

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

**Etude de l'effet de pH sur les paramètres cinétiques
de l'activité catécholase de la PPO de Deglet Nour
(*Phoenix dactylifera L*)**

Présenté par :

-Mme. Mokhtari Shehrazed
- Mlle.Benaicha Nadia

Devant le jury :

Président:Mr Leoukh Mourad (MAA)

Rapporteur :Mr Gouzi Hicham(MCA)

Examineur:Mr Benaceur Farouk(MAB)

Soutenu publiquement le :.....2016.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

La mémoire de ma très chère maman.

Mon père qui m'a éclairée mon chemin et qui m'a encouragée et soutenue toute au long de mes études.

Ma chère petite sœur.

Mon tendre mari pour son soutien aux moments difficiles de mon travail et surtout pour sa patience.

Ma petite sucre adorée ma fille Djamilia

Toute Ma famille , surtout ma grand-mère.

Ma belle -famille , surtout Mes beaux parents.

*Mes collègues de travail du centre régional d'imagerie
médical Laghouat*

Enfin à tous ceux qui m'aiment ...

Shehrazed.

Dédicaces

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

Mes yeux: Mon père et ma mère ;

Ma chère à mon cœur : Wassila

Mes frères : Mohamed, Bachir, Khaled et Omar

A toute la famille

A tous mes collègues de travail du l'hôpital

Ksar El Hirane.

Enfin à tous ceux qui m'aiment....

Nadia

Remerciements

Ce mémoire n'aurait pu voir le jour sans l'appui scientifique et relationnel dont nous avons eu la chance de bénéficier durant ces cinq ans. Nous remercions notre dieu Allah le plus puissant. Nous remercions aussi tous ceux qui nous ont soutenus, plus particulièrement :

Nous exprimons notre très sincère reconnaissance à Monsieur Dr. Gouzi Hicham (Enseignant-Chercheur à l'Université Amar Telidji) pour la direction de ce travail. Tous ses conseils, ses remarques, sa très grande disponibilité, sa grande générosité et son soutien sans faille ont rendu cette étude possible. Vous nous 'avez appris à découvrir des horizons scientifiques insoupçonnés et vous nous avez appris l'humilité. Veuillez trouver ici le témoignage de notre affection et de notre profonde estime.

Nous désirons vous témoigner Cher professeur toute notre gratitude pour la confiance que vous nous 'avez accordé et nous voulons vous exprimer nos respects et notre affection. Nous souhaitons que ce travail soit à la hauteur de vos espérances.

Nous remercions les membres de jury qui ont accepté de juger ce travail malgré toutes les tâches dont il a la responsabilité.

NADIA ET SHAHRAZADE

Résumé

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

L'oxydation du catéchol par l'enzyme suit une cinétique michaelienne. Les valeurs des paramètres cinétiques V_{\max} et K_m trouvées à pH 5.6 et à 30°C sont respectivement : 324.77 $\mu\text{mol/l/min}$ et 26.79 mM. L'activité catécholase est optimale à pH 5.6 et à 70°C.

La nature des acides aminés du site actif de la PPO de datte impliqués dans l'oxydation du catéchol a été déterminée à l'aide de la représentation graphique de Dixon et Webb. L'aspartate, le glutamate et l'histidine sont les acides aminés du mécanisme catalytique de l'activité catécholase.

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

المخلص

استخلص إنزيم البوليڤينول من الرطب (دقلة نور) (*Phoenix dactylifera L.*) في محلول منظم فوسفات الصوديوم ذو التركيز 0.05 مول ودرجة حموضة 7 في وجود 1% PVPP. المستخلص الخام يحوي على نشاط إنزيمي واحد وهو الكاتيكولاز حيث قدر هذا النشاط بـ 17570 UE/mL في الشروط المثلى، 30°C، pH 5.6، كاتيكول Mm160. اتبعت أكسدة الكاتيكول من طرف الإنزيم حركة ميكائليس. قيم الخصائص الحركية المتحصل عليها في الشروط القصوى للقياس، K_m و V_{max} كالآتي: $324.77 \mu\text{mol/l/min}$ و 26.69mM . نشاط الكاتيكولاز هو الامثل في درجة حموضة 5.6 و 70°C. تم تحديد طبيعة الأحماض الأمينية للموقع الفعال للبوليفينول أكسيداز (لدقلة نور) في أكسدة الكاتيكول باستخدام التمثيل البياني Dixon و Webb الأسبارتات القلوتامات والهستيدين من الأحماض الأمينية لآلية حفاز نشاط الكاتيكولاز.

الكلمات المفتاحية: دقلة نور - بونيفينول - أكسيداز - كاتيكولاز - حركة آلية الحفاز - الإحمرار

Abstract

Polyphenol oxidase (PPO, EC 1. 10. 3. 2) was extracted from Deglet nour date (*Phoenix dactylifera* L.) in an aqueous medium in the presence of polyvinylpyrrolidone. The PPO crude extract exhibit only catecholase activity of 17570 EU/mL (pH 5.6, 30 ° C, 160 mM catechol).

The enzymatic oxidation of catechol follows Michaelis kinetic. The values of kinetic parameters V_{\max} and K_m found at pH 5.6 and 30°C are 324.77 $\mu\text{mol/l/min}$ and 26.79 mM, respectively. Catecholase activity is optimal at pH 5.6 and at 70°C

The nature of the amino acids of the active site of Deglet nour PPO involved in the oxidation of catechol was determined using the Dixon and Webb plots. Aspartate, glutamate and histidine seem to be the amino acids involved in the catalytic mechanism of the catecholase activity.

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

SOMMAIRE

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
2.1 Le palmier dattier d'Algérie : répartition géographique et production.....	4
2.2 La datte Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.).....	5
2.2.1 Définition.....	5
2.2.2 Classification botanique	6
2.2.3 Evolution physiologique.....	6
2.2.4 Caractéristiques morphologiques.....	6
2.2.5 Composition biochimiques et valeur nutritionnelle.....	7
2.2.5.1 Composition biochimique.....	7
2.2.5.2 Valeur nutritionnelle	8
2.2.6 Le brunissement enzymatique des dattes.....	8
2.3 Polyphénol oxydase.....	9
2.3.1 Historique.....	9
2.3.2 Nomenclature	9
2.3.3 Définition.....	10
2.3.4 Classification.....	10
2.3.5 Source et localisation.....	10
2.3.6 Caractéristiques réactionnelles.....	11
2.2.7 Structure.....	11
2.2.8 Le site actif.....	13
2.2.9 Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase.....	15
2.2.10 Méthodes de mesure de l'activité enzymatique.....	16
2.2.11 Spécificité de substrat.....	16
2.2.12 Effet du pH.....	17
2.2.13 Applications.....	18
CHAPITRE 3. MATERIEL ET METHODES.....	20
3.1 Matériels.....	20
3.1.1 Matériel biologique	20

3.1.2 Produits chimiques	20
3.2 Méthodes	20
3.2.1 Extraction de la PPO.....	20
3.2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	23
3.2.2.1 Principe.....	23
3.2.2.2 Mode opératoire.....	23
3.2.3 Mesure de l'activité catécholase.....	24
3.2.4 Détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}).....	26
3.2.5 Etude de la spécificité de substrat.....	26
3.2.6 Effet du pH.....	26
3.2.7 Analyse des résultats expérimentaux.....	27
CHAPITRE 4. RESULTATS ET DISCUSSION.....	29
4.1 Extraction de la PPO de Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.).....	29
4.2 Spécificité de substrat	29
4.3 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité catécholase.....	29
4.4 Effet du pH.....	32
4.5 Effet du pH sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}).....	34
CHAPITRE 5. CONCLUSION GENERALE.....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	41
ANNEXE.....	49

LISTE DES ABREVEATIONS

- C °** : Degré Celsius.
- g** : Gramme.
- His** : Histidine.
- min** : Minutes.
- mM** : millimolaire.
- %** : Pourcentage.
- µl** : Microlitre.
- PPO** : Polyphénol oxydase.
- PVPP**: Polyvinyl(poly)pyrrolydone.
- K_m** : Constante de Michaelis spécifique de l'enzyme.
- V_{max}** : Vitesse maximale de réaction.
- UI** : Unité international.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Fruit et graine du dattier (Munier, 1973 ; Buelguedj, 2001).....	5
Figure 2: schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994; Van Gelder et <i>al.</i> , 1997).....	11
Figure 3: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et <i>al.</i> , 1999).	14
Figure 4: L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005)	14
Figure 5: Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet clair) (Ben-Yosef et <i>al.</i> , 2010).....	14
Figure 6: Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO d'après Van Gelder et al. (1997).....	15
Figure 7: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO d'après Solomon et al. (1992)..	15
Figure 8: Les dattes Deglet nour d'Algérie (<i>Phœnix dactylifera</i> L.).....	20
Figure 9 : Extrait brut de la datte Deglet Nour (<i>Phœnix dactylifera</i> L.) avant centrifugation.....	21
Figure 10 : Extrait brut de la datte Deglet Nour (<i>Phœnix dactylifera</i> L) après centrifugation à 4000 tr/min.....	21
Figure11: Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase des dattes Deglet Nour (<i>Phœnix dactylifera</i> L.).....	22
Figure 12: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et al. (1951).....	24

Figure 13: Vitesse initiale d'oxydation du catéchol en fonction de la concentration de la PPO de datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.). Le milieu réactionnel (1 ml) contient 40 mM de catéchol dans 0.05 M de tampon acétate de sodium à pH 5.6.....	25
Figure 14 : representation de Linweaver-Burk en double inversée de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initial d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la PPO Deglet Nour (<i>Phaenix dactylifera</i> L.) à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 50 mM) et à 30°C.....	31
Figure 15: Représentation de michaelis-Menten de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initial d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la PPO Deglet Nour (<i>Phaenix dactylifera</i> L.) à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 50Mm) et à 30°C.....	31
Figure 16 : Activité catécholase de la PPO de datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) en fonction du pH. Le milieu reactionnel (1 ml) contenant 40 mM de catéchol et 30 µl de l'extrait enzymatique est incubé à 30°C.....	33
Figure17 : Dépendance des constantes cinétiques de la PPO de datte au pH. Les mesures de l'activité catécholase ont été effectué dans deux solutions tampons : tampon acétate de sodium (pH 3.6-5.6) et tampons phosphate de sodium (0.05 M ; pH 6-8). Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ont été déterminés à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934). Les valeurs de pK des groupements dissociables sont déterminées par la méthode de Dixon et Webb (1964).....	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Spécificité de substrat de la polyphénol oxydase de datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) (tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.6 et à 30°C).....	30
Tableau 2: les valeurs de K_m et pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales ...	32
Tableau 3: Le pH optimal de la polyphénol oxydase de quelques fruits et légumes utilisant le catéchol comme substrat.....	34
Tableau 4 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO de datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.).....	35

CHAPITRE 1.

INTRODUCTION GENERALE

A l'approche du mois de Ramadan, le musulman se prépare à jeûner et à profiter au maximum des bienfaits de ce mois béni. Parmi les traditions liées à ce mois figure la rupture quotidienne du jeûne avec des dattes. Ce fruit oblong et charnu pousse sur le palmier-dattier sous forme de régimes. Allâh mentionne cet arbre à plusieurs reprises dans le Coran et fera de ses fruits une nourriture pour les gens du paradis. Le Prophète en mangeait souvent et invitait tous les musulmans à en consommer. Mais pourquoi le choix du Prophète s'est-il porté sur les dattes ? (**Alwassat, 2011**). Les travaux de l'analyse physico-chimique de **Dowson et al. 1963** et **Kulkarni et al. (2008)** montrent que les dattes sont une source riche en glucides, en fibres alimentaires, en composés phénoliques, en vitamines et en macroéléments ; ce qui justifie le choix du prophète sur les dattes.

Le problème des dattes est leur durée très courte de conservation qui est dû aux brunissements enzymatique et non enzymatique. Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables des dattes (**Martinez et Whitaker, 1995**).

Le brunissement résulte le plus souvent de l'oxydation des composés phénoliques catalysée principalement par la polyphénol oxydase (polyphénol oxydase (PPO), monophénol, *o*-diphénol: oxygène oxydoréductase; EC 1. 14. 18. 1), une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (**Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979**) et (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín et al., 2006**).

En présence de l'oxygène moléculaire, la PPO présente deux activités différentes. Capable d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols, connue sous le nom d'activité crésolase ou monophénolase. Ces *o*-diphénols, sont à leur tour oxydés pour donner des *o*-quinones, connue sous l'appellation d'activité catécholase ou *o*-diphénolase. Ces derniers se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelés mélanine (**Varoquaux, 1978 ; Arslan et Doğan, 2005 ; Kolcuoğlu et al., 2006**).

La PPO obtenue, purifiée et caractérisée à partir de différentes sources de fruits et de végétaux, n'a été que très peu étudiée à partir des dattes (**Hamdan, 1975 ; Hasegawa et Maier, 1980 ; Sachde et al., 1989a, b ; Benchrair et Benchrair, 2010**).

Notre étude sera consacrée par conséquent à la recherche d'une meilleure compréhension de cette enzyme extraite à partir de la datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.). En particulier, on essayera de connaître ses propriétés biochimiques et de déterminer la nature chimique des acides aminés du site actif impliqués dans le mécanisme catalytique de l'oxydation du catéchol. Ainsi, notre travail présenté en cinq chapitres est séquencé comme suit. Le premier chapitre concerne une introduction générale. Le deuxième chapitre comprend un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la datte Deglet nour et sur la PPO. Dans le troisième chapitre, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. Le quatrième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Nous présenterons les résultats obtenus de l'extraction et de la caractérisation biochimique de l'enzyme. Ensuite, nous présenterons les résultats expérimentaux de l'effet du pH sur les paramètres cinétiques (V_{\max} et K_m) de l'enzyme. 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.

CHAPITRE 2.

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Le palmier dattier d'Algérie :répartition géographique et production

Les véritables palmeraies commencent sur le versant Sud de l'Atlas saharien, par les palmeraies DegletNour de Biskra (Tolga) à l'Est, par celles du M'zab au centre de Bni-Ounif à l'Ouest. A l'extrême Sud du Sahara, l'Oasis de Djanet constitue la limite méridionale de la palmeraie Algérienne. C'est dans le Nord-Est du Sahara qu'on trouve le 3/4 du patrimoine phoenicicole, à la région de Ziban, d'Oued-Righ et la cuvette d'Ouargla dont la production a été estimée de 849 082 qx en 2006. C'est aussi dans ces régions que sont produites les belles dattes, DegletNour et autres variétés commerciales: Ghars, MechDegla, Degla Beida. **(Quinten, 1996)**. La wilaya de Biskra est considérée comme la première région dattière du pays. Elle représente actuellement 27 % du patrimoine national avec une production dattière annuelle de 90000 tonnes suivi de près par la wilaya d'El-Oued **(Anonyme, 2003)**. Pendant la campagne phoenicicole (2003/2004), la production de dattes a été estimée de 4 721 540 qx soit une augmentation de 13 % par rapport aux années écoulées. Il est à noter que 49 % du volume global de la production sont représentés par la variété DegletNour. Effectivement, l'exploitation du palmier dattier constitue une source de revenus financiers appréciables pour les habitants des oasis.

L'Algérie et la Tunisie sont les premiers exporteurs de DegletNour en France et en Europe **(Guizani et al. 2010)**. Selon FAO (2005) l'Algérie se classe comme le sixième producteur dans le monde.

L'Algérie occupe le cinquième rang mondial avec une production annuelle entre 400000 et 430000 tonnes dont plus de 48 % est représentée par la variété *Deglet-Nour* soit une moyenne de 190000 à 210000 tonnes par an **(Anonyme, 2003)**. La *Deglet-Nour* de bonne qualité est souvent exportée. Elle constitue ainsi une source non négligeable de devises pour le pays.

Dans la société, le palmier dattier joue un rôle important dans le système oasien. Il favorise le développement d'un microclimat propice à la culture d'arbres fruitiers, maraîchers, fourragers ou céréaliers. Le palmier dattier constitue, ainsi, le pilier sur lequel repose tout le système oasien **(Quinten, 1995)**.

2.2 La datte DegletNour (*Phoenixdactylifera L.*)

2.2.1 Définition

La datte est une baie à une seule graine bien qu'on évoque souvent à tort un noyau. Elle contient une seule graine dite "noyau" Figure (1). La partie comestible de la datte, est dite "chair" ou "pulpe", donc elle se compose de :

Partie comestible, représentée par le mésocarpe dont la consistance peut être selon les variétés, le climat ainsi que la période de maturation :

Molle : le mésocarpe est très humidifié avec peu de saccharose (31% d'eau).

Demi-molle : telle que la DegletNour (18% d'eau).

Sèche : telle que la Degla Beida, Hamraia et la Mech Degla (12% d'eau).

Partie non comestible, formée par la graine ou le noyau, ayant une consistance dure. Le noyau représente 10 % à 30 % du poids de la datte (**Etienne, 2002**).

La maturation des dattes est longue, elle débute vers les mois de mars-avril, et leur récolte commence en octobre, dans le nord du Sahara. Dans les oasis du Sahara central, on cueille les premières dattes, une friandise, dès le mois d'aout, et même en juillet. Dans le sud du désert, le régime des pluies diffère, on doit alors cueillir les dattes à la fin de la saison sèche, début juillet, avant les pluies d'été (**Benchelal et Maka 2006**). Leur couleur va du blanc jaunâtre au sombre très foncé presque noir, en passant par les ambres, rouges et bruns.

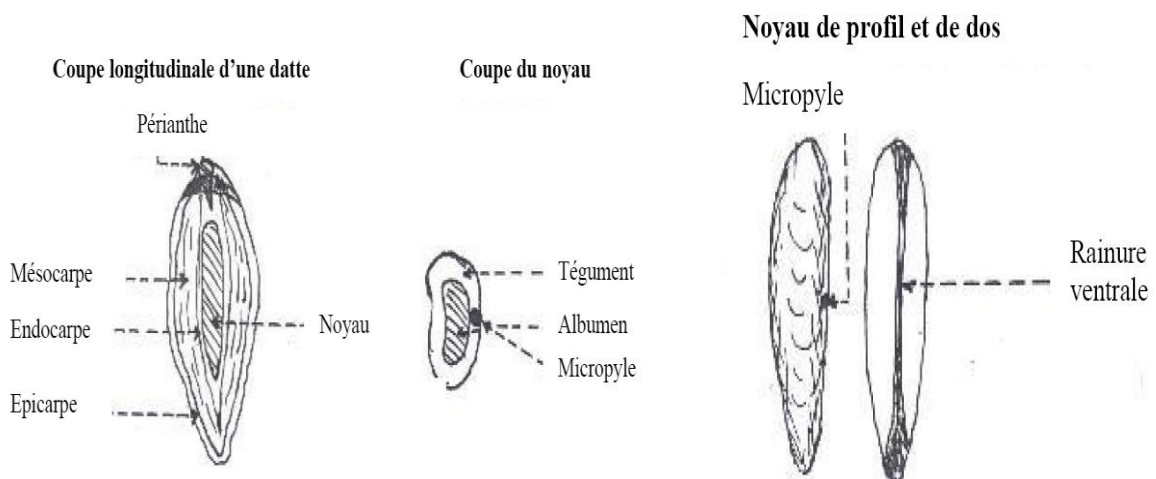


Figure 1 : Fruit et graine du dattier (**Munier, 1973 ; Buelguedj,2001**).

2.2.2 Classification botanique

Le palmier dattier dans le règne végétal se classe selon (Feldman, 1974 ; Djerbi, 1994):

Groupe : Spadiciflore.S

Embranchement : palmacées

Sous –embranchement : angiospermes

Classe : monocotylédones

Série : monocotylédone hypogynes

Ordre : spadiciflorales

Famille : palmoe

Tribu : phoenicées

Genre : *Phoenix*

Espèce : *dactylifera* L.

2.2.3 Evolution physiologique

Depuis la pollinisation jusqu'à la maturation complète de la datte et la récolte, on peut observer trois types d'évolution physiologique de la datte, qui sont (Kharoubi, 1995):

- Une évolution de taille ;
- Une évolution pondérale ;
- Une évolution de la couleur.

2.2.4 Caractéristiques morphologiques

En Algérie, les dattes les plus populaires sont : DegletNour et Ghars (Bessas et al., 2008). La DegletNour/Deglet-En-Nour qui veut dire « doigts de lumière » a été ramenée en Algérie vers le 8^{ème} siècle. Elle constitue jusqu'à l'heure actuelle l'unique variété appréciée sur les marchés nationaux et internationaux et par ce fait, elle est la plus lucrative sensible à l'altération et se conservant mal sur les lieux de production. La datte Deglet Nour est une datte demie molle et excellente. Ses dimensions, selon (Maatallah, 1970) sont les suivantes:

- Un poids moyen de 10 g ;
- Une longueur moyenne de 6 cm ;
- Un diamètre moyen de 1.8 cm ;
- Un noyau lisse, de petite taille 0.8-3cm, pointu aux deux extrémités. La rainure ventrale est peu profonde, le micropyle est central.

2.2.5 Composition biochimique et valeur nutritionnelle

2.2.5.1 Composition biochimique

Le pH : Le pH de la datte est légèrement acide, il varie entre 5 et 6. Ce pH est préjudiciable aux bactéries mais approprié au développement de la flore fongique (**Reynes et al. 1994**).

Les minéraux : La datte offre des minéraux et des oligo-éléments en quantité remarquable (**Munier, 1973 ; Al-wassat., 2011**). Elle en contient entre 1,5 et 1,8%, soit deux à trois fois plus que dans les fruits frais. La datte est parmi les fruits les plus riches en potassium (plus de 670 mg aux 100 g) (**Al-wassat, 2011**) et en calcium (62 mg) (**Frenot et Vierling, 1997 ; Al-wassat, 2011**). En magnésium (58 mg) et en fer (3 mg) ; une portion de 50 g de dattes fournit à peu près 10% des besoins quotidiens en fer et en magnésium. Elle renferme également du manganèse, du zinc et une quantité intéressante de cuivre : ce dernier participe à la formation de l'hémoglobine et du collagène (protéine nécessaire à la structure et à la réparation des tissus) dans le corps.

Les fibres alimentaires : La datte procure une portion intéressante de fibres. Quatre dattes fournissent entre 2 et 4 g de fibres, soit entre 5 et 8% de l'apport journalier recommandé. Les fibres insolubles (non absorbées par les intestins) agissent directement sur le transit et les fibres solubles jouent un rôle dans la réduction du taux de cholestérol et par conséquent aident à réduire les risques de maladies cardio-vasculaires (**Barreveld, 1993, Al-wassat, 2011**).

Le fluor : La datte contient une ration de fluor suffisante pour protéger les dents des caries (**Al-wassat, 2011**).

Les protides : Son taux de protides atteint 2,5% dans le fruit sec contre 1% maximum dans le fruit frais. Par contre, son pourcentage de lipides reste extrêmement faible (<1%) (**Ghazi et Teffahi, 2007 ; Alwassat, 2011**).

Les vitamines : Lorsqu'elle est séchée, son apport en vitamines du groupe B est remarquable : vitamine B3 (1,7 mg), vitamine B5 (0,8 mg), vitamine B6 (0,15 mg) et vitamine B2 (0,10 mg). En revanche, la vitamine C diminue considérablement (2 mg contre 15mg dans le fruit frais). (**Munier, 1973 ; Al-wassat, 2011**).

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

Les enzymes : La bonne connaissance des activités enzymatiques est d'une importance pratique pour l'aspect qualité en procédés alimentaires. En effet, par la manipulation de la température et l'humidité on peut stimuler ou désactiver l'enzyme suivant un résultat désiré (**Barreveld W.H., 1993**). L'activité des enzymes est connue pour être en grande relation avec la texture et la couleur des dattes (**Zaid, 2002 ; Belarbi, 2001 ; Yahiaoui, 2000 ; Al-Hooti et al., 1997 ; Reynes, 1997 ; Aziza et al., 1986 ; Mutlak et Mann, 1984 ; Smolensky et al., 1975**). Parmi les enzymes les plus regardées dans ce sens on trouve la polyphénol oxydase (PPO) et la peroxydase (POD). Selon **Belarbi A. (2001)**, ces deux enzymes sont responsables du brunissement enzymatique du fruit.

2.2.5.2 Valeur nutritionnelle

La datte « Degletnour » est un fruit très énergétique. Elle est légendaire pour la perfection qu'on lui connaît. La datte est qualifiée de « la reine des dattes » et l'un des produits phares de l'agriculture algérienne. Dotée d'un goût très doux, juteuse et quasi-transparente, elle est la plus populaire des dattes. Grâce à son effet laxatif, la datte est un aliment essentiel pour les femmes enceintes avant l'accouchement, car elle purgent le colon et les intestins et simplifie ainsi l'accouchement.

Le jus de dattes mixé avec du lait constitue une boisson très nourrissante et fortifiante pour les petits et même pour les grands. Les dattes agissent efficacement sur les troubles intestinaux (**Benchelah et Maka, 2006 ; Al-wassat, 2011**). Le sirop de datte est une médication intéressante pour traiter l'insuffisance cardiaque et les troubles sexuels (**Al-wassat, 2011**).

2.2.6 Le brunissement enzymatique des dattes

Le brunissement enzymatique est un problème significatif dans un certain nombre de produits importants, particulièrement fruits tels que des abricots, des pommes, des poires, des pêches, des bananes, et des raisins ; légumes comme pommes de terre, champignons, et laitue ; et fruits de mer tels que la crevette, les langoustes, et les crabes (**Sapers, 1993**).

Selon **Nicolas et Potus, 1993** ; les phénomènes de brunissement des tissus végétaux sont la première manifestation d'un désordre cellulaire après une mise en contact accidentelle de substrats et d'enzymes.

Les substrats phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (**Salunkhe, 1990**). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont: les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins, responsables de la structure des fruits et légumes. Ils sont transformés en quinones, qui se polymérisent grâce à l'oxygène ; conduisent à des composés plus ou moins colorés. Ils peuvent réagir avec les acides aminés.

Le brunissement enzymatique est dû à des enzymes les polyphénol-oxydases. (**Macheix et al., 1990**). en général, les dattes sont riches en polyphénols (substrats) dont l'oxydation enzymatique est à l'origine du brunissement plus ou moins intense (**Jarrah et al., 1982**).

En effet, au cours du stockage, la qualité relative des polyphénols simple et des tanins solubles diminue. Les flavones disparaissent en donnant des composés oxydés de couleur brune ainsi que des acides dactylifériques (**Mohamed et al., 1985**).

La vitesse de la réaction dépend de la teneur en substrat. Le pH optimum pour la réaction est 5-7, souvent 6-6,5. C'est pourquoi les fruits les plus acides brunissent moins. Tant que les tissus restent sains, il n'y a pratiquement pas de brunissement. (**Cheftel et al., 1977**).

2.3 Polyphénol oxydase

2.3.1 Historique

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en **1856** par **Schoenbein** dans le champignon *Boletus luciferus*. Et fut mise en évidence par **Bertrand (1896)** dans la bettrave ; le dahlia et certains champignons. Depuis sa découverte, la polyphénol oxydase a fait l'objet de recherches intensives (**Zawistowski et al., 1991 ; Robb, 1984**). Ces recherches ont portés, d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieures (**Bonner, 1957**).

2.3.2 Nomenclature

Des noms différents ont été associés à la polyphénol oxydase dont la phénolase, phénol oxydase, tyrosinase, crésolase, catécholase, diphénolase, o-diphénol oxydase et acide chlorogénique oxydase. La polyphénol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats qui sont généralement de o-quinones (**Rivas et Whitaker, 1973 ; Sugumaran et al., 1998 ; Burton, 1994**).

2.3.3 Définition

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

2.3.4 Classification

La PPO a été placée dans deux catégories principales :

1) *monophénolmonooxygénase ou tyrosinase (EC 1.14.18.1)* :

La PPO (EC 1.14.18.1) est une oxygénase aussi bien qu'une oxydase (**Decker et Terwilliger, 2000**).

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

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

2.3.5 Source et localisation

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

La PPO a été également trouvée chez les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et les mycètes (**Burton, 1994 ; Whitaker, 1995 ; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006**). On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. La PPO peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (**Zawistowski et al., 1991 ; Mayer et Harel, 1979**).

2.3.6 Caractéristiques réactionnelles

En présence d'oxygène moléculaire, la PPO catalyse deux réactions bien distinctes (Figure 2) à savoir l'ortho-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (catéchols) (activité crésolase ou hydroxylase, monophénolase) (Réaction (1)) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénol en o-quinones, activité fréquemment désignées sous le nom de lapolyphénol oxydase, o-diphénol oxydase, catéchol oxydase ou activité catécholase (EC 1.10.3.1) (Réaction(2)) (Metzler, 1977 ; Cho et Ahn ,1999; Tomas-Barberà et Granataal.,2005).

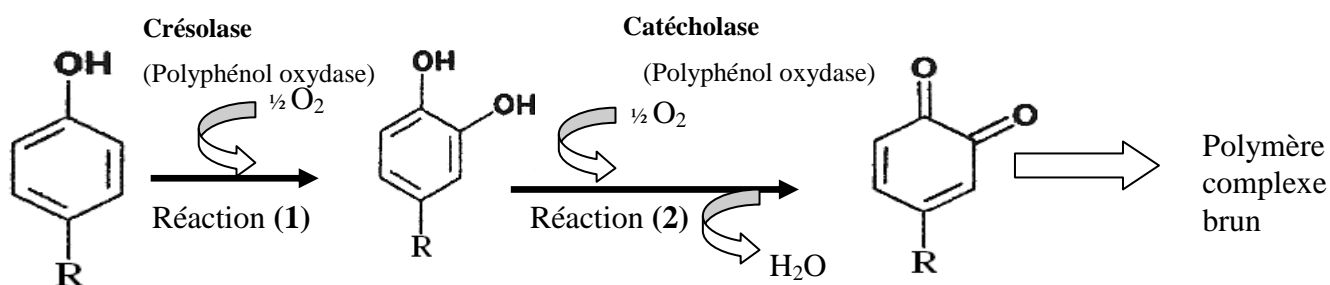


Figure 2: schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994; Van Gelder et al., 1997).

Les o-quinones produits de la transformation des substrats de la PPO sont fortement réactifs et peuvent subir des réactions de polymérisation et de cyclisation non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène noir, brun ou rouge, généralement appelé mélanine, soit réagir avec des acides aminés ou des protéines pour produire des composés colorés (Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2007, Dicko et al., 2002 ; Cho et Ahn, 1999; Burton, 1994).

2.2.7 Structure

La structure cristallographique de la PPO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006 ; Siegbahn, 2003). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (DellaLonga et al., 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright et al., 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et al., 1997).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch, 1982**). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*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**). Seule la structure cristalline de la PPO de patate douce (*Ipomoeabatatas*) sous sa forme active, a été résolue (**Klabunde et al., 1998**).

La PPO native du champignon de souche *Agaricusbisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H_2L_2 . Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L_2H . Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la PPO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (**Strothkamp et al., 1976 ; Robb, 1984 ; Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker, 1995 ; Solomon et al., 1996 ; Van Gelder et al., 1997 ; Jolivet et al., 1998 ; Fan et Flurkey, 2004**).

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

Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (**Mayer et Harel, 1979 ; Anosike et Ayaebene, 1982**). Ces formes d'enzyme, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs.

2.2.8 Le site actif

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

La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (**Mayer et Harel, 1991 ; Turner, 1974**).

La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7), (**Jolivet et al., 1998 ; Ros et al., 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken et al., 1999 ; Haghbeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006**). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice α_2 (Figure 3). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (Figure 4). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est située au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (**Klabunde et al., 1998**). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 5) (**Van Gelder et al., 1997**).

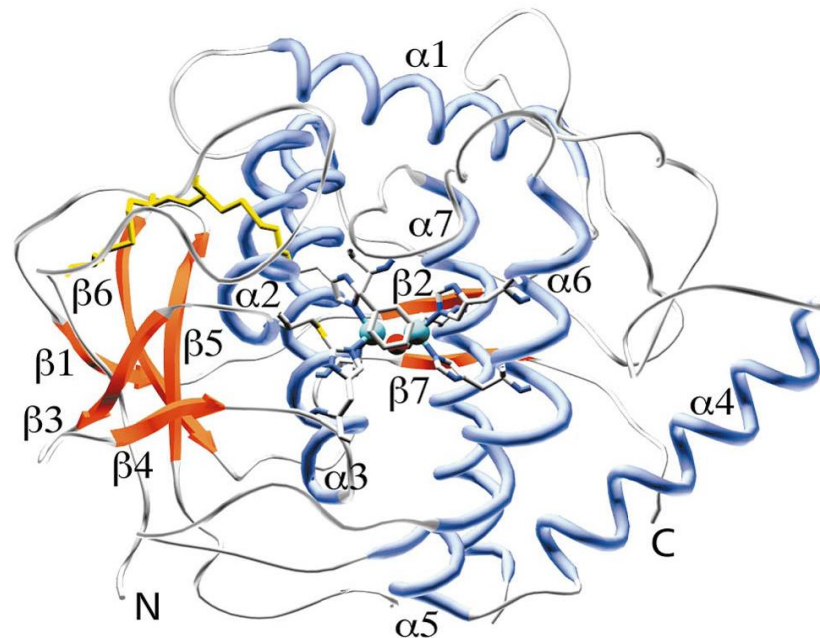


Figure 3: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken *et al.*, 1999).

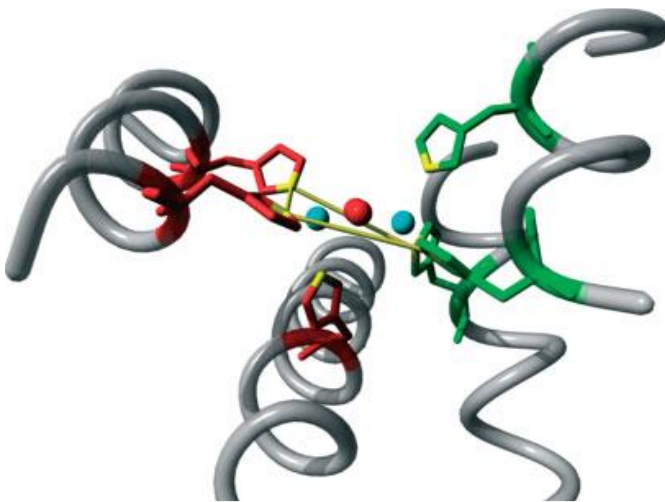


Figure 4: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

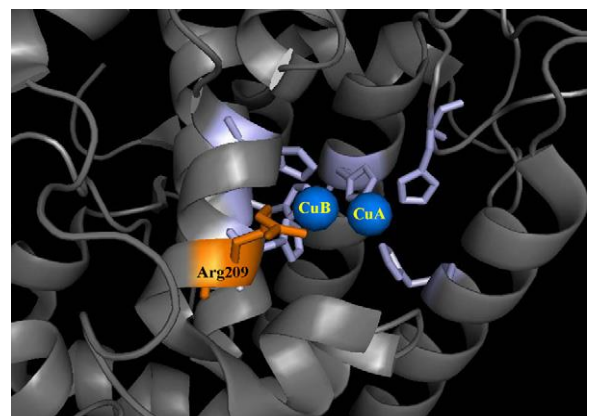


Figure 5: Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivre (violet clair) (Ben-Yosef *et al.*, 2010).

2.2.9 Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase

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

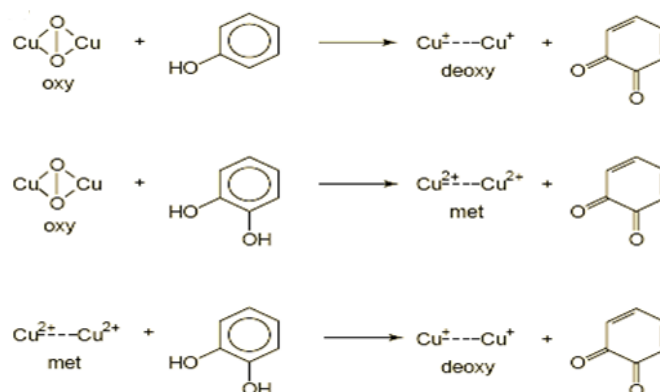


Figure 6: Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ;Deoxyet Oxy PPOd'après **Van Gelder et al. (1997)**.

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

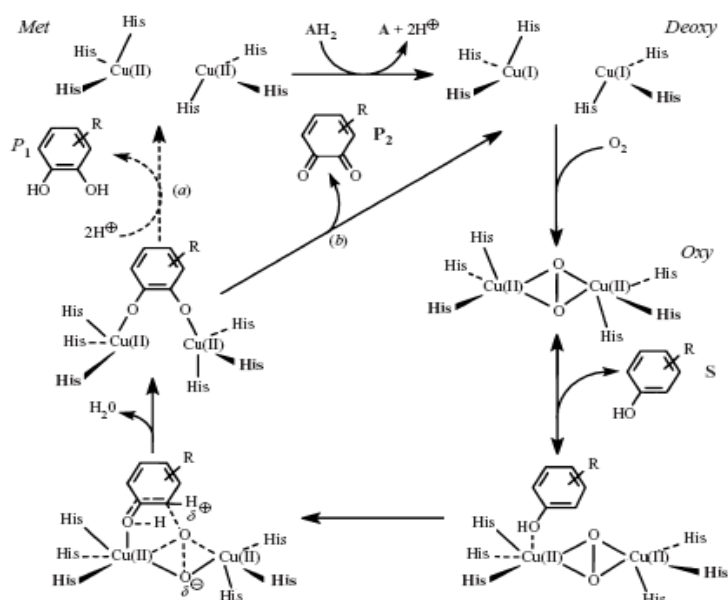


Figure7: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO **Solomon et al. (1992)**.

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

2.2.10 Méthodes de mesure de l'activité enzymatique

L'activité de la PPO peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Il est nécessaire, de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par le produit de la réaction (*o*-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation du produits (Vámos-Vigyázó, 1981).

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurée par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de Warburg ou, par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991 ; Gaillard et al., 1993 ; Naish-Byfield et Riley, 1992). La vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (*o*-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et al., 1991 ; Espín et al., 1995). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple: le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (Vámos-Vigyázó, 1981). La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase, est la mesure de la production d'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- ^3H] monophénol tel que la [3.5- ^3H] tyrosine (Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et al., 1998). On peut également déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ($\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou le NADH à 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mayer et al., 1966 ; El-Bayoumi et Frieden, 1957 ; Zawistowski et al., 1991).

2.2.11 Spécificité de substrat

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent catalyser une grande variété de substrats (Whitaker, 1995). La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention tel que, l'espèce, le genre, le *cultivar*, ou également le tissu (Zawistowski et al., 1991).

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

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

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

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

2.2.12 Effet du pH

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO, varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées, il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur. Nous pouvons citer le type de tampon, la pureté de la préparation enzymatique et le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaires pour sa fixation et sa transformation (Kuby, 1991).

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la PPO par : (1) l'inactivation de l'enzyme à cause du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la réaction catalytique, (2) le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou (3) la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H^+ ou les hydroxyles OH^- sont impliqués.

2.2.13 Applications

La PPO est l'une des enzymes ayant de multiples applications. Elle est utilisée dans la production des o-diphenols comme la L-dopamine et le catéchol (**Min et al., 2010 ; Seetharam et Saville, 2002 ; Marín-Zamora et al., 2009 ; Tuncagil et al., 2009**).

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

Dans le domaines agroalimentaire et environnemental, les biocapteurs à tyrosinase peuvent être utilisé 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'azide de sodium (**Cui et al., 2006**), et le fluorure de sodium (**Asav et al., 2009**).

La PPO sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivée au niveau des eaux usées (**Yamada et al, 2005 ; Seetharam et Saville, 2003 ; Ikehata et Nicell, 2000**).

CHAPITRE 3.

MATERIEL ET METHODES

3.1 Matériel

3.1.1 Matériel biologique

La dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) (Figure 8) est utilisée comme source de la polyphénol oxydase (PPO). Elle est achetée à maturité du marché local de la Wilaya de Biskra dans la semaine précédente de son utilisation. Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conserver à 4°C.



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

3.1.2 Produits chimiques

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

3.2 Méthodes

3.2.1 Extraction de la PPO

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

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



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

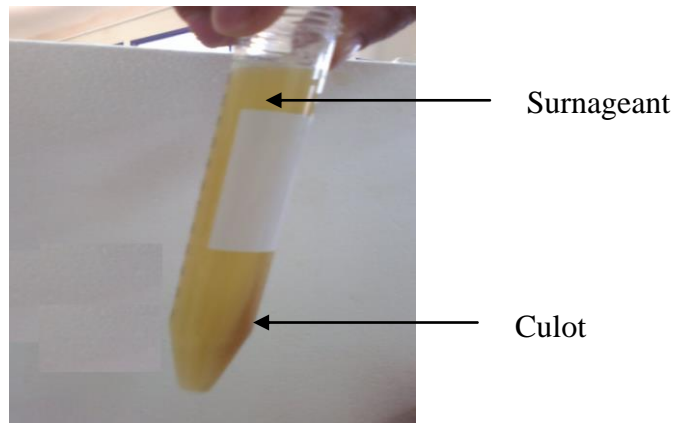


Figure 10 : Extrait brut de la datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L) après centrifugation à 4000 tr/min.

Le diagramme de l'extraction de la PPO des dattes Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) est le suivant :

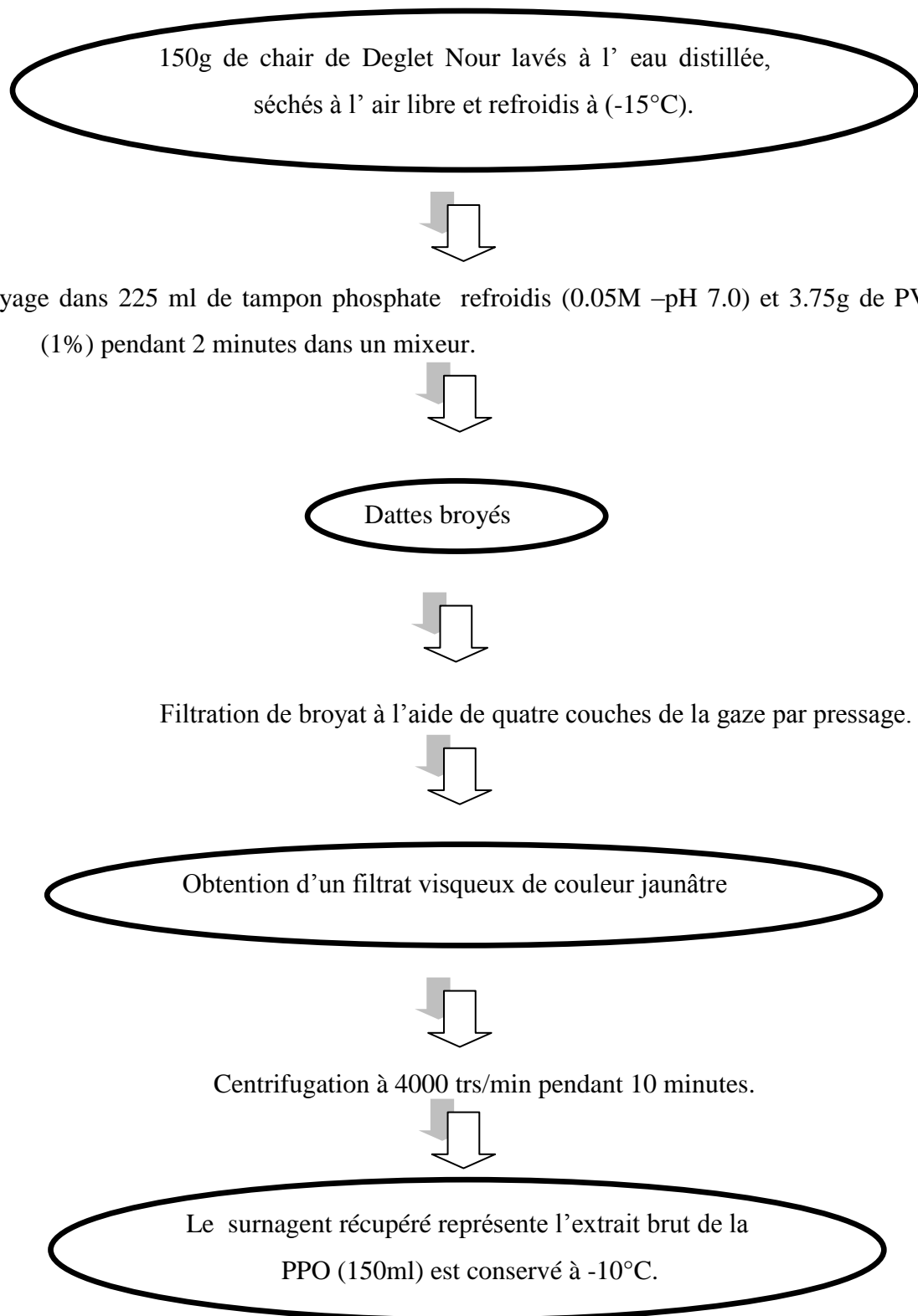


Figure11: Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.).

3.2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

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

3.2.2.1 Principe

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

La méthode est sensible à moins de $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ et elle est probablement la méthode de dosage des protéines largement répandue bien qu'elle soit seulement relative. Le principe de cette méthode est la production d'ions cuivreux qui réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu (**Wilson et Walker, 1996**). La concentration de protéine dans l'extrait enzymatique est calculée par interpolation linéaire à partir d'une gamme étalon contenant le sérum albumine de poule.

3.2.2.2 Mode opératoire

Au temps (t_{p_0}), dans des tubes à essais on ajoute $40 \mu\text{l}$ d'échantillon à doser à 1 ml de réactif (A) (*Annexe*). On mélange les tubes au vortex et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante et l'abri de la lumière. Au temps ($t_{p_0+10 \text{ min}}$), on ajoute 4 ml de réactif (B) (*Annexe*) dans chaque tube. Les tubes sont placés au bain-marie réglé à 50°C pendant 5 minutes puis refroidis rapidement sous l'eau froide. La lecture de la densité optique est effectuée à 650 nm contre un blanc réactif. Une courbe d'étalonnage, établie à partir de diverses dilutions d'une solution mère de sérum albumine de poule à 1 g/l, permet de déterminer la concentration en protéines (Figure 12).

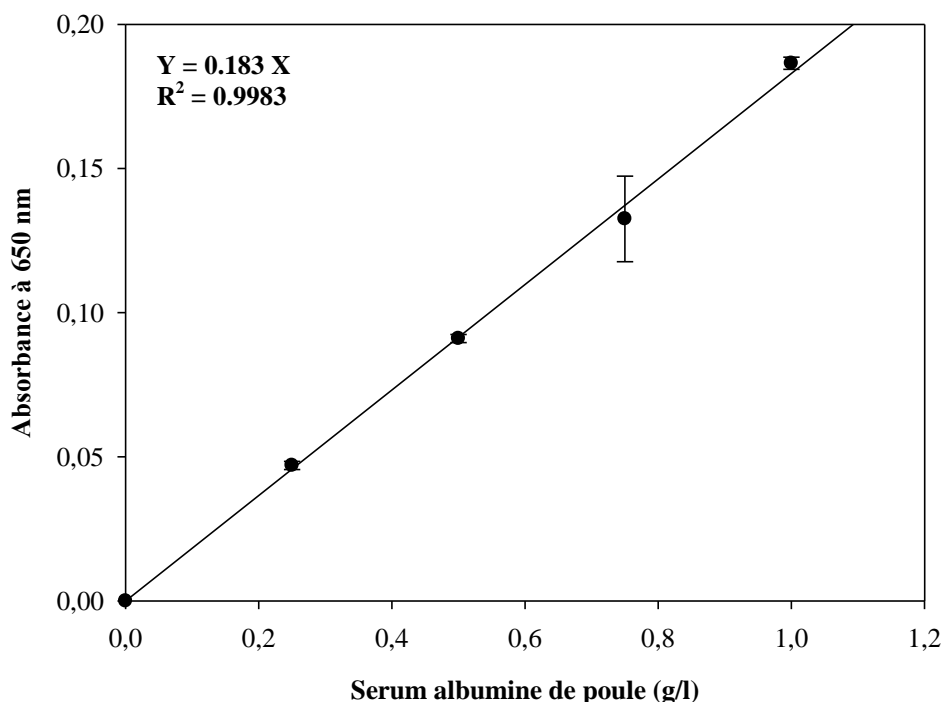


Figure 12: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de **Lowry et al. (1951)**.

3.2.3 Mesure de l'activité catécholase

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

Le catéchol à 0.4 M est préparée dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (**Fan et Flurkey, 2004**). Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 30 μ l d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant deux minutes après l'ajout de l'extrait enzymatique. La vitesse initiale (v_0) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps Figure (13) (**Ünal, 2007**).

Une unité internationale (1 UI) est définie comme la quantité d'enzyme qui forme 1 μ mole d'*o*-benzoquinone par minute (**Zheng et al., 2004; Erat et al., 2005 ; Gawlik-Dziki et al., 2007; Kumar et al., 2008**).

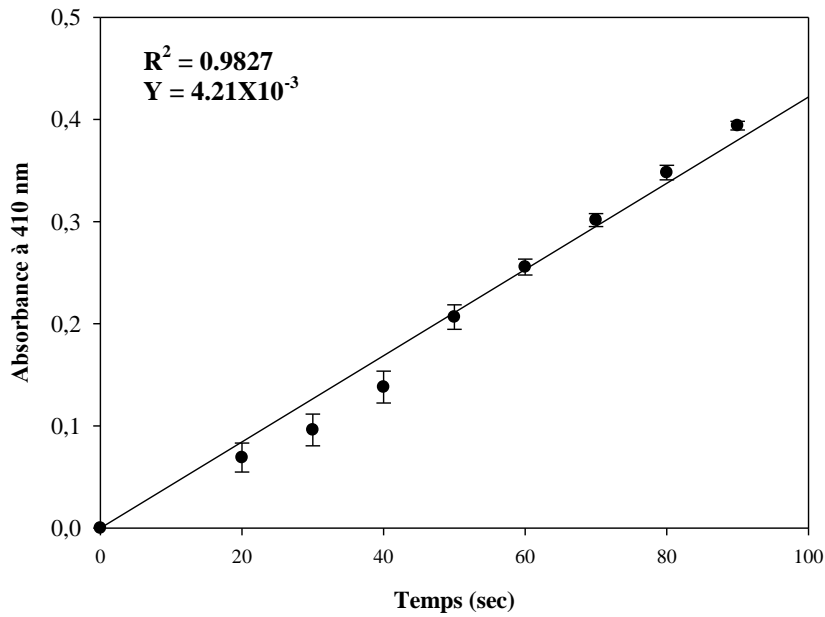


Figure 13 : Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la PPO de datte Deglet noir (*Phoenix dactylifera* L.) (pH 5.6-0.05 M tampon acétate de sodium ; catéchol 40 mM ; 30°C, extrait enzymatique 30 µl).

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

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

Avec :

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

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

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

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

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

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

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

3.2.4 Détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max})

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

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

3.2.5 Etude de la spécificité de substrat

La spécificité de substrat a été étudiée par la mesure de l'activité de la PPO en présence de six différents substrats phénoliques (L-tyrosine (475 nm), phénol (390 nm), catéchol (410 nm), pyrogallol et l'acide gallique (420 nm), et le 4-méthylcatéchol (400 nm)) (Gouzi et Benmansour, 2007 ; Benjakul et al., 2005 ; Orenes-Peñero et al., 2006).

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

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

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

3.2.6 Effet du pH

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

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

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

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

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

3.2.7 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 : Excel® (Microsoft Excel 97-2003) et Sigma Plot 2011 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0).

CHAPITRE 4.

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Extraction de la PPO de DegletNour (*Phœnix dactylifera* L.)

La méthode d'extraction de la PPO décrite par **Benchrair et Benchrair (2010)** s'est avérée simple à mettre en œuvre, rapide et permet d'obtenir un extrait brut de couleur jaunâtre ayant une activité PPO considérable. L'utilisation de poly(vinyl)polypyrrolidone (PVPP) dans la solution d'extraction de la PPO est avérée très utile, puisque ce polymère clarifie l'extrait brut de la PPO et stabilise sa couleur en éliminant les substrats phénoliques présents dans les dattes qui peuvent être oxydés par l'enzyme en o-quinones provoquant ainsi l'inactivation de la PPO (**Wuyts et al., 2006 ; Fang et al., 2007**).

Les activités volumique et spécifique ainsi calculées sont respectivement, 18.59 ± 1.14 UI/ml et 6.76 ± 0.41 UI/mg. L'activité catécholase était très stable pendant plusieurs semaines une fois conservée à -10°C . Selon **Vámos-Vigyázó (1981)** et **Önez et al. 2008**, la PPO reste stable à des températures inférieures à zéro. La stabilité de l'activité enzymatique peut être expliquée par l'effet protecteur (crowding) de la structure de la PPO par les sucres présents dans les dattes (**Hadjari et Kadi Hnifi, 2005 ; Al-Hooti et al., 1995 ; Sawaya et al., 1982 ; Arakawa et Timasheff, 1982**).

Nous avons constaté que le sodium dodécyl sulfate n'a pas d'effet sur le taux d'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO des dattes. Ceci confirme que cette enzyme se trouve dans une conformation complètement active.

4.2 Spécificité de substrat

Les résultats de l'étude de la spécificité de substrat de l'extrait brut de la PPO, est représentée dans le Tableau 1. La PPO de datte est capable d'oxyder activement le catéchol et le 4-méthylcatéchol. Une activité PPO moyenne a été observée avec le pyrogallol. Par contre, l'extrait enzymatique ne peut pas catalyser l'oxydation des monophénols comme la L-tyrosine et le phénol et par conséquent ne possède pas l'activité monophénolase.

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

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

Tableau 1: Spécificité de substrat de la polyphénol oxydase de datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) (tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.6 et à 30°C).

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

4.3 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité catécholase

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

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

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

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

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

Où

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

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

S est la concentration de catéchol (mM) ;

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

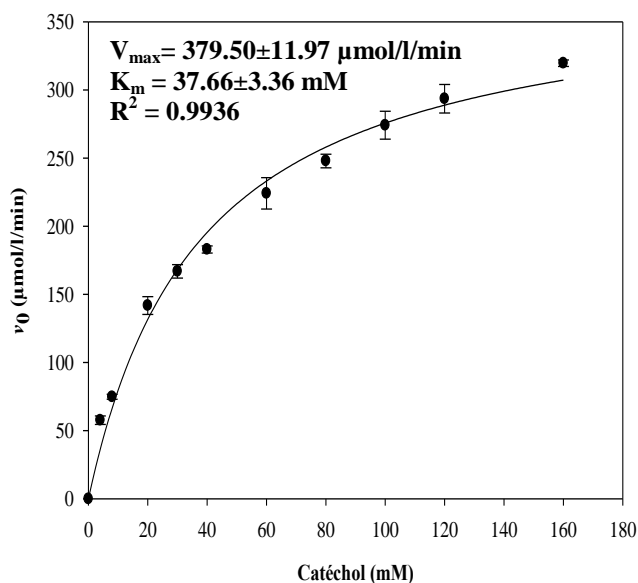


Figure 14: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la PPO Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 50Mm) et à 30°C.

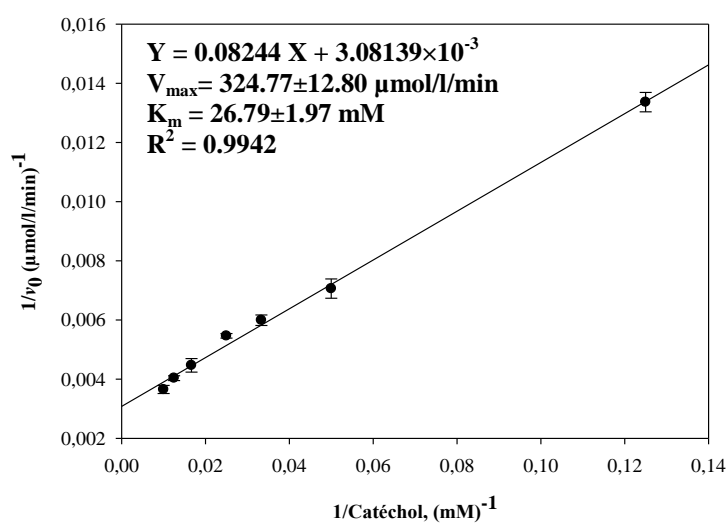


Figure 15 : représentation de Lineweaver-Burk en double inversée de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la PPO Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 50Mm) et à 30°C.

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

La Figure (14) montre que l'activité *o*-diphénol oxydase augmente jusqu'à 160 mM de catéchol au-delà de laquelle la vitesse initiale demeure relativement constante.

La constante de Michaelis-Menten (K_m) mesure l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat, la faible valeur de ce paramètre signifie que l'enzyme a une forte affinité vis-à-vis de son substrat (Siddiq *et al.*, 1992). D'après le Tableau (2) on remarque que l'affinité de la PPO de Deglet nour vis-à-vis du catéchol est relativement similaire par rapport à celles des PPOs de céleri, de raisin et de pomme. Par contre les PPOs de champignon de Paris, de cerise, d'artichaut, de banane et de datte de deux variétés Barhee et Zahdiont l'affinité la plus élevée vis-à-vis de catéchol comme substrat.

Tableau 2: les valeurs de K_m et pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales.

La source	K_m (mM)	pH	Référence bibliographique
Dattes d'Iraq :			
Barhee	3.5-8.75	6	Sachde <i>et al.</i> (1989)
Zahdi		7	
Céleri (<i>Apiumgraveolens</i> L)	29	7	Aydemir et Akkanli (2005)
Pomme	34		Oktayet <i>al.</i> (1995)
Artichaut(<i>Cynarascolymus</i> L.)	10.7	7	Dogan <i>et al.</i> (2005) .
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i> L)	5.2	7	Kumar <i>et al.</i> (2008)
Banane (<i>Musa cavendishii</i>)	8.5	7	Ünal (2007)
Datte Degletnour (<i>Phoenixdactylifera</i> L.)	26.8	5.6	Notre étude
Raisin (<i>Vitisvinifera</i> L. cv. Emir)	25.1	4.2	Ünal et Şener (2006)
Chapignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	0.40	7	Gouzi et Benmansour (2007)

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

Les valeurs de K_m de la PPO varient avec la source d'enzyme, le pH, la température, la méthode de mesure de l'activité enzymatique, le degré de pureté de l'enzyme et de la méthode d'extraction utilisée (Arslan *et al.*, 1997; Dogan et Dogan, 2003).

4.4 Effet du pH

Le pH est parmi les facteurs qui influent sur l'activité des enzymes. L'activité catécholase de la PPO de date Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) est mesurée à différentes valeurs de pH utilisant le catéchol comme substrat. L'enzyme est active dans la gamme de pH

compris entre 3.6-8 et possède une activité maximale à pH 5.6 avec une activité maximale de moitié à pH 3.6 (Figure 16).

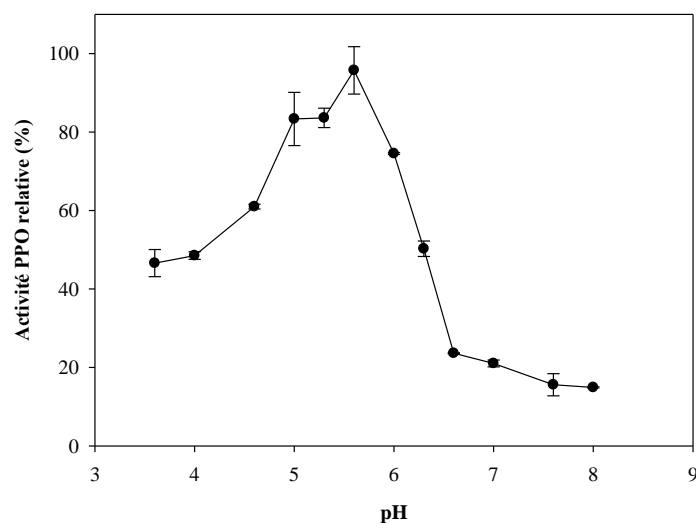


Figure 16 : Activité catécholase de la PPO de datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) en fonction du pH. Le milieu réactionnel (1 ml) contenant 40 mM de catéchol et 30 μ l de l'extrait enzymatique est incubé à 30°C.

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

Comme l'indique le Tableau (3), la PPO de datte est plus active dans les conditions acides que dans les conditions alcalines, ce qui est nettement différent par rapport à la plus part des PPOs qui montrent une activité PPO maximale dans le domaine de pH neutre ou proche de la neutralité. Le comportement de la PPO de datte Deglet Nour vis-à-vis du pH est similaire par rapport à celui des PPOs des autres sources (Tableau 3).

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

Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; Yoruk et Marshall, 2003). Il dépend de la source de la 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 (Whitaker, 1994 ; Luh et Phithalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Kolcuoğlu et al., 2006).

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

Tableau 3: Le pH optimal de la polyphénol oxydase de quelques fruits et légumes utilisant le catéchol comme substrat.

Source de la PPO	pH optimal	Reference bibliographique
Laitue (<i>Lactuca sativavar, capitata</i> L.)	5.5	Gawlik-dziki et al. (2007)
Fraise (<i>Fragariaananassa</i>)	5	Dalmadi et al. (2006)
Banane	6.5	Ünal (2005)
Chou fleur (<i>Brassicaoleraceavar, botrytis italica</i>)	5.7	Gawlik-Dziki et al. (2007)
Poire sauvage (<i>Pyruselaegrifolia</i>)	6	Yerlitürk et al. (2008)
Datte degletnour (<i>Phoenixdactylifera</i> L.)	5.8	Bechrair et Bechrair (2010)
Fleur de viol (<i>rapeflower</i>)	5.5	Sun et al. (2012)
Choux de Chine (<i>Brassicarapa</i> L.)	5	Nagai et Suzuki. (2001)
Raisin dechaunac	6	Lee et al. (1983)
Datte (Zahdi et Barhee)	6.8	Sachde et al. (1989)
Datte Degletnour (<i>Phoenixdactylifera</i> L.)	5.6	Notre travail

4.5 Effet du pH sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max})

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

Les valeurs de K_m et V_{max} ont été déterminés à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver et Burk (1934). D'après le Tableau (4) on remarque que le pH agit simultanément sur la vitesse maximale et la constante de dissociation du complexe ES. Au-dessous du pH 5.0, l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du catéchol est la plus élevée. Par contre aux pHs supérieurs à 5.0, l'affinité de l'enzyme diminue. Par conséquent, le site actif de la PPO de datte à l'état plus protoné fixe mieux le catéchol. En termes de pouvoir catalytique, la PPO de datte catalyse efficacement le catéchol à pH 5-5.3.

Tableau 4 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO de datte Deglet nour (*Phoenix dactylifera* L.).

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

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

Les valeurs pK des groupements ionisables essentiels impliqués dans le processus catalytique ont été déterminées pour la PPO de datte Deglet Nour à partir de la représentation de **Dixon et Webb (1979)**. A partir des courbes de $\text{Log}V_{max}\text{-pH}$ et $\text{Log}K_m\text{-pH}$ (Figures 1A,B) nous avons pu calculer une seule constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (pK_{BES}), qui est égale à 6.3. Cette valeur peut être attribuée à l'histidine (**Whitaker, 1994**). Les valeurs approximatives des constantes qui correspondent à l'enzyme libre, pK_{AE} et pK_{BE} , calculées à partir de la courbe $\text{Log}(V_{max}/K_m)\text{-pH}$, sont respectivement 3.75 et 5.4.

D'après ces résultats on suggère l'existence d'au moins deux groupements ionisables, imidazole et carboxylique, de l'histidine et de l'acide aspartique, respectivement, qui constituent les acides aminés de l'acte catalytique de la PPO de datte lors de l'oxydation du catéchol. **Rosa et Emiola (1980)** supposent aussi que le groupement carboxylique et imidazole sont localisés au niveau du site actif de la PPO de la pomme de terre douce.

Gutteridge et al. (1977) ont trouvés que le résidu histidine est essentiel pour l'activité des PPOs des champignons (*Neurosporacrassae*) et (*Agaricusbispora*).

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

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

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

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

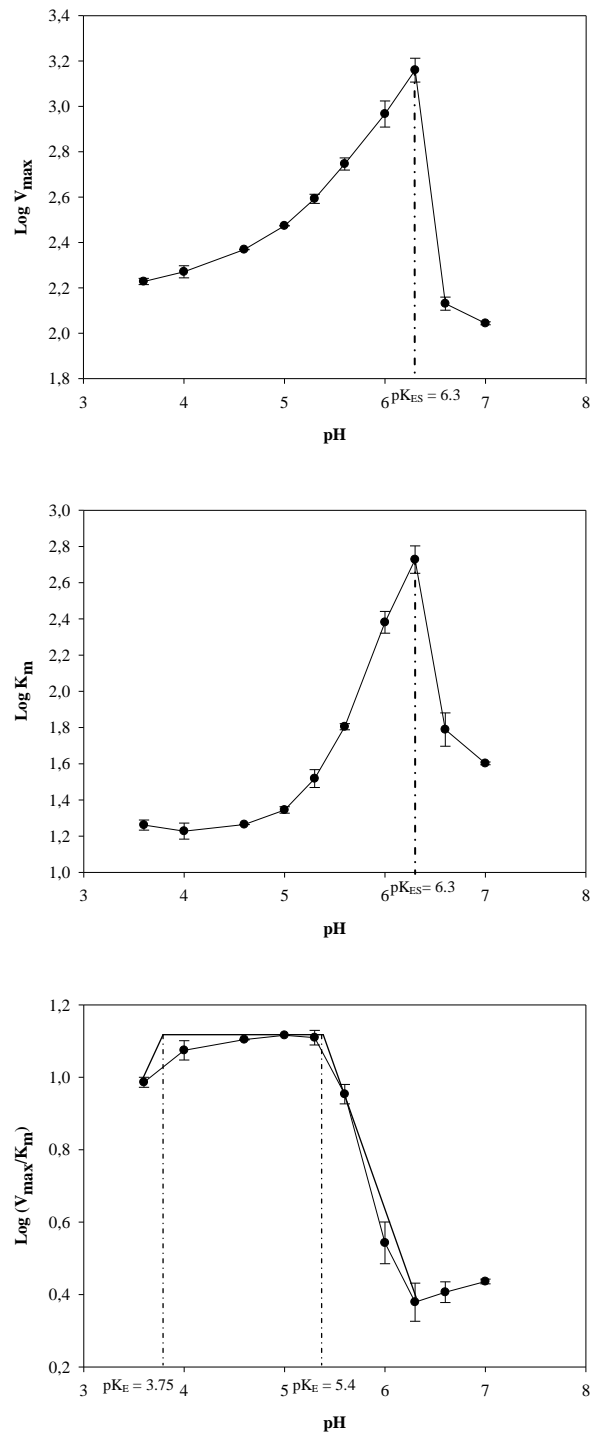


Figure17 : Dépendance des constantes cinétiques de la PPO de datte au pH. Les mesures de l'activité catécholase ont été effectuées dans deux solutions tampons : tampon acétate de sodium (pH 3.6-5.6) et tampons phosphate de sodium (0.05 M ; pH 6-8). Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) ont été déterminés à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934). Les valeurs de pK des groupements dissociables sont déterminées par la méthode de Dixon et Webb (1964).

CHAPITRE 5.

CONCLUSION GENERALE

La polyphénol oxydase de datte Deglet nour (*Phoenixdactylifera* L.) a été facilement extraite en milieu aqueux en présence de polyvinyl (poly) pyrrolidone. L'extrait enzymatique brut possède seulement une activité catécholase considérable. La PPO de datte est thermorésistante et très active dans un milieu acide. Le catéchol est le meilleur substrat de la PPO de Deglet nour. La PPO peut oxyder le catéchol à forte concentration sans aucun effet inhibiteur.

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

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

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

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aldo T., Cavallaro R., Argento S., Branca F., and Spagna G. (2011). Study and characterization of polyphenol oxidase from eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 59, no 20, pp. 11244-11248.
- Al-Hooti, S.; Sidhu, J.S., (1997). Qabazard, H. Objective color measurement of fresh date fruits and processed date products. *Journal of Food Quality*, Vol 20: 257-266.
- Al-hooti, S., Sidhu, J.S. & Qabazard, H. (1996). Objectif color measurement of fresh date fruits and processed date products. *Journal of Food Quality*, Vol. 20:257-266.
- Anil Kumar, V. B., Kishor Mohan, T. C et Murugan, K. (2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry*, 110, 328–333.
- Anonyme (2003). Ministère de l'agriculture. Statistique agricole. Ministère de l'agriculture. Série A. revue p77.
- Anonyme (1993). Création d'une palmeraie, Recueil des fiches techniques, ITDAS., Biskra, pp 39.
- Anonyme. (2002). Statistiques agricoles superficies et productions, Ministère de l'agriculture et du développement rural, série A, palmier dattiers, pp 5-6.
- Anosike E.O. and Ayaebene, A.O. (1981). Purification and some properties of polyphenol oxidase from the yam tubers, *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 20 : 2625-2628.
- Anosike E.O., and Ayaebene, A.O. (1982). Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*. 21, 1889-1893.
- Aoki, S., Suzuki, S. and Tamura, A. (1980). Internal browning of stracking delicious apple during low temperature storage. Report of the National Food Research Inst., No. 38, 56-61.
- Arakawa, T., Timasheff, S.N. (1982b), Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry*, Vol 21 : 6546–6552.
- Arar, K., Ziani A. (2009). Étude de l'effet du traitement thermique sur l'activité de la polyphénol oxydase (EC1.14.18.1) d'*Agaricus bisporus* : analyse cinétique et thermodynamique. Université Amar Telidji Laghouat .58p .
- Arslan, O and Tozulu, I. (1997). Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphénoloxydase from *Anethum graveolens* L. *Ital. J. Food Sci*, Vol,9,No.3,pp.249-253.
- Arslan, O and Dogan, S. (2005). Inhibition of polyphénoloxydase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* Vol.85:1499-1504.
- Aurand, L. W. and Woods, A. E. (1973). Polyphenol oxidase from BARHEE and ZAHDI dates. II. Characterization, *Journal of Food Biochemistry*, Vol 12: 241-252.
- Aziza B. Mustafa, David B. Harper and Donald E. Johnston, (1986). Biochemical changes during ripening of some Sudanese date varieties. *J. Sci. Food Agric.*, Vol 37:43-53
- Barrevelde W H. FAO. (1993). *Agricultural Services Bulletin N° 101, Date Palm Products*. FAO, Rome, 39p.
- Bechrair A et Bschrair F. (2010), Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire d'ingénieur d'état, un, Amar telidji, L'Aghouat. P91.
- Belarbi A. (2001). Stabilisation par séchage et qualité de la datte Deglet Nour. Thèse de Doctorat de l'ENSIA, Massy.
- Benmebark .H et Chaher, F. (2011). Etude de l'inhibition de la polyphénoloxydase de *terfezia leonis* Tul .par des agents chimiques de synthèse. Mémoire d'ingénieur. 38
- Benmansour, A and Gouzi, H. (2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *Int. J. Chem. React. Eng.* Vol 5, 1–11 .
- Bessas A, Benmoussa L, Kerarma M. (2008). Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien, Mémoire d'ingénieur d'état ., Vol 12 :4-6 .
- Bonner, W. D. (1957). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 8, 427.
- Bouguedoura N. (1991). Connaissances actuelles sur la biologie du palmier dattier, *Phoenix*, catalysis today., Vol 22 :459–487.
- Boubekri A. (2010). Optimisation des traitements thermiques de la datte algérienne « deglet-nour », mémoire de doctorat d'état en génie mécanique, UNI . Hadj-Lakhdar BATNA. P3.
- Buelguedj A, Nacib N. (2001). Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu à base de jus de dattes .rev.enreg.ren.production et valorisation biomasse.p41-46.

- Burton S G.(1994). Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, 22,459-487
- Chan, H. T. and Yong, H. Y. (1971). Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the McFarlin cranberry. *J. Food Sci.* 36, 169-172.
- characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry*, 110(32), 8–333.
- Cheftel J.C., Cheftel H. (1977). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Technique et documentation. Lavoisier, Paris, vol. 1, 381 p.
- Chen ,L and Flurkey,W.H.(2002).Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms.Current topics in phytochemistry.Vol.5,pp.109-120.
- Choucha F.,Zarwal I.,(2009).Extraction ,purification et caractérisation de la polyphénoloxydase (EC1.14.18.1) de *Terzia leunis* Tul.Mémoire d'ingénieur .,pp44-54
- Claus ,H and Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases.*Systematic and Applied Microbiology*, Vol.29, 3-14.
- Clifford M N., (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci. Food Agric.* 79, 362–372.
- Conrad J.S.,Hubbard E.R., Meyers t.E.,strothkamp K.G.,(1994).Inhibitors binding to the binuclear active site of tyrosinase :temperature ,pH,and solvent deuterium isotope effects.*biochimistry*,33,5739-5744.
- Dalmadi I, Gabriela R, van loey A, Smout C., and Hendrickx M.(2005)Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study,p8.
- Decker, H., T. Schweikardt, et al. (2006). "The first crystal structure of tyrosinase: All questions answered?" *Angew. Chem. Int. Ed.* 45(28): 4546-4550.
- Deirdre M. NI EidhiN, MurphyE, O'beirne D.(2006). Characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*pyrus elaeagrifolia*). *Journal of Food Biochemistry* 32 ,
- Deirdre M. Nieidhin, Murphy E, O'beirne D,(2006) . Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh. cv Bramley's Seedling):Purification Strategies and Characterization, *journal of food science*—Vol. 71, Nr. 1.
- Della L, S., I. Ascone, et al. (1996). "The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy." *J. Biol. Chem.* 271(35): 21025-21030.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., et Guner, S. (2002). Characterization of polyphenol oxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry*, 77, 1–7.
- Dixon M.,Webb E.C.,(1964).Dans "enzymes".longman ed.,londres 694-695.
- Dixon M.,Webb EC.,(1979).Enzymes. 3rded .New York:Academic press.1116p.
- Dizik, N. S. and Knapp, F. W. (1970). Avocado polyphenol oxidase: purification, *journal of food science*,35,282-285
- Djerbi M, (1994). Précis de phéniculture, F.A.O, Rome, 191 p.
- Dogan, S., et Dogan, M. (2004). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69–77.
- Dorab C. Smolensky, W. R. Raymond, S. Hasewga and Maier V.P., (1975). Enzymatic improvement of date quality. Use of invertase to improve texture and appearance of "sugar wall" dates. *J. Sci. Fd Agric.*,Vol 26 :1523-1528.
- Dowson V. H. W. et Aten A. (1963). Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO, Rome, Cahier n°72, 1-394.
- Duangmal, K., et Apenten, R. K. O. (1999). A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). *Food Chemistry*, 64, 351–359.
- Dubost D. (1991). Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. Thèse de doctorat, université de Tours, France, 191p.
- during ripening of some Sudanese date varieties. *J. Sci. Food Agric.*,37, 43-53
- Eicken, C., B. Krebs, et al. (1999). "Catechol oxidase - structure and activity." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9(6): 677-683.

- ESkin, N.A.M., Henderson, H. M. et Towsend, K. J. (1971). Browning reaction in food. In *Biochemistry of Food.. Journal of Food Biochemistry* 27 , 361-422.
- Espiard.(2002) .introduction à la transformation industrielle des fruits .Ed .Teach et Doc-lavoisier,147-155 .
- Espin JC, Garcia-Ruiz PA, Tudela J, Garcia-Canovas F. (1998). Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochem J*;331(Pt. 2):547–51.
- Etienne E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits, Tec Lavoisier, Paris, New York, 147-149-150-151 p.
- Fang, Z., Zhang, M., Sun, Y., & Sun, J. (2007). Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. *Food Chemistry*, 103, 268–273.
- Ülker F yerlitürk1, oktay a, sinan S 2,3, gencer N and özensoy ö g.(2007).characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*pyrus elaeagrifolia*), *Journal of Food Biochemistry* 32 ,368–383
- Feldman, J. F. and Thayer, J. P. (1974), *Biochem. Biophys.Res. Commun.* 61,917.
- Flurkey, W. H. and Jen, J. J.(1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activity in developing peach. *J. Food Sci.* 43, 1826-1828, 1831 .
- Fraignier, M., Marques, L., Fleuriot, A. and Macheix, J. (1995).Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2375-2380.
- Frankel E N. Water house A L, Teissedre P L, (1995). *Agric. Food. Chem.*, 43,221-235 p.
- Frenot M et Vering E, (1997). *Biochimie des aliments, diététique des sujets bien portent*, Dion, 282 p.
- fruits and processed date products. *Journal of Food Quality*, 20, 257-266.
- Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri I, V. C. and Constantinidie S, S. M.(198 1). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a Dwarf variety of banana (*Musa caendishii*, L.). *J. Food Sci.* 46, 150-155.
- Gawlik-Dziki et al. (2007) .Characterization of polyphenol oxidase from broccoli(*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets. *Food Chemistry* 105 ,1047–1053.
- Ghazi F et Teffahi M, (2007). Mis en valeur et étude de l'utilité technologique de la fermentation de dattes « cas de la variété Hmira », mémoire d'ingénieur d'état en sciences alimentaires, Mascara, 3-6-9-21p.
- Golbeck, K. H. and Cammarata, K. V. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase: isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67, 977-984.
- Gutteridge .S. and D.A. Robb, (1975) . *Eur. J. Biochem.*, Vol 54 p107.
- Guizani a, Ghalib N , Al-Saidi S , Shafiur M, Rahman a, Bornaz b, Al-Alawi a.(2010). State diagram of dates: Glass transition, freezing curve and maximal-freeze-concentration condition,*journal of food Engineering*Vol 99 : 92–97
- Hadi M, .(2004). La quercétine et ces dérivés: molécules à caractères pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres;études et applications thérapeutiques. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade du docteur en sciences del'université Louis Pasteur domaine: Pharmacochimie. 155 p.
- Hadjari M et Kadi Hanifi M, (2005). La mise en oeuvre de la fermentation de jus de datte étude cinétique et biochimique, mémoire d'ingénieur en sciences alimentaire, Mascara, 21-22-23 p.
- Hamdan A. M. (1975) .Date polyphenoloxydase.M.Sc.Thesis,College of Agriculture ,university of Baghdad.
- Hammond, J. B. W. & Nichols, D. A. (1976). Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. : changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology* 93,309-320.
- Han-Ju Sun, Jing Wang, Xue-Ming Tao, Juan Shi, Mei-Ying Huang, and Zhe Chen,(2012), Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Rape Flower China., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 823–829
- Harel, E., Mayer, A. M. and Lerner, H. R. (1970). Change in the level of catechol oxidase and laccase activity in developing peach. *J. Sci. Food.* 21, 542-544 .

- Hasegawa, S. and Maier, V. P. (1980). Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.
- Hatcher ,L.Q and Karlin ,K.D.(2004).Oxidant types in copper –dioxygen chemistry :the ligand coordination defines the Cun-O2 structure and subsequent reactivity.*J Biol Inorg Chem* .9:669-683.
- Hilgeman C. (1972) cité in Bouguedoura n. (1991). Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier. Etude in situ et in vitro du développement morphogénétiques des appareils végétatifs et reproducteurs. Thèse de doctorat. U.S.T.H.B., ALGER, 201p.
- Ikediohi C O, Obasuyi H N (1982) . Purification and some properties of o-diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry* VOL 21 : 2815-2820.
- Jarrah a. Z., Benjamin N. D. (1982). Activity of polyphenoloxydase and pectin esterase during different stages of growth and developpement. *Date.Palm.Journal.* vol. 1, n°2.
- Jiang Y-M I, Zauberman G, Fuchs Y. (1996). Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology* 10, 221-228
- Jiang, Y.-M. (1999). Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chem.* 66, 75–79.
- Jolivet, S., N. Arpin, et al. (1998). "Agaricus bisporus browning: a review." *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- Karbassi, F., K. Haghbeen, et al. (2003). "Activity, structural and stability changes of mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate." *Colloid Surface B* 32(2): 137-143.
- Kessous C,Bouchagra T,(2008),Enzymoloie biochimie metabolique,ben aknoun,alger .
- Kharoubi H.(1995). Essai comparatif de l'effet de deux méthodes de ciselage, avec trois dattes de deux cultivars « Deglet Nour » et « Ghars », mémoire d'ingénieur en agronomie, I.N.F.S.A.S. Ouargla, 103 p.
- Kidron, M., Harel, E. and Mayer, A. M. (1978). Catechol oxidase activity in grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 30-36.
- Klabunde, T., C. Eicken, et al. (1998). "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." *Nat. Struct. Biol.* 5(12): 1084-1090.
- Kolcuoglu,Y.,Colak,A.,Sesli,E.,Yildirim,M.,Saglam(2006).N.Comparative characterization of monophenolase anddiphenolase activities from a wild edible mushroom(Macrolepiota mastoidea).*Food Chemistry.*,Vol.101 ,778-785.
- Lee, C. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W., & Brown, S. K. (1990). Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenol oxidase activity among various peach cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 99.
- Lee, C.Y., Smith, M.L. and Pennesi, A.P. (1983). Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *J. Sci. Food Agric.* 34, 987-991.
- LERCH, K. (1983). Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.*,Vol 52:125-138.K.
- Lerch, J. (1982) .*Biol. Chem.*, Vol(11) :257 6414.
- Lerch,K.(1981).Copper monooxygénases:tyrosinase and dopamine B-monooxygénase.In *Metal Ions in biological Systems.Copper Proteins*,ed .H.Sigel.Marcel Dekker,New York, basel,pp.143-86.
- Guo L, Ying M, John S, Xue S ,(2009), The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* .,Vol 117 :143–151.
- Lorenço,E.J;Leao,Neves ,V.A and Da Silva ,M.A.(1992).Polyphenol oxydase from sweet potato :purification and properties.*J.Agric.Food chem.*,Vol.40,pp.2369-2373
- Luh,B.S.,and phithakpol,B.(1972) .Characteristic of polyphenol oxydase related to browning in cling peaches.*Journal of Food science*,Vol 27,264-268.
- M. Ü mitÜ nal.(2005). Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*), *Food Chemistry* 100, 909–913
- Maatalah S, (1970). Contribution à la valorisation de la datte algérienne, mémoire d'ingénieur en agronomie, I.N.A.,Alger, 120 p.
- Macheix J.J., Fleuriet A. et Billot J. (1990). Phenolic compounds in fruit processing. C.R.C. Press, BOCA_RATON. Fruit phenolics, pp 295-322.

- Mansouri A., Guendez E., Kokkalouc E., et Panagiotis K.,(2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry* .89, 411-420.
- Matallah M A Allah ,(2004) . Contribution à l'étude de la conservation des dattes de la variété Deglet-Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption ; I.N.A. El Harrach –Alger.63p.
- Mayer, A. M. and Harel, E. H. (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochem.* 18, 193-215.
- Mohammed N.A., Nezam deldin a.N. (1985). A study on browning reaction in the major stages maturity of Zahidi date. *Dep. Date and palm. Agric. Water. Reso. Res. Cent. Sci. Res. Council, Baghdad*, 13 p.
- Munier P,(1973). *Le palmier dattier, Maison neuve et Larose, Paris.* 25-28-31-32-40-48-141-142-221-367p. mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate." *Colloid Surface B* 32(2):
- Mutlak H.H. et Mann J.,(1984). Darkening of dates: Control by microwave heating. *Date Palm Journal*, 3(1), 303-316.
- NAGAI T. AND SUZUKI N..(2003).Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max L.*) *journal food chemistry.* Vol. 68, Nr. 16-18
- Wuyts N, Waele D, Swennen,(2006), Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata Grande naine*) roots , *science direct* , 100 , 909–913
- Nicolas J.J. et Potus J. (1993). Phénomènes d'oxydation enzymatique et cooxydation. Exemple du rôle de la lipoxygénase de panification et de la lyxoxygénase en technologie des fruits. *Sciences des fruits*, vol. 14, pp 627-642.
- Nicolas J.J., Richrd-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J., Aubert S.y.,(1994). Enzymatic browning reaction in apple products. *Crit. Rev. food Sci. Nutr.* 34, 109-157.
- Önez ,Z;karakus ,E;and pekyardimci ,S.(2008).Izmir grape Polyphenol Oxydase (*vitis vinifial L*) partial purification and some kinetic proprieties .*journal of food biochemistry.*Vol.32,pp.398-414.
- Quinten M. (1995). *Le palmier dattier dans le système oasien.* *Palm Journal*, 3(1), 303-316.
- Pascal Liu,(2002). The marketing potential of date palm fruits in European market. *International date palm forum, Abu Dhabi, UAE, 15-17 sept., FAO Rome Italy.*
- Zhou P, Nancy L. Smith, and Chang Y. Lee'.(1993).Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica Borkh. cv Bramley's Seedling*):Purification Strategies and Characterization. *journal agriculture and food chemistry* 2007.2008/Vol71.
- Peyron G. (2000). *Cultiver le palmier dattier, G.R.I.D.A.O., polyphenoloxidase from barhee and zahdi dates. characterization, university of basrah basrah, Iraq* 11,109-129 p.
- Quinten M, (1996). Diversité et structure génétique des populations algérienne de *Fusarium oxysporum* agent de la fusariose vasculaire (bayoudh) du palmier dattier, thèse de doctorat, El Harrach, 52 p.
- Rabah N et Merabbi N. (2006). Essai de préparation de boissons gazeuses à base de sirop de datte, mémoire d'ingénieur d'état en biologie option CQA, Sidi bel Abbès, 21p.
- Rafi Z. Kazandjian et Alexander M. Klivanov.(1985).Regioselective Oxidation of Phenols Catalyzed. by Polyphenol Oxidase in Chloroform. 107, 5448-5450
- Rees S et Harbone G. (1985). The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochimie.* 24, 2225-2231 p.
- Rescigno,A;Sollai,F;Pisu,B;Rinaldi,A and Sanjuust,E.(2002). Tyrosinase Inhibition:General and Applied Aspects.*journal of Enzyme Inhibition and Mdicinal Chemistry*,Vol.17,,207-218.
- Reynes M, Bouabidi H, Piombo G, Risterucci A M., (1994). Caractérisation des principales variétés de dattes cultivées dans la région des Djerid en Tunisie. *Fruit*, 49,289-298 p.
- Reynes Max. (1997). Influence d'une technique de désinfestation par micro-ondes sur les critères de qualité phisico-chimiques de la datte. Thèse de doctorat de l'INPL.
- Ribereau G P, (1964). Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. Veg., I.N.R.A.*
- Rivas, N. J. and Whitaker, J. R. (1973) . Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant Physiol.* 52, 501-507
- Robb, D. A. (1984). Tyrosinase. Copper proteins and copper enzymes. R. Lontie. Florida, CRC Press, Inc. 2: 207-240.

- Robb, D. A. (1984). Tyrosinase. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*, CRC Press ; Boca Raton, U.S.A.. 2. 207-241.
- ROSA, D. A. and EMIOLA, L. (1980). Characteristics of *Dioscoru rotundata* polyphenol oxidase. *J. Appl. Biochem.* 2, 100-110.
- Rygg G L., et al, (1953). Factors affecting the spoilage of dates at room temperature. *Annu, Rep, Date Growers' ins.*, 30 ; 10-14.
- Rygg G.L. (1975). Date development, handling and packing in the United States. *Agricultural Handbook no. 482*, Agr. Research Service, U.S. Dept. of Agriculture date development, handling and packing in the United States. Agr. Research Service, U.S. Dept. of Agriculture.
- SACHDE, A. G., Al-bakir' A.y and Abdul-Raheem, J. A. K. (1989).polyphenoloxidase from barhee and zahdi dates.I.Purificatio *J.Food Biochem.*Vol 12 :227-240.
- Salunkhe, DK, (1990). Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press.Vol 268:4384-4397.
- Sapers ,G.M.(1993) .Browning of foods :control by sulfites,antioxidantsand other means .*Food Technol.*,Vol .47,pp.75-84.
- Sapers, G.M., and Hicks, K. B.(1989). Inhibition of Enzymatic Browning in Fruits and vegetables. In *Quality Factors of Fruits and Vegetables: Chemistry and Technology*, ed. Jen, J.J., ACC Symp., Series 405, pp 29-43, Am. Chem. Soc. Washington, DC.
- Sato, M. (1976). Phenolase of spinach roots. *Phytochem.*, Vol 15, 1845-1847.
- Sawaya W N, Khatchadourian H, Khalil J., (1982). Growth and chemical characterization of three Saudi date cultivars at various stages of development. *Can.inst. Food Sci. Technol.*, 16, 87-91 p. 137-143.
- Segel, I. H. (1994). Simple inhibition system. In I. H. Segel (Ed.), *Enzyme kinetic; behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems* (pp. 100–136).
- Scalbert A, Williamson G, (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphénols *J Nutr.*Vol 130,:2073-2085 p.
- Soler-Rivas, C., S. Jolivet, et al. (1999). "Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*." *FEMS Microbiol. Rev.* 23(5): 591-614.
- Soysal, C., et Soylemez, Z. (2004). Properties of wheat bran polyphenol oxidase. *Nahrung/Food*, 48, 5–8.
- Spais, J. C., Macheix, J. J. and Cordonnier, R. E. (1983). The browning capacity of grapes. 1. Changes in polyphenol oxidase activities during development. *J. Agric. Food Chem.* 31, 342-345.
- Spayed, S. E. and Morris, J. R. (1980). Preliminary study of peroxidase and polyphenol oxidase activity in strawberry fruit. *Strawberry Mechanization Station, Bulletin Vol 645 (Aug.)*, 171-174.
- Stephanie G. Burton,(1994) . biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, *sience direct*,Vol 22,459–487.
- Strothkamp, K. G., R. L. Jolley, et al. (1976). "Quarternary structure of mushroom tyrosinase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol 70: 519-524.
- Sugumaran, M. (1998). Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect Physiol.* 27, 229-334
- Sun G, Khtan B, Huang S, Whiteman M et Zhu Y., (2002). Effects of naturals products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta pharmaco.* 23, 1142-1151
- Nagai T and Suzuki N.(2001) . Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa L.* *Food Chemestry* 49, 3922-3926
- Tan K S, Tosont T, Masuda Y, Kamisaca S, (1992). Involvement of cell Wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth Rat and cell wall extensibility of *Oryza coleoptles*. *Plant cell physiol.*,Vol 30, 103-108 p.
- Tate, J. N., Luh, B. S. and York, G. K.(1964). Polyphenol oxidase in Bartlett pears. *J. Food Sci.* Vol 29: 829-836.
- Taylor A.J., Clydesdale F.M., (1987). Potential of oxidized phenolic as food colorants. *Food Chemistry .*,Vol 24 :301-313 .

- Traverso-rueda, S. and Singleton, V. L. (1973). Catecholase activity in grape juice and its implication in wine making.. Vol 24: 103-109.
- Aydemir Tülin, Akkanlı G., (2006), Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens* L.) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors., Vol 41: 1090–1098.
- Ünal, M. Ü., & Sener, A. (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2374–2379.
- Unal, M. U. (2007). Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, Vol 100: 909–913.
- Urszula G-D, Urszula S, Baraniak B., (2007). Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. botrytis italica) florets Agricultural University, ul. Skromna., Vol 8:20-704 Lublin, Poland.
- Kumar A, T.C. Mohan K, K. Murugan .(2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) .*Journal of Food Chemistry*. Vol 110:328-333.
- Urszula G-D, Urszula Z, S'wieca M.(2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.)*Journal of Food Chemistry* VOL 107 :129–135.
- Vamos-vigyazo, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Vol 15: 49-127.
- Van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H., et Wichers, H. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*., Vol 45(7): 1309–1323.
- Walker J.R.L., Ferrar P.H.(1995). The control of enzymatic browning in foods, *Chem. Industry*, 836-839.
- Walker J.R.L., Ferrar P.H.(1998). Diphenoloxidase, Enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.*, 15, 457-498.
- Whitaker J., Lee C. Y., (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning .In enzymatic browning and its prevention .J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington , American chemical Society., 2-7.
- Wiechelman, K.J., Braun, R.D., and Fitzpatrick, J.D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* Vol 175:231-237.
- Wissemann, K. W. and Lee, C. Y. (1980). Polyphenol oxidase activity during grape maturation and wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol 31: 206-311.
- Wong, I. G., Luh, B. S. and Whitaker, J. R. (1971). Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach. *Plant Physiol.*, Vol 48, 14-23.
- Yagar, H. (2004). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from celery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Vol. 34, No. 4, pp. 387-397.
- Yahiaoui K., (2000). Caractérisation physicochimique et évaluation du brunissement de la datte «Deglet-Nour» au cours de la maturation. Mémoire de magister en sciences alimentaires. Institut national agronomique d'El-Harrach, Alger.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., and Tomas-Barberan, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *J. Agric. Food Chem.* Vol 49:3651–3655.
- Zawstowski J., Biliaders G., Eskin N.A.M., (1991). Polyphenol oxidase .In: Oxidative enzyme in foods. D.S.R. and Eskin N.A.M., eds, Elsevier Appl. Sc., London, chap., 6, 217-273.
- Gao Z, Han X, Xiao X, (2009), Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves, *Food Chemistry*, Vol 117 : 342–348 .

ANNEXE

1. Solutions tampons

1.1 Tampon phosphate de sodium 0.05 M (pH 6-8)

Préparer les deux solutions suivantes :

Solution A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ à 0.05 M

Solution B: KH_2PO_4 à 0.05 M

Mélanger les deux solutions précédentes pour avoir les pH suivants :

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)
6	875	125
7	390	610
7.6	137.5	862.5
8	55	945

1.2 Tampon acétate de sodium 0.05 M (pH 4-5.6)

Préparer les deux solutions suivantes :

Solution A : acide acétique à 0.05 M

Solution B: acétate de sodium à 0.05 M

Mélanger les deux solutions précédentes pour avoir les pH suivants :

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)
4	820	180
4.6	510	490
5	296	704
5.6	960	904

1. Composition du réactif de Folin-Ciocalteu

Le réactif de Folin-Ciocalteu comprend deux solutions (A) et (B) qui sont préparés comme suit :

Solution A: mettre dans l'ordre :

CuSO_4 anhydre	0.05 g
Tartrate de K^+	0.1 g
Carbonate de Na^+ (Na_2CO_3)	10 g
NaOH	2 g
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

Chaque produit chimique est mis successivement en diluant à chaque fois avec de l'eau distillée, jusqu'à un volume de 100 ml.

Solution B: (A préparer au dernier moment.)

0.5 ml de réactif de Folin dans 8.5 ml d'eau distillée.

Remarque : Il faut adapter le volume total au nombre de tubes à doser.

الملخص:

استخلص إنزيم البوليفينول من الرطب (دقلة نور) (*Phoenix dactylifera L.*) في محلول منظم فوسفات الصوديوم ذو التركيز 0.05 مول ودرجة حموضة 7 في وجود 1% PVPP. المستخلص الخام يحوي على نشاط إنزيمي واحد وهو الكاتيكولاز حيث قدر هذا النشاط بـ 17570 UE/mL في الشروط المثلى pH 5.6, 30°C, كاتيكول Mm160. اتبعت أكسدة الكاتيكول من طرف الإنزيم حركة ميكانيكيس. قيم الخصائص الحركية المتحصل عليها في الشروط القصوى للقياس V_{max} و K_m كالاتي: 0.53 Abs_{410nm}/min , 27mM. نشاط الكاتيكولاز هو الأمثل في درجة حموضة 5.6 و 70°م تم تحديد طبيعة الأحماض الأمينية للموقع الفعال للبوليفينول أكسيداز (لدقلة نور) في أكسدة الكاتيكول باستخدام التمثيل البياني Dixon و Webb الأسباب تات القلوتامات والهستدين من الأحماض الأمينية لألية حفاز نشاط الكاتيكولاز.

الكلمات المفتاحية:

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

Résumé

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

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

La nature des acides aminés du site actif de la PPO de Deglet noir impliqués dans l'oxydation du catéchol a été déterminée à l'aide de la représentation graphique de Dixon et Webb. L'aspartate, le glutamate et l'histidine sont les acides aminés du mécanisme catalytique de l'activité catécholase.

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

Abstract

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

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

The nature of the amino acids of the active site of PPO Deglet noir involved in the oxidation of catechol was determined using the graphical representation of Dixon and Webb. Aspartate, glutamate and histidine are amino acids of the catalytic mechanism of the catecholase activity.

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