

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la nature et de la vie (S.N.V)

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

**Etude de quelques propriétés biochimiques de la
catéchol oxydase des dattes (*Phonix dactylifera L.*)**

devant les membres de jury :

Présidente : M^{me}. REZZOUG Asma

Examineur : M^r. ZERROUKI Mohamed Houcine

Promoteur : M^r GOUZI hicham

Co-promotrice : M^{lle} BEDERINA sara

Présenté par :

M^{lle} : MEZMAZ Rania

M^{lle} : MAATIAT Hana Kawther

Soutenu publiquement le 12/ 06 /2024

Promotion 2023/2024

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions ALLAH, tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a permis de mener à bien ce modeste travail.

*Nos remerciements s'adressent à **Mme. REZZOUG Asma** d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance et à **M. ZERROUKI Mohammed Houcine** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous voudrions exprimer notre sincère gratitude à notre encadrant **M. Gouzi Hicham**, pour la qualité de son encadrement, ses conseils judicieux, ses aides, ses encouragements.*

Arrivé au terme de la rédaction de ce mémoire. Il nous est particulièrement agréable d'exprimer notre gratitude et nos remerciements à tous ceux qui nous ont aidés à sa réalisation par leur soutien et leurs conseils.

Et aussi nos remerciements s'adressent en particulier à tous les enseignants de département de biologie.

Ce travail de mémoire s'est déroulé au laboratoire pédagogique du département de Biologie et au laboratoire des sciences fondamentales de l'université Amar Telidji - Laghouat -

Enfin, nous remercions toute l'équipe administrative et pédagogique du département de biologie de l'Université Amar Telidji

En définitive, Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou loin au cours de la réalisation de ce modeste travail.

Merci à tous.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chers parents pour l'éducation et le soutien durant
tout mon étude.*

A mes chers frères Yacine et Nadjib.

A ma sœur hafida.

A tous les membres de la famille MAATIAT et CHENOUI.

*A mon binôme Rania pour sa patience avec moi et à sa
famille.*

*A mes amis : Rachida, Hanaa, Soraya, kawther, Amina,
Khadidja, Hanane, Fatima, Ikram, safa, khadidja, nadjwa.*

A mes collègues de la promotion de biochimie appliquée 2024

A tous qui me connaissent de près et de loin.

Kawther

Dédicace

*Je dédie cet humble et modeste travail avec grand amour,
sincérité et fierté :*

*La lumière de mes yeux et le bonheur de ma vie à mes chers
parents pour tout leurs sacrifices leurs tendresse leur soutien
et leurs prières durant le long chemin de mes études.*

A mes plus belles sœurs Khawla et Wissal

A mon seul chère frère Mohamed

*Pour leurs patiences et leurs soutien moral ,avec mes
souhails de bonheur, de santé et de succès .*

A tous les membres de la famille MEZMAZ et BOUDERES.

*A mon binôme Kawther pour sa entente et sa sympathie et à
sa famille .*

A mes belles amies Nafissa et Soraya

2.2

*A mes collègues de la promotion de biochimie appliquée
2024 .*

A tous qui me connaisse de près et de loin.

Rania

الملخص

استخلص إنزيم الكاتيكول اوكسيداز من الرطب (دقلة نور) (*Phoenix dactylifera L.*) في محلول منظم فوسفات الصوديوم ذو التركيز 0.05 مول ودرجة حموضة 7 في وجود بوليفينيلبوليبيروليدون . المستخلص الخام يحوي على نشاط إنزيمي واحد وهو الكاتيكولاز حيث قدر هذا النشاط بـ 17570 وحدة إنزيم/مل في الشروط المثلى (30°C , pH 5.6 , كاتيكول 160 Mm) . اتبعت أكسدت الكاتيكول من طرف الإنزيم حركية ميكائيليس-مينتين , قيم الخصائص الحركية المتحصل عليها في الشروط القصوى للقياس , V_{max} و K_m كالآتي: $0.53 \text{ Abs}_{410 \text{ nm}} / \text{min}$, 27 mM , نشاط الكاتيكولاز الامثل هو في درجة حموضة 5.6 و 70 درجة مئوية .

من بين المثبطات المختبرة حمض الأسكوربيك وميتابيسلفيد الصوديوم، الأكثر تثبيطا إزاء نشاط الكاتيكولاز. إذن هذان الأخيران يمكن استخدامهما في مراقبة ظاهرة الإحمرار والسيطرة عليها أثناء تخزين وتحويل التمر. لذلك فإن الكاتيكول اوكسيداز له خصائص كيميائية حيوية مثيرة للاهتمام يمكن استخدامها في مختلف التطبيقات التكنولوجية الحيوية.

الكلمات المفتاحية:

دقلة نور - بونيفينول - أكسيداز - كاتيكولاز - حركة آلية الحفاز - الإحمرار

Résumé

La catéchol oxydase (CO) de datte Deglet noir (*Phoenix dactylifera L.*) a été extraite en milieu aqueux en présence du polyvinylpolypyrrolidone. L'extrait brut de la CO possède seulement une activité catécholase de 17570 UE/mL (pH 5.6, 30°C, catéchol 160 mM).

L'oxydation du catéchol par l'enzyme suit une cinétique michaelienne. Les valeurs des paramètres cinétiques V_{max} et K_m trouvées à pH 5.6 et à 30°C sont respectivement : $0.53 \text{ Abs}_{410 \text{ nm}} / \text{min}$ et 27 mM . L'activité catecholase est optimale à pH 5.6 et à 70°C.

Parmi les acides organiques testés, l'acide ascorbique et l'acide oxalique sont les inhibiteurs de l'activité catécholase les plus puissants. Ces derniers peuvent être utilisés pour contrôler le brunissement des dattes durant leur stockage ou leur transformation.

La CO possède donc des propriétés biochimiques intéressantes qui peut être utilisées dans diverses applications biotechnologiques.

Mots clés : Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) ; catéchol oxydase ; catécholase, cinétique ; mécanisme catalytique ; brunissement.

Abstract

catechol oxidase (CO) Deglet nour date (*Phoenix dactylifera* L.) was extracted in an aqueous medium in the presence of polyvinylpyrrolidone. The crude extract of CO possesses only catecholase activity of 17570 EU / mL (pH 5.6, 30 ° C, 160 mM catechol).

The oxidation of catechol by the enzyme follows Michaelis kinetics. The values of kinetic parameters V_{max} and K_m found at pH 5.6 and 30°C are respectively 0.53 abs_{410nm}/min and 27 mM. Catecholase activity is optimal at pH 5.6 and at 70°C.

Among the inhibitors tested, ascorbic acid and sodium methabisulfite inhibitors are the most powerful catecholase activity. These can be used to control the browning of dates during storage or processing.

CO therefore has interesting biochemical properties that can be used in various biotechnological applications.

Keywords: Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) Catechol oxidase, catecholase, kinetic, catalytic mechanism, browning.

Liste des figures**Liste des tableaux****Liste des abréviations****I. Introduction..... 1****II. Synthèse bibliographique****Chapitre 01 :Les palmiers dattier**

1.1. Généralités.....	4
1.2. Principales caractéristiques des dattes	4
1.3. Description botanique.....	5
1.4. Classification botanique.....	6
1.5. Classification des dattes.....	6
1.5.1. Dattes molles.....	6
1.5.2. Dattes demi-molles	7
1.5.3. Dattes sèches.....	7
1.6. Composition biochimique.....	7
1.6.1. Eau.....	7
1.6.2. Sucres.....	8
1.6.3. Fibres.....	8
1.6.4. Protéines et acides aminés.....	8
1.6.5. Lipides.....	9
1.6.6. Vitamines.....	9
1.6.7. Eléments minéraux.....	10
1.6.8. Pigments.....	10
1.6.9. Composés volatils.....	10
1.6.10. Composés phytochimiques	11
1.7. Caractéristiques morphologiques des dattes Deglet-Nour	11

1.8. Production des dattes	11
1.9. Valeur alimentaire de la datte	12
1.10. Valeur thérapeutique des dattes	12
1.11. Valeur énergétique de la datte	13

Chapitre 02 : la catéchol oxydase

2. La catéchol oxydase	14
2.1. Historique	14
2.2. Nomenclature	15
2.3. Définition	15
2.4. Classification	15
2.5. Source et localisation	16
2.6. La réaction de brunissement enzymatique	17
2.7. Caractéristiques réactionnelles	17
2.8. Structure et le site actif	18
2.8.1. Structure	18
2.8.2 le site actif	20
2.9. Le mécanisme catalytique de catéchol oxydase	22
2.10. Rôle physiologique de la catéchol oxydase	23
2.11. Les méthodes de détermination de l'activité de la catéchol oxydase ...	24
2.11.1. Poids moléculaire	24
2.11.2. Effet du pH	25
2.11.3. Effet de la température	25
2.11.4. Spécificité de substrat	27
2.11.5. Effet des effecteurs	27

2.11.6. Paramètres cinétiques (K_m et V_{max})	29
2.12. Propriétés générales de la polyphénol oxydase	30
2.13. Applications	30

III. Partie expérimentale

Chapitre 03 :Matériel et méthodes

3.1. Matériels	32
3.1.1. Matériel biologique	32
3.1.2. Produits chimiques	32
3.2. Méthodes	32
3.2.1. Extraction de la CO	32
3.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Lowry	33
3.2.2.1. Principe	33
3.2.2.2. Mode opératoire	34
3.2.3 Mesure de l'activité catécholase	35
3.2.4. Effet de la concentration de l'enzyme	35
3.2.5. Détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ...	36
3.2.6. Etude de la spécificité de substrat	36
3.2.7. Effet des inhibiteurs	36
3.2.8. Effet du pH	37
3.2.9. Analyse des résultats expérimentaux	37

Chapitre 04 : Résultats et discussion

4.1. Extraction et purification de la catéchol oxydase	38
4.1.1. Extraction	38

4.1.2. Purification	40
4.2. Effet de la concentration de l'enzyme	41
4.3. Spécificité de substrat	42
4.4. Effet de la concentration de substrat	43
4.5. Stabilité thermique	46
4.6. Effet du pH sur l'activité catécholase	47
4.7. Effet des inhibiteurs	48
4.8. Effet du pH sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max})	50
IV. Conclusion générale	54
V. Références bibliographiques.....	55

As : L'activité spécifique
Av : L'activité volumique
°C : Degré Celsius
CuA : Cuivre A
CuB : Cuivre B
CO : La catéchol oxydase (CO)
Cys : Cystéine
DEAE : Diéthylaminoéthyl
DIECA : le diéthylthiocarbamate de sodium
DOPA : di-hydroxy-phenylalanine
EC : Enzyme commission
EDTA : Le éthylène diamine tétra-acétique acide
ES : complexe enzyme-substrat
FAO : Food and Agriculture Organization
g : Gramme
His : Histidine
Kcal : kilocalorie
KDa : kilodalton
K_m : constante de Michaelis-Menten
M : Molaire
Min : minute
ml : Millilitre
mM : Millimolaire
nm : nanomètre
Mn : Manganèse
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit
O₂ : dioxygène
Os : structures osseuses
PEG : Le polyéthylène glycol
pH : Potentiel hydrogène
pK : Constant de dissociation acid
PPO : Polyphénol oxydase

PVP : la polyvinylpyrrolidone
PVPP : le polyvinylpolypyrrolidone
R² : coefficient de régression linéaire.
[S] : concentration du substrat.
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SO₂ : Dioxyde de Soufre
trs : tours de centrifugation
UI : Unité internationale
V₀ : vitesse initiale
V_{max} : vitesse maximale
Y : La pente
µg : microgramme
µl : Microlitre
µmol : Micromole

Tableau 01 : : Composition chimique des dattes	9
Tableau 02 : Composition vitaminique des dattes	10
Tableau 03 : Teneur en éléments minéraux des dattes	11
Tableau 04 : Caractéristiques des COs d'origine végétale en terme de poids moléculaire, pH et de température pour différents substrats.....	28
Tableau 05 : Caractéristiques des catécholol oxydases de certaines plantes	32
Tableau 06 : Spécificité de substrat de la catéchol oxydase de datte Deglet noir	48
Tableau 07 : les valeurs de K_m et pH optimal de la CO obtenue à partir de différentes sources végétales	50
Tableau 08 : Le pH optimal de la catéchol oxydase de quelques fruits et légumes utilisant le catéchol comme substrat.	53
Tableau 09 : Effet des inhibiteurs sur l'activité catécholase de la catéchol oxydase de datte Deglet noir (<i>Phoenix Dactylifera</i> L.)	54
Tableau 10 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la CO de datte Deglet noir (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	56

Figure 01: Morphologie du fruit et de la graine du dattier	6
Figure 02 : schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées	20
Figure 03 : Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda	23
Figure 04 : L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i>	23
Figure 05 : Structure du site actif de la tyrosinase	23
Figure 06 : Les trois états fonctionnels de la CO, Met ; Deoxy et Oxy	24
Figure 07 : Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la CO	24
Figure 08 : Les dattes Deglet nour d'Algérie (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	35
Figure09: Extrait brut de la datte Deglet Nour (<i>Phænix dactylifera</i> L) avant centrifugation	36
Figure10: Extrait brut de la datte Deglet Nour (<i>Phænix dactylifera</i> L) après centrifugation	36
Figure 11: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry	37
Figure 12 : Vitesse initiale d'oxydation du catéchol en fonction de la concentration de la CO de datte Deglet nour	47
Figure 13 : Représentation de michaelis-Menten de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initial d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la CO Deglet Nour (<i>Phænix dactylifera</i> L.)	49
Figure 14 : representation de Linweaver-Burk en double inversée de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initial d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la CO Deglet Nour (<i>Phænix dactylifera</i> L.)	49
Figure 15 : Stabilité thermique de la CO de datte (Deglet nour ; <i>Phoenix dactylifera</i> L.) après 10 min de traitement thermique	51
Figure 16 : Activité catécholase de la CO de datte Deglet nour en fonction du pH	52
Figure 17 : Dépendance des constantes cinétiques de la CO de datte au pH	58

INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) était primitivement cultivé dans les zones arides et semi arides chaudes de l'Ancien monde (**Munier, 1973**). La culture du palmier dattier constitue jusqu'à aujourd'hui une source de vie principale pour les populations des régions sahariennes. Il représente à la fois, la base de l'activité agricole et une source d'alimentation (**Sawaya et al., 1983; Elleuche et al., 2008**). En plus de leur utilisation dans l'alimentation, les dattes sont utilisées traditionnellement dans le domaine médical (**Benchelah et Maka, 2008**).

Les palmeraies étaient constituées de plusieurs dizaines de cultivars différents, offrant une diversité extraordinaire dans la forme, la couleur, la précocité et le goût de la datte, ainsi que l'aptitude de l'arbre à résister la salinité et aux maladies aussi dangereuses que le Bayoud (**Munier, 1973**).

En Algérie, le palmier dattier occupe une superficie évaluée à 167.000 hectares, localisées au Nord-est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (**Ghazi et Sahraoui, 2005**). La diversité génétique du phœnicicole algérien permet d'enregistrer plus de 800 variétés, qui sont distribués en plus de 18 millions d'unités (**Lounes et Boualem, 2015**).

Selon la FAO en 2017, l'Algérie est classée au quatrième rang mondial en termes de production de dattes. Elle produit environ 14% de l'ensemble de la production mondiale de dattes qui atteint presque 1 100 000 tonnes. Cependant, les exportations de dattes sont relativement petites une fois comparées à la production totale : l'Algérie exporte moins de 3% de sa production totale. Indépendamment des problèmes de vente, le niveau bas des exportations est également dû à un manque de structures industrielles, en particulier pour le traitement et conditionnement des dattes (**Boubekri, 2010**).

Les importateurs (européens) de dattes repartissent celles-ci en deux catégories selon des critères très arbitraires (**Dowson et Aten, 1963 ; Toutain, 1972**) : les dattes fines ou exportables dont le type Deglet Nour et les dattes communes (**Ghars, Degla-beida, Mech-degla, Tazerait, Tantboucht,...**), qui sont en général de faible valeur marchande et très difficiles à conserver (**Barreveld, 1993**).

Les statistiques actuelles prouvent que l'Algérie est le principal producteur et exportateur de la datte Deglet-Nour. Ce cultivar est caractérisé par sa consistance demi molle, sa couleur claire et son aspect transparente, ce qui lui offre une valeur marchande élevée (**Barreveld, 1993**).

Du point de vue biochimique, les dattes sont une source alimentaire très appréciée pour leur propriétés médicinales et leur richesse en sucres, protéines, fibres, lipides, vitamines, sels minéraux et en composés phénoliques (**Hurst, 2008**).

La présence des composés phénoliques dans les dattes augmente leur propriétés médicinales, particulièrement la protection contre les maladies cardiovasculaires (**Mansouri et al., 2005**). La concentration de ces composés est très variable d'une variété à autre et diminue régulièrement durant la maturation ainsi que la période de récolte et le stockage par différentes voies du brunissement (**Macheix et al., 1990**). A priori, ceci est lié à des variations quantitatives mais aussi qualitatives des teneurs en composés phénoliques (**Amiot et al., 1992; Aubert et al., 1992; Nicolas et al., 1994**).

La pratique de conservation et stockage de ce fruit était déjà présente, sous diverses formes, dans les traditions étant donné que la récolte assurée une fois par an. Cependant, la détérioration des dattes au cours de stockage est un problème majeur et entraîne des modifications indésirables de l'apparence, du goût et de la valeur nutritive du fruit (**Khali et Selselet-Attou, 2007**).

Les réactions de brunissement sont largement rencontrées dans les produits alimentaires et constituées avec d'autres propriétés organoleptiques, la base de l'acceptabilité de l'aliment. Ces réactions sont l'une des altérations les plus soulignées au cours le stockage des dattes et jouent un rôle majeur dans la commercialisation des dattes au niveau local et international (**Macheix et al., 1990**).

Les phénomènes de brunissement dans les produits alimentaires à base de fruits et légumes sont fréquemment observés, notamment lors des traitements mécaniques (pelage, broyage) ou thermiques (chauffage, congélation-décongélation). L'apparition de pigments bruns, entraîne des modifications importantes des produits transformés, diminue fortement leurs attractivités organoleptiques et leurs richesses en composés d'intérêts nutritionnels (composés phénoliques) (**Arsian et Dogan, 2005; Kolcuoglu et al., 2006**). Ce phénomène pourrait être attribué à des réactions enzymatiques ou non enzymatiques (**Khali et Selselet-Attou, 2007**).

Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte la couleur des aliments et touche plus les tissus qui sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage. Il résulte principalement de l'activité enzymatique des catéchol oxydases (CO) (EC 1.10.3.1). Ce sont des métallo-enzymes à cuivre largement répandue dans le monde végétal (pomme, poire, avocat, banane, pomme de terre, champignon, artichaut, laitue, papaye, pêche, datte,...) (**Martinez et Whitaker, 1995**).

La CO est plus spécifique et catalyse principalement une seule réaction : L'oxydation des o-diphénols en o-quinones, connue sous le nom d'activité catécholase., avec consommation de l'oxygène moléculaire (**Espin et al., 1998**). Par la suite, ces quinones se polymérisent et donnent des composés bruns. Chez les végétaux supérieurs, ces enzymes

catalysent principalement des réactions de type catéchol oxydase (**Rodriguez-Lopez et al., 1992**).

La CO est présente la même structure et des caractéristiques fonctionnelles semblable pour les différentes sources biologiques de cette enzyme. Elle est majoritairement présentes dans les plastides des plantes, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs (**Vaughn et Duke, 1984**). Ainsi, elle présente dans les différents organes des végétaux supérieurs (racine, graine, feuille, peau et cortex du fruit) (**Macheix et al., 1990**).

En raison de sa participation majeure aux effets indésirables du brunissement enzymatique, la CO est devenue l'objet de toutes les attentions des chercheurs traitant de la conservation des produits alimentaires. Par des procédés de traitements thermiques tels que la pasteurisation ou la stérilisation, il est possible d'obtenir une dénaturation très rapide de la CO (donc réduisent voire évitent l'oxydation enzymatique); mais ne répondent pas à la demande actuelle des consommateurs qui ont des tendances croissantes dans la sélection des aliments considérés non seulement de valeur nutritive élevée, mais aussi de haute qualité (**Vámos-Vigyázó, 1981**).

Notre étude sera consacrée par conséquent à la recherche d'une meilleure compréhension de cette enzyme extraite à partir de dattes de Phoenix dactylifera L., variété de Deglet Nour, l'objectif principale de notre travail c'est souligner l'importance de l'activité enzymatique du catéchol oxydase et son implication directe dans le brunissement par l'analyse de quelques paramètres influençant leur CO. Afin de souligner l'importance de cette enzyme, nous atteindrons les objectifs suivants :

- La détermination de l'activité enzymatique d'extrait brut et les paramètres cinétiques de l'enzyme (V_{max} , K_m).
- Etude de l'effet du pH sur l'activité enzymatique de CO.
- Etude de la spécificité du substrat.
- Etude de l'effet inhibiteur de différentes substances sur l'activité enzymatique de CO.

Notre travail sera présenté en quatre chapitres est séquencé comme suit. Le première partie concerne une synthèse bibliographique comportant deux chapitres aussi précise et actuels dont un chapitre sur la palmier dattier ,un deuxième sur l'enzyme elle-même catéchol oxydase « CO » .Dans la troisième chapitre est conçu pour la présentation de matériels et méthodes utilisés et/ou appliqués . La quatrième partie est dédiée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Une récapitulation et/ou conclusion succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la CO de dattes sont regroupées dans le dernier partie.

II. SYTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 :
Les palmiers dattier

1. palmier dattier :

1.1. Généralités :

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1753. *Phoenix* dérivé de *Phoinix*, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme arbre des phéniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylus*, dérivant du grec *dactylos*, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin *fero*, porté en référence aux fruits (**Ben Abbes., 2011**).

Au niveau de la taxonomie, le palmier dattier est une plante de grande taille, monocotylédone, spadiceflore appartenant à la famille de *Palmaceae*, Sous famille de *Coryphoideae*, le genre *Phoenix* et l'espèce *dactylifera* (**Lasram et al, 2002**). Le genre *Phoenix* comporte au moins douze espèces, dont la plus connue est *dactylifera* et dont les fruits " dattes " font l'objet d'un commerce international important (**Espiard., 2002**).

Le palmier dattier revêt une importance capitale dans la stabilité socio-économique du Sahara algérien qui représente les (4/5) du territoire national (**Dubost, 1991**). Plusieurs bassins phoenicicoles y sont nés : Aurès, Ziban, Souf, Oued Righ, Pays du Ouargla, M'zab, Touat/Gourara, Tidikelt/Tassili, la vallée de la Saoura. Le Bas Sahara constitue l'aire privilégiée et représentative de la palmeraie algérienne pour la culture de la variété *Deglet-Nour*, hautement prisée tant sur le marché national qu'international (**Dakhia., et al., 2013**).

1.2. Principales caractéristiques des dattes :

Les dattes, fruits du palmier dattier (*Phoenix Dactylifera* L.) ont été historiquement et sont encore considérées parmi les meilleurs aliments énergétiques de l'être humain. La composition à prédominance de sucres, riche en minéraux avec présence de quelques protéines et vitamines offrent à la datte une assimilabilité facile par le corps humain et la qualifient pour un aliment énergétique appréciable.

Les dattes sont composées d'un mésocarpe charnu protégé par un fin péricarpe. L'endocarpe se présente sous la forme d'une membrane très fine entourant la graine, appelée communément noyau. La couleur de la datte est variable selon les espèces : jaune plus ou moins clair, jaune ambré- brun plus ou moins prononcé, rouge ou noir. Sa consistance est également variable, elle peut être molle, demi molle, ou sèche (**Munier, 1973**).

Les différentes classes de dattes qui existent, reposent sur leur qualité commerciale et leur consistance (**Djerbi, 1994**). Celle-ci dépend du stade de maturation du fruit et de la teneur en eau de la pulpe (**Munier, 1963**). La stabilité de la datte dépend de la proportion de sucres par

rapport à la teneur en eau, qui permet ainsi d'apprécier l'aptitude à la conservation des dattes (**Bouabidi, 1996**). On peut ainsi, distinguer trois catégories de dattes :

- Les dattes molles : sont des fruits pâteux et visqueux dont la chaire manque de consistance (**Toutain, 1972**). Ces dattes passent par le stade Routab et demeurent molles au stade tamar. Il s'agit de la plus part des dattes à sucres réducteurs (**Dowson et Aten, 1963**).
- Les dattes demi molles : ces dattes passent par le stade Routab, mais sont un peu sèches au stade tamar et à de texture élastique et visqueuse. Elles contiennent une proportion presque égale en sucres réducteurs et en saccharose (**Toutain, 1972**). Les sucres sont le plus souvent réducteurs. (**Dowson et Aten, 1963**). Exemple : Deglet Nour, Kenta, Tazerzeit.
- Les dattes sèches : elles ne passent pas par le stade Routab et à une consistance solide et dure. Elles sont pour la plus part à saccharose (**Munier, 1963**).

1.3. Description botanique :

La datte est une baie constituée d'une partie charnue, la chair ou pulpe, et d'un noyau. La chair de la datte comporte:

- Une enveloppe cellulosique fine, l'épicarpe ou la peau;
- Le mésocarpe plus ou moins charnu et de consistance variable;
- L'endocarpe est réduit à une membrane parcheminée, entourant la graine ou noyau (**MUNIER, 1973; DJERBI, 1994**) .

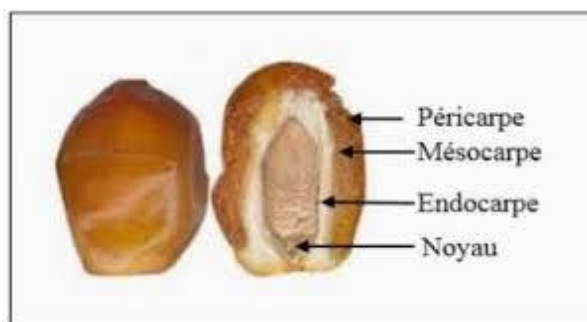


Figure 01 : Morphologie du fruit et de la graine du dattier.

La datte est attachée au pédicelle par le périanthe, celui-ci est formé par les restes desséchés et durcis d'un calice à trois tépales et d'une corolle à trois pétales. Le degré d'adhérence du périanthe à la datte dépend du stade de maturation, mais surtout de la variété (**DOWSON et ATEN, 1963**).

1.4. Classification botanique :

En Algérie, seulement l'espèce du palmier dattier « *Phoenix dactylifera* L . » existe. La classification botanique ainsi correspondante a été actualisée en 2016 par le service de conservation des ressources naturelles de département américain d'agriculture (USDA) et est donnée comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Super-embranchement : Spermatophyta

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida – Monocotyledons

Sous-classe : Arecidae

Ordre : Arecales

Famille : Arecaceae

Genre : Phoenix L.

Espèce : *Phoenix dactylifera* L.

1.5. Classification des dattes :

Les dattes sont classées en trois catégories, d'après leur consistance: molles, demi- molles et sèches (**DOWSON et ATEN, 1963; MUNIER, 1973; DJERBI, 1994**).

1.5.1. Dattes molles :

Les dattes dites de consistance molle, passent par le stade Routab et demeurent molles jusqu'au stade Tmar (**DOWSON et ATEN, 1963**). Ce sont, pour la plupart, des dattes à sucres réducteurs (Ghars). Elles sont caractérisées par la grande teneur en eau de la pulpe, renfermant plus de 30% d'eau (**ATEF et KHALIF, 1998; CHAHATA, 2000; BARABANDI et al., 2000**). La datte demeure molle parce qu'au stade Routab le saccharose va s'invertir en sucres réducteurs (glucose et fructose) qui sont des sucres simples très solubles (**AHMED et al., 1995; AL-FARSI et LEE., 2008**).

1.5.2. Dattes demi-molles :

Les dattes demi-molles passent bien par le stade Routab, mais sont un peu sèches au stade Tmar (**DOWSON et ATEN; 1963**). Après le stade Routab, cette classe de datte perd une partie d'eau pour devenir dans une phase intermédiaire entre sèche et molle (**ATEF et KHALIF, 1998**). La teneur en eau de la pulpe est moins élevée, se situant aux environs de 20 à 25%, avec une proportion presque égale en sucres réducteurs et en saccharose (Deglet-Nour) (**CHAHATA, 2000; BARABANDI et al., 2000**).

1.5.3. Dattes sèches :

Les dattes sèches ne passent pas par le stade Routab (**BARABANDI et al., 2000**). Elles évoluent directement du stade Khalal au stade Tmar, sans ramollissement, leur pulpe est naturellement sèche (**MUNIER, 1973**), avec moins de 20% d'eau (**CHAHATA, 2000; BARABANDI et al., 2000**). Elles sont riches en saccharose (**DOWSON et ATEN, 1963**). C'est l'exemple type de Mech-Degla (**MUNIER, 1973; DJERBI, 1994**).

1.6. Composition biochimique :

La chair représente 80 à 95% du poids frais. Elle est constituée de la majorité des composés essentiels et nécessaires à l'organisme (sucres, protéines, éléments minéraux, fibres, vitamines, polyphénols). Cependant la teneur en ces composés est variable selon les cultivars.

1.6.1. Eau :

L'eau est l'un des constituants principaux de la datte. Sa teneur passe de 85% au stade «Kimri» à 50 ou 60% au stade «Khalal». Au stade «Routab», la datte renferme 35 à 40% d'eau, sa teneur diminue au stade Tmar (**CHAHATA, 2000**). A ce stade, la teneur en eau diffère selon le cultivar et le climat. Les limites de cette valeur varient de 7,2 à 50,4 g /100g du poids de la chair fraîche (**tableau 01**) (**AL-FARSI et LEE, 2008**).

Tableau 01 : Composition chimique des dattes (AL-FARSI et LEE, 2008)

Composition	Teneur(g/100g)
Eau	7,2-50,4
Sucres totaux	52,6-88,6
Glucose	17,6-41,4
Fructose	13,6-36,8
Saccharose	0,5-33,9
Lipides	0,1-1,4
Protéines	1,1-2,6
Fibres	3,53-10,9

1.6.2. Sucres :

Les sucres représentent 95 % du poids sec de la datte entière. La teneur en sucre varie en fonction du climat, du stade de maturation de la datte, de cultivar et de sa consistance. Elle est de 52,6 à 88,6 g/100g de la pulpe (**tableau 01**) (AL-FARSI et LEE, 2008). Tous les auteurs s'accordent sur l'existence de trois principaux glucides chez la datte qui sont le saccharose, le glucose et le fructose. Les dattes molles sont caractérisées par une teneur élevée en sucres réducteurs (glucose, fructose), et les dattes sèches par une teneur élevée en saccharose (BARREVELD, 1993; CHAHATA, 2000).

1.6.3. Fibres :

La chair de la datte est principalement composée de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Au cours de la maturation, ces substances sont dégradées par les enzymes en composés plus solubles, ce qui donne à la datte un aspect tendre et doux. La teneur en fibres brutes des dattes varie de 3,53 à 10,9 g/100g selon la consistance (**tableau 01**) (AL-FARSI et LEE, 2008).

1.6.4. Protéines et acides aminés :

La datte n'est pas une source importante de protéines. Elle renferme une faible quantité allant de 1,5% à 2% de protéines (ATEF et KHALIF, 1998) et de 1,7% à 2,95% de protéines (CHAHATA, 2000). Les protéines jouent un rôle dans le brunissement non enzymatique

(réaction de Maillard) et dans la précipitation des tanins au cours de la maturation (**BARREVELD, 1993**).

Bien que la teneur des dattes en protéines soit relativement faible elle n'est pas négligeable comme complément protéique. Les protéines des dattes sont qualitativement bien équilibrées parce que leur composition en acides aminés correspond à celle des besoins de l'organisme. Elles renferment tous les acides aminés essentiels (**HUSSEIN et al., 1989; BARREVELD, 1993**). Treize acides aminés ont été trouvés dans les dattes de la variété Khalas d'Arabie Saoudite. Il s'agit de la glycine, de l'acide glutamique, de l'acide aspartique, de la leucine, de l'isoleucine, de la lysine, de la tyrosine, de l'arginine, de l'alanine, du tryptophane, de la thréonine, de la valine et de la sérine (**ATEF et KHALIF, 1998**).

1.6.5. Lipides :

La pulpe de la datte renferme de faibles teneurs en lipides (0,1 à 1,4 g/100g). Les principaux acides gras présents dans la pulpe de la datte sont l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide linoléique, l'acide oléique et l'acide myristique (**EL AREM et al., 2011**).

1.6.6. Vitamines :

La pulpe des dattes en contient en quantités variables, selon la variété et la provenance. Généralement, elles contiennent de la vitamine E et des vitamines du groupe B (B1, B3, B6, B9 B12) (**ISMAIL et ALTUWAIRKI, 2016**) en quantités appréciables (**tableau 02**), mais peu de vitamine C au stade Tmar (**AL-SHAHIB et MARSHALL, 2003**).

Tableau 02 : Composition vitaminique des dattes (**ISMAIL et ALTUWAIRKI, 2016**)

Vitamines	Teneur (mg/100g)
Thiamine (B1)	0,55
Niacine (B3)	0.40
Pyridoxine (B6)	2.38
Acide folique (B9)	0.05
Cobalamine (B12)	0.55
Vitamine E	19,74

1.6.7. Eléments minéraux :

Les dattes peuvent être considérées comme des fruits riches en élément minéraux. Leur teneur varie entre 0,01 (Mn et Cu) et 1287 (K) mg/100g (**tableau 03**) (**AL-FARSI et LEE, 2008**). Les éléments majeurs sont le potassium, le phosphore, le calcium, le sélénium et le magnésium.

Tableau 03 : Teneur en éléments minéraux des dattes (**AL-FARSI et LEE, 2008**)

Eléments minéraux	Teneur (mg/100g)
Potassium	345-1287
Sodium	1-261
Calcium	5-206
Magnésium	31-105
Phosphore	35-74
Cuivre	0,01-0,8
Fer	0,10-1,5
Zinc	0,02-0,6
Manganèse	0,01-0,4

1.6.8. Pigments :

Les principaux pigments identifiés dans les dattes d'Egypte sont les carotènes, les anthocyanes, les flavones, les flavonoles, le lycopène, la lutéine et la flavoxanthine. Il a été signalé la présence de la chlorophylle, des caroténoïdes, des anthocyanes et des anthocyanidines dans 8 variétés de dattes Irakiennes au stade Kimri et Khalal (**BARREVELD, 1993**).

1.6.9. Composés volatils :

Les dattes contiennent plusieurs substances responsables de l'arôme spécifique de chaque variété. HARRAK et al. (2005), ont identifié 47 composés dans huit variétés de dattes marocaines. Les composés majeurs sont la 2,3-pentanedione, le 2-méthyl-butanal, l'hexanal, le n-pentanol et le limonène. **EL AREM et al. (2011)**, signalent la présence de 81 composés dans

les variétés Deglet Nour, Alig, Degla, Gosbi et Horra de Tunisie dont 20 esters, 19 alcools, 10 terpènes, 13 aldéhydes, 6 cétones, 12 hydrocarbures et 1 lactone.

1.6.10. Composés phytochimiques :

La pulpe de la datte est riche en composés phytochimiques comme les polyphénols, les stérols, les flavonoïdes, les caroténoïdes et les anthocyanes. Ces composés jouent un rôle important dans la qualité nutritionnelle et organoleptique de la datte (**BARREVELD, 1993; MANSOURI et al., 2005; AL-FARSI et al., 2005a**).

- Acides phénoliques
- Tanins condensés
- Flavonoïdes
- Caroténoïdes
- Anthocyanes

1.7. Caractéristiques morphologiques des dattes Deglet-Nour :

Deglet-Nour est un cultivar demi-molle de couleur rouge au stade Bser. Au stade Tmar, sa couleur devient ambrée. Il est de forme ovoïde et de texture fibreuse (**HANNACHI et al., 1998**). Le poids moyen de la datte est de 10,97 g (**SAYAH et OULD EL HADJ, 2010**). Sa taille varie de 3 à 5cm (**HANNACHI et al., 1998**). Le rapport noyau/datte entière est de 8 à 12% (**MUNIER, 1975**).

Le noyau est lisse de couleur marron, de forme ovoïde pointu aux deux extrémités. Le poids du noyau est de 0,7 g (**SAYAH et OULD EL HADJ, 2010**).

1.8. Production des dattes :

La datte est l'un des fruits les plus importants dans le monde et spécialement dans les pays islamiques qui consomment beaucoup de dattes surtout au mois de Ramadan. 70 % de la production des dattes dans le monde est produit par l'Égypte, l'Iraq, l'Arabie Saoudite, Iran, Pakistan et l'Algérie (**Nezam EL Din, 2000**).

L'Algérie ont un prix à l'exportation le plus cher, car ils exportent les variétés de bonne qualité : Deglet Nour (**Botes et Zaid, 1999**).

1.9. Valeur alimentaire de la datte :

La datte renferme des éléments nutritifs indispensables à l'organisme humain. Elle renferme principalement :

- _ Une quantité appréciable de sucres (principale source d'énergie), surtout les dattes molles qui sont riches en sucres réducteurs (glucose et fructose), facilement assimilables par l'organisme.
- Des protéines en faibles quantités mais qualitativement bien équilibrées (telle que la leucine, l'isoleucine, la thréonine et la lysine), pouvant contribuer efficacement à l'amélioration d'une ration alimentaire.
- Des éléments minéraux, tels que le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium et le sélénium
- Des vitamines A, B1, B2 en quantités suffisantes pour couvrir les besoins de l'organisme (**ATEF et KHALIF, 1998; CHAHATA, 2000**) (**tableau 02**). Pour SIBOUKEUR (1997), les dattes des variétés Tanslit et Litim avec des teneurs respectivement de 0,53 mg/100g et de 0,54 mg/100g de pulpe fraîche; peuvent constituer une bonne source en vitamine B1. Cette vitamine facilite l'oxydation des sucres, notamment ceux apportés par les dattes (indispensable à la décarboxylation oxydative du pyruvate, étape importante de l'oxydation du glucose). ISMAIL et ALTUWAIRKI (2016) rapportent que les dattes de la variété Sukkari, renferment 19,74mg /g de vitamine E qui joue un rôle antioxydant;
- Des fibres qui aident au maintien de la régulation des fonctions du colon.

1.10. Valeur thérapeutique des dattes :

L'utilisation de la datte en pharmacologie remonte à l'Antiquité par les populations des régions phœnicicoles. Les décoctions de dattes sont utilisées comme calmant pour les maladies nerveuses, les affections pulmonaires et de la gorge; mais surtout contre les insomnies et les diarrhées infantiles (**MUNIER, 1973; ATEF et KHALIF, 1998; CHAHATA, 2000**). Les huiles extraites du noyau de la datte traitent le rhumatisme articulaire (**CHAHATA, 2000**). Les noyaux de dattes sont utilisés comme traitement pour l'excrétion des calculs rénaux (**CHAHATA, 2000**). Les décoctions des dattes parthénocarpiques étaient utilisées comme diurétique et contre les hémorroïdes. La consommation des dattes était recommandée aux femmes qui allaitaient pour favoriser la lactation (**MUNIER, 1973**). La datte peut être

considérée comme étant un aliment riche en fer (2,03mg de fer/100g de pulpe pour la variété Ghars, 0,83 mg de fer/100g de pulpe pour la variété Tanslit et 1,3mg de fer/100g de pulpe pour la variété Litim). Elle peut contribuer à combattre les anémies ferriprives (**SIBOUKEUR, 1997**). Elle peut aussi être utilisée dans les régimes hypoglucidiques et hypocaloriques grâce à la présence du fructose qui possède un pouvoir sucrant plus élevé que celui du saccharose et du glucose (**SIBOUKEUR, 1997**).

Les dattes sont riches en composés phénoliques (**TELLI, 2009**) qui sont connus par leurs effets bénéfiques sur la santé humaine contre les maladies dégénératives (cancer et maladies cardiovasculaires).

1.11. Valeur énergétique de la datte :

La datte contient une faible teneur en lipides et en protéines, mais elle est riche en sucres (environ 75% de sa composition), ce qui lui confère une grande valeur calorique. 100g de pulpe de dattes donne 314 kcals (**AL-FARSI et LEE., 2008**). Cette valeur est proche de celle du miel d'abeilles, estimée à 304,5 kcals pour 100 g et est supérieure à celle fournie par le riz, le lait de vache et le jus de fruits (**CHAHATA, 2000**).

Chapitre 02:
La catéchol oxydase

2. La catéchol oxydase :

2.1. Historique :

La catéchol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein 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 bleu dans les plantes (**Whitaker, 1995 ; Zawstowski et al., 1991 ; Vámos-Vigyázó, 1981**). La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle de la catéchol oxydase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (**Lerch, 1981**). La catéchol était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (**Zawstowski et al., 1991 ; Robb, 1984 ; Escribano et al., 1989**). Ces recherches ont porté d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieurs (**Bonner, 1956**).

Les chercheurs se sont intéressés aux Os de diverses sources comme : les truffes (**Miranda et al., 1992 ; Miranda et al., 1996 ; Perez-Gilabert et al., 2001 ; Zarivi et al., 2003**), les champignons (**Frieden et Ottesen, 1959 ; Smith et Krueger, 1962 ; Duckworth et Coleman, 1970 ; Papa et al., 1994a,b ; Gouzi et Benmansour, 2007**), la banane (**Palmer, 1963 ; Ôba et al., 1992 ; Sojo et al., 1998 ; Thomas et Janave, 1986**), les tubercules de pomme de terre (**Patil et Zucker, 1965 ; Matheis, 1987a,b ; Pathak et Ghole, 1994 ; Cho et Ahn, 1999a,b ; Marri et al., 2003**), les épinards (**Golbeck et Cammarata, 1981**), l'artichaut (**Ziyan et Pekyardimci, 2003**), la poire (**Ziyan et Pekyardimci, 2004**), le coing (**Yağar et Sağiroğlu, 2002**), la pêche (**Wong et al., 1971**), l'abricot (**Chevalier et al., 1999**), les feuilles de tabac (**Shi et al., 2012**) et le cerise (**Kumar et al., 2008**). Bien que la catéchol oxydase ait été découverte et purifiée il y a bien longtemps (**Keilin et Mann, 1938 ; Schoenbein, 1856**), c'est beaucoup plus récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger (**Jolivet et al., 1998**).

2.2. Nomenclature:

Des noms différents ont été associés à la catéchol oxydase dont : diphenol oxydase, o-diphénolase, polyphénol oxydase, pyrocatechol oxydase, dopa oxydase, catécholase, o-diphénol oxydoréductase (**ExplorEnz, n.d.**) . La catéchol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats qui sont généralement de o-quinones (**Rivas et Whitaker, 1973 ; Sugumaran et al ., 1998; Burton, 1994**).

2.3. Définition :

Catéchol oxydase est une enzyme appartenant à la classe des oxydoréductases. Elle catalyse spécifiquement l'oxydation des o-diphénols (catéchols) en o-quinones. Cette enzyme joue un rôle important dans la biosynthèse des pigments chez les plantes et dans les mécanismes de défense contre les pathogènes (**ExplorEnz, n.d.**).

La CO également appelée tyrosinase est une oxydoréductase 1,2-benzenediol : oxygène. C'est une enzyme à cuivre (**Kazandjian et Klibanov, 1985**). La CO est présente dans quelques bactéries et mycètes et dans la plupart des végétaux (**Sapers, 1993**).

2.4. Classification:

La CO a été placée dans deux catégories principales :

1) monophénol monooxygénase ou tyrosinase (EC 1.14.18.1) :

La Catéchol oxydase (EC 1.10.3.1), également connue sous le nom de diphenol oxidase, est classée dans la catégorie des monophénol monooxygénases ou tyrosinases (EC 1.14.18.1). Cette enzyme catalyse la conversion des monophénols en o-diphénols en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons (**Decker et Terwilliger, 2000**).

2) o-diphénol : O2 oxydoréductase (EC 1.10.3.2):

Cette classification distingue les deux activités de crésolase et de catécholase de la même enzyme, désignée sous le nom d'oxydase du catéchol (EC 1.10.3.2). La catéchol oxydase est spécifiquement impliquée dans l'oxydation des o-diphénols en o-quinones, jouant ainsi un rôle crucial dans la biosynthèse des pigments végétaux et dans les mécanismes de défense des plantes contre les pathogènes .

Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawstowski et al., 1991).

2.5. Source et localisation :

Les COs ont été découvertes 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 arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (Burton, 1994 ; Whitaker, 1995 ; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006). La localisation subcellulaire de la CO n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawstowski et al., 1991 ; Mayer et Harel, 1979).

Chez les plantes saines, la CO est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Mayer et Harel, 1979 ; Zawstowski et al., 1991. Whitaker et Lee, 1995). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006).

Les meilleures préparations des COs sont issues de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (Solomon et al., 1996). Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus*, est reconnu comme étant la source naturelle majeure de la CO (Chen et Flurkey, 2002 ; Burton, 1994). La CO est présente dans les différentes parties du champignon avec des proportions variables (Zhang et Flurkey, 1997). La localisation intracellulaire de la CO 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. La distribution de la CO dans les différentes parties des fruits et légumes peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble dépend de l'espèce, de l'âge, et dans les fruits ou les légumes, de la maturité (Vámos-Vigyázó, 1981). Le niveau de l'activité de la CO dans les plantes dépend de l'espèce, de la maturité, de l'âge et du stockage. Dans certains cas, cette activité peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables. Cette activité est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel, 1991).

2.6. La réaction de brunissement enzymatique :

Le brunissement enzymatique est un processus chimique, impliquant des catéchols oxydase telles que Laccase et Pyrocatéchol-oxydase donnant une couleur brune.

Le brunissement enzymatique nécessite la présence de l'oxygène, ce qui se produit par exemple quand une pomme est coupée ou blessée. La concentration en cuivre joue un rôle très important dans cette réaction. **(Barrett et al, 2005)** Les phénols oxydés lors du brunissement sont responsables en partie de la flaveur et de la couleur des fruits et légumes. **(Shahidi et Naczk, 2004).**

Le brunissement enzymatique peut avoir lieu lors de :

- La croissance des fruits, c'est l'exemple de la datte **(Mann, 2008)**.
- Ou durant l'endommagement mécanique lors du traitement et des manipulations post récolte. **(Man, 1999)**.
- la conservation et des transformations technologiques. **(Jeantet et al., 2006)**.

La formation des pigments bruns n'est cependant pas toujours indésirable ; un certain degré de brunissement est en effet recherché lors de la maturation des fruits secs (dattes, pruneaux et raisins) **(Jeantet et al., 2006)**.

2.7. Caractéristiques réactionnelles :

En présence d'oxygène moléculaire, la CO catalyse deux réactions bien distinctes **(Figure 02)** à savoir l'ortho-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (catéchols) (activité crésolase ou hydroxylase, monophénolase) (Réaction (1)) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénol en o-quinones, activité fréquemment désignées sous le nom de la catéchol oxydase, o-diphénol oxydase, catéchol oxydase ou activité catécholase (EC 1. 10. 3. 1) (Réaction (2)) **(Tomas-Barberà et Granata et al., 2001)**.

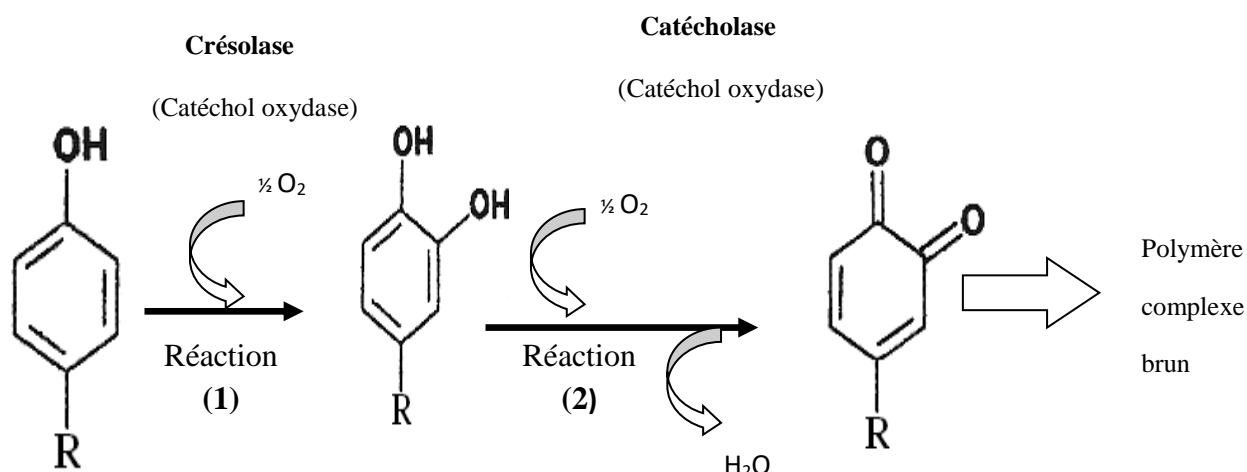


Figure 02 : schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994; Van Gelder et al., 1997).

Les o-quinones produits de la transformation des substrats de la CO sont fortement réactifs et peuvent subir des réactions de polymérisation et de cyclisation non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène noir, brun ou rouge, généralement appelé mélanine, soit réagir avec des acides aminés ou des protéines pour produire des composés colorés (Burton, 1994).

2.8. Structure et le site actif

2.8.1. Structure :

La structure cristallographique de la CO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la CO, 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). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et al., 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright et al., 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et al., 1997).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la CO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des COs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des COs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch, 1982**). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (**Klabunde et al., 1998**). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des *o*-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox.

Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (**Mayer, 1987**). Seule la structure cristalline de la CO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (**Klabunde et al., 1998**).

La CO native du champignon de souche *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, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H_2L_2 . Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L_2H . Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la CO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (**Strothkamp et al., 1976 ; Robb, 1984 ; Zawstowski et al., 1991 ; Whitaker, 1995 ; Van Gelder et al., 1997 ; Jolivet et al., 1998**).

Selon Wichers et al, (1996), les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune activité enzymatique. Les COs des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité, et sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la CO d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est

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 COs 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.

2.8.2 le site actif :

Il a été montré, que la CO peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (**Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003, Baldwin et al., 1992**).

La CO est une métalloenzyme vraie 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 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (**Mayer et Harel, 1991**).

La structure secondaire de la CO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7), (**Jolivet et al., 1998 ; Eicken et al., 1999 ; Haghbeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006**). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice α_2 (**Figure 3**). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (**Figure 4**). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est située au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (**Klabunde et al., 1998**). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la CO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (**Figure 5**) (**Van Gelder et al., 1997**).

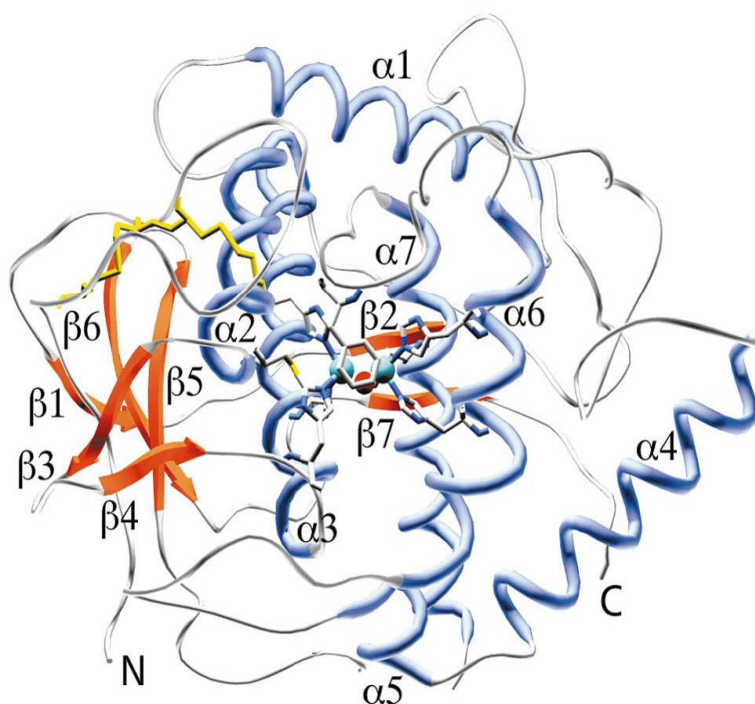


Figure 3: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et al., 1999).

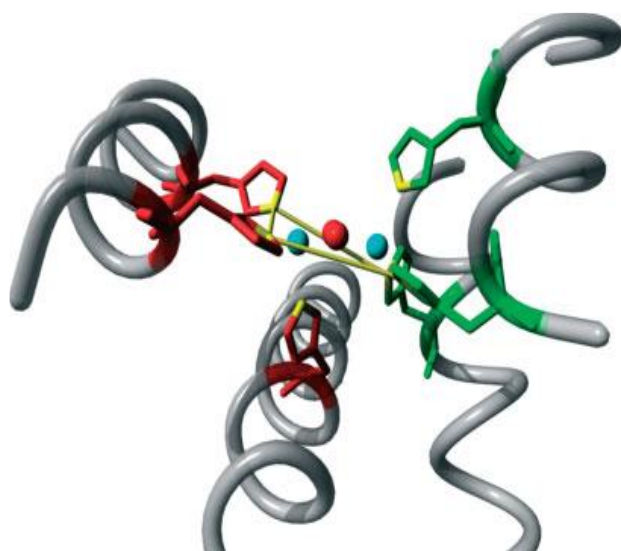


Figure 4: L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

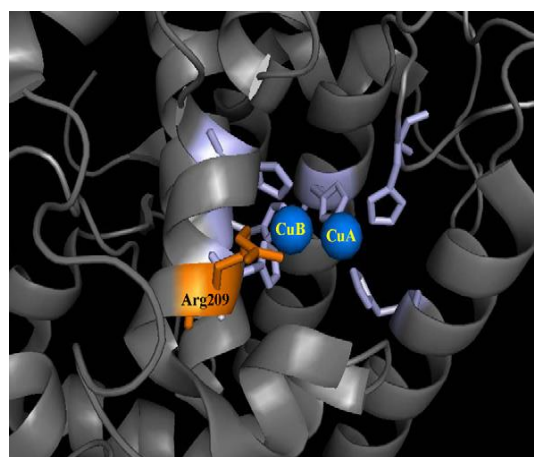


Figure 5: Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet clair) (Ben-Yosef et al., 2010).

2.9. Le mécanisme catalytique de catéchol oxydase :

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les COs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer et al. (1995), le site actif des COs peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : deoxy (CuI-CuI), oxy (CuII-O₂-CuII) et met (CuII-CuII). La forme met, est convertie en forme deoxy par double réduction électronique, et la forme deoxy résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme oxy (**Figure 6**).

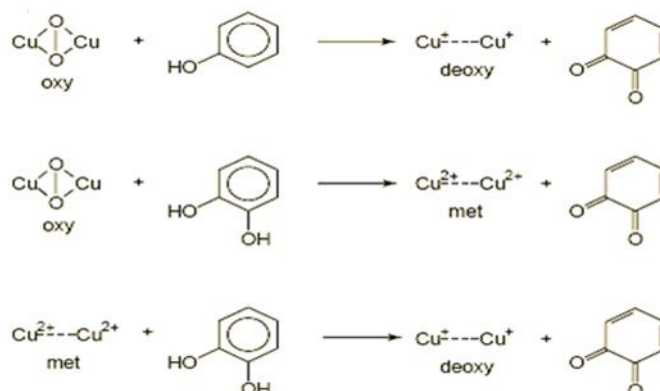


Figure 6: Les trois états fonctionnels de la CO, Met ; Deoxy et Oxy CO d'après **Van Gelder et al. (1997)**.

Le modèle du mécanisme réactionnel de l'activité catécholase de la CO est représenté dans la (**Figure 7**).

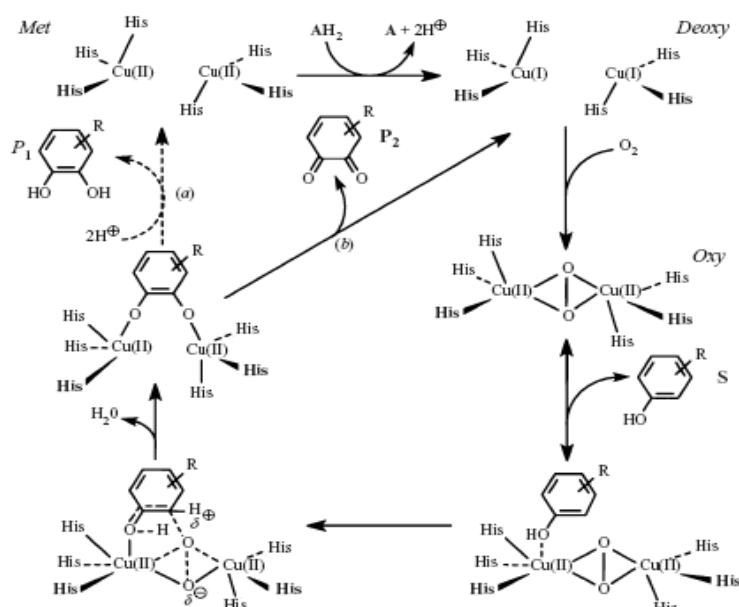


Figure 7: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la CO **Solomon et al. (1992)**.

L'activité catécholase, implique l'oxydation de deux *o*-diphénols en deux quinones, avec la réduction concomitante de $4e^-$ de l'oxygène moléculaire, qui produisent deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un *o*-diphénol, de la forme *met* de l'enzyme, suivie de la réduction du faisceau bicuivrique, menant à la formation du *deoxy*CO et au dégagement d'*o*-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxy*CO est formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre *o*-quinone.

2.10. Rôle physiologique de la polyphénoloxydase :

Chez les bactéries et les champignons, le taux des CO augmente avec l'apparition des corps fructifiants (le taux de corps fructifiant augmente avec la présence de tyrosine et de sels de cuivre). La formation de spores s'accompagne d'une augmentation du taux de mélanines découlant de l'action des CO mais ces mélanines ne sont pas indispensables à la sporulation.

Ces mélanines permettraient d'augmenter la résistance de la paroi et des membranes vis-à-vis d'enzymes de déstructuration (glucanase, chitinase...). Chez les végétaux, les CO seraient impliquées dans les phénomènes de défense et de résistance aux infections bactériennes, fongiques et virales. On constate généralement une augmentation de l'activité des CO à la suite d'un stress, hausse qui serait due à la maturation des formes latentes des CO par les protéases des pathogènes plutôt qu'à une synthèse de novo.

Bien que les CO puissent hydroxyler des monophénols, elles ne sont pas impliquées directement dans la biosynthèse des diphénols car d'une part la crésolase agit très lentement et d'autre part il n'y a aucune corrélation entre la biosynthèse des diphénols et la présence ou l'absence des CO dans le tissu végétal intact. Les CO seraient cependant impliquées dans la biosynthèse des flavones glycosylées. (Mayer, 2006).

La localisation spécifique des formes actives des CO laisse supposer que cette enzyme interviendrait dans la photosynthèse ou dans la régulation du niveau d'oxygène actif au sein des chloroplastes. Certains auteurs ont montré que la CO était structurellement associée au photosystème II dans la plupart des végétaux supérieurs. Il n'a pas été possible de démontrer clairement l'implication des CO au niveau des chaînes d'oxydation cellulaire.

L'activité de la CO a également un impact sur la saveur et l'arôme des produits horticoles, puis que les composés phénoliques jouent un rôle dans le goût amer, sucré, piquant, ou astringent des fruits, de légumes et d'épices (**Tomas- Barberan et Espin, 2001**).

2.11. Les méthodes de détermination de l'activité de la catéchol oxydase

L'activité de la CO 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 (o-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation du produits (**Vámos-Vigyázó, 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 (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991**). La vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la CO (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawstowski et al., 1991 ; Espín et al., 1998**). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple : le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (**Vámos-Vigyázó, 1981**). La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase, est la mesure de la production d'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- ³H] monophénol tel que la [3.5- ³H] tyrosine (**Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et al., 1998**). On peut également déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ($\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou le NADH à 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Mayer et al., 1966 ; Zawstowski et al., 1991**).

2.11.1. Poids moléculaire :

Le poids moléculaire est généralement déterminé par électrophorèse SDS-PAGE en utilisant un marqueur de taille. Contrairement à la plupart des enzymes, l'activité de la CO n'est pas entravé par le SDS. Par conséquent, le dosage bio-autographique ou la coloration de l'activité du CO peuvent être réalisés via une SDS-PAGE en utilisant des substrats tels que le catéchol ou la L-Dopa et permettent par la suite en cas de pureté parfaite, l'obtention d'une seule bande de couleur distincte sur le gel (**Guray et Sanli-Mohamed., 2013**). En général ,le

poids moléculaire des CO des différentes sources variait de 27 kDa à 144 kDa selon sa source, la méthode d'extraction ainsi que la procédure de purification (**Tableau 04**) Dans certaines cas, la visualisation de plusieurs bandes indique la présence de différentes isoformes de la CO dans la même source (**Batista et al., 2014**). Une exception a été observée dans le cas de CO de Lactaire où son isoforme présentant une mobilité différente en milieu alcalin étant donné qu'elle possède le même poids moléculaire avec son homologue (**Tsivinska et al., 2015**).

2.11.2. Effet du pH :

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la CO, varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des COs étudiées, il est compris entre pH 4 et 8 (**Mayer et Harel, 1979**). Plusieurs paramètres affectent cette valeur. Nous pouvons citer le type de tampon, la pureté de la préparation enzymatique et le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaires pour sa fixation et sa transformation (**Kuby, 1990**).

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la CO par : (1) 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, (2) le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou (3) la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H⁺ ou les hydroxydes OH⁻ sont impliqués.

2.11.3. Effet de la température :

L'effet de la température sur l'activité des COs n'a pas été très étudié, comparativement parlant à l'effet du pH (**Vámos-Vigyázó, 1981**). Amiot et al. (1997) ont montré que la CO n'est pas une enzyme thermostable. En effet, des traitements thermiques de courtes durées en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C, suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (**Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991**). La diminution d'une partie de l'activité de la CO après chauffage à une basse température n'est pas étonnante (**Yemenicioğlu, 2002**). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température, et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar (**Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroglu, 2003**). L'inactivation thermique de la CO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (**Mayer et Harel, 1991**).

Tableau 04 : Caractéristiques des COs d'origine végétale en terme de poids moléculaire, pH et de température pour différents substrats

Source	Poids moléculaire kDa	Substrat	pH	Temp (°C)	Référence
Salake	38	Catéchol	6.5	30	Zaini et al., 2013
Truffes noires	-	Catéchol	3,6-7	30	Gouzi et al., 2013
		Tyrosine	5-6	30	
Lobéira	47	Catéchol	6	28	Batista et al., 2014
	68		6.5	30	
Châtaigne	32.5	Catéchol	7	40	Gong et al., 2015
Pêche	81	Catéchol	6.5-7	40	Liu et al., 2015(b)
Alphanso	53, 112, 144	Catéchol	5.4		Cheema et Sommerhalter., 2015
			6.4		
Lactaire	64	Catéchol	6	10	Tsivinska et al., 2015
Pomme (Fuji)	67.3	Catéchol	6.8	35	Liu et al.,201a)
	31	Catéchol	5.5	40	
Groseillier à maquereau		4-methycatéchol	4	25	Bravo et osorio.,2016
		Acide chlorogénique	5	20	
Bourache	80.6	Catéchol	7.5	10	Alici and Arabaci, 2016
		Pyrogallol	7.5	30	
		Acide caféique	5.5	20	
		4-methycatéchol	5	5	
Prune	65	Catéchol	6	25	Ionita et al.,2017
Abricot	63	Catéchol	4.5	45	Derrarja et al.,2017
Feuilles de thé	42	Catéchol	6	38	Teng et al.,2017
	85		5.5	33	
Prune	65	Catéchol	5-7	25-65	Carvalho et Orlanda., 2017
Myrtille		Catéchol	6.1 - 6.3	35	Siddiq and Dolan, 2017
Poire	44	Catéchol	5.5	35	Zhou et al.,2018

2.11.4. Spécificité de substrat :

L'activité diphénoxydase (catécholase) de la CO peut catalyser une grande variété de substrats (**Whitaker, 1995**). La CO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention tel que, l'espèce, le genre, le cultivar, ou également le tissu (**Zawistowski et al., 1991**).

La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la CO trouvés dans les fruits et légumes (**Zawistowski et al., 1991, Vámos-Vigyázó, 1981**).

Le type et la position des substituants présents sur les mono- et les o-dihydroxy phénols, sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, de grandes différences dans les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) sont constatées selon la source et la pureté de l'enzyme (**Zawistowski et al., 1991**).

A titre d'exemple, la substitution en position 3 du 3-méthyl catéchol, cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de la gêne stérique. La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 comme le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique, augmente la réactivité du substrat, alors que celle d'un groupement attracteur d'électron, comme le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque, réduit la réactivité du substrat (**Vámos-Vigyázó, 1981**).

Le catéchol est le substrat phénolique le plus simple de la CO puisqu'il possède la structure de base des o-dihydroxyphénols. Ceci ne signifie pas qu'il s'agisse d'un meilleur substrat pour l'enzyme. Toute substitution sur le cycle aromatique (position et la nature du substituant) affecte la vitesse de la réaction enzymatique.

2.11.5. Effet des effecteurs :

Les activateurs : La CO 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), (**Seo et al., 2003; Gandía-Herrero et al., 2005**). Ce dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la CO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (**Espín et Wichers, 1999**).

Il a même été montré que le SDS active la CO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la CO (**Vámos-Vigyázó, 1981; Fan et Flurkey, 2004; Van Leeuwen et Wichers, 1999**).

Les inhibiteurs : Les traitements thermiques, sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments, en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70- 90°C, de la CO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (**Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003**).

Plusieurs études ont montré que la CO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (**Yemenicioğlu et al., 1997; Weemaes et al., 1998 ; Soysal, 2008**). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard. La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons pouvant induire une inactivation réversible ou irréversible de la CO à des températures relativement basses, en particulier lorsqu'il s'agit d'un produit sensible à la chaleur (**Weemaes et al., 1998**). Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique.

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la CO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O₂ et substrat phénolique) et du pH et de la température (**Zawistowski et al., 1991**). Il est commode de diviser les inhibiteurs de la CO en trois catégories :

- 1) Les agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécules ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitif en ce qui concerne l'oxygène,
- 2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique,
- 3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphénol) (**Robb, 1984; Burton, 1994**).

Puisque la CO est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylldithiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (**Vámos-Vigyázó, 1981; Jolivet et al., 1998; Gasowska et al., 2002 ; Mayer et Harel, 1979**).

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les COs de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels des COs de champignon, de cerises, de pommes, de poire, d'abricot et de pommes de terre sont principalement les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques, le dihydrate de phloridzine et certains acides cinnamiques substitués. Les ions halogénures se comportent comme étant des

inhibiteurs purement compétitifs vis-à-vis de la fixation du dioxygène (**Rescigno et al., 2002; Robb, 1984**). L'acide ascorbique peut également agir directement sur la CO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2++} en Cu^+ (**Vámos-Vigyázó, 1981; Zawstowski et al., 1991**). En outre, les composés qui ne ressemblent pas à la structure de substrat (exemple : le 4-nitrophenol, la phénylalanine et le 4-chlorophénol) et qui sont lentement oxydés, ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la CO. Les analogues de substrat comme les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique, se comportent habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (**Robb, 1984; Jolivet et al., 1998**). L'inhibition de la CO est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites ; SO_2 ; l'acide ascorbique, l'acide érythorbiques et les composés à fonction thiol (**Zawstowski et al., 1991**).

Les composés à fonction thiol, comme la L-cystéine, le glutathion, le dithiotreitol, le mercaptoéthanol et le thiourée, sont des inhibiteurs efficaces de la CO de plusieurs sources (**Zawistowski et al., 1991 ; Burton, 1994 ; Rescigno et al., 2002**). Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP), agissent au tant qu'inhibiteurs compétitifs de la CO, mais on ne sait pas s'ils agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (**Jolivet et al., 1998 ; Vámos-Vigyázó, 1981**). Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la CO, soit en réagissant avec les o-quinones (**McEvily et al., 1992**). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif de la CO. Les cyclodextrines peuvent inhibées la CO par fixation sur le substrat phénolique. L'acide citrique inactive la CO par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu (**McEvily et al., 1992**). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas spécifique seulement pour les CO (**Mayer et Harel, 1991**).

2.11.6. Paramètres cinétiques (Km et Vmax) :

L'affinité de l'enzyme (Km) est estimée par la constante de Michaelis–Menten. Elle définit la force de liaison et la stabilité du complexe enzyme-substrat. Une proportionnalité inverse relie la valeur de Km et l'affinité dont l'affinité est d'autant plus élevée que la valeur de Km est petite et vice versa .

La vitesse de l'activité enzymatique est calculée de la pente de la courbe absorbance en fonction du temps en seconde ou minute. Généralement, nous utilisons la représentation de Michaelis–Menten ou de préférence la représentation de double inverse de Lineweaver –Burk pour le calcul. La valeur de Vmax correspond au point d'intersection de la droite avec l'axe des

ordonnées ($1/V$) tandis que le point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses du côté gauche présente la valeur de ($-1/K_m$).

Pour avoir une bonne idée sur l'efficacité catalytique de l'enzyme, il est recommandé de calculer le rapport V_{max}/K_m . Une valeur élevée de cet ration indique que l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat est très grande impliquant plus d'accélération lors de son oxydation. De plus, une corrélation positive existe entre l'affinité et spécificité dont l'activité enzymatique s'améliore généralement et se diffère d'un substrat à un autre (**Benaceur F., 2019**).

2.12. Propriétés générales de la polyphénol oxydase :

Le pH optimum de la CO varie considérablement avec la plante source, mais est généralement dans la plage de 4,0 à 8,0 (**Yoruk et Marshall, 2003**). Les pH et températures optimaux ainsi que la constante d'affinité apparente des polyphénoloxydases de différentes plantes vis-à-vis de certains substrats sont présentés dans (**tableau 05**).

Tableau 05 : Caractéristiques des catéchol oxydases de certaines sources végétales .

Plante	Substrat	K_m (Mm)	Température optimale	PH optimale	Référence
Pomme	Catéchol	34	15	7	Oktay et al. (1995).
Banane	Catéchol	8.5	30	7	Unal (2007)
Datte Deglet Nour	4-méthyl catéchol	-	35	6.4	Daas Amiour et Hambaba(2016)
Datte Ghars	4-méthyl catéchol	-	40	7.2	Daas Amiour et Hambaba(2016)

2.13. Applications :

La CO est l'une des enzymes ayant de multiples applications. Elle est utilisée dans la production des o-diphenols comme la L-dopamine et le catéchol (**Seetharam et Saville, 2002**).

Seule ou parfois associées à d'autres enzymes tel que la laccase, elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine, le catéchol (**Tan et al., 2010**), le phénol et ses dérivés .

Dans le domaines agroalimentaire et environnemental, les biocapteurs à tyrosinase peuvent être utilisé également pour le dosage de certains polluants chimiques , comme le cyanure , l'acide benzoïque, l'azide de sodium , et le fluorure de sodium (**Asav et al., 2009**).

La CO sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivée au niveau des eaux usées (**Seetharam et Saville, 2003**).

III. PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre 03 : Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Matériel biologique

La datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) (**Figure 08**) est utilisée comme source de la catéchol oxydase (CO). Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conservées à 4°C.



Figure 8: Les dattes Deglet nour d'Algérie (*Phoenix dactylifera* L.).

3.1.2. Produits chimiques :

Le catéchol et le polyvinyl(poly)pyrrolidone (PVPP) sont fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

3.2. Méthodes :

3.2.1. Extraction de la CO :

La CO a été isolée à partir des dattes de la variété « Deglet nour » selon le protocole d'extraction développé par Benchraïr et Benchraïr (2010). Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée et séchées à l'air libre. 150 g de chair de dattes préalablement refroidie à -15°C sont découpées et homogénéisées pendant 2 min à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E) dans 250 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de sodium 0.05 M à pH 7.0 contenant 3.75 g de polyvinyl(poly)pyrrolidone. Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de gaze. Le filtrat ainsi obtenu (**Figure 9**) est centrifugé pendant 10 min à 4000 trs/min dans une centrifugeuse (Sigma Fischer Bioblock Scientific).

Le surnageant récupéré (**Figure 10**) d'un volume total de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait brut de la CO. L'extrait enzymatique brut est divisé dans des tubes coniques de 15 mL qui seront conservés à -10°C.



Figure 9 : Extrait brut de la datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L) avant centrifugation.

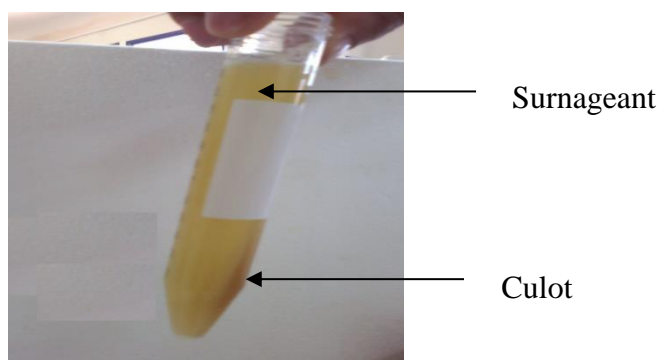


Figure 10 : Extrait brut de la datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) après centrifugation à 4000 tr/min

3.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Lowry :

La concentration des protéines de l'extrait brut de la CO de datte est déterminée selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) (Olson et Markwell, 2007).

3.2.2.1. Principe :

Le groupe phénolique des résidus tyrosine d'une protéine produira une couleur bleu-pourpre, avec un maximum d'absorption dans la région de longueur d'onde 650 nm avec le réactif de Folin-Ciocalteu (à base de tungstate de sodium, molybdate et phosphate).

La méthode est sensible à moins de $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ et elle est probablement la méthode de dosage des protéines largement répandue bien qu'elle soit seulement relative. Le principe de cette méthode est la production d'ions cuivreux qui réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu (Wilson et Walker, 1995). La concentration de protéine dans l'extrait enzymatique est calculée par interpolation linéaire à partir d'une gamme étalon contenant le sérum albumine de poule.

3.2.2.2. Mode opératoire :

Au temps (t_{p0}), dans des tubes à essais on ajoute $40 \mu\text{l}$ d'échantillon à doser à 1 ml de réactif (A). On mélange les tubes au vortex et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante et l'abri de la lumière. Au temps ($t_{p0}+10 \text{ min}$), on ajoute 4 ml de réactif (B) dans chaque tube. Les tubes sont placés au bain-marie réglé à 50°C pendant 5 minutes puis refroidis rapidement sous l'eau froide. La lecture de la densité optique est effectuée à 650 nm contre un blanc réactif.

Une courbe d'étalonnage, établie à partir de diverses dilutions d'une solution mère de sérum albumine de poule à 1 g/l , permet de déterminer la concentration en protéines (Figure 11).

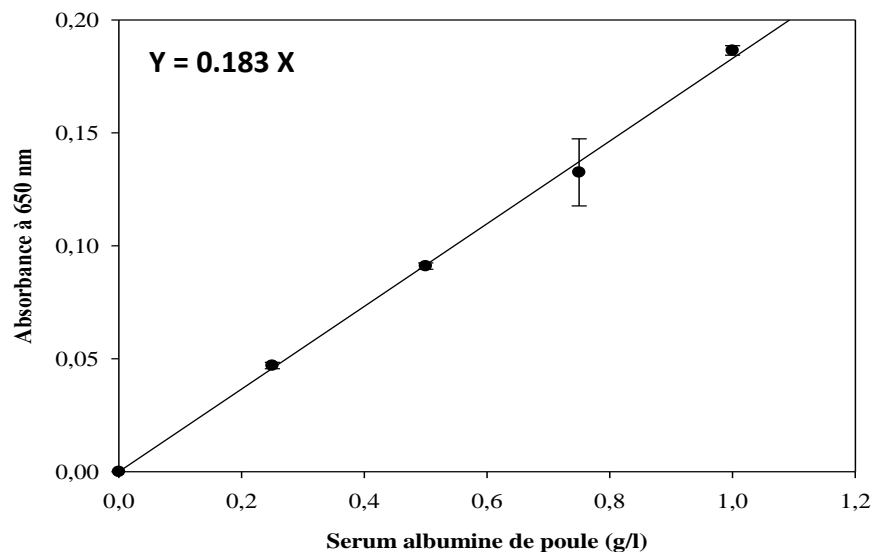


Figure 11: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de (Lowry et al. 1951).

3.2.3 Mesure de l'activité catécholase :

L'activité catécholase de l'extrait brut de la CO de la datte Deglet nour est mesurée à 410 nm en utilisant le catéchol comme substrat par la mesure directe de la formation des *o*-quinones à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeλIOS γ) en présence oxygène/aire (**van et Flurkey, 2004 ; Espín et al., 1995**).

Le catéchol à 0.4 M est préparée dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (**van et Flurkey, 2004**). Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 30 μl d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant deux minutes après l'ajout de l'extrait enzymatique. La vitesse initiale (v_0) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (**Ünal, 2007**).

Une unité internationale (1 UI) est définie comme la quantité d'enzyme qui forme 1 μmole d'*o*-benzoquinone par minute (**Gawlik-Dziki et al., 2007 ; Kumar et al., 2008**).

L'activité volumique de la CO est calculée à partir de la formule suivante :

$$AV_{(UI/ml)} = \frac{A_{(Abs/sec) \times 60}}{\epsilon_{(cm^{-1}.M^{-1})}} \times \frac{V_R}{V_E} \times 10^3$$

Avec :

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

$\epsilon_{(cm^{-1}.M^{-1})}$: coefficient d'extinction molaire de l'*o*-benzoquinone ($\epsilon = 1630 M^{-1}.cm^{-1}$) ;

$V_R (ml)$: volume du milieu réactionnel (1 ml) ;

$V_E (ml)$: volume de l'enzyme (0.03 ml).

L'activité spécifique est calculée selon l'équation suivante :

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

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

3.2.4. Effet de la concentration de l'enzyme :

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse d'oxydation de catéchol (40 mM) à été étudié par la mesure de l'activité catécholase pour des volumes croissants de l'extrait brut de la CO de datte compris entre 2.5 et 50 μl. L'activité enzymatique a été mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C.

3.2.5. Détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) :

Pour la détermination de la constante de Michaelis-Menten (K_m) et de la vitesse maximale (V_{max}), la vitesse initiale de l'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la CO de datte à été mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C ceci pour différentes concentrations de catéchol comprises entre 4 à 160 mM.

Les valeurs de K_m et V_{max} de la CO, ont été estimées à l'aide des représentations graphiques de Michaelis-Menten (v_0 vs $[s]$) et de Lineweaver-Burk (1934) ($[s]/v_0$ vs $[s]$). Tous les essais expérimentaux ont été répétés trois fois et les valeurs moyennes ont été représentées.

3.2.6. Etude de la spécificité de substrat :

La spécificité de substrat a été étudiée par la mesure de l'activité de la CO en présence de six différents substrats phénoliques (L-tyrosine (475 nm), phénol (390 nm), catéchol (410 nm), pyrogallol et l'acide gallique (420 nm), et le 4-méthylcatéchol (400 nm)) (**Gouzi et Benmansour, 2007**).

Les activités mono-, di- et triphénol oxydases de l'extrait brut de la CO de datte ont été mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C.

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

Toutes les mesures d'activité enzymatique ont été répétées trois fois et les valeurs moyennes ont été présentées.

3.2.7. Effet des inhibiteurs :

Les effets de quelques inhibiteurs (acide citrique, acide benzoïque, acide ascorbique, acid oxalique) sur l'activité catécholase de la CO de *Phoenix dactylifera* L. ont été déterminés. L'activité enzymatique est mesurée en présence de deux concentrations de chaque inhibiteur (1 et 10 mM) à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C en utilisant le catéchol à 40 mM comme substrat.

Le pourcentage de l'activité résiduelle est calculé par rapport à l'activité de l'enzyme en absence d'inhibiteur. Toutes les analyses ont été exécutées trois fois.

3.2.8. Effet du pH :

L'activité catécholase de l'extrait brut de la CO de dattes Deglet nour est mesurée à 30°C dans les intervalles de pH 3.6-8. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.6-5.6) et le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 5.8-8). Le catéchol à 40 mM est utilisé comme substrat.

Les activités enzymatiques mesurées aux pH supérieurs à 7 ont été corrigées à cause de l'autoxydation du catéchol en *o*-benzoquinone en milieu alcalin (**Palmer, 1963**).

L'effet du pH sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de la CO a été étudié. Pour cela, l'activité catécholase est mesurée à différentes concentrations de catéchol comprises entre 4 et 100 mM pour différents pH du milieu réactionnel compris entre 3.6 et 7.

Les valeurs des paramètres cinétiques K_m et V_{max} ont été déterminées à 30°C à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk (1984).

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

3.2.9. Analyse des résultats expérimentaux :

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 97-2003) et SigmaPlot 2011 (**Systat Software, Inc., Windows Version 12.0**).

Chapitre 04 :
Résultats et discussion

4. Résultats et discussion :

4.1. Extraction et purification de la catéchol oxydase :

Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la CO il y à quelques décennies (**Wichers et al., 1997**). Cette enzyme a été pour la première fois préparée presque simultanément par Kubowitz (1938) à partir de la pomme de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir du champignon de couche (*Agaricus bisporus*) et est partiellement purifiée par précipitation (**Jolivet et al., 1998**). Plusieurs méthodes d'extraction et de purification de la CO de champignon de couche ont été développées. Parmi les méthodes cités dans la littérature, les plus largement 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 van et Flurkey (1997).

4.1.1. Extraction :

Trois problèmes doivent être traités avant d'extraire la CO à partir du matériel végétal : (1) latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule, et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes et par conséquent les produits se polymérisent et se précipitent, sur la protéine enzymatique (**Vámos-Vigyázó, 1981**)

La CO représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la CO, la concentration de l'enzyme est de l'ordre de 0.004% ce qui implique l'utilisation de 1 kg de champignon pour avoir un rendement de 40 mg de CO purifiée (**Zawistowski et al., 1991**).

Les COs liées peuvent être solubilisées dans un milieu hypotonique, par l'utilisation des agents chimiques tel que les détergents (Tween-80®, Triton X-100®, SDS : Sodium Dodecyl Sulfate), ou au moyen des agents physiques comme les ultrasons (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Robb, 1984**). L'extraction détersive des tissus augmente substantiellement le niveau de l'activité CO (**Whitaker, 1995**). Les plus grandes difficultés à surmonter pendant l'obtention d'une préparation soluble CO sont la prévention de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques endogènes et la formation des pigments pendant le broyage de la matière végétale et l'extraction de l'enzyme. Les pigments pourraient s'associer avec la protéine enzymatique et rendre cette dernière insoluble et inactive (**Vámos-Vigyázó, 1981**).

Pendant l'extraction de la CO, des réactions de tannage peuvent être avoir lieu, et ont comme conséquence la modification des propriétés de l'enzyme (**Mayer et Harel, 1991**). Pour

réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction de la CO devraient être effectuées à basse température, probablement à -20°C voire -30°C; en tout cas à des températures inférieures à 0°C (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et al., 1991**). Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou dans l'azote atmosphérique pour réduire le plus possible les interactions protéine- phénol. Dans certains cas, la congélation rapide et la lyophilisation du matériel sont recommandées comme premières étapes de l'extraction de l'enzyme. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes le plus souvent appliquées.

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes peut réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de catéchol oxydase. Elle peut être effectuée par l'addition dans l'extrait enzymatique des adsorbants de composés phénoliques tels que les résines échangeuses d'ions et le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Nous avons constaté que ce procédé change les caractéristiques cinétiques de la catéchol oxydase de champignon dans le milieu organique, dans une certaine mesure, mais il n'affecte pas les produits de réaction dans les milieux aqueux ou organiques (**Burton, 1994**). Un moyen très efficace de prévention contre l'oxydation et la polymérisation des phénols pendant l'extraction de l'enzyme est leur élimination par fixation à un polymère insoluble. Les pièges à phénol le souvent utilisés pendant l'extraction sont la polyvinylpyrrolidone (PVP), les résines échangeuses d'ions en raison de leurs capacités fixatrices des composés phénoliques. Elles sont utilisées pendant la séparation des fractions subcellulaires et dans les étapes initiales de purification de l'enzyme (**Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et al., 1991 ; Ziyen et Pekyardimci, 2004**). En même temps le PVP est un inhibiteur partiellement compétitif de la CO (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et al., 1991**). Le polyéthylène glycol (PEG) est parfois préféré, peut-être parce que sa solubilité dans l'acétone présente certains avantages pour l'obtention d'une préparation enzymatique brute. Malheureusement, le déplacement de ces phénols par des résines d'échange ionique ou d'autres composés se liant aux phénols (**Bonner, 1955**) peut avoir comme conséquence la perte de quelques isoformes (**Smith et Montgomery, 1985**). Ainsi, le séchage par l'acétone, souvent appliqué comme première étape d'extraction d'enzymes, est, en même temps, un moyen puissant d'élimination des phénols, particulièrement quand ils contiennent environ 20% d'eau.

Le déplacement des substances pectiques des tissus de fruit peut être réalisé par précipitation par l'acétone ou l'acétate de calcium (**Vámos-Vigyázó, 1981**).

L'extraction de la CO peut être entravée en présence d'enzymes protéolytiques endogènes qui pourraient produire des formes multiples artéfactuelles et interconvertibles de l'enzyme.

Cela a été mis en évidence lorsque l'utilisation des inhibiteurs de protéases (fluorure, phénylméthylsulfonyl, et le Trasylol) a conduit à la diminution du nombre des formes d'isoenzymes obtenues lors de la purification de la CO de pêche et de datte (**Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et al., 1991**).

4.1.2. Purification :

La purification d'une enzyme est indispensable pour connaître ses propriétés fonctionnelles et structurales (**Pathak et Ghole, 1994**). L'inconvénient majeur pour l'étude de la CO c'est qu'elle est relativement peu présente. Donc, sa purification s'est avérée une tâche très difficile (**Robb, 1984**). Cependant, plusieurs méthodes de purification de la CO ont été développées (**Shi et al., 2001 ; Burton, 1994**). Elles diffèrent selon la source de l'enzyme et son degré de pureté atteindre. Néanmoins, seulement quelques COs ont été purifiées jusqu'à un degré d'homogénéité apparente (**Zawistowski et al., 1991**).

Après l'extraction avec un tampon approprié, l'étape de purification de la CO implique une précipitation par le sulfate d'ammonium ou par les solvants organiques (acétone ou éthanol, t-butanol). Le plus souvent la précipitation par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation est suivie d'une chromatographie sur gel de Sephadex G-100 ou G-200, d'une chromatographie d'échange ionique sur des échangeurs d'anions (DEAE-cellulose ou le DEAE-Sephadex), ou des combinaisons de certaines de ces méthodes. Le DEAE-cellulose s'avère être un échangeur d'ion très utilisé pour la purification d'une variété de CO. Entre chaque étape de purification, une dialyse, une ultracentrifugation, ou une chromatographie sur gel de Sephadex G-25 sont habituellement utilisées pour éliminer les impuretés de poids moléculaires faibles et les ions des différents tampons employés. Dans certains cas, une étape de purification est appliquée à plusieurs reprises; par exemple, un procédé de purification de la CO de champignon a été rapporté avec deux étapes de précipitations par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, précédée et suivie, respectivement, d'une chromatographie sur DEAE-cellulose.

L'adsorption sur le gel de phosphate de calcium, suivie d'une chromatographie d'adsorption sur l'hydroxylapatite, a été appliquée pour la CO de champignon (**Mayer et Harel, 1979 ; Zawistowski et al., 1991 ; Vámos-Vigyázó, 1981**).

La CO a été purifiée pour la première fois par Lerman en 1953 sur une colonne de chromatographie d'affinité à base de cellulose sur laquelle des inhibiteurs phénoliques sont greffés (acide benzoïque).

Puisque tous les substrats de la CO possèdent un noyau aromatique, il est possible donc que son site actif a un caractère hydrophobe. Par conséquent, l'enzyme se lie bien sur un support

hydrophobe, tel que le phényl-sépharose, à une concentration ionique élevée. Ensuite, elle est éluée par une faible concentration ionique avec un excellent rendement d'activité (**Marri et al., 2003; Robb, 1984**). Powell et al. (2007) ont pu purifié la CO de champignon à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle des ions de Cu^{2+} , de Ni^{2+} , de Co^{2+} ou de Zn^{2+} ont été fixés.

4.2. Effet de la concentration de l'enzyme :

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la CO de datte « Deglet noir » dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer au préalable la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat. L'oxydation a été réalisée avec une concentration saturante en catéchol, soit 40 mM de volume réactionnel et différents volumes d'extrait enzymatique allant de 0 à 50 μl par 1 ml de volume réactionnel. Nos résultats sont en accords avec ceux trouvés par **Bechrair et Bechrair (2010)**.

La(**Figure 12**) représente l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'oxydation de catéchol par la CO brute de datte Deglet noir en fonction de la concentration de l'enzyme.

Dans cette expérience, le volume de 30 μl d'extrait enzymatique est convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la CO.

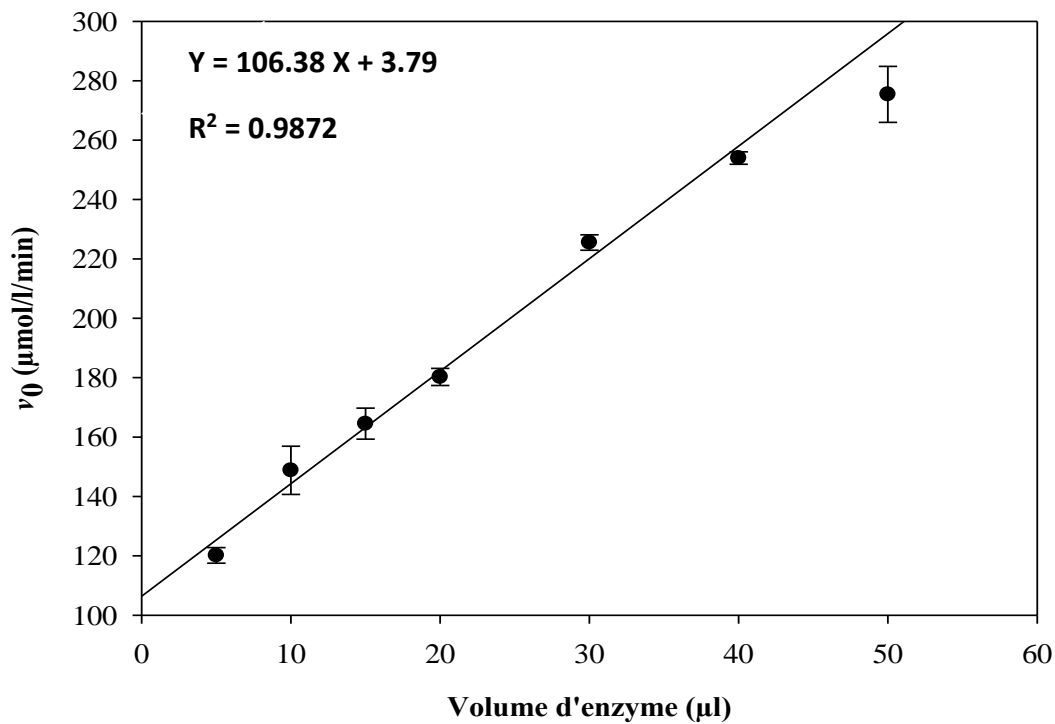


Figure 12: Vitesse initiale d'oxydation du catéchol en fonction de la concentration de la CO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.). Le milieu réactionnel (1 ml) contient 40 mM de catéchol dans 0.05 M de tampon acétate de sodium à pH 5.6.

4.3. Spécificité de substrat :

Les résultats de l'étude de la spécificité de substrat de l'extrait brut de la CO, est représentée dans le (Tableau 06). La CO de datte est capable d'oxyder activement le catéchol et le 4-méthylcatéchol. Une activité CO moyenne a été observée avec le pyrogallol. Par contre, l'extrait enzymatique ne peut pas catalyser l'oxydation des monophénols comme la L-tyrosine et le phénol et par conséquent ne possède pas l'activité monophénolase.

Ces résultats suggèrent que la CO de datte, possède seulement les activités di- et triphénol oxydases. Il s'agit donc d'une diphenol oxydase (EC 1. 10. 3. 2) : catéchol oxydase, diphenol oxygène oxydoréductase).

De meme, **Hasegawa et Maier (1980)**, **Sachde et al. (1989)**, et **Benchrair et Benchrair (2010)** ont signalés de leurs part que l'extrait brut de la CO des dattes ne peut pas catalyser l'oxydation des monphénols.

Tableau 06 : Spécificité de substrat de la catéchol oxydase de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) (tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.6 et à 30°C).

Substrat	Concentration (mM)	Longueur d'onde (nm)	Activité enzymatique relative au 4-Méthylcatéchol (%)
<i>Monophénols</i>			
L-Tyrosine	1	475	0
Phénol	1	390	0
<i>0-Diphénols</i>			
Catéchol	40	410	96.27±2.18
4-Méthylcatéchol	40	400	99.09±1.28
<i>Triphénols</i>			
Pyrogallol	40	420	18.45±0.38
Acide gallique	1	420	0

4.4. Effet de la concentration de substrat :

L'effet de la concentration du catéchol sur l'activité de la CO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) a été étudié en utilisant le catéchol à des concentrations comprises entre 5 et 160 mM. Les autres paramètres physico-chimiques sont maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05 M ; pH 5.6 ; 30°C).

Nos résultats expérimentaux ont été ajustés à l'aide des deux équations non-linéaires suivantes :

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

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

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

Où

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

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

S est la concentration de catéchol (mM) ;

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

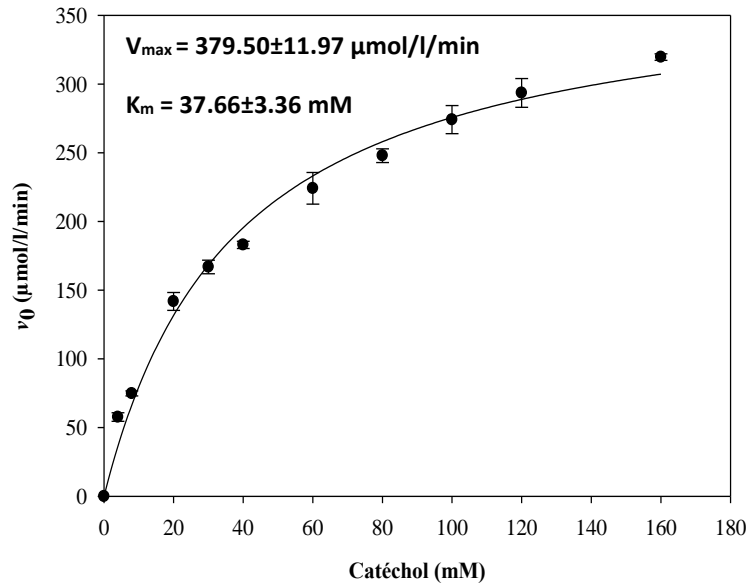


Figure 13: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la CO Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 50mM) et à 30°C.

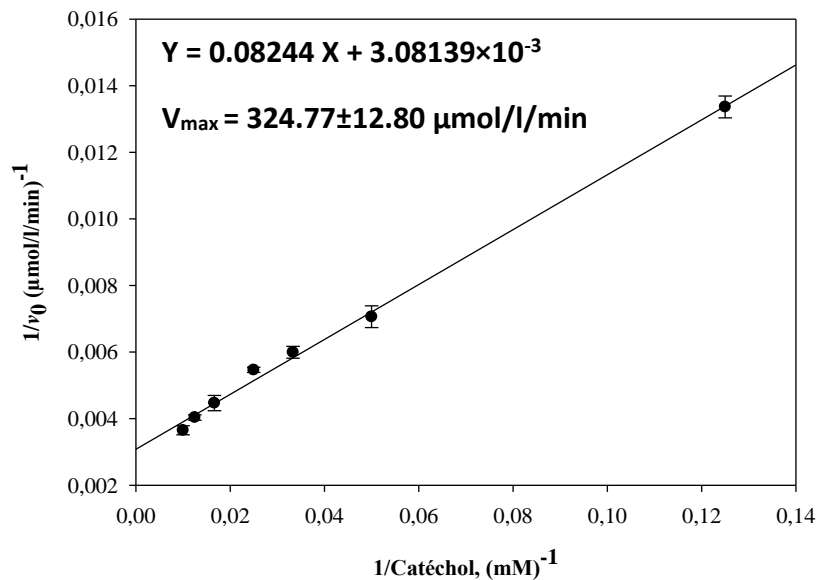


Figure 14 : représentation de Lineweaver-Burk en double inversée de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la CO Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 50mM) et à 30°C.

D'après les valeurs du coefficient de corrélation linéaire (R^2), l'oxydation de catéchol par la CO brute de datte suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten.

La (**Figure 13**) montre que l'activité *o*-diphénol oxydase augmente jusqu'à 160 mM de catéchol au-delà de laquelle la vitesse initiale demeure relativement constante.

La constante de Michaelis-Menten (K_m) mesure l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat, la faible valeur de ce paramètre signifie que l'enzyme a une forte affinité vis-à-vis de son substrat. D'après le (**Tableau 07**) on remarque que l'affinité de la CO de Deglet nour vis-à-vis du catéchol est relativement similaire par rapport à celles des COs de céleri, de raisin et de pomme. Par contre les COs de champignon de Paris, de cerise, d'artichaut, de banane et de datte de deux variétés Barhee et Zahdi ont l'affinité la plus élevée vis-à-vis de catéchol comme substrat.

Tableau 07 : les valeurs de K_m et pH optimal de la CO obtenue à partir de différentes sources végétales .

La source	K_m (mM)	pH	Référence bibliographique
Dattes d'Iraq :			
Barhee	3.5-8.75	6	Sachde et al. (1989)
Zahdi		7	
Céleri (<i>Apium graveolens</i> L.)	29	7	Aydemir et Akkanli (2006)
Pomme	34		Oktay et al. (1995)
Artichaut (<i>Cynara scolymus</i> L.)	10.7	7	Dogan et al. (2005) .
Cerise (<i>Malpighia glabra</i> L.)	5.2	7	Kumar et al. (2008)
Banane (<i>Musa cavendishii</i>)	8.5	7	Ünal (2007)
Datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	26.8	5.6	Notre étude
Raisin (<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Emir)	25.1	4.2	Ünal et Şener (2006)
Chapignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	0.40	7	Gouzi et Benmansour (2007)

La CO des dattes Deglet nour a une bonne affinité vis-à-vis du catéchol par rapport aux COs d'haricot (*Glycine max* L.) ($K_m = 71$ mM) (Nagai et Suzuki 2003), du chou de Chine (*Brassica rapa* L.) ($K_m = 682.5$ mM) (Nagai et al., 2001) et de la fleur de Rape (767 mM) (Sun et al., 2012).

Les valeurs de K_m de la CO varient avec la source d'enzyme, le pH, la température, la méthode de mesure de l'activité enzymatique, le degré de pureté de l'enzyme et de la méthode d'extraction utilisée (Arslan et al., 1997; Dogan et Dogan, 2004).

4.5. Stabilité thermique :

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de la CO de datte Deglet noir, sont représentés dans la (Figure 15). La représentation graphique de l'activité catécholase résiduelle, exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique relative à 30°C pour les différentes températures testées, montre que l'enzyme n'est pas stable thermiquement à des températures supérieures à 65°C. De 65°C à 70°C, l'activité enzymatique résiduelle diminue légèrement (9.36%). Une inactivation rapide se produit entre 70 et 75°C. Cette baisse d'activité enzymatique, selon **Yemenicioğlu (2002) ; Doğan et al. (2005)** ; est due aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, à la destruction de son site actif et aussi à la présence des formes multiples d'enzyme de la CO dont certaines sont extrêmement thermolabiles. Il est également probable que le chauffage doux, cause la dissociation de quelques formes oligomères de la CO vers des monomères moins actifs (**Yemenicioğlu, 2002**).

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique montrent que la CO de datte Deglet noir est une enzyme thermorésistante. Cette grande thermostabilité peut être expliquée par la présence de sucres .

La CO des dattes Deglet Nour d'Algérie est plus stable thermiquement que les COs des dattes d'Iraque des variétés Barhee et Zahdi (**Sachde et al., 1989**), de datte Deglet noir d'amérique (**Hasegawa et Maier, 1980**), de champignon de paris (*Agaricus bisporus*) (**Gouzi et bennmansour, 2007**) et de truffe (*Terfazia leonis*) (**Choucha et Zaroual, 2009**).

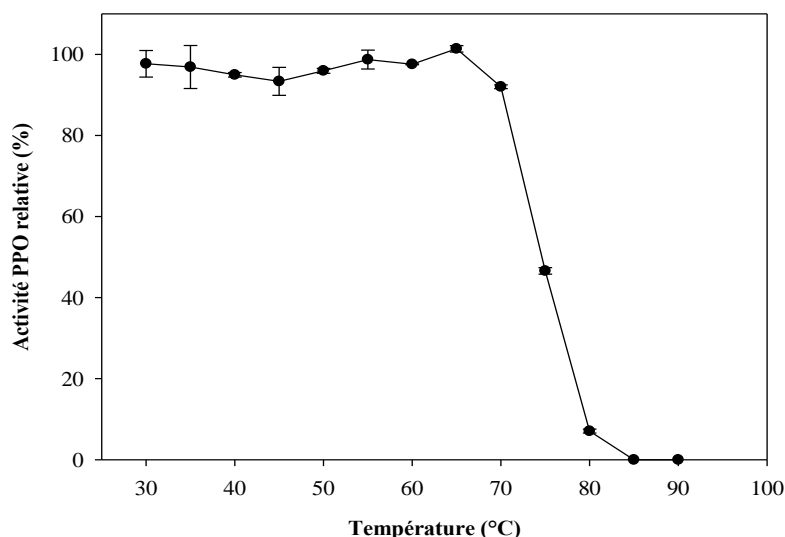


Figure 15: Stabilité thermique de la CO de datte (Deglet noir ; *Phoenix dactylifera* L.) après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 40 mM de catéchol dans 0.05 M de tampon acétate de sodium à pH 5.6.

4.6. Effet du pH sur l'activité catécholase :

Le pH est parmi les facteurs qui influent sur l'activité des enzymes. L'activité catécholase de la CO de date Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) est mesurée à différentes valeurs de pH utilisant le catéchol comme substrat. L'enzyme est active dans la gamme de pH compris entre 3.6-8 et possède une activité maximale à pH 5.6 avec une activité maximale de moitié à pH 3.6 (Figure 16).

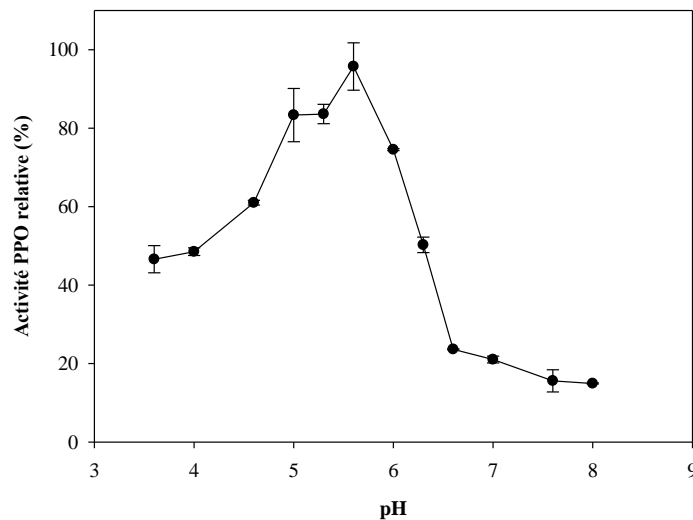


Figure 16 : Activité catécholase de la CO de date Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) en fonction du pH. Le milieu réactionnel (1 ml) contenant 40 mM de catéchol et 30 μ l de l'extrait enzymatique est incubé à 30°C.

Au-dessous et au dessus du pH 5.6, son activité diminue rapidement. A pH 4 et 6.3 l'enzyme perd environ 50% de son activité et elle est inactivée presque totalement à pH 8.

Comme l'indique le (Tableau 08), la CO de date est plus active dans les conditions acides que dans les conditions alcalines, ce qui est nettement différent par rapport à la plus part des COs qui montrent une activité CO maximale dans le domaine de pH neutre ou proche de la neutralité. Le comportement de la CO de date Deglet nour vis-à-vis du pH est similaire par rapport à celui des COs des autres sources (Tableau 08).

L'activité faible de la CO à pH 7.0 peut être exploitée, le brunissement enzymatique des dattes durant leur stockage ou leur transformation peut être contrôlée par l'utilisation des solutions neutres.

Le pH optimal de la CO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; Yoruk et Marshall, 2003). Il dépend de la source de la CO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994 ; Luh et Phithalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Kolcuoğlu et al., 2006).

Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent aussi la valeur du pH optimal (Vámos-Vigyázó, 1981).

Tableau 08 : Le pH optimal de la catéchol oxydase de quelques fruits et légumes utilisant le catéchol comme substrat.

Source de la CO	pH optimal	Reference bibliographique
Laitue (<i>Lactuca sativa</i> var, capitata L.)	5.5	Gawlik-dziki et al. (2007)
Fraise (<i>Fragaria ananassa</i>)	5	Dalmadi et al. (2005)
Banane	6.5	Ünal (2005)
Chou fleur (<i>Brassica oleracea</i> var, botrytis italica)	5.7	Gawlik-Dziki et al. (2007)
Poire sauvage (<i>Pyrus elaeagnifolia</i>)	6	Yerlitürk et al. (2008)
Datte deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	5.8	Bechrair et Bechrair (2010)
Fleur de viol (<i>rape flower</i>)	5.5	Sun et al. (2012)
Choux de Chine (<i>Brassica rapa</i> L.)	5	Nagai et Suzuki. (2001)
Raisin dechaunac	6	Lee et al. (1983)
Datte (Zahdi et Barhee)	6.8	Sachde et al. (1989)
Datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	5.6	Notre travail

4.7. Effet des inhibiteurs :

L'inhibition du brunissement enzymatique résulte soit de l'inactivation de la CO, de l'élimination de l'un des substrats de la réaction (O₂, polyphénols), ou de l'inhibition de la formation des produits de la réaction enzymatique qui peuvent subir des réaction secondaire donnant naissance à des produits colorés (Doğan et al., 2005).

Les résultats indiqués dans le (Tableau 09) montrent que tous les inhibiteurs testés, ont provoqués une diminution de l'activité catécholase de la CO de datte. On remarque que leur pouvoir inhibiteur dépend de leur nature chimique et de leurs concentrations dans le milieu réactionnel.

L'acide ascorbique et le disulfite de sodium inactivent complètement l'enzyme et ce sont donc les inhibiteurs les plus puissants. Nos résultats expérimentaux semblent être similaires par

rapport à ceux trouvés par **Benchrair et Benchrair (2010)**, **Hasegawa et Maier (1980)** et **Sachde et al. (1989)**.

Tableau 09 : Effet des acides organique sur l'activité catécholase de la catéchol oxydase de datte Deglet nour (*Phoenix Dactylifera* L.).

Les inhibiteurs	^a Concentration (mM)	Activité enzymatique relative (%)
Acide citrique	1	115.36±7.35
	10	65.82±4.90
Acide benzoïque	1	101.04±1.14
	10	77.48±1.47
Acide ascorbique	1	0
	10	0
Acide oxalique	1	87.50±1.84
	10	6.71±1.04

L'acide ascorbique est le composé chimique le plus fréquemment utilisé pour la réduction chimique des *o*-quinones en composés *o*-diphénoliques pour le contrôle du brunissement des fruits et légumes. Mais, son effet est temporaire (**Nicolas et al., 1994**) il empêche le brunissement tant qu'il est présent sous forme réduite (**Schwartz et al., 2001**). Son caractère inhibiteur est lié à son action comme un antioxydant plutôt qu'un inhibiteur de l'enzyme puisqu'il réduit la quinone formée par l'enzyme en diphénol initial avant qu'elle entame les réactions secondaires qui mènent au brunissement (**Golan et al., 1984**).

Il a été montré que le sulfite réagit avec les *o*-quinones produites de l'activité enzymatique pour les réduire en *o*-diphénols (**Walker, 1975**), la perte observée de l'activité catalytique a été attribuée à l'inactivation suicide de l'enzyme par **Golan-Goldhirsh et Whitaker (1985)**.

L'acide ascorbique et le disulfide de sodium sont des agents réducteurs qui peuvent réduire les *o*-quinones en diphénols incolores ou régissent irréversiblement avec les *o*-quinones pour former des produits stables et incolores (**Ünal et Şener, 2006**). Selon **Vámos-Vigyázó (1981)** et **Zawistowski et al. (1991)**, l'acide ascorbique peut également agir directement sur l'enzyme par chélation de son groupement prosthétique et réduisant ainsi le Cu²⁺⁺ en Cu⁺. L'effet de

l'acide citrique et du chlorure peut être expliquée respectivement par l'effet chélateur avec le cuivre du site actif de l'enzyme et par l'abaissement du pH (**Zawistomski et al., 1991**).

Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure .

D'après ses résultats, l'acide citrique, l'acide ascorbique et le métabisulfite de sodium, composés chimiques non toxiques, peuvent être utilisés afin de retarder ou d'empêcher le brunissement indésirable des dattes au cours de leurs stockage (**Whitaker, 1972 ; Aurand et Wood, 1973 ; Eskin et al., 1971**)

4.8. Effet du pH sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) :

Les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) de la CO de Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) ont été déterminés à différentes valeurs de pH, en présence de catéchol comme substrat.

Les valeurs de K_m et V_{max} ont été déterminés à l'aide de la représentation graphique de (**Lineweaver et Burk 1934**). D'après le (**Tableau 10**) on remarque que le pH agit simultanément sur la vitesse maximale et la constante de dissociation du complexe ES. Au-dessous du pH 5.0, l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du catéchol est la plus élevée. Par contre aux pHs supérieurs à 5.0, l'affinité de l'enzyme diminue. Par conséquent, le site actif de la CO de datte à l'état plus protoné fixe mieux le catéchol. En terme de pouvoir catalytique, la CO de datte catalyse efficacement le catéchol à pH 5-5.3.

Tableau 10 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la CO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.).

pH	V_{max} ($\mu\text{mol/l/min}$)	K_m (mM)	V_{max}/K_m
3.6	169.10 \pm 5.39	18.28 \pm 1.17	9.69 \pm 0,31
4	186.78 \pm 11.47	16.94 \pm 1.72	11.88 \pm 73
4.6	233.71 \pm 0.53	18.38 \pm 0.01	12.70 \pm 0.03
5	297.49 \pm 0.05	22.13 \pm 0.89	13.06 \pm 0.00
5.3	391.56 \pm 18.09	33.07 \pm 3.74	12.87 \pm 0.59
5.6	557.92 \pm 34.38	63.8 \pm 2.50	8.99 \pm 0.55
6	929.85 \pm 122.69	241.73 \pm 33.29	3.50 \pm 0.46
6.3	1450.23 \pm 175.12	537.87 \pm 93.24	2.40 \pm 0.29
6.6	135.13 \pm 8.94	62.19 \pm 13.09	2.55 \pm 0.16
7	110.58 \pm 1.66	40.01 \pm 0.70	2.73 \pm 0.04

Le site actif d'une enzyme est souvent constitué de groupements ionisables (groupements prototropiques) qui doivent être dans un état ionique adéquat à fin de maintenir la conformation du site actif, la fixation enzyme-substrat ou la réaction catalytique (**Whitaker, 1995**). Le comportement de l'activité enzymatique à différentes valeurs de pH peut donc nous fournir des informations concernant la nature chimique des groupements prototropiques au niveau du site actif une fois que les valeurs pK sont connus (**Segel, 1994 ; Whitaker, 1994**).

Les valeurs pK des groupements ionisables essentiels impliqués dans le processus catalytique ont été déterminées pour la CO de datte Deglet nour à partir de la représentation de Dixon et Webb (1979). A partir des courbes de $\text{Log}V_{max}\text{-pH}$ et $\text{Log}K_m\text{-pH}$ (**Figures 17**) nous avons pu calculer une seule constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (pK_{BES}), qui est égale à 6.3. Cette valeur peut être attribuée à l'histidine (**Whitaker, 1994**). Les valeurs approximatives des constantes qui correspondent à l'enzyme libre, pK_{AE} et pK_{BE} , calculées à partir de la courbe $\text{Log}(V_{max}/K_m)\text{-pH}$, sont respectivement 3.75 et 5.4.

D'après ces résultats on suggère l'existence d'au moins deux groupements ionisables, imidazole et carboxylique, de l'histidine et de l'acide aspartique, respectivement, qui

constituent les acides aminés de l'acte catalytique de la CO de datte lors de l'oxydation du catéchol. Rosa et Emiola (1980) supposent aussi que le groupement carboxylique et imidazole sont localisés au niveau du site actif de la CO de la pomme de terre douce.

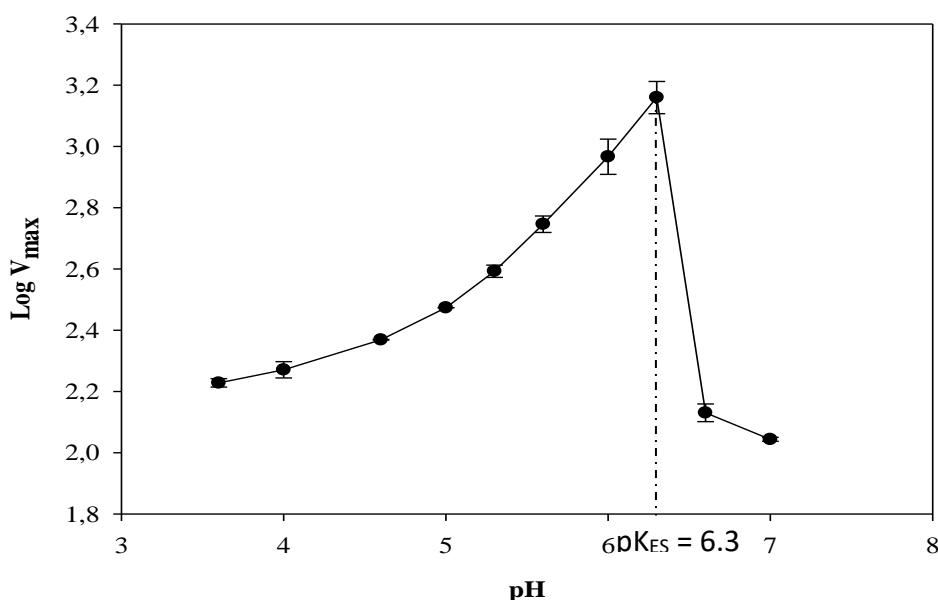
Gutteridge et al. (1977) ont trouvés que le résidu histidine est essentiel pour l'activité des COs des champignons (*Neurospora crassae*) et (*Agaricus bispora*).

Les valeurs de pK trouvées dans cette étude sont en accord avec celles rapportées pour les COs de yam (*Dioscorea bulbifera*) avec 4.7 et 6.8 pour le complexe enzyme-substrat et 4.8 et 6.8 pour l'enzyme libre (Anosike et Ayaebene, 1982). Whitaker (1994) a trouvé que l'aspartate et la cystéine peuvent être impliqués dans l'étape catalytique de la CO.

Ikediodi et Obasuyi (1982) ont trouvés que les valeurs de pK de la CO de yam blanc (*Dioscorea rotundata*) sont respectivement 4.7 et 7.2.

Sachde et al. (1989) ont signalé que les valeurs de pK de deux variétés de datte Barhee et Zahdi sont respectivement, 4.8 et 7.2, 4.6 et 7.1.

Cependant, il est difficile d'attribuer une valeur expérimentale de pK à un groupement réactif d'un acide aminé du site actif d'une enzyme, parce qu'elle est basée sur une approximation. Ces hypothèses peuvent être confirmées par des modifications chimiques spécifiques du site actif.



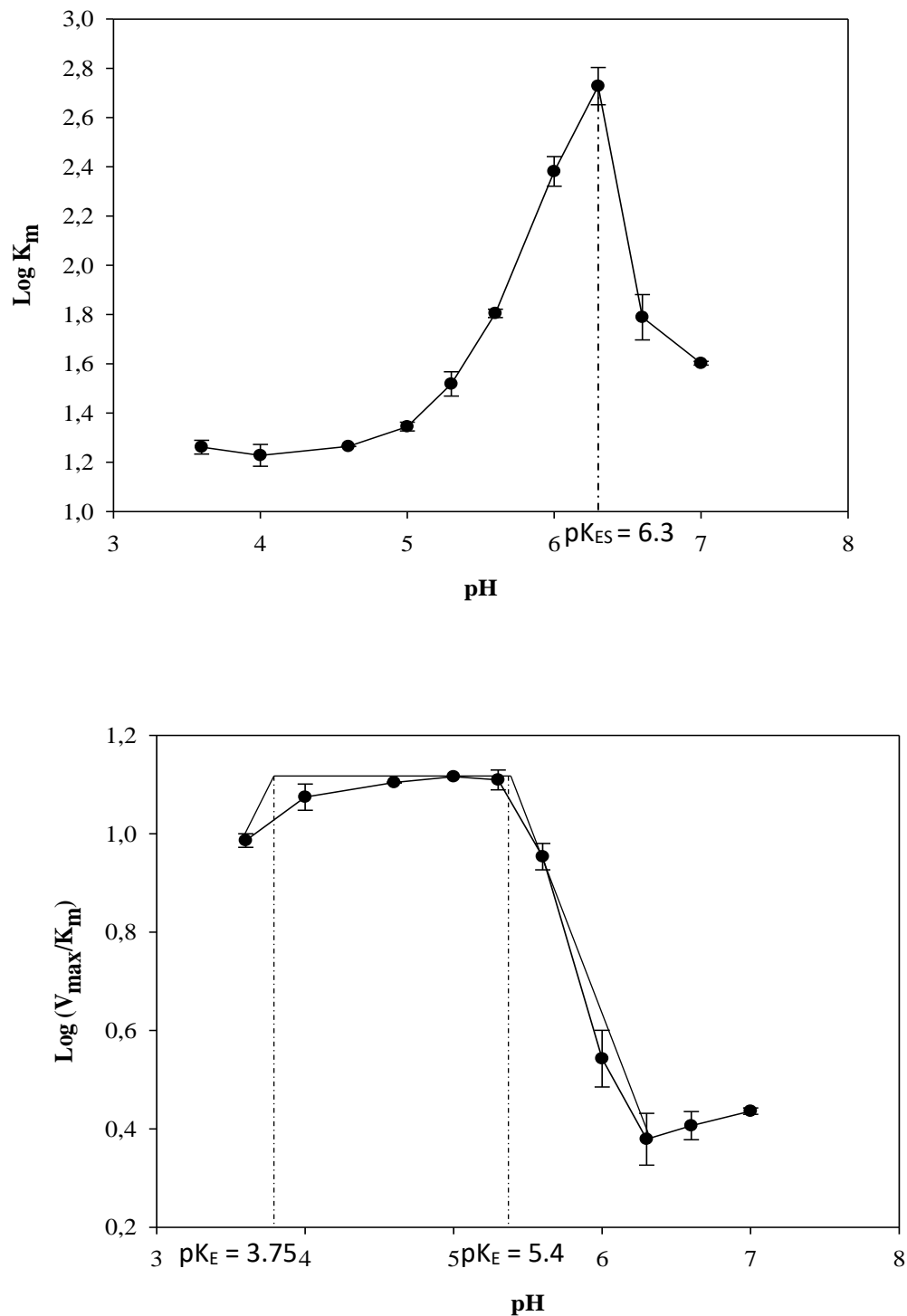


Figure18 : Dépendance des constantes cinétiques de la CO de datte au pH. Les mesures de l'activité catécholase ont été effectuées dans deux solutions tampons : tampon acétate de sodium (pH 3.6-5.6) et tampons phosphate de sodium (0.05 M ; pH 6-8). Les paramètres cinétiques (K_m et V_{\max}) ont été déterminés à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934). Les valeurs de pK des groupements dissociables sont déterminées par la méthode de Dixon et Webb (1964).

CONCLUSION

La polyphenol oxydase de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) a été facilement extraite en milieu aqueux en présence de polyvinyl (poly) pyrrolidone. L'extrait enzymatique brut possède seulement une activité catécholase considérable. La CO de datte est thermorésistante et très active dans un milieu acide. Le catéchol et le 4-méthylcatéchol sont les meilleurs substrats de la CO de Deglet nour. La CO peut oxyder le catéchol à forte concentration sans aucun effet inhibiteur.

La CO de datte est complètement inhibée par l'acide ascorbique et l'acide oxalique. Ces deux agents chimiques peuvent être utilisés pour le contrôle du brunissement des dattes durant leur stockage ou leur transformation.

Les paramètres cinétiques de l'enzyme V_{max} et K_m varient avec le pH du milieu réactionnel. La représentation de Dixon et Webb montre que la CO de Deglet nour a un site actif constitué principalement d'au moins deux types d'acides aminés impliqués dans l'oxydation du catéchol, l'un ayant une fonction carboxylique et l'autre une fonction imidazole.

En perspectives, il serait envisageable d'utiliser d'autres méthodes d'identification des acides aminés du site actif de l'enzyme comme le marquage par affinité et/ou la mutation dirigée.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ✚ Alici, E.H., Arabaci, G., 2016. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 1051–1056.
- ✚ Anil Kumar, V. B., Kishor Mohan, T. C et Murugan, K. (2008). Purification and kinetic journal food chemistry., Vol110:328–333
- ✚ Anosike. E. O. and Ayebebcnc. A. O. (1981), *Phpochmulry* . , Vol 20.p 26.
- ✚ Arar Ket Ziani A.(2009). étude de l'effet du traitement thermique sur l'activité de la polyphynoloxydase (EC1.14.18.1) d'agaricus bisporus :analyse cinétique et thermodynamique.un .Amar telidji laghouat .58p
- ✚ Arslan ,O and Tozulu,I.(1997).Substrate specificity,heat inactivation and inhibition of polyphénoloxydase from anethum graveolens L .*Ital. J. Food Sci*, Vol,9,No.3,pp.249-253.
- ✚ Arslan ,Oand Dogan,S .(2005) .Inhibition of polyphénoloxydase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid.*journal of the science of food and agriculture* Vol.85:1499-1504.
- ✚ Aurand, L. W. and Woods, A. E.(1973). Polyphenol oxidase from BARHEE and ZAHDI dates. II. Characterization ,*Journal of Food Biochemistry*,Vol 12: 241–252.
- ✚ Aydemir TÜ lin , Akkanlı G ,(2006), Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens* L.) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors.,Vol 41: 1090–1098.
- ✚ Baldwin, M.J., Root, D.E., Pate, J.E., Fujisawa, K., Kitajima, N., & Solomon, E.I. (1992). Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper(II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *Journal of the American Chemical Society*, 114, 10421-10431.
- ✚ Barrett, D.M., Somogyi, L.P., and Ramaswamy, H.S. (2005). *Processing fruits (Sciences and Technology)*. Second ed. CRC Press, Orlando, USA, 841 p.

- ✚ Barreveld W H. FAO.(1993). Agricultural Services Bulletin N° 101, Date Palm Products. FAO, Rome, 39p.
- ✚
- Batista, K.A., Batista, G.L.A., Alves, G.L., Fernandes, K.F.(2014). Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 102, 211–217.
- ✚ Batista, K.A., Batista, G.L.A., Alves, G.L., Fernandes, K.F.(2014). Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 102, 211–217.
- ✚ Bechrair A et Bschrair F. (2010), Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire d'ingénieur d'état, un, Amar telidji, L'Aghouat.P91.
- ✚ Benaceur F.(2019). Purification et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de quelques variétés des dattes d'Algérie. THESE de DOCTORAT en SCIENCES : Université MUSTAPHA Stambouli Mascara , pages 33-40
- ✚ Benmansour, A and Gouzi, H. (2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) imbach. *Int. J. Chem. React. Eng.* Vol 5, 1–11 .
- ✚ Bonner, W. D. (1957) .*Annu. Rev. Plant Physiol.* 8, 427.
- ✚ Boubekri A . (2010). Optimisation des traitements thermiques de la datte algérienne « deglet-nour »,mémoire de doctorat d'état en génie mécanique, UNI . Hadj-Lakhdar BATNA.P3.
- ✚ Bradley, J. S. C. Olson , John Markwell. (2007). Assays for Determination of Protein Concentration . June 2007 , Chapter 3(1):Unit 3.4
- ✚ Bravo, K., Osorio, E.(2016). Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry(*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chem.*197,185–190
- ✚ Burton S G.(1994). Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, 22 ,459-487
- ✚ C.A. Weemaes, L.R. Ludikhuyze, I. Van den Broeck, M.E. Hendrickx, P.P. Tobback.(1998) .Activity, Electrophoretic Characteristics and Heat Inactivation of Polyphenoloxidases from Apples, Avocados, Grapes, Pears and Plums, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 31, Issue 1,1998,Pages 44-49.
- ✚ Carvalho, J.O., Orlanda, J.F.F.(2017). Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. *Food Chem.* 233, 159–163.
- ✚ Chan, H. T. and Yong, H. Y. (1971). Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the McFarlin cranberry. *J. Food Sci.* 36, 169-172.

- ✚ Cheema, S & Sommerhalter, M.(2015). Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. *Food Chem.* 171, 382–387
- ✚ Chen ,L and Flurkey,W.H.(2002).Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms.*Current topics in phytochemistry.*Vol.5,pp.109-120.
- ✚ Choucha F.,Zarwal I.,(2009).Extraction ,purification et carractirisation de la polyphénoloxydase (EC1.14.18.1) de Terfzia leunis Tul.Mémoire d'ingénieurat .,pp44-54
- ✚ Claus ,H and Decker,H.(2006).Bacterial tyrosinases.*Systematic and Applied Microbiology*,Vol.29, 3-14.
- ✚ DaasAmiour, S. (2009). Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de troisvariétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique. Mémoire de magister, Université de Batna.
- ✚ Dalmadi I, Gabriela R, van loey A, Smout C., and Hendrickx M.(2005)Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study,p8.
- ✚ Decker, H., T. Schweikardt, et al. (2006). "The first crystal structure of tyrosinase: All questions answered?" *Angew. Chem. Int. Ed.* 45(28): 4546-4550.
- ✚ Della L, S., I. Ascone, et al. (1996). "The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy." *J. Biol. Chem.* 271(35): 21025-21030.
- ✚ Derardja,A.,Pretzler ,M.,Kampatsikas,I,Barkat,M.,Rompel,A.(2017). Purification and Characteriza-tion of Latent Polyphenol Oxidase from Apricot (*Prunus armeniaca* L.).*J Agric Food Chem.*65,8203–8212.
- ✚ Dixon M.,Webb E.C.,(1964).Dans"enzymes".longman ed.,londres 694-695.
- ✚ Dixon M.,Webb EC.,(1979).Enzymes. 3rded .New York:Academic press.1116p.
- ✚ Djerbi M, (1994). Précis de phéniculture, F.A.O, Rome, 191 p.
- ✚ Dogan, S., et Dogan, M. (2004). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69–77.
- ✚ Dowson V. H. W. et Aten A. (1963). Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO, Rome, Cahier n°72, 1-394.
- ✚ Dubost D. (1991). Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. Thèse de doctorat, université de Tours, France, 191p.
- ✚ Eicken, C., B. Krebs, et al. (1999). "Catechol oxidase - structure and activity." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9(6): 677-683.

- ✚ Engin Asav , Erol Akyilmaz , Emine Yorganci . (2009), An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination , May 2009 ,78(2):553-6
- ✚ ESkin, N.A.M., Henderson, H. M. et Townsend, K. J. (1971). Browning reaction in food. In *Biochemistry of Food.. Journal of Food Biochemistry* 27 , 361-422.
- ✚ Espiard.(2002) .introduction à la transformation industrielle des fruits .Ed .Teach et Doc-lavoisier,147-155 .
- ✚ Espin JC, Garcia-Ruiz PA, Tudela J, Garcia-Canovas F. (1998). Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochem J*;331(Pt. 2):547–51.
- ✚ Espín, J. C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (1995). A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical biochemistry*, 231(1), 237–246.
- ✚ Fang, Z., Zhang, M., Sun, Y., & Sun, J. (2007). Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. *Food Chemistry*, 103, 268–273.
- ✚ Flurkey, W. H. and Jen, J. J.(1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activity in developing peach. *J. Food Sci.* 43, 1826-1828, 1831 .
- ✚ Gawlik-Dziki et al. (2007) .Characterization of polyphenol oxidase from broccoli(*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. *Food Chemistry* 105 ,1047–1053.
- ✚ Gayathri Seetharam, Bradley A Saville.(2002) ,l-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite,*Enzyme and Microbial Technology*,Volume 31, Issue 6,Pages 747-753,
- ✚ Ghazi F et Teffahi M, (2007). Mis en valeur et étude de l'utilité technologique de la fermentation de dattes « cas de la variété Hmira », mémoire d'ingénieur d'état en sciences alimentaires, Mascara, 3-6-9-21p.
- ✚ Golbeck, K. H. and Cammarata, K. V. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase: isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67, 977-984.
- ✚ Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., Wang, W.(2015). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. *LWT - Food Sci. Technol.* 60,1095–1099.

- ✚ Gouzi H., Depagne C., Benmansour, A., Coradin .(2013). First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol.* 237(5)721–729.
- ✚ Guray, M.Z., Sanlı-Mohamed, G.(2013). A new thermophilic polyphenol oxidase from *Bacillus* sp. partial purification and biochemical characterisation. *J. proteins proteomics* 4, 11–20.
- ✚ Gutteridge .S. and D.A. Robb, (1975) . *Eur. J. Biochem.*, Vol 54 p107.
- ✚ Han-Ju Sun, Jing Wang, Xue-Ming Tao, Juan Shi, Mei-Ying Huang, and Zhe Chen,(2012), Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Rape Flower China., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 823–829
- ✚ Harel, E., Mayer, A. M. and Lerner, H. R. (1970). Change in the level of catechol oxidase and laccase activity in developing peach. *J. Sci. Food.* 21, 542-544 .
- ✚ Hasegawa, S. and Maier, V. P. (1980). Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.
- ✚ Himmelwright RS, Eickman NC, Lu Bien CD, Lerch K, Solomon EI. 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora tyrosinase*: Comparison to hemocyanins. *J Am Chem Soc* 102: 7339 –7344.
- ✚ Ikediobi C O, Obasuyi H N (1982) . Purification and some properties of o-diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry* VOL 21 : 2815-2820.
- ✚ James K. Palmer.(1963). Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties , *Plant Physiology*, Volume 38, Issue 5, September 1963, Pages 508–513.
- ✚ Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P. et Brulé G. (2006). *Sciences des aliments*, Tec et
- ✚ Jiang Y-M I, Zauberman G, Fuchs Y. (1996). Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology* 10 , 221-228
- ✚ Jolivet, S., N. Arpin, et al. (1998). "Agaricus bisporus browning: a review." *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- ✚ Karbassi, F., K. Haghbeen, et al. (2003). "Activity, structural and stability changes of mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate." *Colloid Surface B* 32(2): 137-143.
- ✚ Kessous C, Bouchagra T,(2008), *Enzymologie biochimie metabolique*, ben aknoun, alger . Kidron, M., Harel, E. and Mayer, A. M. (1978). Catechol oxidase activity in grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 30-36.
- ✚ Klabunde, T., C. Eicken, et al. (1998). "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." *Nat. Struct. Biol.* 5(12): 1084-1090.

- ✚ Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam (2006). N. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, Vol. 101, 778-785.
- ✚ Kumar A, T.C. Mohan K, K. Murugan .(2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*) . *Journal of Food Chemistry*. Vol 110:328-333.
- ✚ Lee, C. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W., & Brown, S. K. (1990). Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenol oxidase activity among various peach cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 99.
- ✚ Lee, C.Y., Smith, M.L. and Pennesi, A.P. (1983). Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *J. Sci. Food Agric.* 34, 987-991.
- ✚ Lerch, J. (1982) . *Biol. Chem.*, Vol(11) :257-6414.
- ✚ LERCH, K. (1983). Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.*, Vol 52:125-138.K.
- ✚ Lerch, K. (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine B-monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed .H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 143-86.
- ✚ Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- ✚ Liu, F., Zhao, J., Wen, X., Ni, Y. (2015, a). Purification and structural analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from Fuji apple. *Food Chem.* 183, 72-77.
- ✚ Luh, B.S., and Phithakpol, B. (1972). Characteristic of polyphenol oxidase related to browning in cling peaches. *Journal of Food Science*, Vol 27, 264-268.
- ✚ M. OKTAY, I. KÜFREVIOLU, I. KOCAÇALIŞKAN, H. ŞAKIROLU. (1995). Polyphenoloxidase from Amasya Apple. Volume 60, Issue 3, May 1995, Pages 494-496
- ✚ Macheix J.J., Fleuriet A. et Billot J. (1990). Phenolic compounds in fruit processing. C.R.C. Press, BOCA RATON. *Fruit phenolics*, pp 295-322.
- ✚ Mann, H. S., Alton, J.J., Kim, S., and Tong, C.B. (2008). Differential expression of cell-wall modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1), 152-157p.
- ✚ Mansouri A., Guendez E., Kokkalouc E., et Panagiotis K., (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry* .89, 411-420.

- ✚ Mayer, A. M. and Harel, E. H. (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochem.* 18, 193-215.
- ✚ Munier P, (1973). *Le palmier dattier*, Maisson neuve et Larose, Paris. 25-28-31-32-40-48-141-142-221-367p. mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate." *Colloid Surface B* 32(2):
- ✚ Mutlak H.H. et Mann J., (1984). Darkening of dates: Control by microwave heating. *Date Palm Journal*, 3(1), 303-316.
- ✚ Nagai T and Suzuki N. (2001). Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa L.* *Food Chemistry* 49, 3922-3926
- ✚ NAGAI T. AND SUZUKI N. (2003). Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max L.*) *Journal of Food Chemistry*. Vol. 68, Nr. 16-18
- ✚ Nicolas J.J. et Potus J. (1993). Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydation. Exemple du rôle de la lipoxygénase de panification et de la lyoxygénase en technologie des fruits. *Sciences des fruits*, vol. 14, pp 627-642.
- ✚ Nicolas J.J., Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J., Aubert S.y., (1994). Enzymatic browning reaction in apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109-157.
- ✚ Önez Z; Karakus E; and Pekyardimci S. (2008). Izmir grape Polyphenol Oxidase (*Vitis vinifera L.*) partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. Vol. 32, pp. 398-414.
- ✚ Radha Iyengar, Arthur J. McEvily. (1992). Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 3, Pages 60-64.
- ✚ Rafi Z. Kazandjian et Alexander M. Klivanov. (1985). Regioselective Oxidation of Phenols Catalyzed by Polyphenol Oxidase in Chloroform. 107, 5448-5450
- ✚ Rescigno, A; Sollai, F; Pisu, B; Rinaldi, A and Sanjuust, E. (2002). Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol. 17, 207-218.
- ✚ Rivas, N. J. and Whitaker, J. R. (1973). Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant Physiology*. 52, 501-507
- ✚ Robb, D. A. (1984). Tyrosinase. Copper proteins and copper enzymes. R. Lontie. Florida, CRC Press, Inc. 2: 207-240.
- ✚ Robb, D. A. (1984). Tyrosinase. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*, CRC Press; Boca Raton, U.S.A.. 2. 207-241.
- ✚ ROSA, D. A. and EMIOLA, L. (1980). Characteristics of *Dioscorea rotundata* polyphenol oxidase. *J. Appl. Biochem.* 2, 100-110.

- ✚ SACHDE, A. G., Al-bakir' A.y and Abdul-Raheem, J. A. K. (1989).polyphenoloxidase from barhee and zahdi dates.I.Purificatio J.Food Biochem.Vol 12 :227-240.
- ✚ Sapers ,G.M.(1993) .Browing of foods :control by sulfites,antioxidantsand other means .Food Technol.,Vol .47,pp.75-84.
- ✚ Sapers, G.M., and Hicks, K. B.(1989). Inhibition of Enzymatic Browning in Fruits and vegetables. In Quality Factors of Fruits and Vegetables: Chemistry and Technology, ed. Jen, J.J., ACC Symp., Series 405, pp 29-43, Am. Chem. Soc. Washington, DC.
- ✚ Sato, M. (1976). Phenolase of spinach roots. Phytochem., Vol 15, 1845-1847.
- ✚ Sawaya W N, Khatchadourian H, Khalil J., (1982). Growth and chemical characterization of three Saudi date cultivars at various stages of development. Can.inst. Food Sci. Technol., 16, 87-91 p. 137-143.
- ✚ Segel, I. H. (1994). Simple inhibition system. In I. H. Segel (Ed.),Enzyme kinetic; behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems (pp. 100–136).
- ✚ Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S., Adir, N., & Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. Journal of molecular biology, 405(1), 227–237.
- ✚ Siddiq, M., Dolan, K.D.,(2017). Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chem. 218, 216–220
- ✚ Soler-Rivas, C., S. Jolivet, et al. (1999). "Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*." FEMS Microbiol. Rev. 23(5): 591-614.
- ✚ Soysal, C., et Soylemez, Z. (2004). Properties of wheat bran polyphenol oxidase. Nahrung/Food, 48, 5–8.
- ✚ Spais, J. C., Macheix, J. J. and Cordonnier, R. E. (1983). The browning capacity of grapes. 1. Changes in polyphenol oxidase activities during development. J. Agric. Food Chem. 31, 342-345.
- ✚ Spayed, S. E. and Morris, J. R. (1980). Preliminary study of peroxidase and polyphenol oxidase activity in strawberry fruit. Strawberry Mechanization Station, Bulletin Vol 645 (Aug.), 171-174.
- ✚ Stephanie G. Burton,(1994) . biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, sience direct.,Vol 22,459–487.
- ✚ Strothkamp, K. G., R. L. Jolley, et al. (1976). "Quarternary structure of mushroom tyrosinase." Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol 70: 519-524.

- ✚ Sugumaran, M. (1998). Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect Physiol.* 27, 229-334
- ✚ Sun G, Khtan B, Huang S, Whiteman M et Zhu Y., (2002). Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta pharmaco.* 23, 1142-1151
- ✚ Suniti U. Pathak, Vikram S. Ghole. (1994) .Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*, *Phytochemistry*, Volume 36, Issue 5, Pages 1165-1167.
- ✚ Tan K S, Tosont T, Masuda Y, Kamisaca S, (1992). Involvement of cell Wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth Rate and cell wall extensibility of *Oryza coleoptiles*. *Plant cell physiol.*,Vol 30, 103-108 p.
- ✚ Teng,J.,Gong,Z.,Deng,Y.,Chena,L.,Li,Q.,Shao,Y.,Lin,L.,Xia,W.(2017).Purification characterization and enzymatic synthesis of theaflavins of polyphenol oxidase isozymes from tea leaf (*Camellia sinensis*). *LWT-Food Sci.Technol.* 80,263-270.
- ✚ Tomás-Barberán, F. A., and Espin, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876p.
- ✚ Tshivinska, M. V., Antonyuk, V. O., & Stoika, R. S. (2015). ISOLATION AND PROPERTIES OF POLYPHENOL OXIDASE FROM BASIDIOMYCOTAS OF *Lactarius pergamenus* Fr. (Fr.) FUNGI. *Ukrainian biochemical journal*, 87(2), 56–65.
- ✚ Ülker F yerlitürk1, oktay a, sinan S 2,3, gencer N and özensoy ö g.(2007).characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*pyrus elaeagnifolia*), *Journal of Food Biochemistry* 32 ,368–383
- ✚ Unal, M. U. (2007). Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, Vol 100: 909–913.
- ✚ Ünal, M. Ü., & Sener, A. (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2374–2379.
- ✚ Vamos-vigyazo, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Vol 15: 49-127.
- ✚ Van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H., et Wichers, H. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.*,Vol 45(7): 1309–1323.
- ✚ Walker J.R.L.,Ferrar P.H.(1995).The control of enzymatic browning in foods,*Chem.Industry*,836-839.

- ✚ Walker J.R.L., Ferrar PH, (1998). Diphenoloxidase, Enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, 15, 457-498.
- ✚ 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.
- ✚ Wisseman, K. W. and Lee, C. Y. (1980). Polyphenol oxidase activity during grape maturation and wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol 31: 206-311.
- ✚ Wong, I. G., Luh, B. S. and Whitaker, J. R. (1971). Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach. *Plant Physiol.*, Vol 48, 14-23.
- ✚ Yemennicioglu, A. (2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *January 2002 214(4):313-319*
- ✚ Yoruk, R., & Marshall, M.R. (2003). PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND FUNCTION OF PLANT POLYPHENOL OXIDASE: A REVIEW'. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361-422.
- ✚ Zafrilla, P., Ferreres, F., and Tomas-Barberan, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *J. Agric. Food Chem.* Vol 49:3651–3655.
- ✚ Zaini, N.A.M., Osman, A., Hamid, A.A., Ebrahimpour, A., Saari, N. (2013). Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO) from Snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss]. *Food Chem.* 136, 407–414
- ✚ Zawstowski J., Biliaders, Eskin, N.A.M., (1991). Polyphenoloxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. d.s.r and Eskin, n.a.m., eds, Elsevier appl. Sc., London, chap., 6, 217-273.
- ✚ Zhou P, Nancy L. Smith, and Chang Y. Lee'. (1993). Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley's Seedling): Purification Strategies and Characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2007.2008/Vol 71.
- ✚ Zhou, X., Xiao, Y., Meng, Y., Liu, B. (2018). Full inhibition of Whangkeumbae pear polyphenol oxidase enzymatic browning reaction by L-cysteine. *Food Chemistry*. 266, 1-8.

Références webographies

ExplorEnz. (n.d.). EC 1.10.3.1: Catechol oxidase. ExplorEnz: The Enzyme Database.
<https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=1.10.3.1>