

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

***Détermination des conditions optimales de l'activité
pyrogallol oxydase de trois variétés des dattes
(Phoenix dactylifera L)***

Présenté par : Boudaoud Laila

Devant le jury :

Président(e) :Mr. Sifi Ibrahim (MAA)

Examineur:Mr. Laboukh Mourad (MAA)

Rapporteur : Mr.Benaceur Farouk (MAA)

Soutenu publiquement le : 11 Mai 2017

Dédicaces

Quoi que de plus que de pouvoir partager les meilleurs moments de la vie avec les êtres qu'on aime.

Arrivé au terme de mes études, j'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

- A ma très chère **mère**, qui me donne toujours l'espoir de vivre, et qui n'a jamais cessé de prier pour moi. Ma mère représente pour moi la source de tendresse, la vie et le soutien.
- A mon très cher **père**, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation

- A mes très chers(es) **Sœurs** et **frère** : Fatima.Z, Mohamed.A, Ismahane et la petite Maria

Les mots ne suffisent pas pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous, Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité

- Sans oublier ma sœur et n'est pas l'amie : Bou-Salah **Leila**

C'est l'occasion de t'exprimer mes sincères sentiments, et le pur amour que je porte pour toi, t'étais toujours la main qui m'aide à me relever quand je me sens triste

- A mon cher **époux** Belkacem Mekhanet

Je te dis merci d'être à coté de moi par ton soutien, ton encouragement et ta gentillesse sans égal, et ton profond attachement qui m'ont permis de réussir

Je dédie ce travail à toute ma **famille** Boudaoud, Sehairi et ma nouvelle famille Mekhanet



Remerciement

Avant tous, je tiens à remercier **Allah**, le clément et le miséricordieux de m'avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

Aussi je voudrai exprimer mes vifs remerciements à Mr **Benaceur Farouk** pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger ce mémoire. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité, son sérieux et son respect.

Je prends aussi un réel plaisir à remercier chaleureusement tous les membres du **Jury** qui me font l'honneur de juger cette mémoire.

Egalement Je voudrais remercier du fond du mon cœur l'ensemble des **enseignants** de l'université Ammar Theldji de Laghouat, ainsi tous mes enseignants durant mes études.

Les plus grandes leçons ne sont pas tirées d'un livre mais d'un enseignant comme vous. Merci d'avoir pris le temps de m'aider au cours de ces années et de m'avoir accompagné dans la maîtrise de mes connaissances.

En définitive, je remercie toute **personne** qui a participé de près ou de loin, de façon directe ou indirecte, à la réussite de ce travail.

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Chapitre 1		
Figure 01	Datte et noyau du palmier dattier	5
Figure 02	la variété de datte Deglet Nour	6
Figure 03	Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases	14
Figure 04	Diffraction aux rayons X de la PPO de <i>V.vinifera</i> . (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, les deux β -feuilles (Bleu), les quatre hélices (Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de C α de <i>V.vinifera</i> PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et <i>Neurospora crassa</i> (vert).	16
Figure 05	Site actif de la PPO de <i>V.vinifera</i> PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et <i>N.crassa</i> enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER, (b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres, la distance internucléaire était : Cu-Cu, 4,17Å; Cu A à H87, 2,07°; à H108, 2,16°; H117, 2,35°; Cu B à H239, 2,04Å; à H243, 2,15Å; à H272, 2,02Å	16
Figure 06	Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (<i>Met</i> , <i>Deoxy</i> , et <i>Oxy</i> PPO)	18
Figure 07	Structure de quelques substrats phénoliques	22
Chapitre 2		
Figure 08	Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Deglet nour.) (pH 4.6-0.05 M tampon acétate de sodium; pyrogallol 100 mM; 30°C, extrait enzymatique 40 μ l).	28
Chapitre 3		
Figure 09	Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L) « Deglet-Nour, Ghars et Degla Beida »	31
Figure 10	Variation de l'activité enzymatique de la PPO de <i>Phoenix dactylifera</i> L Deglet Nour en fonction du pH. (En présence de pyrogallol comme substrat).	33
Figure 11	Variation de l'activité enzymatique de la PPO de <i>Phoenix dactylifera</i> L Degla Beida en fonction du pH. (En présence de pyrogallol comme substrat).	33

Figure 12	Variation de l'activité enzymatique de la PPO de <i>Phoenix dactylifera</i> L Ghars en fonction du pH. (En présence de pyrogallol comme substrat).	34
Figure 13	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes (<i>Phoenixdactylifera</i> L.) Deglet Nour après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrogallol comme substrat)	35
Figure 14	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes (Degla beida après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrogallol)	35
Figure 15	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrogallol comme substrat.	36
Figure 16	Effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par pyrogallol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Deglet Nour: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk	39
Figure 17	Effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par pyrogallol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L Degla Beida : (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.	40
Figure 18	Effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par pyrogallol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L Ghars : (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk	41
Figure 19	Effet de la concentration du pyrogallol oxydase de (<i>Phoenix dactylifera</i> L) Deglet Nour sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5 ; 30°C pyrogallol 100 mM)	44
Figure 20	Effet de la concentration du pyrogallol oxydase de (<i>Phoenix dactylifera</i> L) Degla beida sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5 ; 30°C ; pyrogallol 100 mM).	44
Figure 21	Effet de la concentration du pyrogallol oxydase de (<i>Phoenix dactylifera</i> L) Ghars sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5 ; 30°C ; pyrogallol 100 mM).	45

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Chapitre 1		
Tableau 1	Nombre de palmier dattier en Algérie	4
Tableau 2	Catégories de dattes selon leur consistance et teneur en eau	6
Tableau 3	Composition en sucres des variétés Ghars, Déglet-Nour et Déglâ-Beida	8
Tableau 4	Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale	20
Tableau 5	Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origines végétales	24
Chapitre 3		
Tableau 6	Valeurs de pH optimum de la PPO des dattes en présence de pyrogallol comme	32
Tableau 7	Température optimales de la PPO des dattes en présence de pyrogallol comme substrat	37
Tableau 8	Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de pyrogallol comme substrat	42

Liste d'abréviations

Abs : l'absorbance

CV : cultivât

DOPA : dihydroxy phénylalanine

ES : complexe actif enzyme-substrat

ESS : complexe inactif

K_m: constante de Michaelis (constante de dissociation) (mM)

K_s : la constante de dissociation

PPO: polyphénoloxydase

PVPP: polyvinyl polypyrrolidone

trs/min : tour par min

UV: ultra-violet

V₀: La vitesse initiale (Abs/min)

V_m: vitesse maximale de la réaction (Abs/min)

[E]₀ : Concentration initiale en enzyme (mM)

[S] : la concentration de pyrogallol (mM)

الملخص

الهدف لاساسي من هذا العمل هو دراسة الشروط المثالية لمتعدد الفينول أكسيداز المستخرج من التمور (فونكس داكتيليفيرل) : دقلة نور, دقلة البيضة, الغرس. متعدد الفينول أكسيداز لأنواع هذه التمور تمتلك نشاط البيغوالول أو أكسيداز المقاسة بالسبكتروفوتومتر عند 330 نانومتر في حضور البيغوالول كركيزة. إن دراسة لثبات الحرارة الحاراري بينت أن البيغوالول أكسيداز مستقر حراريا الى غاية الدرجة 60° و ما فوق هذه الحرارة تؤدي الى تناقص نشاط هذا الأنزيم تدريجيا, و بالزيادة قيم درجة الحموضة المثلى والعوامل الحركية قدرها كالتالي:

دقلة نور (pH=4.5 $V_{max}= 0,339\pm 0,005$ Abs /min, $K_m=20,339 \pm 1,105$ mM)

دقلة البيضة (pH=4.5, $V_{max}= 0,162\pm 0,003$ Abs /min, $K_m= 21,393\pm 1,449$ mM)

الغرس (pH=4.5, $V_{max}= 0,1249\pm 0,015$ Abs /min, $K_m= 18,241\pm 0,888$ mM)

الكلمات المفتاحية: فونكس داكتيليفيرال, متعدد الفينول أكسيداز, الشروط المثالية

Résumé

L'objectif principal de ce travail est l'étude des conditions optimales de la polyphénol oxydase (PPO :EC 1.10.3.1) extraite des dattes (*Phoenix dactylifera* L) cv Deglet-Nour, cv Degla Beida et cv Ghars. La PPO de ces variétés des dattes possèdent une activité pyrogallol oxydase, mesurée par spectrophotométrie à 330 nm en présence de pyrogallol comme substrat.

L'étude de la stabilité thermique a montré que le pyrogallol oxydase est relativement thermostable jusqu'au 60°C au-delà de cette température l'activité de cette enzyme diminue progressivement, de plus les valeurs de pH optimum ainsi que les paramètres cinétiques ont été également estimées comme suit ; Deglet Nour (pH=4.5, $V_{max}= 0,339\pm 0,005$ Abs /min, $K_m=20,339 \pm 1,105$ mM) Degla beida (pH=4.5, $V_{max}= 0,162\pm 0,003$ Abs /min, $K_m= 21,393\pm 1,449$ mM), Ghars (pH=4.5, $V_{max}= 0,1249\pm 0,015$ Abs /min, $K_m= 18,241\pm 0,888$ mM).

Mots clés : *Phoenixdactylifera* L , Polyphénol oxydase , Condition optimales.

Abstract

This paper reports the study of the optimal conditions of polyphenol oxidase (PPO :EC 1.10.3.1) Extracted from three types of dates (*Phoenix dactylifera* L) cv Deglet-Nour, cv Degla beida and cv Ghars. The PPO of these date ones possess pyrogallol oxidase activity, measured by spectrophotometry at 330 nm using pyrogallol as substrate.

The study of thermal stability showed that pyrogallol oxidase is relatively thermostable up to 60 ° C Beyond this temperature the activity of this enzyme decreases progressively. In addition, optimum pH values and kinetic parameters were also estimated as follows:

Deglet Nour (pH=4.5, $V_{max}= 0,339\pm 0,005$ Abs /min, $K_m=20,339 \pm 1,105$ mM) Degla beida (pH=4.5 , $V_{max}= 0,162\pm 0,003$ Abs /min, $K_m= 21,393\pm 1,449$ mM), Ghars (pH=4.5, $V_{max}= 0,1249\pm 0,015$ Abs /min, $K_m= 18,241\pm 0,888$ mM).

Keywords: *Phoenixdactylifera* L , Polyphénol oxidase ,Optimal condition.

Sommaire

Sommaire

Dédicace	I
Remerciement	II
Sommaire	III
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
Les abréviations	VI
Résumé	VII
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
I.1 Palmier dattier	2
I.1.1 Nom vernaculaire et synonyme	2
I.1.2 Position systématique	2
I.1.3 Classification botanique	2
I.1.4 Ecologie	3
I.1.5 Répartition géographique	3
I.2 Les dattes	
I.2.1 Définition	5
I.2.2 Classifications des dattes	6
I.2.3 Formation et maturation de la datte	7
I.2.4 Les variétés des dattes	8
I.2.5 Composition biochimique des dattes	8
I.2.6 Valeur nutritionnelle et utilisation de la datte	11
II. Polyphénol oxydase	
II.1 Historique	12
II.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO	
II.2.1 Définition de la PPO	12
II.2.2 Classification et nomenclature	12

II.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO	
II.3.1 Caractéristiques réactionnelles	13
II.3.2 Caractéristique structurales	15
II.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOs	
II.4. 1 Source et localisation	17
II.4.2 Rôle physiologique	17
II.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique	18
II.6 pH et Température optimale	19
II.7 Spécificité de la PPO	21
II.8 Affinité et efficacité	23
II.9 Applications de la PPO	25

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

III.1 Matériels	
III.1.1 Matériel biologique	27
III.1.2 Produits chimiques	27
III.2 Méthodes	
III.2.1 Extraction de la PPO	27
III.2.2 Mesure de l'activité pyrogallol oxydase	27
III.2.3 Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO	28
III.2.4 Etude de la stabilité thermique de l'activité pyrogallol oxydase	28
III.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme	29
III.2.6 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité pyrogallol oxydase	29
III.2.7 Analyse des résultats expérimentaux	29

Chapitre 3 : Résultats et discussions

IV.1 Extraction du pyrogallol oxydase des dattes	30
IV.2 Effet du pH	32
IV.3 Etude de la stabilité thermique	34
IV.4 Détermination des paramètres cinétiques	37
IV.5 Effet de la concentration de l'enzyme	43

Chapitre 4 : Conclusion

Conclusion	47
-------------------	----

Références bibliographiques

Introduction générale

Introduction générale

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) est la plus importante culture des zones arides et semi-arides. Il joue un rôle important dans la vie économique et sociale des populations de ces régions (**Besbes.s et al., 2003**). Il donne une gamme étendue de produits dont la datte (**Djerbi., 1994**). Il existe un grand nombre de variétés de dattiers, estimé à environ 200, citant par exemple Deglet Nour, Ghars, Degla Beida, Tagarbouchet, Tamjoughret...etc (**Munier., 1973**).

Durant le développement et la maturation des dattes, des enzymes comme la polyphénol oxydase (PPO) jouent un rôle très important.

En présence de l'oxygène moléculaire, la PPO présente deux activités différentes, elle est capable d'hydroxyler les monophénols en o-diphénols (activité crésolasique ou monophénolasique), les o-diphénols ainsi formés sont oxydés à leur tour pour donner des o-quinones (activité catécholasique ou o-diphénoloxydasique) qui se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé mélanine (**Arslan et Doğan., 2005 ; Kolcuoğlu et al., 2006**). En raison de sa participation majeure dans le phénomène du brunissement enzymatique, la PPO a suscité l'attention considérable des chercheurs du domaine agro-alimentaire.

Dans ce sens l'objectif souligné dans notre étude vise à une compréhension du comportement cinétique de la PPO extraite de trois variétés des dattes « *Phoenixdactylifera* L : cv Deglet Nour, cv Ghars et cv Degla beida » par la détermination des conditions optimales de la PPO en présence d'un substrat triphénolique « Le Pyrogallol ».

De plus, l'originalité de ce travail est double d'une part le choix de trois sources des dattes et d'autre part le choix de substrat, dont la plupart des études sur la PPO implique l'utilisation de pyrocatechol comme substrat.

Dans le premier chapitre nous présenterons une synthèse bibliographique sur les dattes et une partie sur la PPO. Suivie par le deuxième chapitre qui traite les différentes procédures expérimentales utilisées, tandis que nous allons présenter nos résultats avec une discussion dans le troisième chapitre.

Vers la fin une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans le dernier chapitre.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

I.1 Palmier dattier : Généralités

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1753. Phoenix dérivé de Phoinix, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme arbre des phéniciens, dactylifera vient du latin dactylus, dérivant du grec dactylos, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin fero, porté, en référence aux fruits.(Munier., 1973).

I.1.1 Nom vernaculaire et synonyme

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

I.1.2 Position systématique

La plante *Phoenixdactylifera* L. est une espèce dioïque, fait partie de la classe des Monocotylédones, d'une famille de plantes tropicales (Palmoe ou Arecaceae), 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 Coryphoïdées est elle-même subdivisée en trois tribus (Riedacker et al., 1990).

I.1.3 Classification botanique

La classification botanique du palmier dattier donnée par (Djebri., 1994) et (Feldman., 1976) est la suivante:

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

I.1.4 Ecologie

C'est une espèce arborescente connue pour son adaptation aux conditions climatiques très sévères des régions chaudes et sèches (**Ghazi et Sahraoui ., 2005**).

Le dattier est une espèce thermophile ; il exige un climat chaud, sec et ensoleillé. C'est un arbre qui s'adapte à tous les sols. Il est sensible à l'humidité pendant la période de pollinisation et au cours de la maturation (**Munier., 1973 ; Toutain., 1979**).

Le palmier dattier commence à produire des fruits à un âge moyen de 5 ans, et continue la production avec un taux de 400 à 600Kg /arbre/an pour plus de 60ans (**Imad et al.,1995**).

Ces arbres sont connus : une température constante supérieure à 30°C (espèces thermophile) pendant la maturation, une forte luminosité, une humidité relative faible, surtout pas de pluie sur les fruits. Il supporte un léger degré de salinité (**Munier., 1973 ; Toutain., 1979**).

I.1.5 Répartition géographique

- **En Algérie**

En général 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 (**Messaid., 2007**) 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%.(**Messaid., 2007**).

Notons que sur un nombre de 13,50 millions de plantes cultivés, 69,4 % sont productifs. C'est aussi dans ces régions que sont produites les belles dattes, Deglet Nour et autres variétés commerciales: Ghars, Mech Degla, Degla Baida....etc (**Quinten., 1996**).

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Nombre de palmier dattier en Algérie (Noui., 2007)

wilaya	Deglet-Nour (datte fine)	Ghars (datte molle)	Degla Beida (datte sèche)	Total palmier dattier
Adrar	0	0	2150904	2904150
Laghouat	8470	7650	11580	27 700
Batna	700	3900	21270	25870
Biskra	1 964 460	436 530	748 200	3 149 190
Bechar	5650	0	0	770 030
Tamanrasset	2970	0	0	167 760
Tébessa	49 550	49 550	10 650	68 970
Djelfa	2610	860	210	3 680
M'sila	18 000	0	0	18 000
Ouargla	1092330	783850	193130	2310069
El-Bayedh	0	45 900	0	193130
Illizi	2250	16340	73030	91620
Tindouf	350	24250	0	24600
El-Oued	1 884030	703330	296300	2660883
Khenchla	21 290	44 800	73 70	73460
Naama	0	19600	2600	22 200
Ghardaïa	377 100	154 400	378 900	910 400
total	3559930	1660761	4048710	13 505880

- **Dans le monde**

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 débutée réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés irakiennes (**Bougedoura., 1991 ; Matallah., 2004**).Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (**Matallah., 2004**).

I.2 Les dattes

I.2.1 Définition

La datte est une baie ayant une seule graine communément appelée noyau. Elle comporte (figure 1) :

- 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 copect 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**).

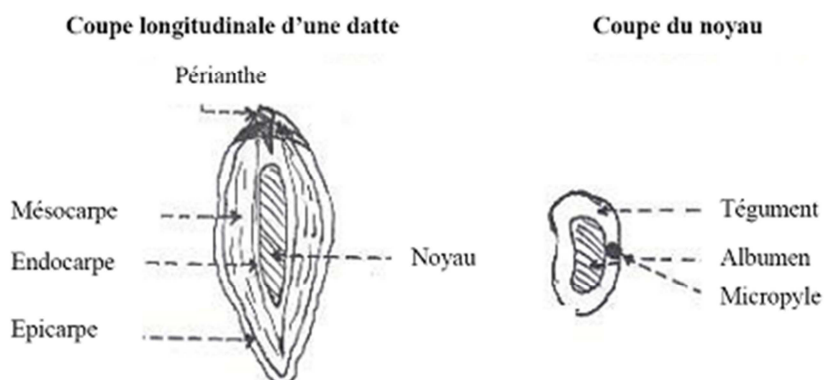


Figure 1: Datte et noyau du palmier dattier (**Buelguedj., 2001**)

Les dattes sont en général de forme allongée, oblongue ou ovoïde (figure 2), mais il en existe cependant quelques-unes pratiquement sphériques, la Tinteboucht 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**).

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

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).

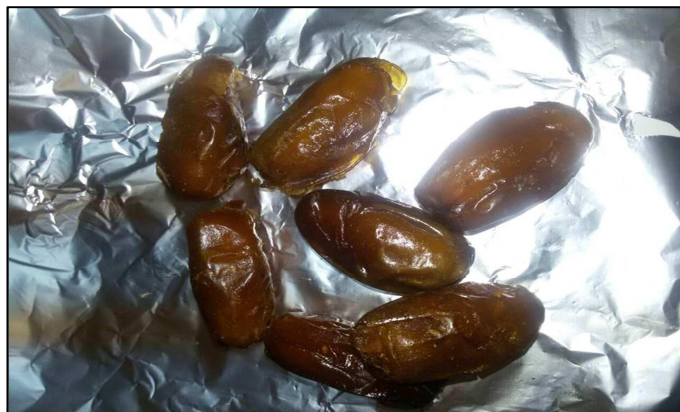


Figure 2 : la variété de datte Deglet Nour

I.2.2 Classifications des dattes :

Du point de vue biochimique pour **Munier (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 telle que Meche -Degla, Degla Beida.....etc

Tableau 2 : Catégories de dattes selon leur consistance et teneur en eau (**Noui., 2007**).

Variété	Consistance	Teneur en eau
Deglet Nour	Demi-molle	22,60
Degla beida	Sèche	13,70
Ghars	Molle	25.40

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

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 et conduit à la classification suivante :

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

Pour $r = 2$ la stabilité du fruit est optimale et son aptitude à la conservation est très appréciable. (Munier., 1973)

I.2.3 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 quatre semaines (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

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

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.2.4 Les variétés des dattes :

Elles sont très nombreuses et se différencient par leurs saveurs, consistances, formes, couleurs, poids et dimensions (Djerbi, 1994 ; Belguedj., 2001).

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 (Hannachi 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 (Hannachi et al., 1998)

I.2.5 Composition biochimique des dattes

1- Sucres

Le tableau suivant montre que la teneur en sucres dans les dattes est très variable selon les variétés.

- **Sucres totaux**

La teneur des dattes en sucres totaux est de 73.42% pour la variété Ghars, de 42.01% pour la variété Déglet-Nour et de 55.17% pour la variété Dégla-Beida (Sayah., 2008)

- **Sucres réducteurs**

Dégla-Beida et Déglet-Nour ont des teneurs relativement faibles en sucres réducteurs (33.89%) par rapport à la variété Ghars (26.44%) (Sayah., 2008).

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

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)

Tableau 3 : Composition en sucres des variétés Ghars, Déglet-Nour et Dégla-Beida (Belguedj., 2002)

Variétés		Pourcentage par rapport à la matière sèche		
Consistance	Appellation	Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose
Molle	Ghars	85.28	80.68	04.37
Demi-molle	Déglet- Nour	71.37	22.81	46.11
Sèche	Dégla-Beida	71.0	42.00	30.36

2- Protéines

La teneur moyenne en protéines de la variété Dégla-Beida est de 2.04 ± 0.8 (Sayah., 2008), par contre Ould el hadj et al (2012) ont trouvés 0.53 ± 0.08 %. Déglet-Nour a un taux en protéine égale à 0.79 ± 0.06 %, ce taux est faible dans la variété Ghars (0.05 ± 0.12 %) (Sayah., 2008)

3- Lipides

La teneur en lipides des variétés Ghars, Déglet-Nour et Dégla-Beida est faible. Elle est de 0.07 ± 0.06 % pour la variété Ghars, de 0.11 ± 0.06 % pour Déglet-Nour et de 0.12 ± 0.06 % pour Dégla-Beida (Sayah., 2008)

4- Teneur en matière grasse

Selon Amellal (2008), la variété Dégla-Beida présente une teneur en matière grasse limité entre 0.101 ± 0.001 %.

5- Teneur en pectine

Dégla-Beida a une teneur en pectine égale à 0.154 ± 0.003 % (Amellal., 2008). (Sayah., 2008) estime une teneur égale à 1.04 ± 0.037 % pour cette même variété. Pour la variété Déglet-Nour et Ghars leurs teneurs en pectines sont respectivement de 2.51 ± 0.08 % et 1.1 ± 0.12 %.

6- 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).

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

La variété Ghars a une teneur en cellulose égale à $1.12\pm 0.37\%$, celle de Déglet-Nour égale à $4.71\pm 0.23\%$ et de Dégla-Beida égale à $1.85\pm 0.79\%$ (**Sayah., 2008**).

7- Vitamines

En général, la dattes 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-Eléments minéraux

La dattes 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**).

9- Composés phénoliques

Selon **Telli (2009)**, pour la variété Ghars, la concentration en polyphénols totaux la plus élevée au cours de premier stade de la maturation (Hababoukou Loulou).

Sayah (2008) rapporte que la concentration en composés phénoliques de la variété Ghars est de 263.04 ± 6.09 mg/100g, celle de Déglet-Nour est de 195.91 ± 6.98 mg/100g et de Dégla-Beida est de 217.55 ± 4.24 mg/100g.

10-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 dattes 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 pectinmethyl esterase :**

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

- **La polyphénoloxydase :**

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

- **Brunissement des dattes :**

Le brunissement est attribué à des réactions enzymatiques et non enzymatiques touchant le matériel végétal lorsque les cellules du tissu sont endommagées.

- **Brunissement enzymatique :**

Est le contact accidentel du substrat et l'enzyme. Ce phénomène est le résultat de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques en quinones qui se polymérisent en produits bruns (Goupy et *al.*, 1990)

- **Brunissement non enzymatique :**

Ce type de brunissement concerne les sucres, il aboutit à la formation de polymères bruns ou noirs (pigments) à partir de la condensation d'un composé carbonyle (sucre réducteur) et d'une fonction amine (NH₂) libre d'une protéine ou d'un acide aminé (Bouras., 1994).

I.2.6 Valeur nutritionnelle et utilisation de la datte

La datte constitue un excellent aliment, de grande valeur nutritive et énergétique décrite selon Toutain (1979) 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 en 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. Egalement 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 ; Jaccot et Campillo., 2003).

II. Polyphénol oxydase

II.1 Historique

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (**Whitaker., 1995**)

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

C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (**Lerch., 1981; Jolivet et al., 1998**). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte il y'a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la PPO a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomea batatas* (**Klabund et al.,1998**),et depuis, la PPO a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été 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.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO

II.2.1 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. Bien que le terme générique de PPO soit couramment utilisé, il s'agit en réalité d'une vaste famille d'enzymes réunissant les tyrosinases (EC 1.14.18.1), les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1) et les laccases (EC 1.10.3.2) (**Mesquita et Queiroz.,2013**).

II.2.2 Classification et nomenclature

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-diphénoloxydase 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.)

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

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 ; Mesquita et Quei roz., 2013**)

La PPO catalyse l'o-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (l'activité diphenolase) avec l'oxygène comme oxydant primaire (**Mayer.,2006 ; Mesquita et Queiroz.,2013**)

L'activité monophenolase (EC 1.14.18.1), également appelée hydroxylase ou crésolase, est toujours couplée à l'activité diphenolase (EC 1.10.3.1), catécholase ou oxydase. Toutefois, l'activité diphenolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (**Mayer., 2006 ;Mesquita et Queiroz.,2013**).

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

II.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO

II.3.1 Caractéristiques réactionnelles

La PPO accomplit l'o-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (l'activité diphenolase) 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 diphenolase (EC 1.10.3.1), catécholase ou oxydase. (**Whitaker.,1994**).

II.3.1.1 Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)

Les monophénols 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 la règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat.

L'activité monophénoloxydase 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 ; Martinez et al.,2012**).

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

II.3.1.2 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 mélanoïdines (Lerner.,1953).

II.3.1.3 La laccase (EC 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité p-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase (Figure 3) L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radicale 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 ; Madhavi et Lele.,2009).

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).

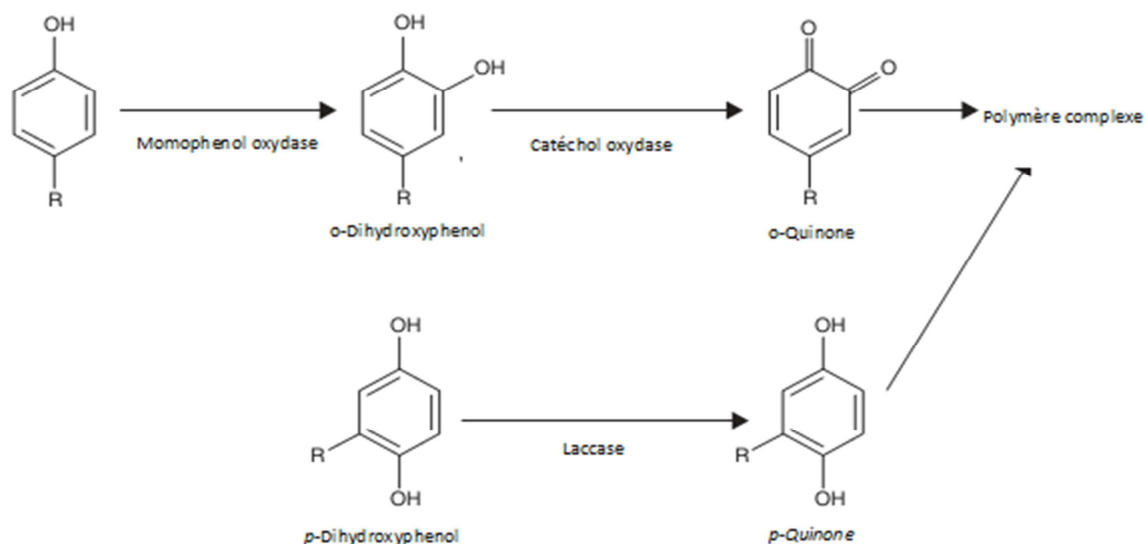


Figure 3 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases.(Giardina et al.,2010).

II.3.2 Caractéristique structurales

II.3.2.1 La structure

En général, le poids moléculaire de PPO varie considérablement d'une source à une autre, les PPO de nombreuse sources végétales ont des masses moléculaires de 32 à plus de 200 kDa, essentiellement dans l'intervalle de 35-70 kDa (**Van Gelder et al.,1997, Klabunde.,1998 ;Yang et al., 2000 ;Virador et al.,2010**)

La PPO est une métallo-enzyme contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique, ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine(**Yang et al., 2000**).

Site actif

Garcia-Borronet Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch.,1982**).

Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomeabatatas*) (**Klabunde et al.,1998**). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (**Mayer.,1987**).

La structure cristalline de la PPO de *Vitisviniferaa* été récemment résolu (**Virador et al.,2010**) , sa similitude avec les structures cristallines de la catéchol-oxydase de *Ipomoea batatas* (**Klabunde.,1998**) et l'hémocyanine de *Enteroctopusdofleini* (**Cuff.,1998**) soutient d'avantage la théorie d'un mécanisme catalytique identique entre ces dernières enzymes.

La PPO de *Vitisvinifera*est une protéine monomérique de 38,4 kDa (figure4).La structure secondaire est essentiellement α - hélicoïdal avec un noyau formé de quatre α -hélices ; α_4 , α_5 , α_{12} , et α_{14} ,le centre catalytique formé de deux atomes du cuivre est entouré par les hélices α_3 et α_9 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 26 et Cys 25–Cys 88) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle. La paire

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

de cuivre (CuA et CuB) (figure 5) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α . Le CuA est coordonné par l'His 87, His 108, et l'His 117.

L'His 87 est situé au milieu de l'hélice α_4 , tandis que l'His 108 et His 117, sont au début et au milieu de l'hélice α_5 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 239, His 243 et l'His 272. Ces résidus d'histidines, sont localisés au début et à la fin de l'hélice 12 et 14, respectivement. H108, se lie de façon covalente au Cys 91.(Virador et al.,2010).

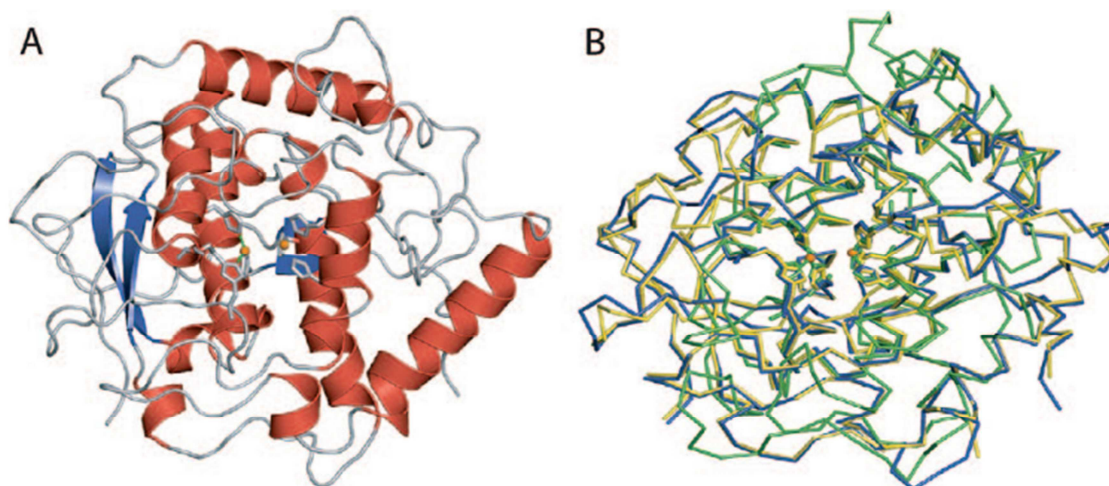


Figure 4 : Diffraction aux rayons X de la PPO de *V.vinifera*. (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, les deux β -feuilles (Bleu), les quatre hélices (Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de C α de *V.vinifera* PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et *Neurospora crassa* (vert).

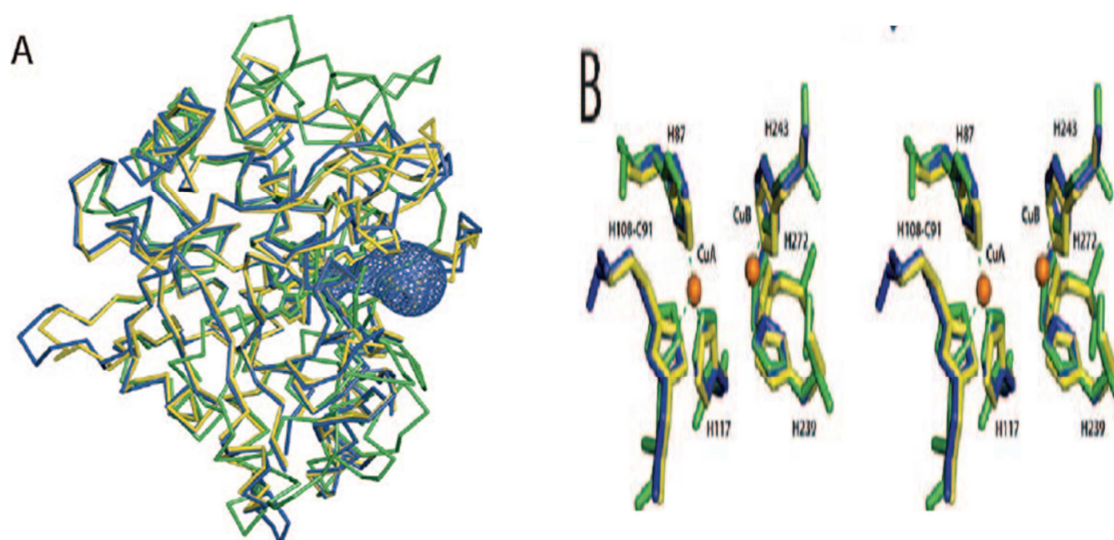


Figure 5 : Site actif de la PPO de *V.vinifera* PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et *N.crassa* enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER, (b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres, la distance internucléaire était :Cu-Cu, 4,17Å°; CuA à H87, 2,07°; à H108, 2,16°; H117, 2,35°; Cu B à H239, 2,04Å°; à H243, 2,15Å°; à H272, 2,02Å°.

II.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOs

II.4. 1 Source et localisation

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

La localisation subcellulaire attribue à la PPO une fonction physiologique (Mayer et Harel.,1979), l'emplacement de la PPO a toujours été d'un intérêt particulier pour les chercheurs dans le domaine agro-alimentaire. La PPO se trouve dans une variété de fractions subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries et les microsomes (Harel et al.,1964 ;Shomer et al., 1979; Mayer et Harel .,1979; Martinez et al.,1989).

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides. alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (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).

II.4.2 Rôle physiologique

La localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh., 1999).

En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn.(1991) ont montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*). Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez etWhitaker., 1995).

Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (Mayer et Harel.,1991;Walker et Ferrar.,1995) et plusieurs hypothèses sont émises. La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker.,1995;Fenoll et al., 2004).

Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine (Steffens et al.,1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

la biosynthèse des composés phénoliques (Vámos-Vigyázó.,1981; Zawistowski et al ., 1991).

II.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sanchez-Ferrer et al (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire. La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif (figure6) passe alors sous forme *Désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite.

Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme *Oxy*. Cette dernière peut prendre en charge aussi bien les mono que les o-diphénols. Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme *Désoxy*). Ces phénomènes sont liés à des légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (Eicken et al., 1999).

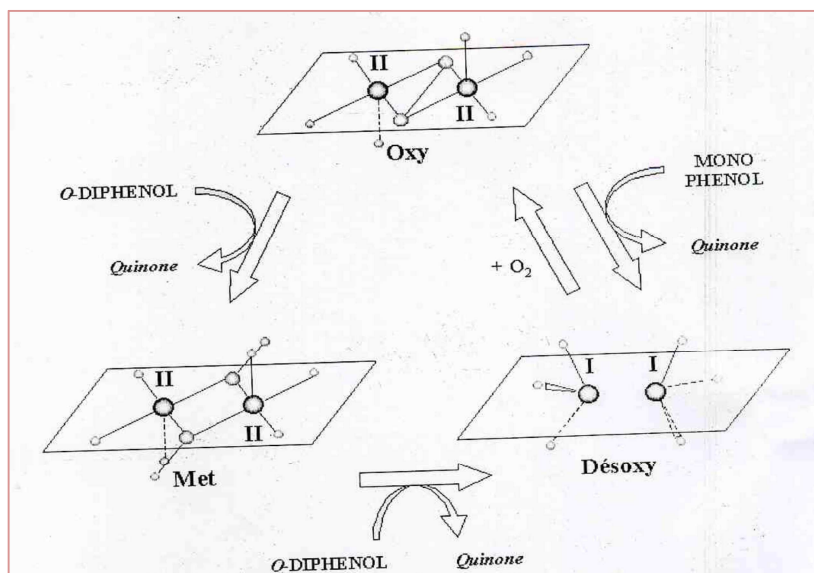


Figure 6: Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (*Met*, *Deoxy*, et *Oxy* PPO) d'après Van Gelder et al (1997).

II.6 pH et Température optimale

Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale, mais il est généralement dans la gamme de 4,0 à 8,0 il est influencé par un certain nombre de facteurs expérimentaux tels que les méthodes d'extraction, de la température, la nature du substrat phénolique et système de tampons utilisé au cours d'élimination (**Mayer et al.,2006**).

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme par exemple, la PPO de persil (**Yusuf et Mustafa.,2012**) présente une activité maximale à pH 8,5 avec le pyrogallol, mais un pH de 4 avec le 4-méthylcatéchol (Tableau 4).Les valeurs de pH optimum en présence de même substrat vis-à-vis des PPO d'origine différente sont également variables dont en présence de L-dopa, la valeur de pH optimum pour le persil égale à 4,5 (**Doğru et Erat., 2012**) tandis que pour celle de chèvrefeuille du Japon égale à 7,5.(**Goyeneche et al ,2013**).

Les valeurs de pH optimums de la PPO est également exposé à des changements lorsqu'il est testé en présence d'un détergent, le comportement de la PPO de pomme en fonction de pH est modifié en présence de SDS ; quel que soit le substrat, l'activité de la PPO de pomme est inhibée à un pH acide et activé à un pH supérieur à 5,0 et ceci en présence de 3,5 mM SDS (**Marques et al.,1995**).

La température est un autre facteur très important influençant sur l'activité enzymatique, la PPO n'appartient pas aux enzymes extrêmement stable à la chaleur. Les traitements thermiques de courtes durées de l'enzyme dans les tissus ou en solution, à des températures de 70 à 90 ° C sont, dans la plupart des cas, suffisants pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction de catalyseur. L'exposition à des températures inférieures à zéro peuvent également affecter l'activité enzymatique (**Queiroz et al., 2008**).

Chutintrasr et Noomhorm (2006), ont montré que l'activité PPO d'ananas, a été réduite d'environ 60% après une exposition à 40-60 °C, pendant 30 min. La valeur de la température optimale de la PPO dépend notamment de substrat (Tableau 4), du pH optimum, et également de la source de l'enzyme. Elles varient entre 20 et 65°C. Les résultats ainsi récapitulés dans le tableau « 4 » montrent, que pour une même enzyme, la température optimale peut varier en fonction de substrat, par exemple pour la PPO de radis (**Goyeneche et al., 2013**) des valeurs de températures optimales égales à 40 °C et 20°C, en présence de catéchol et pyrogallol, respectivement, ont été obtenus. Pour deux PPO

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

d'origine différente la température optimale change vis-à-vis de même substrat par exemple en présence de L-tyrosine la PPO de Chien-rose présente une température optimale égale à 65°C. (Sakiroglu et al.,1996), tandis que pour la PPO de cerise une valeur de 47 °C a été estimée (Kumar et al.,2008).

Tableau 4 : Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.

Source	Substrat	pH optimum	Température optimale	Référence bibliographique
<i>Chien-rose</i> (<i>Rosa dumalis</i> Rechst)	Catéchol	8,5	25	Sakiroglu et al.,(1996)
	4-méthylcatéchol	8,5	20	
	Pyrogallol	7	15	
	L-Tyrosine	7	65	
	P-cresol	5	60	
<i>Murier blanc</i> (<i>Morus alba</i> L.)	Pyrogallol	7,5	20	Arslan et al.,(2004)
<i>Banane</i> (<i>Musa cavendishii</i>)	Catéchol	7	30	Ünal et al.,(2007)
	Catéchol	7	40	
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	L-Tyrosine	5,2	47	Kumar et al., (2008)
	Pyrogallol	8	30	
<i>Blé</i> (<i>Triticumaestivum</i>)	Catéchol	4,5	40	Erat et al,(2010)
	Catéchin	5	35	
	pyrogallol	5	30	
	L-dopa	5	40	
	Dopamine	4,5	35	
	4-méthylcatéchol	5	35	
Persil (<i>Petroselinumcrispum</i>)	Catéchol	4	40	Doğru et Erat., (2012)
	4-Methylcatechol	4	40	
	Pyrogallol	8,5	35	
	L-Dopa	4,5	45	
	Dopamine	8	45	
	Catéchin	4	35	
<i>Radis</i> (<i>Raphanussativus</i>)	Catéchol	7	40	Goyeneche et al.,(2013)
	Pyrogallol	7	20	
<i>Chèvrefeuille</i> (<i>Lonicerajaponica</i>)	L-Dopa	7,5	25	Na-Na et al.,(2013)

II.7 Spécificité de la PPO

Les composés phénoliques sont des substances naturelles qui contribuent à la richesse sensorielle (couleur, goût, arôme et texture) associée à la qualité des fruits ,toutefois, les PPO des plantes présentent grandes spécificités vis-à-vis de ces composés et sont capables d'oxyder une variété de mono, di ou des polyphénols. **(Es-Safi et al.,2003).**

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase) peuvent catalysées une grande variété des substrats **(Whitaker.,1995).**L'activité diphénolase du PPO est généralement la plus répandue dans les plantes, quand les deux activités monophénolase et diphénolase sont présentes, le rapport de l'activité monophénolase à celle de l'activité diphenolase varie de 1:10 à 1:40 selon les sources végétales **(Perez et al.,2001.,Mesquita et Queiroz.,2013).**

La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO, trouvés dans les fruits et légumes **(Zawistowski et al., 1991 ; Vámos-Vigyázó.,1981 ; Trebst et Depka .,1995).**

Ces composés phénoliques sont des substrats primaires de PPO (Figure 7).Les types et les concentrations relatives des phénols naturels varient considérablement pour les différentes sources végétales. Par exemple, la catéchine est un composé phénolique majeur trouvé dans le thé **(Ullah.,1991)** et le persil **(Doğru et Erat.,2012)**, tandis que l'acide chlorogénique est présent dans le Radis **(Goyeneche et al.,2013)**,et l'aubergine **(Todaro et al .,2011).**

Yang et al.(2000) ainsi que **Sojo et al.(1998)**,ont rapporté que le brunissement enzymatique dans la pulpe de banane est causé par l'oxydation du composé phénolique, « la dopamine », en présence de substrats endogènes.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

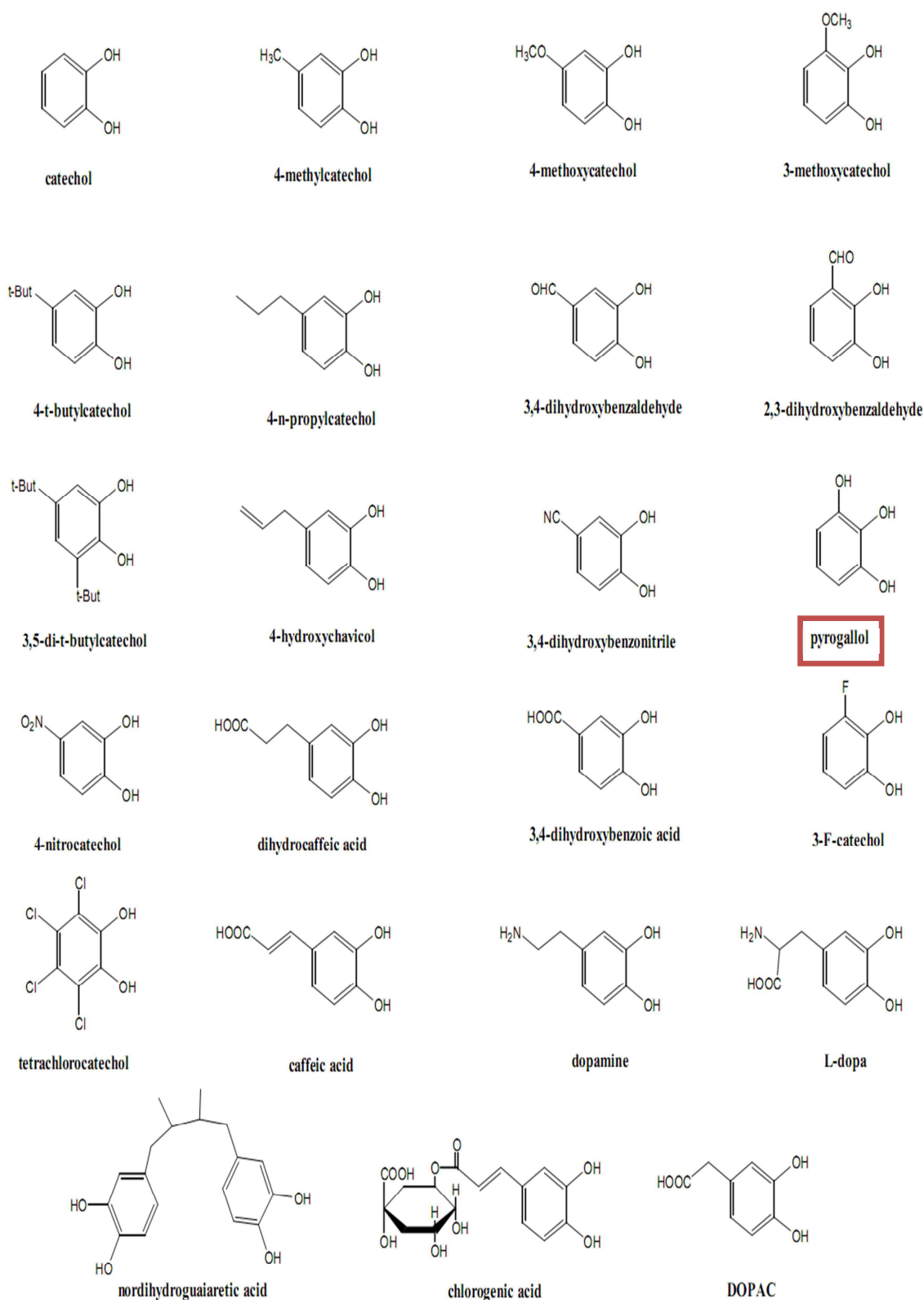


Figure 7 : Structure de quelques substrats phénoliques (Majid et al.,2004).

II.8 Affinité et efficacité

La spécificité de l'enzyme est évaluée en estimant deux paramètres cinétiques : la valeur de K_m qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse V_{max} . Les valeurs de K_m et V_{max} de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, et la méthode utilisée pour son extraction (**Dogan et Dogan.,2003 ;Ziyan et Pekyardimci.,2004**).

Les valeurs de K_m varient entre $7,4\mu\text{M}$ et 77mM (Tableau 5) avec une meilleure affinité pour la PPO de persil vis-à-vis de pyrogallol comme substrat (**Doğru et Erat.,2012**). L'affinité change avec le type de substrat utilisé et/ou même entre deux PPO de sources différentes vis à vis de même substrat. Pour la PPO de radis ,par exemple, des valeurs de K_m différentes égales à $4,2\text{mM}$ et 77mM en présence d'acide gallique et d'acide caféique, respectivement, ont été estimées (**Goyeneche et al.,2013**).De même, une valeur de K_m valant 1354 fois plus grande a été estimée pour la PPO de cerise ($K_m= 10,7\text{mM}$)(**Kumar et al.,2008**) par rapport à celle de persil($K_m=7,9\mu\text{M}$,**Doğru et Erat.(2012)**) et ceci en présence de catéchol comme substrat.

Les valeurs de V_{max} sont également dépendantes de substrat et source d'enzyme et elles ont une gamme comprise entre $3,22\text{UI}/\text{min}$ et $1695\text{UI}/\text{min}$..La comparaison des valeurs de V_{max} des travaux de **Dogan et al .(2005)** avec celles de **Kumar et al.(2008)** qui ont travaillé sur la PPO de cerise (*Malpghiaglabra*),montre l'effet de la méthode d'extraction et /ou purification sur l'efficacité catalytique de l'enzyme ,ainsi, les valeurs de vitesses maximales changent pour la même enzyme en fonction de substrat utilisé.

Pour la PPO de radis (**Goyeneche et al.,2013**),un rapport de 8 fois plus grand en utilisant l'acide caféique par rapport au catéchol comme substrat a été rapporté.Tableau 5

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

Tableau 5: Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origines végétales

Source	substrat	Vmax	K_m (mM)	Référence bibliographique
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Catéchol	6,97 (μ M/min)	10,7	Dogan et al .,(2005)
	Pyrogallol	13,93	11,6	
	4-méthylcatéchol	12,20	5,2	
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Catéchol	79.5 (μ M/min)	10.7	Kumar et al., (2008)
	pyrogallol	8.8 (μ M/min)	5.2	
	4-méthylcatéchol	125 (μ M/min)	11.6	
Blé (<i>Triticumaestivum</i>)	Catéchol	3.21 (UI/min ml)	0.1243	Erat et al.,(2010)
	Pyrogallol	2.43	0.1040	
	4-méthylcatéchol	3.02	0.8861	
Aubergine (<i>Solanummelongena L</i>)	Catéchol	2,34 (μ M/min)	2.973	Todaro et al.,(2011)
	4-methylcatechol	5,55	2.122	
	Acide chlorogénique	2,31	1,351	
Persil (<i>Petroselinumcrispum</i>)	Catéchol	0,39 (Δ Abs/ml min)	$7,9 \cdot 10^{-4}$	Doğru&Erat.,(2012)
	Pyrogallol		$7,4 \cdot 10^{-4}$	
	4-méthylcatéchol		$9,7 \cdot 10^{-4}$	
	L-Dopa		$1,5 \cdot 10^{-4}$	
	Dopamine		5,93	
	Catéchin		$1,6 \cdot 10^{-2}$	
Radis (<i>Raphanussativus</i>)	Acide gallique	233 (UI/min ml)	4,2	Goyeneche et al. ,(2013)
	Acide pyrogallique	4348	6,3	
	Acide chlorogénique	302	7,2	
	L-tyrosine	495	9,3	
	Catéchol	1587	28,3	
	Acide caféique	1695	77.0	

La constante de Michaelis-Menten (**K_m**) est la concentration du substrat à laquelle la vitesse de réaction est à la moitié de sa valeur maximale (**V_{max}**). Autrement dit :

$$K_m = V_{max}/2 \quad (\text{se mesure en mmol dm}^{-3}) \quad (\text{F.Lépine.,2001})$$

II.9 Applications de la PPO

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

Les polyphénols oxydases, en particulier les laccases ont d'intérêts dans la cuisson car elles sont capables de former des biopolymères par le phénomène de cross-link (Rodriguez et Toca.,2006).

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

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

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

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

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

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

Chapitre 1 :Synthèse bibliographique

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

Matériels et méthodes

III.1 Matériels

III.1.1 Matériel biologique

Les variétés des dattes (*Phoenix dactylifera* L : Deglet Nour, Degla Beida et Ghars) sont utilisées comme source de l'enzyme polyphénol oxydase.

III.1.2 Produits chimiques

La pyrogallol est fourni par Fluka; acide orthophosphorique (84-90% Prolabo Ph. Eur) ; le $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,5% Prolabo R. P Normapur) ; le $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,5% Prolabo R. P Normapur); acétate de sodium; acide acétique; Acétone (99,8% Carlo Erba)

III.1.3 Matériels de laboratoire

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

III.2 Méthodes

III.2.1 Extraction de la PPO

150g de chair de dattes lavées à l'eau distillée, séchés à l'air libre et refroidis à (-15°C). Ensuite sont homogénéisés pendant 2 min à l'aide d'un mixeur dans 225 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate refroidis (0.05 M à pH 7,0) contenant 3,75g de PVPP (1%).

Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de la gaze par pressage manuel. Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000 trs/min dans une centrifugeuse.

Le surnageant récupéré d'un volume total de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait brut de la PPO. L'extrait brut de la PPO est conservées à -10 °C.

III.2.2 Mesure de l'activité pyrogallol oxydase

L'activité pyrogallol oxydase de l'extrait brut de la PPO des dattes a été mesurée à 330 nm en utilisant le pyrogallol comme substrat pour la mesure directe de la formation des *o*-quinones à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific Helios γ) en présence oxygène/aire (Fan et Flurkey., 2004 ; Espín et al., 1995).

Le pyrogallol 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 de substrat à 100 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 40 μl d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant deux minutes après l'ajout de l'extrait

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

enzymatique. La vitesse initiale (v_0) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Figure 8) (Ünal., 2007).

Les solutions tampon et de substrat sont pré-incubées dans un bain marie réglé à 30°C pendant 5 min.

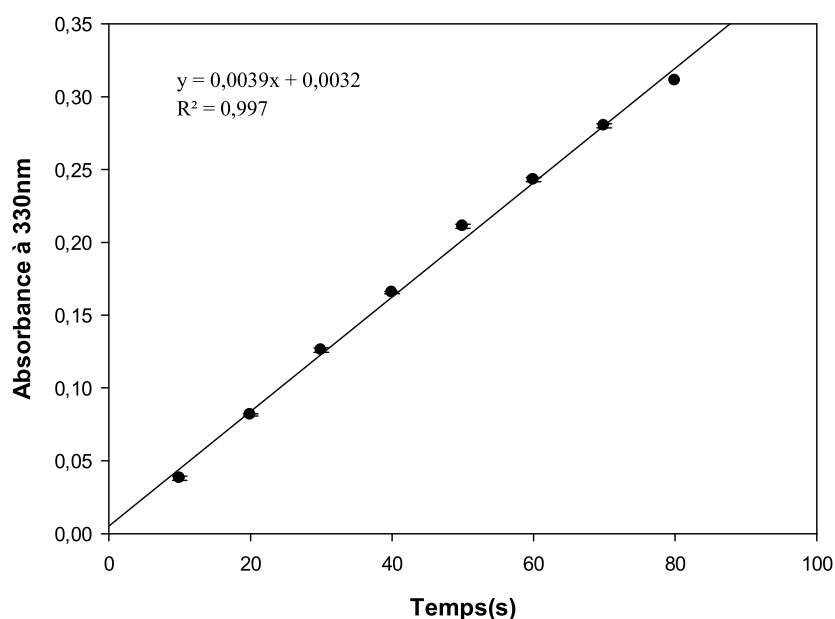


Figure 8 : Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera* L cvDeglet nour.) (pH 4.6-0.05 M tampon acétate de sodium ; pyrogallol 100 mM ; 30°C, extrait enzymatique 40 μ l).

III.2.3 Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO

L'activité o-diphénolase de la PPO est mesurée à 30°C dans l'intervalle de pH compris entre 2,5 à 8,0. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0,05 M ; pH 3,0-6,0), le tampon phosphate de sodium (0,05 M ; pH 6,0-8,0). Le pyrogallol à 100 mM est utilisé comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

III.2.4 Etude de la stabilité thermique de l'activité pyrogallol oxydase

L'activité enzymatique résiduelle de l'extrait brut de la PPO est mesurée après 10 minutes d'incubation des tubes en verre de 1 mm d'épaisseur contenant 2 ml d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 à 90°C.

Après traitement thermique, les tubes sont refroidis rapidement dans l'eau froide et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 4,5 (tampon acétate de sodium 0,05 M) et à

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

30°C, en présence de 100mM du pyrogallol comme substrat.

Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement (**Doğan et al., 2005**). L'activité enzymatique résiduelle est calculée à partir de la formule suivante :

$$AR_{(\%) } = \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

- A_0 est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C)
- A_t est l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois

III.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme

La vitesse initiale de l'oxydation de pyrogallol à 100mM par la PPO des dattes est mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 80 μ l.

L'activité enzymatique a été mesurée à pH 4,5 (tampon acétate de sodium 0,05 M) et à 30°C.

III.2.6 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité pyrogallol oxydase

Pour déterminer les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'extrait brut de la PPO de ces trois variétés des dattes, l'activité enzymatique est mesurée à pH 4,5 (tampon acétate de sodium à 0,05 M) et à 30°C, à différentes concentrations des pyrogallols compris entre 10 à 120 mM.

Les valeurs des paramètres cinétiques ont été estimées à l'aide des représentations graphiques de Michaelis-Menten (V_0 vs $[S]$) et de Lineweaver-Burk (1934) ($1/V_0$ vs $1/[S]$).

III.2.7 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2,03 , Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 97-2003), SigmaPlot 2008 (Systat Software, Inc., Windows Version 11.0) et Origin 6.0 (Microcal(TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

Résultats et discussion

IV.1 Extraction du pyrogallol oxydase des dattes

La pyrogallol oxydase a été facilement isolée à partir de trois variétés des dattes (*Phoenix dactylifera* L) : Deglet-Nour, Ghars et Degla Beida à l'aide d'un protocole simple à mettre en œuvre. L'extrait enzymatique brut est capable de catalyser l'oxydation de pyrogallol comme substrat

L'utilisation de polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) dans l'extraction de la pyrogallol oxydase des dattes permet d'éliminer les composés phénoliques endogènes des dattes qui peuvent être oxydés par l'enzyme en o-quinones et qui après leur polymérisation provoquant l'inactivation de la PPO (Wuyts *et al.*, 2006 ; Fang *et al.*, 2007).

Le diagramme de l'extraction de la PPO de ces variétés des dattes est récapitulé ci-contre (Figure 9) :

Chapitre 4 : Résultats et discussion

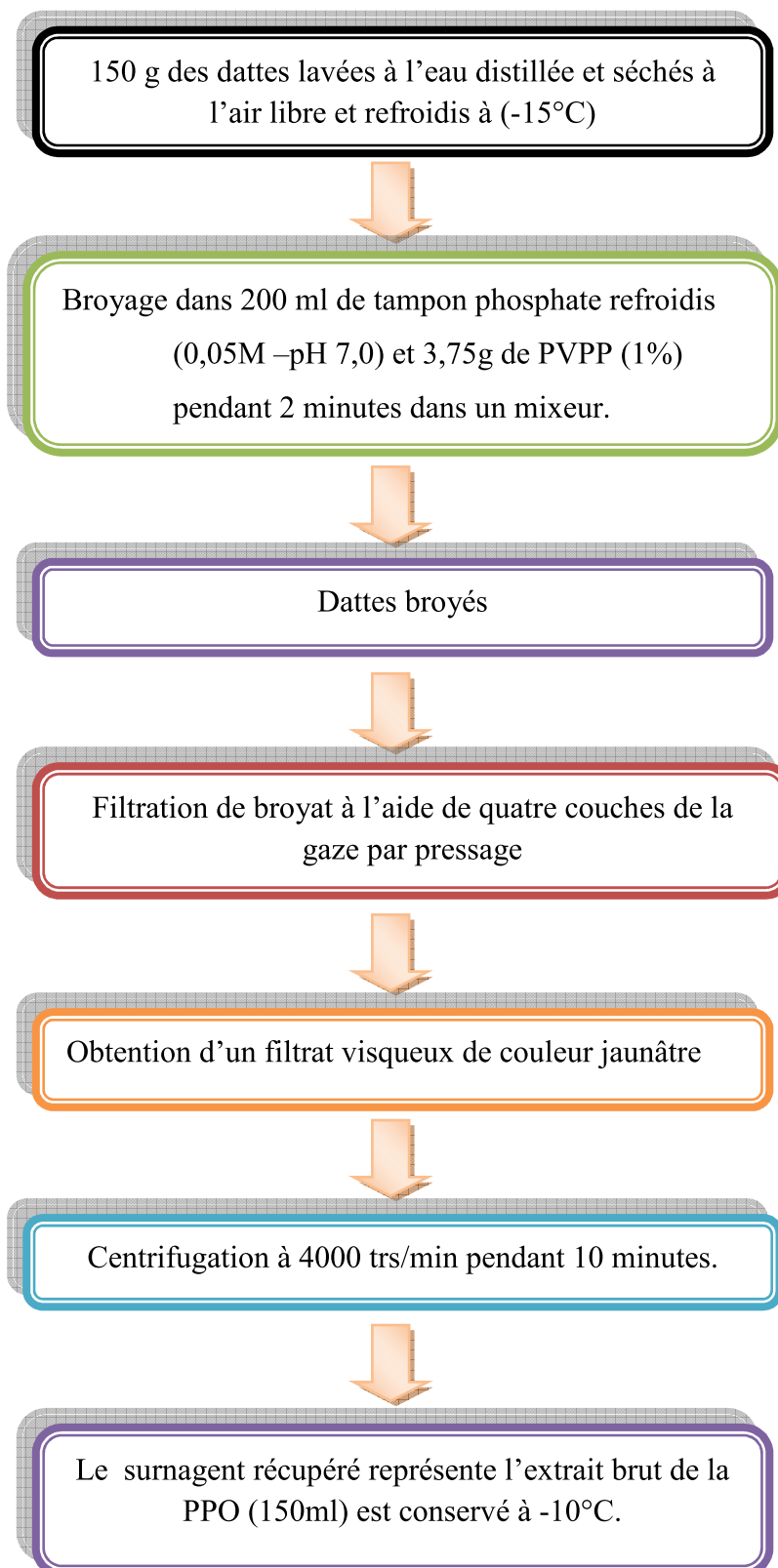


Figure 9 : Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenixdactylifera* L) « Deglet-Nour, Ghars et Degla Beida »

Chapitre4 : Résultats et discussion

IV.2 Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité pyrogallol oxydase des dattes « Deglet-Nour, Ghars et Degla Beida » a été déterminée en mesurant les vitesses initiales d'oxydation du pyrogallol à différents pH compris entre 3,5 et 8,0.

Les systèmes tampon utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0,05 M ; pH 3,5-6,0), et le tampon phosphate de sodium (0,05 M ; pH 6.0-8,0).

Les figures (10, 11 et 12) représentent le profil de l'activité pyrogallol oxydase relative en fonction du pH en présence de pyrogallol comme substrat.

Les valeurs des pH optimums pour la PPO de ces sources en présence de pyrogallol comme substrat sont regroupés dans le tableau 6

Tableau 6 : Valeurs de pH optimum de la PPO des dattes en présence de pyrogallol comme substrat

Variété	pH
<i>Deglet Nour</i>	4,5
<i>Ghars</i>	4,5
<i>Degla beida</i>	4,5

L'activité pyrogallol oxydase est maximale à pH 4,5 pour les trois variétés des dattes ; Deglet-Nour et Degla Beida et Ghars.

De part et d'autre de ces pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de pyrogallol et/ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre le site actif de l'enzyme et le pyrogallol .(Khatun et al., 2001).

En effet, l'activité enzymatique diminue à cause de changement de degré d'ionisation des groupement de ces résidus localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme, et qui seront impliqués dans la fixation et/ou la transformation des substrats (Khatun et al., 2001).

Chapitre 4 : Résultats et discussion

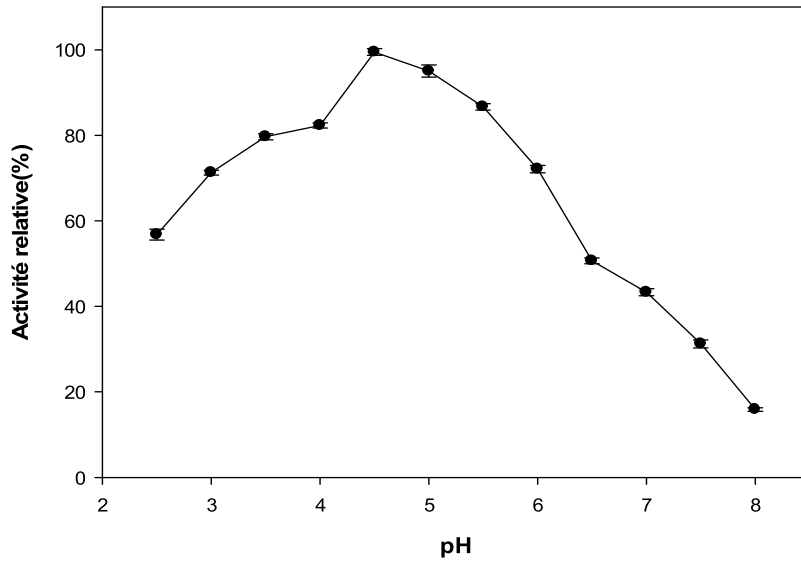


Figure 10: Variation de l'activité enzymatique de la PPO de *Phoenixdactilyfera* L Deglet Nour en fonction du pH. (En présence de pyrogallol comme substrat).

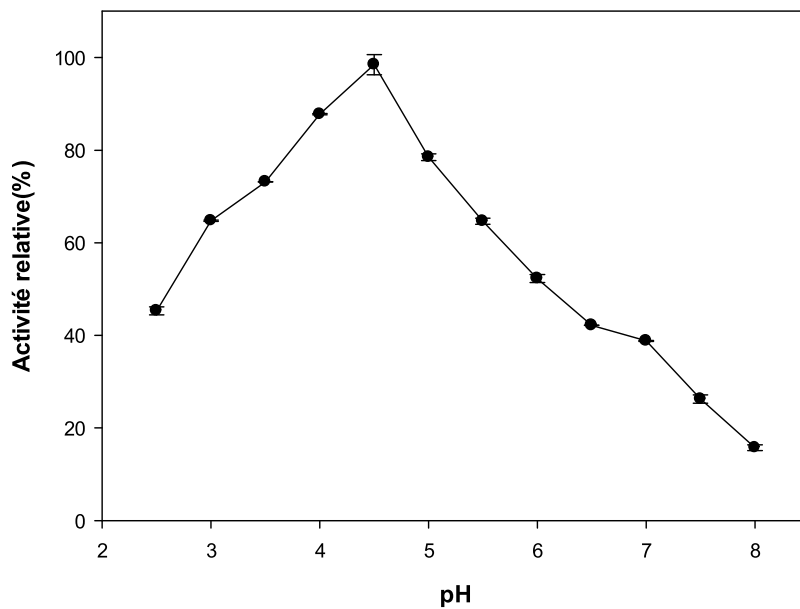


Figure 11: Variation de l'activité enzymatique de la PPO de *Phoenix dactilyfera* L Degla Beida en fonction du pH. (En présence de pyrogallol comme substrat).

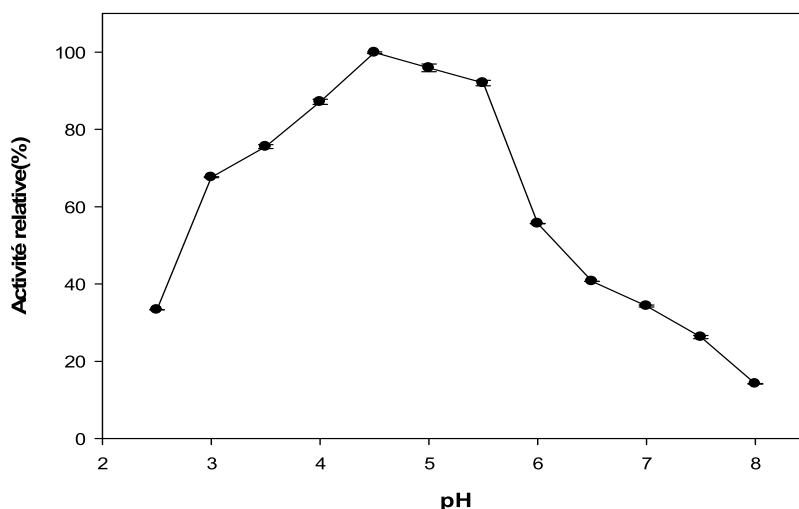


Figure 12: Variation de l'activité enzymatique de la PPO de *Phoenix dactylifera* L Ghars en fonction du pH.
(En présence de pyrogallol comme substrat).

Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4,0-8,0 (Yoruk et Marshall., 2003).

Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Vámos-Vigyázó., 1981 ;Whitaker, 1994 ; Kolcuoğlu et al., 2006).

IV. 3 Etude de la stabilité thermique

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes en présence de pyrogallol comme substrat sont représentés dans les figures (13,14 et 15) L'activité enzymatique relative a été suivie dans un intervalle des températures compris entre 30 et 90°C en respectant les conditions optimales décrites précédemment.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

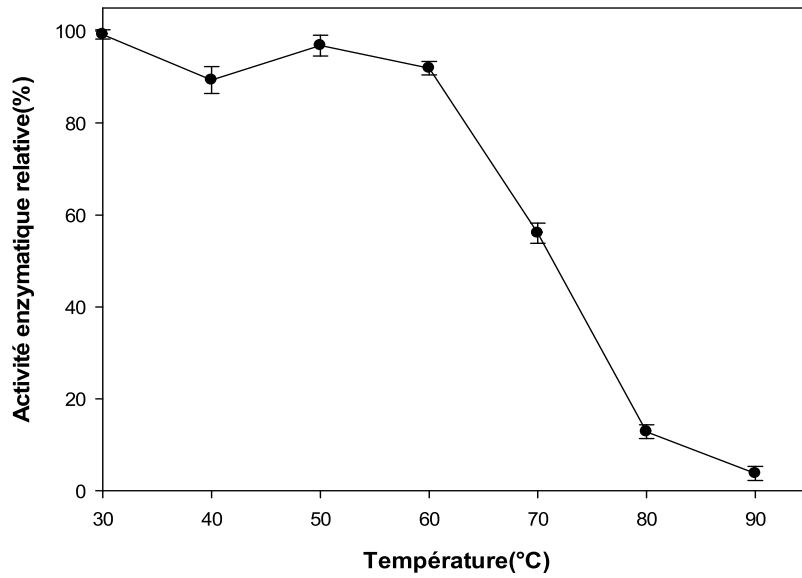


Figure 13 : Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes (*Phoenixdactylifera L.*) Deglet Nour après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrogallol comme substrat)

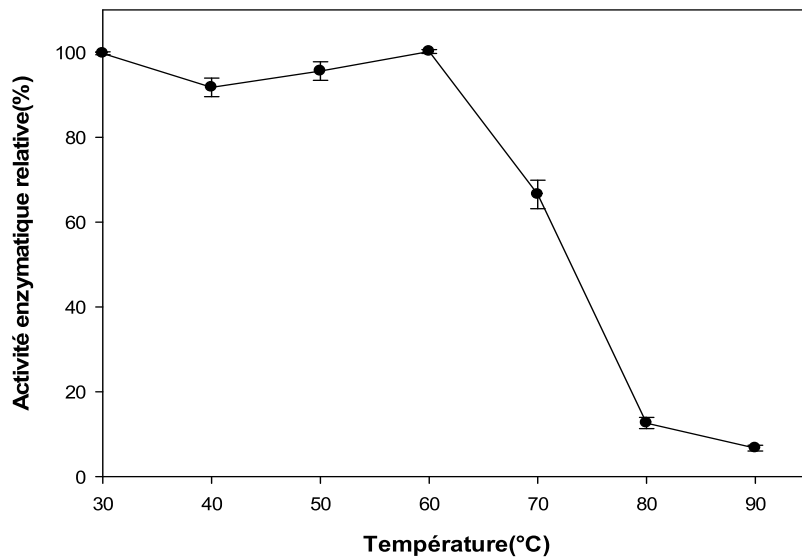


Figure 14: Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes (*Phoenixdactylifera L.*) Degla beida après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrogallol comme substrat).

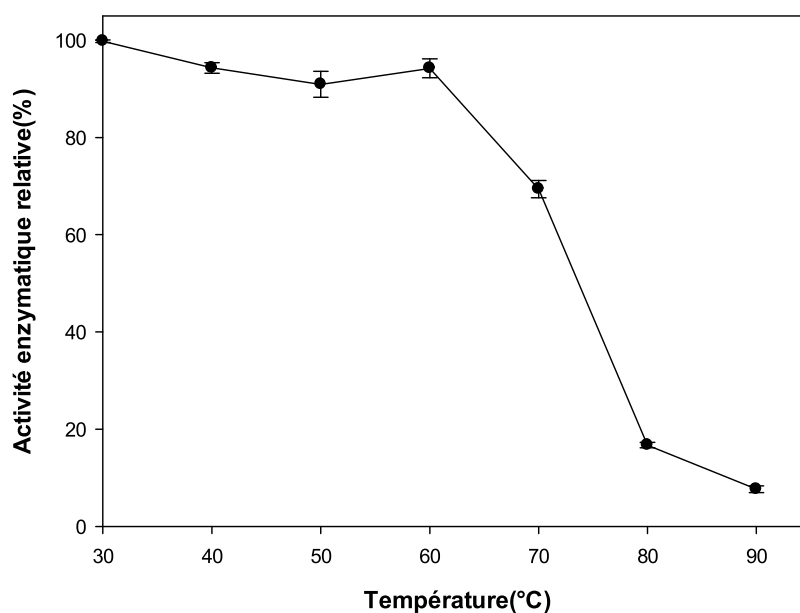


Figure15 : Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrogallol comme substrat.

Comme pour la plupart des réactions enzymatiques, la vitesse des réactions catalysées par la PPO augmente en général avec la température. Cependant, quand la température s'élève au-dessus de 60 à 70°C, l'activité catalytique enzymatique diminue. Ce phénomène résulte de deux effets opposés:

- 1- de l'effet thermique activateur dont une augmentation exponentielle de la vitesse de la réaction avec la température.
- 2- de l'effet thermique dénaturant de la structure de la protéine aux températures plus élevées. (Voet., 2011)

Selon la nature du substrat utilisé et la source enzymatique, on remarque que la température optimale est dans la gamme 30 - 40°C, ainsi pour les trois sources d'enzyme une valeur de 30°C a été estimée en présence de pyrogallol comme substrat.

Chapitre4 : Résultats et discussion

Tableau7 : Température optimales de la PPO des dattes en présence de pyrogallol comme susbtart

Source	Température optimale °C
<i>Deglet nour</i>	30
<i>Degla beida</i>	30
<i>Ghars</i>	30

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés pour les différentes PPO d'origine végétale : *Penaeus japonicus* (Benjakul et al., 2005), *Macrolepiota mastoidea* (Kolcuoğlu et al., 2006), *Musa cavendishii* (Ünal, 2007), *Ocimum basilicum* (Doğan et al., 2005) et *Castanea henryi* (Xu et al., 2004).

Plusieurs chercheurs ont indiqué que les PPO ont des température optimales entre 20 et 40°C (Arslan et al., 1997; Aydemir., 2004; Duangmal et al., 1999; Fujita et al., 1995 ; Jiang.,1999,Gawlik-Dziki et al., 2008).

En effet ,la PPO n'est pas une enzyme thermostable ,les traitements thermiques de courtes durées à des températures de 70 à 90°C de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale, sont dans la plupart des cas suffisants pour la destruction irréversible, partielle voire totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó., 1981 ; Zawistowski et al., 1991 ;Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003).

La variation de la température optimale implique que la tolérance thermique des enzymes dépend de plusieurs facteurs y compris la spécificité de substrat, le pH optimum, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et/ou de cultivar (Vámos-Vigyázó., 1981 ; Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003). Elle peut être liée aussi à la maturité de la plante et/ou aux formes moléculaires de l'enzyme (Zhou et Feng., 1991)

IV.4 Détermination des paramètres cinétiques

Pour déterminer les paramètres cinétiques de la PPO des dattes, les vitesses initiales ont été mesurées à différentes concentrations de pyrogallol.

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité pyrogallol oxydase a été étudié dans une gamme de concentration pyrogallol comprise entre 10 et 120 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants.

Les valeurs des paramètres cinétiques V_{max} , K_m et ont été ainsi estimés à partir des représentations de Michaelis-Menten (Equation (1)) et de Lineweaver-Burk (Equation (2)) comme suit (Dalmadi et al., 2006):

Chapitre 4 : Résultats et discussion

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots \text{Equation (1)}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \left(\frac{1}{V_{\max}} \right) \dots\dots\dots \text{Equation (2)}$$

V_0 est la vitesse initiale de la réaction (Abs/min)

V_{\max} est la vitesse maximale de la réaction (Abs/min)

$[S]$ est la concentration de pyrogallol (mM)

K_m : est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (mM) ou constante de Michaelis-Menten,

Les profils d'évolution de l'activité enzymatique de la PPO des trois variétés des dattes (Deglet Nour, Degla Beida et celle de Ghars) en fonction de la concentration de pyrogallol sont représentés dans les figures (16,17 et 18) respectivement.

Nous remarquons que les représentations graphiques donnent des courbes d'allure hyperbolique, ce qui signifie que l'enzyme suit une cinétique michalienne.

La courbe $1/V$ vs $[S]$ a été utilisée afin d'évaluer la valeur de la constante de dissociation du complexe inactif ESS (K_s). Le phénomène d'inhibition par excès de substrat a été observé pour la PPO des trois variétés avec une valeur approximative valant 100 mM.

L'inhibition de la PPO par excès de substrat a été également rencontré pour les PPO de différentes sources végétales (**Tomita et al.,1980 ;Muñoz et al.,2010**). Cet effet peut être dû à la formation d'un complexe actif enzyme-substrat (ES) où le substrat est mal orienté dans le site ou bien à la formation d'un complexe ternaire non actif (ESS) (**Muñoz et al.,2010**), de même, la fixation d'une deuxième molécule de substrats sur le même site enzymatique retarde son action catalytique (**Zawistowski et al., 1991**).

Haldane (1930) a suggéré que l'enzyme possède au moins deux sites actifs successifs et voisins dont chacun fixe une molécule de substrat conduisant par conséquent à un complexe inactif.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

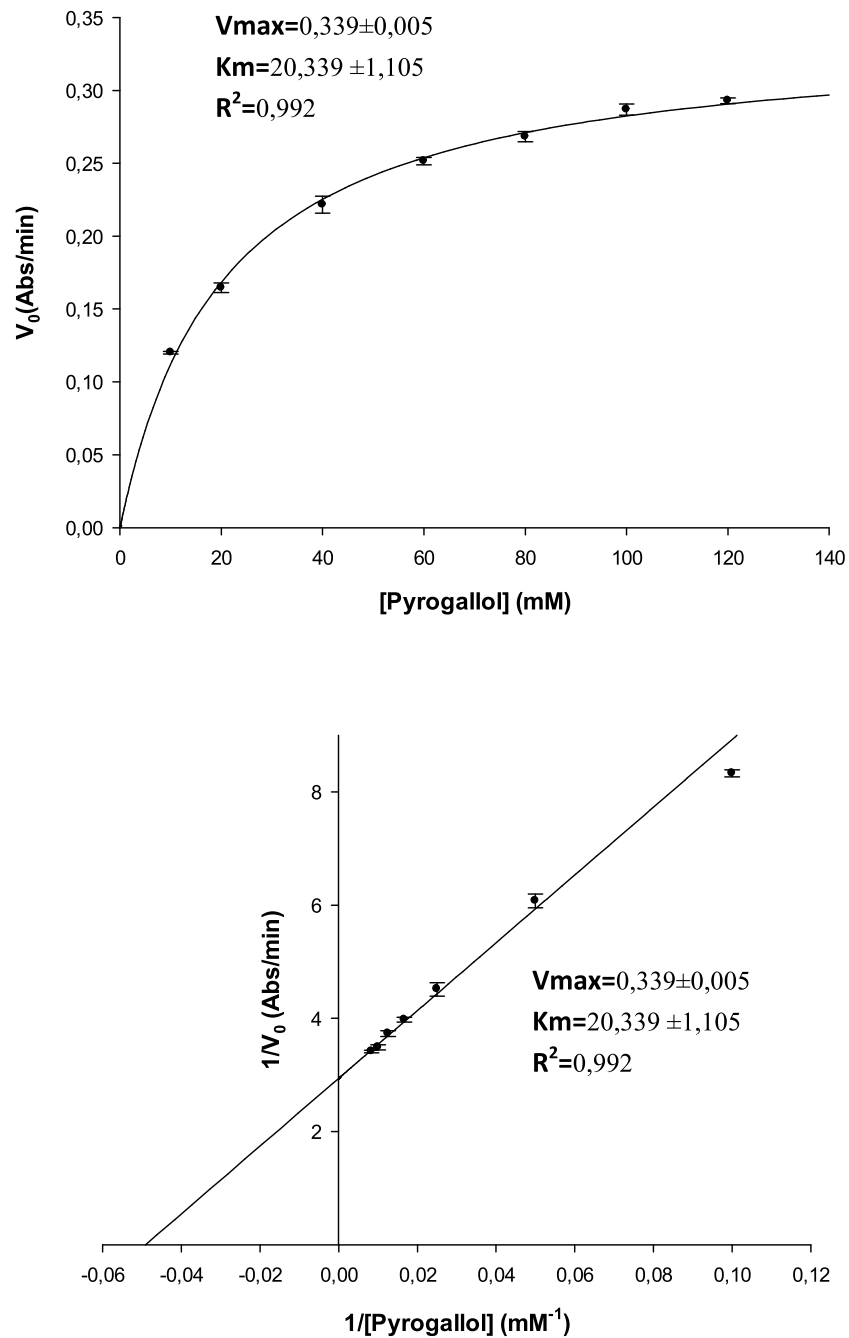


Figure 16 : Effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par pyrogallol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L cv Deglet Nour: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.

Chapitre 4 : Résultats et discussion



Figure 17 : Effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par pyrogallol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L Degla Beida : (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

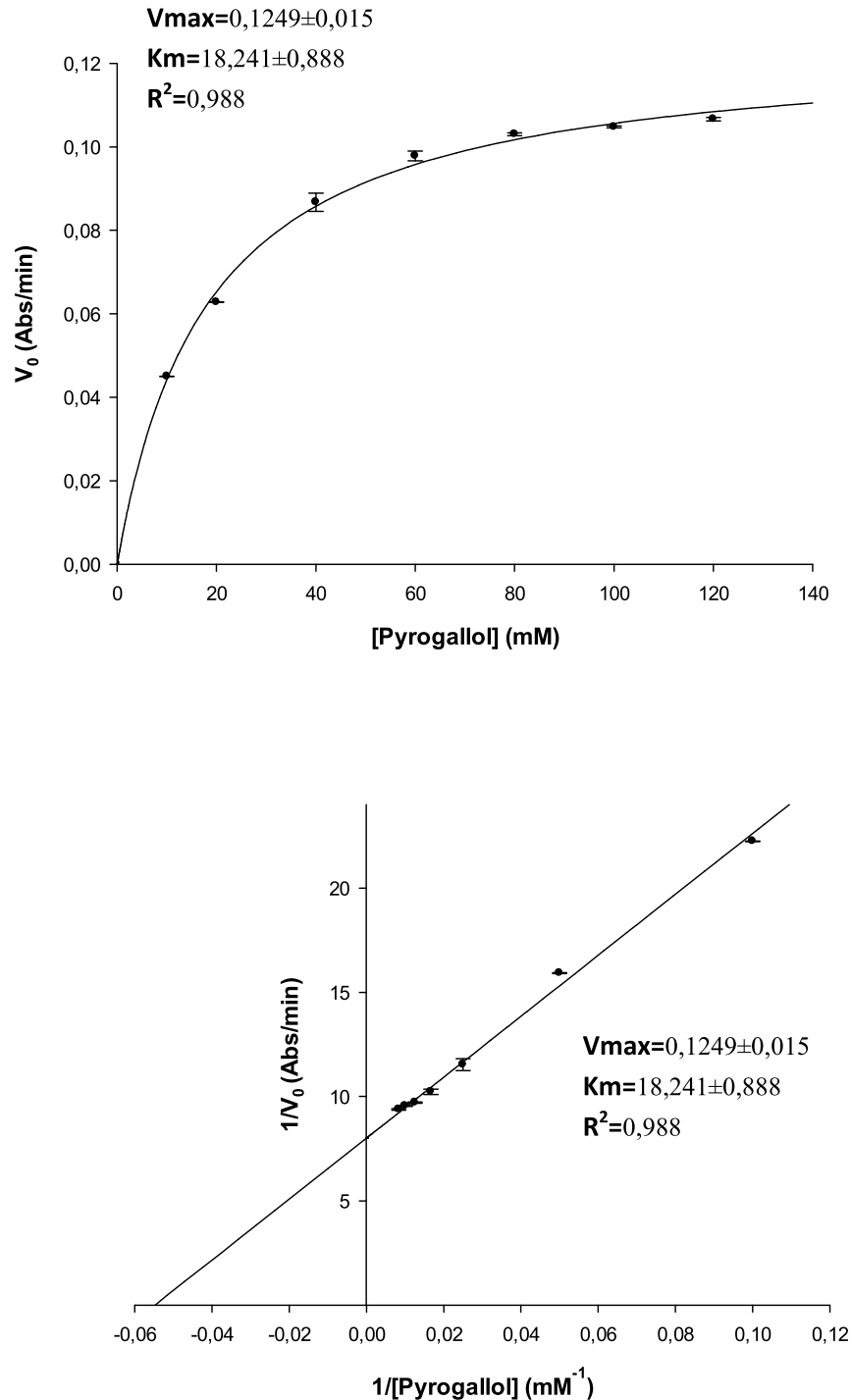


Figure 18 : Effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par pyrogallol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L Ghars : (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.

Les valeurs des paramètres cinétiques (V_{max} et K_m , et rapport V_{max}/K_m ou efficacité) obtenus à partir des représentations graphiques de double inverse $1/V=f(1/S)$ ainsi que sont récapitulées dans le tableau 8

Chapitre4 : Résultats et discussion

Tableau 8 : Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de pyrogallol comme substrat

Source	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mM}$)
Deglet Nour	38,965 \pm ,005	20,339 \pm 1,105	1,915
Degla Beida	18,620 \pm 0,003	21,393 \pm 1,449	0,870
Ghars	14,356 \pm 0,015	18,241 \pm 0,888	0,787

En termes d'affinité, les PPO de ces trois variétés présentent des différences significatives avec l'ordre d'affinité suivant :

PPO de Deglet Nour < PPO de Degla Beida < PPO de Ghars

De même, en termes d'efficacité la PPO de deglet nour semble avoir la meilleure efficacité pour le pyrogallol par rapport aux deux autres variétés dont l'ordre d'efficacité suivant :

PPo de Ghars <PPO de Degla beida<PPO de deglet Nour

En effet, les recherches sur les PPO impliquent généralement l'utilisation de pyrocatechol comme substrat .Selon **Sachde et al. (1989)**, la valeur de la K_m de la PPO des dattes d'Iraq vis-à-vis du pyrogallol comme substrat, déterminée à pH 6.2 (tampon phosphate de potassium 0.01 M) sont : 3.5 et 8.75 pour les deux variétés de datte Barhee et Zahdi, respectivement

Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten déterminées pour le pyrocatechol comme substrat pour les PPOs d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (**Dogan et al., 2005**), de poire (*Pyrus communis*) (**Ziyan et pekyardimci., 2004**), de cerise (*Malpighia glabra* L.) (**Kumar et al., 2008**), de Yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv. Longbô) (**Gnangui et al., 2009**), des racines de céleri (*Apium graveolens* L.) (**Aydemir et Akkanlı., 2006**) ; et de banane (*Musa cavendishii*) (**Ünal., 2007**) sont respectivement : 10.7 ; 5.55 ; 5.2, 13.93, 29 et 8.5 mM.

Une valeur de 14.3 mM pour la PPO du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (**Aydemir., 2010**), 10.7 mM pour la PPO de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (**Dogan et al., 2005**), 5.55 mM pour la PPO de la poire (*Pyrus communis*) (**Ziyan et pekyardimci., 2004**), 4.5 mM pour la PPO de coing (**Yağar et Sağiroğlu., 2002**), 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighia glabra* L.) (**Kumar et al., 2008**), 6.3 mM pour la PPO de la mangue (*Mangifera*

Chapitre4 : Résultats et discussion

indica L.) (Wang et al., 2007), 3,65 mM pour la PPO du raisin (*Vitis vinifera L.*) (Önez et al., 2008) et 8,3 mM pour la PPO de céleri (*Apium graveolens L.*) (Aydemir et al., 2006).

Les valeurs de K_m et V_{max} de la PPO varient avec le type du substrat, le tampon, de la concentration ionique, de la température, de la source de l'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (Arslan et al., 1997 ; Dogan et Dogan., 2003; Ziyan et Pekyardimci., 2004).

Dogan et al., (2005) supposent que le pH affecte aussi les valeurs apparentes du K_m .

IV.5 Effet de la concentration de l'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par l'extrait brut de la PPO des dattes a été étudié tout en respectant les conditions optimales précédemment décrites.

Les figures (19, 20 et 21) représentent le résultat de l'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité de la PPO de Deglet Nour, Ghars et celle de Degla Beida, respectivement.

Nous constatons que la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol augmente de manière linéaire avec l'augmentation du volume d'enzyme dans le milieu réactionnel, à partir de cette relation de proportionnalité nous pouvons estimer la valeur de la constante catalytique et par conséquent d'estimer la concentration de la PPO dans un extrait sans qu'il soit nécessaire d'effectuer sa purification totale (Weil., 2001)

Chapitre 4 : Résultats et discussion

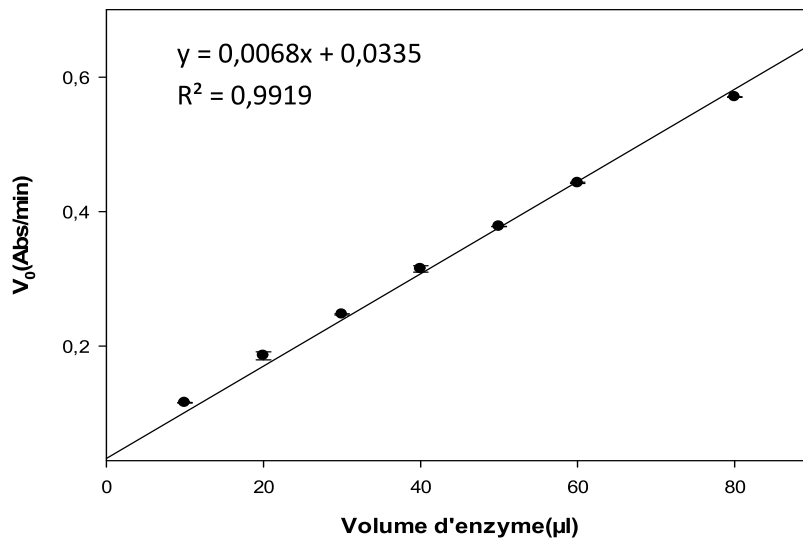


Figure 19 : Effet de la concentration du pyrogallol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L) Deglet Nour sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol (tampon acétate 0,05 M-pH 4,5 ; 30°C pyrogallol 100 mM)

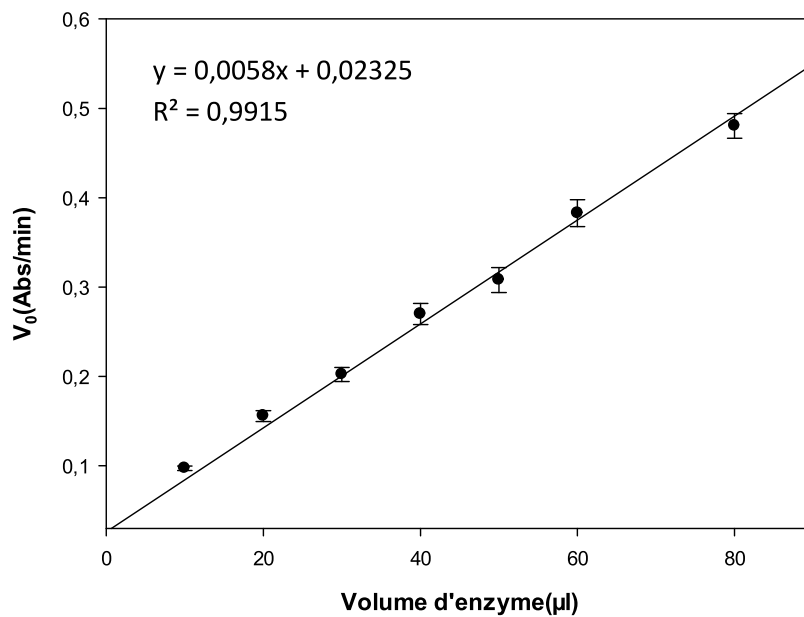


Figure 20 : Effet de la concentration du pyrogallol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L) Degla beida sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5 ; 30°C ; pyrogallol 100 mM).

Chapitre 4 : Résultats et discussion

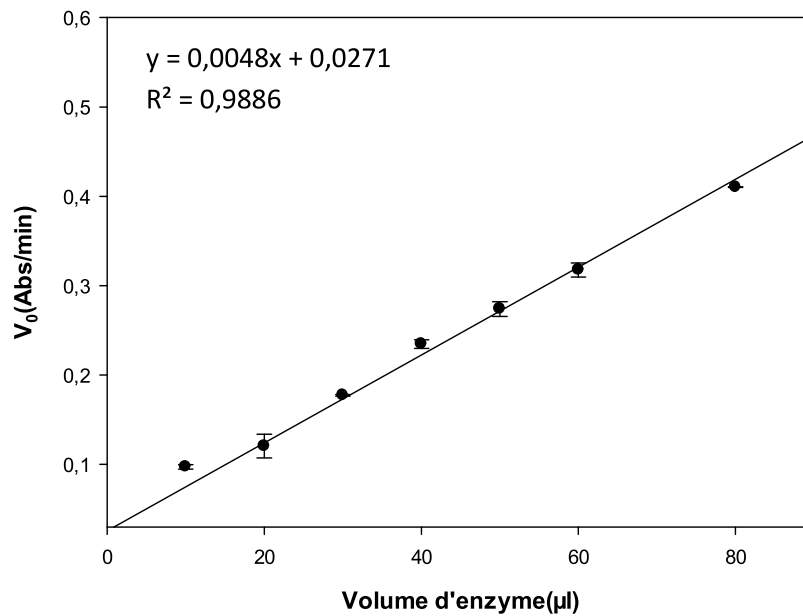


Figure 21: Effet de la concentration du pyrogallol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L) Ghars sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol (tampon acétate 0,05 M-pH 4,5 ; 30°C ; pyrogallol 100 mM).

La constante catalytique correspond à la quantité d'enzyme qui convertit une mole de substrat par seconde et elle est donnée par l'équation suivante :

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0} \quad \dots\dots\dots \text{Equation 3}$$

Avec :

- V_{max} Vitesse maximale ou activité catalytique ;
- K_{cat} Constante catalytique (temps⁻¹)
- [E]₀ Concentration initiale en enzyme.

Néanmoins, nous ne connaissons pas ici la concentration molaire de l'enzyme et nous ne pouvons donc pas calculer K_{cat}. Dans la pratique, K_{cat} ne peut être obtenue par le calcul que si nous disposons d'un modèle cinétique et de la valeur numérique des diverses constantes. De plus, la concentration de l'enzyme ([E]₀) ne peut être connue, même dans une préparation pure, car la protéine enzymatique n'est qu'un des composants d'un mélange dans des

Proportions inconnues et variables en fonction du temps, du mode de préparation de l'enzyme et de son origine, etc. (Coutouly., 1991).

Chapitre4 : Résultats et discussion

Nous pouvons caractériser la quantité d'enzyme présent par sa concentration, exprimée en terme de masse ou de moles mais seulement par le produit $K_{cat} \times [E]_0$, c'est-à-dire en terme V_{max} , activité catalytique par unité de masse de la préparation enzymatique, seule accessible expérimentalement (**Coutouly., 1991**).

D'après cette expérience, nous avons choisi le volume de l'enzyme de 40 μ l comme étant convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.

Conclusion

Chapitre 4 : conclusion

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé sur la détermination des conditions optimales de l'activité enzymatique d'une enzyme particulière « La polyphénol oxydase » extraite à partir de trois variétés des dattes : Deglet Nour, Degla Beida, et Ghars en présence d'un substrat triphénolique « le pyrogallol ».

Ce qui nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes:

1-L'activité pyrogallol oxydase est maximale à pH **4,5** pour les trois variétés des dattes : Deglet-Nour et Degla Beida et Ghars, de part et d'autre de ces pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique

2-L'étude de la stabilité thermique de l'activité de la PPO montre que sa température optimale apparente est comprise entre **30°C** et **40°C**. Une activité pyrogallol oxydase résiduelle non négligeable a été mesurée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C. L'enzyme est presque totalement dénaturée à 90°C. Par conséquent, la PPO des dattes d'Algérie est plus thermostable.

3-Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten sont plus élevées par rapport à celle trouvée pour les PPOs des autres sources végétales. Par conséquent, la PPO des dattes d'Algérie ont une faible affinité pour le pyrogallol comme substrat avec une meilleure affinité pour la pyrogallol oxydase de la variété Ghars tandis qu'en terme d'efficacité l'enzyme de la variété Deglet Nour semble avoir la meilleure efficacité

4-L'activité pyrogallol oxydase dépend de la concentration de l'enzyme et est directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu réactionnel dont un volume de **40µl** semble être adéquat pour le suivi de la cinétique enzymatique.

Comme perspectives, nous proposons de consacrer d'autres études sur l'activité du pyrogallol oxydase dont une étude de la cinétique d'inhibition par les acides organiques et/ou l'étude de l'effet de la température et/ou les propriétés thermodynamique est vivement recommandée.

*Références
bibliographique*

Références bibliographique

A

- **Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J.**(2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367.
- **Aït- Ameer L.** (2001). Analyse du processus de diffusion des sucres, des acides organiques et de l'acide ascorbique dans le système : Mech -Degla/Jus de citron. Mémoire de magister.
- **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.
- **Ameer, Q et Adeloju, S.B.**(2009). Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5–11
- **Amellal H.**, (2008). Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes: formulation d'un yaourt naturellement sucré et aromatisé. Thèse de Doctorat Génie Alimentaire. Université de Boumerdès: 127p
- **Arslan O., Doğan S.**(2005). Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1499-1504.
- **Asanuma,M.,Miyazaki,I.,Ogawa,N.**(2003). Dopamine or-L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176
- **Asav, E., Yorganci, E.,Akyilmaz,E.**(2009).An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- **Aydemir,A.**(2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads. *Food Chem.*, 87, 59-67.

Références bibliographique

B

- **Belguedj M.** (2001). Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud -Est Algérien, N° 11, INRAA. El-Harrach , Alger. 289 p
- **Benamara S., Chibane H. et Boukhelifa M.** (2004). Essai de formulation d'un yaourt naturel aux dattes. Revue Industrie Agricole et Alimentaire. Actualités techniques et scientifiques, N°1. 11-14p
- **Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M.**(2005). Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).” Journal of Food Biochemistry. 29: 470-485.
- **Beses S., Blecker C., Deroanne C., Drira N. D., Attla H.,** 2003. Date seeds: chemical composition and characteristic profiles of the lipide fraction. Laboratoire de biotechnologie végétale, Faculté des Sciences de Sfax, Tunix, 577 p
- **Bouguedoura N.** (1991). Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier. Etude in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs. Mémoire de doctorat. U.S.T.H.B. Alger. 201 p.
- **Bouras A.D.,** 1994. Biochimie alimentaire .Office des publications universitaires. Alger, pp 77-89

C

- **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.
- **Chutintrasri,B & Noomhorm,A.**(2006). Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. Lebensmittel-wissenschaft., 36, 492-495
- **Claus, H & Decker,H.**(2006).Bacterial tyrosinases. Systematic and Applied Microbiology,29:13-14.
- **Cook J. A. and Furr J.R.**(1952). Sugars in the fruits of soft, semi -dry and dry commercial date varieties. Date Growers Inst. Rept. N° 29. 3-4 p.
- **Cowan, M.,Horst,E. A.,Luengpailin,S.,Doyle,R,J.,**(2000).Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715.Anti microbial Agents and Chemotherapy 44 (9):2578-2580

Références bibliographique

- **Cuff M, Millerki E, Van Holdeke, Hendrick Sonwa.**(1998). Crystal structure of a functional unit from Octopus dofleini hemocyanin .JMolBiol 1998 ;278 :855–70
- **Cui, Y., BarforD, J.P., Renneberg, R.**(2006). A disposable, screen-printed electrode for the ampero-metric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. Analytical Sciences. 22 : 1279-1281

D

- **Dalmadi, I., Rapean, G., Loey, An., Smout, C., Hendrickx, M.**(2006). Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. Journal of Food Biochemistry, V 30, p 56–76.
- **Djerbi M.**, 1994. Précis de phœniciculture. Ed. FAO, Rome: 23-191
- **Dogan, M & Dogan, S.**(2003). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii*). J Food Chem. 39: 1-9.
- **Dogan, S., Turan, Y., Erturk, H., Arslan, O.**(2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- **Doğru, Y, Z &, Erat, M(2012).** Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum, Apiaceae*) Food Research international, 49, 411-415
- **Duangmal, K., Owusu Apenten, R.K.**(1999). A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chem. 64:351-359.
- **Duran, N., Esposito, E.**(2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. Appl. Catal. B Environ. 28: 83–99.

Références bibliographique

E

- **Eicken, C., Krebs, B., Sacchetti, J.C.**(1999). Catechol oxidase: structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- **Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F.** (1995). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry*. 45: 1090-1094
- **Es-Safi, N.E., Cheynier, V., Moutounet, M.**(2003). Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J Food Comp Anal*. 16:535–553.

F

- **Fan, Y & Flurkey, W.H.**(2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- **Feldman., 1976-** Le grain de blé. Composition et utilisation .Ed INRA. Paris, 308 p.
- **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.
- **Ferrar P.H., Walker J.R.L.**(1999). Microorganisms as potential source of novel diphenol oxidase inhibitors. *J. Food Biochem.*, 23, 1-15.
- **Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., & Tono, T.**(1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea L.*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 43(113)1138–1142.

G

- **Garcia-Borrón, 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
- **Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., & Swieca, M.**(2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. Capitata L.*). *Food Chemistry*. 107: 129–135.

Références bibliographique

- **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.
- **Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G.**(2010).Laccases: a never-ending story.Cell Mol Life Sci. (3):369-385
- **Gilles P.**, 2000- Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, 110 p
- **Gnangui,S,N.,Dué, E. A.,N'guessan Kouadio, J-P. E.,Kouamé, L. P.** (2009). Efect of heat treatment on edible yam polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. Journal of animal & plant sciences. 2,(3),128 – 137.
- **Goyeneche,R., Di Scala,K , Roura.**(2013).Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(*Raphanussativus var.sativus*) Food Science and Technology.(54), 57-62

H

- **Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A.,(2006).** Fungal tryrosinases: new prospects in molecular characteristics,bioengineering and biotechnological applications. J. Appl. Microbiol. 100, 219–232
- **Haldane, J.B.S.**(1930). The enzymes. Green and Co Ed, Londres.
- **Hannachi S., Khitri D., Benkhalifa A. et Brac de Perrière R.A.** (1998). Inventaire variétal
- **Harel, E., Mayer, A.M., Shain, Y.**(1964). Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. Physiologica Plantarum. 17: 921-930

I

- **Imad A., Abdul Wahab K. A et Robinson R. K.**, 1995-Chemical composition of date Varieties as influenced by the stage of ripening. Food Chem., 54: 305-309 pp

Références bibliographique

J

- **Jaccot B. et Campillo B.** (2003). Nutrition humaine. Ed. Masson, Paris. p 311
- **Jiang, Y. M.**(1999). Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry*. 66:75–79.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G.**(1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459-1483
- **José L. Navarro, A.T., Miguel A.S, Enrique,S.**(2014) .Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chemistry*, V 157, Pages 283-289.

K

- **Keilin, D & Mann, T.**(1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B*. 125: 187-204
- **Khatun, S., Absar, N., And Ashraduzzaman, M.**(2001). Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera L.*) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4: 1129-1132.
- **Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J., Krebs, B.**(1998.) Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol*;5:1084–90.
- **Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M.**(2008). Tyrosinase/laccase biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171–174.
- **Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N.**(2006). Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*. 101:778-785.
- **Kubowitz, F.** (1938). Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*. 299: 32-57.
- **Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K.**(2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra L.*). *Food Chemistry*. 110:328-333.

Références bibliographique

- **Kuwabara,T.,& Katoh,Y.(1999).** Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.

L

- **Lax A.R & Vaughn K. C.(1991).**Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31
- **Lerch, K.(1983).** *Neurospora sp* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125-138.
- **Loera,C,O.,Pérez,P,M.,Cristina I,B., Rodríguez,J,R and Villaseñor,O,F.(2006).**dvances in Agricultural and Food Biotechnology.323-340.

M

- **Madhavi ,V.,& Lele,S,S.(2009).**Laccase properties,use,,Bioresources.1694-1717
- **Majid,Y..Moridania,B.,Arnosiraki,A., Tatiana-Chevaldina,A., Hughscobie, Peter.,O'brien J.(2004).** Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes.*Chemico-Biological Interactions* .145(2):213-23.
- **Marques, L., Fleuriet, A.,Macheix, J.(1995).** Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.
- **Martinez V.M. & Whitakerj.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 variété Deglet -Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingéniera, INA. El-Harrach. Alger. 79 p
- **Mayer A.M.,(2006).** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–2331
- **Mayer, A.M.; Harel, E.** 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- **Mayer,A.M.,Harel,E.,(1979).**Polyphenol oxidases in plants .*Phytochemistry* 18,193
- **Mesquita,V,L,V.,Queiroz,C.(2013).**Chapter 10 ;Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*, pp 387-418.
- **Messaïd H., 2007-**Optimisation du processus D'immersion- Réhydratation du

Références bibliographique

ystème dattes sèches-jus d'Orange. Mémoire du diplôme de Magister. Université M'Hamed BOUGUERA-Boumerdès.96p

- **Min, K., Yoo, Y.J.**(2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- **Monteali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R.** (2010). A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- **Munier P.**, (1973). Le palmier dattier. Techniques agricoles et productions tropicales Ed. Larousse, Paris: 221p.
- **Muñoz-Muñoz ,Jl., Garcia-Molina,F., Varon,R., Tudela,J., Garcia,F., Rodríguez-López,Jn** .(2010) New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase . *J Math Chem*.

N

- **Njagi J., Chernov ,M.M., Leiter L.C., Andreescu ,S.**(2010). Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem*. 82: 989-996.
- **Noui, Y.** (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister en génie alimentaire, Université de Boumerdès.33p.

O

- **Önez Z., Karakuş E., Pekyardimci Ş.**(2008). Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera L.*): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. 32, 396–414.

Références bibliographique

P

- **Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M And Garcia-Carmona, F.**(2001). Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum*. 133: 203-209
- **Polaina, J & Maccabe,A P.**(2007).Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p

Q

- **Queiroz ,C.,Maria,L M,Fialho ,E.,Vera.,Lúci,A.**(2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375
- **Quinten M.** (1996). Diversité et structure génétique des populations algérienne de *Fusarium oxyporum* agent de la fusariose vasculaire (bayoudh) du palmier dattier, Mémoire de doctorat, El Harrach, Alger. 52 p

R

- **Riedacker A.** (1990). *Physiologie des arbres et arbustes en zone aride*, Ed .J. Libbey, Paris.323-327 p
- **Rodriguez C,S & Toca Herrera ,J.L.**(2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24 (5):500-13.

S

- **Sakiroglu H., Kufrevioglu I.O., Kocacaliskan I., Oktay M., Onganer Y.,** (1996). Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2982–2986.
- **Sanchez Ferrer,A.,Rodriguez-Lopez,J.N.,Garcia Canovas,F.,Garcia Carmona,F.** (1995) .Tyrosinase:a comprehensive review of its mechanism.*Biochim.Biophys .Acta* 1247 ,1–11.

Références bibliographique

- **Sayah Z.**, (2008). Contribution à l'étude des caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des dattes sèche, molles, et demi-molles de la cuvette de Ouargla. Mémoire Magistère en biologie. Université Kasdi Merbah, Ouargla: 71p
- **Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N.**,(2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- **Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S.**(2004).Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183
- **Simsek, S., & A. Yemenicioglu.**(2007).Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry.*
- **Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F.,Sánchez-Ferrer, A.**(1998). Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930.
- **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) : 23-250.

T

- **Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J.**(2010). Amperometric Catechol Biosensor Based On Polyaniline–Polyphenol Oxidase. *Biosensors And Bioelectronics.* 25: 1681–1687.
- **Telli, A.**,(2009). Contribution à l'optimisation de l'extraction des polyphénols des dattes (variété Ghars) au cours de différents stades phénologiques et étude de leur activité biologique. Magistère en Biologie. Université Kasdi Merbah, Ouargla: 108p
- **Tirichine H S.**, 2010- Etude ethnobotanique, activité antioxydants et analyse photochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phœnix dactylifera L.*) du Sud-Est Algérien. Mémoire du diplôme de Magister en biologie. Université d'ORAN-Es Senia.106p
- **Todaro,A.,Cavallaro,R.,Argento,S., Brancand,F.,Spagna,G.**(2011).Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*solanum melongena L.*) *J. Agric. Food Chem*,59 (20),11244–11248.

Références bibliographique

- **Tomita Y, Hariu A, Mizuno C, Seiji M.**(1980).Inactivation of tyrosinase by dopa.J Invest Dermatol.75(5):379-82.
- **Toutain G.** (1996). Rapport de synthèse de l'atelier "Techniques culturelles du palmier dattier". In : Options méditerranéennes, série, N° 28. Le palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain. pp 201-205.
- **Toutain G.,** 1979- Eléments d'agronomie saharienne : de la recherche au développement. Ed. JOUVE, Paris, 276 p.
- **Tortora G.J.** et **ANAGNOSTAKOS N.P.,** 1987- Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. INC, 5 ème Edition, 688-693 pp
- **Trebst, A et Depka, B.**(1995). polyphenol oxydase and photpsynthesis research. Photosynththesis Research 46:41-44.

U

- **Ullah, M.R.**(1991). Tea. In Food Enzymotogy, (P.F. Fox, ed.) pp. 163-187, Elsevier Science Publishing, New York
- **Ünal M.Ü.**(2007.) Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). Food Chemistry., 100, 909-913.

V

- **Vámos-Vigyázó, L.**(1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15: 49-127.
- **Van Gelder,C.,W.G., Flurkey, W.H, Wichers, H.J.**(1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. Phyto-chemistry 45, 1309- 1323.
- **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.
- **Voet,D., Voet ,J,G.**(2011).Biochemistry, 4th Edition.Courier/Kendallville.USA.

W

Références bibliographique

- **WANG, J., JIANG, W., WANG, B., LIU, S., GONG, Z., AND LUO, Y.**(2007). Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tainong”) pulp. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 45–55.
- **Webb KJ1, dixon Allison G, Sullivan ML, Winters AL.**(1964).Gene expression patterns, localization, and substrates of polyphenol oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L.).*Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 7421 – 7430.
- **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.

X

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

Y

- **Yagar, H.,& Sagiroglu, A.** (2002) Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk. J. Chem.* Vol. 26, pp. 97-103.
- **Yahiaoui K.** (1998). Caractérisation physico-chimique et évolution du brunissement de la datte « D-N » au cours de la maturation. Mémoire de Magister. I.N.A. El - Harrach. Alger.66p
- **Yamada, K., Akiba,Y.,Shibuya,K., KashiwadA, A., Matsuda, K., and hirata, M.**(2005).Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829
- **Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N. And Hayashi, N.** (2000).Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48,2732-2735
- **Yemenicioglu, A & Cemeroglu, B.**(2003).Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the Presence of Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51:2371-2379.

Références bibliographique

- **Yoruk, R & Marshall, M.R.,**(2003). Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Chem.* 27,361–422.

Z

- **Zhang,G,H.,, Wang,Y,F.,, Zhang,X,Q, ,Nag,T,Z., Wang,H,X.**(2010).Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*.*Process Biochemistry*.V45, Pages 627–633
- **Zhou,H,W & Feng,X.**(1991).Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*).*Journal of the Science of Food and Agriculture*,V57, p 307–313.
- **Ziyan, E And Pekyardimci, S.** (2004).Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem*.28:547-557.

الملخص

الهدف لاساسي من هذا العمل هو دراسة الشروط المثالية لمتعدد الفينول أكسيداز المستخرج من التمور (فونكس داكتيليفيرل) : دقلة نور, دقلة البيضة, الغرس. متعدد الفينول أكسيداز لأنواع هذه التمور تمتلك نشاط البيغوالول أو أكسيداز المقاسة بالسبكتروفوتومتر عند 330 نانومتر في حضور البيغوالول كركيزة. إن دراسة لثبات الحرارة بينت أن البيغوالول أكسيداز مستقر حراريا الى غاية الدرجة 60° و ما فوق هذه الحرارة تؤدي الى تناقص نشاط هذا الأنزيم تدريجيا, و بالزيادة قيم درجة الحموضة المثلى والعوامل الحركية قدرها كالتالي:

دقلة نور (pH=4.5 $V_{max}= 0,339\pm 0,005$ Abs /min, $K_m=20,339 \pm 1,105$ mM)

دقلة البيضة (pH=4.5, $V_{max}= 0,162\pm 0,003$ Abs /min, $K_m= 21,393\pm 1,449$ mM)

الغرس (pH=4.5, $V_{max}= 0,1249\pm 0,015$ Abs /min, $K_m= 18,241\pm 0,888$ mM)

الكلمات المفتاحية: فونكس داكتيليفيرال, متعدد الفينول أكسيداز, الشروط المثالية

Résumé

L'objectif principal de ce travail est l'étude des conditions optimales de la polyphénol oxydase (PPO :EC 1.10.3.1) extraite des dattes (*Phoenix dactylifera* L) cv Deglet-Nour, cv Degla Beida et cv Ghars. La PPO de ces variétés des dattes possèdent une activité pyrogallol oxydase, mesurée par spectrophotométrie à 330 nm en présence de pyrogallol comme substrat.

L'étude de la stabilité thermique a montré que le pyrogallol oxydase est relativement thermostable jusqu'au 60°C au-delà de cette température l'activité de cette enzyme diminue progressivement, de plus les valeurs de pH optimum ainsi que les paramètres cinétiques ont été également estimées comme suit ; Deglet Nour (pH=4.5, $V_{max}= 0,339\pm 0,005$ Abs /min, $K_m=20,339 \pm 1,105$ mM) Degla beida (pH=4.5, $V_{max}= 0,162\pm 0,003$ Abs /min, $K_m= 21,393\pm 1,449$ mM), Ghars (pH=4.5, $V_{max}= 0,1249\pm 0,015$ Abs /min, $K_m= 18,241\pm 0,888$ mM).

Mots clés : *Phoenixdactylifera* L , Polyphénol oxydase , Condition optimales.

Abstract

This paper reports the study of the optimal conditions of polyphenol oxidase (PPO :EC 1.10.3.1) Extracted from three types of dates (*Phoenix dactylifera* L) cv Deglet-Nour, cv Degla beida and cv Ghars. The PPO of these date ones possess pyrogallol oxidase activity, measured by spectrophotometry at 330 nm using pyrogallol as substrate.

The study of thermal stability showed that pyrogallol oxidase is relatively thermostable up to 60 ° C Beyond this temperature the activity of this enzyme decreases progressively. In addition, optimum pH values and kinetic parameters were also estimated as follows:

Deglet Nour (pH=4.5, $V_{max}= 0,339\pm 0,005$ Abs /min, $K_m=20,339 \pm 1,105$ mM) Degla beida (pH=4.5 , $V_{max}= 0,162\pm 0,003$ Abs /min, $K_m= 21,393\pm 1,449$ mM), Ghars (pH=4.5, $V_{max}= 0,1249\pm 0,015$ Abs /min, $K_m= 18,241\pm 0,888$ mM).

Keywords: *Phoenixdactylifera* L , Polyphénol oxidase ,Optimal condition.