

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 appliquée*

### THEME

---

**L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque sur l'activité de la  
PPO des dattes « *Phénix dactylifera L cv Ghars* »**

---

Présenté par : \* DADA FELLA

\* BENMOUSSA FATIMA

**Devant le jury :**

**Président: CHAIBI RACHID**

**Rapporteur : BENACER FAROUK**

**Examineur: HAMIDA AMINE**

**Soutenu publiquement le :16/05/2018.**

## *Dédicaces*

*Je rends grâce à DIEU le tout puissant qui m'a permis d'arriver à ce but.*

*Je voudrais en toute modestie dédier ce travail à*

*La mémoire de mon père MOHAMMED NOURE-EDDINE*

*Et mon frère MOHAMMED RIDHA qui je*

*Souhaiteraient rencontrer au Paradis.*

*A la lumière de ma vie, à ma très chère mère BENT AMAR qui a*

*Inséré le gout de la vie et le sens de la responsabilité pour sa tendresse*

*Et ma soutenue et encouragée et qui ; sans leur compréhension,*

*Leur conseil et leur tolérance je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs.*

*A mon marie MOHAMMED NADHIR SAHRAOUI*

*Et mon chère fils ISLAM qui sont toujours été à mes cotes, qui ma soutenue et encourage.*

*A mon chère frère : Mohammed Rida et Mustapha Nadir Qui*

*M'ont soutenue dans les plus durs, je ne la remerciera jamais assez...*

*A mes chères sœurs : Fettoum, Wafia, Naïma et Lamia Pour leur présence et*

*Leurs soutiens.*

*A celle que je considère comme frères :*

*Abdelkader ORIF, Aissa BEN HARZALLAH,*

*Taher BEN SAAD et Aissa LOUBACHRIA*

*Sont oublier : Samah, Nour, Malak, Meriem, Marwa, Noureddine Adam,  
Mohammed Habib, Nour elimane, Bassma, Soundes, Alaa, Ines, Mohamed Nourddin,  
Maram et khaled*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*DADA FELLA*

## *Dédicaces*

*Je rends grâce à **DIEU** le tout puissant qui m'a permis d'arriver à ce but.*

*Je voudrais en toute modestie dédier ce travail à*

*Mon père et ma chère mère qui sont*

*Insérés le gout de la vie et le sens de la responsabilité pour sa tendresse*

*Et ma soutenue et encouragée et qui ; sans leur compréhension,*

*Leur conseil et leur tolérance je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs.*

*A mon marie **MOHAMMED NOUREDDINE SAOULI***

*Et mes chères enfants **NOUHA** et **YACINE** qui sont toujours été à mes cotes, qui ma soutenue et encourage.*

*A ma chère sœur : **Meriem** Pour sa présence et*

*Soutien.*

*A mes frères : **Nabil, Rida** et **Adel** Qui*

*M'ont soutenue dans les plus durs,*

*A leurs femmes que je les considère comme mes sœurs*

*Sont oublier leurs enfants: **Ritaj, Sofiane** et **Anas***

*A toute ma famille grande et petite.*

***BENMOUSSA Fatima***

## *Remerciements*

*NOUS tiens à remercier **DIEU** le tout puissant qui NOUS donné la force, la volonté et le savoir pour poursuivre mes études et réaliser ce travail.*

*Tout d'abord nous remercions infiniment notre encadreur : **Mr. Benacer Farouk**, pour son aide, orientation et encouragement le long de ce travail scientifique.*

*Nous remercions aussi **les membres de jury** pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer ce travail.*

*NOUS dois également exprimer mes gratitude à tous les enseignants de département de **BIOLOGIE** et spécialement de **département de FACULTE DES SCIENCES***

*Qui nous ont accompagnés le tout long de notre parcours scolaire*

*Nous sommes reconnaissants envers **nos familles** pour leurs sacrifices et compréhension.*

*Sans oublier **Les étudiants de la promotion 2018, amis et collègues...** merci d'être les bons accompagnants, merci pour les bons moments qu'on a partagé ensemble durant le cursus universitaires.*

*En fin Un grand Merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*

## Résumé

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

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'inhibiteur utilisé. Une valeur d'IC<sub>50</sub> en présence d'acide benzoïque égale à (IC<sub>50</sub>=1.11 mM ±0,39) a été obtenue. La représentation de Lineweaver-Burk indique que l'acide benzoïque est un inhibiteur compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K<sub>IS</sub> égale à 238,18±24,21mM.

**Mots clés :** Ghars, PPO, acide benzoïque, Inhibition, Brunissement enzymatique.

## Abstract

This work deals with the study of oxidase polyphenol (OPP) of date (Phoenix dactylifera L CV Ghars) by benzoic acid. the opp activity was measured by uv spectrophotometry at courenumber 410 nm, at pH=5 and and at T=30°C, in the presence of catechol as substrate.

The OPP inhibition efficiency is dependent to the concentration of the inhibition used. The IC<sub>50</sub> value in the presence of benzoic acid equal to (IC<sub>50</sub>=1.11 mM ±0, 39) was got. The Lineweaver-Burk reveals that benzoic acid is competitive inhibition of opp activity with a K<sub>IS</sub> value equal to 238, 18±24,21mM.

**Keywords:** Ghars, OPP, benzoic acid, inhibition, Enzymatic browning

## ملخص

يهدف هذا البحث إلى دراسة تثبيط تراكيز بوليفينول أوكسيداز (فينيكس دكتيليفيرا إل. غرس) بواسطة حمض البنزويك. تم طيفياً عند 410 نانومتر عند درجة حموضة 5 و 30 درجة مئوية في وجود كاتيكول كركيزة PPO قياس نشاط

في وجود حمض البنزويك يساوي IC<sub>50</sub> يعتمد على تركيز المانع المستخدم. تم الحصول على قيمة PPO درجة تثبيط إلى أن حمض البنزويك هو مثبط تنافسي لنشاط Lineweaver-Burk يشير تمثيل (IC 50 = 1.11 mM ± 0.39).

mM. تبلغ KIS بقيمة PPO 24.21 ± 238.18

## الكلمات المفتاحية:

غرس PPO؛ حمض البنزويك ، تثبيط ، إنزيمي اللون البني

# Table des Matières

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction .....</b>                                                  | <b>1</b>  |
| <b>Chapitre 1. Synthèse Bibliographique.....</b>                           | <b>3</b>  |
| <b>1.1 Palmier dattier .....</b>                                           | <b>3</b>  |
| <b>1.1.1 Généralités.....</b>                                              | <b>3</b>  |
| <b>1.1.2 Nom vernaculaire et synonyme.....</b>                             | <b>3</b>  |
| <b>1.1.3 Classification botanique.....</b>                                 | <b>3</b>  |
| <b>1.1.4 Position systématique.....</b>                                    | <b>3</b>  |
| <b>1.1.5 Ecologie.....</b>                                                 | <b>4</b>  |
| <b>1.1.6 Répartition géographique.....</b>                                 | <b>5</b>  |
| <b>1.2 Les dattes .....</b>                                                | <b>6</b>  |
| <b>1.2.1 Définition .....</b>                                              | <b>6</b>  |
| <b>1.2.2 Classifications des dattes .....</b>                              | <b>7</b>  |
| <b>1.2.3 Formation et maturation de la datte.....</b>                      | <b>8</b>  |
| <b>1.2.4 Les variétés des dattes.....</b>                                  | <b>8</b>  |
| <b>1.2.5 Composition biochimique des dattes.....</b>                       | <b>9</b>  |
| <b>1.2.6 Valeur nutritionnelle et utilisation de la datte .....</b>        | <b>11</b> |
| <b>1.3 Polyphénol oxydase.....</b>                                         | <b>12</b> |
| <b>1.3.1 Historique .....</b>                                              | <b>12</b> |
| <b>1.3.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO.....</b>     | <b>12</b> |
| <b>1.3.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO .....</b> | <b>13</b> |
| <b>1.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOs .....</b>    | <b>18</b> |
| <b>1.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique.....</b>       | <b>19</b> |
| <b>1.6 PH et Température optimale.....</b>                                 | <b>20</b> |
| <b>1.7 Spécificité de la PPO.....</b>                                      | <b>22</b> |
| <b>1.8 Affinité et efficacité .....</b>                                    | <b>24</b> |
| <b>1.9 Applications de la PPO .....</b>                                    | <b>25</b> |
| <b>Chapitre 2. Matériels et Méthodes .....</b>                             | <b>27</b> |
| <b>2.1 Matériels.....</b>                                                  | <b>27</b> |
| <b>2.1.1 Matériels biologiques.....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>2.1.2 Produits chimiques.....</b>                                       | <b>27</b> |
| <b>2.2 Méthodes .....</b>                                                  | <b>27</b> |

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO.....                                                                             | 27        |
| 2.2.2 Mesure de l'activité de PPO.....                                                                                         | 28        |
| 2.2.3 Effet du pH .....                                                                                                        | 28        |
| 2.2.4 Etude de la stabilité thermique .....                                                                                    | 29        |
| 2.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme.....                                                                               | 29        |
| 2.2.6 Détermination des paramètres cinétiques .....                                                                            | 29        |
| 2.2.7 Détermination des valeurs d'IC <sub>50</sub> .....                                                                       | 30        |
| 2.2.8 Détermination des mécanismes d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque.....                                           | 30        |
| 2.2.9 Analyse des résultats expérimentaux.....                                                                                 | 30        |
| <b>Chapitre 3 : Résultat et discussion.....</b>                                                                                | <b>32</b> |
| 3.1 Extraction du polyphénol oxydase des dattes.....                                                                           | 32        |
| 3.2 Les conditions optimales de l'activité catéchol oxydase .....                                                              | 34        |
| 3.2.1 Effet du pH .....                                                                                                        | 34        |
| 3.2.2 Etude de la stabilité thermique.....                                                                                     | 35        |
| 3.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme.....                                                                               | 37        |
| 3.2.4 Détermination des paramètres cinétiques .....                                                                            | 38        |
| 3.2.5-Détermination de la valeur d'IC <sub>50</sub> de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique .....                      | 41        |
| 3.2.6-Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété par l'acide benzoïque PPO..... | 43        |
| <b>Conclusions et perspectives.....</b>                                                                                        | <b>47</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b>                                                                                        | <b>48</b> |

## Liste des abréviations

**Gh** : Ghars

**PPO** : polyphénol oxydase

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**PVPP** : Le polyvinyl (poly)pyrrolidone

**V<sub>max</sub>** : est la vitesse maximale de la réaction (Abs/min) ;

**[S]** : est la concentration de 4-Méthylcatéchol (mM) ;

**K<sub>m</sub>** : est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (mM) ou constante de Michaelis-Menten.

## Liste des tableaux

|                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1 :</b> classification botanique.....                                                                                                                                  | 4  |
| <b>Tableau2 :</b> Nombre de palmier dattier en Algérie (Noui., 2007).....                                                                                                         | 5  |
| <b>Tableau 3 :</b> Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.....                                                                              | 21 |
| <b>Tableau 4:</b> Paramètres cinétiques de quelques polyphénols oxydase d'origine végétale.....                                                                                   | 25 |
| <b>Tableau 5:</b> Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de 4 catéchol comme substrat.....                                                                        | 40 |
| <b>Tableau 6 :</b> Les valeurs d'IC50 de l'acide benzoïque trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats.....                                       | 43 |
| <b>Tableau 7 :</b> Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (Phoenix dactylifera L) cv Ghars en utilisant le catéchol comme substrat..... | 44 |

## Listes des figures

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1:</b> Datte et noyau du palmier dattier ( <b>Buelguedj., 2001</b> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 7  |
| <b>Figure 2 :</b> Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 15 |
| <b>Figure 3 :</b> Diffraction aux rayons X de la PPO de <i>V. vinifera</i> . (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, le deux $\beta$ -feuilles(Bleu), les quatre hélices(Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de $C\alpha$ de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) avec ceux de la PPO .....                                                                                                           | 17 |
| <b>Figure 4 :</b> Site actif de la PPO de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et <i>N. crassa</i> enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER,b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres , la distance internucléaire était :C u-Cu, 4,17 Å ; CuA à H87,2.07 ° ; à H108 ,2.16 ° ; H117, 2.35 ° ; CuB à H239, 2.04Å ° ;à H243, 2.15 Å ° ; à H272, 2.02Å..... | 17 |
| <b>Figure 5:</b> Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (Met, Deoxy, et Oxy PPO) d'après <b>Van Gelder et al (1997)</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 19 |
| <b>Figure 6:</b> Structure de quelques substrats phénoliques ( <b>Majid et al, 2004</b> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 23 |
| <b>Figure7 :</b> La variété de dattes (Phoenix dactylifera L.) Ghars.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 27 |
| <b>Figure 8 :</b> Extrait brut de la datte (Phoenix dactylifera L CV Ghars) avant et après centrifugation.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 28 |
| <b>Figure 9:</b> Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (Phoenix dactylifera L.) « Ghars».....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 33 |
| <b>Figure 10 :</b> Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (Phoenix dactylifera L.) cv en Ghars fonction du pH. (En présence de 4-catéchol comme substrat).....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 34 |
| <b>Figure 11 :</b> Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (Phoenix dactylifera L.) Cv Ghars après 10 min de traitement thermique. (En présence de catéchol comme substrat).....                                                                                                                                                                                                                                               | 35 |
| <b>Figure 12 :</b> Effet de la concentration de la PPO de (Phoenix dactylifera L.) cv Ghars sur la vitesse initiale d'oxydation du 4catéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 5 ; 30°C ; catéchol 80 mM).....                                                                                                                                                                                                                                                    | 37 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 13</b> : Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par la PPO des dattes (Phoenix dactylifera L.) cv Ghars: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.....                                         | 40 |
| <b>Figure 14</b> : L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de catéchol par la PPO de dattes (Phoenix dactylifera L cv Ghars). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5)..... | 42 |
| <b>Figure 15</b> : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (Phoenix dactylifera L cv Ghars)<br>Par l'acide benzoïque.....                                                                                                | 45 |
| <b>Figure16</b> : schéma de type Michaelis-Menten De l'inhibition compétitive.....                                                                                                                                                                                               | 45 |
| <b>Figure 17</b> : Représentation de l'inhibition compétitive.....                                                                                                                                                                                                               | 45 |

## Introduction

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

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

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

La PPO est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (**Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979**) et (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín et al, 2006**). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent pour former un colorant brun ou noir appelé mélanine (**Varoquaux, 1978**).

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

Au cours des dix dernières années, certains rapports ont été consacrés sur l'étude de l'inhibition de la PPO de différentes sources par des acides organiques y compris l'acide benzoïque comme étant agent anti-brunissement dans l'industrie alimentaire (Queiroz et *al*, 2011). Par contre, l'inhibition de la PPO des dattes n'a pas suscité l'attention similaire. Pour cela, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de l'acide benzoïque sur l'activité de la PPO des dattes « Phénix dactylifera L cv Ghars » et de déterminer ses mécanismes d'inhibition en utilisant le catéchol comme substrat phénolique.

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

# Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

## 1.1 Palmier dattier :

### 1.1.1 Généralités:

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

### 1.1.2 Nom vernaculaire et synonyme :

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

### 1.1.3 Position systématique :

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

### 1.1.4 Classification botanique :

La classification botanique du palmier dattier donnée par (Djebri., 1994) et (Feldman., 1976) est le suivant tableau 1.1 ;

**Tableau 1 : classification botanique**

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

### 1.1.5 Ecologie :

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

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

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

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

### 1.1.6 Répartition géographique :

#### ✓ En Algérie:

En général les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis. Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement (**Messaïd., 2007**), pour une superficie de 120830 hectares, cependant 4 wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar22%, El -oued21% et Ouargla 15%.(**Messaïd., 2007**).

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

*Tableau 2 : Nombre de palmier dattier en Algérie (Noui., 2007)*

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

#### ✓ Dans le monde:

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

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

## **1.2 Les dattes :**

### **1.2.1 Définition**

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

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

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

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

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

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

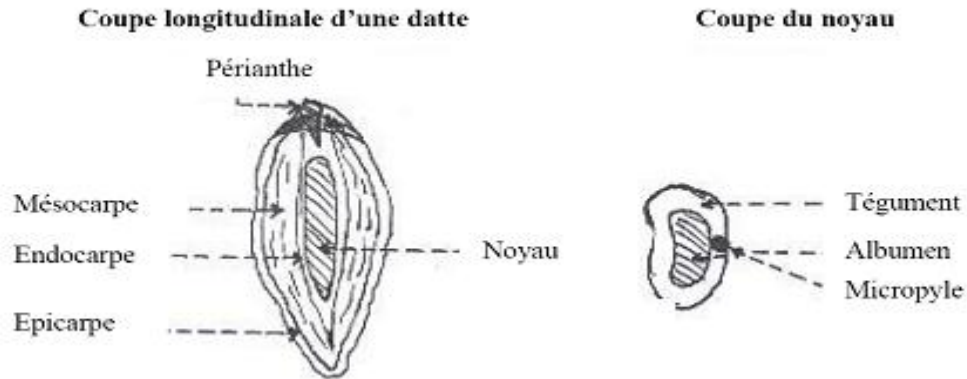


Figure 1 : Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj., 2001)

### 1.2.2 Classifications des dattes :

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

- Les dattes molles : taux d'humidité supérieur ou égal à 30%, elles sont à base de sucres invertis (fructose, glucose) tel que Ghars, Hamraia, Litima.....etc.
- Les dattes demi-molles : de 20 à 30% d'humidité, elles occupent une position Intermédiaire à l'exception de la Deglet-Nour, datte à base de saccharose par excellence (Cook et Furr, 1952).
- Les dattes sèches : dures, avec moins de 20% d'humidité, riche en saccharose. Elles ont une texture farineuse telle que Meche -Degla, Degla Beida.....etc Tableau 2-Catégories de dattes selon leur consistance et teneur en eau (**Noui., 2007**).

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

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

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

- dattes molles :  $r < 2$

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

### 1.2.3 Formation et maturation de la datte :

On distingue cinq stades qui sont:

✓ **Loulou (Hababouk) :**

C'est le stade "nouaison" qui vient juste après la pollinisation. Les dattes ont une croissance lente, une couleur verte jaunâtre et une forme sphérique (Fig. 1). Il dure 4 à 5 semaines après fécondation (Djerbi., 1994).

✓ **Kimri, (Khalal ou Blah) :**

Ce stade dur sept semaines environs, il se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes. Les fruits ont une couleur verte vive et un goût âpre à cause de la présence des tanins (Djerbi., 1994).

✓ **Bser (Bsir, Bissir) :**

Les sucres totaux atteignant un maximum en fin du stade. La couleur vire au jaune, au rouge et au brun, suivant les clones. La datte atteint son poids maximum, au début de ce stade. Il dure en moyenne • dattes sèches :  $r > 3,5$

Pour  $r = 2$  la stabilité du fruit est optimale et son aptitude à la conservation est très Quatre semaines (Djerbi., 1994).

✓ **Routab (Martouba) :**

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

✓ **Tamar (Tmar) :**

C'est la phase ultime de la maturation au cours de laquelle, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose) et le fruit perd beaucoup d'eau, ce qui donne un rapport sucre/eau élevé (Djerbi., 1994).

### 1.2.4 Les variétés des dattes :

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

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

✓ **Deglet-Nour :**

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

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

✓ **Variétés communes :**

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

### **1.2.5 Composition biochimique des dattes :**

#### **a) Sucres**

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

➤ **Sucres totaux:**

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

➤ **Sucres réducteurs:**

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

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

#### **b) Protéines :**

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

**c) Lipides :**

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

**d) Teneur en matière grasse :**

Selon Amellal (2008), la variété Dégla-Beida présente une teneur en matière grasse limitée entre  $0.101\pm 0.001$  %.

**e) Teneur en pectine :**

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

**f) Cellulose :**

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

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

**g) Vitamines :**

En général, la datte ne constitue pas une source importante de vitamines. Les plus dominantes sont la vitamine A, B1 et B2 qui sont en proportions appréciables.

Les vitamines C et D sont quasiment inexistantes (AL-shahib et al, 2003; Bousdira., 2007).

**h) Eléments minéraux :**

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

**i) Composés phénoliques :**

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

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

**j) Les enzymes des dattes et brunissement enzymatique :**

Les enzymes jouent un rôle important dans le processus de conversion se produisant pendant le stade de formation et la maturation du fruit.

La qualité de la datte est influencée par l'activité de :

❖ **L'invertase**

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

❖ **La cellulase :**

Elle décompose la cellulose en chaînes plus courtes.

❖ **La pectinmethylesterase :**

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

❖ **La polyphenoloxydase :**

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

**1.2.6 Valeur nutritionnelle et utilisation de la datte :**

La datte constitue un excellent aliment, de grande valeur nutritive et énergétique décrite selon **Toutain (1979) et Gilles (2000)** de par leur forte teneur en sucres qui leur confèrent une grande valeur énergétique.

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

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

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

diverticulose, des varices et des hémorroïdes. Ils ont également un effet hypocholestérolémiant (Albert., 1998 ; Jaccot et Campillo., 2003).

### 1.3 Polyphénol oxydase :

#### 1.3.1 Historique :

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

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

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

#### 1.3.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO :

##### ✓ Définition :

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

##### ✓ Classification et nomenclature :

L'union internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats. L'o-diphénol oxydase qui appartient au groupe des oxydo-réductases a été définie par Dixon et Webb (1964) comme l'o-diphénol : oxygène, oxydoréductase (E.C.1.10.3.1.), le nom tyrosinase, très

souvent donné à l'enzyme, était, par conséquent, en contradiction avec la nomenclature officielle. C'est pourquoi en 1972, cette nomenclature a été modifiée et le complexe nommé monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène, oxydoréductase (E.C.1.14.18.1.) (**Martinez et Whitaker, 1995, Mesquita et Queiroz, 2013**)

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

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

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

### **1.3.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO :**

#### **1.3.3.1 Caractéristiques réactionnelles :**

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

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

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

#### **1.3.3.1.1 Activité monophénolase (EC 1.14.18.1) :**

Les monophénols oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols, (figure 1.2). Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat.

L'activité mono phénol oxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. (Mayer *et al*, 2006, Martinez *et al*, 2012).

#### **1.3.3.1.2 Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1) :**

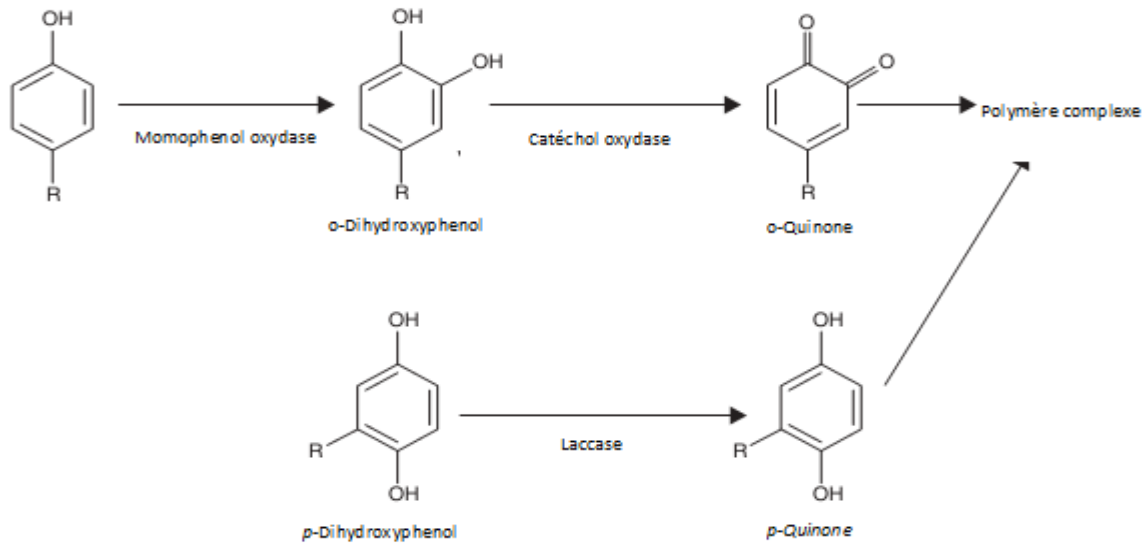
L'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité o-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catéchol oxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoïdines (Lerner., 1953).

#### **1.3.3.1.3 La laccase (EC 1.10.3.2) :**

La laccase se caractérise par son activité p-diphénol oxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase(Figure1.2)L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radicale semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (Giardina *et al*.,2010).

Ces enzymes ont été trouvés dans différentes espèces de plantes, d'insectes et les bactéries (Loera *et al*, 2006;Madhavi *et Lele*., 2009).

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



**Figure 2 :** Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.

### 1.3.3.2 Caractéristique structurales :

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

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

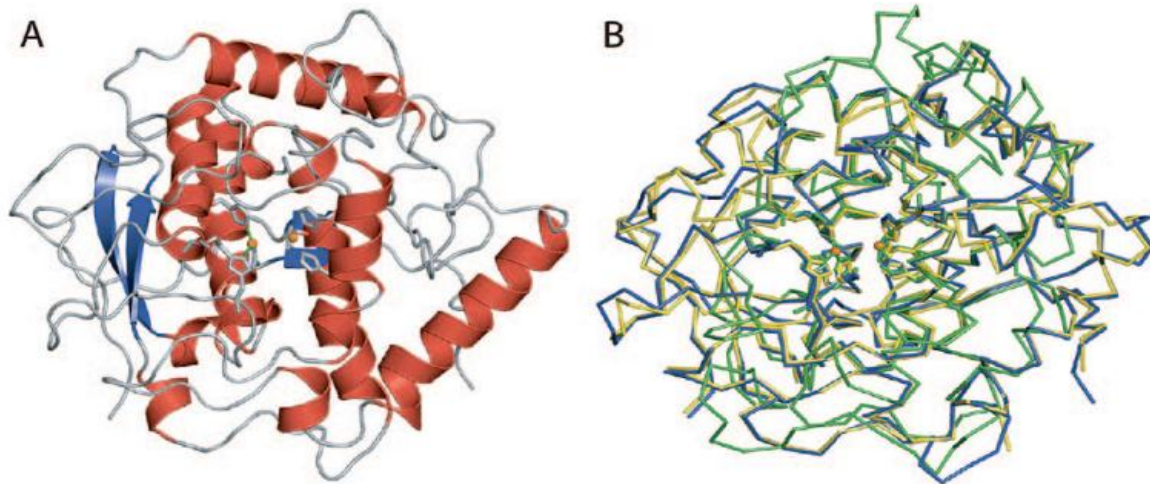
**Garcia-Borron et Solano (2002)** décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices  $\alpha$  et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des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

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

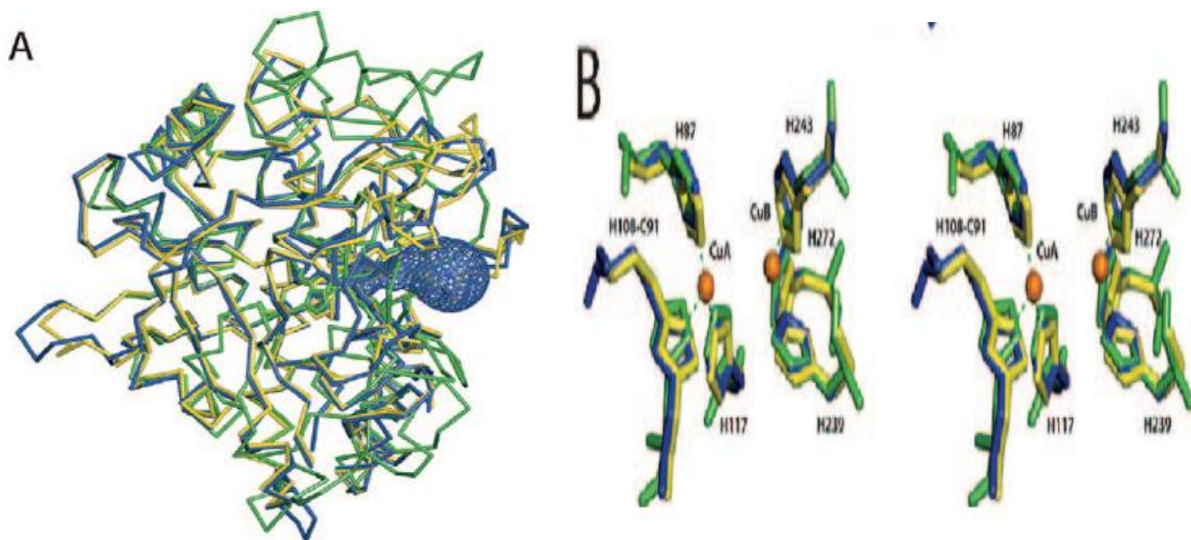
La structure cristalline de la PPO de *Vitis vinifera* a été récemment résolu (**Virador et al, 2010**), sa similitude avec les structures cristallines de la catéchol-oxydase de *Ipomoea batatas* (**Klabunde., 1998**) et l'hémocyanine de *Enteroctopus dofleini* (**Cuff., 1998**) soutient d'avantage la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

La PPO de *Vitis vinifera* est une protéine monomérique de 38,4 kDa (figure 3). La structure secondaire est essentiellement  $\alpha$ -hélicoïdal avec un noyau formé de quatre  $\alpha$ -hélices ;  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 12$ , et  $\alpha 14$ , le centre catalytique formé de deux atomes du cuivre est entouré par les hélices  $\alpha 3$  et  $\alpha 9$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 26 et Cys 25–Cys 88) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle. La paire de cuivre (CuA et CuB) (figure 1.4) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$ . Le CuA est coordonné par l'His 87, His 108, et l'His 117.

L'His 87 est situé au milieu de l'hélice  $\alpha 4$ , tandis que l'His 108 et His 117, sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha 5$ . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 239, His 243 et l'His 272. Ces résidus d'histidines, sont localisés au début et à la fin de l'hélice 12 et 14, respectivement. H108, se lie de façon covalente au Cys 91. (**Virador et al., 2010**).



**Figure 3 :** Diffraction aux rayons X de la PPO de *V. vinifera*. (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, le deux  $\beta$ -feuilles(Bleu), les quatre hélices(Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de Ca de *V. vinifera* PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et *Neurospora crassa* (vert).



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

## **1.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOs :**

### **1.4.1 Source et localisation :**

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

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

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides. Alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (**Zawistowski et al, 1991 ; Whitaker et Lee., 1995**). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (**Claus et Decker., 2006**).

### **1.4.2 Rôle physiologique :**

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

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

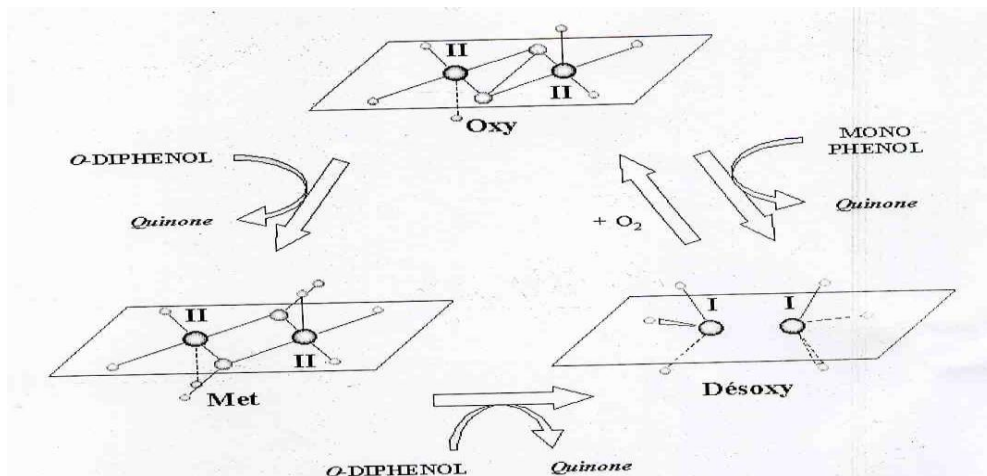
Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement **controversés** (**Mayer et Harel.,1991;Walker et Ferrar.,1995**) et plusieurs hypothèses sont émises. La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement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

Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine (Steffens et al, 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Vámos-Vigyázó.,1981; Zawistowski et al., 1991).

### 1.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique :

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sanchez-Ferrer et al (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire. La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif (Figure 5) passe alors sous forme *Désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite.

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



**Figure 5:** Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (*Met*, *Deoxy*, et *Oxy* PPO) d'après Van Gelder et al (1997).

## 1.6 PH et Température optimale :

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

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme, par exemple, la PPO de persil (Yusuf & Mustafa, 2012) présente une activité maximale à pH 8,5 avec le pyrogallol, mais un pH de 4 avec le 4-méthylcatéchol (Tableau 3). Les valeurs de pH optimum en présence de même substrat vis-à-vis des PPO d'origine différente sont également variables dont en présence de L-dopa, la valeur de pH optimum pour le persil égale à 4,5 (Dođru & Erat., 2012) tandis que pour celle de chèvrefeuille du Japon égale à 7,5. (Goyeneche et al, 2013).

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

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

Chutintrasri & Noomhorm (2006), ont montré que l'activité PPO d'ananas, a été réduite d'environ 60% après une exposition à 40-60 °C, pendant 30 min. Les valeurs de la température optimale de la PPO dépendent notamment de substrat (Tableau 3), du pH optimum, et également de la source de l'enzyme. Elles varient entre 20 et 65°C. Les résultats ainsi récapitulés dans le tableau «3 » montrent, que pour une même enzyme, la température optimale peut varier en fonction de substrat, par exemple pour la PPO de radis (Goyeneche et al., 2013), des valeurs de températures optimales égales à 40 °C et 20°C, en présence de catéchol et pyrogallol, respectivement, ont été obtenus. Pour deux PPO d'origine différente la température optimale

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

**Tableau 3 :** Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.

| Source                                             | Substrat         | pH optimum | Température optimale | Référence bibliographique |
|----------------------------------------------------|------------------|------------|----------------------|---------------------------|
| <i>Chien-rose</i><br>( <i>Rosa dumalis</i> Rechst) | Catéchol         | 8,5        | 25                   | Sakiroglu et al, (1996)   |
|                                                    | 4-méthylcatéchol | 8,5        | 20                   |                           |
|                                                    | Pyrogallol       | 7          | 15                   |                           |
|                                                    | L-Tyrosine       | 7          | 65                   |                           |
|                                                    | P-cresol         | 5          | 60                   |                           |
| <i>Murier blanc</i><br>( <i>Morus alba</i> L.)     | Pyrogallol       | 7,5        | 20                   | Arslan et al, (2004)      |
| <i>Banane</i><br>( <i>Musa cavendishii</i> )       | Catéchol         | 7          | 30                   | Ünal et al, (2007)        |
|                                                    | Catéchol         | 7          | 40                   |                           |
| Cerise<br>( <i>Malpighiaglabra</i> )               | L-Tyrosine       | 5,2        | 47                   | Kumar et al, (2008)       |
|                                                    | Pyrogallol       | 8          | 30                   |                           |
| <i>Blé</i><br>( <i>Triticumaestivum</i> )          | Catéchol         | 4.5        | 40                   | Erat et al, (2010)        |
|                                                    | Catéchin         | 5          | 35                   |                           |
|                                                    | pyrogallol       | 5          | 30                   |                           |
|                                                    | L-dopa           | 5          | 40                   |                           |
|                                                    | Dopamine         | 4.5        | 35                   |                           |
|                                                    | 4-méthylcatéchol | 5          | 35                   |                           |
| Persil<br>( <i>Petroselinumcrispum</i> )           | Catéchol         | 4          | 40                   | Doğru & Erat., (2012)     |
|                                                    | 4-Méthylcatechol | 4          | 40                   |                           |
|                                                    | Pyrogallol       | 8.5        | 35                   |                           |
|                                                    | L-Dopa           | 4.5        | 45                   |                           |
|                                                    | Dopamine         | 8          | 45                   |                           |
|                                                    | Catéchin         | 4          | 35                   |                           |
| <i>Radis</i><br>( <i>Raphanussativus</i> )         | Catéchol         | 7          | 40                   | Goyeneche et al. , (2013) |
|                                                    | Pyrogallol       | 7          | 20                   |                           |
| <i>Chèvrefeuille</i>                               | L-Dopa           | 7,5        | 25                   | Na-Na et al, (2013)       |

## 1.7 Spécificité de la PPO :

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

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

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

Ces composés phénoliques sont des substrats primaires de PPO (Figure1.6).Les types et les concentrations relatives des phénols naturels varient considérablement pour les différentes sources végétales. Par exemple, la catéchine est un composé phénolique majeur trouvé dans le thé **(Ullah., 1991)** et le persil **(Doğru et Erat., 2012)**, tandis que l'acide chlorogénique est présent dans le Radis **(Goyeneche et al, 2013)**, et l'aubergine **(Todaro et al, 2011).**

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

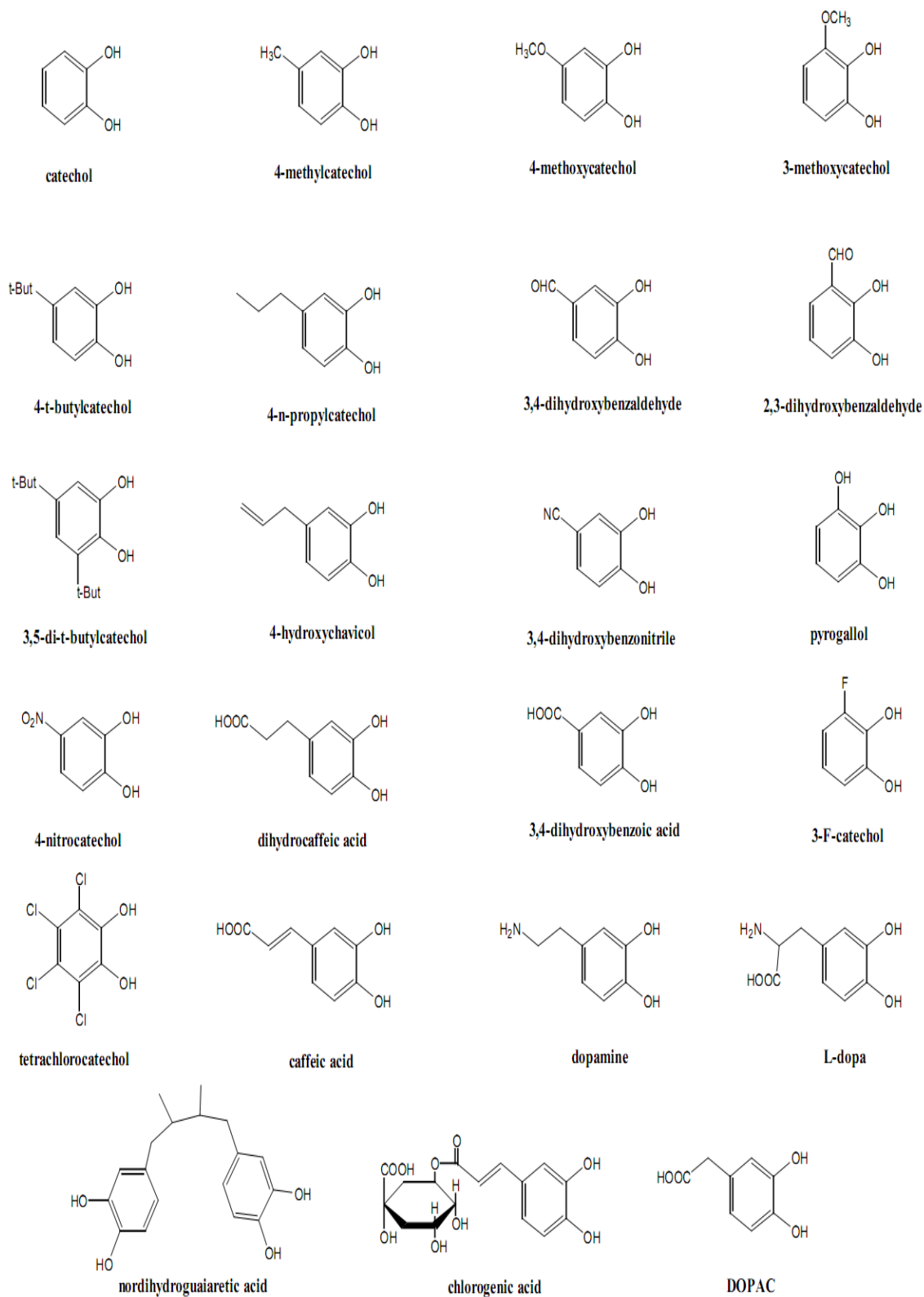


Figure 6: Structure de quelques substrats phénoliques (Majid et al, 2004).

### 1.8 Affinité et efficacité :

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

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

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

Pour la PPO de radis (**Goyeneche et al, 2013**), un rapport de 8 fois plus grand en utilisant l'acide caféique par rapport au catéchol comme substrat a été rapporté. (Tableau 4).

**Tableau 4:** Paramètres cinétiques de quelques polyphénols oxydase d'origine végétale

| Source                                     | substrat            | Vmax                       | $K_m$<br>(mM)       | Référence<br>bibliographique |
|--------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|------------------------------|
| Cerise<br>( <i>Malpighiaglabra</i> )       | Catéchol            | 6,97( $\mu$ M/min)         | 10,7                | Dogan et al, (2005)          |
|                                            | Pyrogallol          | 13,93                      | 11,6                |                              |
|                                            | 4-méthylcatéchol    | 12,20                      | 5,2                 |                              |
| Cerise<br>( <i>Malpighiaglabra</i> )       | Catéchol            | 79.5 ( $\mu$ M/min)        | 10.7                | Kumar et al, (2008)          |
|                                            | pyrogallol          | 8.8 ( $\mu$ M/min)         | 5.2                 |                              |
|                                            | 4-méthylcatéchol    | 125( $\mu$ M/min)          | 11.6                |                              |
| Blé<br>( <i>Triticumaestivum</i> )         | Catéchol            | 3.21 (UI/min ml)           | 0.1243              | Erat et al, (2010)           |
|                                            | Pyrogallol          | 2.43                       | 0.1040              |                              |
|                                            | 4-méthylcatéchol    | 3.02                       | 0.8861              |                              |
| Aubergine<br>( <i>Solanummelongena L</i> ) | Catéchol            | 2,34( $\mu$ M/min)         | 2,973               | Todaro et al, (2011)         |
|                                            | 4-methylcatechol    | 5,55                       | 2,122               |                              |
|                                            | Acide chlorogénique | 2,31                       | 1,351               |                              |
| Persil<br>( <i>Petroselinumcrispum</i> )   | Catéchol            | 0,39( $\Delta$ Abs/ml min) | $7,9 \cdot 10^{-4}$ | Dođru & Erat., (2012)        |
|                                            | Pyrogallol          | 0,07                       | $7,4 \cdot 10^{-4}$ |                              |
|                                            | 4-méthylcatéchol    | 0,05                       | $9,7 \cdot 10^{-4}$ |                              |
|                                            | L-Dopa              | 0,02                       | $1,5 \cdot 10^{-4}$ |                              |
|                                            | Dopamine            | 0,35                       | 5,93                |                              |
|                                            | Catéchin            | 0,06                       | $1,6 \cdot 10^{-2}$ |                              |
| Radis<br>( <i>Raphanussativus</i> )        | Acide gallique      | 233(UI/min ml)             | 4,2                 | Goyeneche et al. ,<br>(2013) |
|                                            | Acide pyrogallique  | 4348                       | 6,3                 |                              |
|                                            | Acide chlorogénique | 302                        | 7,2                 |                              |
|                                            | L-tyrosine          | 495                        | 9,3                 |                              |
|                                            | Catéchol            | 1587                       | 28,3                |                              |
|                                            | Acide caféique      | 1695                       | 77,0                |                              |

## 1.9 Applications de la PPO :

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

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

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

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

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

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

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

Dans le domaine agroalimentaire et environnement, les biocapteurs à PPO peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (**Durán et Esposito., 2000**), comme le cyanure (**Shan et al, 2004**), l'acide benzoïque (**Li et al, 2010**), l'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 dérivées au niveau des eaux usées (**Yamada et al, 2005**) de même, dans l'industrie textile, les PPO sont utilisées dans le blanchiment, la teinture et la décoloration (**Rodriguez et Toca., 2006**).

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

### 2.1 Matériels :

#### 2.1.1 Matériels biologiques :

La datte (Variété Ghars) utilisée dans notre étude a été achetée à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat. Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conservées à 4°C



*Figure 7 : La variété de dattes (Phoenix dactylifera L.) Cv Ghars*

#### 2.1.2 Produits chimiques :

Le phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), l'acétate de sodium, le catéchol, l'acide benzoïque, l'acide oxalique et le polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) sont fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

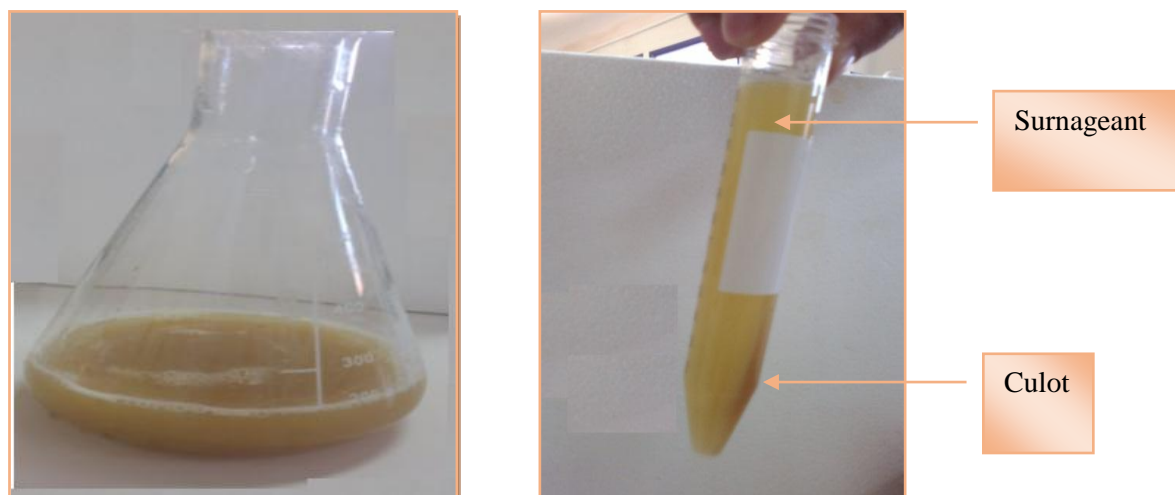
### 2.2 Méthode :

#### 2.2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO :

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

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. 150g de chair de dattes refroidie préalablement à 4°C sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG, model BB 90E) dans 200 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 5.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) comme chélateur des composés phénoliques. Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de gaze. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo Scientific Helios  $\gamma$  Spectrophotometer, England).

Le surnageant récupéré d'un volume totale de 170 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait enzymatique brut(PPO) qui divisé dans des tubes Eppendrof de 2ml qui seront Conservés à  $-10^{\circ}\text{C}$



**Figure 8 :** *Extrait brut de la datte (Phoenix dactylifera L CV Ghars) avant et après centrifugation.*

### 2.2.2 Mesure de l'activité de PPO :

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

La solution mère de catéchol à 0.16 M est préparé dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5mM (**Fan et Flurkey, 2004**).

Le milieu réactionnel contient 0,5 ml de substrat à 80mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20  $\mu\text{l}$  d'extrait enzymatique. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant 2 min après l'ajout de l'extrait enzymatique.

### 2.2.3 Effet du pH :

L'activité o-diphénolase de la PPO est mesurée à  $30^{\circ}\text{C}$  dans l'intervalle de pH compris entre 3.5 à 8.0. Le système tampon utilisé est ; le tampon phosphate de sodium (0.05 M; pH 6.0-8.0). Le catéchol à **80 mM** est utilisé comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

### 2.2.4 Etude de la stabilité thermique :

L'activité catécholase résiduelle de l'extrait brut de la PPO est mesurée après 10 minutes d'incubation des tubes en verre de 1 mm d'épaisseur contenant 20 µl d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 à 90°C.

Après traitement thermique, les tubes sont refroidis rapidement dans l'eau froide et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 5.0 pour les variétés de Ghars et à 30°C, en présence de 80 mM du catéchol comme substrat.

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

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

Où:  $A_0$  est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C)

$A_t$  est l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

### 2.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme :

La vitesse initiale de l'oxydation de la catéchol à 80 mM par la PPO de Ghars est mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 70 µl. L'activité enzymatique a été mesurée dans les conditions optimales décrites ci-dessus (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5 ; 30°C ; catéchol 80 mM)

### 2.2.6 Détermination des paramètres cinétiques :

Pour déterminer les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de l'activité catéchol oxydase de l'extrait brut de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) Cv Ghars, l'activité enzymatique est mesurée à pH : 5.0, tampon acétate de sodium à 0.05 M) et à 30°C, à différentes concentrations de 4 catéchol comprises entre 10 à 120 mM.

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

### 2.2.7 Détermination des valeurs d'IC<sub>50</sub> :

Cette valeur correspond à la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC<sub>50</sub>).

L'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 5.0 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs : d'acide benzoïque entre **5 et 40mM**, pour une concentration constante de catéchol.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (acide benzoïque) (**Chen et al, 1998**). Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur (A<sub>0</sub>) (**Dogan et al, 2005**) selon l'équation suivante :

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

Avec :

A<sub>0</sub> : est l'activité diphenolase en absence d'inhibiteur

A<sub>1</sub> : est l'activité diphenolase en présence d'inhibiteur

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

### 2.2.8 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque :

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur (1,5 et 3 mM pour l'acide benzoïque) et à différentes concentrations croissantes de la catéchol comprises entre 30 et 80 mM.

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

### 2.2.9 Analyse des résultats expérimentaux :

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific

Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). Enzyme Kinetics ProTM Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) ET Origin 6.0 (Microcal (TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

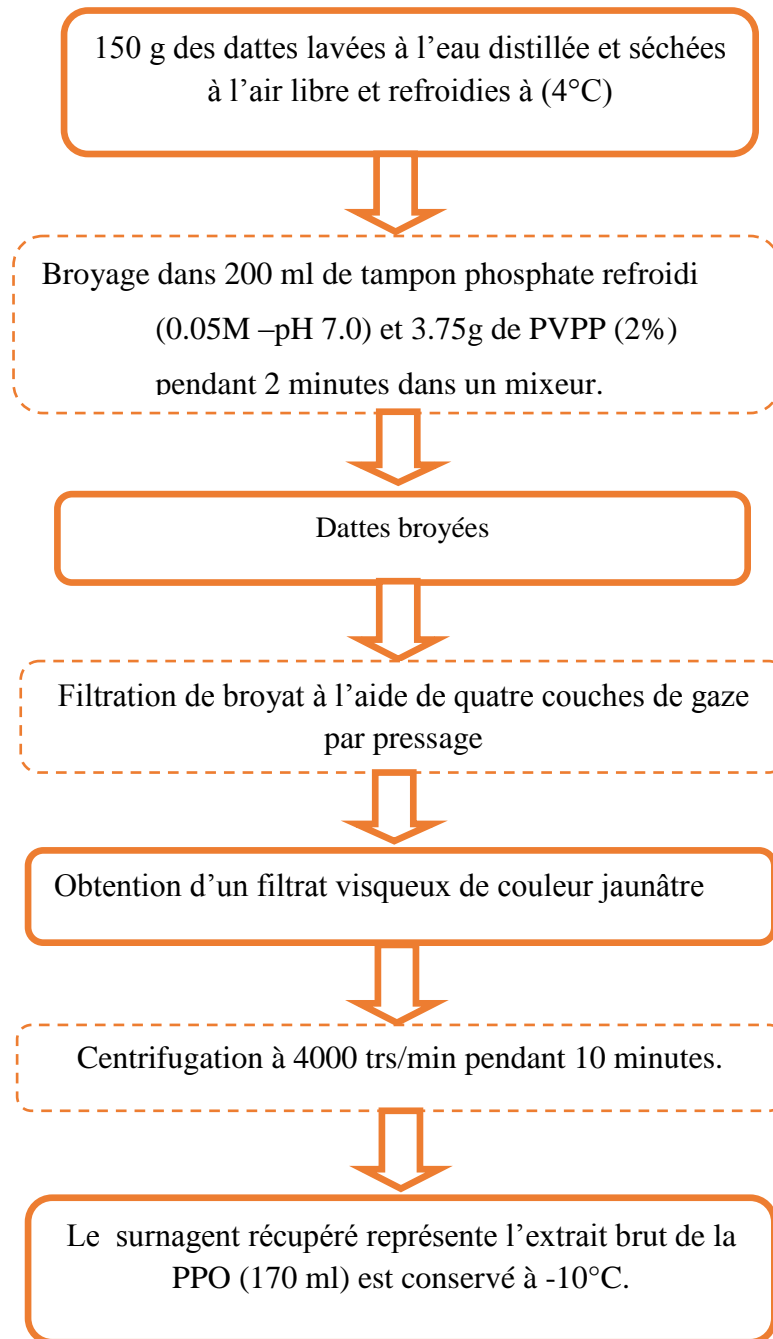
## Chapitre 3 : Résultats et discussion

### 3.1 Extraction de la polyphénol oxydase des dattes :

La PPO a été facilement isolée à partir de variété de datte (*Phoenix dactylifera*. L cv Ghares) à l'aide d'un protocole simple à mettre en œuvre. L'extrait enzymatique brut est capable de catalyser l'oxydation de catéchol comme substrat.

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

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



**Figure 9:** Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera L.*) « Ghars ».

## 3.2 Les conditions optimales de l'activité catéchol oxydase :

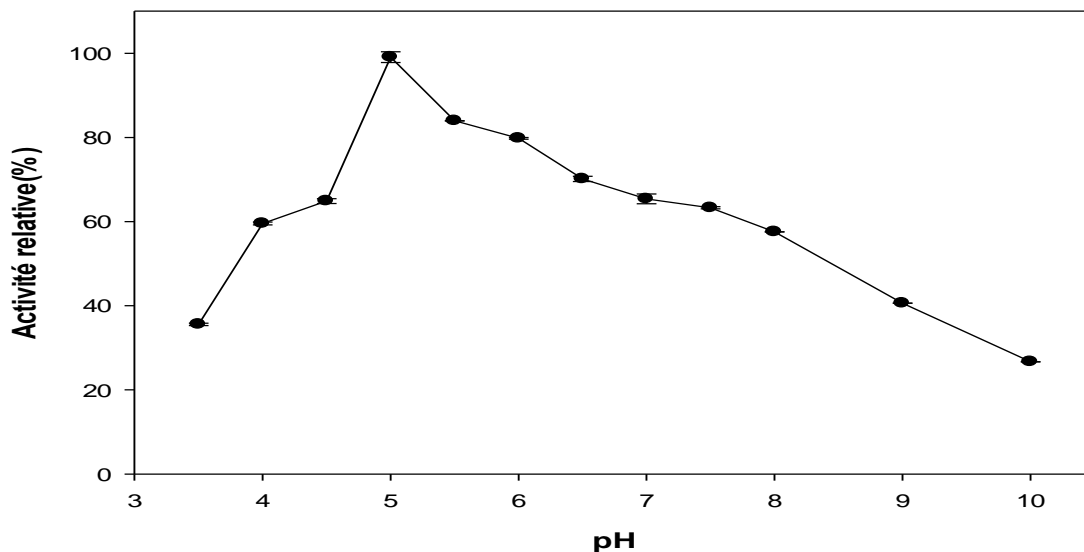
### 3.2.1 Effet du pH :

L'influence du pH sur l'activité catécholase des dattes cv Ghares a été déterminée en mesurant les vitesses initiales d'oxydation du 4-Méthylcatéchol à différents pH compris entre 3.5 et 8.0.

Les systèmes tampons utilisés sont: le tampon acétate de sodium (0.05 M; pH 3.5-6.0), et le tampon phosphate de sodium (0.05 M; pH 6.0-8.0).

(La figure 3.2) Représente le profil de l'activité catéchol oxydase relative en fonction du pH en présence de catéchol comme substrat. Ainsi, une valeur de pH=5 correspondant au max de pic relativement proportionnelle à l'activité optimale a été déduite. De part et d'autre de ce pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la 4-Méthylcatéchol et/ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre le site actif de l'enzyme et le catéchol. (Khatun et al., 2001).

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



**Figure 10:** Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L.*) cv Ghares en fonction du pH. (En présence de 4-catéchol comme substrat)

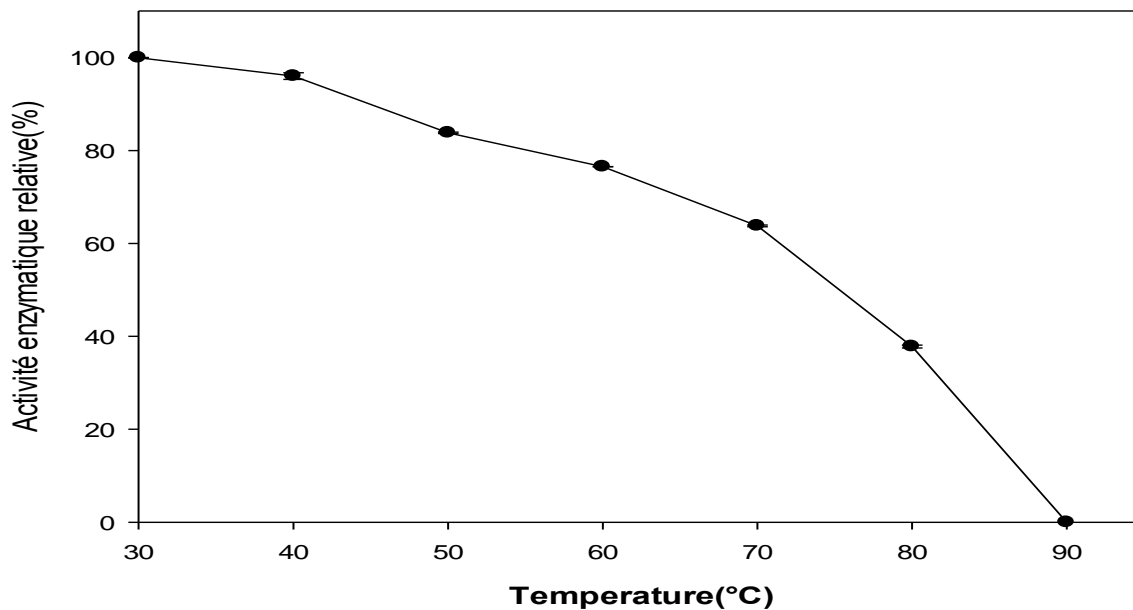
Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Yoruk et Marshall., 2003).

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

### 3.2.2 Etude de la stabilité thermique :

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes en présence de catéchol, comme substrat sont représentés dans la figure (11).

L'activité enzymatique relative a été suivie dans un intervalle des températures compris entre 30 et 90°C en respectant les conditions optimales décrites précédemment dont elle a été mesurée à pH 5.0 et à 30°C en présence de catéchol à 80 mM.



**Figure 11 :** Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L.*) Cv Ghares après 10 min de traitement thermique. (En présence de catéchol comme substrat).

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

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

Selon la nature du substrat utilisé et la source enzymatique, on remarque que la température optimale est dans la gamme 30-40°C, ainsi pour les trois sources d'enzyme une valeur de 30°C a été estimée en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

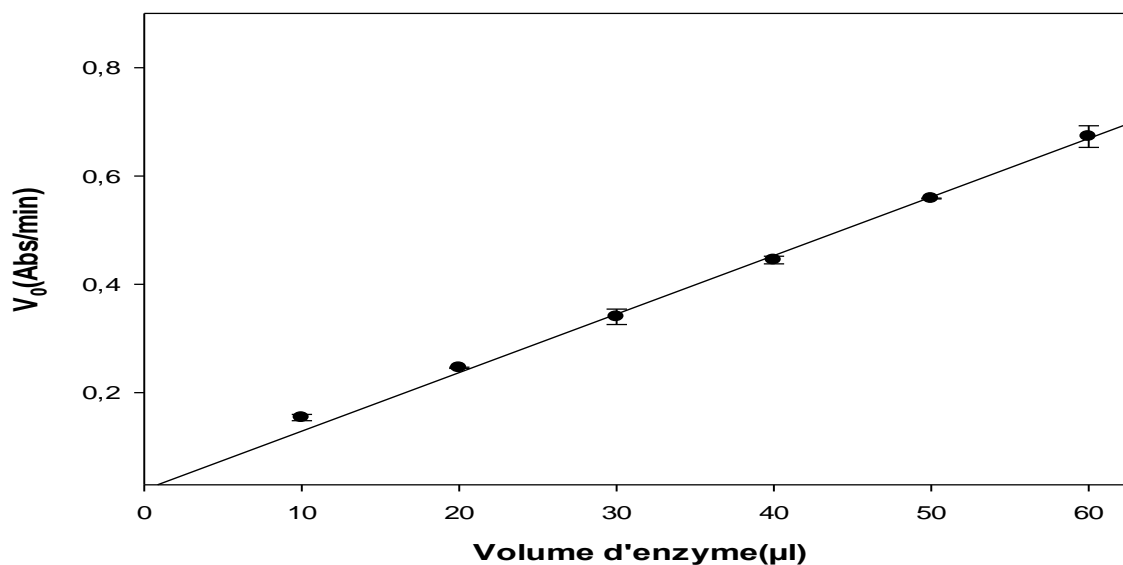
Nos résultats sont similaires à ceux trouvés pour les différentes PPO d'origine végétale: *Panaeus japonicus* (Benjakul et al, 2005), *Macrolepiotamastoidea* (Kolcuoğlu et al, 2006), *Musa cavendishii* (Ünal., 2007), *Ocimum basilicum* (Doğan et al, 2005) et *Castanea henryi* (Xut et al, 2004). Plusieurs chercheurs ont indiqué que les PPOs ont des températures optimales entre 20 et 40 °C (Arslan et al, 1997; Aydemir., 2004; Duangmal et al, 1999; Fujita et al, 1995; Jiang., 1999; Gawlik-Dziki et al, 2008). En effet, la PPO n'est pas une enzyme thermostable, les traitements thermiques de courtes durées à des températures de 70 à 90°C de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale, sont dans la plupart des cas suffisants pour la destruction irréversible, partielle voire totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003).

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

### 3.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme :

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol par l'extrait brut de la PPO des dattes a été étudié tout en respectant les conditions optimales précédemment décrites.

La **Figure 12** représente le résultat de l'effet de la concentration de l'enzyme sur son activité de PPO de Ghares. Nous constatons que la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol augmente de manière linéaire avec l'augmentation du volume de l'enzyme dans le milieu réactionnel, à partir de cette relation de proportionnalité nous pouvons estimer la valeur de la constante catalytique et par conséquent d'estimer la concentration de la PPO dans un extrait sans qu'il soit nécessaire d'effectuer sa purification totale (Weil., 2001).



**Figure 12 :** Effet de la concentration de la PPO de (*Phoenix dactylifera L.*) cv Ghares sur la vitesse initiale d'oxydation du 4 méthylcatéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 5 ; 30°C ; catéchol 80 mM)

D'après cette expérience, nous avons choisi le volume de l'enzyme de 20 µl comme étant convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.

### 3.2.4 Détermination des paramètres cinétiques :

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

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité catécholase a été étudié dans une gamme de concentration catéchol comprise entre 20 et 140mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05mM à pH 5.0 à une température de 30°C).

Les valeurs des paramètres cinétiques  $V_{max}$ , et  $K_m$  ont été ainsi estimés à partir des représentations de Michaelis-Menten (Equation (2)) et de Lineweaver-Burk (Equation (3)) comme suit (**Dalmadi et al, 2006**):

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

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) \left( \frac{1}{[S]} \right) + \left( \frac{1}{V_{max}} \right) \quad \dots\dots\dots\text{Equation (3)}$$

Où :

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

$V_{max}$  : est la vitesse maximale de la réaction (Abs/min) ;

[S] : est la concentration de 4-Méthylcatéchol (mM) ;

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

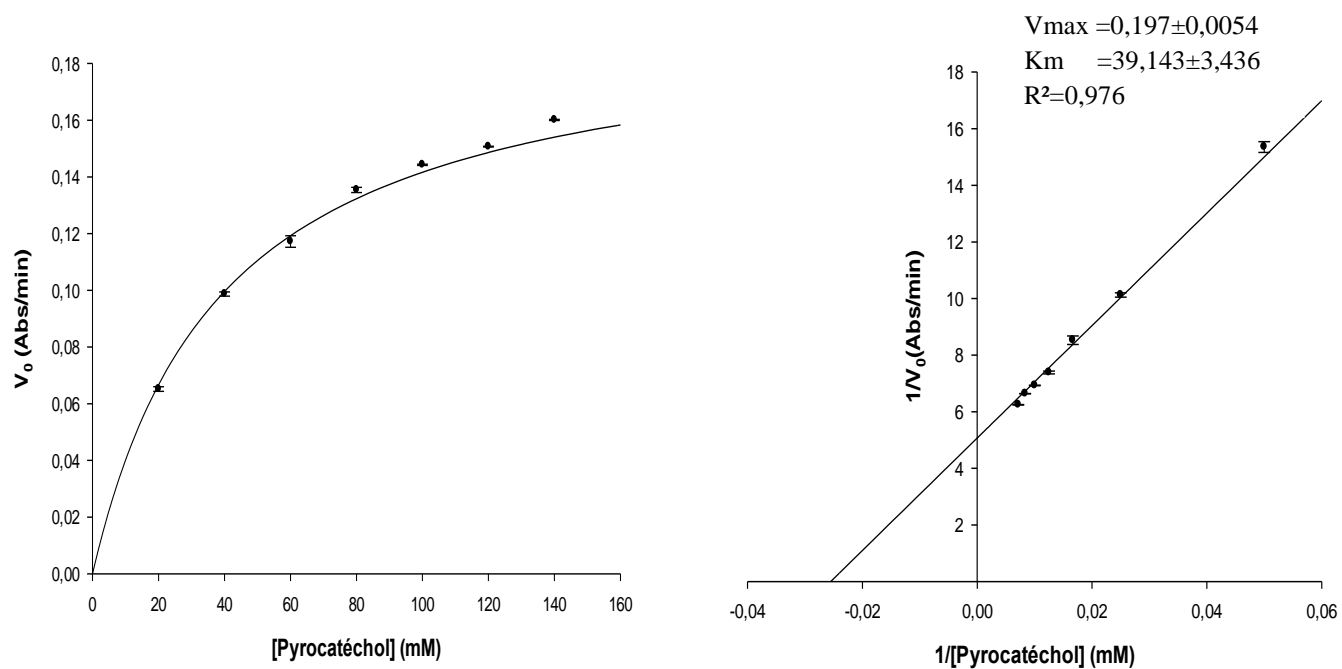
Le profil d'évolution de l'activité enzymatique de la PPO de la variété des dattes (Cv Ghares) en fonction de la concentration de catéchol est représenté dans la **Figure 13**

Nous remarquons que la représentation graphique donne une courbe d'allure hyperbolique, ce qui signifie que l'enzyme suit une cinétique michalienne.

La courbe  $1/V$  vs  $[S]$  a été utilisée afin d'évaluer la valeur de la constante de dissociation du complexe inactif ESS ( $K_s$ ). Le phénomène d'inhibition par excès de substrat a été observé pour la PPO des trois variétés avec une valeur approximative valant 140 mM.

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

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



**Figure 13 :** Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L.*) cv Ghares : (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.

Les valeurs des paramètres cinétiques ( $V_{\max}$  et  $K_m$ , et le rapport  $V_{\max}/K_m$  efficacité) obtenus à partir de la représentation graphique de double inverse  $1/V=f(1/S)$  sont ainsi récapitulées dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de 4 catéchol comme substrat

| Source | $V_{\max}$<br>(Abs/min) | $V_{\max}$<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) | $K_m$ (mM)         | $V_{\max}/K_m$<br>( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mM}$ ) |
|--------|-------------------------|----------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|
| Ghares | $0,197 \pm 0,0054$      | $0,376 \pm 0,035$                            | $39,143 \pm 3,436$ | $0,0095 \pm 0,000$                                         |

En effet, les recherches sur les PPOs impliquent généralement l'utilisation de catéchol comme substrat. Selon **Sachde et al, (1989)**, la valeur de la  $K_m$  de la PPO des dattes d'Iraq vis-à-vis du 4-Méthylcatéchol comme substrat, déterminée à pH 6.2 (tampon phosphate de potassium 0.01 M) sont: 3.5 et 8.75 pour les deux variétés de datte Barhee et Zahdi, respectivement.

Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten déterminées pour le catéchol comme substrat pour les PPOs d'artichaut (*Cynarascolymus L.*) (**Dogan et al., 2005**), de poire (*Pyruscommunis*) (**Ziyan et pekyardimci, 2004**), de cerise (*Malpighiaglabra L.*) (**Kumar et al., 2008**), de Yam (*Dioscoreacayenensis-rotundata* cv. Longbô) (**Gnangui et al, 2009**), des racines de céleri (*ApiumgraveolensL.*) (**Aydemir et Akkanlı., 2006**); et de banane (*Musa cavendishii*) (**Ünal., 2007**) sont respectivement: 10.7, 5.55, 5.2, 13.93, 29 et 8.5 mM.

Une valeur de 14.3 mM pour la PPO du romarin (*Rosmarinusofficinalis L.*) (**Aydemir., 2010**), 10.7 mM pour la PPO de l'artichaut (*Cynarascolymus L.*) (**Dogan et al., 2005**), 5.5 mM pour la PPO de la poire (*Pyruscommunis*) (**Ziyan et pekyardimci, 2004**), 4.5 mM pour la PPO de coing (**Yağar & Sağıroğlu., 2002**), 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighiaglabra L.*) (**Kumar et al., 2008**), 6.3 mM pour la PPO de la mangue (*Mangiferaindica L.*) (**Wang et al., 2007**), 3.65 mM pour la PPO du raisin (*Vitisvinifera L.*) (**Önez et al., 2008**) et 8.3 mM pour la PPO de céleri (*Apiumgraveolens L*) (**Aydemir et al, 2006**).

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

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

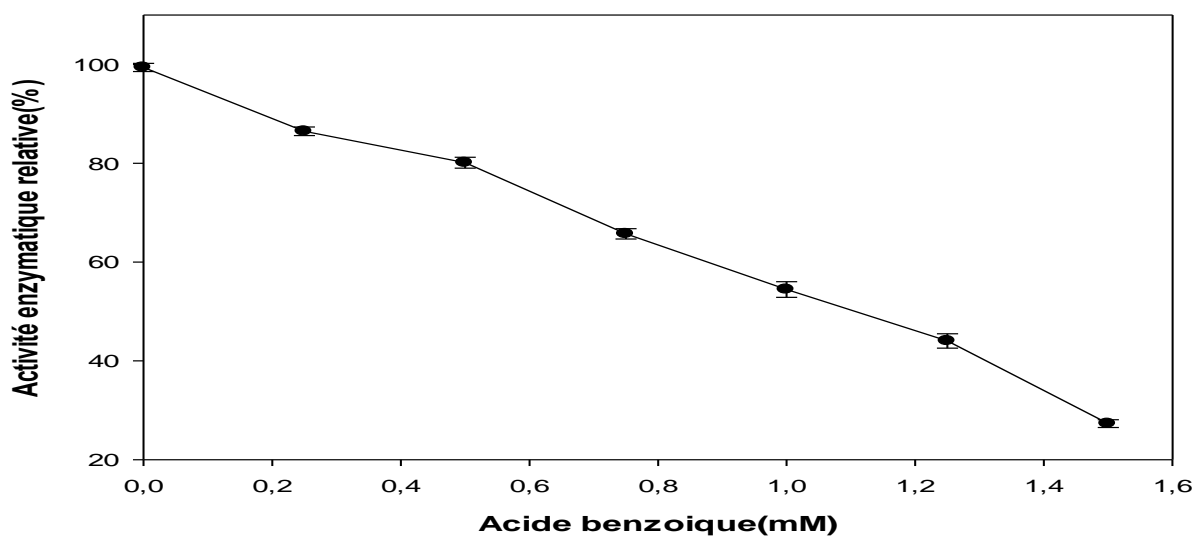
### **3.2.5 Détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique de la PPO :**

L'effet de différentes concentrations d'acide benzoïque, sur l'oxydation de la catéchol sur l'activité enzymatique de la polphénol oxydase des dattes *Phoenix dactylifera L* cv Ghares a été étudié.

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

La valeur d'IC<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration de l'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50% (Chen *et al*, 1998). On a obtenu une valeur

D'IC<sub>50</sub>=1,11Mm ±0,39 en présence d'acide benzoïque.



**Figure 14 :** L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de catéchol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L cv Ghares*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5).

Pour mieux comparer l'effet de l'acide benzoïque sur les PPOs d'origine végétale et celle de notre variété, les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'acide benzoïque, trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans le Tableau 6.

**Tableau 6** : Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'acide benzoïque trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats

| Sources                                               | Type de substrat | IC <sub>50</sub> mM | Références                                            |
|-------------------------------------------------------|------------------|---------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>Phoenix dactylifera L cv Ghares</i>                | Catéchol         | 1,11±0,39           | Notre étude                                           |
| <i>Phoenix dactylifera L cv Deglet –Nour</i>          | Catéchol         | 0,19 ±0,15          | Choul., 2016                                          |
| <b>Blé</b><br><i>Triticumaestivum L.</i>              | Catéchol         | 11.18               | Erat et <i>al.</i> , 2010                             |
| <b>Truffe</b><br><i>Terfezia leonis Tul</i>           | Catéchol         | 8.2                 | Gouzi., 2014                                          |
| <b>Champignon de Paris</b><br><i>Agaricusbisporus</i> | Catéchol         | 1.00<br>0,147       | Chen et <i>al.</i> 2003<br>Gouzi et <i>al.</i> , 2010 |

De plus, d'après ces résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur du a la valeur d'IC<sub>50</sub> qui peut être influencé beaucoup plus de la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors la mesure de l'activité de la PPO des dattes

### 3.2.6 Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété par l'acide benzoïque :

L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO des dattes cv Ghares est étudié en utilisant le catéchol comme substrat.

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

Le coefficient de régression linéaire (R<sup>2</sup>) de représentation de lineweaver-Burk en absence et en présence de ces acides organiques pour le substrat utilisé (catéchol) est indiqué dans le tableau 7.

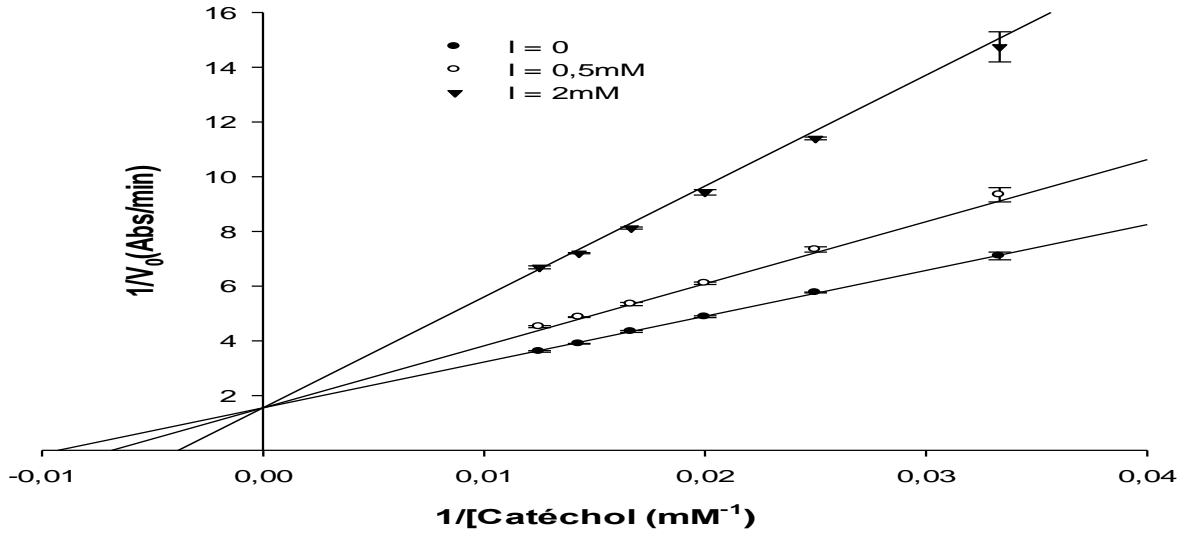
Les valeurs «  $R^2$  » équivalent à (0.987) indiquent bien que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

**Tableau 7 :** Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L*) cv Ghares en utilisant le catéchol comme substrat

| Substrat        | [I]<br>mM | $K_i$        | $K_m$           | $V_{max}$   | $R^2$ | Type d'inhibition |
|-----------------|-----------|--------------|-----------------|-------------|-------|-------------------|
|                 | 0         |              | 107,6261±5,8392 |             | 0,989 |                   |
| Acide benzoïque | 15        | 36.621±1.165 | 115,999±11,007  | 0,267±0,024 | 0.987 | Non compétitive   |
|                 | 2         |              | 272,480±1,5447  |             | 0,986 |                   |

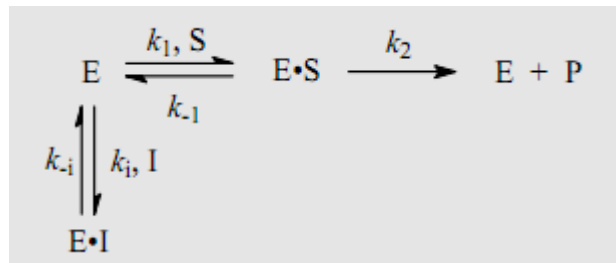
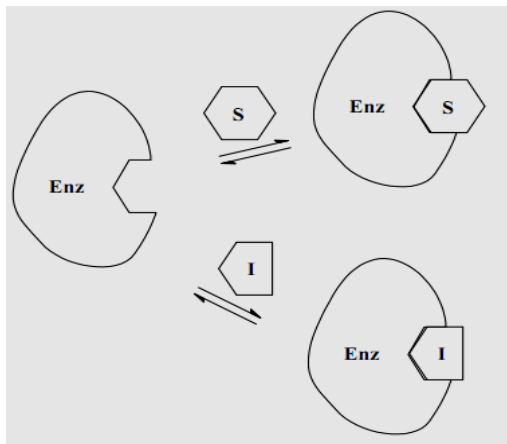
Les valeurs de KI indiquées dans le Tableau (7) suggèrent que cet acide organique inhibe efficacement l'activité de la PPO de la variété Ghares en présence de catéchol. De même ce tableau montre que les représentations graphiques de  $1/v_0$  en fonction de  $1/[S]$ , est une série de courbes parallèles, avec une diminution de la valeur  $V_{max}$  et pareillement, augmentation du  $K_m$ .

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de catéchol par la PPO des dattes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de ces acides organique, agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk. Les résultats ainsi trouvés sont représenté dans la **Figure 15**



**Figure 15:** Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Ghares*) par l'acide benzoïque.

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



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

**Figure 17 :** schéma de type Michaelis-Menten

De l'inhibition compétitive (Keillor, 2004)

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

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

Avec :

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

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

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

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

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

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

## Conclusion et perspectives

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

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

L'application de l'acide benzoïque comme inhibiteur pour réduire le brunissement dû à l'enzyme PPO des dattes *Phoenix dactylifera* L cv Ghars est ainsi rapportée pour la première fois.

D'après les résultats obtenus à partir de ce travail, on conclue que, l'acide benzoïque présente un mécanisme compétitif, dont il se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat

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

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

## Références bibliographiques

- **Arslan O., Doğan S.**(2005). Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1499-1504.
- **Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I.**(1997). Polyphenol oxidase from *Allium* sp.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*45:2861–2863.
- **Asanuma,M.,Miyazaki,I., Ogawa,N.**(2003).Dopamine or-L-DOPA-induced neuro toxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176
- **Aydemir,A.**(2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chem.*, 87, 59-67.
- **Aydemir, T.**(2010). Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Food Properties.* 13: 475-485.
- enzyme activity of some inhibitors. *J. Food Sci. Tech.*, 41, 1090–1098.
- **Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I.**(1997). Polyphenol oxidase from *Allium* sp.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*45:2861–2863.
- **Anosike E.O & Ayaebene A.O.**(1982). Properties of polyphenol oxidase from tubers of the Yam (*Dioscorea bulbifera.*) *Phytochemistry*, 21, 1889-1893.
- **Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M.**(2005). Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).” *Journal of Food Biochemistry.* 29: 470-485.
- **Chan, H. T & Yang, H. Y.**(1971). Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. *Journal of food science.* 35: 169.
- **Chang-Kui D,, Kazuo C, Yoshinori U, Chien Y.W.,**(2002). Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry* 76,213–218.
- **Chen, Q.X., Lu, H.Y., Zhu, C.M., Lin, H.N., Zhou, H.M.**(1998). The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.* 45: 465-73.

- **Cheng,X.-F., M.,Zhang,M.,Adhikari,B.**(2013).The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, Ultrasonics Sonochemistry 20,674–679.
- **Cuff M,Millerki E, Van Holdeke,Hendrick Sonwa.**(1998).Crystal structure of a functional unit from Octopus dofleini hemocyanin .JMolBiol 1998 ;278 :855–70
- **Dalmadi,I.,Rapean,G.,Loey,An.,Smout,C.,Hendrickx ,M.**(2006). Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. Journal of Food Biochemistry,V 30, p 56–76.
- **Dogan S., Turan P., Dogan M., Alkan M., Arslan O.**(2007). Inhibition Kinetic of *Ocimum basilicum* L.Polyphenol Oxidase. 5, 46.
- **Dogan, M & Dogan, S.**(2003). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii*). J Food Chem. 39: 1-9.
- **Eicken, C., Krebs, B .,Sacchettini, J.C.**(1999).Catechol oxidase:structure and activity.Catalysis and regulation.Current Opinion in Structural Biology. 9: 677-683.
- **Espin,J.C.,Morales,M.,& Varon,R,**(1996).Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and di-phenolase activities of pear polyphenoloxidase. J.FoodSci.61(6),1177.
- **Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F.** (1997). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. J. Agric. Foo Chemistry. 45: 1090-1094
- **Es-Safi, N.E., Cheynier, V.,Moutounet, M.**(2003).Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. J Food Comp Anal. 16:535–553.
- **Fan, Y & Flurkey, W.H.**(2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. Phytochemistry. 65: 671-678.
- **Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., & Tono, T.**(1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea L.*). Journal of Agricultural Food Chemistry. 43(113)1138–1142.

- **Garcia-Borrón ,J.C., Solano F.**(2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173
- **Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., & Swieca, M.**(2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *Capitata* L.). *Food Chemistry.* 107: 129–135.
- **Gnangui,S,N.,Dué, E. A.,N’guessan Kouadio, J-P. E.,Kouamé, L. P.** (2009). Effect of heat treatment on edible yam polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of animal & plant sciences.* 2,( 3),128 – 137.
- **Gouzi, H & Benmansour, A.**(2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering.* 5: 1-11.
- **Gouzi H., Coradin T., Delicado E.M., Ünal U., Benmansour A.**(2010). Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal.*, 3, 1-7.
- **Gouzi H.,Depagne C., Benmansour, A., Coradin .**(2013). First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle(*Terfezia leonis Tul.*) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol* .
- **Gouzi, H., Depagne, C., & Coradin, T.** (2012). Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 500–506.
- **Goyeneche,R,, Di Scala,K , Roura.**(2013).Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(*Raphanussativus var.sativus*) *Food Science and Technology.*(54), 57-62
- **Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A.,**(2006). Fungal tryrosinases: new prospects in molecular characteristics,bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219–232
- **Haldane, J.B.S.**(1930). *The enzymes.* Green and Co Ed, Londres.
- **Harry,W.,Duckworth.,Joseph,E.,Colema.**(1970). Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Biological. Chem.*, 7, 1613-1625

- **Hasegawa, S. and Maier, V. P.** (1980). Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893.
- **Jiang, Y. M.**(1999). Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry.* 66:75–79.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G.**(1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459-1483
- **Harel, E., Mayer, A.M., Shain, Y.**(1964). Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum.* 17: 921-930
- **Keilin, D & Mann, T.**(1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187-204
- **Khatun, S., Absar, N ., And Ashraduzzaman, M.**(2001). Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera L.*) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4: 1129-1132.
- **Klabunde,T.,Eicken,C.,Sacchettini,Jc,Krebs,B.**(1998.)Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center.*NatStructBiol*;5:1084–90.
- **Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N.**(2006).Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry.*101:778-785.
- **Kumar Anil,V.B.,Mohane Kishor, T. C.,Murugan. K.**(2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra L.*).*Food Chemistry.*110:328-333.
- **Lax A.R & Vaughn K. C.**(1991).Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31
- **Lineweaver, H & Burk,D.**(1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.
- **Madhavi ,V.,& Lele,S,S.**(2009).Laccase properties,use,,*Bioresources.*1694-1717
- **Martinez-Cayuela, M., Rodriguez-Vico, F., Faus, M.J. And Gil, A.** (1989). Partial purification and intracellular localization of cherimoya (*Annona cherimolia Mill.*) Polyphenol oxidase.*J.Plant Physiol.*133, 660-663.

- **Martínez.C, M., Corzo,N .,Villamiel,M., Del Castillo,M,D.**(2012).chapitre 4 Browning Reactions. Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition.
- **Martínez V.M. & Whitakerj.R.**,(1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.
- **Muñoz-Muñoz ,Jl., Garcia-Molina,F., Varon,R., Tudela,J., Garcia,F., Rodríguez-López,Jn** .(2010) New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase . *J Math Chem* .
- **Önez Z., Karakuş E., Pekyardimci Ş.**(2008). Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera L.*): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. 32, 396–414.
- **Pifferri P.G., Baldassari L., Cultrera R.**(1974). Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric.*, 25, 263-270
- **Queiroz ,C.,Maria,L M,Fialho ,E.,Vera.,Lúci,A.**(2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375
- **Robert ,C., Rouch ,C., Cadet ,F.**(1997). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 59, 355-60.
- **Sakiroglu H., Kufrevioglu I.O., Kocacaliskan I., Oktay M., Onganer Y.,** (1996). Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2982–2986.
- **Simsek, S., & A. Yemenicioglu.**(2007).Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry*.
- **Todaro,A.,Cavallaro,R.,Argento,S., Brancand,F.,Spagna,G.**(2011).Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*solanum melongena L.*) .*J. Agric. Food Chem*,59 (20),11244–11248.
- **Tomita Y, Hariu A, Mizuno C, Seiji M.**(1980). Inactivation of tyrosinase by dopa. *J Invest Dermatol*.75(5):379-82.
- **Trebst, A et Depka, B.**(1995). polyphenol oxydase and photpsynthesis research. *Photosynththesis Research* 46:41-44.

- **Ünal M.Ü.**(2007.) Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry.*, 100, 909-913.
- **Ünal, M. Ü & Şener, A.** (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J Sci Food Agric.* Vol. 86, pp. 2374–2379.
- **Urszula G., Urszula Z., Michal W.**(2007). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) *Food Chem.*, 8, 20-704
- **Vámos-Vigyázó, L.**(1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- **Virador,V,M.,Grajeda,J,P,R.,Blanco-Labra,L.,Mendiola-Olaya,E.,Smith,M ,G.,Moreno,A., Whitaker.,J,R.**(2010). Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.* , 58, 1189–1201.
- **Voet,D., Voet ,J,G.**(2011). *Biochemistry*, 4th Edition. Courier/Kendallville.USA.
- **WANG, J., JIANG, W., WANG, B., LIU, S., GONG, Z., AND LUO, Y.**(2007). Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tainong”) pulp. *Journal of Food Biochemistry.* 31: 45–55.
- **WEI L , LI-QIANG Z, JUN-PING L, ZHAO-QIN Z, CHENG-MEI L, RUI-HONG L.**(2013)The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation. *Food Chemistry* 140,289–295.
- **Yagar, H.,& Sagiroglu, A.** (2002) Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk. J. Chem.* Vol. 26, pp. 97-103.
- **Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N. And Hayashi, N.** (2000).Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48,2732-2735
- **Yang, Y & Wang, Z.**(2008). Some Properties Of Polyphenol Oxidase From Lily. *International Journal Of Food Science And Technology* 43: 102-107.
- **Yemenicioglu, A & Cemeroğlu, B.**(2003).Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the Presence of Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51:2371-2379.

- **Yoruk, R & Marshall, M.R.**,(2003). Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Chem.* 27,361–422.
- **Zawistowski,J., Biliaderis, C.G.,Eskin, N.A.M.**(1991). Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- **Zhang,Y.,Wang,Y., Zhou,L., Liao,X.**(2010). A comparative study of inactivation of peach polyphenol oxidase and carrot polyphenol oxidase induced by high-pressure carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*,V(45,11), p 2297–2305.
- **Zhou,H,W & Feng,X.**(1991). Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*,V57, p 307–313.