

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

**Étude de l'inhibition de la Polyphénol oxydase
extraite de *Phoenix dactylifera L cv Degla Beida*
par quelques acides organiques**

Présenté par :
Bou-Salah Leïla

Devant le jury :

Présidente : Mlle. Boussoussa Hadjer (MCB).

Examineur : Mr. Leboukh Mourad (MAA).

Rapporteur : Mr. Benaceur Farouk (MAA).

Soutenu publiquement le :13 Mai 2017.

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance...*

Je dédie ce Mémoire ...

A Ma Très Chère Maman

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de consentir depuis ma naissance.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

A Mon Très Cher Papa

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Tu peux être fière et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie.

Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mon très cher frère Mounir

Mon cher frère présent dans tous mes moments d'examens par son soutien moral et ses belles surprises sucrées.

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

À mes très cher(e)s tantes et oncles

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle.

Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

Une spéciale dédicace à cette personne qui m'a toujours encouragé et énormément soutenu, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect.

À mon cher oncle Aïssa

A ma grand-mère paternelle

A la mémoire de la grande dame qui a tant sacrifié pour nous. Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.

A ma grand-mère maternelle

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A Ma meilleure amie, ma sœur et ma confidente Boudaoud Leila

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour t'exprimer mon affection et mes pensées, tu es pour moi une sœur sur qui j'ai toujours pu compter. T'avoir à mes côtés c'est comme avoir un autre moi-même.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

*À Toutes La Promotion de Master 2 Biochimie des produits
naturels 2016/2017*

*En témoignage des souvenirs de tous les moments que nous avons
passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine
de santé et de bonheur.*

*À mon Directeur de Mémoire Monsieur
Benaceur Farouk*

*Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis,
vous avez toujours été présent.*

*Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond
respect. Vous avez bien voulu me confier ce travail riche d'intérêt et me
guider à chaque étape de sa réalisation.*

*À TOUS CEUX QUE J'AI
OMIS DE CITER*

Remerciements

*Ce travail a été effectué au laboratoire de biochimie de l'université
Amar Thelidji de Laghouat.*

*Si une thèse représente un investissement personnel, c'est aussi avant
tout un travail d'équipe. C'est pourquoi, je tiens à remercier
chaleureusement...*

Mon Directeur de Mémoire Monsieur

Benaceur Farouk

*Qui m'avait toujours réservé le meilleur accueil, malgré ses obligations
professionnelles.*

*Ses encouragements inlassables, son amabilité, sa gentillesse méritent
toute admiration.*

*Je saisis cette occasion pour lui exprimer ma profonde gratitude tout
en lui témoignant mon respect.*

A Mesdames et Messieurs les membres de jury

*Vous me faites l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de
siéger parmi mon jury de thèse.*

Veillez accepter ce travail, en gage de mon grand respect et ma profonde reconnaissance. Je vous remercie pour votre estimable participation.

Veillez trouver ici l'expression de mon estime et ma considération.

Je voudrais, transmettre par ailleurs, mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont assistée durant l'accomplissement de mon travail.

À la fin je remercie tous mes professeurs qui m'ont enseigné durant mes études à la faculté.

Table de Matières

Table de matières

Table de matières	I
Liste des abréviations.....	V
Liste des figures et photos	VI
Liste des tableaux.....	VIII
Résumé.....	IX
Abstract.....	IX
ملخص.....	IX
 INTRODUCTION	 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I

La datte, Généralités, composition et intérêt.

I. LA DATTE	3
I .1. Généralités	3
I.2. Classifications Des Dattes	5
I.3. Stades d'évolution de la datte	5
I.3.1.- Loulou ou Hababouk	6
I.3.2.- Khalal ou Kimri, Blah	6
I.3.3.- Bser ou Bsir, Bissir.....	6

I.3.4.- Martouba ou Routab	6
I.3.5.- Tamar ou Tmar.....	6
I.4. La Composition Biochimique De La Datte	6
I.4.1.Composition Biochimique De La Partie Comestible "Pulpe "	6
I.4.1.1. Constituants Majeurs	6
I.4.1.1.a. L'eau.....	7
I.4.1.1.b. Les Sucres.....	7
I.4.1.1.c.Les Protéines	8
I.4.1.1.d. Les Acides gras	8
I.4.1.1.e. Les Minéraux	8
I.4.1.1.f. Les Vitamines	8
I.4.1.1.g. Les Composés phénoliques.....	8
I.4.1.1.h. Les Enzymes	8
I.4.2. Composition Biochimique De La Partie Non Comestible "Noyau ".....	9
I .5. Intérêt Médical Et Nutritionnel De La Datte	9
I.5.1. Intérêt Médical	9
I.5.2. Intérêt Nutritionnel	11

Chapitre II

Brunissement enzymatique et Polyphénol Oxydase

I. LE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE	12
I.1. Définition.....	12
I.2. Déclenchement, Conséquences Et Catalyse Du Brunissement Enzymatique	12

II. LA POLYPHENOL OXYDASE	13
II.1. Historique	13
II.2. Définition, Nomenclature Et Caractéristiques.....	14
II.2.1. Définition	14
II.2.2. Nomenclature	14
II.2.3. Caractéristiques	14
II.2.3.1. Caractéristiques Fonctionnelles	14
II.2.3.1. a. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)	14
II.2.3.1. b. Activité <i>o</i> -diphénololoxydase (EC 1.10.3.1)	14
II.2.3.1. c. Activité laccase (E.C. 1.10.3.2)	15
II.2.3.2. Caractéristiques Structurales	15
II.2.3.2. a. Architecture Moléculaire Globale	15
II.2.3.2. b. Le Site Actif	16
II.2.3.2. c. Les substrats	18
II.2.3.3. Caractéristiques réactionnelles	19
II.3. Source et localisation	20
II.4. Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase	21
II.5. Les effecteurs de la PPO	22
II.5.1. Les activateurs	22
II.5.2. Les inhibiteurs	23
II.6. Applications de la PPO	25

Partie II: Etude expérimentale

Chapitre I

Matériels et méthodes

I. MATERIELS	27
I.1. Matériel biologique	27
I.2. Produits chimiques	27
I.3 Matériels du laboratoire	28
II. METHODES	28
II.1. Préparation de l'extrait brut de la PPO	28
II.2 Mesure de l'activité de PPO	30
II.3 Détermination des valeurs d'IC ₅₀	30
II.4 -Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par les acides organiques.....	31
II.5 Analyse des résultats expérimentaux	31

Chapitre II

Résultats et discussion

1. Détermination de la valeur d'IC ₅₀ des trois acides organiques sur l'activité enzymatique de la PPO	33
2. Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase des dattes... ..	38
Conclusion générale.....	47
Références Bibliographiques.	

Liste des abréviations

A : L'activité diphénolase.

E : Enzyme.

IC₅₀ : Inhibitor Concentration 50 / Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition.

I : Inhibitor/ inhibiteur.

K_i : Constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

K_{IS} : constante de dissociation du complexe enzyme-substrat-inhibiteur

KH₂PO₄ : Phosphate de Potassium.

K_m : Constante de Michaelis-Menten.

mM : milli Molaire.

NH₂PO₄ : Phosphate de Sodium.

nm : Nanomètre.

P : Produit.

PPO : Polyphénoloxydase / Polyphenoloxidase.

PVPP : PolyVinyle (Poly) Pyrrolidone.

R² : Coefficient de régression linéaire.

S : substrate / substrat.

T : Température.

UI : Unité internationale.

V_{max} : Vitesse maximale de réaction.

Liste des Figures et Photos

Liste des Figures

Figure 01 : Datte et noyau du palmier dattier	4
Figure 02: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda	17
Figure 03: L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i>	18
Figure 04: Structure du site actif de la tyrosinase	18
Figure 05 : Les réactions catalysées par la polyphénol oxydase, les deux activités crésolase et catéchol oxydase sont représentées	19
Figure 06: Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO	21
Figure 07: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO	22
Figure 08 : Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase des dattes.....	29
Figure 09 : Le spectrophotomètre	30
Figure 10: L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Pyrocatechol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Degla beida</i>).	33
Figure 11 : L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de Pyrocatechol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Degla beida</i>).	34
Figure 12 : L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de Pyrocatechol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Degla beida</i>).	35
Figure 13 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Degla beida</i>) par l'acide citrique	40
Figure 14 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Degla beida</i>) par l'acide ascorbique	41
Figure 15 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera L cv Degla beida</i>) par l'acide benzoïque.....	41

Figure 16 : Représentation de l'inhibition compétitive	42
Figure 17 : schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive	42
Figure 18 : Représentation de l'inhibition non compétitive	45
Figure 19 : Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive	45

Liste des Photos

Photos 01 : Datte de la variété Degla-Beida	4
Photo 02 : <i>Phoenix dactylifera L</i> , la variété de Degla Beida	27

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Catégories de dattes selon leur consistance	5
Tableau 02 : Stades de développement de la datte.....	5
Tableau 03 : Pourcentage des différents constituants de la datte.....	7
Tableau 04 : Effets biologiques des dattes observés par étude <i>in vivo</i>	10
Tableau 05 : Effets biologiques des dattes observés par étude <i>in vitro</i>	11
Tableau 06 : Les valeurs d'IC50 de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différents substrats par l'acide citrique.	36
Tableau 07 : Les valeurs d'IC50 de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différents substrats par l'acide ascorbique.	36
Tableau 08 : Les valeurs d'IC50 de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différents substrats par l'acide benzoïque.....	37
Tableau 09 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L</i>) en utilisant le pyrocatechol comme substrat.	38
Tableau 10 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L</i>) en utilisant le pyrocatechol comme substrat.....	39
Tableau 11 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L</i>) en utilisant le pyrocatechol comme substrat.	39

RÉSUMÉ

Ce présent travail a pour objectif d'étudier l'inhibition du polyphénol oxydase (PPO) des dattes (Phoenix dactylifera L cv Degla beida) par l'acide citrique, l'acide ascorbique et l'acide benzoïque. L'activité de la PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, à pH 5,5 et à 30°C, en présence de pyrocatechol comme substrat.

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration de l'inhibiteur utilisé. D'après les valeurs d'IC₅₀, (IC₅₀=21,047 mM ±0,65 en présence d'acide citrique ; IC₅₀=0,117mM ±0,24 en présence d'acide ascorbique ; IC₅₀ = 1,52±0,24 en présence d'acide benzoïque) nous avons estimé que l'acide ascorbique est 180 et 12 fois plus puissant que l'acide citrique et l'acide benzoïque, respectivement.

La représentation de Lineweaver-Burk indique que l'acide ascorbique et l'acide benzoïque sont des inhibiteurs compétitifs tandis que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{IS} égale à 238,18±24,21mM, 1,443±0,05 mM et 36,621±1,165 mM, respectivement.

Mots Cles : Dattes, PPO, Acide Benzoïque, Acide Citrique, Acide Ascorbique, Inhibition, Brunissement Enzymatique.

ABSTRACT

This present work aims to study the inhibition of the polyphenol oxydase (PPO) of (Phoenix dactylifera L cv Degla beida) by the citric acid, the ascorbic acid and the benzoic acid. The activity of PPO was measured by spectrophotometry at 410 Nm, at pH 5.5 and at 30°C, in the presence of pyrocatechol as substrate.

The degree of PPO inhibition depends on the concentration of the inhibitor used. According to the values of IC₅₀, (IC₅₀ = 21.047 mM ± 0.65 in the presence of citric acid, IC₅₀ = 0.117mM ± 0.24 in the presence of ascorbic acid, IC₅₀ = 1.52 ± 0.24 in the presence of benzoic acid) we estimated that ascorbic acid is 180 and 12 times more potent than citric acid and benzoic acid, respectively.

The Lineweaver-Burk representation indicates that ascorbic acid and benzoic acid are competitive inhibitors whereas citric acid is a non-competitive inhibitor of PPO activity with a K_{IS} value of 238.18 ± 24, 21 mM, 1.443 ± 0.05 and 36.621 ± 1.165, respectively.

Keywords: Dates, PPO, Benzoic Acid, Citric Acid, Ascorbic Acid, Inhibition, Enzymatic Browning.

الملخص

العمل الحالي يهدف الى دراسة تثبيط بوليفينول أوكسيداز (PPO) المستخلصة من التمور (Phoenix dactylifera L cv Degla beida) عن طريق الحمض الليموني، حمض الاسكوربيك وحمض البنزويك. تم قياس نشاط ال PPO بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند 410 nm و درجة الحموضة 5.5 و 30 درجة مئوية في وجود البيروكاتيكول كركيزة.

درجة تثبيط PPO تعتمد على تركيز المثبط المستخدم. وفقا لقيم IC₅₀ (IC₅₀=21,047 mM ±0,65 في وجود الحمض الليموني; IC₅₀=0,117mM ±0,24 في وجود حمض الاسكوربيك IC₅₀ = 1,52±0,24 في وجود حمض البنزويك). لقد قيمنا أن حمض الاسكوربيك أكثر قوة ب 180 و 12 مرة من حمض الستريك وحمض البنزويك، على التوالي.

يظهر تمثيل Lineweaver-Burk أن حمض الاسكوربيك وحمض البنزويك مثبطات تنافسية اما الحمض الليموني مثبط غير تنافسي لنشاط ال PPO بقيمة K_{IS} تساوي 238,18±24,21mM , 1,443±0,05 mM و 36,621±1,165 , على التوالي.

كلمات البحث: التمور، البوليفينول أوكسيداز (PPO) ، حمض البنزويك، حمض الستريك، حمض الأسكوربيك، تثبيط، التشويه الانزيمي.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) est considéré comme l'arbre des régions désertique du globe connues pour leur climat chaud et sec. En raison de ses utilités alimentaires, écologiques, sociales et économiques, le palmier dattier est l'arbre fruitier le plus apprécié par les populations des oasis (**Tirichine., 2010**).

L'Algérie est un pays producteur de dattes (*Phoenix dactylifera L.*) avec une production annuelle de plus de 500 000 tonnes. La partie la plus importante de ce tonnage constitue les dattes communes. Celles-ci sont des variétés sèches à faible valeur marchande. En 2011, la production de dattes communes en Algérie a atteint 244 577 tonnes (**SAA., 2011**).

Les dattes communes telles que *Degla Beida* présente une importance économique indéniable (**Brac de la Perriere., 1988**). Ces dattes, de consistance sèche constituent 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 (**Acourene et Tama., 1997**).

Cependant l'un des problèmes les plus importants des dattes : est la réaction de brunissement enzymatique qui se produit au cours de leur développement, récolte, traitement et stockage. Le brunissement enzymatique est un phénomène largement rencontré chez les fruits et les végétaux, il est le plus souvent une réaction indésirable, provoquant la formation d'un pigment brun responsable du changement de couleur, d'odeur et du goût désagréables des dattes, et par conséquent diminuant sa qualité nutritionnelle et sa valeur commerciale. (**Martinez et Whitaker., 1995**)

La polyphénol oxydase (PPO) est reconnue comme étant la principale enzyme responsable de ce brunissement. La polyphénol oxydase (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**).

En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent 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 (Acide citrique, acide benzoïque et acide ascorbique) comme des anti-brunissements dans l'industrie alimentaire (Acourene et Tama., 1997 ; Varoquaux., 1978 ; Queiroz et al., 2008). 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, de l'acide benzoïque et l'acide ascorbique sur l'activité de la PPO des dattes « Phoenix dactylifera L cv Degla Beida » et de déterminer ses mécanismes d'inhibition en utilisant le pyrocatechol comme substrat phénolique.

Notre travail sera présenté en quatre (04) parties et est séquencé comme suit. La première partie concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible 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.

Synthèse

bibliographique

Chapitre I

**La datte, Généralités,
Composition et Intérêt.**

CHAPITRE I

La datte, Généralités, Composition et Intérêt.

I. LA DATTE

I.1 Généralités

La datte : Originnaire des bassins de l'Euphrate, ce fruit est consommé depuis des milliers d'années. Aliment phare des gens du Moyen-Orient et de la péninsule arabique depuis fort longtemps, la phoeniculture y est très développée dans cette région. Ce fruit est non seulement très bénéfique pour notre organisme, mais il est un aliment phare de la Tradition Prophétique (Buelguedj., 2001).

Le mot « datte » vient du grec ancien daktylos (doigt), qui fait référence à sa forme allongée, oblongue ou ovoïde, mais on rencontre également des dattes sphériques, la datte est une baie à une seule graine (**Figure 01**), avec un mésocarpe épais et charnu recouvert d'un péricarpe très fin. Le noyau est dur avec un endocarpe réduit à une mince membrane (Munier., 1973). Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 g selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouge et brune plus ou moins foncée (Djerbi., 1994) (**photos 01**).

Ce fruit fait partie des plus anciens. Son transport est délicat, car arrivée à maturité, la datte est un fruit fragile (Al-Shahib et Marshall., 2002).

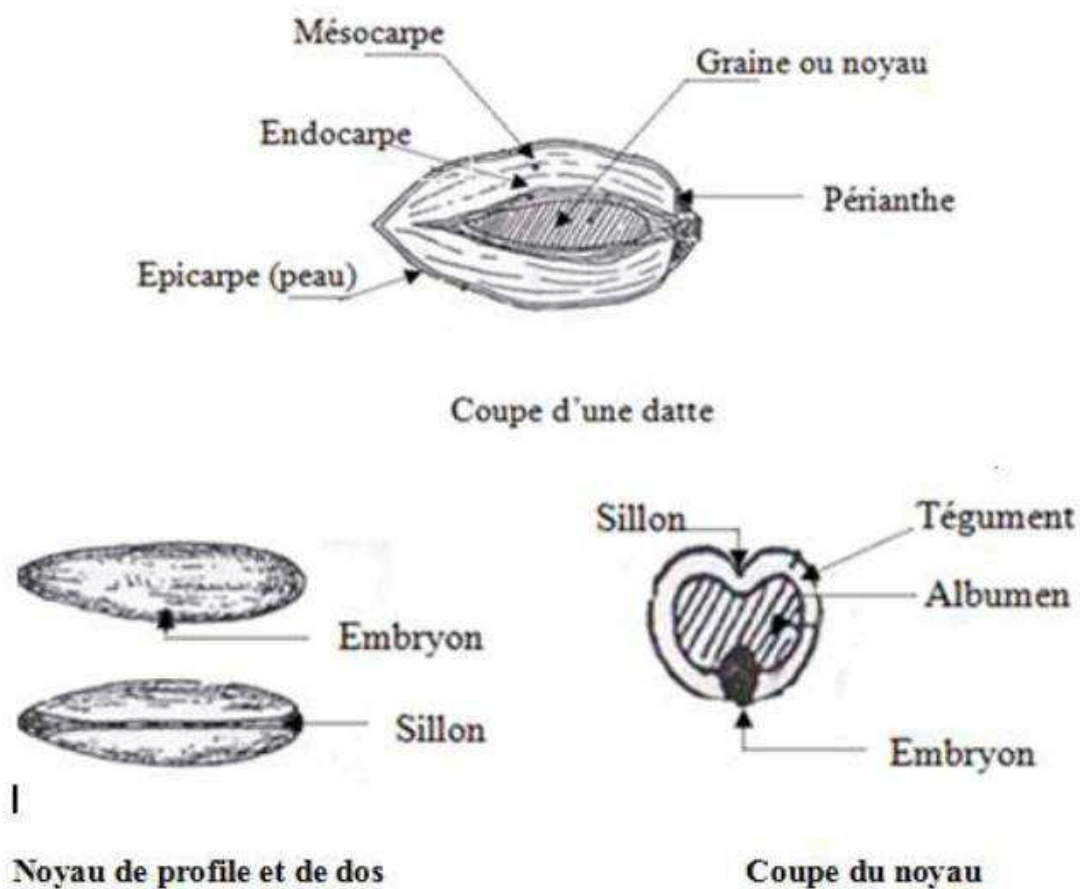


Figure 01 : Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj., 2001).



Photos 01 :Datte de la variété Degla-Beida (HANNACHI et al., 1998)

I.2. Classifications des dattes

Du point de vue biochimique pour **MUNIER (1973)**, les dattes sont classées en trois catégories, d'après leur consistance : molles, demi-molles et sèches (**Tableau 01**).

Tableau 01 : Catégories de dattes selon leur consistance

Consistance	Catégorie
Molle	Molle
	Demi-molle
Dure	Demi- sèche
	Sèche

Source : Peyron., 2000

I.3. Stades d'évolution de la datte

La datte passe par différents stades d'évolution (**Al-Shahib et Marshall., 2002**).

Le **Tableau (02)** présente les stades d'évolution de la datte et les appellations utilisées en Afrique du Nord et en Irak.

Tableau 02 : Stades de développement de la datte.

Pays	Stades de développement de la datte				
	I	II	III	IV	V
Irak	Hababouk	Kimiri	Khlal	Routab	Tamr
Algérie	Loulou	Khlal	Besr	Martouba	Tamr
Libye	-	Gamag	Bser	Routab	Tamr
Mauritanie	Zeï	Tefejena	Engeuï	Blah	Tamr

Source : Djerbi., 1994.

Les différents stades peuvent être définis comme suit (Djerbi., 1994) :

I.3.1.- Loulou ou Hababouk

C'est le stade "nouaison" qui vient juste après la pollinisation. Les dattes ont une croissance lente, une couleur verte jaunâtre et une forme sphérique (**Figure 07**). Il dure 4 à 5 semaines après fécondation.

I.3.2.- Khalal ou Kimri, Blah

Ce stade dur sept semaines environs, il se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes. Les fruits ont une couleur verte vive et un goût âpre à cause de la présence des tanins.

I.3.3.- Bser ou Bsir, Bissir

Les sucres totaux atteignant un maximum en fin du stade. La couleur vire au jaune, au rouge et au brun, suivant les clones. La datte atteint son poids maximum, au début de ce stade (**Figure 07**). Il dure en moyenne quatre semaines.

I.3.4.- Martouba ou Routab

C'est le stade de la datte mûre pour certains cultivars. Le poids et la teneur en eau vont diminuer à la fin. La durée de ce stade où le fruit prend une couleur brune est de 2 à 4 semaines. Les tanins émigrent vers les cellules situées à la périphérie du mésocarpe et sont fixés sous forme insoluble.

I.3.5.- Tamar ou Tmar

C'est la phase ultime de la maturation au cours de laquelle, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose).

I.4. La composition biochimique de la datte

I.4.1.Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe "

I.4.1.1. Constituants majeurs

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 (Noui., 2007) (**Tableau 03**).

Tableau 03 : Pourcentage des différents constituants de la datte.

Constituants	(%) du poids à l'état frais
Eau	13.70
Protéines	1.5
Sucres totaux	80.07
Saccharose	30.36
Glucose	10.4
Fructose	9.6
Cellulose	7.20
Lipides	0.05
Cendres	2,32

Source : PEYRON., 2000

I.4.1.1.a. L'eau

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % (**Noui, 2007**).

I.4.1.1.b. Les sucres

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement trois types : saccharose, fructose et glucose (**Acourene et Tama, 1997**).

Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol (**Acourene et Tama, 1997**).

La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 70 et 90 % du poids de la matière sèche (**Belguedj, 2001**).

I.4.1.1.c. Les protéines

Les dattes présentent des teneurs faibles en composés protidiques, généralement moins de 3% (MS). La pulpe des variétés algériennes renferme une faible quantité de protéines variant entre 0.38 et 2.5% (Noui., 2001).

I.4.1.1.d. Les acides gras

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais (Djouab., 2007). Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation. (Yahiaoui., 1998).

I.4.1.1.e. Les minéraux

La caractéristique la plus remarquable des dattes réside dans la présence de minéraux et d'oligoéléments particulièrement abondants dépassant nettement les autres fruits secs (Benchelah et Maka., 2008).

I.4.1.1.f. Les vitamines

La pulpe de dattes contient des vitamines en quantités variables avec les types de dattes et leur provenance. En général, elle contient des caroténoïdes et des vitamines du groupe B en quantités appréciables, mais peu de vitamine C (Munier., 1973).

I.4.1.1.g. Les composés phénoliques

La datte renferme des métabolites secondaires dits composés phénoliques. L'analyse qualitative des composés phénoliques de la datte a révélé la présence des acides cinnamiques, des flavones, des flavanones et des flavonols (Mansouri et al., 2005). Selon Henk et al., (2003), les polyphénols jouent un rôle important dans le corps : ils ont des effets anti-inflammatoires, antioxydants, abaissent la tension artérielle et renforcent le système immunitaire.....etc.

I.4.1.1.h. Les enzymes

Les enzymes jouent un rôle important dans le processus de conversion se produisant pendant le stade de formation et la maturation du fruit. La qualité de la datte est influencée par l'activité de :

L'invertase

Responsable de l'inversion du saccharose en fructose et glucose.

.La cellulase

Elle décompose la cellulose en chaînes plus courtes.

.La pectinmethylesterase

Elle convertit les substances pectiques insolubles en pectine plus soluble qui ramollit le fruit.

.La polyphenoloxydase

Elle conduit au brunissement du fruit suite à l'oxydation des phénols (**Yahiaoui., 1998**).

I.4.2. Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "

Le noyau présente 7 à 30 % du poids de la datte. Il est composé d'un albumen blanc, dur et corné protégé par une enveloppe cellulosique (**Espiard., 2002**). Les travaux de recherche menés sur la composition des noyaux de certaines variétés de datte d'Arabie Saoudite ont démontré la présence de protéines, de glucides, de lipides, et de minéraux (K, P, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Cu). En plus des protéines, le noyau contient des acides gras tels que l'acide oléique, palmique, laurique, linoléique et palmitique mis en évidence dans l'huile extraite des graines (**Al Hooti et al., 1998**).

I .5. Intérêt médical et nutritionnel de la datte**I .5. 1. Intérêt médical**

En plus de son usage traditionnel intense pour soulager certains maux, il a été prouvé par maintes études de recherche que la datte possède diverses activités biologiques ; celles-ci sont détaillées ci-dessous (**Tableaux 04 et 05**).

Tableau 04: Effets biologiques des dattes observés par étude *in vivo*.

Propriété pharmacologique	Observations et références
1/ Activité anti-inflammatoire	Augmentation des niveaux des antioxydants plasmatiques (vitamine C, E, A, β -carotène) et diminution des peroxydes lipidiques. Réduction du gonflement et du taux de fibrinogène plasmatique (Doha et Al-Okbi., 2004).
2/ Action sur le tractus gastro-intestinal	Augmentation du temps de transit gastro-intestinal, réduction des ulcères gastriques induits par l'éthanol (Al-Qarawi et al., 2004, 2005).
3/Activité Antihyperlipidémique	Réduction des taux plasmatiques de triglycérides, cholestérol total et LDL (Salah et Al-Maiman., 2005).
4/ Activité hépatoprotective	Lutte contre la baisse des marqueurs hépatiques (ALAT, ASAT, phosphatases alcalines et LDH) pendant l'hépatotoxicité induite par le diméthanoate et diminution de la nécrose et de l'inflammation A effet protecteur contre l'hépatotoxicité induite par CCl4 (Al - Qarawi et al., 2004 ; Saafi et al., 2011).
5/ Activité néphroprotective	Prévention des lésions rénales induites par la gentamicine et réduction du taux de créatinine et de l'urée (Al-Qarawi et al., 2008).
6/ Activité anticancéreuse	Régression des sarcomes tumoraux chez la souris (Ishurda et Kennedy., 2005).
7/ Activité immunostimulante	Amélioration de l'immunité à médiation cellulaire et humorale à la fois (Puri et al., 2000).
8/ Activité gonadotrope	Augmentation des taux de FSH, LH, testostérone, oestrogènes ; favorisation de la spermatogenèse et augmentation du nombre de spermatozoïdes (El Gasim et al., 1995; Ali et al., 1999).

Source : (Baliga et al., 2011)

Tableau 05 : Effets biologiques des dattes observés par étude *in vitro* .

Propriété pharmacologique	Observations et références
1/ Activité antioxydante	Piégeage des radicaux libres, inhibition de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des protéines (Vayalil, 2002; Al-Farsi et al., 2005; Mansouri et al., 2005; Allaith, 2008; Chaira et al., 2009).
2/ Activité antimutagène	Inhibition de la mutagénicité induite par le benzo (a) pyrène dans le test d'Ames (Vayalil, 2002).
3/ Activité anti-hémolytique	Inhibition de l'activité hémolytique de streptolysine O (Abuharfeil et al., 1999).
4/ Activité antivirale	Empêchement de l'activité lytique du phage <i>Pseudomonas</i> ATCC 14209-B1 sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Jassim et Naji., 2008)
5/ Activité antifongique	Activité antifongique contre la <i>Candida albicans</i> (Shraideh et al., 1998).

Source : (Baliga et al., 2011)

I .5. 2. Intérêt nutritionnel

Des sous-produits variés peuvent être obtenus de la datte (Barreveld, 1993 ; Al-Abid et al., 2007a, b). En effet, les dattes sont traditionnellement utilisées pour préparer une grande gamme de produits tels que les jus de dattes concentrés (Robb., 1984) et les pâtes pour différents usages (boulangerie et confiserie et préparations pâtissière) en plus de leur consommation directe. Les dattes sont commercialisées entières, dénoyautées, coupées en petits morceaux ou macérées (Yahia et Kader., 2011).

Récemment, la demande pour les dattes de table a diminué; versus un regain d'intérêt envers les nouvelles formulations alimentaires de la datte (Ahmed et Ramaswamy., 2006). En effet, les industries de transformation des dattes fabriquent une variété de produits tels que les sirops, miels, confitures, vinaigre, alcool, pectines et fibres alimentaires (ElShaarawy et al., 1989; Al Hooti et al., 2002 ; Ahmed et Ramaswamy., 2006).

Chapitre II

Brunissement enzymatique et Polyphénol Oxydase

Chapitre II

Brunissement enzymatique et Polyphénol Oxydase

I. Le brunissement Enzymatique

I.1 Définition

On appelle «brunissement enzymatique» la transformation enzymatique en présence d'oxygène de composés phénoliques en polymères colorés le plus souvent bruns ou noirs en passant par des teintes intermédiaires de rose ou rouge. Les pigments sombres formés sont désignés par le terme général de mélanines (Yoruk et Marshall, 2003; Jeantet *et al.*, 2006) ; par opposition au brunissement de Maillard qui est de type non enzymatique (Walker et Ferrar., 1998).

I.2. Déclenchement, conséquences et catalyse du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique s'installe au sein de la datte après sa récolte et augmente avec des teneurs élevées en eau de ce fruit ; cela constitue l'un des facteurs de désordre physiologique de la datte conduisant à une altération de sa qualité et par conséquent une diminution de sa valeur marchande (Yahia et Kader., 2011).

Il peut avoir lieu lors de la croissance des fruits, c'est l'exemple de la datte (Hui., 2004 ; Mann., 2008) ou durant l'endommagement mécanique lors du traitement et des manipulations post récolte (Mann., 2008), également lors de la conservation et des transformations technologiques (parage, découpage, broyage pour la préparation des jus, déshydratation, conservation au froid et congélation) (Jeantet *et al.*, 2006).

Ce phénomène se traduit par l'oxydation et la polymérisation des composés phénoliques comme résultat de l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase (PPO) pouvant conduire à la formation de pigments bruns.

Après tout traitement endommageant les cellules, comme la blessure suite à la conservation au froid conduisant à des dommages de la membrane des organites tels que les vacuoles, les composés phénoliques vacuolaires peuvent alors se mettre en contact avec la PPO ; ce qui conduit à leur oxydation rapide (de Rigal., 2001) et alternativement, les cellules peuvent réagir au froid par dépôt de composés phénoliques dans les parois cellulaires, qui vont alors réagir avec la PPO déjà présente dans les apoplastes (Chazarra *et al.*, 2001 ; Nguyen *et al.*, 2003).

Ce phénomène est accompagné de la perte des qualités nutritionnelles, fonctionnelles et organoleptiques, se traduisant par l'assombrissement, la diminution de la fermeté et l'altération de la flaveur (**Zawistowsky et al., 1991**). Toutefois, le brunissement dans d'autres cas comme dans le traitement du thé noir (**Eskin., 1990; Ullah., 1991**), le café (**Amorim et Melo., 1991**) et le cacao (**Lee et al., 1991; Lopez et Dimick., 1991**) est bénéfique dans une certaine mesure car il améliore la qualité des boissons à travers les produits savoureux formés (**Yoruk et Marshall, 2003**).

II. La Polyphénol Oxydase

II.1.Historique

La polyphénol 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 brun dans les plantes (**Whitaker et Lee.,1995**).

Bertrand (1896) à son tour a mis également en évidence la présence d'une enzyme dans la betterave, le dahlia et certains champignons. **Bach et Chodat. (1904)** ont émis l'hypothèse que le brunissement des tissus végétaux coupés ou broyés était dû à l'action d'une oxygénase qui catalyserait la peroxydation des o-diphénols. Selon ces auteurs, le peroxyde ainsi formé serait détruit par la peroxydase, conduisant à la formation des composés quinoniques.

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

C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (**Lerch., 1981; Jolivet et al., 1998**). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte il y'a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la PPO a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomea batatas* (**Klabund et al.,1998**). Et depuis, la PPO a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique (**Seo et al.,2003 ;Halalouili et al.,2006 ;Virador et al., 2010 ;Cheng et al.,2013 ;José et al.,2014**).

II.2. Définition, nomenclature et caractéristiques

II.2.1. Définition

La polyphénol oxydase (PPO) également appelée tyrosinase appartient au groupe des oxydoréductases. C'est une enzyme à cuivre (**Kazandjian et Klibanov., 1985**), elle est largement répandue dans le règne microbien, végétal et animal et participe dans la mélanogénèse chez les mammifères et/ou dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes. Bien que le terme générique de PPO soit couramment utilisé, il s'agit en réalité d'une vaste famille d'enzymes réunissant les tyrosinases (EC 1.14.18.1), les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1) et les laccases (EC 1.10.3.2) (**Mesquita & Queiroz., 2013**).

II.2.2. Nomenclature

Des noms différents ont été associés à la polyphénol oxydase dont la phénolase, phénol oxydase, tyrosinase, crésolase, catécholase, diphénolase, *o*-diphénol oxydase et acide chlorogénique oxydase. La polyphénol 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**).

II.2.3. Caractéristiques

II.2.3.1. Caractéristiques fonctionnelles

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

- hydroxylation en position ortho d'un substrat monophénolique (activité monophénol oxydase, crésolase ou tyrosinase) ;
- oxydation d'un diphénol en benzoquinone (activité diphénoloxydase, également appelée laccase, et spécifiquement catécholase lorsqu'il s'agit du *o*-diphénol).

II.2.3.1. a. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. (**Decker et Terwilliger., 2000**). Cette enzyme est appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Elle est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat.

II.2.3.1. b. Activité *o*-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase.

Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoidines (Cheriot., 2007).

II.2.3.1.c. Activité laccase (E.C. 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité *p*-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité *o*-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme ping-pong (Reinhammar et Malmström., 1981).

Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phyto-pathogènes et dans certaines plantes mais on ne trouve pas de laccase dans les fruits et légumes à part dans les pêches (Harel et al., 1970) et les abricots (Dijkstra et Walker., 1991).

On peut distinguer les *o*- des *p*- diphénoloxydases en fonction de leurs spécificités de substrats et d'inhibiteurs. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif ainsi que les différences des mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique peuvent en partie expliquer les taux différents d'inhibition de ces deux enzymes pour un même inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol qui sont de puissants inhibiteurs de la catécholoxydase (Keilin et Mann., 1940).

II.2.3.2. Caractéristiques structurales

II.2.3.2.a. Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la PPO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que les tyrosinases, les hémocyanines (protéine oligomérique servant au transport de l'oxygène chez les invertébrés, dont le site actif contient du cuivre) et les catécholoxydases de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker., 2006 ; Siegbahn., 2003). 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 PPO, 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 PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, 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 PPO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (**Klabunde et al., 1998**).

Les masses moléculaires apparentes des PPOs déterminées généralement par des techniques de chromatographie d'exclusion ou d'électrophorèse dénaturante sont comprises entre 12 et 400 kDa (**Zawistowski et al., 1991**). Ces différences de taille s'expliquent notamment par l'existence de formes polymériques de l'enzyme, pouvant aller du monomère à la forme tétramérique. Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (**Mayer et Harel., 1979 ; Anosike et Ayaebene., 1982**). Ces formes d'enzyme, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs.

II.2.3.2.b. Le site actif

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

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 (**Mayer et Harel., 1991 ; Turner., 1974**).

La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$), (Jolivet *et al.*, 1998 ; Ros *et al.*, 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, $\alpha 1$ et $\alpha 4$, 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 $\alpha 2$ (**Figure 02**). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (**Figure 03**). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est située au milieu de l'hélice $\alpha 2$, tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice $\alpha 3$. 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 $\alpha 6$ et $\alpha 7$ (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 04**) (Van Gelder *et al.*, 1997).

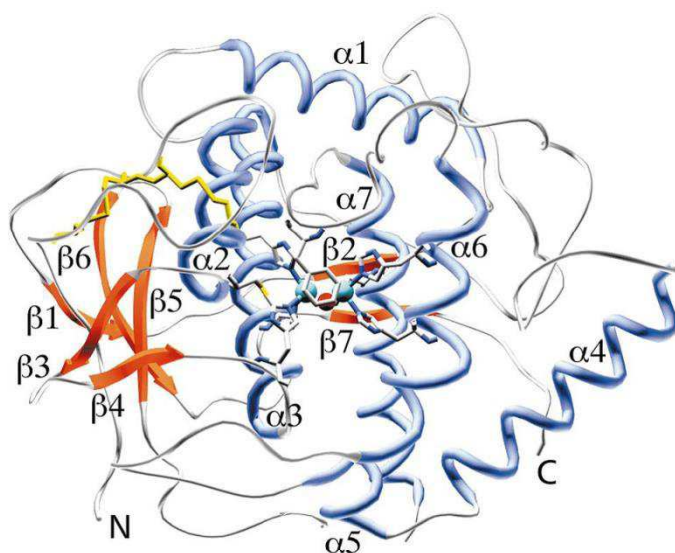


Figure 02: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken *et al.*, 1999).

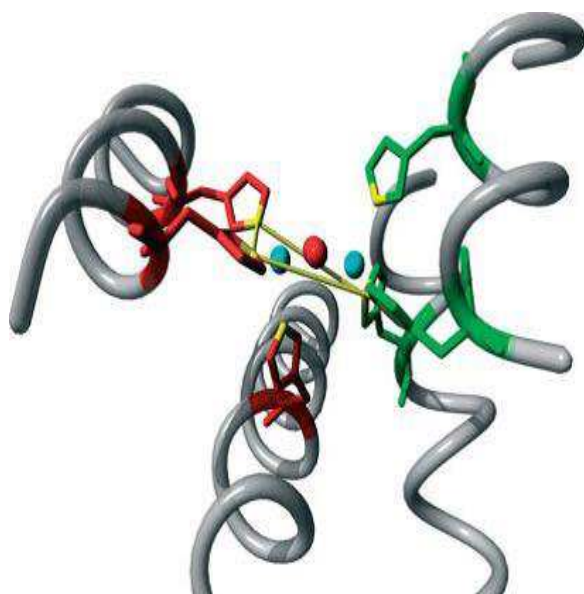


Figure 03: L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker., 2005).

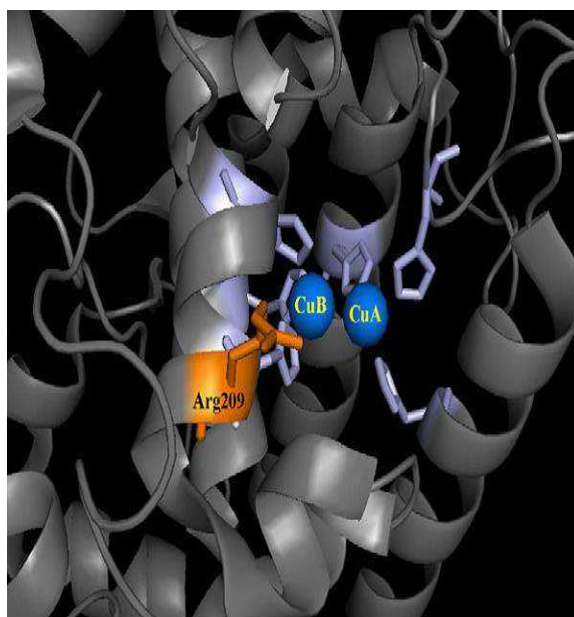


Figure 04: Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet clair) (Ben-Yosef et al., 2010).

II.2.3.2.c. Les substrats

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent catalyser une grande variété de substrats (Whitaker., 1995). La PPO 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 PPO trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski et al., 1991, Vámos-Vigyázó., 1981 ; Trebst et Depka., 1995).

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-nitrocatéchol 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 PPO 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.

II.2.3.3. Caractéristiques réactionnelles

En présence d'oxygène moléculaire, la PPO catalyse deux réactions bien distinctes l'hydroxylation de monophénols en *o*-diphénols (l'activité crésolase) (**Réaction (1)**) et l'oxydation des *o*-diphénols à leurs *o*-quinones correspondants (l'activité catécholoxydase) (**Réaction (2)**) (Robb., 1984) (**Figure 05**).

Les PPOs sont capable d'insérer de l'oxygène dans une position ortho à un groupe hydroxyle existant dans un cycle aromatique, suivi de l'oxydation du diphénol à la quinone correspondante ; l'oxygène moléculaire est utilisé dans la réaction (Mayer., 2006).

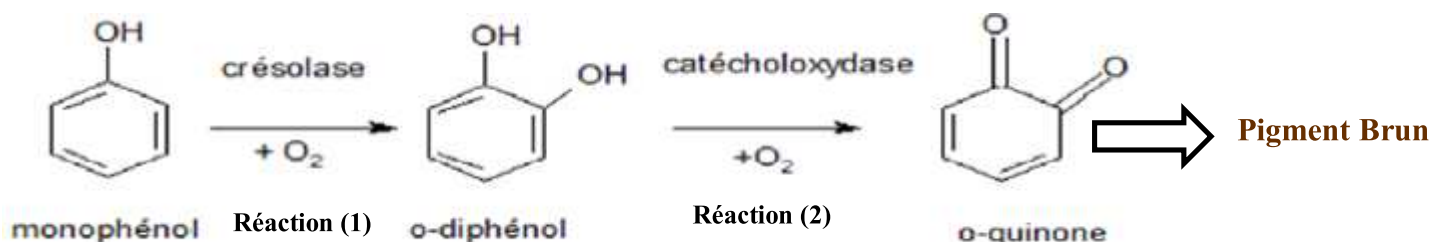


Figure 05 : Les réactions catalysées par la polyphénoloxydase, les deux activités crésolase et catécholoxydase sont représentées (de Rigal., 2001).

Les *o*-quinones produits de la transformation des substrats de la PPO 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 (Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003., Dicko et *al.*, 2002 ; Cho et Ahn., 1999; Burton., 1994).

II.3. Source et localisation

L'activité de PPO a été rapportée dans la pomme (Aoki *et al.*, 1980), le raisin (Taverso-Rueda et Singleton., 1973 ; Kidron *et al.*, 1978 ; Wissemann *et al.*, 1980 ; Spais *et al.*, 1983), la pêche (Harel *et al.*, 1970 ; Chan et Jeunes., 1971 ; Wong *et al.*, 1971 ; Flurkey et Jen., 1978), la poire (Tate *et al.*, 1964 ; Rivas et Whitaker., 1973), banane (Galeeazzi *et al.*, 1981), la pomme de terre (Sato., 1976 ; Golbeck et Cammarata., 1981 ; Harel *et al.*, 1970).

La PPO a été également trouvée chez les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et les mycètes (Burton., 1994 ; Whitaker., 1995 ; Chen et Flurkey., 2002 ; Claus et Decker., 2006).

La localisation subcellulaire de la PPO n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. La PPO peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski *et al.*, 1991 ; Mayer et Harel., 1979).

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides, tandis qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Vaughn et Duke., 1984 ; Mayer et Harel., 1979 ; Zawistowski *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 PPOs sont issues à partir de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (Solomon *et al.*, 2006). Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus* est reconnu comme étant la source naturelle majeure de la PPO (Chen et Flurkey., 2002 ; Burton., 1994). La PPO est présente dans les différentes parties du champignon avec des proportions variables (Zhang et Flurkey., 1997). La localisation intracellulaire de la PPO d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (Jolivet *et al.*, 1998). Bonner (1955) a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. Van Gelder *et al.*, 1997 ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol.

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble. Elle 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 PPO dans les plantes dépend de l'espèce, du cultivar, de la maturité, de l'âge et le stockage et peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables dans certains cas. L'activité PPO est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel., 1991).

II.4. Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer et al., (1995), le site actif des PPOs 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 06).

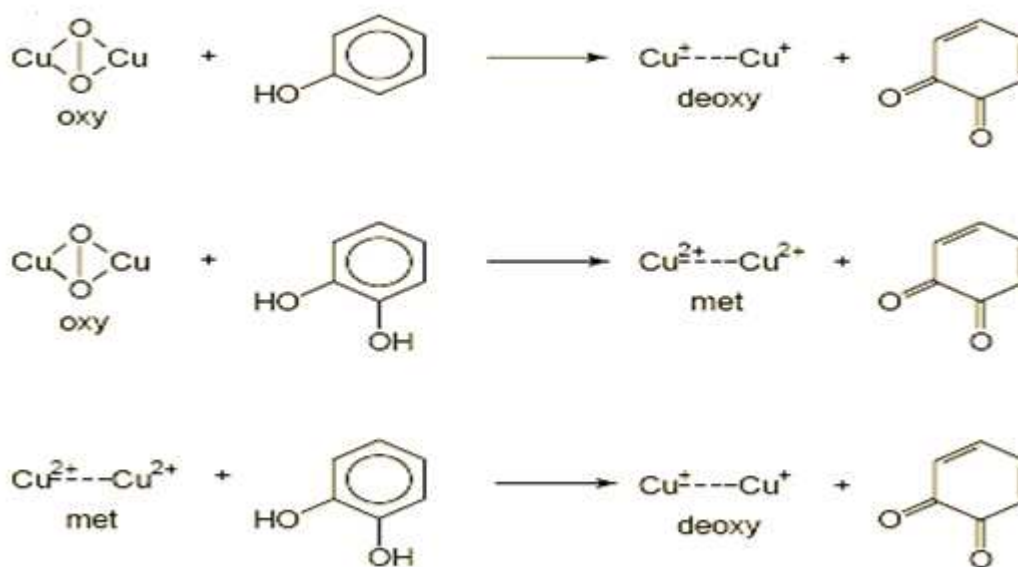


Figure 06: Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO d'après Van Gelder et al., 1997.

Le modèle du mécanisme réactionnel de l'activité catécholase de la PPO est représenté dans la (Figure 07).

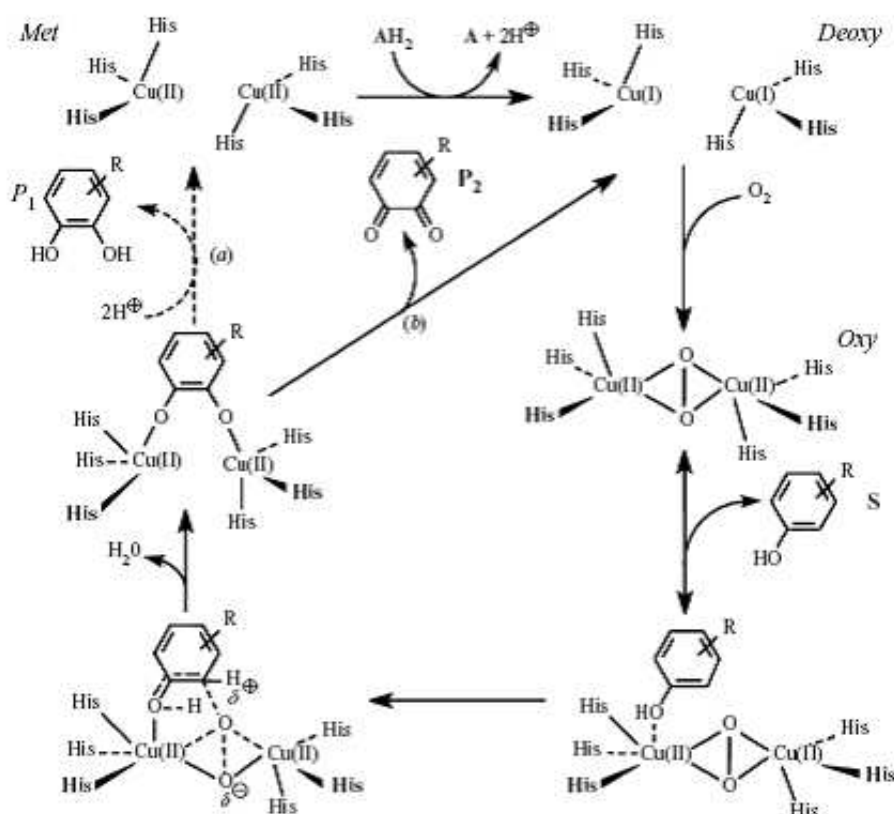


Figure 07: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO (Solomon et al., 1992).

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*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.5. Les effecteurs de la PPO

II.5.1. Les activateurs

La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), (Seo et al., 2003 ; Pérez-Gilabert et al., 2004 ; Gandía-Herrero et al., 2005). Ce

dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (Espín et Wichers., 1999).

Il a même été montré que le SDS active la PPO 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 PPO (Vámos-Vigyázó., 1981; Fan et Flurkey., 2004; Van Leeuwen et Wichers., 1999)

II.5.2. 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 PPO 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; Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (Yemenicioğlu et al., 1997 ; McCord et Kilara., 1983 ; Weemaes et al., 1998a,b ; 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 PPO à des températures relativement basses, en particulier lorsqu'il s'agit d'un produit sensible à la chaleur (Terefe et al., 2009 ; Weemaes et al., 1998 ; Buckow et al., 2009 ; Rapeanu et al., 2006 ; Devece et al., 1999). 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 PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O_2 et substrat phénolique) et du pH et de la température (Zawistowski et al., 1991).

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la PPO 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 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 (**Vámos-Vigyázó., 1981; Jolivet et al., 1998; Anderson et Morris., 2001 ; Gasowska et al., 2002 ; Mayer et Harel., 1979**).

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les PPOs de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels des PPOs 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 PPO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2++} en Cu^+ (**Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski 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 PPO. 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; Gasowska et al., 2002 ; Janovitz-Klapp et al., 1990**).

L'inhibition de la PPO est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites ; SO₂ ; l'acide ascorbique, l'acide érythorbiques et les composés à fonction thiol (Kahn, 1985 ; Zawistowski 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 PPO 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 PPO, 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 PPO, soit en réagissant avec les *o*-quinones (McEvily et *al.*, 1992). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu²⁺ du site actif de la PPO (O'Sullivan., 1969). Les cyclodextrines peuvent inhibées la PPO par fixation sur le substrat phénolique (Irwin et *al.*, 1994). L'acide citrique inactive la PPO par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu (MeEvely et *al.*, 1992). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas spécifique seulement pour les PPO (Mayer et Harel., 1991).

II.8. Applications de la PPO

Au cours de ces dernières années, les polyphénols oxydases ont suscité un intérêt considérable en raison de leur forte capacité d'oxyder les composés aromatiques. Cette caractéristique rend l'utilisation de polyphénols oxydases très appropriée pour certaines applications biotechnologiques notamment dans l'industrie des aliments, l'industrie des pâtes et papiers, de textile, ainsi dans la médecine et l'environnement. Les Polyphénol oxydases, en particulier les laccases ont d'intérêts dans la cuisson car elles sont capables de former des biopolymères par le phénomène de cross-link (Rodriguez & Toca., 2006). Elles peuvent être également utilisées pour la biosynthèse des antioxydants et colorants alimentaires (Simsek & Yemenicioglu., 2007).

L'application des polyphénols oxydases dans l'industrie alimentaire comprend la formation de la couleur et de l'amélioration de la saveur du thé, du cacao et du café, de la pectine de betterave à sucre, la détermination de l'acide ascorbique et de la gélification et également comme un biocapteur (Polaina & MacCabe., 2007).

Dans le secteur médical, **Cowan et al.(2000)** ont montré que la polyphénol oxydase peut inhiber l'adhérence de *Streptococcus sobrinus* au niveau de la cavité buccale,de plus ,elle peut être utilisée également pour le traitement de la maladie de Parkinson via la conversion de la L-tyrosine en L-DOPA (**Xu, et al., 1998 & Asanuma, et al.,2003**).

En outre,les PPO peuvent faire l'objet de marqueur de vitiligo qui est une maladie auto-immune,et/ou comme agent de traitement en tant que précurseur de médicament et suppresseur de tumeur (**Seo et al.,2003**).

Seule ou parfois associée à d'autres enzymes telle que la laccase (**Kochana et al.,2008 ;Montereali et al.,2010**), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (**Min & Yoo.,2009, Njagi et al., 2010**), le catéchol (**Ameer & Adeloju.,2009 ;Tan et al.,2010**), le phénol et ses dérivés (**Adamski et al., 2010**).

Dans le domaines agroalimentaire et environnement, les biocapteurs à PPO peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (**Durán & Esposito.,2000**), comme le cyanure (**Shan et al.,2004**), l'acide benzoïque (**Li et al.,2010**), l'azide de sodium (**Cui et al., 2006**), et le fluorure de sodium (**Asav et al., 2009**).

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

Etude Expérimentale

Chapitre I

Matériels et Méthodes

I. MATERIELS

I.1. Matériel biologique

Les dattes de la variété (Degla Beida) (**photo 02**) utilisée dans notre étude a été achetée à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat dans la semaine de son utilisation. Les dattes sont utilisées comme une source de l'enzyme Polyphenol oxydase (PPO). Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conserver à 4°C pour une utilisation ultérieure.



Photo 02 : *Phoenix dactylifera L*, la variété de Degla Beida (Wilaya de Laghouat, 2016)

I.2. Produits chimiques

Le phosphate de potassium (KH_2PO_4), Le phosphate de sodium (NH_2PO_4), l'acétate de sodium, le catéchol, l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide benzoïque 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.

I.3 Matériels du laboratoire

Le spectrophotomètre (Thermo scientifique (UV/Visible)); un bain-marie (Grant - Sub 28 ; Memmert) ; et une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific) ; vortex ; mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E).

II. METHODES

II.1. Préparation de l'extrait brut de la PPO

La PPO a été isolée à partir des dattes de la variété (Degla-Beida) 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 3 min 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 phénoliques.

Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de gaze. 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 total de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait enzymatique brut PPO qui est divisé dans des tubes Eppendorf de 2 ml qui seront conservés à -10°C (**figure 08**).

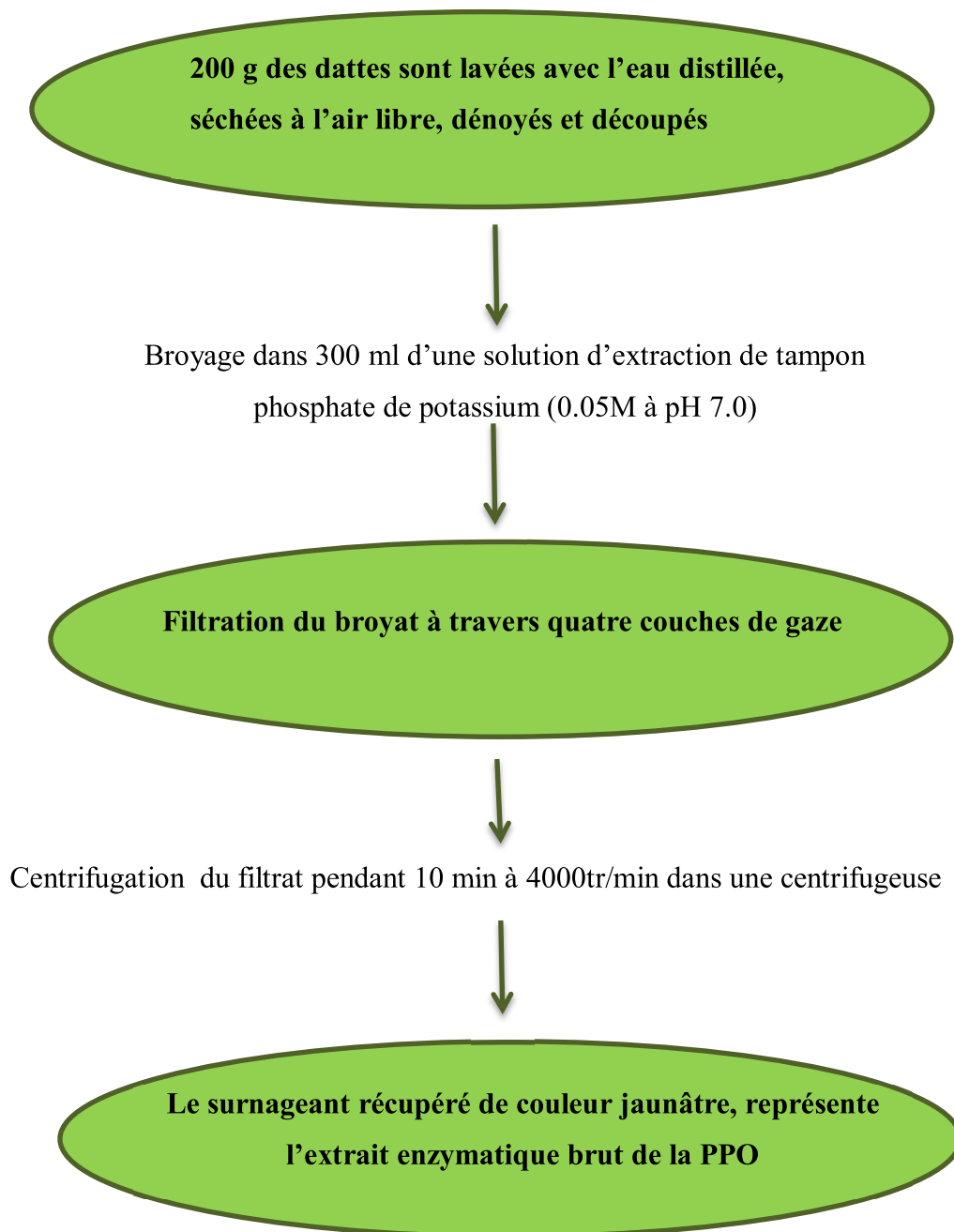


Figure 08 : Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase des dattes.

II.2 Mesure de l'activité de PPO

L'activité de la polyphénol oxydase est mesurée à 410 nm en utilisant le catéchol comme substrat par la mesure directe de la formation du produit o-quinone à l'aide d'un spectrophotomètre (**figure 09**) (Thermo Scientific Helios Spectrophotometer, England). en présence d'oxygène/aire (**Fan et Flurkey., 2004 ;Espchin et al., 1995**).

La solution mère de catéchol à 0.4 M est préparé dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5mM (**Fan et Flurkey., 2004**).

Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 μ l d'extrait enzymatique. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant 2 min après l'ajout de l'extrait enzymatique.



Figure 09 : Le spectrophotomètre (*Thermo Scientific Helios Spectrophotometer, England*).

II.3 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 5,5 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs : d'acide citrique

[Etude Expérimentale]

entre 5 et 40mM, acide ascorbique entre 0,05 et 0,25 mM et de l'acide benzoïque entre 0.5 et 3 mM pour une concentration constante de catéchol.

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, acide ascorbique et l'acide benzoïque) (**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 3 fois.

II.4 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par les acides organiques

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur (15 et 30 mM pour l'acide citrique, 0,05 et 0,15mM pour l'acide ascorbique tandis que pour l'acide benzoïque des concentrations valant 1 et 2 mM ont été utilisées) et à différentes concentrations croissantes de la catéchol comprises entre 30 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**).

II.5 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 effectué par ajustement à l'aide de régression

linéaire, et de régression non linéaire 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 II

Résultats et discussion

1. Détermination de la valeur d'IC₅₀ des trois acides organiques sur l'activité enzymatique de la PPO

Sachant que la PPO est stable, l'effet des différentes concentrations : d'acide citrique, d'acide ascorbique et d'acide benzoïque sur l'oxydation de la pyrocatechol sur l'activité enzymatique de la polphénol oxydase des dattes « Degla beida » (*Phoenix dactylifera L cv*) a été étudié.

Les résultats trouvés, montrent que la concentration de ces trois inhibiteurs 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 une valeur :

D'IC₅₀ = 21,047 mM ± 0,65 en présence d'acide citrique.

IC₅₀ = 0,117 mM ± 0,24 ; en présence d'acide ascorbique

IC₅₀ = 1,52 ± 0,24 en présence d'acide benzoïque

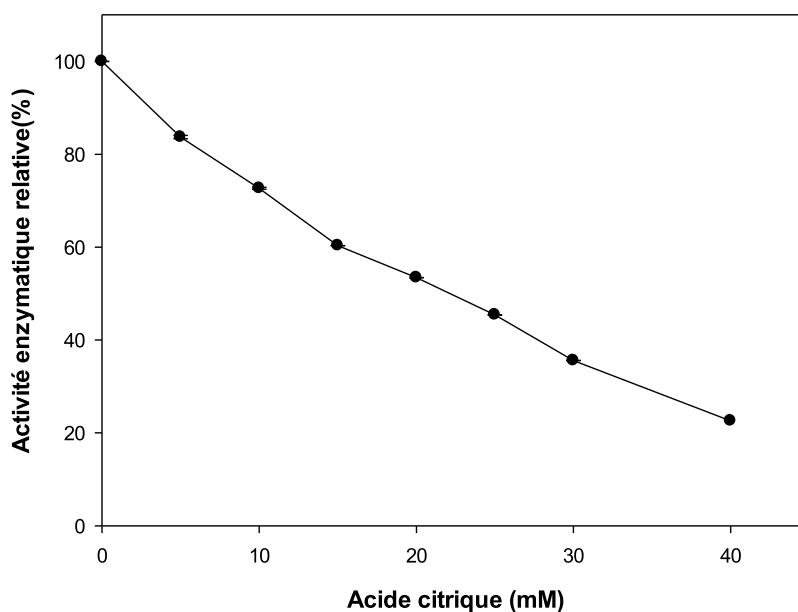


Figure 10 : L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de Pyrocatechol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L cv Degla beida*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,5).

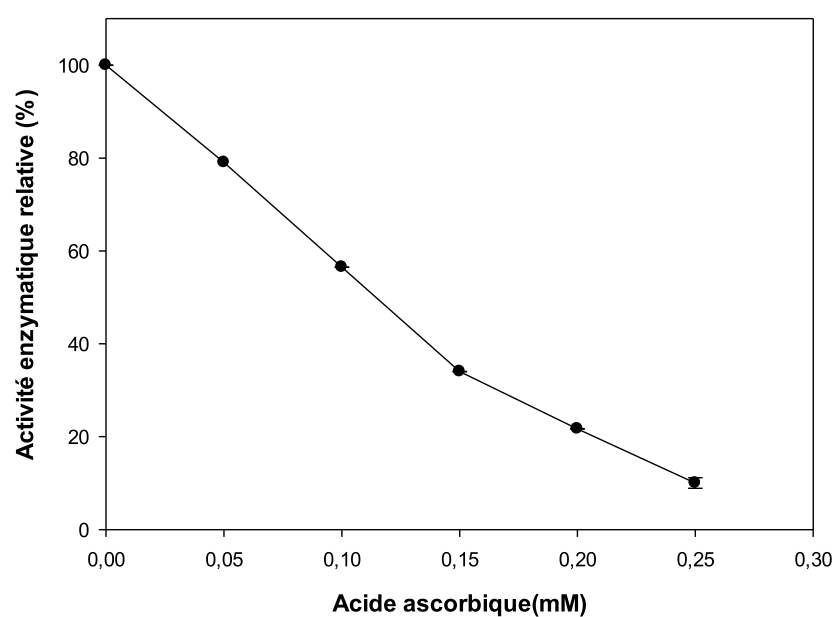


Figure 11 : L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de Pyrocatechol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L cv Degla beida*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,5).

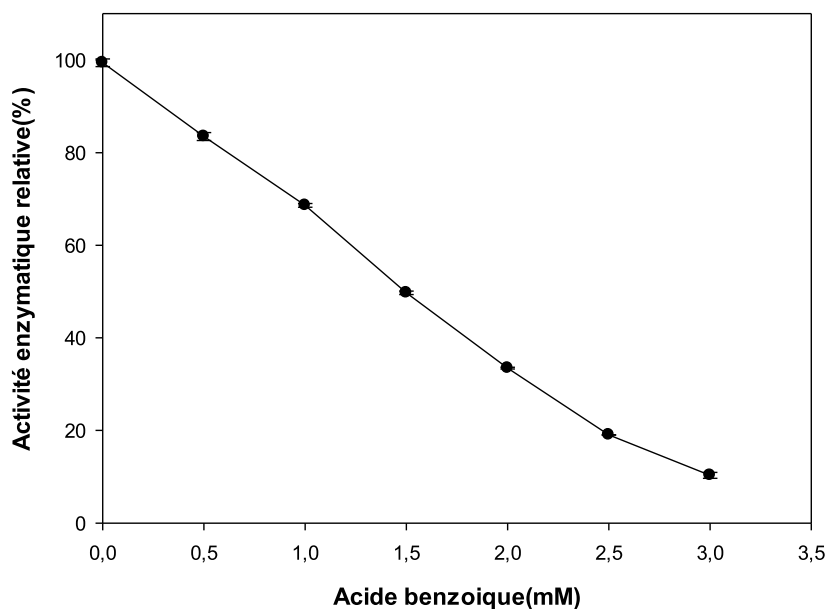


Figure 12 : L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de Pyrocatechol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L cv Degla beida*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,5).

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 de l'acide benzoïque trouvées pour la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans les Tableaux (06,07 et 08) respectivement.

Tableau 06 : Les valeurs d'IC₅₀ de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différents substrats par l'acide citrique.

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Degla beida	Catéchol	21,047 ±0,65	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet –Nour	Catéchol	24,44±0,79	Mameri et Boudia., 2016
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet –Nour	Pyrogallol	50,08	Bouchareb., 2014
Truffe <i>Terfezialeonis Tul</i>	L-tyrosine	9,46	Harrouz Sahraoui., 2014
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Catéchol	150	SON et <i>al.</i> , 2000

Tableau 07 : Les valeurs d'IC₅₀ de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différents substrats par l'acide ascorbique.

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Degla beida	Catéchol	0,117 ±0,24	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet –Nour	Catéchol	0,21 ±0,32	Mameri et Boudia., 2016
Blé <i>Triticumaestivum L.</i>	Catéchol	11.18	Erat et <i>al.</i> , 2010
Truffe <i>Terfezialeonis Tul</i>	L.Tyrosine	0.151	Hafes, Saadi., 2014
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Catéchol	0.24	Goldrish et Witaker., 1984

Tableau 08 : Les valeurs d'IC₅₀ de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différents substrats par l'acide benzoïque.

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet beida	Catéchol	1,52±0,24	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet –Nour	Catéchol	0,19 ±0,15	Choul., 2016
Blé <i>Triticumaestivum L.</i>	Catéchol	11.18	Erat et al., 2010
Truffe <i>Terfezia leonis Tul</i>	Catéchol	8.2	Gouzi., 2014
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Catéchol	1.00 0,147	Chen et al., 2003 Gouzi et al., 2010

En utilisant l'acide ascorbique comme inhibiteur, nous avons obtenu une valeur d'IC₅₀ très appréciable reflétant entre autres l'efficacité de cet inhibiteur dont des facteurs de 180 et 12 fois plus sont estimés en comparant sa valeur avec celles obtenues en présence d'acide citrique et d'acide benzoïque respectivement.

En analysant ces tableaux, on remarque que la PPO des dattes semble être plus sensible à ces acides organiques en particulier vis-à-vis de l'acide ascorbique par rapport aux autres sources végétales, de même la sensibilité de la PPO de degla beida (**notre étude**) semble être plus élevée par rapport à celle de la PPO de deglet nour.

De plus, d'après ces résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur et/ou la valeur d'IC₅₀ dépend beaucoup plus de la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors de la mesure de l'activité de la PPO des dattes.

2-Etude du mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du polyphénol oxydase des dattes

L'effet inhibiteur de l'acide citrique, de l'acide ascorbique et aussi de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO des dattes cv *Degla Beida* est étudié en utilisant le pyrocatechol comme substrat.

Les résultats trouvés, montrent que ces inhibiteurs provoquent une diminution significative de l'activité enzymatique de la PPO et que leur 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 de ces acides organiques pour le substrat utilisé (Pyrocatechol) sont indiqués dans les tableaux (09,10 et 11).

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 choisie.

Tableau 09 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L*) en utilisant le pyrocatechol comme substrat.

Inhibiteur	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
	0			0,383±0,024	0,989	
Acide citrique	15	36,621±1,165	115,999±11,007	0,267±0,024	0,987	Non compétitive
	30			0,210±0,024	0,986	

Tableau 10 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L*) en utilisant le pyrocatechol comme substrat.

Inhibiteur	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
	0		114,275±13,058		0,987	
Acide ascorbique	0,05	238,18±24,21	156,420±17,87	0,592±0,044	0,986	compétitive
	0,015		238,182±24,215		0,985	

Tableau 11 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L*) en utilisant le pyrocatechol comme substrat.

Inhibiteur	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
	0		95,40±7,84		0,996	
Acide benzoïque	1	1,443±0,05	148,58 ±10,09	0,50±0,02	0,995	compétitive
	2		244,58 ±11,75		0,994	

Avec

K_i : Constante de dissociation du complexe EI (mM)

[I] : Concentration d'inhibiteur (mM)

K_m : Constante de Michaelis-Menten

V_{max} : La vitesse maximale

R^2 : Coefficient de régression linéaire

Les valeurs de K_i s indiquées dans les Tableaux (09, 10, 11) suggèrent que ces acides organiques inhibent efficacement l'activité de la PPO de la variété Degla Beida en présence de pyrocatechol, de même ces tableaux montrent que les représentations graphiques de $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$, est une série de courbes

[Etude Expérimentale]

parallèles, avec une diminution de la valeur V_{max} et pareillement, augmentation du K_m .

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de pyrocatechol par la PPO des dattes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de ces acides organique 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 l'acide citrique, de l'acide ascorbique et de l'acide benzoïque sont représentés respectivement dans les figures (13) (14) et (15).

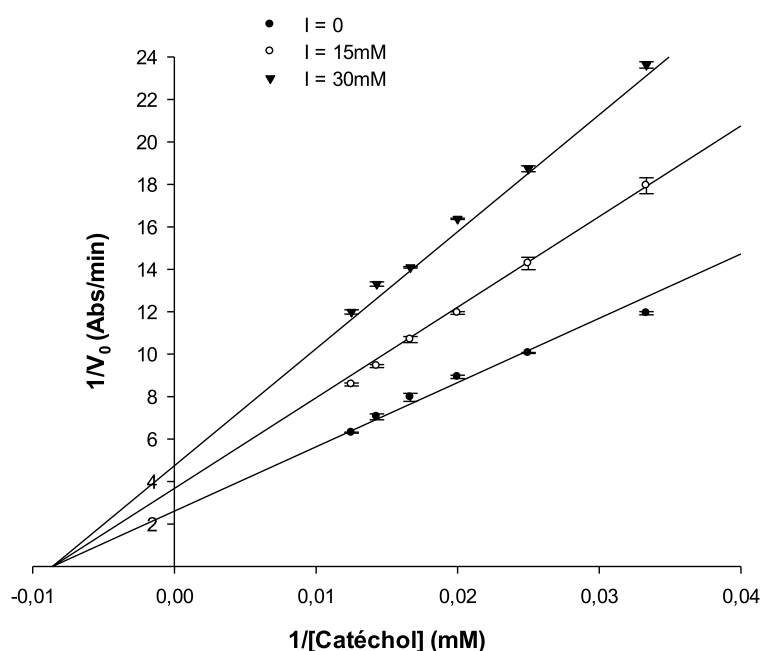


Figure 13 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Degla beida*) par l'acide citrique. Les concentrations d'acide citrique sont 0 (●), 15(○), et 30(▼)

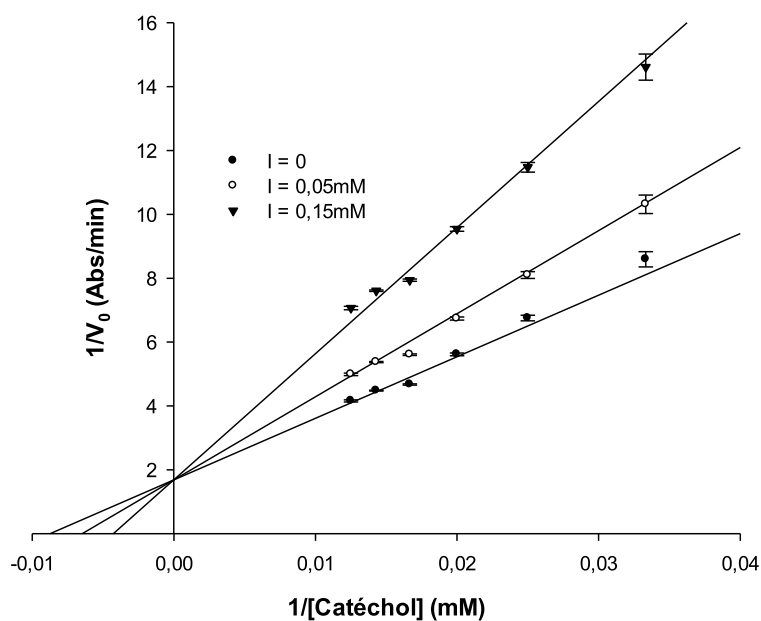


Figure 14 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Degla beida*) par l'acide ascorbique. Les concentrations d'acide ascorbique sont 0 (●), 0,05 (○), et 0,15 (▼),

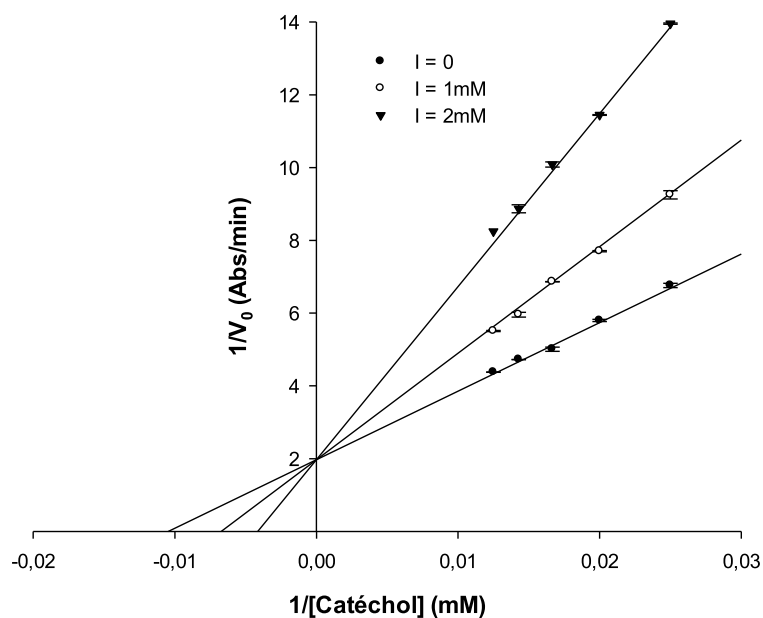


Figure 15 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Degla beida*) par l'acide benzoïque. Les concentrations d'acide benzoïque sont 0 (●), 1 (○), et 2 (▼),

En présence d'acide ascorbique et/ou d'acide benzoïque la représentation graphique de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, et qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées. La valeur de V_{max} demeure constante tandis que, la valeur de K_m augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur.

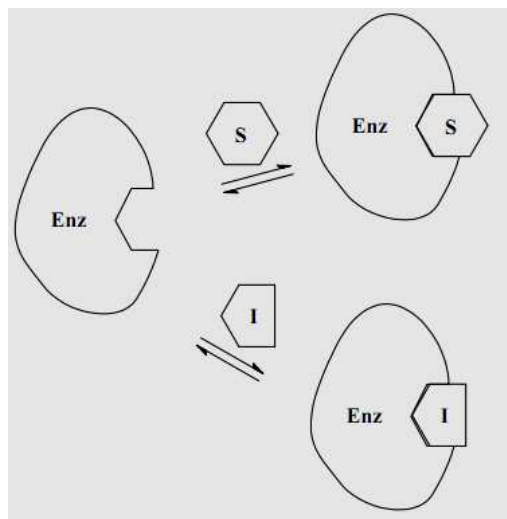


Figure 16 : Représentation de l'inhibition compétitive (Keillor., 2004)

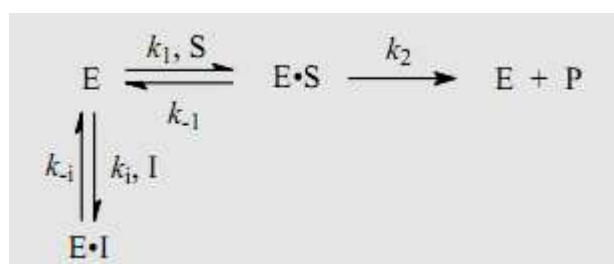


Figure 17 : schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive (Keillor., 2004)

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

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Avec :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

[Etude Expérimentale]

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

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

L'acide ascorbique et/ou l'acide benzoïque se fixent uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

Les constantes d'équilibre de fixation de ces deux inhibiteurs sur l'enzyme libre, K_I , sont obtenues à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'acide ascorbique et/ou l'acide benzoïque.

Comme s'est indiqué dans les Tableaux (10 et 11), les constantes d'inhibition (K_I) pour l'acide ascorbique et l'acide benzoïque, utilisant le catéchol comme substrat sont respectivement, 238,18 mM et 1,443 mM.

Pour l'acide ascorbique nos résultats sont similaires avec ceux trouvés pour la PPO extraite d'artichauts (*Cynara scolymus L.*) (Tülin., 2003), cependant, ils sont en désaccord avec ceux obtenus pour la PPO extraite de blé (*Triticum aestivum L.*) où l'effet de l'acide ascorbique a été décrit comme non compétitif avec le catéchol comme substrat (Erat et al., 2010). Ce qui indique que le type d'inhibition peut dépendre de l'origine de la PPO étudiée.

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).

L'inhibition compétitive de la PPO par l'acide benzoïque observée dans notre étude, est en accord avec les résultats trouvés pour la PPO de champignons par Harry et al., (1970) et pour d'autres PPOs obtenues à partir de différentes sources (Anosike et Ayaebene., 1982; Robert et al., 1997 ; Ziyen et Pekyardimce., 2004 ; Dogan et al., 2005). Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (Pifferri et al., 1974).

En présence de l'acide citrique (figure 13) nous remarquons une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ($1/[S]$) mais de différentes pente. Ceci indique que le type d'inhibiteur est non compétitif pour ces deux acides organiques

L'acide citrique se fixe 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 Tableau (09), la constante d'inhibition (K_I) pour l'acide citrique, utilisant le catéchol comme substrat 36,621 mM.

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

$$1/V_0 = ([K_m/V_{max}] / (1 + [I]/K_I)) + 1/V_{max}$$

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).

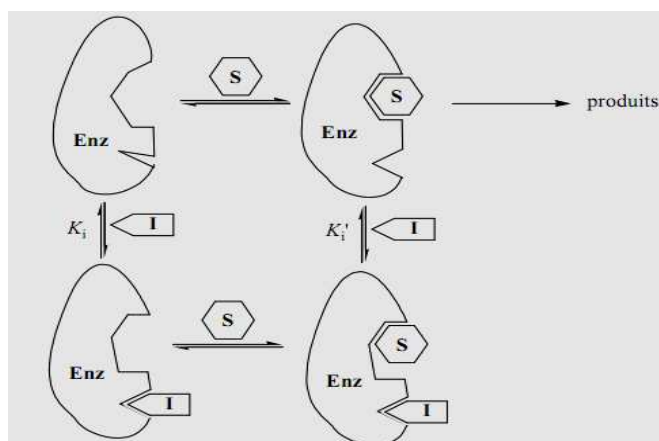


Figure 18 : Représentation de l'inhibition non compétitive
(Keillor., 2004)

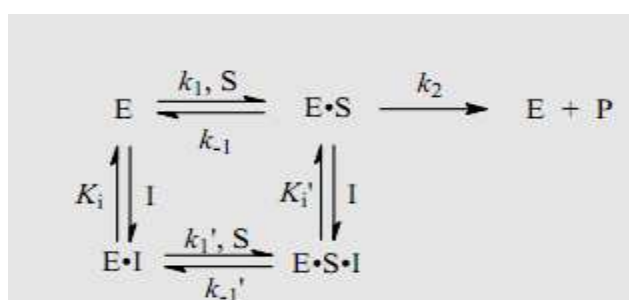


Figure 19 : Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive
(Keillor., 2004)

Urszul et *al.*, (2007) ont trouvé que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de la PPO de brocoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) lorsque le catéchol est utilisé comme substrat. Par contre la PPO de céleri (*Apium graveolens* 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.

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.

Conclusion

CONCLUSION

La variété « *Degla Beida* » est un fruit historique de grande valeur nutritionnelle et commerciale, il est très apprécié aussi bien sur le plan national qu'international.

L'un des problèmes les plus importants des dattes ; c'est la réaction de brunissement enzymatique causée par l'enzyme « polyphénol oxydase ».

Alors le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé sur l'inhibition de cette enzyme qui a été extraite en milieu aqueux en présence de (PVPP), l'extrait enzymatique brut montre que la PPO des dattes est une diphénolase, qui est capable d'oxyder le pyrocatechol comme substrat.

L'application de l'acide citrique, de l'acide ascorbique et de l'acide benzoïque comme des inhibiteurs pour réduire le brunissement dû à l'enzyme PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L cv *Degla Beida*), est ainsi rapportée pour la première fois.

D'après les résultats obtenus à partir de ce travail, on conclue que :

- l'acide ascorbique et l'acide benzoïque présentent un mécanisme compétitif tandis que l'acide citrique présente un mécanisme non compétitif.
- 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 catéchol comme substrat et d'une manière réversible alors que l'acide ascorbique et/ou l'acide benzoïque se fixent uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

D'après les valeurs d'IC₅₀, nous pouvons déduire que :

- l'acide ascorbique est 180 et 12 fois plus puissant que l'acide citrique et l'acide benzoïque, respectivement.

Ces acides organiques sont non toxiques et peu coûteux ce qui rend leur utilisation comme étant des agents anti-brunissement très appropriée.

Comme perspectives, une amélioration du pouvoir inhibiteur de ces acides organiques est envisageable, et ceci en faisant appel à d'autres moyens physiques comme la température dont il serait plus intéressant d'étudier l'effet de ces inhibiteurs sur les propriétés cinétiques et thermodynamiques de la PPO.

Références Bibliographiques



- **Abuharfeil N, Al-Oran R, Abo-Dhehda M** (1999). The effect of bee honey on the proliferative activity of human B- and T-lymphocytes and the activity of phagocytosis. *Food Agric. Immunol.* 11: 169-177.
- **Achour, M., Bagga, N.,** (2005). Effet des conditions d'entreposage sur la dégradation de la couleur des dattes tunisiennes de type Deglet Nour. *EDP Sciences*. Vol. 60, pp. 41–46.
- **Acourene s. et Tama m.** (1997). Caractérisation physicochimique des principaux cultivars de dattes de la région des Zibans. *Recherche Agronomique*, N° 1. Ed. INRAA, Alger .59-66p.
- **Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J.**(2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta.* 55: 2363–2367.
- **Ahmed, J., & Ramaswamy, H. S.** (2006). Physico-chemical properties of commercial date pastes (Phoenix dactylifera). *Journal of Food Engineering*, 76(3), 348-352.
- **Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M., & Al-Rawahy, F** (2007 a), Maintaining the soft consistency of date paste, *Acta Horticulturae*, 736 , 523 – 530.
- **Al-Abid M , Al-Shoaily K , Al-Amry M & Al-Rawahy F** (2007 b), Preparation of caramel colour from dates , *Acta Horticulturae* , 736 , 537 – 541.
- **Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., & Shahidi, F.** (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (Phoenix dactylifera L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7592-7599.
- **Al-Hooti S., Sudhus S. And Gabazard H.** (1998). Chemical composition of seeds of date fruit cultivars of United Arab Emirates. *J.Food Chem.Technol.* 35: 44-46.
- **Ali, B. H., Bashir, A. K., & Alhadrami, G.** (1999). Reproductive hormonal status of rats treated with date pits. *Food chemistry*, 66(4), 437-441.
- **Allaith, A. A. A.** (2008). Antioxidant activity of Bahraini date palm (Phoenix dactylifera L.) fruit of various cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(6), 1033-1040.
- **Al-Qarawi, A. A., Mousa, H. M., Ali, B. H., Abdel-Rahman, H., & El-Mougy, S. A.** (2004). Protective effect of extracts from dates (Phoenix dactylifera L.) on carbontetrachlorideinduced hepatotoxicity in rats. *Int J Appl Res Vet Med*, 2(3), 176-180.
- **Al-Qarawi, A. A., Abdel-Rahman, H., Ali, B. H., Mousa, H. M., & El-Mougy, S. A.** (2005). The ameliorative effect of dates (Phoenix dactylifera L.) on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 313-317.
- **Al-Qarawi, A. A., Abdel-Rahman, H., Mousa, H. M., Ali, B. H., & El-Mougy, S. A.** (2008). Nephroprotective action of Phoenix dactylifera. in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 46(4), 227-230.
- **Al-Shahib, W., Marshall, R.J.,** (2002). Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm Phoenix dactylifera L. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 719-721.
- **Al-Shahib, W., & Marshall, R. J.,** (2003). The fruit of the date palm: Its possible use as the best food for the future. *Int. Journal. of Food. Sci and Nutrition.* Vol 54, pp 247–259.
- **Ameer, Q & Adeloju, S.B.**(2009). Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B.* 140: 5–11

- **Amiot, Mj., Flueriet, A., Chenynier, V., Nicolas, J.** (1997). Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruits and vegetables*. (Eds: Tomas- Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford*. 51-85.
- **Amorim, H.W. & Melo, M.** (1991). Significance of enzymes in non-alcoholic coffee beverage. Dans: Fox, P.F. (Ed.) *Food enzymology*. Elsevier Science Publishing, New York, pp. 189-209.
- **Anderson, Jv. And Morris, Cf.** (2001). An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. *Crop Science*. 41: 1697-1705.
- **Anosike, Eo. And Ayaebene, Ao.** (1982). Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
- **Aoki, S., Suzuki, S. And Tamura, A.** (1980). Internal browning of stracking delicious apple during low temperature storage. Report of the National Food Research Inst., No. 38, 56-61.
- **Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N.** (2003). Dopamine or L-DOPA-induced neuro toxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176
- **Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E.** (2009). An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.



- **Bach, A., Chodat, R.**, (1904). Studies about the function of peroxides in the Chimes of the living cell. II About peroxide formation in living cells. *Ber.*, 35, 2466-24.
- **Baldwin, Mj., Root, De., Pate, Je., Fujisawa, K., Kitajima, N., Solomon, Ei.** (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.
- **Baliga, M. S., Baliga, B. R. V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P., & Vayalil, P. K.** (2011). A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Research International*, 44(7), 1812-1822.
- **Barrevel, W. H.** (1993). Date palm products FAO Agricultural Services Bulletin, pp. 101, 211 *FAO*, Rome, Italie.
- **Barrow S.** 1998 – A monograph of *Phoenix* L. (Palmae : *Coryphoideae*). *Kew bulletin* 53 : 513-575.
- **Buelguedj A, Nacib N.** (2001). Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu à base de jus de dattes. *rev.enreg.ren.production et valorisation biomasse*. p41-46.
- **Belguedj M.** (2001). Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérien, N° 11, INRAA. El-Harrach , Alger. 289 p.
- **Bertrand G.** (1896). Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelque champignon. *C. R. Acad. Sc.*, 123, 463-465.
- **Bertrand, G.,** (1896). Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxidant, d'origine végétale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 122: 1215–1217.
- **Brac de la Perriere, R.A.,** (1988). Les recherches sur les ressources génétiques du palmier dattier en Algérie. *Annales Institut National Agronomique El-Harrach*. Vol 12, N° 493, pp 106.
- **Ben Abdallah A.** 1990. La phoeniciculture. Les systèmes agricoles oasiens. In : Dollé V., Toutain G. (eds.). *Options Méditerranéennes : Les Systèmes Agricoles Oasiens*, 1988/11/19- 21, Tozeur (Tunisia). Séminaires Méditerranéens Série A. n° 11. CIHEAM, Montpellier. Pp. 105-120.

- **Benchelah, A.-C. Et Maka, M.** (2008). Les Dattes, intérêt et nutrition. *Phytothérapie (ethnobotanique)*, 6: 117 -121.
- **Besbes, S., Drira, L., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H.** (2009). Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): Compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *Food chemistry*, 112(2), 406-411.
- **Buckow, R., Weiss, U., Knorr D.** (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 : 441-448.
- **Burton S G.**(1994). Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, 22,459-487.



- **Chaira, N., Smaali, M. I., Martinez-Tome, M., Mrabet, A., Murcia, M. A., & Ferchichi, A.** (2009). Simple phenolic composition, flavonoid contents and antioxidant capacities in water-methanol extracts of Tunisian common date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 316–329.
- **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.
- **Chao, C. T., & Krueger, R.** (2007). The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses, and cultivation. *HortScience*, 42(5), 1077-1082.
- **Chazarra, S., Garcia-Carmona, F., & Cabanes, J.** (2001). Evidence for a tetrameric form of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase: purification and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4870-4875.
- **Cheng,X.-F., M.,Zhang,M.,Adhikari,B.**(2013).The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, *Ultrasonics Sonochemistry* 20,674–679.
- **Chen, Q.X., Lu, H.Y., Zhu, C.M., Lin, H.N., Zhou, H.M.**(1998). The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.* 45: 465-73.
- **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.
- **Chen X., Hu, Y., Wilson, Gs.** (2002). Glucose microbiosensor based on alumina sol-gel matrix/electropolymerized composite membrane. *Biosens. Bioelectron.* 17:1005-1013.
- **Cheriot S.,** (2007). Role des produits de la reaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phenols et des lipides. l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et d l'Environnement (Agro Paris Tech), Thèse de doctorat, spécialité sciences de l'aliment., 241.
- **Cho, Yk. And Ahn, Hk.** (1999a). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry.* 23: 577-592.
- **Cho, Yk. And Ahn, Hk.** (1999b). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*, 23: 593-605.
- **Claus ,H And Decker, H.** (2006). Bacterial tyrosinases.Systematic and Applied Microbiology, Vol.29, 3-14.
- **Cowan, M.,Horst,E. A.,Luengpailin,S.,Doyle,R,J.,** (2000).Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715.Anti microbial Agents and Chemotherapy 44 (9):2578-2580.

- **Cui, Y., BarforD, J.P.,Renneberg, R.**(2006). A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22 : 1279-1281.

D

- **Decker, H., Terwilliger, N.** (2000). Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- **Decker, H.** (2005). Copper proteins with dinuclear active sites. *In*: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry. John Wiley & Sons*, II: 1159–1173.
- **Della Longa S., Ascone I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Castellano, Ac., Zarivi O., Miranda M.** (1996). The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem*, 271: 21025-21030.
- **De Rigal, D.** (2001). Recherches sur l'inhibition du brunissement enzymatique : utilisation de préparations enzymatiques, substituts aux sulfites. Thèse de doctorat, université d'aix- Marseille III. 208 p.
- **Devece, C., Rodriguez-Lopez, Jn., Fenoll, Lg., Tudela, J., Catala, Jm., De Los Reyes, E., Garcia-Canovas, F.** (1999). Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem*, 47: 4506-4511.
- **Dijkstra, L., Walker, Jrl.** (1991). Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric*. 54: 229-234.
- **Dicko, Mh., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., And Voragen, A.G.J.** (2002). Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 306: 336-339.
- **Djerbi M.,** (1994). Précis de phoeniciculture. Ed. FAO, Rome: 192p
- **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 (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- **Doha, A., & Al-Okbi, S.Y.** (2004). In-vivo evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of different extracts of date fruits in adjuvant arthritis. *Polish J Food Nutrition Science*, 13:397–402.
- **Duran, N., Esposito, E.**(2000).Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ*. 28: 83–99.

E

- **Eicken, C., Krebs, B And Sacchettini, JC.** (1999). Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 677-683.

- **El-Bayoumi, Ma., Frieden, E.** (1957). A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications, 79: 4854-4858.
- **El Bekr A.** 1972. Le palmier dattier : Passé et Présent et Nouveauté dans son agronomie, industrie et commerce Imp. El Ani. Bagdad. Irak 1050 p.
- **El-Gasim, E. A., Alyousef, Y. A., & Humeid, A. M.** (1995). Possible hormonal activity of date pits and flesh fed to meat animals. *Food Chemistry*, 52(2), 149-152.
- **El-Shaarawy, M., Mesallam, M.I., Ei-Nakhal, A.S., & Wahdan, A.N.** (1989). Studies on extraction of dates. Proc. of the 2nd Symp. On Date Palm, K.F. Univ., AI-Hassa, Saudi Arabia, March 3-6 : 259-271.
- **Erat,M.,Nuri,Y.Gülşah,S,A.,Demirkol,A.** (2010). Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum L.*) *European Food Research and Technology*.23,6,899-905.
- **Eskin, N.A.M.** (1990). Biochemistry of food spoilage: Enzymatic browning. Dans Eskin, N.A.M. (Ed.), *Biochemistry of Foods*, Academic Press, New York, pp. 401-432.
- **Espiard E.** (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc. Lavoisier, Paris. pp 147-155.
- **Espin, Jr., Morales, M., Varon, R.** (1995). A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246.
- **Espin, J. C., Wichers, H. J.** (1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem*, 47: 3518-3525.

F

- **Fan, Y., Flurkey, Wh.** (2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- **Flurkey, W. H. And Jen, J. J.** (1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activity in developing peach. *J. Food Sci.* 43, 1826-1828, 1831.

G

- **Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V. C. And Constantinidies, S. M.** (1981). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a Dwarf variety of banana (*Musa caendishii*, L.). *J. Food Sci.* 46, 150-155.
- **Gandia-Herrero, F., Jimenez-Atienzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., Escribano, J.** (2005). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386: 601-607.
- **Garcia-Borron., Jr., Solano., F.** (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.

- **Gasowska, B., Wojtasek, H., Hurek, J., Drag, M., Nowak, K., Kafarski, P.** (2002). Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl) methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 269: 4098-4104.
- **Gaillard, F., Richard-Forget, F., Nicolas, J.** (1993). New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry.* 215: 59-65.
- **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.
- **Golan-Goldhirsh A. Whitaker J.R.; Kahn, V.** (1984). Relation between polyphenol oxidase and prevention of browning. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*; Friedman, M., Ed.; Plenum: New York, 457-495.

H

- **Hagbeen, K., Saboury, Aa., Karbassi, F.** (2004). Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1675: 139-146.
- **Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomasclo, A., (2006).** Fungal tryrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219-232.
- **Hannachi S., Khitri D., Benkhalifa K., Brec De La Perriere R. A.,** (1998). Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Ed. Anep, Rouïba: 12-13.
- **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.
- **Harry, W., Duckworth, J., Joseph, E., Colema.** (1970). Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Biological. Chem.,* 7, 1613-1625
- **Henk J., Zwir E. et Rik, L.** (2003). Caroténoïdes et flavonoïdes contre le stress oxydatif. *Arômes Ingrédients Additifs.* 44: 42-45.
- **Himmelwright, Rs., Eickman, Nc., Solomon, Ei.** (1980). Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102.
- **Hui, Y. H., Legarretta, I. G., Lim, M. H., Murrell, K. D., & Nip, W. K** (2004). Handbook of frozen foods (Vol. 133). CRC Press, New York, 707 p.

I

- **Irwin, Pl., Pfeffer, Pe., Doner, Lw., Sapers, Gm., Brewster, Jd., Nagahashi, G., Hicks, Kb.** (1994). Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr. Res.* 256: 13-27.
- **Ishurd, O., & Kennedy, J. F.** (2005). The anti-cancer activity of polysaccharide prepared from Libyan dates (*Phoenix dactylifera* L.). *Carbohydrate Polymers,* 59(4), 531-535.

J

- **Jassim, S. A. A., & Naji, M. A.** (2008). In vitro evaluation of the antiviral activity of an extract of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pits on a pseudomonas phage. *Evidence based complementary and alternative medicine*, 15, 1–6.
- **Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P. & Brule G.** (2006). Sciences des aliments, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 383 p.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G.** (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459-1483.
- **José L. Navarro, A.T., Miguel A,S, Enrique,S.** (2014) .Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chemistry*, V 157,Pages 283-289.
- **Joslyn, Ma., Ponting, Jd.** (1951). Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3: 1-44.

K

- **Kahn, V.** (1985). Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.* 50: 111-115.
- **Kazandjian Rafi Z. Et Alexander M. Klibanov.** (1985).Regioselective Oxidation of Phenols Catalyzed. by Polyphenol Oxidase in Chloroform. 107, 5448-5450.
- **Keilin, D & Mann, T.**(1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187-204.
- **Keilin, D., Mann T.** (1940). Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. *Nature.* 145: 304.
- **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., Eicken, C., Sacchettini, J.C And Krebs, B.** (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology.* 5: 1084-1090.
- **Kochana,J.,Nowak, P.,Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M.**(2008). Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal.* 89: 171–174.
- **Kubowitz, F.** (1938).Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Häemocyanins. *Biochemisches Zeitung.* 299: 32-57.
- **Kuby, S. A.** (1991). In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), *CRC Press Inc., Boca Raton.* 301–339.

L

- **Lee, P. M., Lee, K. H., Ismail, M., & Karim, A.** (1991). Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55(2), 251-260.
- **Lerch, K.** (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414–6419.
- **Lerch, K.**(1983). *Neurospora sp* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125-138.
- **Linne C. (von)** 1753 – *Species Plantarum*, tome 2. Stockholm, Impensis Laurentii Salvii, 776 p.
- **Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J.**(2010). Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B.* 144 : 18–22.
- **Lopez, A.S., & Dimick, P.S.** (1991). Enzymes involved in cocoa curing. Dans: Fox, P.F. (Ed.), *Food Enzymology*, Elsevier Science Publishing, New York, pp. 211-236.

M

- **Mann, H. S., Alton, J. J., Kim, S., & 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), 152-157.
- **Mansouri A., Guendez E., Kokkalou E. And Kefalas P.** (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of Algerian ripe date palm (*Phoenix dactylifera*). *Food.Chem.* **89**:411-420.
- **Martinez, M. V., Whitaker, J. R.** 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology.* 6: 195–200.
- **Mathew, A. G., & Parpia, H. A. B.** (1971). Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in food research*, 19, 75-145.
- **Mayer, Am.** (1987). Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants–Recent progress. *Phytochemistry.* 26 : 11-20.
- **Mayer, Am., Harel, E.** (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.* 18: 193-215.
- **Mayer, A.M., Harel, E.** (1991). Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science.* 373-398.
- **Mayer, A. M.** (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places ? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331.
- **McCord, JD., Kilara A.** (1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci.* 48: 1479-1483.
- **McEvily, Aj., Iyengar, R., Otwell, Ws.** (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.

- **Mesquita, V., L., V., Queiroz, C.** (2013). Chapter 10 ; Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*, 387-418.
- **Min, K., Yoo, Y.J.** (2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- **Montealeali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R.** (2010). A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- **Munier P.** 1973. Le palmier-dattier. Editions Maisonneuve et Larousse, Coll. Techniques Agricoles et Productions Tropicales. Paris. 221 p.
- **Muriel Gros-Balthazard., Claire Newton., Sarah Ivorra., Margaretatengberg., Jean-Christophe Pintaud Et Jean-Frederic Terral.,** (2013) « Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) », *Revue d'ethnoécologie*. 2-3p.

N

- **Naish-Byfield, S., Riley, Pa.** (1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* 288: 63-67.
- **Nguyen, T. B. T., Ketsa, S., & Van Doorn, W. G.** (2003). Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 30(2), 187-193.
- **Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J., & Aubert, S. Y.** (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(2), 109-157.
- **Njagi J., Chernov, M.M., Leiter L.C., Andreescu, S.** (2010). Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- **Noui Y.** (2001). L'optimisation de la production de la biomasse « *saccharomyces cerevisiae* » cultivé sur un extrait de datte. Mémoire d'ingénieur. Département d'agronomie. Batna. 62p.
- **Noui, Y.** (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister en génie alimentaire, Université de Boumerdès. 33p.

O

- **O'Sullivan, WJ.** (1969). Stability constants of metal complexes. *In Data for biochemical research*. R. M.C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, K. M. Jones. Oxford, England: 423-434.

P

- **Perez-Gilabert M., Morte, A., G-Carmona, F.** (2004). Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*. 166: 365–370.
- **Perry, C. R., Matcham, S. E., Wood, D. A., & Thurston, C. F.** (1993). The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 139(1), 171-178.
- **Peyron G.** (2000). Cultiver le palmier dattier. Guide illustré de formation. Quae, France, 112 p.
- **Pifferri P.G., Baldassari L., Cultrera R.**(1974). Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric.*, 25, 263-270
- **Polaina, J & Maccabe, A P.**(2007).Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p.
- **Popenoe W.** 1938 – Manual of tropical and subtropical fruits. New-York, The Macmillan Company, 544 p.
- **Puri, A., Sahai, R., Singh, K. L., Saxena, R. P., Tandon, J. S., & Saxena, K. C.** (2000). Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in Indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1), 89-92.

Q

- **Quarta, A., Mita, G., Durante, M., Arlorio, M., De Paolis, A.**(2013). Isolation of a polyphenol oxidase (PPO) cDNA from artichoke and expression analysis in wounded artichoke heads. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 68, Pages 52-60.
- **Queiroz, C., Maria, L. M., Fialho, E., Vera, Lúci, A.**(2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375.

R

- **Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M.** (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chemistry*, 94: 253-261.
- **Reinhammar B., Malmström B.G.**, (1981). "Blue" copper-containing oxidases. *in* Copper Proteins. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons., 109-149.

- **Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A And Sanjust, E.** (2002). Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 17: 207-218.
- **Reynes, M., Bouabidi, H., Piombo, G., Risterrucci, A.,** (1994). Characterisation des principales variétés des dattes cultivées dans la région de Tozeur. *Fruits*. N° 49, pp 289-298.
- **Rivas, N. J. And Whitaker, J. R.** (1973) . Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant Physiol*. 52, 501-507.
- **Rivas M., Barbieri, R.L. Da Maia L.C.** 2012, Plant breeding and *in situ* utilization of palm trees. *Ciencia Rural Santa Maria* 42: 261- 269.
- **Robb, D. A.** (1984). Tyrosinase. Dans: Lontie, R. (Ed), *Copper proteins and copper enzymes*. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. II, pp. 207-240.
- **Robert ,C., Rouch ,C., Cadet ,F.**(1997). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 59, 355-60.
- **Rodakiewicz-Nowak, J., Ito, M.** (2003). Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces sp.* REN-21. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 78: 809-816.
- **Rodriguez C,S & Toca Herrera ,J.L.** (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24 (5):500-13.
- **Ros, Jr., Rodriguez-Lopez, Jn., Garcia-Canovas, F.** (1994). Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.



- **Saafi, E. B., Louedi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M. F., Hammami, M., & Achour, L.** (2011). Protective effect of date palm fruit extract (*Phoenix dactylifera* L.) on dimethoate induced-oxidative stress in rat liver. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(5), 433-441.
- **Salah A. Al-Maiman** (2005). Effect of date palm (*Phoenix Dactylifera*) seed fibers on plasma lipids in rats. *J. King Saud Univ.* 2005; 17: 117-123.
- **Sallon S., Solowey E., Cohen Y., Korchinsky R., Egli M., Woodhatch I., Simchoni O., Kislev M.** 2008. Germination, Genetics, and Growth of an Ancient Date Seed. *Science* 320: 1464.
- **Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, Jn., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F.** (1995). Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1247: 1-11.
- **Sato, M.** (1976). Phenolase of spinach roots. *Phytochem.*, Vol 15, 1845-1847.
- **Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N.,** (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- **Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S.**(2004).Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183
- **Shraideh, Z. A., Khaled, H., Abu-Elteen, & Sallal, A. K. J.** (1998). Ultrastructural effects of date extract on *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 142, 119–123.
- **Schwartz B., Olgin A.K., Klinman J.P.**(2001). The role of cooper in topa quinone biogenesis and catalysis, as probed by azide inhibiton of a copper amine oxidase from yeast. *Bio. Chem.*, 40, 2954-2963
- **Sidhu, J.S.** (2006). Date fruits production and processing. Dans: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Blackwell, Oxford, pp. 391–419.
- **Siegbahn, Pem.** (2003). The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* 8: 567-576.

- **Simsek, S., & A. Yemenicioglu.** (2007). Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry*.
- **Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S-K., and Palmer, A.E. (2001).** Oxygen binding, activation and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 4570-4590.
- **Soysal, Ç.** (2008). Kinetics and thermal activation /inactivation of starking apple poly phenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation*. 32: 1034–1046.
- **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.
- **Sugumaran, M.** (1998). Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect Physiol.* 27, 229-334.
- **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.
- **Suriyan ,S , Pattama,P., Racha ,T.(2012).** Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. *Taaptimjaan* using konjac.glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract. *Postharvest Biology and Technology*.v73.p46–49.



- **Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J.**(2010). Amperometric Catechol Biosensor Based On Polyaniline–Polyphenol Oxidase. *Biosensors And Bioelectronics*. 25: 1681–1687.
- **Tate, J. N., Luh, B. S. And York, G. K.** (1964). Polyphenol oxidase in Bartlett pears. *J. Food Sci.* Vol 29: 829-836.
- **Terefe, Ns., Yang, Yh., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C.** (2009). High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11: 52-60.
- **Tirichine H S.,** 2010- Etude ethnobotanique, activité antioxydants et analyse photochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-Est Algérien. Mémoire du diplôme de Magister en biologie. Université d'ORANes Senia.106p.
- **Traverso-Rueda, S. And Singleton, V. L.** (1973). Catecholase activity in grape juice and its implication in wine making.. Vol 24: 103-109.
- **Trebst, A., Depka, B.** (1995). Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research*. 46: 41-44.
- **Tulin, A. (2004).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *heads Food Chemistry* 87:59–67.
- **Turner, Em.** (1974). Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*. 63: 541-547.



- **Ullah, M.R.** (1991). Tea. Dans: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. Elsevier Science Publishing, New York, pp. 163-187.
- **Urszula G., Urszula Z., Michal W.** (2007). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.) *Food Chem.*, 8, 20-704.



- **Vamos-Vigyazo, L., & Haard, N. F.** (1981). Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(1), 49-127.
- **Van Gelder, Cwg., Flurkey, Wh., Wichers, HJ.** (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 45 : 1309-1323.
- **Van Leeuwen J., Wichers Hj.** (1999). Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res.* 103: 413–418.
- **Varoquaux P.** (1978). Contribution à l'étude des propriétés de l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doctorat. Faculté des sciences de la vie et de l'environnement. Dijon. 131 p.
- **Vaughn, Kc., Duke, So.** (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- **Vayalil, P. K.** (2002). Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. Arecaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 610–617.
- **Virador, V.M., Grajeda, J.P.R., Blanco-Labra, L., Mendiola-Olaya, E., Smith, M., G., Moreno, A., Whitaker, J.R.** (2010). Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.*, 58, 1189–1201.



- **Walker, J. R., & Ferrar, P. H.** (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 15(1), 457-498.
- **Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V And Hendrickx M.E.** (1998a). Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 60: 292-300
- **Weemaes, CA., Ludikhuyze, LR., Den Broeck, IV., Hendrickx, ME., Tobback, PP.** (1998b). Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm.-wiss. U.-Technol.* 31: 44-49.
- **Whitaker, J.R.** (1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences* (2ème Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 271-556.
- **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.

- **Whitaker, J.R.** (1996). Polyphenol oxidase. Dans: Fennema,, O.R. (ed.) *Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York, pp. 492 – 494.
- **Wissemann, 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.



- **Xu, Y. M., A. H. Stokes, R. Roskoski, And K. E. Vrana.** (1998). Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience Research* 54 (5):691-697.



- **Yahia, E. M., & Kader, A.A.** (2011). Date (*Phoenix dactylifera* L.). Dans: Yahia E. M (Ed), *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, pp. 41–79.
- **Yahia, E.M.** (2005). Postharvest technology of food crops in the Near East and North Africa (NENA) region, Dans: Dris, R. (Ed.), *Crops: Quality, Growth and Biotechnology*, WFL Publisher, Helsinki , Finland , pp. 643 – 663.
- **Yamada, K., Akiba,Y.,Shibuya,K., KashiwadA, A., Matsuda, K., and hirata, M.**(2005).Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829.
- **Yemenicioglu, A., Zkan, M., Cemeroglu, B.** (1997). Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510.
- **Yemenicioglu, A.** (2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- **Yemenicioglu, A., Cemeroglu, B.** (2003). Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.
- **Yoruk, R., & Marshall, M. R.** (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review1. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.

Z

- **Zaid, A., & Arias-Jimenez, E.J.** (2002) Date palm cultivation. FAO plant production and protection paper. 156, Rev. 1. FAO. Rome.
- **Zhang, X., Flurkey, Wh.** (1997). Phenoloxidases in Portabella Mushrooms. *Journal Of Food Science*. 62: 97-100.
- **Ziyan, E And Pekyardimci, S.**(2004).Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.*28:547-557.