

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 de *Phoenix dactylifera L cv*
deglet-nour par quelques acides organiques**

Présenté par :

-Mlle Aouissi Dhaouia
-Mlle Guessar Fatma

Devant le jury :

Président(e) : Mr Chetatha Mohammed (MAB).

Rapporteur : Mr Benaceur Farouk (MAB).

Examineur: Mr Leboukh Mourad (MAB).

Soutenu publiquement le :13 Mai 2017 .

Dédicace

Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à mon très chère père

Abdelkader

Qui m'a toujours soutenu, et qu'a été Toujours présent pour Moi

A la plus chère au monde, Ma mère qui a Toujours m'encouragé durant Mes études

mebarka

A mes sœurs : Fatima. Khadidja. hiba

A mon frère :

Hadj aïssa

A la petite de la maison MALAK

pour les âmes de ma soeur et mes freres

alhachmeia ; mohamed tahar ; atallah et mon grand père ; Ma cousine « Dieu ait pitié d'eux »

A tout ma famille ,et A toutes mes amies et

A toute personne qui me connaît



Dhaouia

Dédicaces

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

A ma très chère maman Mebaraka, A mon très cher papa Abed

El Hadi, A Mes frères : Mahi, Mohamed ,

Mostafa, Kouider, Ahlam, Saadia, Rahma

A Ahmed , Khoulod, Karima, bouchra

A toute la famille Guessar, A tous mes amis et mes collègues,

surtout : Amel , Nejet, Nour , Mary

A Fadhila , Fatiha, Bassma,

Fatima, Dawya, Aicha , chaima

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à la

réalisation de ce travail



Fatma

Remerciements

Tout d'abord, louange à Dieu qui nous a donné la santé, la force et le courage dans la vie et tout au long de notre cycle d'étude.

*Nous remercierons tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, et en particulier notre encadreur **M. FAROUK BENACEUR** (Enseignant-Chercheur à l'Université Amar Telidji de Laghouat), pour ses efforts scientifiques, sa disponibilité, et ses conseils durant la réalisation de ce projet de recherche.*

Nous tenons également à exprimer nos remerciements à tous les membres du jury, désignés parmi les enseignants du département de Biologie, université de Laghouat, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

En fin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

AOUISSI ET GUESSAR

Liste d'abréviation

4-MC : 4 Méthylcatéchol

A₀ : activité diphénolase en absence d'inhibiteur

A_t : activité diphénolase en présence d'inhibiteur

Abs : Absorbance optique à une longueur d'onde $\lambda=410$ nm

C : carbone

Ca: calcium

Cl⁻ : anion de chlore

Co²⁺ : Cobalt ion

Cu⁺ : ions cuivreux

Cu²⁺ : ion cuivrique

Cys : Cystéine

D-glucopyranoside : énantiomères dextrogyre du glucopyranoside

DEAE : diéthylaminoéthyle

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOPA : 3,4-dihydroxy phénylalanine

EC : Enzyme Commission number

EDTA : L'éthylène diamine tétra-acétique acide

EI : Enzyme-Inhibiteur

ESI : Enzyme-Substrat-Inhibiteur

FAO: The Food and Agriculture Organization

Fe: fer

H⁺ : Ion hydrogène

His :histidine

[I] : concentration d'inhibiteur (milli mole)

IC₅₀ :Concentration d'inhibiteur pour une diminution de l'activité enzymatique de 50%

K_i : Constante de dissociation du complexe EI (mM)

K_m : Constante de Michaelis-Menten

L-tyrosine : énantiomères lévogyre de la tyrosine

Mg: magnésium

mM : milli mole

Ni²⁺ : Nickel

(NH₄)₂SO₄ : sulfate d'ammonium

NH₂OH :hydroxylamine

O₂ :Oxygène

O-diphénoloxydase :orthodiphénoloxydase

OH :hydroxide

P: potassium

p-diphénol oxydase : Para diphénol oxydase

PEG : polyéthylène glycol

pH : potentiel hydrogène

PPO : polyphénol oxydase

PVPP : polyvinylpolypyrrolidone

R² : Coefficient de régression linéaire

V₀ : Vitesse initiale.

V_{max}: La vitesse maximale

Liste des Figures

		Pages
Figure 1	Datte et noyau du palmier dattier	05
Figure 2	Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases	13
Figure 3	Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan	16
Figure 4	Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet clair)	16
Figure 5	L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limuluspolyphemus</i> . Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge.	16
Figure 6	Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO	19
Figure 7	Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la PPO	21
Figure 8	<i>Phoenixdactylifera L cv</i> , la variété de Deglet-Nour	27
Figure 9	Un tube Eppendrof de 2mL Contenant l'extrait enzymatique brut d'une couleur jaune	28
Figure 10	Le protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (<i>Phoenixdactylifera L</i>)	29
Figure 11	Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du 4-MC par la PPO de datte Degletnour (<i>Phoenixdactylifera L.</i>)	30
Figure 12	L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de 4-MC par la PPO de dattes (<i>Phoenixdactylifera L cv</i> DegletNour)	32
Figure 13	L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de 4-MC par la PPO de dattes (<i>Phoenixdactylifera L cv</i> DegletNour)	33
Figure 14	L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de 4-	33

MC par la PPO de dattes (*Phoenixdactylifera L cv DegletNour*)

Figure 15	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité 4-méthylcatéchol oxydase des dattes (<i>Phoenixdactylifera L cv Degletnour</i>) par l'acide ascorbique	38
Figure 16	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité 4-méthylcatéchol oxydase des dattes (<i>Phoenixdactylifera L cv Degletnour</i>) par l'acide benzoïque	38
Figure 17	Représentation de l'inhibition compétitive	39
Figure 18	Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive	39
Figure 19	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenixdactylifera L cv Degletnour</i>) par l'acide citrique	41
Figure 20	Représentation de l'inhibition non compétitive	42
Figure 21	Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive	42

Liste des tableaux

	Pages
Tableau 1	La classification botanique du palmier dattier donnée par (Djebri., 1994)). 4
Tableau 2	Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily et al., 1992). 24
Tableau 3	Les valeurs d'IC50 de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats. 34
Tableau 4	Les valeurs d'IC50 de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différents substrats par l'acide ascorbique 34
Tableau 5	Les valeurs d'IC50 de l'acide benzoïque comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats. 35
Tableau 6	Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L cv deglet Nour</i>) en utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat 36
Tableau 7	Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L cv deglet Nour</i>) en utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat 36
Tableau 8	Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L cv deglet Nour</i>) en utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat 37

ملخص

هذا العمل هدفه دراسة آلية تثبيط انزيم البوليفينول أوكسيداز PPO لدقلة نور (*Phoenix dactylifera* L) بواسطة حمض الستريك وحمض الاسكوربيك وحمض البنزويك. تم قياس نشاط انزيم PPO بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي على طول موجة 410 نانومتر و عند درجة الحموضة 4,5 و 30 درجة مئوية في وجود 4-ميثيل كاتكول كركيزه ، درجة تثبيط PPO يعتمد على تركيز مثبط المستخدم ، فتنبعا لقيم $IC_{50} = 25,82 \text{ mM} \pm 1,89$ في وجود حمض الستريك و $IC_{50} = 0,152 \text{ mM} \pm 0,08$ في وجود حمض الاسكوربيك و $IC_{50} = 1,57 \text{ mM} \pm 0,08$ في وجود حمض البنزويك) وجدنا أن حمض الاسكوربيك هو أكثر قوة 170 و 16 مرة من حمض الستريك وحمض البنزويك، على التوالي، يظهر تمثيل Lineweaver-Burk أن حمض الاسكوربيك وحمض البنزويك مثبطات تنافسية أما حمض الليمون فهو مثبط غير تنافسي من النشاط PPO مع قيمة KIS يعادل $36,63 \text{ mM} \pm 0,95$ و $0,039 \text{ mM} \pm 0,005$ و $0,714 \text{ mM} \pm 0,08$ على التوالي.

كلمات البحث: التمر، PPO، حمض البنزويك وحمض الستريك وحمض الاسكوربيك، التثبيط، التشوه الأنزيمي.

RÉSUMÉ

Ce présent travail à pour objectif d'étudier l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) des dattes (*Phoenix dactylifera* L cv *Deglet Nour*) 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 4,5 et à 30°C, en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'inhibiteur utilisé. D'après les valeurs d' IC_{50} , ($IC_{50} = 25,82 \text{ mM} \pm 1,89$ en présence d'acide citrique ; $IC_{50} = 0,152 \text{ mM} \pm 0,08$ en présence d'acide ascorbique ; $IC_{50} = 1,57 \text{ mM} \pm 0,08$ en présence d'acide benzoïque) nous avons estimé que de l'acide ascorbique est 170 et 16 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 compétitif tandis l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{IS} égale à $36,63 \text{ mM} \pm 0,95$, $0,039 \text{ mM} \pm 0,005$ et $0,714 \text{ mM} \pm 0,08$, respectivement.

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

ABSTRACT

This work aims to study the inhibition of the polyphenol oxidase (PPO) of dates (*Phoenix dactylifera* L cv *Deglet- Nour*) by citric acid, ascorbic acid and benzoic acid. The activity of the PPO was measured by spectrophotometry at 410 nm, at pH 4.5 and at 30 ° C., in the presence of 4-methyl catechol as substrate.

The degree of inhibition of PPO depends on the concentration of the inhibitor used. Based on IC_{50} values ($IC_{50} = 25.82 \text{ mM} \pm 1.89$ in the presence of citric acid, $IC_{50} = 0.152 \text{ mM} \pm 0.08$ in the presence of ascorbic acid, $IC_{50} = 1.57 \text{ mM} \pm 0.08$ In the presence of benzoic acid) we have estimated that ascorbic acid is 170 and 16 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 $36.63 \text{ mM} \pm 0.95$, $0.039 \text{ mM} \pm 0.005$ and $0.714 \text{ mM} \pm 0.08$, respectively.

Key words: dates, PPO, benzoic acid, citric acid, ascorbic acid, Inhibition, Enzymatic browning.

ملخص

هذا العمل هدفه دراسة آلية تثبيط انزيم البوليفينول أوكسيداز PPO لدقلة نور (*Phoenix dactylifera* L) بواسطة حمض الستريك وحمض الاسكوربيك وحمض البنزويك. تم قياس نشاط انزيم PPO بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي على طول موجة 410 نانومتر و عند درجة الحموضة 4,5 و 30 درجة مئوية في وجود 4-ميثيل كاتكول كركيزه ، درجة تثبيط PPO يعتمد على تركيز مثبط المستخدم ، فتنبعا لقيم $IC_{50} = 25,82 \text{ mM} \pm 1,89$ في وجود حمض الستريك و $IC_{50} = 0,152 \text{ mM} \pm 0,08$ في وجود حمض الاسكوربيك و $IC_{50} = 1,57 \text{ mM} \pm 0,08$ في وجود حمض البنزويك) وجدنا أن حمض الاسكوربيك هو أكثر قوة 170 و 16 مرة من حمض الستريك وحمض البنزويك، على التوالي، يظهر تمثيل Lineweaver-Burk أن حمض الاسكوربيك وحمض البنزويك مثبطات تنافسية أما حمض الليمون فهو مثبط غير تنافسي من النشاط PPO مع قيمة KIS يعادل $36,63 \text{ mM} \pm 0,95$ و $0,039 \text{ mM} \pm 0,005$ و $0,714 \text{ mM} \pm 0,08$ على التوالي.

كلمات البحث: التمر، PPO، حمض البنزويك وحمض الستريك وحمض الاسكوربيك، التثبيط، التشوه الأنزيمي.

RÉSUMÉ

Ce présent travail à pour objectif d'étudier l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) des dattes (*Phoenix dactylifera* L cv *Deglet Nour*) 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 4,5 et à 30°C, en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'inhibiteur utilisé. D'après les valeurs d' IC_{50} , ($IC_{50} = 25,82 \text{ mM} \pm 1,89$ en présence d'acide citrique ; $IC_{50} = 0,152 \text{ mM} \pm 0,08$ en présence d'acide ascorbique ; $IC_{50} = 1,57 \text{ mM} \pm 0,08$ en présence d'acide benzoïque) nous avons estimé que de l'acide ascorbique est 170 et 16 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 compétitif tandis l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{IS} égale à $36,63 \text{ mM} \pm 0,95$, $0,039 \text{ mM} \pm 0,005$ et $0,714 \text{ mM} \pm 0,08$, respectivement.

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

ABSTRACT

This work aims to study the inhibition of the polyphenol oxidase (PPO) of dates (*Phoenix dactylifera* L cv *Deglet- Nour*) by citric acid, ascorbic acid and benzoic acid. The activity of the PPO was measured by spectrophotometry at 410 nm, at pH 4.5 and at 30 ° C., in the presence of 4-methyl catechol as substrate.

The degree of inhibition of PPO depends on the concentration of the inhibitor used. Based on IC_{50} values ($IC_{50} = 25.82 \text{ mM} \pm 1.89$ in the presence of citric acid, $IC_{50} = 0.152 \text{ mM} \pm 0.08$ in the presence of ascorbic acid, $IC_{50} = 1.57 \text{ mM} \pm 0.08$ In the presence of benzoic acid) we have estimated that ascorbic acid is 170 and 16 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 $36.63 \text{ mM} \pm 0.95$, $0.039 \text{ mM} \pm 0.005$ and $0.714 \text{ mM} \pm 0.08$, respectively.

Key words: dates, PPO, benzoic acid, citric acid, ascorbic acid, Inhibition, Enzymatic browning.

Synthèse bibliographique

Chapitre I.
Généralités sur le
palmier dattier

I.1- Notions générales sur le palmier dattier

Le nom grec de genre *Phoenix*, repris en latin, peut avoir comme origine la Phénicie, Pays exportateur de dattes, mais aussi l'oiseau fabuleux qui renaît de ses cendres tandis que *Dactyl* en grec signifie doigt et datte, d'autre part le philosophe grec Aristote décrivait ce fruit comme un « doigt de lumière ». (Djerbi., 1994).

C'est une composante essentielle de l'écosystème oasien grâce à sa remarquable adaptation aux conditions climatiques, sa haute valeur nutritive de ses fruits, ses multiples utilisations de ses produits ainsi que sa morphologie favorisant d'autres cultures sous-jacentes (El homaizi et al., 2002 ; Bakkaye., 2006).

Comme toutes les espèces du genre *Phoenix*, il existe des arbres mâles appelés communément dokkars ou pollinisateurs et des arbres femelles Nakhla. En général, les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (Ghazi et Sahraoui., 2005).

I.2- Nom vernaculaire et synonyme

Palmier dattier (Français), Nakhla (Arabe), Tamar (Hébreu), Palma datilera (Espagnol), Palma daterro (Italien), Manah (Persan), Tazdait, Tanekht, Tainiout (en Berbère suivant les régions) (Tirichine., 2010).

I.3-Position systématique

La plante *Phoenix dactylifera L.* est une espèce dioïque, fait partie de la classe des Monocotylédones, d'une famille de plantes tropicales (Palmoe ou Palmacées), la mieux connue sur le plan systématique. Elle est représentée par 200 genres et 2700 espèces réparties en six sous familles. La sous famille des Coryphoidées est elle-même subdivisée en trois tribus (Riedacker et al., 1990).

I.4- Classification botanique

La classification botanique du palmier dattier donnée par (Djerbi., 1994) est la suivante :

Tableau 1 La classification botanique du palmier dattier donnée par (Djerbi., 1994)

Embranchement	Angiospermes.
Classe	Monocotylédones.
Groupe	Spadiciflores
Ordre	Palmale
Famille	Palmacées
Sous famille	Coryphoidées
Tribu	Phoenicées ou Phoenixées.
Genre	<i>Phoenix</i>
Espèce	<i>Phoenixdactylifera.L</i>

I.5-La répartition géographique

Le palmier dattier fait l'objet d'une plantation intensive en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient. L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche (Toutain., 1996).

Aux Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier fût introduit au XVIII^{ème} siècle. Sa culture n'a débuté réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés irakiennes (Bouguedoura., 1991 ; Matallah., 2004). Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (Matallah., 2004).

D'autre part les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis. Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement pour une superficie de 120830 hectares, cependant 4 wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar 22%, El-oued 21% et Ouargla 15% (Anonyme., 2002).

I.6-Les dattes

I.6.1-Définition

La datte est une baie ayant une seule graine communément appelée noyau. Elle comporte :

- Un épicarpe : une enveloppe fine cellulosique fine dénommée peau.
- Un mésocarpe : plus ou moins charnu et de consistance variable, présentant une zone périphérique de couleur plus soutenue et de texture selon sa teneur en sucre.
- Un endocarpe : zone interne de teinte plus claire et de texture fibreuse.

Le péricarpe, le mésocarpe et l'endocarpe sont confondus par les conditionneurs sous l'appellation de chair ou pulpe (Munier., 1973).

Les dattes sont en général de forme allongée, oblongue ou ovoïde, mais il en existe cependant quelques-unes pratiquement sphériques, la Tinte-boucht d'Algérie notamment.

Les dimensions de la datte sont très variables, de 1.5 à 7 ou 8cm de longueur et d'un poids varie de 2 à 7 ou 8g (Djerbi., 1994).

Leur couleur va du blanc-jaunâtre au sombre très foncé presque noir, en passant par les ambres, rouges et bruns plus ou moins foncés. Leur consistance peut être dure, molle ou très molle, d'où leur répartition (Munier.,1973).

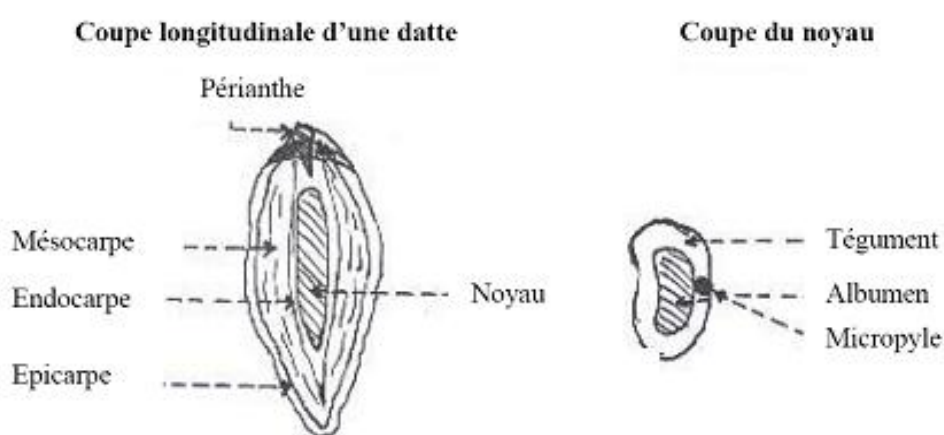


Figure 1 Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj., 2001)

I.6. 2-Classifications des dattes

Du point de vue biochimique pour Munie (1973), les dattes sont classées en trois catégories, d'après leur consistance et la teneur en eau : molles, demi-molles et sèches.

- Les dattes molles : taux d'humidité supérieur ou égal à 30%, elles sont à base de sucres invertis (fructose, glucose) tel que Ghars, Hamraia, Litima.....etc.
 - Les dattes demi-molles : de 20 à 30% d'humidité, elles occupent une position intermédiaire à l'exception de la Deglet-Nour, datte à base de saccharose par excellence (Cook et Furr., 1952).
 - Les dattes sèches : dures, avec moins de 20% d'humidité, riche en saccharose. Elles ont une texture farineuse tel que: Meche -Degla, Degla Beida.....etc ; sont
- Catégories de dattes selon leur consistance et teneur en eau (Noui., 2007).

En 1973 (Munier) définit un indice «r» de qualité ou de dureté comme étant le rapport entre la teneur en sucre sur la teneur en eau des dattes.

$$r = \frac{\text{Teneur en sucre}}{\text{Teneur en eau}}$$

Le calcul de cet indice permet d'estimer le degré de stabilité du fruit est conduit à classification suivante :

- dattes molles : $r < 2$
- dattes demi - molles : $2 < r < 3,5$ appréciable. (Noui., 2007).
- dattes sèches : $r > 3,5$

Pour $r = 2$ la stabilité du fruit est optimale et son aptitude à la conservation est très

I.6.3 -Formation et maturation de la datte

On distingue cinq stades qui sont:

1- Loulou (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 . Il dure 4 à 5 semaines après fécondation (Djerbi., 1994).

2- Kimri, (Khalal ou 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 (Djerbi., 1994).

3- Bser (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. Il dure en moyenne (Djerbi., 1994).

4-Routab (Martouba)

La couleur jaune ou rouge du stade khalal passe au foncé ou au noir. Ce stade se caractérise par la perte de la turgescence du fruit suite à la diminution de la teneur en eau, l'insolubilisation des tanins qui se fixent sur l'épicarpe du fruit et l'augmentation de la teneur des monosaccharides qui donne un goût sucré au fruit. Ce stade dure de deux à quatre semaines (Djerbi., 1994).

5- Tamar (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) et le fruit perd beaucoup d'eau, ce qui donne un rapport sucre/eau élevé (Djerbi., 1994).

I.6.4-Les variétés des dattes :

Elles sont très nombreuses et se différencient par leurs saveurs, consistances, formes, couleurs, poids et dimensions (Buelguedj., 2002).

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes et les principales variétés cultivées sont :

- **Deglet-Nour**

Variété commerciale par excellence. C'est une datte demi-molle, considérée comme étant la meilleure variété de datte du fait de son aspect, son onctuosité et sa saveur.

A maturité la datte est d'une couleur brune ambrée avec un épicarpe lisse légèrement plissé et brillant, le mésocarpe présentant une texture fine légèrement fibreuse (Hanachi et al., 1998).

- **Variétés communes**

Ces variétés sont de moindre importance économique par rapport à Deglet-Nour. Les plus répandues sont : Ghars, Degla-Beïda et Mech-Degla (Hanachi et al., 1998)

I.6.5-Composition biochimique des dattes

1- Sucrestotaux et réducteurs

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement la présence de trois types de sucres : le saccharose, le glucose et le fructose (Estanove., 1990 ; Acoureneetal., 1997). Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion, tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol (Favier et al., 1993; Siboukeur., 1997); Mais ils sont en quantités négligeables, environ 1,6 % de la pulpe fraîche (Belguedj., 2002), le glucose et le fructose sont des sucres réducteurs (sucres invertis) qui proviennent de l'hydrolyse du saccharose (Dawson et al., 1963).

La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 60 et 80 % du poids de la pulpe fraîche. Le glucose et fructose résultant de l'inversion du saccharose (Siboukeur., 1997).

2- Protéines

Les dattes sont caractérisées par une faible teneur en protéines. Elle varie entre 0,38 et 2,5% du poids sec (Razi., 1993). Malgré cette faible teneur, les protéines de la datte sont équilibrées qualitativement (Yahiaoui., 1998).

La composition en acides aminés des protéines de la pulpe de datte révèle la présence de 6 à 8 acides aminés indispensables pour l'homme (Makhloufi., 2010).

Selon **Al-shahib et Marshall (2003)**, les protéines de la datte contiennent 23 acides aminés dont certains ne sont pas présents dans certains fruits comme la banane, la pomme et l'orange.

3- Lipides

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais, qui se concentre dans l'épicarpe, cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation (**Noui., 2007**).

4-cellulose

Les dattes fines, comme Déglet-Nour, ne contiennent qu'une faible proportion de cette substance, mais certaines dattes communes particulièrement fibreuses en contiennent plus de 10% (**Munier., 1973**).

7- Vitamines

En général, la datte ne constitue pas une source importante de vitamines. Les plus dominantes sont la vitamine A, B1 et B2 qui sont en proportions appréciables. Les vitamines C et D sont quasiment inexistantes (**AL-shahib et al., 2003; Bousdira., 2007**).

8-Les fibres

La datte est riche en fibres (6,4 à 11,5%) du poids sec (**Al-shahib et al., 2003**). Les constituants pariétaux de la datte sont : la pectine, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ce sont des agents qui interviennent dans la modification de la fermeté de la datte (**Benchabane., 1995**).

9-Eléments minéraux

La datte est l'une des fruits les plus riches en éléments minéraux, essentiellement le potassium, le magnésium, le phosphore et le calcium(**Acourene et al., 2001**).

10- Composés phénoliques

Mansouri et ses collaborateurs (2005) ont mené une étude sur des variétés de dattes mûres récoltés sur des palmeraies de Ghardaia. Les différentes variétés analysées ont présenté un contenu phénolique dans la gamme 2,49 - 8,36 mg/100 g du poids à l'état frais.

I.6.6-Les enzymes des dattes et brunissement enzymatique

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 polyphenol oxydase :**

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

I.6.7-Valeur nutritionnelle et utilisation de la datte

La datte constitue un excellent aliment, de grande valeur nutritive et énergétique décrite selon **Toutain(1996) et Gilles (2000)** de par leur forte teneur en sucres qui leur confèrent une grande valeur énergétique.

Ils ont aussi une teneur intéressante en sucres réducteurs facilement assimilables par l'organisme et des protéines équilibrées qualitativement. De plus, les dattes sont riches en minéraux plastiques tels que le Ca, le Mg, le P, le S et en minéraux catalytiques comme le Fe et le Mn. Elles sont reminéralisantes et renforcent notablement le système immunitaire (**Albert., 1998**).

Le profil vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs appréciables en vitamines du groupe B. Ce complexe vitaminique participe au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (**Tortora et al., 1987**).

Autres utilisations des dattes dans les confiseries : la production de pâte de dattes, la farine de dattes (cette farine est utilisée en biscuiterie, pâtisserie, aliments pour enfants (**Aït-Ameur., 2001**) et yaourt (**Benamara et al., 2004**), les Sirops, les crèmes et les confitures de dattes. Également il y a l'usage médicinal des dattes : riches en fibres, les dattes facilitent le transit intestinal et exercent un rôle préventif des cancers colorectaux, des appendicites, de la diverticulose, des varices et des hémorroïdes. Ils ont également un effet hypocholestérolémiant (**Albert., 1998**).

Chapitre II.

*La polyphénol oxydase et
contrôle du brunissement*

II.1- La polyphénol oxydase

II.1.1- Historique sur la polyphénol oxydase

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en **1856** par **Schoenbein** dans le champignon *Boletus luciferus*. Et fut mise en évidence par **Bertrand (1896)** dans la betterave ; le dahlia et certains champignons, la première étude de cette enzyme a suivi la production à grande échelle du polyphénol oxydase de pomme de terre par **Kubowitz (1938)**. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (**Lerch., 1981**), 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 porté 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.1.2- Définition

La polyphénol oxydase (PPO) appartient au groupe des oxydoréductases, 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 (**Mesquita & Queiroz., 2013**). Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La polyphénol oxydase est peut-être la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail (**Dawson et Magee., 1955 ; Rescigno et al., 2002**). La PPO est une métalloprotéine contenant du cuivre. En présence d'oxygène moléculaire, la PPO est capable de catalyser l'oxydation des composés phénoliques en quinones, qui se polymérisent pour former la mélanine, source de la pigmentation de la peau et le brunissement des fruits et légumes (**Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker., 1995 ; Fenoll et al., 2004**)

II.1.3- Nomenclature et classification

II.1.3.1- Nomenclature

Plusieurs noms ont été associés à la PPO dont la tyrosinase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est la polyphénol oxydase qui reflète généralement

la capacité de cette enzyme a utilisé différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas.

Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (**Zawistowski et al., 1991 ; Burton., 1994**).

II.1.3.2-Classification

L'union internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats. L'*o*-diphénol oxydase qui appartient au groupe des oxydo-réductases a été définie par **Dixon et Webb (1964)** comme l'*o*-diphénol : oxygène, oxydoréductase (E.C.1.10.3.1.), le nom tyrosinase, très souvent donné à l'enzyme, était, par conséquent, en contradiction avec la nomenclature officielle. C'est pourquoi en (**1972**), cette nomenclature a été modifiée et le complexe nommé monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène, oxydo-réductase (E.C.1.14.18.1.) (**Martinez et Whitaker., 1995**).

La PPO catalyse l'*o*-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones (l'activité diphénolase) avec l'oxygène comme oxydant primaire (**Mayer., 2006**).

L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1), également appelée hydroxylase ou crésolase, est toujours couplée à l'activité diphénolase (EC 1.10.3.1), catécholase ou oxydase. Toutefois, l'activité diphénolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (**Mayer., 2006**).

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

II.1.4-Caractéristiques réactionnelles

La PPO accomplit l'*o*-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones (l'activité diphénolase) avec l'oxygène comme oxydant primaire (**Zawistowski et al., 1991**).

L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1), également appelée hydroxylase ou crésolase, est toujours couplée à l'activité diphénolase (EC 1.10.3.1), catécholase ou oxydase. Toutefois, l'activité diphénolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (**Whitaker., 1994**).

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

II.1.4.1-Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)

Les monophénol oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (**Figure 2**). Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénol oxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. (**Mayer et al., 2006**)

II.1.4.2 Activité catéchol oxydase (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 catéchol oxydase. 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 (**Lerner., 1953**).

II.1.4.3 La laccase (EC 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité *p*-diphénol oxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase (**Figure 2**). L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (**Giardina et al., 2010**).

Ces enzymes ont été trouvés dans différentes espèces de plantes, d'insectes et les bactéries (**Loera et al., 2006**)

Cependant, la majorité des laccases décrites dans la littérature ont été isolés à partir des champignons supérieurs, Les laccases fongiques les plus connus sont des enzymes extracellulaires, chez les végétaux supérieures, elles assurent trois rôles important incluant la formation de pigment, la dégradation de la lignine et de désintoxication (**Loera et al., 2006**).

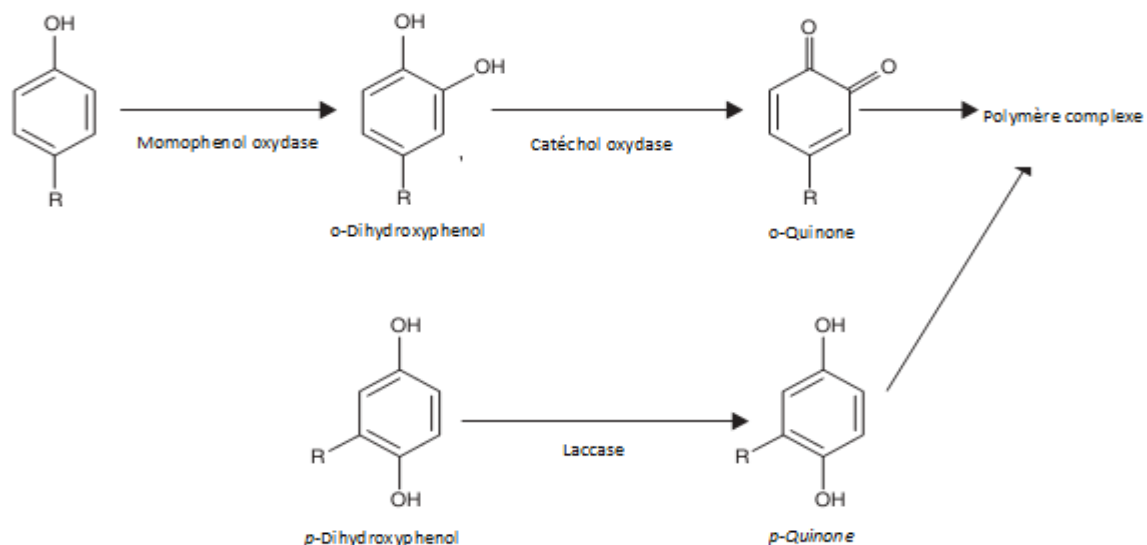


Figure 2 Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases. (Yoruk *et al.*, 2003)

II.1.5- Caractéristiques structurales

II.1.5.1 la structure

La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique (Mayer et Harel., 1991 ; Turner., 1974). La structure cristallographique de la PPO n'a pas été élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker., 2006 ; Siegbahn., 2003). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène ; Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright *et al.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder *et al.*, 1997).

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 par l'existence des formes polymériques de l'enzyme, pouvant aller du monomère, comme ceci est le cas pour la PPO des graines de tournesol (Raymond *et al.*, 1993), à la forme tétramérique comme ceci est le cas pour la tyrosinase de champignon (Strothkamp *et al.*, 1976). Les auteurs s'accordent pour donner une masse moléculaire apparente voisine de 40 à 45 kDa pour les formes monomériques (Rigal., 2001).

Selon **Klabunde et al (1998)** 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**).

La PPO native du champignon de souche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H₂L₂ ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H₂L₂. Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L₂H. Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la PPO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (**Strothkamp et al., 1976 ; Robb., 1984 ; Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker ., 1995 ; Solomon et al., 1996 ; Van Gelder et al., 1997 ; Jolivet et al., 1998 ; Fan et Flurkey., 2004**).

Selon **Wichers et al (1996)**, les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune activité enzymatique. Les PPOs des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité, et sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la PPO d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques, peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (**Robb., 1984 ; Jolivet et al., 1998**).

Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (**Mayer et Harel., 1979 ; Anosike et Ayae bene., 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.1.5.2 Le site actif

Garcia-Borron & 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**).

Ce type de site actif à cuivre est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et est trouvé 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 (α_2 , α_3 , α_6 et α_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, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice α_2 (**Figure 3**). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α . Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est située au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (**Klabunde et al., 1998**). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (**Figures 4 ,5**) (**Van Gelder et al., 1997**).

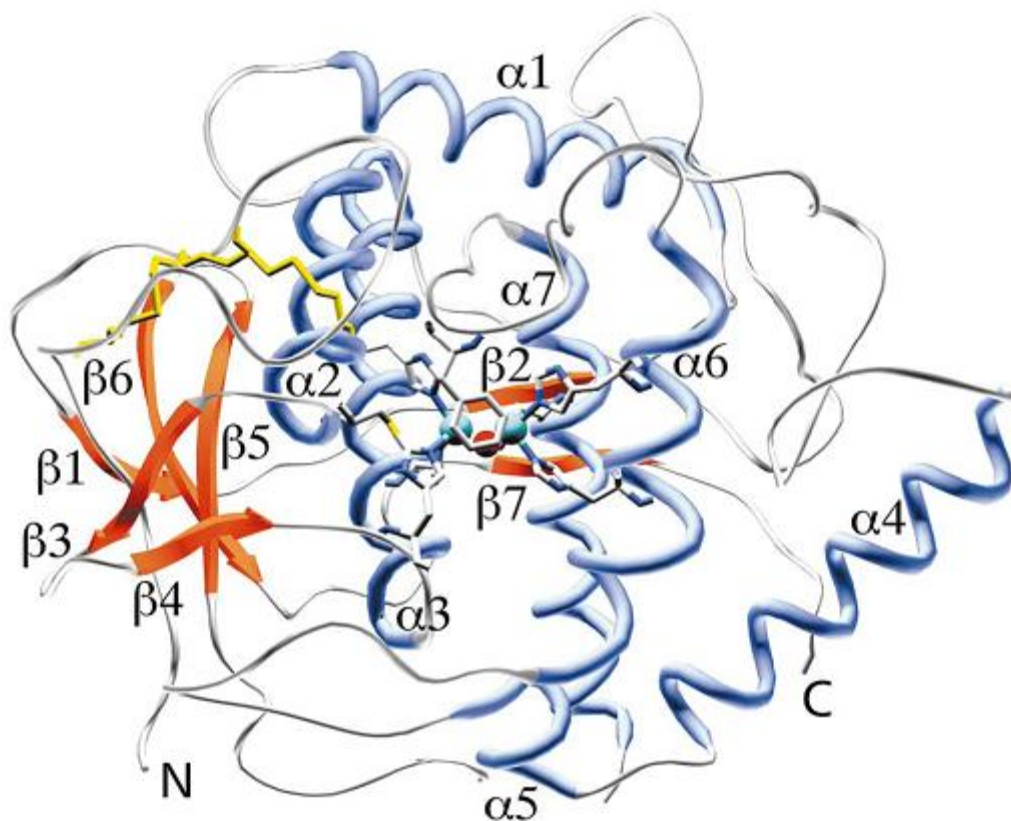


Figure 3 Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone, gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken *et al.*, 1999).

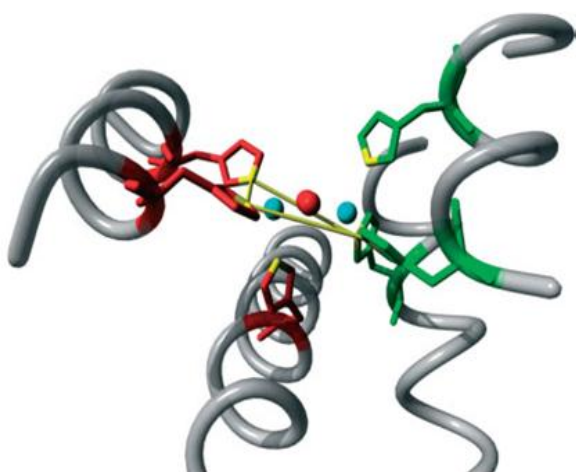


Figure 4 L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker., 2005).

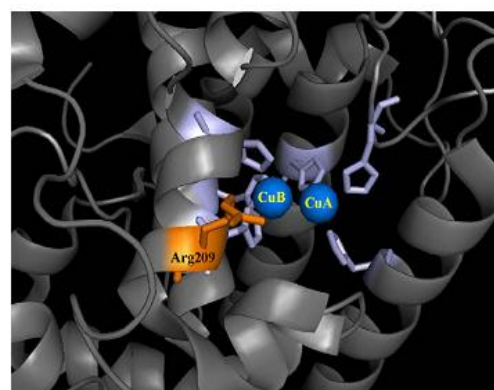


Figure 5 Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet clair) (Ben-Yosef *et al.*, 2010).

II.1.6 Source et localisation des PPO

Les PPO ont été trouvées dans la plupart des tissus végétaux (Vamos-Vigyazo., 1981 ; Zawistowski et al., 1991; Sherman et al., 1991., 1995; Fraignier et al., 1995 ;Haruta et al., 1999). Elles ont été trouvées dans les procaryotes, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes mais les PPO ont été découvertes initialement dans les champignons (Burton., 1994 ; Whitaker., 1995 ; Chen et Flurkey., 2002 ; Claus et Decker., 2006).

La localisation subcellulaire de la PPO n'est pas clairement comprise mais de nombreux chercheurs notent la présence de forme soluble de 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). la localisation de la PPO dans les cellules végétales dépend de l'espèce, l'âge et la maturité des fruits et légumes (Marques et al., 1995).

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 (1956) a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. Van Gelder et al., 1997 ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol.

II.1.7 Rôle biologiques de PPO

La localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara & Katoh., 1999). Il a été montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*). (Lax & Vaughn., 1991)

La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Fenoll et al., 2004). Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker., 1995).

La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel., 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles construisant une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, (Zawistowski et al., 1991). Selon Craft et Audia (1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

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

Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine (Steffens et al., 1998).

L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel., 1991) d'une part elle est essentielle pour la coloration bénéfique de certaines nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé, et d'autre part elle induit le modifie de façon indésirable les qualités organoleptiques des fruits et des légumes (Whitaker et Lee., 1995).

II.1.8- Mécanisme réactionnelle de la PPO

Le mécanisme globale des oxydations de monophénol et de diphenol proposées pour la PPO de *le crassa de neurospora* est montré dans la Figure 7 (Lerch., 1995), le mécanisme de l'action catalytique pour l'enzyme a été déduit a basé sur le géométrique et structure électronique de l'emplacement actif de cuivre (Himmelwright et al., 1980 ; Lerch 1983., 1995 ; Wilcox et al., 1985 ; Solomon et al., 1992).

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 6)

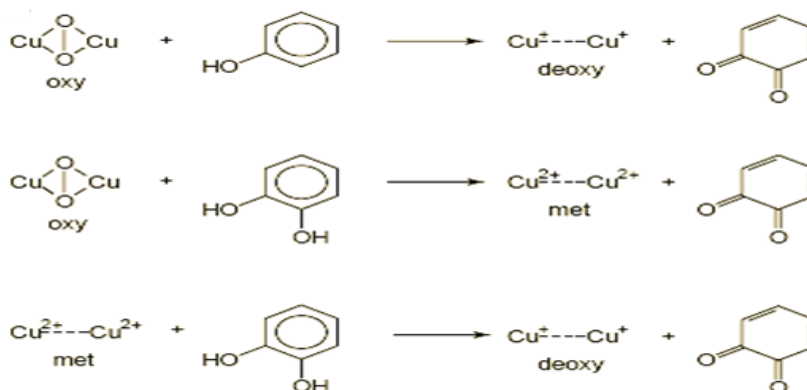


Figure 6 Les trois états fonctionnels de la PPO, *Met* ; *Deoxy* et *Oxy* PPO d'après Van Gelder et al (1997).

In *vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme *met*, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch., 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes et al (2002). Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les PPOs soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols catalysée par les PPOs suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence (Sanchez-Ferrer et al., 1995). Cette phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'*o*-diphénols (Espin et Wichers., 1999).

Le modèle des mécanismes réactionnels des PPOs incluant l'activité catécholase (Figure 7, cycle A) et crésolase (Figure 7, cycle B) est basé sur des informations quant à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre binucléaire et sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Siegbahn., 2003; Lerch., 1995).

Les formes *oxy* peuvent réagir avec les mono- et les diphénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols (Claus et Decker., 2006). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodríguez-Lopez et al., 1992).

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme *oxy* semble beaucoup plus instable que dans le cas des PPOs, ce qui réduit fortement l'affinité des PPO pour les mono-phénols (Eicken et al., 1999). L'oxygène se fixe sur

l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (**Janovitz-Klapp et al., 1989**).

L'activité catécholase implique l'oxydation de deux *o*-diphénols en deux quinones avec la réduction concomitante de 4e⁻ de l'oxygène moléculaire produisant deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un *o*-diphénol à la forme *met* de l'enzyme qui est 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 le peroxyde et en produisant l'eau et la formation d'une autre *o*-quinone.

Dans l'activité crésolase, l'O₂ est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du *deoxy*PPO pour donner l'*oxy*PPO dans laquelle l'O₂ a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxy*PPO, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de l'*o*-quinone (**Solomon et al., 1996 ; Solomon et al., 2001 ; Fenoll et al., 2004 ; Whitaker., 1995 ; Mayer et Harel., 1991 ; Siegbahn., 2004 ; Sánchez-Ferrer et al., 1995 ; Jolivet et al., 1998**).

Les étapes limitantes dans l'hydroxylation des monophénols pourraient être :

- 1) L'attaque nucléophile du groupement OH en C-4 sur l'ion cuivre du site actif de la tyrosinase ;
- 2) L'attaque électrophile du peroxyde du site actif de l'oxytyrosinase sur le C-3 du substrat monophénolique ;
- 3) L'oxydation du *o*-diphénol formé à partir du monophénol (**Fenoll et al., 2000**).

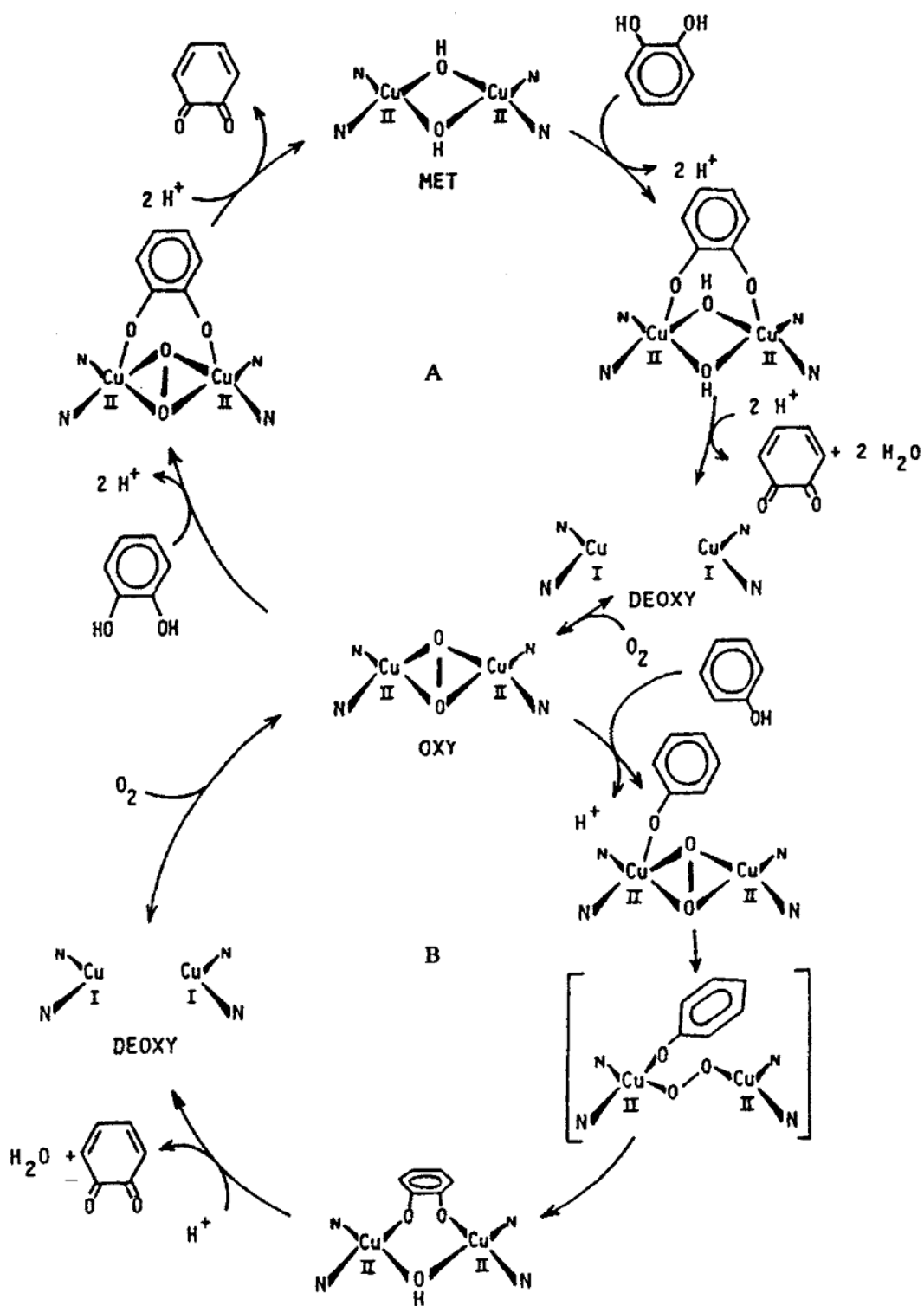


Figure 7 Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) de la PPO (Lerch., 1995 ; Mayer et Harel., 1991).

II.2- Brunissement enzymatique

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

Parmi les caractéristiques organoleptiques des aliments, la couleur est l'une des propriétés principales pour évaluer la qualité des aliments par les consommateurs. Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et des légumes. Mais ce phénomène peut également se produire lors de la transformation et le stockage de certains fruits de mer. (**Whitaker et Lee., 1995**)

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

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

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

II.2.2- Contrôle du brunissement enzymatique

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

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

II.2.2.1- Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

II.2.2.1.1- Les traitements thermiques

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais. (Vámos-Vigyázó., 1981).

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

II.2.2.1.2- La congélation

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

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

II.2.2.2- Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

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

Mc Evily et al (1992) classent les inhibiteurs de la PPO en six catégories (**tableau2**) : les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexants, les inhibiteurs d'enzyme, les traitements enzymatiques.

Tableau 2 Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily et al., 1992)

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

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

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

II.2.2.2.1- Agent réducteur

L'acide ascorbique est un agent réducteur largement utilisé dans l'industrie pour contrôler ce phénomène. Cet antioxydant naturel régénère les *o*-diphénols en réduisant les *o*-

quinones formées (Varoquaux et Sarris., 1979 ; Nicolas et al., 1994 ; Walker et Ferrar., 1995 ; Martinez et Whitaker., 1995).

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

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

II.2.2.2-Agents chélateurs

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

II.2.2.3- Inhibition ciblant l'enzyme

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

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

II.2.3- Les activateurs et les inhibiteurs

II.2.3.1- Les activateurs

La PPO peut être activée par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), par les alcools, et les protéases (Seo et al., 2003 ,Gandía-Herrero et al., 2005), par un choc de pH acide et alcalin (Joy et al., 1995) et aussi par l'exposition aux acides gras dans les mélanges d'incubation, de même, l'addition des ions du Cu²⁺ dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Fan et Flurkey., 2004).

Le SDS peut activer la PPO de diverses sources, y compris la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Il a été également montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiée (Espin et Wichers., 1999).

II.2.3.2- Les inhibiteurs

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 (O₂ et substrat phénolique) et du pH et de la température (**Zawistowski et al., 1991**).

Plus récemment, les plantes sont considérées comme étant une source potentielle des inhibiteurs de la PPO (**Baurin et al., 2002**). Un certain nombre d'inhibiteur de la PPO des sources naturelles ont été identifiés. Ils appartiennent à deux grand groupes : les polyphénols et les aldéhydes et d'autres dérivés (**Rescigno et al., 2002**). Parmi les composés isolés le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercetine, la morine, la lutéoline, l'ansaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique sont des inhibiteurs puissants de la PPO (**Parvez et al., 2007**).

Matériels et méthodes

III.1- Matériels

III.1.1-Matériel végétal

La variété des dattes (Deglet-Nour) utilisée dans notre étude a été achetée à maturité du marché local de la wilaya de Laghouat, sont d'origine de Biskra qui est située au Sud-est du pays, et plus exactement au sud des Aurès.



Figure 8 *Phoenixdactylifera* Lcv Deglet-Nour(Wilaya de Lagouat., 2017)

III.1.2-Produits chimiques

- 4-Méthylcatéchol, Le phosphate de potassium, l'acétate de sodium, acide acétique, Diméthyle sulfoxyde (DMSO), l'acide citrique ($C_6H_8O_7$) l'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$) et l'acide benzoïque ($C_7H_6O_2$) sont fournis par fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

III.2- Méthodes

III.2.1-Préparation de l'extrait brut de la PPO

La 4-Méthylcatéchol oxydase a été isolée à partir des dattes de la variété Deglet-Nour (*Phoenix dactylifera* L) selon le protocole d'extraction développé par (Hasegawa et Maier., 1980).

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. 200g de chair de dattes refroidie préalablement à $-15^{\circ}C$ sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG ,model BB 90E) dans 300 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) comme chélateur des composés phénoliques. Le

broyat est ensuite filtré à travers quatre couche de gaz. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo ScientificHelIOS γ Spectrophotometer, England).

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



Figure 9Un tube Eppendrof de 2mL Contenant l'extrait enzymatique brut d'une couleur jaune.

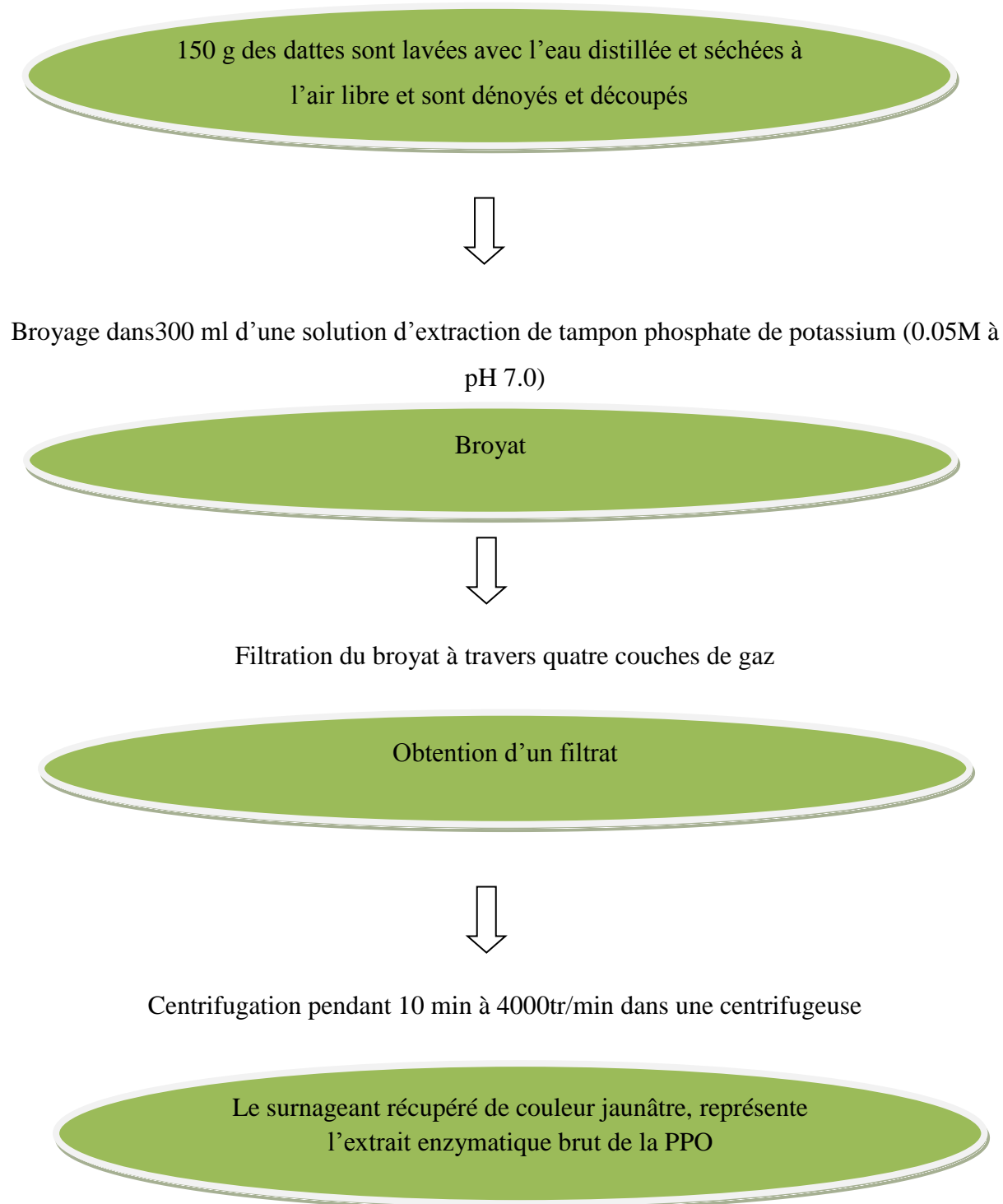


Figure 10 Le protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenixdactylifera L*) développé par (Hasegawa et Maier., 1980).

III.2.2-Mesure de l'activité de la PPO

L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de la datte Deglet nour est mesurée à 400 nm en utilisant le 4-MC comme substrat par la mesure directe de la formation des *o*-quinones à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HellIOS γ) en présence oxygène/aire (**Fan et Flurkey, 2004 ; Espín et al., 1995**).

Le 4-MC à 0.4 M est préparée dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (**Fan et Flurkey, 2004**). Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 μ l d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant une minute après l'ajout de l'extrait enzymatique. La vitesse initiale (v_0) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps **Figure (11) (Ünal, 2007)**.

Les solutions tampon et de substrat sont préincubées dans un bain marie réglé à 30°C pendant 5 min. L'échantillon blanc contient seulement 1 ml de solution tampon acétate avec 20 μ l d'extrait enzymatique.

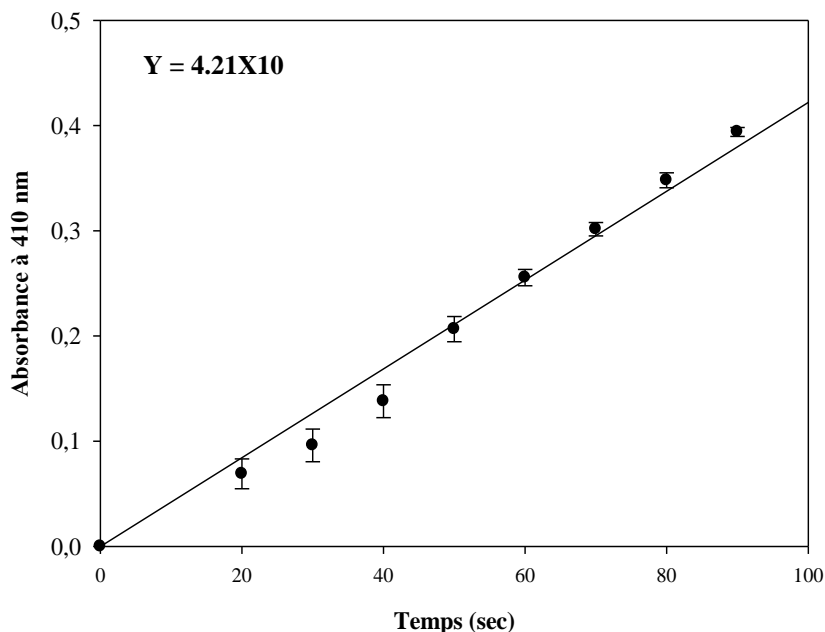


Figure 11 Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du 4-MC par la PPO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.) (pH 4,5-0.05 M tampon acétate de sodium ; 4-MC 40 mM ; 30°C, extrait enzymatique 20 μ l).

III.2. 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 4,5 (tampon acétate de sodium 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations

d'inhibiteurs : d'acide citrique entre 10 et 50 mM, d'acide ascorbique entre 0,1 et 0,4 mM, et de l'acide benzoïque entre 1 et 10 mM pour une concentration constante de 4-MC.

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 4-méthylcatéchol oxydase en absence d'inhibiteur

A₁ : est l'activité 4-méthylcatéchol oxydase en présence d'inhibiteur.

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

III.2.4- Détermination du mécanisme d'inhibition de la 4-méthylcatéchol oxydase 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 (20 et 40 mM pour l'acide citrique, 0,1 et 0,2 mM pour l'acide ascorbique tandis que pour l'acide benzoïque des concentrations valant 0,5 et 2,5 mM ont été utilisées) et à différentes concentrations croissantes de la 4-méthylcatéchol comprises entre 10 et 50 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**).

III.2.5- 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 effectuée 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 Pro™ 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.).

Résultats et discussion

IV.1.Détermination de la valeur d'IC₅₀ des trois acides organiques sur l'activité enzymatique de la 4-méthylcatéchol oxydase

L'effet de différentes concentrations d'acide citrique, d'acide ascorbique ainsi que l'acide benzoïque sur l'oxydation de la 4-Méthyl-catéchol sur l'activité enzymatique de la 4-Méthylcatéchol oxydase des dattes *Phoenix dactylifera L cv Deglet Nour* a été étudié.

Les résultats trouvés, montre que la concentration de ces trois inhibiteurs dans le milieu réactionnel provoque une diminution significative sur l'activité enzymatique.

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=25,82 mM±1, 89, en présence d'acide citrique.
- IC₅₀=0,152 mM±0,08 en présence d'acide ascorbique
- IC₅₀ = 1,57 mM±0,08 en présence d'acide benzoïque

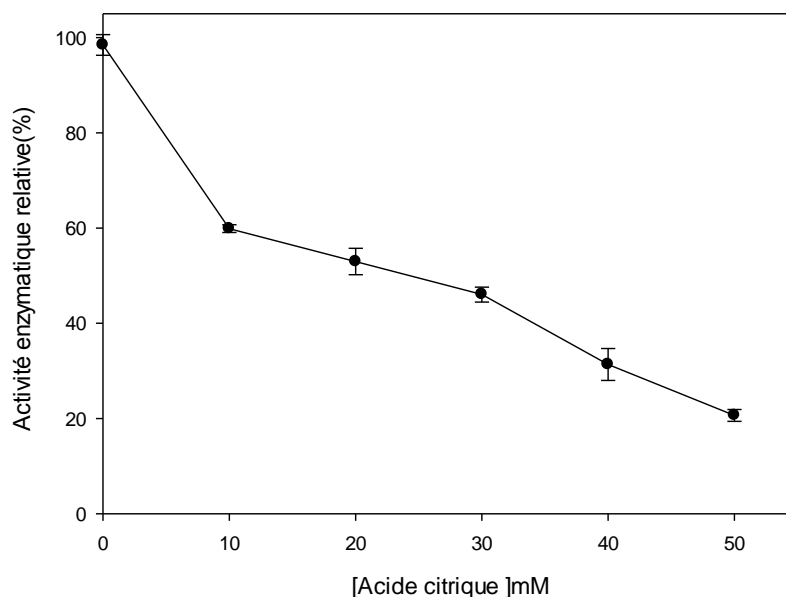


Figure 11 L'effet de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de la 4-Méthyl-catéchol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L cv Deglet -Nour*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 4,5).

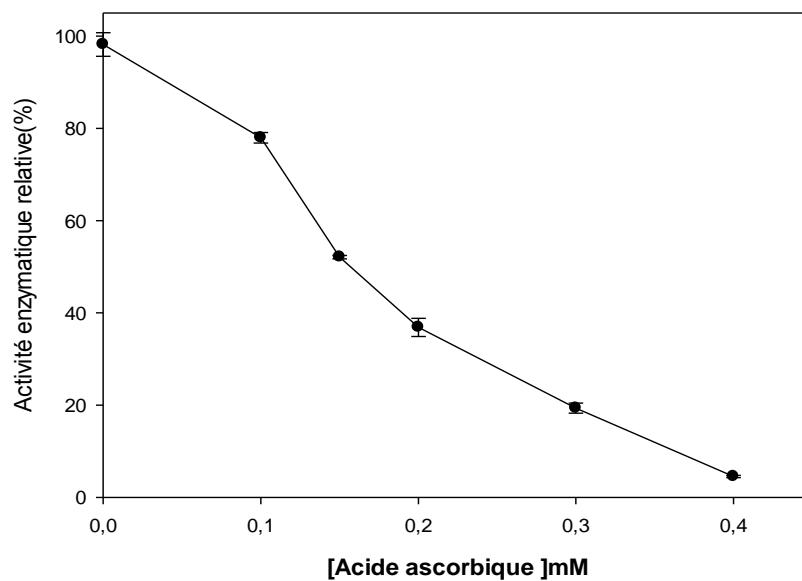


Figure 12 L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de 4-Méthylcatéchol par la 4-Méthylcatéchol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Deglet Nour*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 4,5).

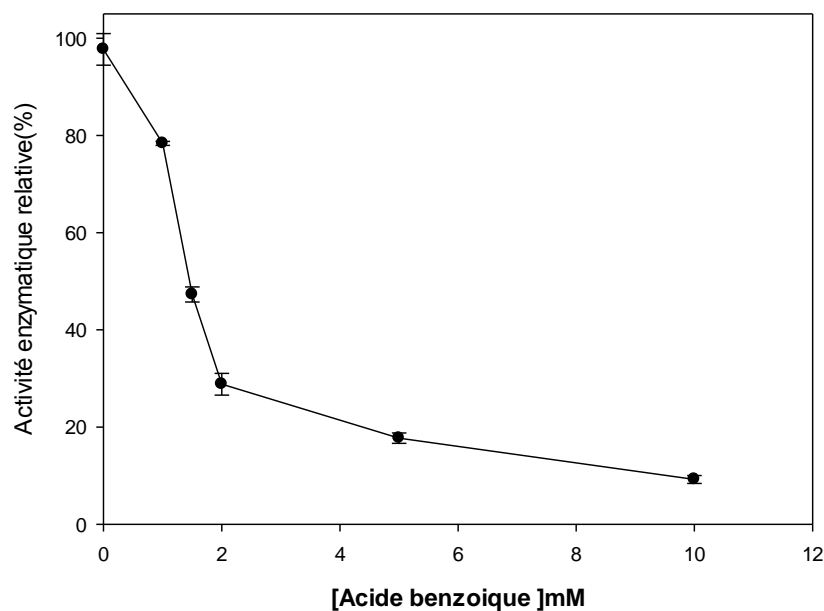


Figure 13 L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de 4-Méthylcatéchol par la 4-Méthylcatéchol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Deglet Nour*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH4, 5).

Résultats et discussion

Pour mieux comparer l'effet de l'acide citrique sur les PPOs d'origine végétale et celle de notre variété, les valeurs d'IC₅₀ de l'acide citrique, de l'acide ascorbique ainsi que l'acide benzoïque trouvé pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans les **Tableaux (3,4 et 5)** respectivement.

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

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet-Nour	4-Méthylcatéchol	25,82 ±1,89	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>TerfezialeonisTul</i>	L-tyrosine	9,46	Harrouz et Sahraoui., 2014
Champignon de Paris <i>Agaricus bisporus</i>	Catéchol	150	SON et al., 2000

Tableau 4 Les valeurs d'IC₅₀ de l'inhibition de la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats par l'acide ascorbique.

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet-Nour	4-Méthylcatéchol	0,152 ±0,08	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 al., 2010
Truffe <i>TerfezialeonisTul</i>	L.Tyrosine	0.151	Hafes, Saadi., 2014
Champignon de Paris <i>Agaricus bisporus</i>	Catéchol	0.24	Goldrish et Witaker., 1984

Tableau5 Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide benzoïque comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats .

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L</i> <i>cv Deglet Nour</i>	4-Méthylcatéchol	1,57 ±0,08	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L</i> <i>cv Deglet –Nour</i>	Catéchol	1,9 ±0,15	Choul., 2016
<i>Blé</i> <i>Triticumaestivum L.</i>	Catéchol	11.18	Erat et al., 2010
<i>Truffe</i> <i>TerfezialeonisTul</i>	Catéchol	8.2	Gouzi., 2014
<i>Champignon de Paris</i> <i>Agaricus bisporus</i>	Catéchol	1.00	Chen et al., 2003
		0,147	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 170 et 16fois plus sont estimés en comparant sa valeur avec celles obtenues en présence d'acide citrique et d'acide benzoïque respectivement.

En analysant ces **tableaux 3.4.5** 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 Deglet-Nour(notre étude) semble être plus élevée par rapport à celle de la PPO de deglet-nour.

De plus, d'après ces résultatsobtenus, on constate que le pouvoir inhibiteur du et la valeur d'IC₅₀peut être influencé beaucoup plus de de la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors la mesure de l'activité de la PPO des dattes.

IV.2.EtudeMécanisme cinétique d'inhibition de l'activité 4-Méthylcatéchol 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 Deglet-nour* est étudié en utilisant le 4-Méthyl-catéchol comme substrat.

Résultats et discussion

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 (4-Méthylcatéchol) sont indiqués dans **les tableaux (6 ,7 et 8)**.

Leurs valeurs « R^2 » comprises entre (0,974 et 0,992) indiquent bien que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

Tableau 6 Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phœnix dactylifera L cv deglet-Nour*) en utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Substrat	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
Acide citrique	0			0,5022±0,0069	0,992	Non compétitive
	20	36,6363±0,9517	6,6924±0,4138	0,3257±0,0044	0,991	
	40			0,2398±0,0329	0,990	

Tableau 7 Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L cv deglet Nour*) en utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Inhibiteur	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
Acide ascorbique	0		3,436±0,5383		0,978	compétitive
	0,1	0,03951±0,0059	12,037±1,886	0,331±0,006	0,975	
	0,2		20,10 ±3,146		0,974	

Résultats et discussion

Tableau8 Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera Lcv deglet Nour*) en utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Inhibiteur	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
Acide benzoïque	0		5,53±0,60		0,981	
	0,5	0,714± 0,08	9,53±1,06	0,329±0,006	0,980	compétitive
	2.5		26,005±2,82		0,979	

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_{IS} indiquées dans les tableaux (6.7.8) suggèrent que ces acides organiques inhibent efficacement l'activité de la PPO de la variété Deglet-Nour en présence de 4-Méthyl-catéchol, de même ces tableaux montrent que les représentations graphiques de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$, est une série de courbes croisées, avec une diminution de la valeur V_{max} et pareillement, augmentation du K_m .

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de 4-Méthylcatéchol 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 ascorbique, de l'acide benzoïque et de l'acide citrique sont représentés dans les figures (14), (15) et (18) .respectivement.

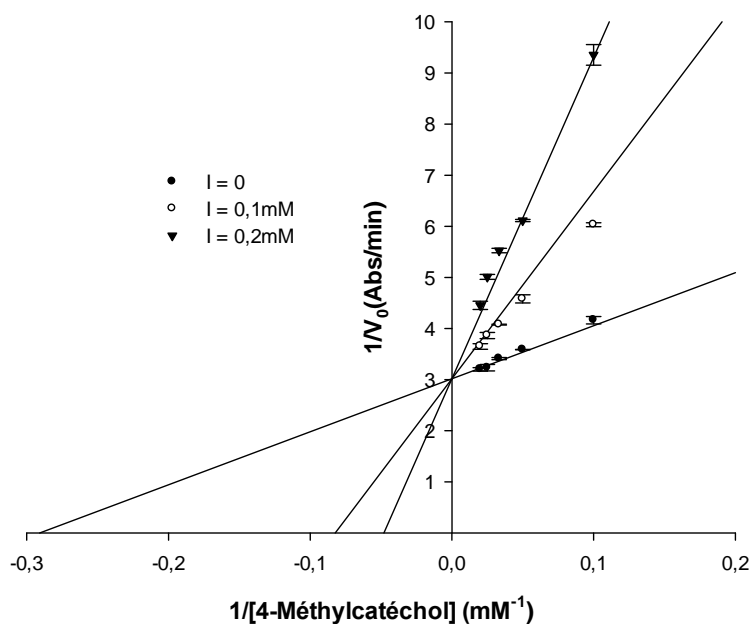


Figure 14. Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Deglet-Nour*) par l'acide ascorbique. Les concentrations d'acide citrique sont 0 (○), 0,1 (●), et 0,2 (▼)

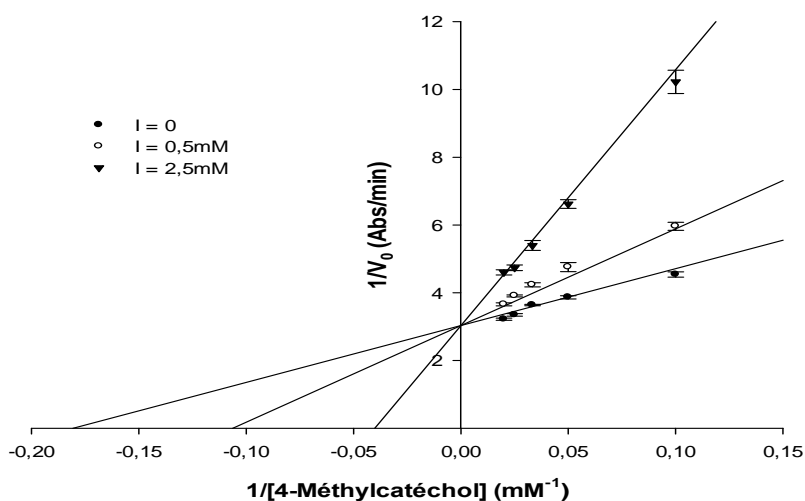


Figure 15. Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Deglet Nour*) par l'acide benzoïque. Les concentrations d'acide benzoïque sont 0 (○), 0,5 (●), et 2,5 (▼),

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.

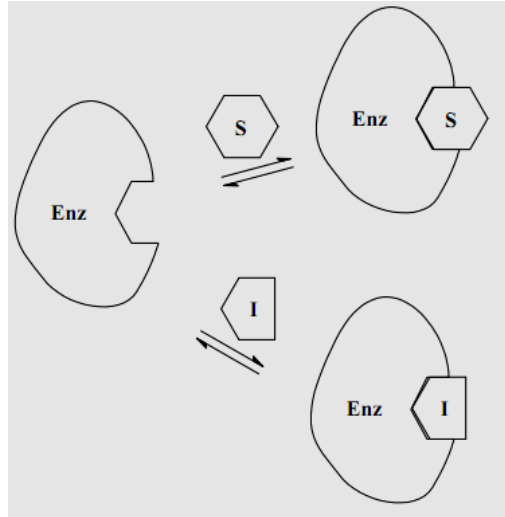


Figure 16. Représentation de l'inhibition compétitive (Keillor., 2004)

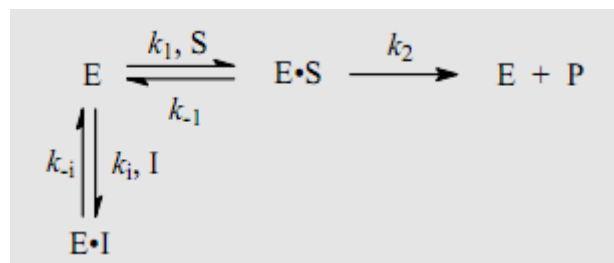


Figure 17. schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive (Keillor., 2004)

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 :

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

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 6.7 et 8, les constantes d'inhibition (K_I) pour l'acide ascorbique et l'acide benzoïque, utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat sont respectivement, 0,03951 mM et 0,714 mM.

Pour l'acide ascorbique nos résultats sont similaires avec ceux trouvés pour la PPO extraite d'artichauts (*Cynarascolymus L.*) (Tülin., 2003), cependant, ils sont en désaccord avec ceux obtenus pour la PPO extraite de blé (*Triticumaestivum 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).

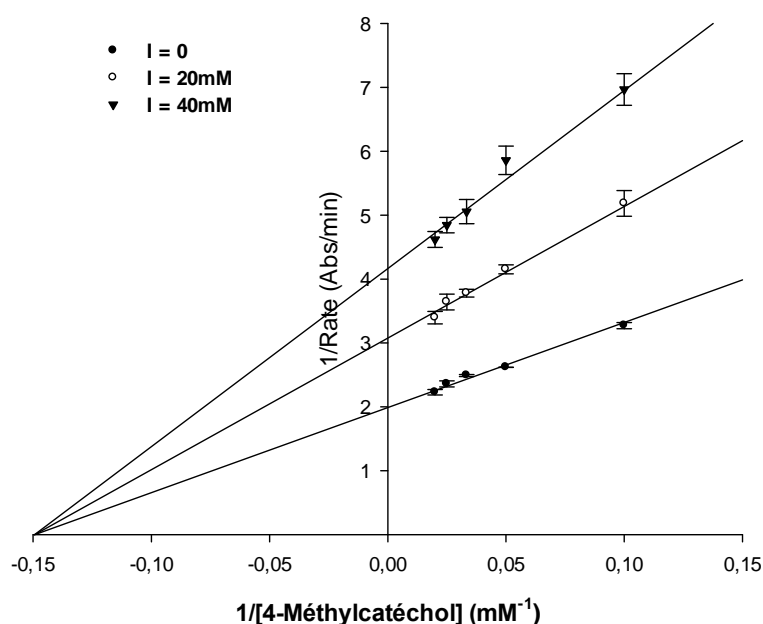


Figure 18. Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenixdactylifera L cv Deglabeida*) par l'acide citrique . Les concentrations d'acide citrique sont 0 (○), 20(●), et 40(▼),

En présence de l'acide citrique (**figure 18**), 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 ce acide organique.

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

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur le complexe enzyme-substrat 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 le Tableau (6), le constante d'inhibition (K_I) pour l'acide citrique, utilisant le 4-méthyl catéchol comme substrat =36,6363mM

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

$$1/V_0 = (\left[\frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right] \cdot 1/[S] + \alpha/V_{max}$$

Avec:

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

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

$$K_I = K_{IS}$$

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

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

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

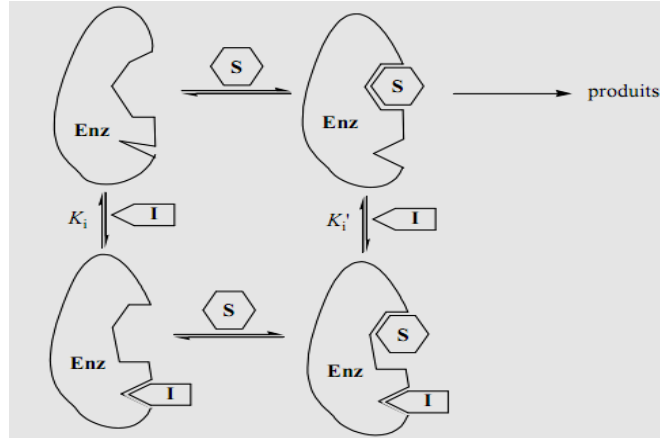


Figure 19 Représentation de l'inhibition non compétitive (Keillor., 2004)

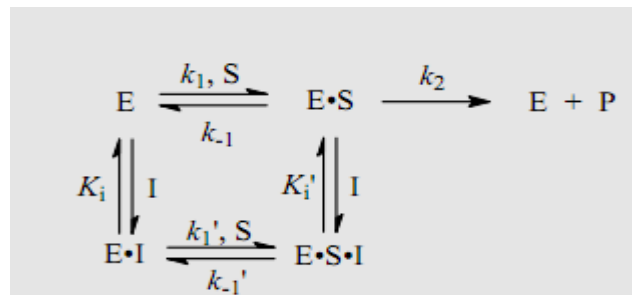


Figure 20 Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive (Keillor., 2004)

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

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

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

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

La variété Deglet Nour est un fruit de grande valeur nutritionnelle est commerciale. L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique causé par la polyphénol oxydase.

La polyphénol oxydase des dattes a été extraite en milieu aqueux en présence de (PVPP). L'extrait enzymatique brut montre que la PPO des dattes est une diphénolase. La PPO de datte est capable d'oxyder le 4-MC 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 Deglet Nour* 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 4-MC comme substrat et d'une manière réversible alors que l'acide ascorbique et l'acide benzoïque se fixent uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

D'après les valeurs d' IC_{50} , nous pouvons déduire que l'acide ascorbique est 170 et 16 fois plus puissant que l'acide citrique et l'acide benzoïque, respectivement.

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

Comme perspectives, une amélioration de 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*

- ❖ **Ait ameur, L., 2001** . Evolution de la qualité nutritionnelle des protéines de biscuits modèles au cours de la cuisson au travers d'indicateurs de la réaction de Maillard : Intérêt de la fluorescence frontale. Mémoire de doctorat en Chimie analytique, Institut national Agronomique, Paris-Grignon.80p.
- ❖ **Acourene S., Tama M., 1997**. Caractérisation physicochimique des principaux cultivars de datte de la région de Ziban. Revue recherché Agronomique, Ed. INRAA, N° 1, 59-66 pp
- ❖ **Al- shahib, W., Marshall, R.J.2003**. The fruit of the date palm: it's possible use as the best food for the future International Journal of Food Sciences and Nutrition, 54, 247-259 pp.
- ❖ **Albert, L., 1998**. La santé par les fruits. Ed. VEECHI. 44-74pp.
- ❖ **Anderson, J.V and Morris, C.F. 2001**. An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. Crop Science. 41: 1697-1705.
- ❖ **Anonyme. 2002**. Statistiques agricoles : Superficies et productions. ministère de l'agriculture et du développement rural. Série A, 5-6pp.
- ❖ **Anosike E.O., and Ayaebene, A.O.1982**. Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*. 21, 1889-1893.
- ❖ **Arslan, O., Dogan, S., 2005**. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.85, 1499-1504.In AbidliAhmed Tidjani et SaggarAhmed Seddik2012.
- ❖ **Bakkaye S. 2006**. Lexique phoenicicole en arabe et en mozabite. CWANA, HCA et RAB98/G31. 14-16, 24-25, 31P.
- ❖ **Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q.T., Bernard, P. 2002**. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82: 155-8.
- ❖ **Belguedj, M. 1996**. Caractéristiques des cultivars de dattiers du Sud-Est du Sahara algérien. Ed. Filière culture pérenne de L'ITDAS. Biskra.
- ❖ **Belguedj, M. 2001**. Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérienne. INRAA El-Harrach N° 11, Alger, 289 p.
- ❖ **Belguedj, M 2007**.Evaluation du sous-secteur des dattes en Algérie., INRAA El-Harrach.60P.
- ❖ **Belguedj, M. 2002**. (b). Les ressources génétiques du palmier dattier :

caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du Sud-Est Algérien. Revue annuelle de L'INRAA N°1/2002. 28-289 p.

- ❖ **Belguedj, M., Trichine, A., Guerradi, M., 2008.** le cultivar du palmier dattier dans les oasis de GHARDAIA (Algérie). INRAA El-Harrach. Alger 96p.
- ❖ **Ben-Yosef, V.S., Sendovski, M., Fishman, A. 2010.** Directed evolution of tyrosinase for enhanced monophenolase/diphenolase activity ratio *Enzyme and Microbial Technology*. 47:372–376.
- ❖ **Ben chabane, A., Meftah, F., Saadi, A. 1995.** (a) Les composés pariétaux de la datte au cours de la maturation. *Options méditerranéens : série A. séminaires, méditerranéens ; n° : 28.*
- ❖ **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.
- ❖ **Bonner, W.D. 1956.** Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 427-452.
- ❖ **Bouchareb, N., Taouti, M. 2014.** Etude d'inhibition du polyphénol oxydase des dattes Deglet-Nour (*Phoenix dactylifera* L.) par l'acide citrique. Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Biologie, Génie biologique.
- ❖ **Bouguedoura, N. 1991.** Connaissance de la morphogénèse du palmier dattier. Etude in situ et in vitro du développement morphogénétiques des appareils végétatifs et reproducteurs. Thèse de doctorat. U.S.T.H.B., ALGER, 201p.
- ❖ **Bousdira K. 2007.** Contribution à la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une valorisation de la biomasse : caractérisation morphologique et biochimique des dattes de cultivars les plus connus de la région du Mزاب, classification et évaluation de la qualité. Thèse Mag. Dép. Technologie alimentaire. Uni. Boumerdès. 123pp.
- ❖ **Burton, SG. 1994.** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*. Vol. 22. pp. 459-487.
- ❖ **Cabanes, J., Chazarra, S., Garcia-Carmona, F. 2002.** Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *Journal of Theoretical Biology*, 214: 321-325.
- ❖ **Chen, L., Flurkey, W.H. 2002.** Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*, 5: 109-120.

- ❖ **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., Mehta A., Berenbaum M., Engeseth N., 1998.**The potential use of honey as an inhibitor of enzymatic browning. Presented at Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Atlanta, GA.
- ❖ **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.
- ❖ **Claus, H ., Decker, H. 2006.**Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 29. Issue 1, pp. 3-14.
- ❖ **Craft, C. C., Audia, W. M. 1962.** Phenolic substances associated with wound-barried formation in vegetables. *Bot. Gaz.* 123: 211-219.
- ❖ **Dawson, C.R., Magee, R.J.1955.** Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, 2: 817-831.
- ❖ **Dawson V.H.W.1963.** Récolte et conditionnement des dattes. Collection F.A.O. Rome, cahier n°72, 397 p.
- ❖ **Decker, H.2005.** Copper proteins with dinuclear active sites. *In: King, B. (Ed.), Encyclopedia of Inorganic Chemistry. John Wiley & Sons*, II: 1159–1173.
- ❖ **Decker, H., Terwilliger, N.2000.** Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- ❖ **Dixon M, Webb E.C., 1964.**Dans “ enzymes”. Longman ed., Londres, 694-695.
- ❖ **Djerbi, M .1994.** Précis de phoeniciculteurs. FAO, 192 p.
- ❖ **Dogan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., Alkan, M. 2005a.** purification and characterization of *Ocimum bacilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 10224-10230.
- ❖ **Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H and Arslan, O. 2005b.**Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynarascolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 776–785.
- ❖ **Eicken C., Krebs B., Sacchettini J.C., 1999.** Catechol oxidase – structure and activity. *Current Op. Structural Biol.*, 9, 677-683.
- ❖ **Elhadrami, I and Elhadrami, A.2009.** Breeding date palm. Univ. Marrakech.

191- 195 pp.

- ❖ **El homaizi, M., Saaidi, M., Oihabi, A., Cilas, C., 2002.** Phenotypic diversity of date-palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) from Morocco. *Genet. Resource. Crop. Evolved* 49, 483–490 pp.
- ❖ **Ensminger, A. H., Ensminger, M. E., Konlande, J. E., Robson, J. R. K. 1995.** The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition. Second edition, Boca Raton, CRC Press. 1178p.
- ❖ **Erat, M., Nuri, Y., Gülşah, S.A., Demirkol, A. 2010.** Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticumaestivum* L.) *European Food Research and Technology*. 23,6,899-905.
- Espin JC, 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:
- ❖ **Estanove, P. 1990.** Note technique : Valorisation de la datte. In *Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens*. Ed. CIHEAM, 301-318p
- ❖ **Fan, Y., Flurkey, W.H. 2004.** Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- ❖ **Favier, J.C., Ireland, R.J., Laussucq, C and Feinberg, M. 1993.** Répertoire général des aliments. table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique. Tome III, Ed. ORSTOM EDITIONS, LAVOISIER, INRA EDITIONS, 27-28 pp.
- ❖ **Fennema, O. R. 1975.** Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems. in *Water relations of foods*. R. B. Duckworth (Ed.). New York, Academic Press: 397-413.
- ❖ **Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F and Tudela, J. 2004.** Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- ❖ **Fenoll, L.G; Rodríguez-López, J.N; Varón, R; García-Ruiz, P.A; García-Cánovas, F and Tudela, J. 2000.** Action Mechanism of Tyrosinase on *meta*- and *para*-Hydroxylated Monophenols. *Biol. Chem.*, Vol. 381, pp. 313-320.
- ❖ **Fraignier, M., Marques, L., Fleuriet, A and Macheix, J. 1995.** Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2375-2380.

- ❖ **Friedman, M. 1997.** Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- ❖ **Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, 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, J.C., Solano, F. 2002.** Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15:162-173.
- ❖ **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.
- ❖ **Ghazi, F., Sahraoui, S., 2005.** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantbouchet et Hamraia. Mémoire d'Ingénieur. Institute national d'agronomie. Alger, 81 p.
- ❖ **Gilles, P., 2000.** Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, 110 p.
- ❖ **Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, J.R. 1984.** Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(5), 1003-1009.
- ❖ **Gouzi, H., Coradin, T., Delicado, E.M., Ünal, U., Benmansour, A. 2010.** Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3: 1-7.
- ❖ **Haghbeen, K., Saboury, A.A., 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., Lomascolo, A. 2006.** Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219–232.
- ❖ **Hanachi, S., Khitri, D., Benkhalifa, A., Brac de Perrière, R.A. 1998.** Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. 225 p.
- ❖ **Harry, W., Duckworth, Joseph, E., Colema. 1970.** Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Biological. Chem.*, 7, 1613-1625.
- ❖ **Haruta, M., Murata, M., Kadokura, H and Homma, S. 1999.**

- Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. *Phytochemistry* 50, 1021-1025.
- ❖ **Hasegawa, S. and Maier, V. P. 1980.** Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.
 - ❖ **Himmelwright, R.S., Eickman, N.C., Solomon, E.I. 1980.** Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102.
 - ❖ **Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. 1989.** Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry* 28: 2903-2907.
 - ❖ **Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Goupy, P.M and Nicolas J. 1990.** Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1437-1441.

 - ❖ **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J and Pellon, G.1998.** Agaricus bisporus browning: a review. *Mycol. Res.* Vol. 102, No. 12, pp. 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.
 - ❖ **Keillor jeffrey, w .2004.** inhibition des réactions enzymatiques BCM 2504.
 - ❖ **Klabund, T., C. Eicken, C., Sacchettini, J.C and Krebs, B. 1998 .** "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." *Nat. Struct. Biol.* 5(12): 1084-1090.
 - ❖ **Kubowitz, F. 1938.** Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Häemocyanins. *Biochemisches Zeitung.* 299: 32-57.
 - ❖ **Kuwabara, T., & Katoh, Y. 1999.** Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.
 - ❖ **Lax A.R & Vaughn K. C.1991.** Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.
 - ❖ **Lerch K. 1981.** Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine-monoxygenase. *in Metal ions in biological systems.* H. Siegel. New York, Marcel Dekker. 13: 143-186.
 - ❖ **Lerch, K. 1983.** *Neurospora sp* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125-138.

- ❖ **Lerch, K. 1995.** Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. *in* Enzymatic Browning and Its Prevention. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: 64-80.82.
- ❖ **Lerner, A.B. 1953.** Metabolism of phenylalanine and tyrosine. *Adv. Enzymol.* **14**, 73-128.
- ❖ **Makhloufi, A. 2010.** Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Mémoire de obtenir le grade de doctorat d'état en biologie. université Aboubaker Belkaid. Bechar.166P.
- ❖ **Mammeri, M., Boudia .F.2016.** Etude de l'inhibition du PPO de *phoenix dactylifera* par quelques acides organiques . Mémoire de master de biochimi, Amar telidji, L'Aghouat.
- ❖ **Marques, L., Fleuriet, A and Macheix, J.J. 1995.** Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol.Biochem.* **33**, 193-200.
- ❖ **Martinez, V.M. & Whitaker, j.R.1995.** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, **6**, 195-200.
- ❖ **Matallah, M.2004.** Contribution à l'étude de la conservation des dates variétés Deglet- Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingénieur agronomies, INA. El- Harrach. 79 p.
- ❖ **Mayer, A.M. 1987.** Review Article number 22. Polyphenol oxydase in plants-Recent progress. *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 1, pp. 11-20.
- ❖ **Mayer, A.M., 2006.** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, **67**, 2318–2331.
- ❖ **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.
- ❖ **McEvil, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S., 1992.** Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 253-273.
- ❖ **Munier, 1973.** Le palmier dattier. Ed. Maison neuve, Paris, 221p.
- ❖ **Noui, Y. 2007.** Caractérisation physico-chimique comparative des deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister. Faculté des sciences de l'ingénieur. BOUMERDES, (2, 5,6) p.

- ❖ **Nappi, A.J., Vass, E. 1994** . Chromatographic analyses of the effects of glutathione, cysteine and ascorbic acid on the monophenol and diphenol oxidase activities of tyrosinase. *J. Liquid Chromatogr.*, 17, 793-815.
- ❖ **Nicolas, J.J and Potus J. 1993.**Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydation. Exemple du rôle de la lipoxygénase de panification et de la lipoxygénase en technologie des fruits. *Sciences des fruits*, vol. 14, pp 627-642.
- ❖ **Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M and Aubert, S.Y.1994.** Enzymatic browning reaction in apple and apple products. *Critical reviews in food science and nutrition* 34(2), 109-157.
- ❖ **Papa, G., Pessione, E., Leone, V and Giunta, C. 1994a.** *AGARICUS BISPORUS* TYROSINASE–I. Progress Made In Preparative Methods. *Int. J. Biochem.*Vol. 26. No. 2, pp. 215-221.
- ❖ **Papa, G., Pessione, E., Leone, V and Giunta, C. 1994b.** *Agaricusbisporus*TyrosinaseII. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities.*Int. J. Biochem.* Vol. 26, No. 2, pp. 223-228. progress. *Phytochemistry.* 26: 11-20.
- ❖ **Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Bae, H. 2007.** Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res.* 21: 805-816.
- ❖ **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.
- ❖ **Qiu, L., Chen, Q.H.,Zhuang, J.X., Zhong, X., Zhou, J.J., Guo, Y.J., Chen, Q.X. 2009.**Inhibitory effects of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry.* 112: 609-613.
- ❖ **Raymond, J., Rakariyatham, N and Azanza, J.L. 1993.** Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds.*Phytochemistry* 34, 927-931.
- ❖ **Razi, M.1993.** Contribution à l'étude de la valeur nutritive du jus de dattes de quatre variétés molles « Ghars, Litima, Tansilt et Takermoust »en comparaison avec le miel d'abeilles. Mémoire d'Ingénieur, I.T.D.A.S, Ouaregla.66p.
- ❖ **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*

- ❖ **Richard-Forget, F.C., Gaillard, F.A. 1992.** Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7),2472-2476.
- ❖ **Rigal, D. 2001.** Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; utilisation de préparations enzymatique, substitués aux sulfite. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option :biochimie. P19.
- ❖ **Rivas, N.D.J., Whitaker, J.R. 1973.** Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol.* 52: 501-507.
- ❖ **Robb, D.A. 1984.** Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. *CRC Press, Boca Raton, Florida.* 207-241.
- ❖ **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-Lopez, J.N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. 1992.** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 3801-3810.
- ❖ **Ros, J.R., Rodríguez-López, JN., García-Cánovas, F. 1994.** Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- ❖ **Sanchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. 1995.** Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247: 1-11.
- ❖ **Sapers, G.M. 1993.** Browning of foods: control by control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.*, 47, 75-84.
- ❖ **Schoenbein, C.F. 1856.** On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine.* 11: 137-141.
- ❖ **Schwartz, B., Olgin, A.K., Klinman, J.P. 2001.** The role of copper in topa quinone biogenesis and catalysis, as probed by azide inhibition of a copper amine oxidase from yeast. *Bio. Chem.*, 40, 2954-2963.

- ❖ **Seo, S.Y., Sharma, V.K., Sharma, N. 2003.** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- ❖ **Sherman, T.D., Vaughn, K.C and Duke, S.O. 1991.** A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 30,2499-2506.
- ❖ **Siboukeur, O.1997.** Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes. Thèse de Magister, INA. El-Harrach, Alger, 106 p.
- ❖ **Siegbahn, P.E.M. 2003.** The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* Vol. 8, pp. 567-576.
- ❖ **Siegbahn, P.E.M. 2004.** The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* Vol.9, pp. 577-590.
- ❖ **Solomon, E.I., Baldwin, M.J and Lowery, M.D. 1992.** Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity. *Chem. Rev.* 92, 521-542.
- ❖ **Solomon, E.I., Sundaram, U.M and Machonkin, T.E. 1996.** Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* Vol. 96, No. 7, pp. 2563-2605.
- ❖ **Son, S.M., Moon, K.D Lee, C.Y. 2000a.** Rhubarb juice as a natural antibrowning agent. *J. Food Sci.* 65, 1288-1289.
- ❖ **Stauffer, C. E. 1998.**Fats and oils in bakery products. *Cereal Foods World.* P120-126
- ❖ **Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P. 1998.** Polyphenol oxidase. *In* Polyphenols 96.Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 230-250.
- ❖ **Strothkamp, K.G., Jolley, R.L., Mason, H.S. 1976.** Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical And Biophysical Research Communications.* 70: 519-524.
- ❖ **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.
- ❖ **Tappel, A. L. 1966.** Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems.in *Cryobiology.* H. T. Meryman (Ed.). New York, Academic Press: 163-177.
- ❖ **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.

- ❖ **Tortora, G.J et Anagnostakos, N.P.1987** . Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. INC, 5 ème Edition, 688-693 pp.
- ❖ **Toutain, G. 1996**. Eléments d'agronomie saharienne et la recherche au développement, Marrakech, Maroc, 277 p.
- ❖ **Tulin, A. 2003**. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *heads Food Chemistry* 87:59–67.
- ❖ **Turner, E.M. 1974**. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*. 63: 541-547.
- ❖ **Urszula, G., Urszula, Z., Michal, W.2007**.Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) *Food Chem.*, 8, 20-704.
- ❖ **Vámos-Vigyázó, L. 1981**. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crc crit. Rev. Food sci. Nutr*, Vol. 15, pp. 49-127.
- ❖ **Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H and Wichers, H.J. 1997**. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, Vol. 45, N°. 7, pp. 1309-1323.
- ❖ **Varoquaux, P., Sarris, J. 1979**. Influence de l'acide ascorbique sur la cinétique de l'o-diphénolase (EC 1.14.18.1) du champignon de Paris (*Agaricusbisporus*). *Lebensm.Wissen. Technol.*, 12, 318-320.
- ❖ **Vaughn, K.C., Duke, S.O. 1984**. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant*. 60 , 106-112.
- ❖ **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. L., Ferrar, P. H. 1995**. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.*, 836-839.
- ❖ **Wichers, HJ., Van den Bosch, T., Gerritsen, Y.A.M., Oyevaar, J.I., Ebbelaar, M.C.E.M., Recourt, K.,Kerrigan, RW. 1996**. Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase.*Science and Cultivation of Edible Fungi, Elliott* (ed.) © Balkema, Rotterdam: 723-728.

- ❖ **Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E. and Solomon, E.I. 1985.** Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am. Chem. SOC.* 107: 4015-4027 .
- ❖ **Whitaker, J.R. 1994.***Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Second Ed., pp. 271-556, Marcel Dekker, New York.
- ❖ **Whitaker, J.R. 1995.** Polyphenol oxidase. *In Food Enzymes Structure and Mechanism*, (D.W.S. Wong, ed.) pp. 271-307, Chapman and Hall, New York.
- ❖ **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.
- ❖ **Yahiaoui.1998.** Caractérisation physico-chimique et l'évolution du brunissement de la datte Deglet-Nour au cours de la maturation. Thèse de Magister, INA. El-Harrach, Alger, 103 p.
- ❖ **Zawistowski J., biliaders cg .,eskin n.A.M. 1991.** Polyphénoloxydase .In:Oxidative enzyme in foods.d.s.r and eskin n.a.m.,eds ,elsevier appl.Sc.,London,chap.,6,217-273.
- ❖ **Zhang, X and Flurkey, W.H. 1997.** Phenoloxidasés in *Portabella Mushrooms*. *Journal Of Food Science*. Vol. 62, N°.1, pp. 97-100.
- ❖ **Zhang, J., Tan, Y., Guo, X., Kan, J. 2010.** Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 25: 1681–1687.
- ❖ **Zinkernagel, V. 1986.** Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltan (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115: 257-266.
- ❖ **Ziyan, E And Pekyardimci, S.2004.** Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.*28:547-557.

Annexe

1. préparation de tampon acétate de sodium :

- ❖ **L'acide acétique de 0.05 mM :** 1430 μ l de l'acide acétique est dilué jusqu'à 250 ml par l'eau distillée
- ❖ **Acétate de sodium de 0.05 mM :** 1,024 g est dissout dans 250 ml d'eau distillée
- ❖ On mélange les deux solution pour récupérer un tampon acétate de sodium de PH=4,5

ملخص

هذا العمل هدفه دراسة آلية تثبيط انزيم البوليفينول أوكسيداز PPO لدقلة نور (*Phoenix dactylifera* L) بواسطة حمض الستريك وحمض الاسكوربيك وحمض البنزويك. تم قياس نشاط انزيم PPO بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي على طول موجة 410 نانومتر و عند درجة الحموضة 4,5 و 30 درجة مئوية في وجود 4-ميثيل كاتكول كركيزه ، درجة تثبيط PPO يعتمد على تركيز مثبط المستخدم ، فتنبعا لقيم $IC_{50} = 25,82 \text{ mM} \pm 1,89$ في وجود حمض الستريك و $IC_{50} = 0,152 \text{ mM} \pm 0,08$ في وجود حمض الاسكوربيك و $IC_{50} = 1,57 \text{ mM} \pm 0,08$ في وجود حمض البنزويك) وجدنا أن حمض الاسكوربيك هو أكثر قوة 170 و 16 مرة من حمض الستريك وحمض البنزويك، على التوالي، يظهر تمثيل Lineweaver-Burk أن حمض الاسكوربيك وحمض البنزويك مثبطات تنافسية أما حمض الليمون فهو مثبط غير تنافسي من النشاط PPO مع قيمة KIS يعادل $36,63 \text{ mM} \pm 0,95$ و $0,039 \text{ mM} \pm 0,005$ و $0,714 \text{ mM} \pm 0,08$ على التوالي.

كلمات البحث: التمر، PPO، حمض البنزويك وحمض الستريك وحمض الاسكوربيك، التثبيط، التشوه الأنزيمي.

RÉSUMÉ

Ce présent travail à pour objectif d'étudier l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) des dattes (*Phoenix dactylifera* L cv *Deglet Nour*) 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 4,5 et à 30°C, en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'inhibiteur utilisé. D'après les valeurs d' IC_{50} , ($IC_{50} = 25,82 \text{ mM} \pm 1,89$ en présence d'acide citrique ; $IC_{50} = 0,152 \text{ mM} \pm 0,08$ en présence d'acide ascorbique ; $IC_{50} = 1,57 \text{ mM} \pm 0,08$ en présence d'acide benzoïque) nous avons estimé que de l'acide ascorbique est 170 et 16 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 compétitif tandis l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{IS} égale à $36,63 \text{ mM} \pm 0,95$, $0,039 \text{ mM} \pm 0,005$ et $0,714 \text{ mM} \pm 0,08$, respectivement.

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

ABSTRACT

This work aims to study the inhibition of the polyphenol oxidase (PPO) of dates (*Phoenix dactylifera* L cv *Deglet- Nour*) by citric acid, ascorbic acid and benzoic acid. The activity of the PPO was measured by spectrophotometry at 410 nm, at pH 4.5 and at 30 ° C., in the presence of 4-methyl catechol as substrate.

The degree of inhibition of PPO depends on the concentration of the inhibitor used. Based on IC_{50} values ($IC_{50} = 25.82 \text{ mM} \pm 1.89$ in the presence of citric acid, $IC_{50} = 0.152 \text{ mM} \pm 0.08$ in the presence of ascorbic acid, $IC_{50} = 1.57 \text{ mM} \pm 0.08$ In the presence of benzoic acid) we have estimated that ascorbic acid is 170 and 16 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 $36.63 \text{ mM} \pm 0.95$, $0.039 \text{ mM} \pm 0.005$ and $0.714 \text{ mM} \pm 0.08$, respectively.

Key words: dates, PPO, benzoic acid, citric acid, ascorbic acid, Inhibition, Enzymatic browning.