

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

جامعة عمار تليجي - الاغواط

Faculté des sciences

كلية العلوم

Département de Biologie

قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

**Etude cinétique de l'inhibition du pyrogallol
oxydase des dattes de trois variétés
par l'acide citrique**

Présenté par :

M. OULAD SAID Salim

M. KOUIDRI Mohammed said

Devant le jury :

Président : Mr SIFI Ibrahim

Rapporteur : Mr BENACEUR Farouk

Examineur : Mr LEBOUKH Mourad

2016/2017

Dédicaces

*Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail
que je dédie :*

A la mémoire de mes grands parents

*A mon père mon professeur de toujours, et ma très
chère mère*

Pour leurs soutien et encouragements.

*A mes chères Frère, Sœurs et à tous mes amis sans
exception.*

*A mes proches et toute mes familles (Kouidri, Benbay
, Taifi, Lakhdimi, Belali.....)*

A gens qui m'aiment.

*A tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je
n'ai pas cité le nom.*

Au bonheur des plus chers.

Merci à tous

Mohammed said

Dédicaces

*Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail
que je dédie :*

A la mémoire de mes grands parents

*A mon père mon professeur de toujours, et ma très
chère mère*

Pour leurs soutien et encouragements.

*A mes chères Frère, Sœurs et à tous mes amis sans
exception.*

*A mes proches et toute mes familles (Oulad Saïd
,Kroumi , Kelbit Bounaoua,.....)*

A gens qui m'aiment.

*A tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je
n'ai pas cité le nom.*

Au bonheur des plus chers.

Merci à tous

Oulad saïd salim

Remerciements

Nous remercions profondément M BENACEUR FAROUK, ses conseils et ses directives ont contribué fortement à la réalisation de cette mémoire.

Nous remercions tout particulièrement Dr. Hicham Gouzi, Dr. Rachid Chaïbi, M. Labokh Mourad, Dr. Sifi Ibrahim et Mme Allal Farida et Dr Benarous Khedidja, Dr. Ouinten Mohamed et Mme Elhouiti Fatiha pour leurs aides et leurs conseils et pour leurs grandes valeurs humaines.

Nous souhaitons aussi saluer et remercier nos collègues étudiants(es),

Avec qui nous avons eu le plaisir d'étudier durant ces trois dernières années.

Nous tenons aussi à remercier toute l'équipe administrative particulièrement

Melle Kroba Oum Elkhier et tous les enseignants du département de Biologie de l'Université Amar Telidji.

Un grand merci à mes parents et à toute mes familles pour leur amour, leur aide et leur soutien.

ملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة الية تثبيط نشاط البوليفينول الانزيمي للتمر, (cv Takarbouchet *Phoenix dactylifera* L), بواسطة حمض الستريك. و بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي تم قياس تثبيط نشاط البوليفينول اوكسيداز بطول موجة يساوي 410 نانو متر و درجة حموضة 4.5 و 30 درجة مئوية و هذا باستخدام البيروغالول كدعامة .

تتأثر عملية تثبيط البوليفينول اوكسيداز بتراكيز حمض الستريك المستعملة ل IC50 و هي كالتالي (IC50=8,28mM ±0,45 ; IC50=6,881 mM±0,38 ; IC50 = 15,54±0,63) للبوليفينول اوكسيداز الخاص بالأصناف Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret , بالترتيب. ولقد أظهرت بيانات Lineweaver – Burk أن حمض الستريك هو مثبط غير تنافسي لنشاط البوليفينول اوكسيداز لهذه الأصناف من التمر, مع قيم ثابت التفكك K_{IS} التي تساوي 13,072±0,691, 18,32±0,43 et 33,176±0,892 للبوليفينول اوكسيداز الخاص بالأصناف Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret , بالترتيب. كلمات مفتاحية : تمر, بوليفينول اوكسيداز, حمض الستريك, تثبيط, الاسمرار الإنزيمي.

RÉSUMÉ

Ce présent travail à pour objectif d'étudier l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) des dattes (*Phoenix dactylifera* L cv Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret) par l'acide citrique. L'activité de la PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, à pH 4,5 et à 30°C, en présence de pyrogallol comme substrat.

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration de l'acide citrique utilisé dont les valeurs d'IC₅₀ sont (IC50=8,28mM ±0,45 ; IC50=6,881 mM±0,38 ; IC50 = 15,54±0,63) pour la PPO de la variété Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret , respectivement .

La représentation de Lineweaver-Burk indique que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de l'activité de la PPO de ces tris variétés des dattes avec une valeur de K_{IS} égale à 13,072±0,691, 18,32±0,43 et 33,176±0,892 pour la PPO la variété Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret , respectivement

Mots clés : dattes , PPO, ,acide citrique , Inhibition, Brunissement enzymatique.

ABSTRACT

The aim of present paper is to study inhibition of polyphenol oxidase (ppo) enzyme responsible of the dates browning (*Phoenix dactylifera* L cv Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret) by citric acid. The ppo activation was measured by spectrophotometre at 410 nm using pH 4.5 and 30°C, in the presence of pyrogallol as substrate.

The inhibition degree of PPO depending on the concentration of citric acid was evaluated by this values of IC50 (IC50=8,28mM ±0,45 ; IC50=6,881 mM±0,38 ; IC50 = 15,54±0,63) for the PPO of Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret , respactevly .

The Lineweaver – Burk representation indicates that the citric acid reacts as non-competitive inhibitor of PPO activity with a values of K_{is} equaling : (13,072±0,691, 18,32±0,43 et 33,176±0,892) for the PPO of Takarbouchet, cv Tedela et cv Tamjohret , respactevly .

Key words : dates , PPO, citric acid, Inhibition, enzymatic browning.

Sommaire

I.1. Généralité sur le Palmier dattier.....	3
I.2. Généralité sur la datte	4
I.2.1. Description de la datte	4
I.2.2. Formation et maturation de la datte	4
I.2.3. composés chimiques et biochimiques de la partie comestible de dattes	7
I.2.4. Valeur nutritionnelle des dattes	9
I.2.5. Les utilisations des dates	10
II.1. Poly phénol oxydase.....	11
II.1.1. Définition de la Polyphénole oxydase.....	11
II.1.2. Nomenclature de la Polyphénole oxydase	11
II.1.3. Classification de la Polyphénole oxydase	11
II.1.4. Caractéristiques réactionnelles des polyphénol-oxydases	12
II.1.5. Mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique	13
II.1.6. Caractéristiques du site actif	14
II.1.7. Substrats phénoliques et spécificité enzymatique	16
II.1.8. Rôle physiologique des polyphénoloxydases (PPO).....	18
II.2. Brunissement enzymatique.....	18
II.2.1. Le brunissement enzymatique des fruits et des légumes	18
II.2.2. Contrôle du brunissement enzymatique	19
II.2.2.1. Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique	20
II.2.2.1.1. Les traitements thermiques	20
II.2.2.1.2. La congélation.....	20
II.2.2.2. Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique.....	20
II.2.2.2.1. Agent réducteur.....	21
II.2.2.2.2. Agents chélateurs.....	22
II.2.2.2.3. Inhibition ciblant l'enzyme	22

Liste des figures

Figure1 : Schéma du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera L.</i>) d'après	3
Figure 2 : Schéma datte et son noyau	4
Figure 3 : Dattes en stade Khalal	5
Figure 4 : Dattes en stade Blah	5
Figure 5 : Dattes en stade Bser	6
Figure 6 : Dattes en stade Rotab	6
Figure 7 : Datte Mech-Degla entière et en coupe	7
Figure 8 : Schéma de la réaction catalysée par la PPO ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées.....	12
Figure 9 : Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase	13
Figure 10 : 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	15
Figure 11 : Vue à l'intérieure du site actif.....	15
Figure 12 : L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . Les trois résidus histidines liés au CuA son 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.....	15
Figure 13 : Structures de composés phénoliques substrats des PPOs	17
Figure14 : Le protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera L.</i>).....	23
Figure15 : L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Pyrogallol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Takarbouchet</i>). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 4,5).....	25
Figure16 : L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Pyrogallol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Tamjohret cv Tedela cv Takarbouchet</i>). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 4,5).....	26
Figure17 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv tedela</i>) par l'acide citrique.....	30
Figure18 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Tamjohret</i>) par l'acide citrique.....	31
Figure 19 : Représentation de l'inhibition non compétitive	32
Figure 20 : Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive	32

Liste des tableaux

Tableau 1: composés chimiques et biochimiques de la partie comestible de dattes.....	8
Tableau 2: les éléments nutritifs et leurs teneurs de variété de dattes	9
Tableau 3: Inhibiteurs du brunissement enzymatique.....	21
Tableau 4: Les valeurs d'IC50 de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats	27
Tableau 5: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L cvTakarouchet</i> ,) en utilisant le pyrogallol comme substrat.....	28
Tableau 6: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L cvTedela</i>) en utilisant le pyrogallol comme substrat..	28
Tableau 7: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L cv Tamjohret</i>) en utilisant le pyrogallol comme substrat.....	29

Liste des abréviations

Abs : absorbance.

ANR :Apport Nutritionnel Recommandé.

°C : degré Celsius.

Cal : calorie.

Cl : chlore.

cm :Centimètre.

Cu : cuivre.

cv : certaine variété.

DIECA :diéthylthiocarbamate de sodium.

E : enzyme.

%:pourcentage.

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique acide.

µg : microgramme

His : Histidine.

IC₅₀ : concentration de l'inhibiteur de 50% de l'activité.

µl : microlitre.

KH₂ PO₄ :phosphate de potassium.

M : mole sur litre.

mg :millie gramme.

min : minute.

ml :millie litre.

O₂:oxygène moléculaire.

o-diphénol : ortho diphénol.

o-quinone :orthoquinone.

PH :coefficient d'acidité.

PPO : polyphénol oxydase

PVPP : polyvinyle polypyrrolidone

[S] : concentration de substrat

tr : tourne

UI: unité internationale

V₀: vitesse initiale

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La datte, est le fruit du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. produit dans les régions sahariennes considéré comme un aliment de grande importance pour la population habitant ces régions. Dans le sud Algérien, les dattes constituent un aliment fondamental pour les musulmans durant toutes les saisons et particulièrement pendant le mois sacré de Ramadhan.

La datte est un aliment historique de grande valeur énergétique car elle est une source riche en glucides, en fibres alimentaires, en composés phénoliques, en vitamines et en macroéléments faisant d'elle un aliment naturel nutritif pour l'humanité (**Kulkarni et al., 2008 ; Dowson et al., 1963**). Elle est très appréciée aussi bien sur le plan national qu'international.

L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique qui se produit au cours de développement des dattes, la récolte, traitement et le stockage. Le brunissement enzymatique est un phénomène largement rencontré chez les fruits et les végétaux, il est le plus souvent une réaction indésirable, provoque la formation d'un pigment brun responsable du changement de couleur, d'odeur et du goût désagréables des dattes (**Martinez et Whitaker, 1995**) et par conséquent diminuant sa qualité nutritionnelle et sa valeur commerciale. La polyphénol oxydase (PPO) est reconnue comme étant la principale enzyme responsable du brunissement des dattes.

La PPO est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (**Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979**) et (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín et al., 2006**). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'oxydation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 10. 3. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent pour former un colorant brun ou noir appelé mélanine (**Varoquaux, 1978**).

L'inactivation de la PPO par les inhibiteurs chimiques est l'une des méthodes de contrôle la plus efficace pour la prévention du brunissement enzymatique. Cependant, leur utilisation ne peut être possible que s'ils n'ont aucun effet toxique, ne modifient ni le goût ni la couleur des produits et le traitement n'est pas coûteux (**McEvily et al., 1992; Sapers, 1993**).

Au cours des dix dernières années, certains rapports ont été consacrés sur l'étude de l'inhibition de la PPO de différentes sources par des acides organiques (tel que l'acide citrique) comme des anti-brunissements dans l'industrie alimentaire (**Queiroz et al., 2011**). Par contre, l'inhibition de la PPO de datte n'a pas suscité l'attention similaire. Pour cela, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de l'acide citrique, sur l'activité de la PPO des de trois variétés des dattes « *Phoenix dactylifera* L cv

Introduction générale

Takarouchet, cv Tedela, cv Tamjohret » tout en déterminant le mécanisme d'inhibition correspondant et ceci en utilisant le pyrogallol comme substrat phénolique.

Notre travail sera présenté en quatre parties et est séquencé comme suit. La première partie concerne un rappel bibliographique sur la datte, la polyphénol oxydase (PPO) et sur le brunissement enzymatique et sa prévention. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. La troisième partie est dédiée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans la dernière partie.

PREMIERE PARTIE
ETUDE BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 1
GENERALITE SUR LES
DATTES

I.1. Généralité sur le Palmier dattier

Le dattier est un arbre probablement originaire du golfe persique, cultivé dans les régions chaudes et humides. C'est une espèce dioïque c'est-à-dire existe des dattiers males (Dokhar) et des dattiers femelles (Nakhla), monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbre à palmes et produit des dattes (Mozoyer., 2002 ; Gilles., 2000).

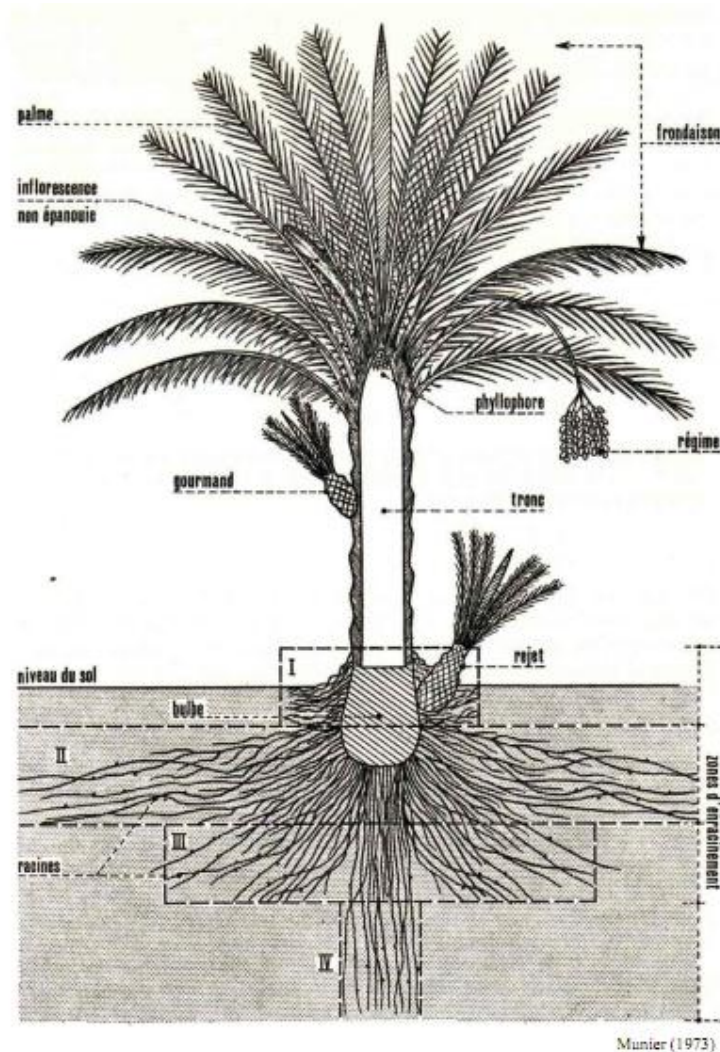


Figure N° 1 : Schéma représente un palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) d'après (Munier, 1973)

I.2.Généralité sur la datte

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, ou arrondie. Elle est composée d'un noyau ayant une consistance dure, entouré d'une partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe. (Djerbi., 1994).

I.2.1. Description de la datte

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambres, rouges, brunes plus ou moins foncées (Djerbi., 1994).

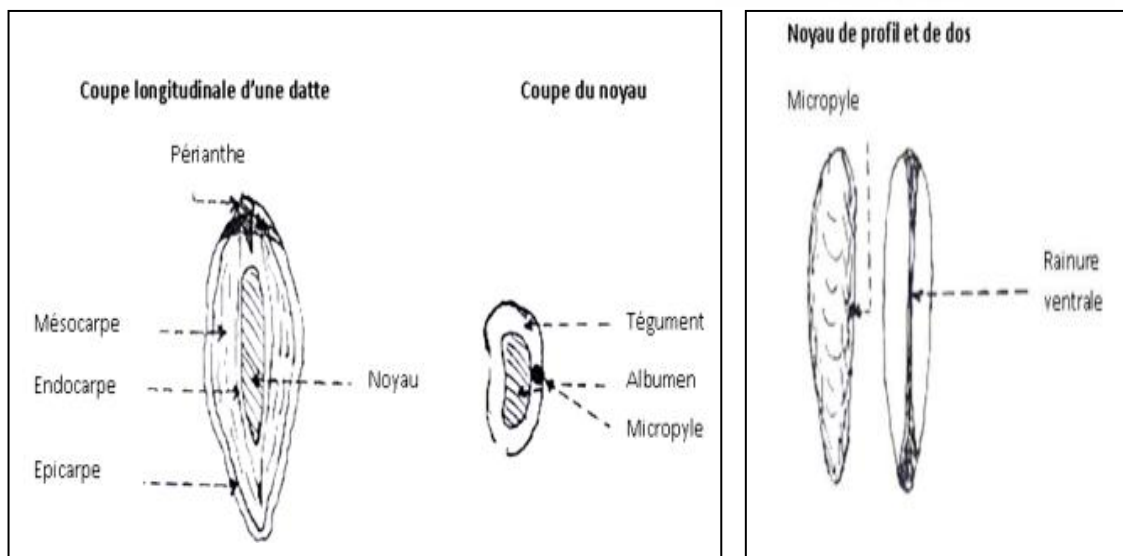


Figure N° 2 : Schéma représente la datte et son noyau (Belguedj, 2001)

I.2.2. Formation et maturation de la datte

Chaque stade de maturité correspond à une appellation particulière. Par ailleurs, toutes les références bibliographiques indiquent cinq stades phénologiques. Les cinq stades de maturation phénologique utilisés ultérieurement sont repris dans toute la bibliographie (Dawson., 1963 ; Munier., 1973 ; Akidi., 1987 ; Barreveld., 1993 ; Beker., 2002 ; Belguedj., 2002 (b) ; Ipigri., 2005) et ce sont les suivants : premier stade : **khalal**, deuxième stade : **Blah**, troisième stade : **Bser**, quatrième stade : **Rotab** et le cinquième stade : **Tmar**.

➤ Stade Khalal

C'est le stade qui suit immédiatement la pollinisation. La datte a une forme sphérique, de couleur crème. L'évolution du fruit est très lente. Ce stade dure 4 à 5 semaines après la pollinisation. (Ipigri., 2005)



Figure N° 3: Dattes en stade Khalal

➤ **Stade Blah**

A ce stade de maturité du fruit, la datte qui tombe du régime et mûrit est désignée par le terme arabe romakh, et en mozabite par torchimt. Cette désignation concerne particulièrement la variété DegletNour. La datte commence son développement, grossit et prend une teinte verte (vert pomme). Ce stade s'étend de juin à juillet, il constitue la phase la plus longue de l'évolution de la datte, et dure 4-7 semaines. (Ipigri., 2005)



Figure N° 4: Dattes en stade Blah

➤ **Stade Bser**

Selon le descripteur du palmier dattier (Ipigri 2005), c'est le stade de développement de la datte durant lequel, le fruit prend sa forme et sa taille finale, et il passe de sa couleur verte à une couleur généralement jaune ou rouge, rarement verdâtre. La période de ce stade dure de trois à cinq semaines.



Figure N° 5: Dattes en stade Bser

➤ **Stade Rotab**

La datte passe du stade Bser à ce stade par l'apparition progressive de points d'amollissement. En général, ce changement de texture commence par la partie supérieure du fruit (Turrell, 1940 ; Cavell, 1947; Bakkaye, 2006). Puis, il ya une homogénéisation de la couleur et de la texture. Il existe des variétés où l'amollissement apparaît de façon aléatoire (Beker., 2002). La datte devient alors translucide, sa peau passe du jaune de chrome à une couleur presque noire, ou au vert selon les variétés.



Figure N° 6: Dattes en stade Rotab

➤ **Stade Tmar ou Tamr**

C'est le stade final de maturation de la datte. La consistance du fruit à ce stade est comparable à celle du raisin et des prunes. Dans la plupart des variétés, la peau adhère à la pulpe et se ride à mesure que celle-ci diminue de volume. Toutefois, dans certains cas, la peau très fragile craque lorsque la pulpe se réduit et laisse ainsi exposés des fragments de chair poisseuse qui attirent les insectes ou agglutinent des grains de sable. (Bakkaye., 2006)

La couleur de l'épiderme et de la pulpe fonce progressivement. A ce stade, nous distinguons deux catégories de dattes (Dawson., 1963) .

- ✓ **Dattes molles** : la pulpe est d'abord molle, ensuite elle devient de plus en plus ferme tout en restant souple. Exemple : variétés BentQbala, Litima (Ghardaia- Algérie).

- ✓ **Dattes sèches** : où il n'y a pas de passage par le stade Rotab. La teneur en eau reste la même que pour la datte molle à ce stade. Cependant, la texture est plus serrée et la couleur à ce stade est claire. Exemple : variétés MechDeglaetDeglaBeyda (Biskra - Algérie). Le fruit perd beaucoup d'eau et le rapport sucre/eau reste assez élevé empêchant la fermentation et l'acidification (oxydation).



Figure N° 7: Datte Mech-Degla entière et en coupe

I.2.3. composés chimiques et biochimiques de la partie comestible de dattes

La datte est constituée de la pulpe en chair et d'un noyau. La proportion du noyau par rapport à la datte entière constitue une caractéristique qui dépend non seulement de la variété mais aussi des facteurs climatiques et des conditions de culture. Cette caractéristique est utilisée par les sélectionneurs pour évaluer la qualité d'une variété. Une datte *Deglet-Nour* de qualité, pesant environ 10 g, comporte 10 % de noyau et 90% de pulpe (Arnaud., 1970).

Tous les travaux sur l'étude de la composition chimique de la datte, ont montrés que le sucre et l'eau sont les principaux constituants de la chair.

En effet, la stabilité de la datte dépend du rapport sucres/eau qui doit être d'environ de 2 (Husson., 1931 ;Matallah., 1970).

Tableau 1: composés chimiques et biochimiques de la partie comestible de dattes

Les composés	Teneur du poids frais
Eau (Noui, 2007).	varie entre 8 et 30 %
Sucres (SIBOUKEUR., 1997).	60 et 80 % en saccharose 17 à 80% pour les sucres réducteurs
Protéines (Besbes et al., 2009).	Les protéines avec 23 acides aminés moins de 3%
Lipides (Djouab, 2007)	Lipides avec 06 acides gras de 0,43 à 1,9 %
Les fibres (LUND et al., 1983)	cellulose 1,55 % hémicellulose (1,28 %) lignine (2,01 %) lignocellulose et de pectines insolubles (très variable selon les variétés).
Vitamines (Regimes Maigrir.com ,2014)	149 UI vitamine A 0,1 mg de vitamine B1 0,1 mg de vitamine B2 1,6 mg de vitamine B3 0,8 mg de vitamine B5 0,2 mg de vitamine B6 15 µg de vitamine B9 2,7 µg de vitamine K
Carotenoids (Harraket al, 2012).	61,7-167 µg/100g lutéine 32,6-672 µg/100g bêta carotène 37,3-773 µg/100g néoxanthine
Les enzymes principales (REYNES MAX, 1997).	l'invertase, la polyphénoloxydase, la peroxydase, la pectine méthylestérase et la polygalacturonase, le cellulase
acides organiques (Youssef et al., 1992)	malate, citrate, et oxalate
matière minérale (Hasnaa et al, 2012).	107,4 à 916 mg potassiums 13 à 63 mg phosphores 0,3 à 10,4 mg fer 9,5 à 207 mg calciums 0,8 à 1 mg cobalt 0,1 à 2,9 mg cuivre 0,3 à 5,9 mg manganèse 0,1 à 1,8 mg zinc 0,1 à 0,2 mg fluorine 0,1 à 0,3 mg sélénium
Autres composés (Barreveld, 1993)	pigments, acides phénoliques, flavonoïdes, tannas, composés volatiles (flaveurs)

La partie comestible de dattes (La pulpe)

I.2.4. Valeur nutritionnelle des dattes

Les dattes sont en effet des drupes (**Encarta, 2009**), très sucrées apporte d'extraordinaires valeurs nutritionnelles 100 grammes de dattes de variété apportent les aliments dans ce tableau :

Tableau 2: les éléments nutritifs et leurs teneurs de variété de dattes (RegimesMaigrir.com., 2014)

Eléments nutritives	Les teneurs	Calories
Sucres	75 g de glucides (dont 7 g de fibres alimentaires)	Ces éléments contenus dans 100 grammes de variété de dattes peuvent contenir 277 K cal
Protéines	1,8 g de protéine	
Lipides	0,2 g de graisse	
Vitamines	149 UI vitamine A (3% des ANR) 2,7 µg de vitamine K (3% des ANR) 0,1 mg de vitamine B1 (3% des ANR) 0,1 mg de vitamine B2 (4% des ANR) 1,6 mg de vitamine B3 (8% des ANR) 0,8 mg de vitamine B5 (8% des ANR) 0,2 mg de vitamine B6 (12% des ANR) 15 µg de vitamine B9 (4% des ANR)	
Minéraux	64 mg de calcium (6% des ANR) 0,9 mg de fer (5% des ANR) 54 mg de magnésium (14% des ANR) 1 milligramme (mg) de sodium 62 mg de phosphore (6% des ANR) 696 mg de potassium (20% des ANR) 0,4 mg de zinc (3% des ANR) 0,4 mg de cuivre (18% des ANR) 0,3 mg de manganèse (15% des ANR)	
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • 21,3 g d'eau • 1,7 g de cendres. • 0,4 mg de bétaine • 9,9 mg de choline 	

I.2.5. Les utilisations des dattes

(**EL SAYED et BAESHIN 1983**) considèrent la datte comme un aliment complet parce qu'elle contient des nutriments utiles au corps humain.

-Les polyphénols contenant dans les dattes jouent un rôle important dans le corps : ils ont des effets anti-inflammatoires, antioxydants, abaissent la tension artérielle et renforcent le système immunitaire.....etc.

-Le sélénium joue un rôle dans la prévention des cancers et donne le maintien du système immunitaire.

En particulier le potassium qui s'accumule dans la datte pendant sa maturation rend évidemment ce fruit un aliment très énergétique pour les personnes souffrant d'hypertension.

En outre, les dattes sont conseillées aux sujets anémiques étant donné leur riche teneur en fer (**Harrak et al, 2012**).

-Sa teneur impressionnante en fer fait de lui un complément alimentaire idéal pour les personnes souffrant d'anémie.

Les quantités significatives de minéraux présents dans les dattes en font un super aliment pour renforcer les os et repousser les maladies douloureuses et débilitantes comme l'ostéoporose.

Selon une étude réalisée en 2002, des composés de soufre organique peuvent produire un impact positif sur nombre de gens qui souffrent de RAS (rhinite allergique saisonnière).

Les vitamines présentes dans le fruit du dattier en font un coup de pouce idéal pour optimiser le fonctionnement du système nerveux. Le potassium est l'un des ingrédients de choix pour favoriser un système nerveux en bonne santé et réactif, et il améliore aussi la vitesse et la vivacité de l'activité cérébrale (**Regimes Maigrir.com 2014**).

-Des études ont montré que les fruits du dattier peuvent être bénéfiques pour augmenter l'endurance du partenaire masculin pendant les rapports intimes. Pour cela, il faut faire tremper une poignée de dattes dans le lait de chèvre frais pendant la nuit, puis les broyer (dans le même lait) en y versant un mélange de poudre de cardamome et de miel (**la revue "Iran J Med Sci., 2006**).

Et comme on l'a dit précédemment ne peut pas entourer l'intérêt des dattes dans ce modeste travail.

CHAPITRE 2
POLYPHENOL OXYDASE ET,
BRUNISSEMENT
ENZYMATIQUE

II.1. Poly phénol oxydase

II.1.1. Définition de la Polyphénole oxydase

La polyphénoloxydase (PPO) est une métalloprotéine à cuivre, présente dans l'ensemble du règne du vivant, des végétaux aux animaux en passant par les champignons. Leur étude a débuté il y a plus d'un siècle chez les champignons (**Bertrand., 1896**).

Les polyphénoloxydases représentent un groupe d'enzymes qui catalysent l'oxydation de composés phénoliques, en faisant intervenir l'oxygène moléculaire, en quinones, qui par la suite se polymérisent spontanément pour former des polymères bruns, responsables de la coloration brune, le plus souvent indésirable, observée sur les fruits et légumes endommagés (**Cheftelet Cheftel., 1976**).

II.1.2. Nomenclature de la Polyphénole oxydase

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

II.1.3. Classification de la Polyphénole oxydase

L'enzyme PPO est une oxygénase oxydoréductase (**Papa et al., 1994**). La classification et la spécificité de cette enzyme demeure confuse et sont quelque peu ambiguës (**Burton., 1994 ; Eickenet al., 1999**).

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB), a mis à jour la nomenclature et a placé la PPO dans deux catégories principales comme EC 1.14.18. 1-monophénolmonooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC, 1.10.3.2 *o*-diphénol: 02

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

II.1.4. Caractéristiques réactionnelles des polyphénol-oxydases

La classe des polyphénoloxydases est divisée en deux sous-groupes en fonction du substrat dont elles catalysent l'oxydation :

- hydroxylation en position ortho d'un substrat monophénolique (activité monophénoloxydase, crésolase ou tyrosinase) (réaction1)
- oxydation d'un diphénoles en benzoquinone (activité diphénoxydase, également appelée laccase, et spécifiquement catécholase lorsqu'il s'agit *o*-diphénol). (réaction2)

Ces deux réactions utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat. Lorsque ces deux activités enzymatiques sont simultanément observées dans les plantes, le ratio activité monophénoloxydase sur diphénoxydase est généralement de 1/10 et peut aller jusqu'à 1/40 (Nicolas *et al.*, 1994). Les différentes affinités relatives pour les substrats mono- et di- phénoliques observées pour une même enzyme sont attribuées à l'existence de sous-unités dont les propriétés chimiques, physiques et cinétiques varient et peuvent ainsi conférer à une même enzyme des activités mono- et diphénoxydase (Van Gelder *et al.*, 1997).

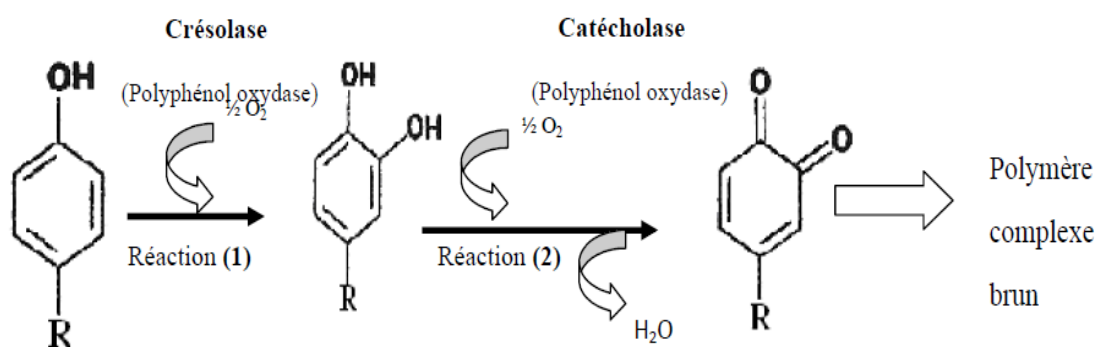


Figure N° 8: Schéma de la réaction catalysée par la PPO ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Van Gelder *et al.*, 1997)

II.1.5. Mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les tyrosinases d'origines fongiques. D'après (Sanchez-Ferrer et ses collaborateurs, 1995), le site actif des tyrosinases 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 9)

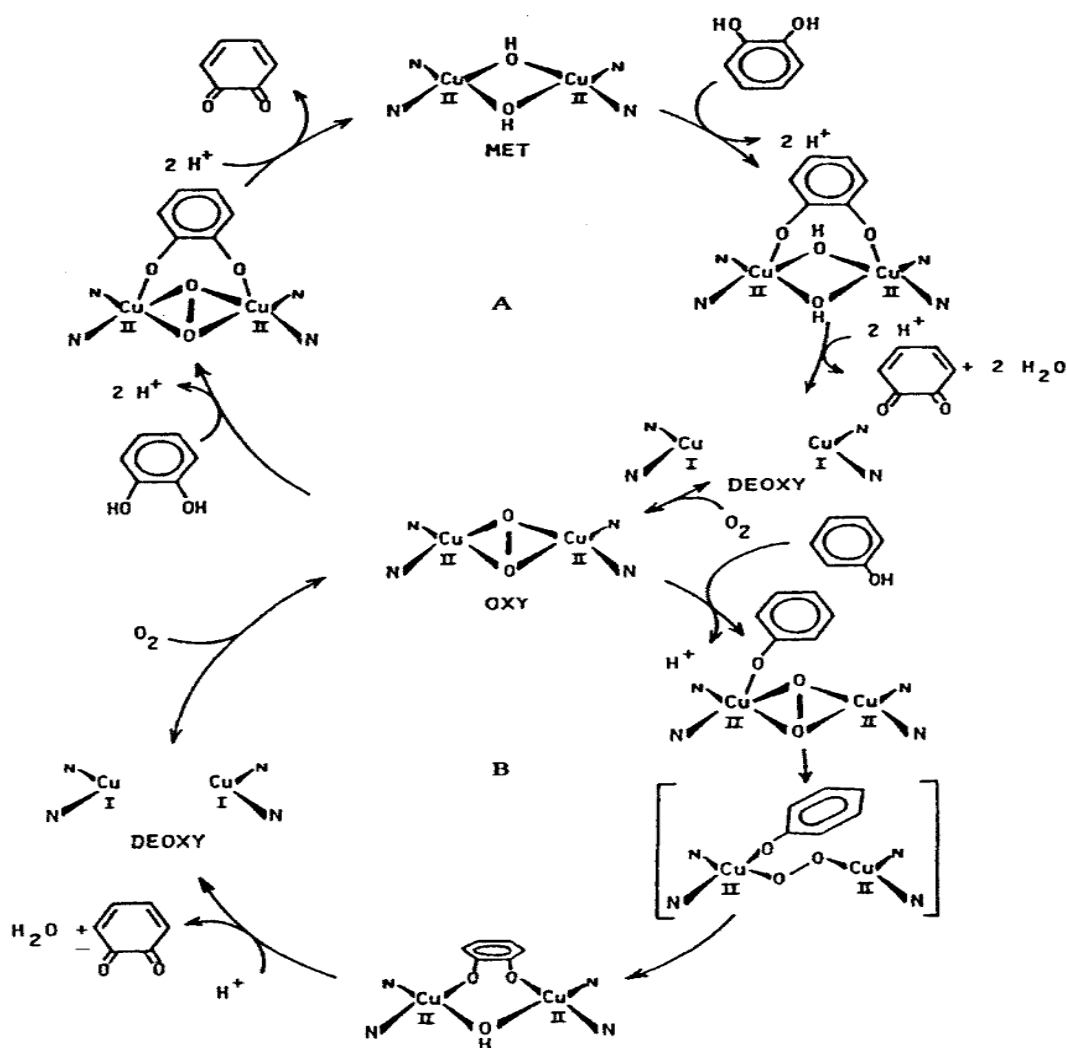


Figure N° 9 : Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la tyrosinase (d'après Lerch., 1995)

L'activité pyrogallique 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*PPO et au dégagement d'*o*-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxy*PPO est formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre *o*-quinone.

II.1.6. Caractéristiques du site actif

La PPO 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 (Turner., 1974 ;Mayer etHarel., 1991;Baldwin et al., 1992 ;Nowak etIto, 2003)

La structure secondaire de la PPO 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 ; Rosetal.,1994 ; Decker et Terwilliger,2000 ; 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 10). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus d'histidine fournis par les quatre hélices α (Figure 11). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situé 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 des 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 PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 12) (Van Gelder et al., 1997).

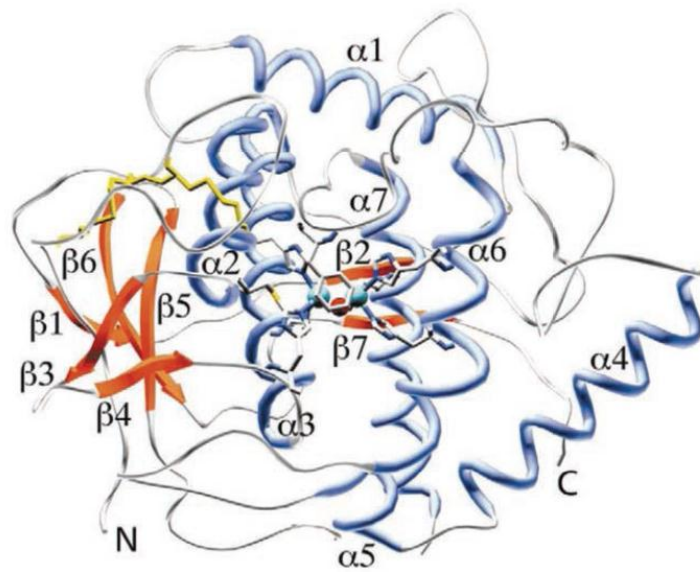
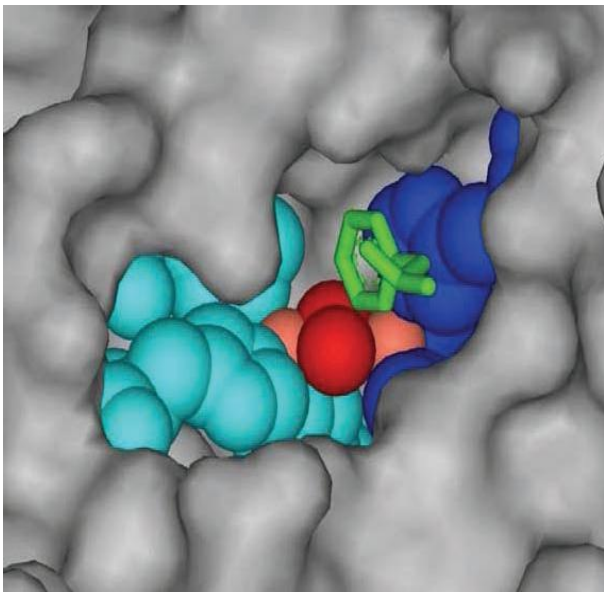


Figure N° 10: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (**Eickenetal., 1999**)).



FigureN° 11: Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limuluspolyphemus*. Lesatomes de cuivre (marron clair), oxygène(rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleuclair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé)(**Decker et Jaenicke., 2004**).

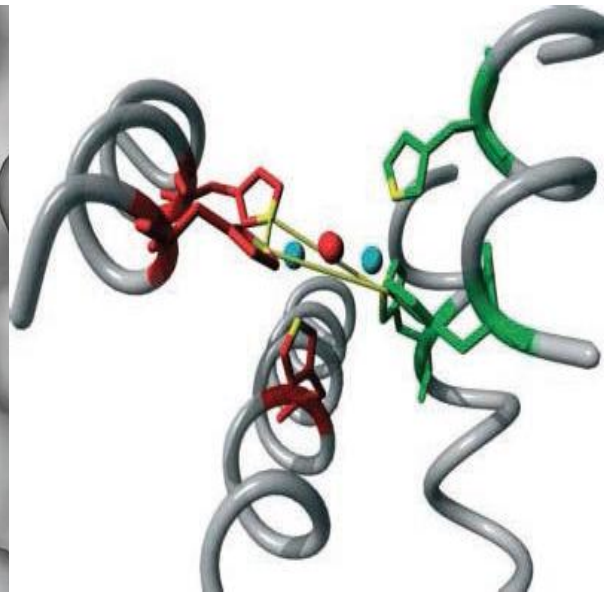
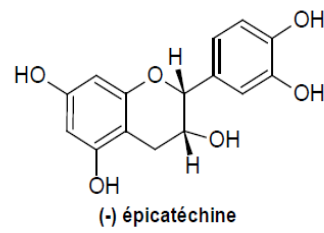
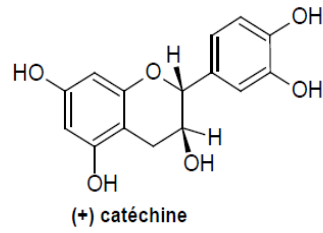
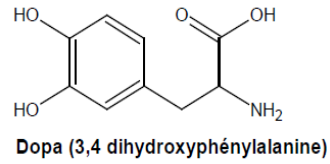
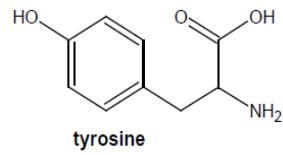


Figure N° 12: L'état Oxydu site actif d'hémocyanine de *Limuluspolyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sontcolorés en bleu et l'oxygène en rouge (**Decker., 2005**).

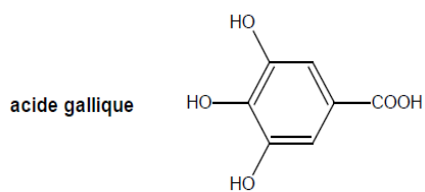
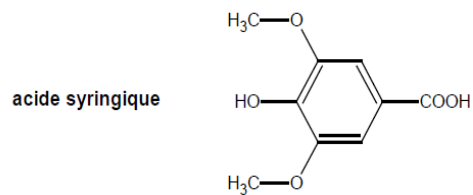
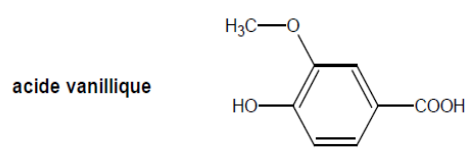
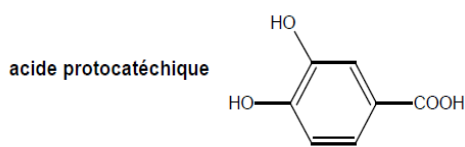
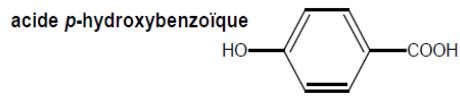
II.1.7. Substrats phénoliques et spécificité enzymatique

Les substrats phénoliques qui participent à la couleur, l'astringence, l'amertume et au goût des fruits et légumes, comportent un noyau aromatique porteur d'un ou plusieurs groupe(s) hydroxyle. La composition en polyphénols dans les végétaux varie selon l'espèce, le cultivar, la maturité, les conditions de culture et de stockage. (Crumière., 2000).

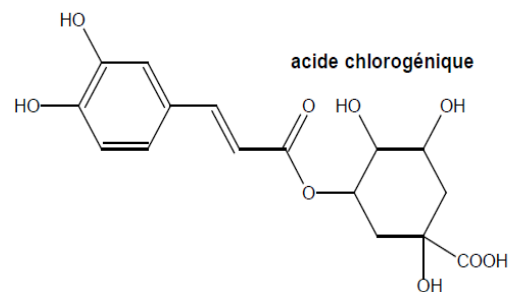
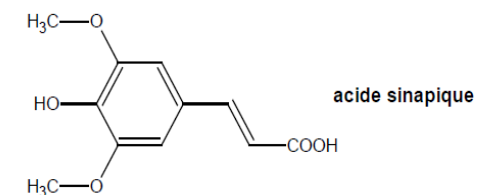
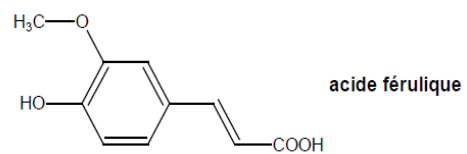
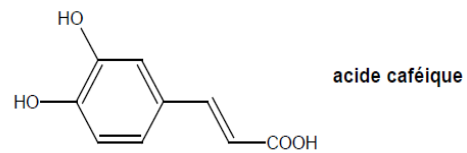
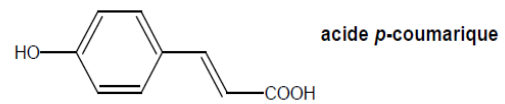
La **figure 13** présente les structures des composés phénoliques substrats les plus courants des PPO. Les dérivés de l'acide caféique, tels que l'acide chlorogénique, sont souvent cités comme étant les composés *o*-diphénols majoritaires dans les végétaux où ils sont présents sous forme glycosylés. Il faut alors noter que les monophénols tels que l'acide sinapique ou l'acide syringique forment alors des semi-quinones. (Crumière., 2000).



Série des acides benzoïques



Série des acides cinnamiques



FigureN° 13: Structures de composés phénoliques substrats des PPOs (Crumière., 2000).

II.1.8. Rôle physiologique des polyphénoloxydases (PPO)

Les PPO ont été découvertes dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles sont majoritairement présentes dans les plastides des plantes, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs (**Vaughnet Duke, 1984**).

Selon (**Walker et Ferrar 1995**), la localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et / ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (**Kuwabara et Katoh., 1999**). En support à cette hypothèse, **Lax et Vaughn (1991)** ont montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (**Martinez et Whitaker., 1995**). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (**Vaughnet al., 1988 ; Mayer et Harel., 1991 ; Walker et Ferrar., 1998**) et plusieurs hypothèses sont émises. Les polyphénols, ont des propriétés anti-fongiques (**Friedman., 1997**).

La polyphénoloxydase catalyse l'oxydation de ces composés phénoliques en quinones, elles-mêmes bactéricides et fongicides (**Zinkernagel., 1986**), qui se polymérisent ensuite pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, et grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, limitent la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante (**Zawistowski et al., 1991**).

Selon (**Craft et Audia 1962**), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

II.2. Brunissement enzymatique

II.2.1. Le brunissement enzymatique des fruits et des légumes

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales pour évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et

des légumes. Mais ce phénomène peut également se produire lors de la transformation et le stockage de certains fruits de mer (**Whitakeret Lee., 1995**).

Il ne sera ici question que du brunissement enzymatique des fruits et légumes catalysé par la polyphénoloxydase (1,2 benzènediol ; oxygène oxydoréductase, EC.1.10.3.1) notée PPO. Cette appellation regroupe également les termes de phénoloxydase, phénolase, monophénoloxydase, diphénoloxydase et tyrosinase (**Ensmingeret al., 1995**).

Le brunissement enzymatique peut parfois être très bénéfique à l'acceptabilité du produit par le consommateur. En effet, que ce soit pour le thé noir, oolong ou vert, le brunissement enzymatique est nécessaire au développement de leur couleur et flaveur au cours du procédé de fabrication. De même, l'apparition de la couleur du cacao est facilitée par le brunissement enzymatique lors de la fermentation et le séchage des fèves. Les polyphénols oxydases sont par ailleurs responsables de la couleur dorée caractéristique des fruits secs (raisins, prunes, dates et figues). Or, le thé, le café et le chocolat sont des marchandises essentielles à l'économie de certains pays émergents tels que l'Inde, la Chine, le Sri Lanka ou le Kenya (**Ensmingeretal., 1995**).

Cependant, le brunissement enzymatique est aussi une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes. Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (**Whitakeret Lee., 1995**). Ces lourdes pertes ont suscité un intérêt considérable dans la compréhension et le contrôle de l'activité polyphénoloxydase dans les aliments. Les salades et autres légumes feuillus, les pommes de terres et autres tubercules riches en amidon tels que les patates douces, l'igname, de même que les champignons, les pommes, les bananes, les pêches les dattes et encore beaucoup d'autres. (**Jolivet et al., 1998**)

II.2.2. Contrôle du brunissement enzymatique

Le contrôle de l'activité de la PPO, est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (**Jolivet et al.,1998; Qiu et al., 2009**).

Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber le brunissement enzymatique et plusieurs techniques essayant d'éliminer les composés responsables de ce brunissement

(oxygène, enzyme, cuivre, substrat), ont été développées parmi ces techniques les traitements physico-chimiques.

II.2.2.1. Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

II.2.2.1.1. Les traitements thermiques

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. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais. (Vámos-Vigyázó., 1981).

Les températures appliquées lors du blanchiment varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inactiver. En général, une exposition des PPO à des températures de l'ordre de 70-90°C entraîne la destruction de leur activité catalytique (Vámos-Vigyázó., 1981).

II.2.2.1.2. La congélation

Des températures inférieures à -18°C sont utilisées pour la conservation longue durée des aliments. Les mécanismes d'inactivation des enzymes par la congélation peuvent être expliqués par différentes hypothèses : augmentation de la concentration en inhibiteurs du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état **liquide** (Tappel., 1966), de modifications du pH ou encore des groupements thiols (Fennema., 1975).

De la même façon que pour l'inactivation des enzymes par chauffage, ce procédé présente des inconvénients et provoque notamment des changements de texture. De plus, la congélation fragilise les structures membranaires des cellules et facilite ainsi le brunissement enzymatique lors de la décongélation des produits. (Vámos-Vigyázó., 1981).

II.2.2.2. Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique peut être inhibé en ciblant l'enzyme, les substrats (oxygène et polyphénols) ou les produits de la réaction. L'utilisation d'inhibiteurs du brunissement enzymatique ne peut se concevoir que s'ils n'ont aucun effet toxique et ne modifient pas le goût ni la couleur des produits, et évidemment si leur coût économique est supportable.

(Mc Evily *et al.* 1992) classent les inhibiteurs de la PPO en six catégories (**tableau 3**) : les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexants, les inhibiteurs d'enzyme, les traitements enzymatiques.

Tableau N° 3: Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily *et al.*, 1992)

Agents réducteurs	Sulfites et dérivés Acide ascorbique et analogues Cystéine et glutathion
Agents chélateurs	Phosphates EDTA Acides organiques
Acidifiants	Acide citrique Acide phosphorique
Inhibiteurs d'enzyme	Acides carboxyliques aromatiques Alcools aliphatiques Anions Peptides Résorcinols substitués
Traitements enzymatiques	Oxygénases <i>o</i> -méthyltransférase Protéases
Agents complexants	Cyclodextrines

Ces techniques sont le plus utilisées, mais elles présentent cependant des limites organoleptiques. Tel est le cas de l'emploi d'acide citrique (acidification), du bicarbonate de sodium (alcalinisation) ou encore des thiols (cystéine et glutathion), ces derniers interagissant avec les produits de la réaction pour former des produits d'addition incolores ; toutefois, ces composés d'addition peuvent également entrer dans des réactions d'oxydations couplées avec les *o*-quinones en excès conduisant, d'une part au phénol parental et d'autre part à la formation de produits fortement colorés (**Richard-Forget *et al.*, 1992**).

Selon (**Nappi *et Vass.*, 1994**), la cystéine serait capable d'inhiber l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon.

II.2.2.2.1. Agent réducteur

L'acide ascorbique est un agent réducteur largement utilisé dans l'industrie pour contrôler ce phénomène. Cet antioxydant naturel régénère les *o*-diphénols en réduisant les *o*-quinones formées (**Varoquaux *et Sarris*, 1979** ; **Nicolas *et al.*, 1994** ; **Walker *et Ferrar*, 1995** ; **Martinez *et Whitaker*, 1995**).

Cependant, son effet anti-brunissement n'est que temporaire (**Varoquaux *et Sarris*, 1979** ; **Golan-Goldhirsh *et Whitaker*, 1984**).

Les travaux de (**Golan-Goldhirsh** et **Whitaker.,1984**) montrent les effets inhibiteurs de l'acide ascorbique, du bisulfite de sodium et des composés thiols sur l'activité de la tyrosinase de champignon.

II.2.2.2.2. Agents chélateurs

Puisque la PPO est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (**Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981; Jolivet et al., 1998; Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska et al., 2002**).

II.2.2.2.3. Inhibition ciblant l'enzyme

(**Mayer et Harrel.,1979**) ont classé les inhibiteurs qui agissent directement sur la PPO en deux groupes :

- **Le premier groupe** est celui des agents chélateurs de métaux, tels que les ions azoture, cyanure, halogénés et la tropolone. Le chlore (Cl⁻) est un inhibiteur non compétitif de la PPO.
- **Le second groupe** d'inhibiteurs consiste en analogues des substrats : ces acides carboxyliques de la série des acides benzoïque et cinnamique sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO (**Janovitz-Klapp et al., 1990**).

DEUXIEME PARTIE
PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1 Matériels biologiques

Les variétés des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Takarbouchet, cv Tamjohret, cv Tedela*) utilisée dans notre étude ont été achetées à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat dans la semaine son utilisation. Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conserver à 4°C

1.2 Produits chimiques

Le phosphate de potassium (KH_2PO_4), l'acétate de sodium, le pyrogallol, l'acide citrique ,et le polyvinyle (poly)pyrrolidone (PVPP) sont fournis par fluka .tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique

2. Méthodes

2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO

La PPO a été isolée à partir des dattes selon le protocole d'extraction développé par (Hasegawa .,1980)

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. 200g de chair de dattes refroidie préalablement à -15°C sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG ,model BB 90E) dans 300 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) comme chélateur des composés phénolique .le broyat est ensuite filtré à travers quatre couche de gaz. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo Scientific Helios Spectrophotometer, England).

Le surnageant récupéré d'un volume totale de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait enzymatique brut (PPO) qui divisé dans des tubes Eppendorf de 2ml qui seront conservés à -10°C

200 g des dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre et sont dénoyées et découpées



Broyage dans 300 ml d'une solution d'extraction de tampon phosphate de potassium (0.05M à pH 7.0)



Broyat

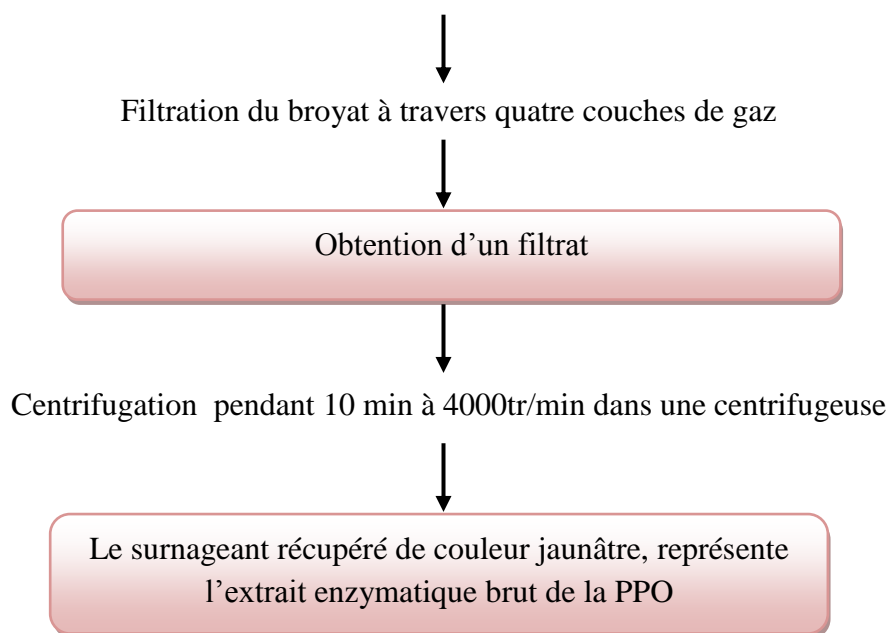


Figure N°14: Le protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera L*)

2.2 Détermination des valeurs d'IC₅₀

Cette valeur correspond à la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀).

L'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 4,5 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs : d'acide citrique entre 2,5 et 20m et ceci pour les trois variétés une concentration constante de pyrogallol.

Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (acide citrique,) (Chen et al, 1998).

Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur (A₀) (Dogan et al, 2005) selon l'équation suivante :

$$AR(\%) = \left(\frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

Avec :

A₀ : est l'activité diphénolase en absence d'inhibiteur

A₁ : est l'activité diphénolase en présence d'inhibiteur

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

2.3 -Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide citrique

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'acide citrique (5 et 10 mM pour les PPO de *Phoenix dactylifera L* cv Takarbouchet et cv Tedela tandis que pour la PPO de *Phoenix*

dactylifera L cv Tamjohret, des concentrations valant 10 et 20 mM ont été utilisées) et à différentes concentrations croissantes de la Pyrogallol comprises entre 10 et 80 mM.

Les types d'inhibition ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat pour chaque inhibiteur (Arslan et Doğan, 2005).

2.4 Analyse des résultats expérimentaux

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression nonlinéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). Enzyme Kinetics ProTM Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) et Origin 6.0 (Microcal(TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

CHAPITRE 2
RESULTAT ET DISCUSSION

1-Détermination de la valeur d'IC₅₀ de l'acide citrique sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes :

L'effet de différentes concentrations d'acide citrique, sur l'activité enzymatique de la polphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera L* cv Takarbouchet, cv Tamjohret, cv Tedela) en présence de pyrogallol comme substrat a été étudié.

Les résultats trouvés, montre que l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur dans le milieu réactionnel provoque une diminution significative sur l'activité de la PPO.

La valeur d'IC₅₀ est définie comme étant la concentration de l'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50% (Chen et *al*, 1998). On a obtenu les valeurs suivantes :

IC₅₀=8,28mM ±0,45 pour la variété Takarbouchet

IC₅₀=6,881 mM±0,38 ; pour la variété Tedela

IC₅₀ = 15,54±0,63 pour la variété Tamjohret

Figure 1: L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Pyrogallol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L* cv Takarbouche cv Tamjohret cv Tedela). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 4,5).

Pour mieux comparer l'effet de l'acide citrique sur les PPOs d'origine végétale et celle de notre variété, les valeurs d'IC₅₀ de l'acide citrique, de l'acide ascorbique ainsi que l'acide benzoïque trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans les Tableaux (I, II et III) respectivement

Tableau 3: Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L cv Takarbouchet</i>	Pyrogallol	8,28mM ±0,45	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L cv Tamjohret</i>	Pyrogallol	15,54±0,63	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L cv Tedela</i>	Pyrogallol	6,881 mM±0,38	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L cv Deglet –Nour</i>	Catéchol	24,44±0,79	Mameri et Boudia., 2016
<i>Phoenix dactylifera L cv Deglet –Nour</i>	Pyrogallol	50,08	Bouchareb., 2014
Truffe <i>TerfezialesTul</i>	L-tyrosine	9,46	Harrouz, Sahraoui, 2014
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Catéchol	150	SON et al., 2000

En analysant ces tableaux, on remarque que la PPO des trois variétés des dattes étudiées semble plus être sensible à l'acide citrique en présence de pyrogallol comme substrat par rapport aux résultats obtenus sur la PPO de degletNour en utilisant le pyrocatéchol comme substrat, de même la PPO *Phoenix dactylifera L cv Tedela* semble être la plus sensible par rapport aux autres sources y comprises celles des autres variétés des dattes.

D'après ces résultats obtenus, on constate que le pouvoir inhibiteur du et la valeur d'IC₅₀ peut être influencé beaucoup plus de la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors la mesure de l'activité de la PPO des dattes

2-Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase des dattes

L'effet inhibiteur de l'acide citrique, sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Takarbouchet, cv Tamjohret, cv Tedela*) en utilisant le pyrogallol comme substrat a été également étudié.

Les résultats trouvés, montrent que cet inhibiteur provoque une diminution significative de l'activité enzymatique de la PPO et que son pouvoir inhibiteur, dépend non seulement de sa concentration dans le milieu réactionnel, mais aussi de la concentration du substrat utilisé.

Les coefficients de régressions linéaires (R^2) des représentations de lineweaver-Burk en absence et en présence d'acide citrique pour le substrat utilisé (Pyrogallol) sont indiqués dans les tableaux (5, 6 et 7).

Leurs valeurs « R^2 » comprises entre (0.985 et 0.997) indiquent bien que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

Tableau 4: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L cv Takarbouchet,*) en utilisant le pyrogallol comme substrat

Substrat	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
	0			0,1429±0,0035	0,985	
Acide citrique	5	13,072±0,691	23,777± 1,574	0,110±0,0028	0,984	Non compétitive
	10			0,836±0,0023	0,983	

Tableau 5: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L cv Tedela*) en utilisant le pyrogallol comme substrat

Substrat	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
	0			0,111± 0,08	0,996	
Acide citrique	5	18,32±0,43	15,278 ±0,476	0,087±0,052	0,995	Non compétitive
	10			0,0612±0,039	0,994	

Tableau 6: Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L cv Tamjohret*) en utilisant le pyrogallol comme substrat

Inhibiteur	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
------------	-----------	-------	-------	-----------	-------	----------------------

	0			0,181±0,0036	0,997	
Acide citrique	10	33,176±0,892	51,393± 2,01	0,140±0,029	0,996	Non compétitive
	20			0,103±0,024	0,995	

Avec

Ki : Constante de dissociation du complexe EI (mM)

[I] : Concentration d'inhibiteur (mM)

Km : Constante de Michaelis-Menten

Vmax : La vitesse maximale

R2 : Coefficient de régression linéaire

Les valeurs de KIS indiquées dans les Tableaux (5, 6, 7) suggèrent que l'acide citrique inhibe efficacement l'activité de la PPO de ces trois variété de dattes en présence de pyrogallol comme substrat, de même ces tableaux montrent que les représentations graphiques de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$, est une série de courbes parallèles, avec une diminution de la valeur Vmax et pareillement, augmentation du Km.

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de pyrogallol par la PPO des dattes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de l'acide citrique agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk. Les résultats trouvés en présence de de l'acide citrique vis-à-vis des PPO de trois variétés sont représentés dans les figure (18),(19) et (20) .respectivement.

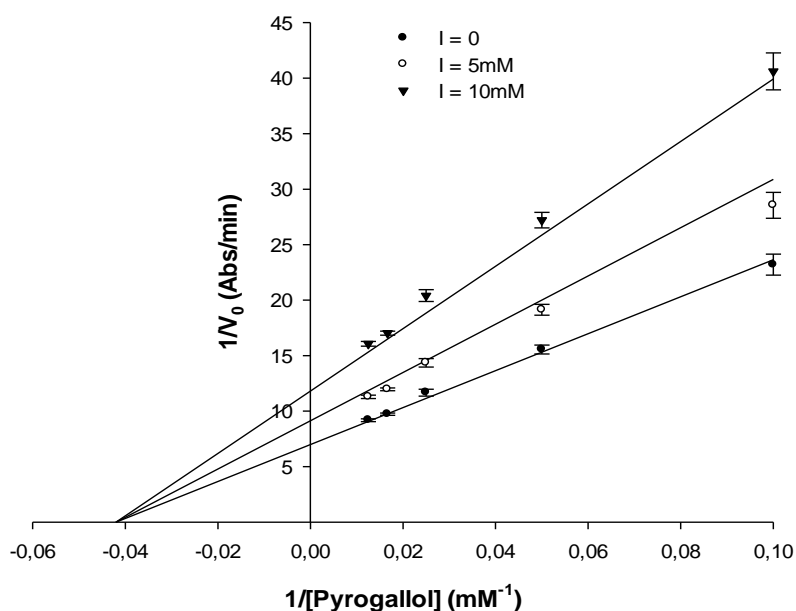


Figure 16: Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Takarbouchet*) par l'acide citrique.

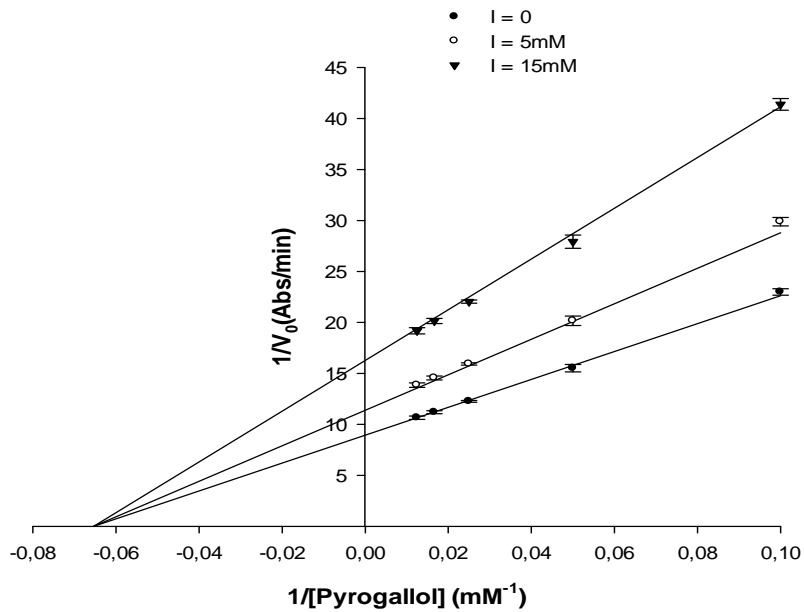


Figure 17: Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv tedela*) par l'acide citrique.

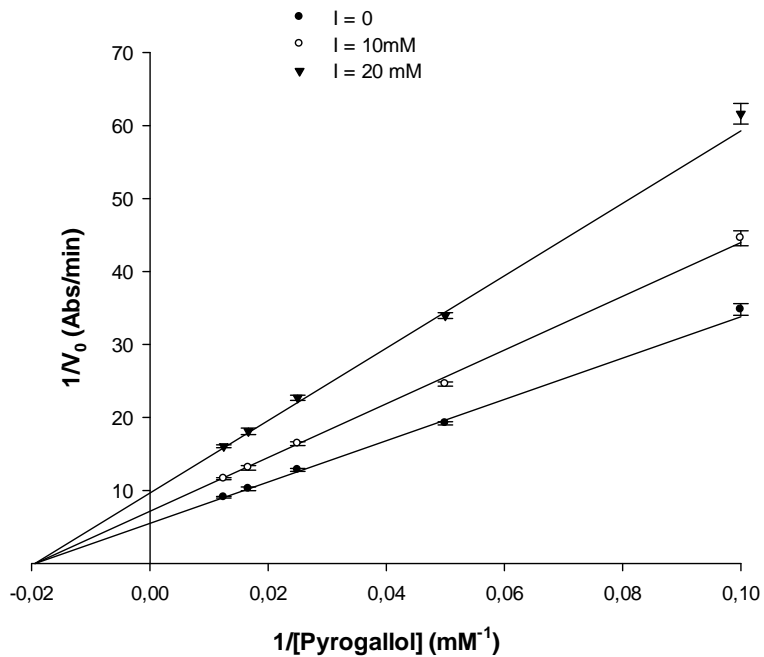


Figure 18: Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Tamjohret*) par l'acide citrique.

En présence de l'acide citrique (figures 18, 19 et 20), nous remarquons une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ($1/[S]$) mais de différentes pentes. Ceci indique que le type d'inhibiteur est non compétitif pour cet acide organique.

L'acide citrique se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme s'est indiqué dans les Tableaux (5, 6, 7), la constante d'inhibition (K_I) pour l'acide citrique, utilisant le pyrogallol comme substrat est 13,072 ; 18,32, et 33,176 mM pour la PPO de la variété Takarboucher, de la variété Tedela et celle de Tamjohret, respectivement.

L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition non compétitive s'écrit comme suit:

$$1/V_0 = ([\alpha K] _m / V_max) . 1 / ([S]) + \alpha / V_max$$

Avec:

$$\alpha = 1 + ([I]) / K_I$$

$$\alpha' = 1 + ([I]) / K_{IS}$$

$$K_I = K_{IS}$$

K_I : constante de dissociation du complexe EI (mM) ;

K_{IS} : constante de dissociation du complexe ESI (mM) ;

$[I]$: concentration d'inhibiteur (mM).

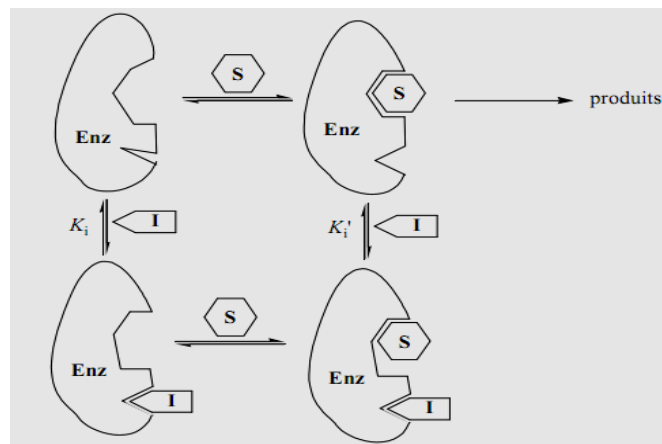


Figure 2: Représentation de l'inhibition non compétitive

(Keillor, 2004)

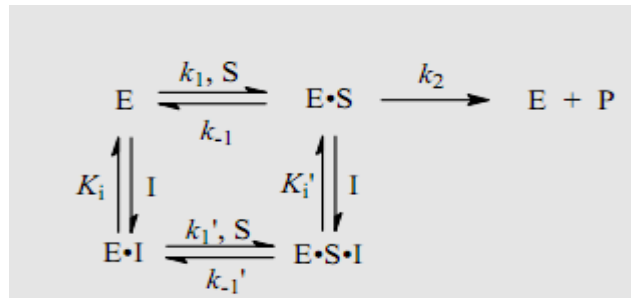


Figure 20: Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive

(Keillor, 2004)

Urszul et *al.* (2007) ont trouvé que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de la PPO de brocoli (*Brassicaoleracea var. botrytis italica*) lorsque le catéchol est utilisé comme substrat. Par contre la PPO de céleri (*Apiumgraveolens L.*) présente une inhibition de type compétitif (Tulin et Gulay, 2006).

L'inhibition de la PPO par l'acide citrique peut être expliquée par son effet chélateur avec le cuivre du site actif de l'enzyme, et aussi par son pouvoir acidulant en abaissant le pH du produit afin de minimiser l'activité de la PPO, à des valeurs de pH inférieures de 4, l'enzyme a peu d'activité en raison de la perte de cuivre du site actif (Suttirak et Manurakchinakorn., 2010).

En effet l'acide citrique est un acide organique retrouvé largement dans les fruits et les légumes, et ont été souvent signalé pour leur activité anti-brunissement dans l'industrie agro-alimentaire, cette activité est liée à la concentration d'agent anti-brunissement. (Suttirak et Manurakchinakorn., 2010).

L'efficacité de l'acide citrique de retarder le brunissement peut être améliorée par l'addition d'un agent anti-brunissement possédant un mécanisme d'inhibition différent et / ou une meilleure stabilité. (Suttirak et Manurakchinakorn., 2010).

CONCLUSION

Conclusion

Les variétés des dattes utilisées (cv Takarbouchet,cvTedela,cvtamjohret) sont entre autres des fruits de grande valeur nutritionnelle est commerciale. L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique causé par la polyphénol oxydase.

La polyphénol oxydase des dattes a été extraite en milieu aqueux en présence de (PVPP). L'extrait enzymatique brut montre que la PPO des dattes est une diphénolase. La PPO de datte capable d'oxyder le pyrogallol comme substrat.

L'application de l'acide citrique ,commeun inhibiteur pour réduire le brunissement dû à l'enzyme PPO des dattes *Phoenix dactylifera*L(cv Takarbouchet,cvTedela,cvtamjohret) est ainsi rapportée pour la première fois.

D'après les résultats obtenus à partir de ce travail, on conclue que, l'acide citrique présente un mécanisme non compétitif et ceci vis-à-vis de la PPO des trois variétés utilisées.

L'acide citrique inhibe la PPO en se fixant sur le complexe enzyme-substrat (ES), qui se comporte comme étant un inhibiteur non compétitif vis-à-vis du pyrogallol comme substrat et d'une manière réversible .

D'après les valeurs d'IC₅₀ ,nous pouvons déduire l'efficacité de l'inhibiteur peut être affectée par la source utilisée dont semble être la source la plus sensible

Cet acide organique est non toxique et peu couteux ce qui rend son utilisation comme étant des agent anti-brunissement très appropriée.

Comme perspectives,une amélioration de pouvoir inhibiteur de l'acide citrique est envisageable ,et ceci en faisant appel à d'autre moyens physiques comme la température dont il serait plus intéressant d'étudier l'effet de cet inhibiteur sur les propriétés cinétiques et thermodynamiques de la PPO.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **(Anderson, J. V., Morris, C. F. 2001.)** An improved Whole-Seed Assay for screening wheat Germ plasm for polyphenol oxidase activity. *CROP SCIENCE* V41, P1697-1705.
- **(ARSLAN,O., DOĞAN,S., 2005).** Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1499-1504.
- **(Barreveld W.H., 1993).** Date palm products, FAO Agricultural Services, Bull. No. 101, Roma, Italy,
- **(Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Lognay, G., Drira N, E., Attia, H., 2005).** Heating effects on some quality characteristics of date seed oil. *Food Chemistry*, 91, pp 469–476.
- **(Bonner, W.D.1955).***Plant Physiol.*, 30, XXX.
- **(BuelguedjA,Nacib N. 2001).** Production d'acide lactique par lactobacillus rhamnosus sur milieu a base de jus de dattes .rev.enreg.ren.production et valorisationbiomasse.p41-46.
- **(Burton, S.G. 1994).** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today.* 22:459-487.
- **(Cheftel J.C., Cheftel H. 1977).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Technique et documentation. Lavoisier, Paris, vol. 1, 381 p.
- **(Claus, H &Decker,H. 2006).**Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*,29:13-14.
- **(Craft CC., Audia, WM. 1962).** Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz*, 123: 211-219
- **(DAWSON, R., H, W., ATEN, A., 1963).** Récolte et conditionnement des dattes. Organisation du Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Ed, FAO, Rome, Italie. P397
- **(Decker, H., Jaenicke,E.2004)** Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Development and comparative Immunology* V28, p673-687
- **(Dawson V H W., 1963).** Récolte et conditionnement des dattes. FAO ROME.

Références bibliographiques

- **(DJOUDI, Imene, 2013).** Contribution à l'identification et à la caractérisation de quelques accessions du palmier dattier (*Phoenix Dactylifera*.l) dans la région de Biskra, (1, 6, 9, 12, 13, 14, 15) p.
- **(Husson, 1931 et Matallah, 1970)** Contribution à la valorisation de la datte algérienne. Mémoire d'Ingénieur agronome, INA. El-Harrach, Alger, 113 p.
- **(Decker, H., Terwilliger, N. 2000).** COPS AND ROBBERS: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*.203:1777-1782
- **(Djerbi M, 1994. Précis de phéniculture, F.A.O, Rome, 191 p.Djouab, A., 2007).** Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Memoire de Magister.option génie alimentaire, Université de Boumerdès.24 p.
- **(Dogan S., Turan Y., Erturk H., Arslan O., 2005.)** Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynarascolymus L.*). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- **(Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O. 2005).** Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynarascolymus L.*). *J. Agric. Food Chem*, Vol. 53(3)776-785.
- **(Eicken, C., Krebs, B .,Sacchettini, J.C. 1999.)**Catechol oxidase:structure and activity.Catalysis and regulation.Current Opinion in Structural Biology. 9: 677-683.
- **(Eicken, C., Krebs, B .,Sacchettini, J.C. 1999).**Catechol oxidase:structure and activity.Catalysis and regulation.Current Opinion in Structural Biology. 9: 677-683.
- **(El-sayed S, A., baeshin N, A., 1983).** Feasibility of desinfestation of date fruits produced in Saudi Arabia by gamma irradiation. The first symposium on the date palm in Saudi Arabia. March 23-25.
- **(Friedman, M. 1997).** Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem* V45, P1523-1540.
- **(Gilles, P., 2000).** Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, 110 p.
- **(Golan-Goldhirsh A., Whitaker J.R., 1984).** Effects of ascorbic acid, sodium bisulfate and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 32,1003-1009.
- **(Hagheben, K., Saboury, A.A., Karbassi, F. 2004).** Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *BiochimicaetBiophysicaActa*. 1675:139-146.
- **(Harrak, H., Boujnah, M., 2012).**Valorisation technologique des dattes au Maroc.

Références bibliographiques

- **(Harrouz, H., Sahraoui, M., 2014).** Etude de l'inhibition du tyrosinase de la truffe (*terfezialenistul*) par l'acide citrique.
- **(Janovitz-Klapp) A. H., Richard F. C., Goupy P. M., Nicolas J. J. 1990.** Inhibition studie on appele polyphenol oxidase. *J. Arric. Food chem V 38*, 926-931.
- **(Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998).** Agaricusbisporusbrowning: a review. *Mycol. Res.*102(12)1459-1483.
- **(Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998).** Agaricusbisporusbrowning: a review. *Mycol. Res.*102(12)1459-1483.
- **(Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., Krebs, B. 1998).**Crystal structure of a plant catecholoxidase containing a dicopper center. *Nat. Struc. Biol.* 12.
- **(Kuwabra, T., Katoh, Y. 1999).** Involvement of the binuclear coppersite in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant cellphysiol V40*, P1029-1035.
- **(La revue "Iran J Med Sci., 2006)**
- **(Lax A.R & Vaughn K. C.1991).**Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31
- **(Lerch K., 1995).**Tyrosinase: molecular and active-site structure, *ACS Symp. Ser.* 600, 64–80.
- **(Lund. E, D., Smoot J, M., Hall N, T., 1983).** Dietary fibre content of elevent tropical fruits and vegetables. *J. Agr. And Food Chem.* 31.5.
- **(Martinez V.M. & Whitakerj.R.,1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.
- **(Mozoyer M, 2002) ;** Larousse agricole, le monde agricole au XXI^{ème} siècle. Ed. MATHILDE MAJOREL, p224.
- **(Mayer, A.M and HAREL, E. 1991).** Phenoloxidasés and their Significance in Fruit and Vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science.
- **(Mayer, A.M and Harel, E. 1979.)** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.* 18:193-215
- **(McEvily, A. J., Iyenger R., Otwell W. S. 1992.)** Inhibition of enzymatic browning in mushrooms (*Agaricusbisporus*). *J Food Sci. Nutr V32*, P253-273.
- **(Microsoft Encarta., 2009).** 1993-2008 Microsoft Corporation, Les dattes

Références bibliographiques

- **(Munier P, 1973.)** Le palmier dattier, Maison 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):
- **(Nicolas J., Billaud C., 2006.)** Prévention du brunissement enzymatique. *in* Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado et V. CheynierEds. Paris, Tec et Doc. Lavoisier., 173-
- **(Noui, Y., 2007.)** Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Thèse de Magister spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès. 62 p
- **(Papa, G., Pessione, E., Leone, V., And Giunta, C.1994).**Agaricusbisporustyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- **(Qiu, L., Chen, Q.H., Zhuang, X., Zhou, J.J., Guo, Y. 2009.)** Inhibitoiy effects of a-cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chem* V112, P609-613.
- **(RegimesMaigrir.com, 2014)**Dattes : bienfaits santé, valeur nutritionnelle
- **(Reynes, M., 1997.)** Thèse de Doctorat. Influence d'une technique de desinfestation par micro-ondes sur les criteres de qualite physico-chimiques et biochimiques de la datte
- **(Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. 1999.)** Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *BiochimicaetBiophysicaActa*, 1204:33-42.
- **(Sapers ,G.M. 1993).**Browing of foods :control by sulfites,antioxidantsand other means .*Food Technol.*,Vol .47,pp.75-84.
- **(Siboukeur, O., 1997.)** Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes. Thèse de Magister, INA. El-Harrach, Alger, 106 p.*Ins. Food SCI. Technol. J.* 16, 2, 87-93 pp.
- **(Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y., 2000).**Kinetic Study of Oxalic Acid Inhibition on Enzymatic Browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071-2074.
- **(Schumacher, R. W.; Davidson, B. S.; Montenegro, D. A.; Berman,V. S. J. Nat. Prod. 1995),** 58, 613–617.

Références bibliographiques

- **(Shen Q, Rigor RR, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY (2010))** Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovasc Res* 87(2):272–280. doi:10.1093/cvr/cvq144
- **(T. A. Knappe, U. Linne, S. Zirah, S. Rebuffat, X. L. Xie and M. A. Marahiel, J. Am. Chem. Soc., 2008)**, 130, 11446–11454.
- **(Suttirak W., Manurakchinakorn S., 2010.)** Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Walailak J. Sci. Tech.*,7(1), 5-14.
- **(Urszula G., Urszula Z., Michal W., 2007).**Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce(*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) *Food Chem.*, 8, 20-704.
- **(Vámos-Vigyázó, L. 1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15:49-127.
- **(Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J. 1997.)** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 45(7)1309-1323.
- **(Varoquaux., 1978).**contribution a l'étude des propriétés de m'o-diphenoloxydase du champignon de paris (*Agaricusbisporus*). Thèse de doct., faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'université de Dijon, 131p
- **(Vaughn, K. C., Duke, S. O.1984.)** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *physiol plant* V60, P116-112.
- **(Vaughn, K. C., Duke, S. O. 1988).** Polyphenol oxidase : the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant* V 72, P659-665.
- **(Walker, J.R. L. 1995.)** Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. In: Lee, C. Y., Whitaker, J. R., *Enzymaticbrowning and Its Prevention*. Washington: ASC Symposium series 600. P8-22
- **(Walker, J.R. L., et Ferrar, P. H. 1998).** Diphenol oxidase, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology&Genetic Engineering Reviews* V15, P457-498.
- **(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

Références bibliographiques

- **(Whitaker, J.R. 1995.)** Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) Food enzymes: Structure and Mechanism. New York: *Chapman and Hall*. 1995:271-307.
- **(Youssef, M., K, E., El-Geddawy M, N., El-Rify., B R. Ramadan., 1992.)** Study of amino acid, organic acid and free sugar composition of new valley dates and certain date products. *Acta Alimentaria*, 21, 3, 325-335
- **(Zawistowski,J., Biliaderis, C.G.,Eskin, N.A.M.1991).** Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- **(Zinkernagel V.1986.)** Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremialactucaee*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115, 257-266

Références bibliographiques

Université Amar Téliidji Laghouat / Département de Biologie
BP 37G Route de Ghardaïa / 03000 Laghouat - Algérie - Tel : +213 29.93.26.98 poste : 242.
E-mail: dep.agro@mail.lagh-univ.dz / web: www.lag

