



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## **Université Amar Thelidji- Laghouat**

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

### **MEMOIRE DE MASTER**

Présenté par : M. Kacem Houssemeddine

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

### **Thème**

Etude de l'inhibition du polyphénol oxydase de  
datte Deglet-nour (*Phoenix dactylifera L.*)  
par l'acide caféique

#### **Jury de soutenance :**

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>qualité</b>
M. Leboukh Mourad	Maitre de Conférences Classe A	Président
M. Krantar Kamel	Maitre Assistant Classe A	Examinateur
M. Gouzi Hicham	Maitre de Conférences Classe A	Rapporteur
M. Bennaceur Farouk	Maitre Assistant Classe B	Co-rapporteur

**Promotion : Juin – 2016**

# *Dédicaces*

*Comme le parcours de la vie m'a donné l'occasion d'exprimer ma profonde gratitude,  
Je dédie cet humble travail à :*

## *Mon Père Derradji*

*Qui ma beaucoup aidé, conseillé et encouragé.*

*En vous, je vois un père dévoué à sa famille. Ta présence en toute circonstance m'a  
rappelé le sens de la responsabilité.*

## *Ma Mère Fatiha*

*En vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à se sacrifier pour le bonheur de ses  
enfants.*

*Merci pour tout : Votre courage, votre bravoure, votre générosité et votre motivation.*

## *Mes sœurs et frère*

*Amel, imane, sanaa et mahamed amine merci d'avoir me soutenue et encouragé  
durant mon cursus.*

*Aux petites Hiba, aya et mayar*

*A tous les membres de ma famille petits et grands qui me soutient à réussir. Grâce à  
eux j'ai enregistré le succès.*

## *Et enfin,*

*À tous mes amis ali, abou beker el seddik, noureddine, yacine et toute la classe de  
sciences agronomique*

# *Remerciements*

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

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur Gouzi Hicham et Maître de Conférences au département de biologie de l'université Amar Téliidji et Monsieur benaceur farouk, responsables de cette étude, pour avoir acceptés de m'encadrer, pour le choix de thème et pour avoir participé à la correction de ce manuscrit afin de réaliser cette étude. Pour leurs conseils pratiques, techniques, et scientifiques durant mes travaux de mémoire, Merci infiniment.*

*Au terme de ce travail, qui a été réalisé dans les laboratoires du département de Biologie, je tiens à remercier tous les ingénieurs de laboratoire pour leur accueil et leur patience.*

*Je voudrais aussi remercier les membres de jury qui ont bien voulu trouver un peu de temps pour évaluer mon travail et pour les conseils prodigués et l'apport d'informations judicieuses dans le parachèvement de ce labeur.*

*Il demeure important pour moi d'exprimer mes plus sincères remerciements à toutes celles et ceux qui, de près ou loin, m'a aidé à réaliser ce projet de fin d'étude.*



## *Sommaire*

Résumé.....	III
Sommaire.....	IV
Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII
Liste des photos.....	IX
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Historique sur le palmier dattier.....	3
2. Généralités sur le palmier dattier.....	3
2.1. La classification botanique.....	3
2.2. Ecologie.....	4
2.3 Production mondiale des dattes .....	4
2.4 La répartition de deglet noir en algerie.....	4
3. La datte.....	5
3.1 Définition.....	5
3.2 Les produits des dattes.....	6
3.3 Formation et maturation de la datte.....	6
3.4 Classification des dattes selon consistance.....	7
3.5 Composition biochimique de la datte.....	8
3.6 Les enzymes de la datte .....	8
4. La polyphénol oxydase.....	9
4.1 Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase.....	9
4.2 Définition, classification et nomenclature de la polyphénol oxydase.....	9
4.2.1 Définition.....	9
4.2.2 Classification.....	9
4.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales de PPOs.....	10
4.3.1 Caractéristiques réactionnelles.....	10
4.3.2 Caractéristiques structurales.....	10
4.5 Source, localisation et rôle des PPOs .....	12
4.5.1 Source et localisation.....	12
4.5.2 Role.....	12
4.6 Activité catécholase de la PPO.....	13
4.7 Les méthodes de détermination de l 'activité PPO.....	14
4.8 Les substrats de la PPO .....	15
5. Effet du pH et de température sur l 'activité PPO.....	15
6. Les effecteurs de la PPO.....	15
6.1 Les activateurs.....	15
6.2 Les inhibiteurs naturels.....	15
6.2.1 Les polyphénols.....	18
6.2.2 Les dérivés d 'aldéhyde benzoïque et de benzoate .....	21
6.3 D 'autres inhibiteurs naturels et synthétiques.....	22
6.3.1 D 'autres inhibiteurs a partir des sources naturelles.....	22
6.3.2 D 'autres inhibiteurs a partir des sources synthétiques.....	22
Matériels et méthode.....	24
1. Matériel.....	24

1.1 Matériel biologique.....	24
1.2 Produits chimiques.....	24
2. Méthodes.....	24
2.1 Préparation de l 'extrait brut de la PPO.....	24
2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	25
2.2.1 Principe de la méthode.....	25
2.2.2 Mode opératoire.....	25
2.3 Mesure de l'activité de PPO.....	26
2.3.1 Mesure de l'activité catécholase.....	26
2.4 Effet du pH.....	28
2.5 Effet de la température.....	28
2.6 Effet de la concentration de l 'enzyme.....	28
2.7 Détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ).....	29
2.8 Etude cinétique de l 'effet de l'acide caféique sur l'activité catécholase.....	29
2.8.1 Détermination de l 'IC <sub>50</sub> .....	29
2.8.2 Détermination du Mécanisme cinétique d 'inhibition.....	29
2.9 Analyse des résultats expérimentaux.....	30
Résultats et discussion.....	31
1. Détermination des conditions optimales de la mesure de l 'activité catécholase...31	
1.1 Extraction de la PPO de deglet nour ( <i>phoenix dactylifera L.</i> ).....	31
1.2 Effet de la concentration de l 'enzyme.....	31
1.3 Détermination des paramètres cinétiques de l 'activité catécholase.....	32
1.4 Stabilité thermique.....	35
1.5 Effet de pH.....	36
2. Etude de l'inhibition de la PPO de datte deglet nour par l 'acide cafféique.....38	
2.1 Détermination de la valeur d 'IC <sub>50</sub> .....	38
2.2 Mécanisme cinétique d 'inhibition de l 'activité catécholase par l'acide cafféique.....	3
9	
Conclusion .....	42
Références bibliographiques.....	43
Annexe.....	

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Titre du tableau</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b>	Stades de développement des dattes	<b>06</b>
<b>Tableau 02</b>	les valeurs de $K_m$ et pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales.	<b>33</b>
<b>Tableau 03</b>	Le pH optimal de la polyphénol oxydase de quelques fruits et légumes utilisant le catéchol comme substrat.	<b>37</b>
<b>Tableau 04</b>	Les valeurs de $K_I$ , de $K_m$ , et de $V_{max}$ de l'activité catécholase de la PPO de datteen présence de l'acide caféique.	<b>40</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre de figure</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 01</b>	Répartition des palmiers dattiers	<b>05</b>
<b>Figure 02</b>	Datte et noyau du palmier dattier	<b>06</b>
<b>Figure 03</b>	Classification des dattes	<b>07</b>
<b>Figure 04</b>	Schéma de différentes réactions catalysées par les PPO	<b>10</b>
<b>Figure 05</b>	Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda	<b>11</b>
<b>Figure 06</b>	Schéma mécanistique de l'activité catécholase de la PPO	<b>23</b>
<b>Figure 07</b>	Mécanisme d'action des inhibiteurs réversibles	<b>16</b>
<b>Figure 08</b>	Structure chimique de l'acide kojique, la tropolone et la L-mimosine	<b>17</b>
<b>Figure 09</b>	Les structures chimiques de quelques inhibiteurs naturels et synthétiques de la tyrosinase	<b>23</b>
<b>Figure 10</b>	Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry	<b>26</b>
<b>Figure 11</b>	Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la PPO	<b>27</b>
<b>Figure 12</b>	Vitesse initiale d'oxydation du catéchol en fonction de la concentration de la PPO de datte Deglet noir	<b>32</b>
<b>Figure 13</b>	Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la PPO Deglet Nour	<b>34</b>
<b>Figure 14</b>	Représentation de Lineweaver-Burk en double inversée de l'effet de la concentration de substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par l'extrait brut de la PPO Deglet Nour	<b>34</b>
<b>Figure 15</b>	Stabilité thermique de la PPO de datte Deglet noir ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) après 10 min de traitement thermique.	<b>35</b>
<b>Figure 16</b>	Activité catécholase de la PPO de datte Deglet noir ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) en fonction du pH	<b>36</b>
<b>Figure 17</b>	Effet de la concentration de l'acide caffeique sur l'oxydation de catéchol de datte Deglet noir.	<b>38</b>
<b>Figure 18</b>	Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de la datte	<b>39</b>
<b>Figure 19</b>	Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non-compétitive	<b>41</b>

## *Liste des abréviations*

**PPO** : Polyphénol oxydase.

**AC** : Acide caffeique.

**Kda** : kilo-dalton.

**PPO** : Polyphénol oxydase

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

**IC<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibiteur pour une diminution de l'activité enzymatique de 50%

**°C** : Degré Celsius

**K<sub>m</sub>** : Constante de Michaelis

**K<sub>I</sub>** : Constante de dissociation

**V<sub>0</sub>** : Vitesse initiale

**V<sub>max</sub>** : Vitesse maximale

**R<sup>2</sup>** : Coefficient de régression linéaire

**E** : Concentration d'enzyme

**S** : Concentration de substrat

**I** : Concentration d'inhibiteur

## *Liste des photos*

<b>Numéro</b>	<b>Titre de la photo</b>	<b>Page</b>
<b>Photo 01</b>	Les dattes Deglet-Nour d'Algérie ( <i>Phœnix dactylifera</i> L.)	<b>24</b>
<b>Photo 02</b>	Un tube Eppendorf de 2mL contenant l'extrait enzymatique brut d'une couleur jaune.	<b>25</b>

# *Introduction*

Le fruit du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*.L) est considéré comme un fruit important pour la population algérienne durant toutes les saisons et particulièrement pendant le mois sacré de Ramadhan.. Il est considéré comme un élément vital composante de leur régime alimentaire quotidien. Ce fruit a une grande importance des points nutritionnels et économiques de vue de nos jours.

La datte est 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. La polyphénol oxydase (PPO) est reconnue 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 ; Casafiola-Martin et al., 2006). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent pour former un colorant brun ou noir appelé mélanine (Varoquaux, 1978).

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

L'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) est l'un des acides phénoliques communs qui se trouve fréquemment dans les fruits (Mattila, 2002) et les grains (Bryngelsson et al., 2002). Pour une consommation humaine, il est sous forme d'esters avec de l'acide quinique ou des saccharides.

D'après nos connaissances, aucune étude n'a été réalisée sur l'inhibition de la PPO des dattes Deglet-nour par l'acide caféique. Par conséquent, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de l'acide caféique sur l'activité catécholase de la PPO de Deglet-Nour et de déterminer son mécanisme d'inhibition en utilisant le catéchol comme substrat o-diphénolique.

Notre travail sera présenté en quatre parties et est séquencé comme suit. La première partie est une synthèse bibliographique constitué de deux principaux chapitres relatant des généralités sur les dattes et la polyphénol oxydase. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. La troisième partie est consacrée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans la dernière partie.

# *Synthèse bibliographique*

## 1. Historique sur le palmier dattier

Le palmier dattier a pu exister à l'état spontané dans plusieurs régions, au moyen orient et en Afrique, en particulier en certains points du Sahara comme le Fezzan (Le Berre, 1978)

Arbre des zones semi-arides et arides, il est présent, sur le pourtour méditerranéen, de la Mauritanie à l'Arabie, et au-delà, en Iran, jusqu'à l'Indus, il a été domestiqué avant plus 5000 années. A l'origine de l'ère Mésopotamie (Munier, 1981). Deux hypothèses ont été proposées sur son l'origine, l'une considère que le palmier descende d'une ou de divers espèces de genre *Phoenix* cultivés localement dans leur milieu naturelle. L'autre qui la considère comme un hybride issu de plusieurs espèces non classé de genre *Phoenix* (Bennaceur et al., 1991).

## 2. Généralités sur le palmier dattier

Le palmier dattier : *Phoenix dactylifera* L., provient du mot (*Phoenix*) qui signifie dattier chez les phéniciens, et dactylifera dérive du terme grec (*dactulos*) signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit (Djerbi, 1994).

Le dattier c'est une espèce dioïque, monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbres à palmes et produit des dattes (Gilles, 2000;).

Il s'agit d'une herbe géante qui s'élève à plus de 20 mètres de haut : un stipe élancé, plutôt qu'un vrai tronc, sans cerne de croissance, terminé par un unique bourgeon d'où émerge un panache de longues feuilles pennées de 5 à 6 mètres de long. Ses fruits les dattes, se présentent en énormes grappes, les régimes, formés de très nombreuses branchettes (Brac de la Perrière, 1995). L'entretien seul assure son allure au dattier. L'intervention de l'homme s'avère indispensable à toutes les étapes de sa croissance (Benchelah et Maka, 2006).

### 2.1. La classification botanique

La place du palmier dattier dans le règne végétal est rappelée ci-dessous (Gilles, 2000) :

Groupe : Spadiciflores

Ordre : Palmale

Famille : Palmacées

Sous famille : Coryphoïdées

Tribu : Phoenicées

Genre : *Phoenix*

Espèce : *Dactylifera* L.

Le genre *Phoenix* comporte au moins douze espèces, la plus connue est le *dactylifera*, dont les fruits " dattes " font l'objet d'un commerce international important (Espiard, 2002).

### 2.2. Ecologie

Les palmiers sont à l'origine, des arbres des régions tropicales humides, mais au cours des âges, ils se sont adaptés aux climats chauds, semi-arides ou arides. Ces arbres peuvent s'adapter à de nombreuses conditions grâce à leur grande variabilité ( Gilles, 2000 ).

En Afrique subsaharienne, cette famille est largement représentée, au Sahara, on n'en rencontre que deux espèces, d'une importance économique majeure, *Hyphaene thébaïca*, le palmier doum, *Phoenix dactylifera*, le palmier dattier ( Benchelah et Maka, 2006 ).

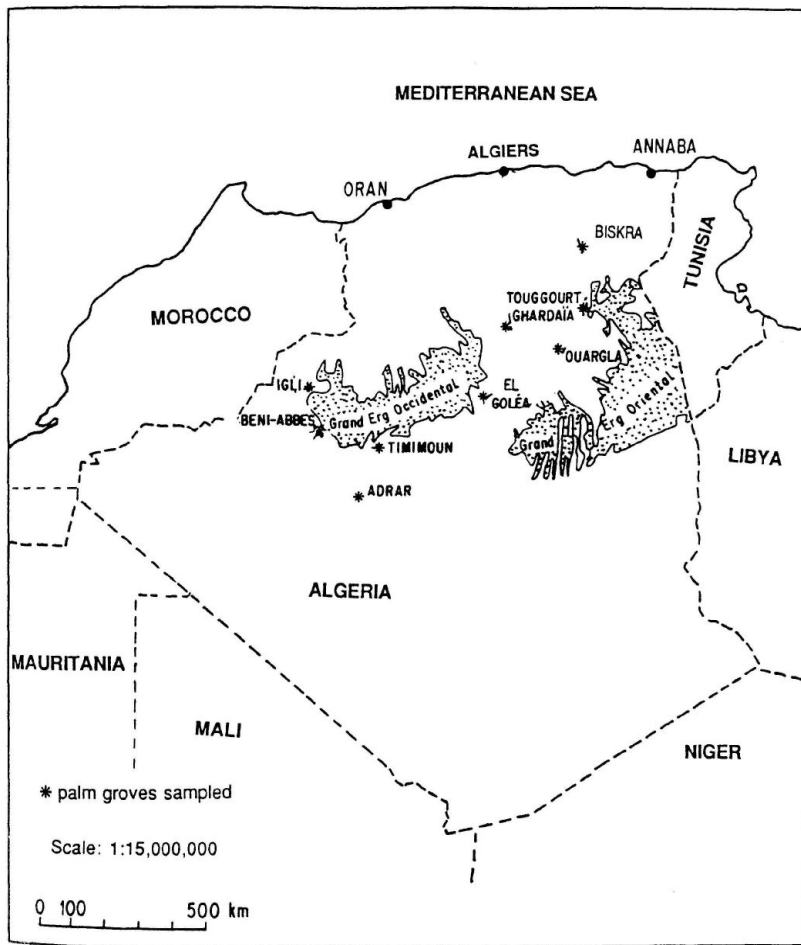
### 2.3 Production mondiale des dattes

Selon FAO (2004), la production des fruits de dattes dans le monde est estimée à 6.7 million de tonnes. L'Algérie et la Tunisie sont les premiers exporteurs de Deglet Nour en France et en Europe (Guizani et al., 2010). En 2004, la Tunisie a produit près de 110 000 tonnes de dattes ( Guizani et al., 2010). En Algérie, la production annuelle de dattes est en moyenne de 200.000 tonnes (Le Berre, 1978).

### 2.4 La répartition de deglet nour en algerie

En Algérie, la région de Béchar, le Touat, le Tidikelt et le Mزاب ont de belles palmeraies, mais le pays des dattes se situe entre Ouargla, Oued Rhir et Souf et se poursuit dans le Djerid et Nefzaoua en Tunisie (Le Berre, 1978)

Comme c'est indiqué dans la Figure (1) le palmier dattier Deglet Nour est réparti dans les quatre régions d'Algérie suivantes : Saoura (Igli et Beni Abbes), Touat (Adrar et Timimoun), centre (Chardaia et El Golea), et Rhir-Zibans (Biskra, (Ferfar), Touggoun (Touggourt, El Arfiane et Sidi Mahdi) et Ouargla).

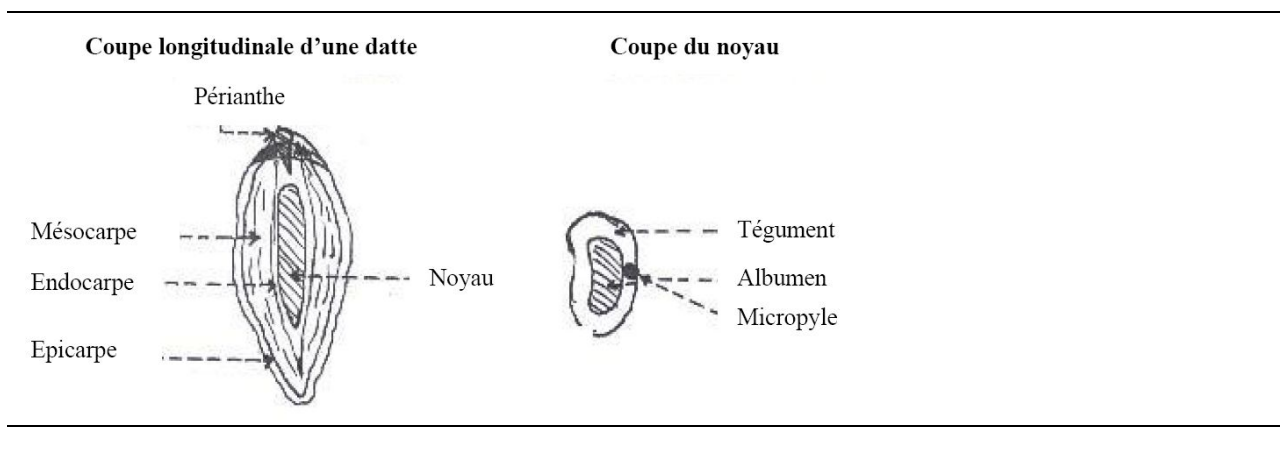


### 3. La datte

#### 3.1. Définition

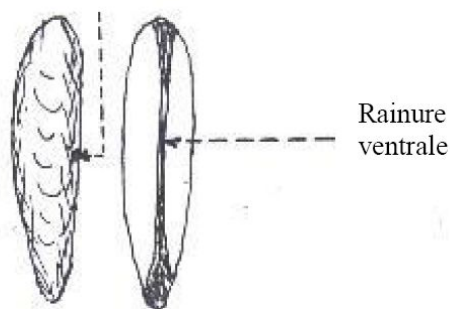
La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair Figure (2). La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée d'un :

- *péricarpe* ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau ;
- *mésocarpe* généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue ;
- *endocarpe* de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau Figure (2) (Espiard, 2002 )



**Noyau de profil et de dos**

Micropyle



### **3.2 Les produits des dattes**

Les dattes sont utilisées pour la production de confiture, du jus et des sirops (Al-hooti et *al.* 1996). Les sous-produits des dattes ont été utilisés comme substrat de fermentation pour la production de biomasse (Al obaidi et Berry 1982; Nacib et *al.*, 1999), ou la production de divers métabolites tels que l'acide citrique, l'oxytétracycline ou l'éthanol (Abou Zied et *al.*, 1991; Abou Zied et Baghlef, 1983; Abou Zied et Khoja, 1993; Al obaidi et Berry 1982).

### **3.3 Formation et maturation de la datte**

Les fleurs fécondées, à la nouaison, donnent un fruit qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte (Gilles, 2000). La datte passe par différents stades d'évolution (Sawaya *et al.*, 1983; Benchabane et *al.*, 1996; Al-Shahib et Marshall, 2003).

Le Tableau (1) présente les stades d'évolution de la datte et les appellations utilisées en Afrique du Nord et en Irak.

**Tableau .1** : Stades de développement des dattes (Djerbi, 1994).

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

De nombreux auteurs ont adapté la terminologie utilisée en Irak. Les différents stades peuvent être définis comme suit ( Djerbi, 1994) :

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes(noui, 2007). Les principales variétés cultivées sont :

La Deglet-Nour est une variété commerciale par excellence. A maturité la datte est d'une couleur brune ambrée avec un épicarpe lisse légèrement plissé et brillant, le mésocarpe présente une texture fine légèrement fibreuse (Noui, 2007).

Les variétés communes sont de moindre importance économique par rapport à Deglet-Nour. Les variétés les plus répandues sont : Ghars, Degla-Beïda et Mech-Degla. Selon Le Berre (1978 ), Une grande proportion des variétés communes est de consistance molle.

### **3.4. Classification des dattes selon consistance**

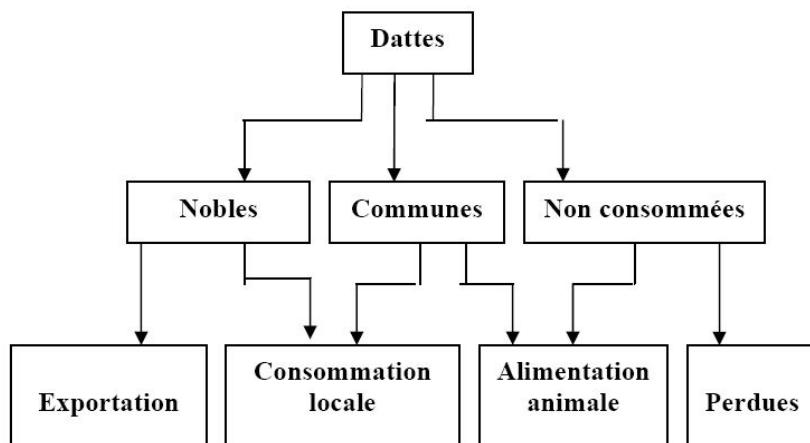
D'après Espiard (2002) , la consistance de la datte est variable. Selon cette caractéristique, les dattes sont réparties en trois catégories :

1-Dattes molles : Ahmar (Mauritanie), Kashram et Miskani (Egypte, Arabie-Saoudite).

2-Dattes demi-molles : Deglet-Nour (Tunisie, Algérie), Mehjoul (Mauritanie), Sifri et Zahidi (Arabie-Saoudite).

3-Dattes sèches de consistance dure : Degla-Beïda et Mech-Degla (Tunisie et Algérie), Amersi (Mauritanie).

D'autre classification est mette en evidence comme la classification selon la qualité (Figure 3).



### 3.5. Composition biochimique de la datte

Les dattes (*Phoenix dactylifera* L.) constituent spécifiquement un important aliment dans les régions arides et semi-arides du monde, elles contiennent des carbohydrates de 44 à 88%, principalement du fructose, du glucose et du saccharose ; des lipides de 0.2 à 0.5% ; des protéines de 2.3 à 5.6% ; des fibres diététiques de 6.4 à 11.5% ; des éléments minérales (le pourcentage de chaque minérale dans les dattes sèches varie de 0.1 à 916 mg/100g de datte), et des vitamines (comme vitamine C, B1, B2, A, riboflavine et niacine) (Al-Hooti et al., 1995; Al-Shahib et Marshal, 2002; Sawaya et al., 1982).

Le taux en eau des dattes est variable, et peut atteindre au maximum 25% ( Belarbi et al.; 2000 ). En plus de sa valeur nutritionnelle, les dattes sont riches en composés phénolique qui possèdent une activité antioxydante ( Mansouri et al, 2005 ; Vayalil, 2002 ; Al-Farsi et al, 2005 ; Vinson et al, 2005).

Les dattes sont aussi une bonne source des macroéléments comme le phosphore, le fer, potassium et d'une quantité importante en calcium ( Gamil-Abdel-Hafez et *al.*, 1980; Anwar-Shinwari, 1987 ).

### **3.6. Les enzymes des dattes**

L'activité des quatre enzymes citées ci-dessous présente un intérêt particulier pour la qualité final du produit ( Barreveld , 1993) :

- *Invertase* : responsable de la conversion du saccharose en sucre invertis (glucose et fructose) elle influe sur la texture du fruit ;
- *Polygalacturonase* et pectinesterase : convertissent les substances pectiques insolubles en pectique plus solubles attribuant au fruit la texture molle ;
- *Cellulase* : décompose /hydrolyse la cellulose en substances plus simple, ce qui augmente la solubilité et conduit éventuellement à la formation du glucose, ainsi le taux de fibre diminue ;
- *Polyphénol oxydase* : est responsable des transformations biochimiques des polyphénols dont l'exemple: les tannins. Cette enzyme joue un rôle très important dans les réactions de brunissement non enzymatique des dattes ( Sachde et *al.*, 1989a,b ; Hasegawa et Maier, 1980).

## **4. La polyphénol oxydase**

### **4.1. Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase**

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes ( Whitaker, 1995 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Vámos-Vigyáz ó, 1981).

La polyphénol était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique). Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Robb, 1984 ; Escribano et *al.*, 1989). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte et purifiée il y a bien longtemps ( Keilin et Mann, 1938 ; Schoenbein, 1856 ), c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger ( Jolivet et *al.*, 1998).

### **4.2. Définition, classification et nomenclature de la polyphenol oxydase**

#### **4.2.1. Définition**

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La polyphénol oxydase est peut-être la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail ( Dawson et Magee , 1955 ; Rescigno et *al.*, 2002).

#### **4.2.2. Classification**

L'enzyme PPO est une oxygénase oxydoréductase ( Papa et *al.*, 1994). La classification et la spécificité de cette enzyme demeure confuse et sont quelque peu ambiguës ( Burton , 1994 ; Eicken et *al.*, 1999).

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a mis à jour la nomenclature et a placé la polyphénol oxydase dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monoxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase (cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase) et EC 1.10.3.2 *o*-diphénol : O<sub>2</sub> oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme ( Mayer, 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la PPO (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase ; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire: l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des *o*-diphénols aux *o*-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) ( Cho et Ahn, 1999 ).

### **4.3. Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPOs**

#### **4.3.1. Caractéristiques réactionnelles**

##### ***Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)***

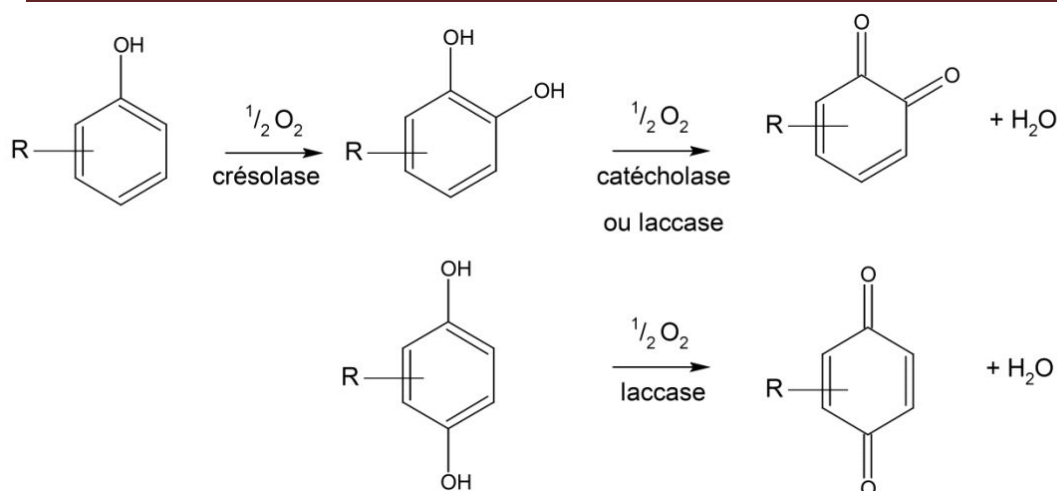
Les monophénoloxydases ou monoxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est appelée. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat ( Varoquaux , 1978).

##### ***Activité *o*-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)***

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase ( Burton, 1994 ; Thomas, P and Janave, 1986 ).

Un résumé des deux activités de la PPO est présenté dans la Figure (4).

**Figure 4 :** Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases (Claus et Decker, 2006)



).

### 4.3.2 Caractéristiques structurales

#### 4.3.2.1 Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la PPO n'a pas été élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006 ; Siegbahn, 2003). En effet Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables.

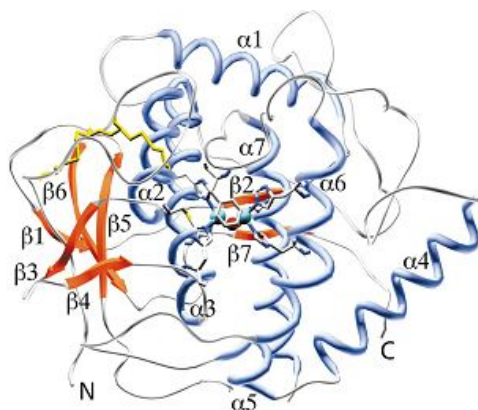
Himmelwright et al. (1980) et Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO comme une sphère hydrophile délimitée par 4 hélices  $\alpha$  contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile est située dans une poche hydrophobe formée par des résidus aromatiques.) . Seule, la structure cristalline de la PPO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active a été résolue (Klabunde et al., 1998).

#### 4.3.2.2 Le site actif

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

La structure secondaire de la PPO est principalement  $\alpha$ -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices  $\alpha$  ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  et  $\alpha 7$ ) (Figure 5) (Jolivet et al., 1998 ; Ros et al., 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken et al., 1999 ; Haghbeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices,  $\alpha 1$  et  $\alpha 4$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aide à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50) à l'hélice  $\alpha 2$ . La paire du cuivre (CuA et CuB) du site actif est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre

hélices  $\alpha$ . Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice  $\alpha_2$ , tan disque l'His 109 et His 118 sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha_3$ . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines sont localisés au milieu d'hélices  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$  (Klabunde et al., 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB) est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Van Gelder et al., 1997).



**Figure 5:** Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et al., 1999).

#### 4.5. Source, localisation et rôle des PPOs

##### 4.5.1. Source et localisation

Les PPOs sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (Burton, 1994 ; Whitaker, 1995 ; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006). La localisation subcellulaire de la PPO n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski et al., 1991 ; Mayer et Harel, 1979). Les meilleures préparations des PPOs sont issues à partir de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (Solomon et al., 2001). La localisation intracellulaire de la PPO d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (Jolivet et al., 1998). Bonner (1955) a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. van Gelder et al. 1997 ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol.

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble. Elle dépend de l'espèce, de l'âge, et -dans les fruits ou les légumes- de la maturité (Vámos-Vigyázó, 1981).

##### 4.5.2. Rôle

Depuis la découverte en 1895, la PPO reste une énigme physiologique ( Vaughn, et Duke , 1984). Cependant, plusieurs hypothèses ont été proposées au sujet de sa fonction ( Thygesen et *al.*, 1995 ; Steffens et *al.*, 1998). Selon Walker et Ferrar (1995), la localisation spécifique de ses formes actives 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 PPOs jouent 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 ( Vaughn et *al.*, 1988 ; Mayer et Harel, 1991 ; Walker et Ferrar, 1998) et plusieurs hypothèses sont émises. Les polyphénols, ont des propriétés anti-fongiques ( Friedman , 1997).

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

La PPO est impliquée dans divers processus tels que la pigmentation des vertébrés et le brunissement des fruits et des légumes ( Fenoll et *al.*, 2004). Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. Chez les mammifères, elle est responsable de la pigmentation de peau (Whitaker , 1995).

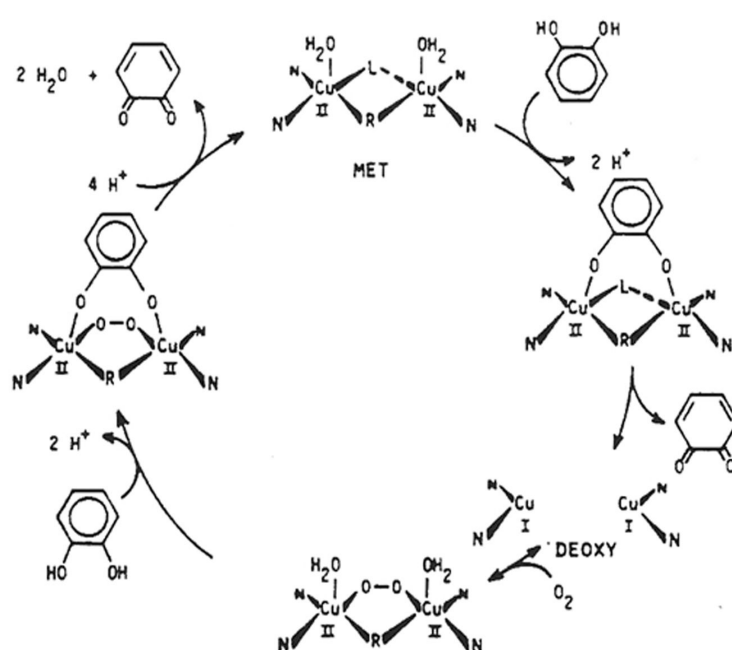
La PPO peut induire des modifications anti-nutritives des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens et *al.*, 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques ( Vámos-Vigyáz ó, 1981; Vaughn et Duke, 1984 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel, 1991). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé ( Whitaker et Lee, 1995 ).

#### **4.6. Activité catécholase de la PPO**

Le modèle du mécanisme catalytique de l'activité catécholase de la PPO est représenté dans la Figure (6) ( Siegbahn, 2003 ; Lerch, 1995).

L'activité catécholase implique l'oxydation de deux *o*-diphénols en deux quinones avec la réduction concomitante de 4e<sup>-</sup> de l'oxygène moléculaire produisant deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un *o*-diphénol à la forme met de l'enzyme qui est suivie de la réduction du faisceau bicuivrique menant à la formation du *deoxy*PPO et au dégagement d'*o*-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxy*PPO est formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant le peroxyde et en produisant l'eau et la formation d'une autre *o*-quinone (Janovitz-Klapp et al., 1989).



**Figure 6 :** Schéma mécanistique de l'activité catécholase de la PPO (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991).

#### 4.7. Les méthodes de détermination de l'activité PPO

La détermination de l'activité enzymatique de la PPO n'est pas aussi simple qu'elle peut apparaître. Un certain nombre de facteurs doivent être pris en considération pendant la détermination de l'activité enzymatique afin d'éviter une surestimation ou des résultats faux (Vámos-Vigyázó, 1981).

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

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurée par l'absorption de l'oxygène dissout, par la technique de Warburg ou par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991 ; Gauillard *et al.*, 1993 ; Naish-Byfield et Riley, 1992).

La vitesse de formation de produit peut être déterminée par méthode spectrophotométrique en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981).

### 4.8. Les substrats de la PPO

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

Le substrat phénolique le plus simple de la PPO est le catéchol puisqu'il possède la structure de base des *o*-dihydroxyphénol, mais ceci ne signifie plus qu'il s'agit d'un meilleur substrat pour l'enzyme. Toute substitution sur le cycle aromatique (position et la nature du substituant) affecte la vitesse de la réaction enzymatique (Whitaker, 1995).

### 5. Effet du pH et de température sur l'activité PPO

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO varie avec la source de l'enzyme et en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur : (1) le type de tampon ; (2) la pureté de la préparation enzymatique et (3) le stade de maturité du fruit ou du végétal (Kuby, 1991).

### 6. Les effecteurs de la PPO

#### 6.1. Les activateurs

La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), les acides gras, les alcools, le choc acide et les protéases (Seo *et al.*, 2003 ; Espín *et al.*, 2002 ; Gandía-Herrero *et al.*, 2005)

#### 6.2. Les inhibiteurs naturels

Un certain nombre d'inhibiteurs des sources naturelles et synthétiques de la tyrosinase ont été identifiés. Beaucoup d'auteurs utilisent la terminologie "inhibiteur de la tyrosinase" pour faire allusion aux inhibiteurs de la mélanogénèse, dont l'action réside principalement dans la formation de mélanine, indépendamment d'une interaction directe de l'inhibiteur avec l'enzyme.

Les résultats expérimentaux de l'inhibition de l'activité tyrosinase peuvent être expliqués par l'un des mécanismes suivants :

1) Les agents réducteurs provoquant la réduction de l'o-dopaquinone comme l'acide ascorbique sont utilisés comme des inhibiteurs de la mélanogénèse pour leur capacité de convertir l'o-dopaquinone en dopamine, et d'empêcher ainsi la formation de la dopachrome et de la mélanine.

2) Les piègeurs de l'o-dopaquinone comme les composés contenant une fonction thiol, bien connus comme inhibiteurs de la mélanogénèse et réagissent avec la dopaquinone pour former des produits incolores. Pour cette raison le processus de la mélanogénèse est ralenti jusqu'à la consommation totale des piègeurs, et il reprend sa vitesse initiale.

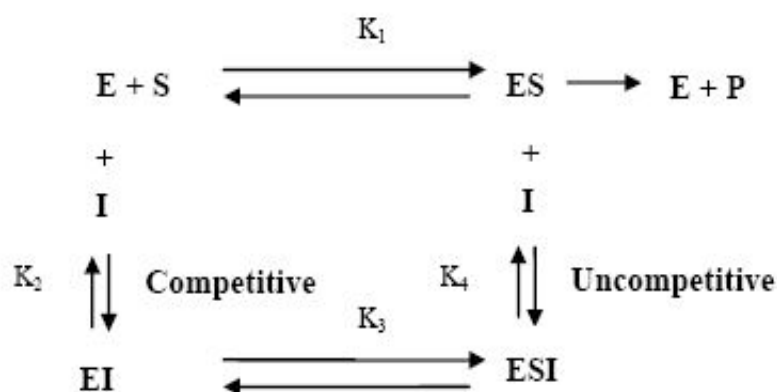
3) Lorsque des composés phénoliques présentent une forte affinité pour l'enzyme, la formation de la dopachrome est empêchée, et ils pourraient être classifiés d'une manière erronée comme des inhibiteurs.

4) Les inactivateurs non spécifiques des enzymes tels que les acides ou les bases, dénaturent non-spécifiquement l'enzyme, et empêchant de ce fait son activité.

5) Les composés qui peuvent être catalysés par la tyrosinase forment parfois des liaisons covalentes avec les acides aminés du site actif, et inactivent irréversiblement l'enzyme pendant le cycle catalytique selon le mécanisme dit "substrat suicide".

6) Les inhibiteurs spécifiques de la tyrosinase se fixent réversiblement avec l'enzyme, et diminuant ainsi son activité catalytique.

Parmi les six types de composés décrits ci-dessus, seulement les inactivateurs spécifiques de la tyrosinase (5) et les inhibiteurs spécifiques (6) sont considérés comme "des vrais inhibiteurs" qui se lie réellement à l'enzyme et empêchent son activité.



Habituellement, les "vrais inhibiteurs" sont classés en quatre types, comprenant les inhibiteurs compétitifs, les inhibiteurs incompétitif, les inhibiteurs de type mixte (compétitif/incompétitif) et les inhibiteurs noncompétitifs (Figure 7).

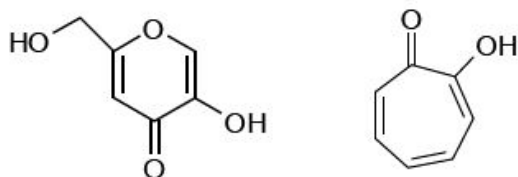
Un inhibiteur compétitif est une substance qui se lie avec l'enzyme libre d'une façon à empêcher la fixation du substrat. L'inhibiteur compétitif peut être un chélateur de cuivre, un analogue non métabolisable, ou un dérivé du même substrat. Par contre, un inhibiteur incompétitif se fixe seulement sur le complexe enzyme-substrat. Un inhibiteur de type mixte se fixe non seulement sur l'enzyme libre mais sur le complexe enzyme-substrat.

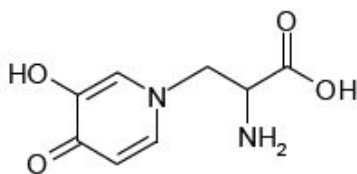
Pour la plus part des inhibiteurs mixtes, leurs constantes d'équilibre de fixation pour l'enzyme libre et le complexe enzyme-substrat sont différentes. Cependant, un cas exceptionnel des inhibiteurs mixtes sont les inhibiteurs non compétitifs, qui se fixent sur l'enzyme libre et le complexe enzyme-substrat avec les mêmes constantes d'équilibre.

En plus du mécanisme d'inhibition, le pouvoir inhibiteur est un critère essentiel d'un inhibiteur. Le pouvoir d'un inhibiteur est habituellement exprimé par la valeur  $IC_{50}$ , qui est la concentration d'un inhibiteur requise pour diminuer l'activité enzymatique par moitié (Chang, 2009).

L'acide kojique est l'inhibiteur de la tyrosinase le plus largement étudié. C'est un métabolite d'origine fongique couramment utilisé comme un agent de blanchiment de la peau et comme un additif alimentaire pour la prévention du brunissement enzymatique (Chen et wei, 1991)

La tropolone et la L-mimosine sont considérées aussi comme des inhibiteurs puissants de l'activité tyrosinase (Espin et Wichers, 1999 ; Cabanes et *al.*, 1987) (Figure 8).





**Figure 8:** Structure chimique de l'acide kojique, la tropolone et la L-mimosine  
(Chang, 2009).

En plus de ces inhibiteurs, un nombre élevé de nouveaux inhibiteurs, particulièrement ceux découverts durant les cinq dernières années, parmi lesquels les polyphénols, les dérivés du benzaldéhyde et de benzoate, et d'autres inhibiteurs naturels et synthétiques.

### **6.2.1 Les polyphénols**

Les polyphénols représentent divers groupes de composés contenant des fonctions phénoliques multiples et sont largement distribués dans la nature. Les polyphénols sont aussi un large groupe d'inhibiteur de la tyrosinase jusqu'à présent.

Plusieurs polyphénols sont considérés comme des substrats de la tyrosinase. La présence et la position d'un substituant supplémentaire au niveau de leurs structure peuvent les rendre comme étant des inhibiteurs de l'enzyme.

#### **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont parmi les polyphénols les plus nombreux et les mieux étudiés. Ce sont composés des noyaux pyrène et benzo- $\gamma$ -pyrone largement distribués dans les feuilles, l'écorce, et les feuilles des plantes. Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés jusqu'à présent. Ces composés protègent les plantes contre le rayonnement UV, les agents pathogènes, et les herbivores (Harborne et williams, 2000). Ce sont également responsables des couleurs rouge et bleu caractéristiques des baies, des vins, et de certains légumes. Les flavonoïdes peuvent subdivisés en sept principaux groupes, comprenant les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavonoïdes, les chalcones, et les catéchines.

Différentes classe de flavonoïdes sont distinguées par les noyaux d'oxygène hétérocyclique, les différentes positions du noyau B, et par les groupements hydroxyle, méthyle, isoprenoïdes, et méthoxy distribués dans les différents motifs du noyau.

La structure des flavonoïdes est également en principe compatible avec les rôles du substrat et des inhibiteurs de la tyrosinase. Des études détaillées ont montré que quelques flavonoïdes sont ont en faite des inhibiteurs plus efficaces. En plus des flavonoïdes, d'autres polyphénols, qui ont été également identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase, contiennent des stilbénes et des dérivés de coumarine.

### **Les flavonols**

Plusieurs flavonols ont été isolés à partir des plantes, et certains ont été identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase. Le mode d'inhibition des inhibiteurs de flavonol est habituellement une inhibition compétitive pour l'oxydation de la L-dopamine par la tyrosinase et la partie 3-hydroxy-4-keto de la structure du flavonol a un role clé dans la chélation du cuivre (Kubo et Kinst-Hori, 1999 ;Kubo et *al.*, 2000)

En terme de pouvoir inhibiteur, les inhibiteurs flavonol decouverts sont classés comme suit : la quercétine (5, 7,3',4'-tétrahydroxyflavonol) > myricétine (5, 7,3',4',5'-pentahydroxy-flavonol) > kaempferol (5, 7,4'-trihydroxyflavonol) > galangine (5,7-dihydroxyflavonol) >> morine, buddlenoïde A, buddlenoïde B (Xie et *al.*, 2003 ; Matsuda et *al.*, 1995)

Des tous les inhibiteurs de flavonol cités ci-dessus sont des inhibiteurs très faibles; le flavonol le plus actif est la quercétine (Figure 9), a montré seulement 20% du pouvoir inhibiteur de l'acide kojique vis-à-vis de l'activité diphénolase de la tyrosinase de champignon. Par conséquent, il est évident que ces inhibiteurs de flavonol aient un faible potentiel dans les applications du blanchiment de la peau ou contre le brunissement des aliments.

### **Les flavones, flavanones, et les flavanols**

Les épluchures de citron comme sous-produit contiennent une large quantité de flavonoïdes. Certains des flavonoïdes ont été identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase, comprenant la nobilétine (5,6,7,8,3',4'-hexaméthoxyflavone), la naringine (5,7,4'-trihydroxyflavanone), et la neohesperidine (5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone). Cependant, le pouvoir inhibiteur de ces trois inhibiteurs c'est avéré moins actif vers la tyrosinase de champignon par rapport à l'acide kojique (Zhang et *al.*, 2007 ; Itoh et *al.*, 2009)

Bien qu'aucun inhibiteur puissant de la tyrosinase a été isolé à partir des agrumes jusqu'à présent, l'extrait éthanolique du citron possède un effet inhibiteur sur la mélanogénèse dans les mélanocytes.

L'activité inhibitrice sur la mélanogénèse de l'extrait brut du citron a été trouvée pour être principalement due à l'activité antioxydante de la neohesperidin du citron.

En plus des extraits de citron, les extraits de l'espèce de *Morus*, qui a été bien connue comme une plante riche en polyphénol et utilisée comme un agent thérapeutique naturel non-toxique, et possède aussi un large potentiel d'application comme agent de blanchiment de la peau due aux nombreux inhibiteurs puissants de la tyrosinase isolés à partir des différentes parties de la plante.

Mulberroside F (moracine M-6,3'-di-O- $\beta$ -glucopyranoside) purifié à partir des feuilles de la plante a montré une activité anti-diphénolase de la tyrosinase de champignon pour être 4.5-fois plus élevée que l'acide kojique et exerce un effet inhibiteur sur la formation de la mélanine dans les mélanocytes (Lee et al., 2002).

Norartocarpétine (5,7,2',4'-tétrahydroxyflavone, (Figure 9)), isolé à partir des écorces de tige des plantes, est 10.4-fois plus actif que l'acide kojique contre l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon avec un type d'inhibition compétitif ( $K_{i1} = 1.35 \mu\text{M}$ ) (Ryu et al., 2008).

Le flavone a été également démontré pour être un inhibiteur à fixation lente juste comme la tropolone et l'acide kojique. En plus des feuilles et des tiges de la plante, les racines de l'espèce *Morus* se sont également avérées pour contenir beaucoup d'inhibiteurs très puissants de la tyrosinase, tel que l'oxyrésveratrol (Shin et al., 1998), la norartocarpétine, et streppogénine (5,7,2',4'-tétrahydroxy-flavavone, (Figure 6)) (Jeong et al., 2009).

Un autre flavanol, le taxifoline (5,7,3',4'-tétrahydroxyflavanol, (Figure 9)) du germe de *Polygonum hydropiper* a une activité inhibitrice équivalente de l'acide kojique vis-à-vis de l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon (Miyazawa et Tamura, 2007)

En plus des flavonoïdes monomériques, un dimère flavone-flavanone a été isolé à partir des plantes de littorale, *Garcinia subelliptica*, et a été révélé d'être 3.6-fois plus actif que l'acide kojique contre l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon (Masuda et al., 2005).

### ***Isoflavonoïdes***

Les extraits des racines et des graines des espèces de *Glycyrrhiza* (Leguminosae) ont été longtemps considérés comme une source des agents de blanchiment de la peau dans les pays de l'est asiatique. L'activité inhibitrice de la mélanogénèse par les extraits proviennent principalement des isoflavonoïdes des plantes. Deux isoflavanes ont été purifiés à partir des racines de plante et ont été identifiées en tant qu'inhibiteurs puissants de la tyrosinase. La glabridine (Figure 6) a été initialement identifiée comme un inhibiteur d'une activité 15-fois supérieure que l'activité de l'acide kojique et possède une activité de dépigmentation élevée que l'arbutine (Yokota et al., 1998).

### ***Chalcones***

Les chalcones se composent de deux noyaux aromatiques de configuration trans, séparées par trois atomes de carbone, parmi lesquels deux sont reliées par une double liaison et le troisième est un groupement carbonyle. Certaines chalcones prénylées naturelles ont montrées une activité inhibitrice puissante de la tyrosinase.

Le licuraside, l'isoliquiritine, et le licochalcone A sont trois dérivés des chalcones (Figure 9). Ces derniers ont été isolés à partir des racines de l'espèce de *Glycyrrhiza*, présentent une inhibition compétitive de l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon. Les chalcones naturelles citées ci-dessus, il semble que la partie 4-résorcinol (groupement 2,4-dihydroxyle du noyau aromatique) dans la structure de chalcone est le substituant clé responsable de l'effet inhibiteur puissant (Chang, 2009).

### **Stilbènes**

Le stilbène est constitué d'une double liaison éthène substituée par un noyau benzyle sur les deux atomes de carbone de la double liaison. L'oxyrésveratrol (2, 4,3',5'-tétrahydroxy-trans-stilbène, (Figure 9), qui a été initialement isolé à partir de *Morus alba*, a une activité inhibitrice puissante 32-fois supérieure que l'acide kojique (Shin et al., 1998). Il agit comme un inhibiteur noncompétitif sur l'activité monophénolase et diphénolase de la tyrosinase de champignon. L'oxyrésveratrol réduit également la pigmentation des mélanocytes.

En plus d'oxyrésveratrol, trois hydroxystilbènes; la chloroporine, le gnétol, et le piceatannol, ont été également purifiés et identifiés comme des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase (Figure 6).

Récemment, le piceatannol des raisins et du vin rouge, a montré une activité anti-monophénolase 32.7-fois supérieure que l'acide kojique (Yokozawa et al., 2007).

### **Les coumarines**

Les coumarines sont des lactones d'acide du phénylpropanoïde avec un noyau H-benzopyranone. L'aloésine est le chef de file de coumarines inhibitrices de la tyrosinase (Figure 9). C'est un glucoside naturel d'hydroxycoumarine isolé à partir d'*Aloe vera*. L'aloésine a été récemment employé en cosmétique pour le traitement de la peau (Jones et al., 2002 ; Choi et al., 2002).

#### **6.2.2 Les dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate**

Un grand nombre de dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate ont été isolés à partir des plantes et identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase, comprenant l'acide benzoïque, l'aldéhyde benzoïque, l'acide anisique, l'anisaldéhyde, l'acide cinnamique, et l'acide méthoxycinnamique à partir des racines *Pulsatilla cernua* (Lee, 2002), les benzaldéhydes 4-substitués à partir du cumin (Jiménez et al., 2001), le 2-hydroxy-4-méthoxybenzaldéhyde des racines de *Mondia whitei* (Kubo et Kinst-Hori, 1999), l'acide p-coumarique des feuilles de *Panax ginseng* (Lim et al., 1999), les dérivés

d'hydroxycinnamoyl des grains du café vert (Iwai et al., 2004), et l'acide vanillique et ses dérivés à partir du son de riz noir (Miyazawa et al., 2003). Le groupement aldéhyde est connu pour réagir avec les groupements nucléophiles biologiquement importants tels que les groupements sulfhydryle, amine, et hydroxyle.

### 6.3 D'autres inhibiteurs naturels et synthétiques

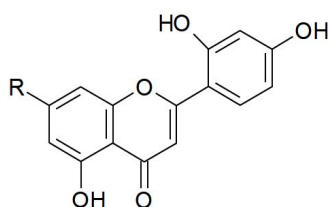
#### 6.3.1 D'autres inhibiteurs à partir des sources naturelles

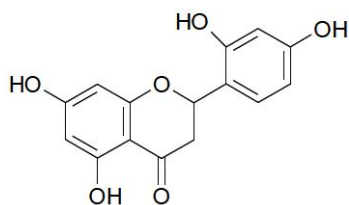
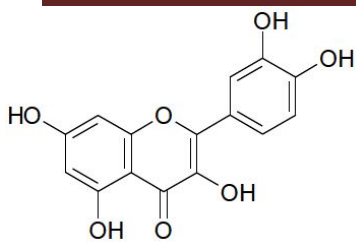
Des anthraquinones de différentes sources végétales ont été largement utilisées depuis l'antiquité pour leurs propriétés laxatives et cathartiques. En outre, cette classe de composés a montré une grande variété d'activité pharmacologique, tel que les activités anti-inflammatoire, curative des blessures, analgésique, antipyrétique, antimicrobiennes, et des activités antitumorales. Récemment, une anthraquinone, la physcione (1,8-dihydroxy-2-méthoxy-3-méthylantraquinone, (Figure 9)), s'est avérée pour montrer une activité inhibitrice de la tyrosinase similaire à l'acide kojique (Leu et al., 2008).

#### 6.3.2 D'autres inhibiteurs à partir des sources synthétiques

Pour les petites molécules, il est plus facile de leurs concevoir des modèles structuraux par des méthodes chimiques de synthèse. L'amélioration de l'activité inhibitrice d'un inhibiteur de la tyrosinase connu est possible grâce au changement approprié des groupements substitués.

N-Phénylthiourée (Figure 9) est un inhibiteur bien connu pour l'activité diphenolase de l'enzyme qui appartient au groupe des protéines à cuivre type-3. Quelques composés phényle et de diphenyle simples ont été également synthétisés et identifiés en tant qu'inhibiteurs puissants de la tyrosinase (Chang, 2009)

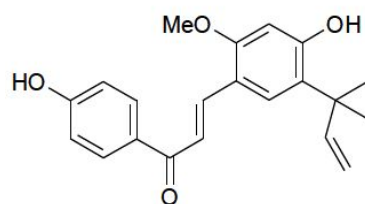
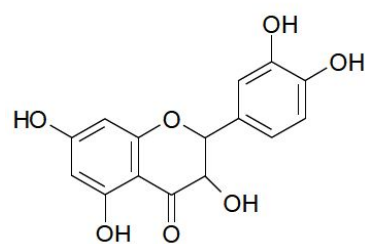
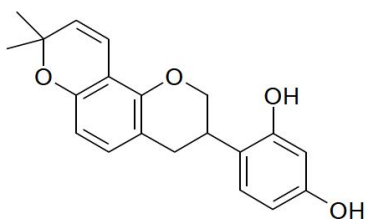




**Quercétine**

**Norartocarpétine**

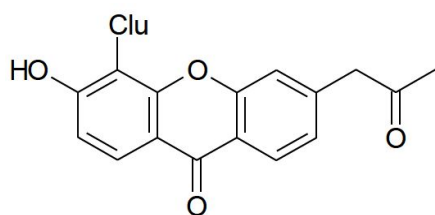
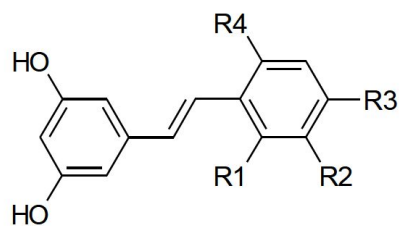
**Streppogénine**



**Taxifoline**

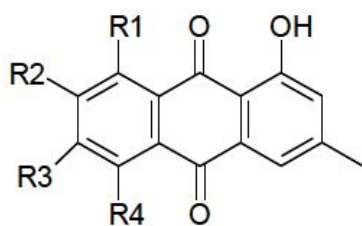
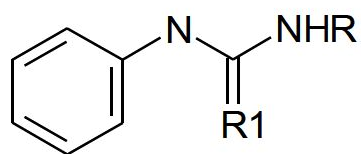
**Glabridine**

**Licochalcone A**



R1 = R3=OH, R2= R4=H : Oxyrésveratrol  
R1 = R4=OH, R2= R3=H : Gnétol  
R1 = R4=H, R2= R3=OH : Piceatannol

**Aloesine**



**Phycione**

**N-Phénylthiourée**

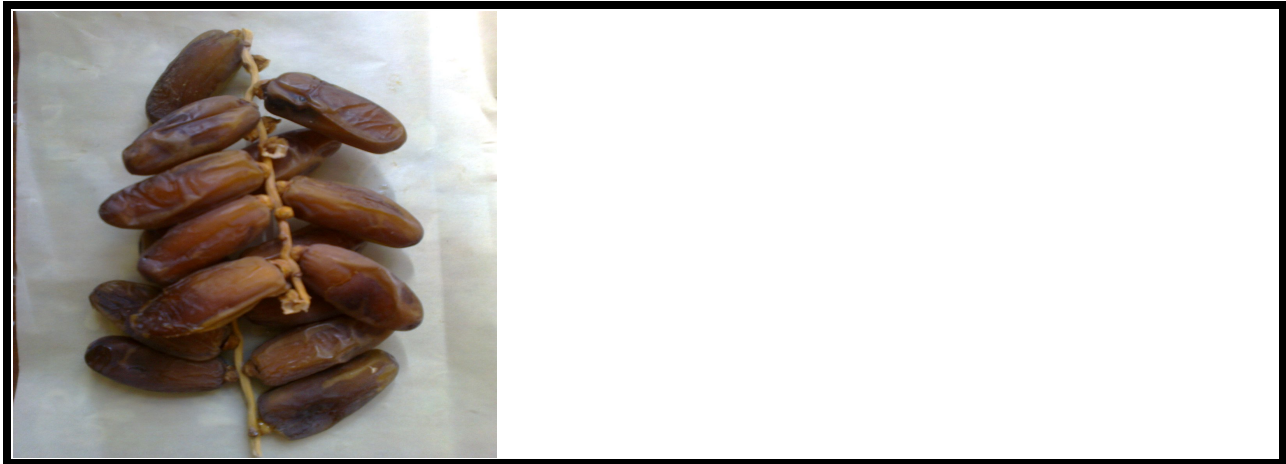
**Figure 9:** Les structures chimiques de quelques inhibiteurs naturels et synthétiques de la tyrosinase (Chang, 2009).

# *Matériel et méthodes*

## 1. Matériels

### 1.1 Matériel biologique

La dattes (Deglet-Nour) utilisée dans notre étude a été achetée à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat. Les dattes sont utilisées comme une source de la polyphénol oxydase (PPO) (Photo, 6).



**Photo 1:** Les dattes Deglet-Nour d 'Algérie (*Phoenix dactylifera* L.).

### 1.2 Produits chimiques

Le catéchol et l 'acide cafféique sont fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d 'un grade analytique.

## 2. Méthodes

### 2.1 Préparation de l 'extrait brut de la PPO

La PPO a été isolée à partir des dattes de la variété « Deglet-Nour » selon le protocole d'extraction publié par Hasegawa et Maier (1980).

Les dattes sont lavées avec l 'eau distillée et séchées à l 'air libre est dénoyauter. 150 g de chair de dattes préalablement refroidie à -10°C sont découpés et homogénéisés pendant 2 min à l 'aide d'un

mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E) dans 250 ml d'une solution d'extraction composée d'acétone préalablement refroidie. Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de gaze (4 compresses). Le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000 tr/min dans une centrifugeuse (Sigma Fischer Bioblock Scientific). Le surnageant récupéré de couleur jaunâtre, représente l'extrait brut de la PPO qui est divisé dans des tubes Eppendroph de 2 ml qui seront conservés à -10°C (Figure 10). ajout du poly(vinyl)polypyrrolidone (PVPP) dans la solution d'extraction de l'enzyme pour plus clarifier l'extrait enzymatique.



**Photo 2 :** Un tube Eppendrof de 2mL contenant l'extrait enzymatique brut d'une couleur jaune.

### **2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry**

Afin de pouvoir établir le tableau de purification et de déterminer le taux et le rendement de purification au cours des étapes d'extraction et de purification des activités enzymatiques, la quantité de protéines contenue dans chaque extrait enzymatique est dosée selon la méthode de Lowry et *al.* (1951). Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire, à partir d'une gamme étalon contenant de l'albumine sérique bovine.

#### **2.2.1 Principe de la méthode**

Le groupe phénolique des résidus tyrosine d'une protéine, produit une couleur bleu- pourpre, avec un maximum d'absorption dans la région de longueur d'onde 660 nm avec le réactif de Folin-Ciocalteu (à base de tungstate de sodium, molybdate et phosphate). La méthode est sensible à moins de 10 µg/ml et elle est certainement la méthode de dosage des protéines la plus répandue, bien qu'elle soit seulement relative. Le principe de cette méthode, est la production d'ions cuivreux qui réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu (Wilson et Walker, 1996).

L'addition au réactif d'une certaine quantité de cuivre (méthode de Lowry), augmente considérablement la sensibilité de la méthode (100 fois plus sensible que la réaction de Biuret). Cette

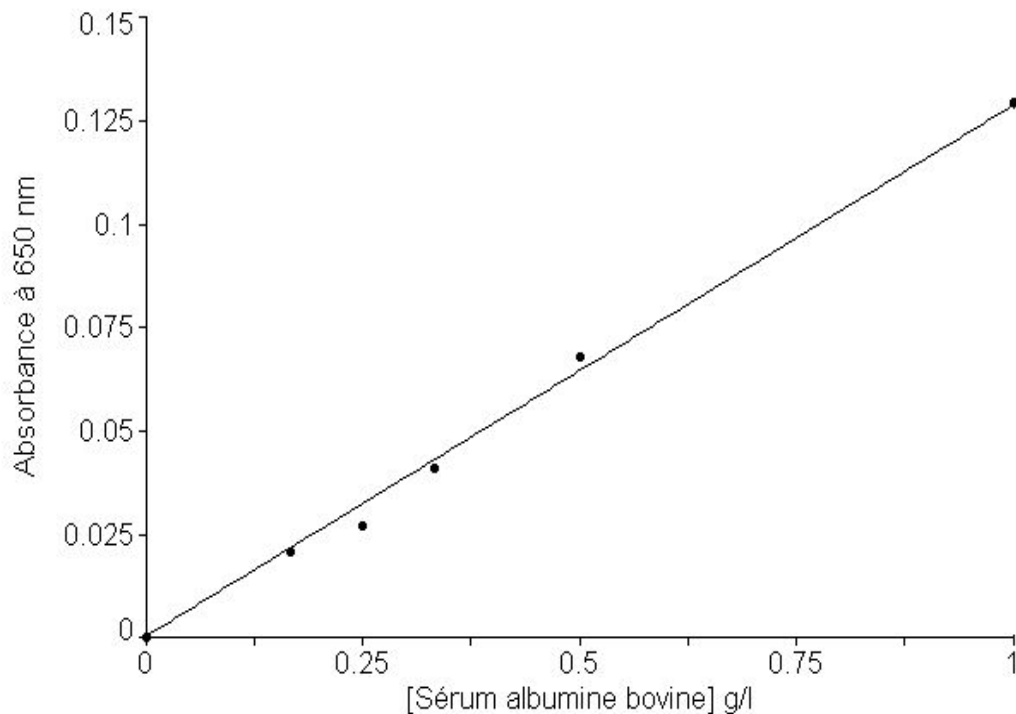
méthode, ne présente d'intérêt que pour un travail semi-quantitatif appliqué à des protéines en solution diluée (Métais., 1979).

### **2.2.2 Mode opératoire**

Au temps ( $t_{p_0}$ ), dans des tubes à essais on ajoute 20  $\mu$ l d'échantillon à doser, dilué 6 fois dans de l'eau distillée à 0.5 ml de réactif (A) (Annexe 1).

On mélange les tubes au vortex et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante.

Au temps ( $t_{p_0}+10$  min), on ajoute 2 ml de réactif (B) (Annexe 1) dans chaque tube. Les tubes sont placés au bain-marie réglé à 50°C pendant 5 minutes puis refroidis rapidement sous l'eau froide. La lecture de la densité optique est effectuée à 650 nm contre un blanc réactif. Une courbe d'étalonnage, établie à partir de diverses dilutions d'une solution mère d'albumine sérique bovine à 1 g/l, permet de déterminer la concentration en protéines Figure (11).



## 2.3 Mesure de l'activité de PPO

### 2.3.1 Mesure de l'activité catécholase

L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de la datte Deglet nour est mesurée à 410 nm en utilisant le catéchol comme substrat par la mesure directe de la formation des *o*-quinones à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS  $\gamma$ ) en présence oxygène/aire (Fan et Flurkey, 2004; Espín et al., 1995). Le catéchol à 0.4 M est préparée dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (Fan et Flurkey, 2004).

Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 30  $\mu$ l d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant deux minutes après l'ajout de l'extrait enzymatique.

La vitesse initiale ( $v_0$ ) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps Figure (12) (Ünal, 2007).

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

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

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

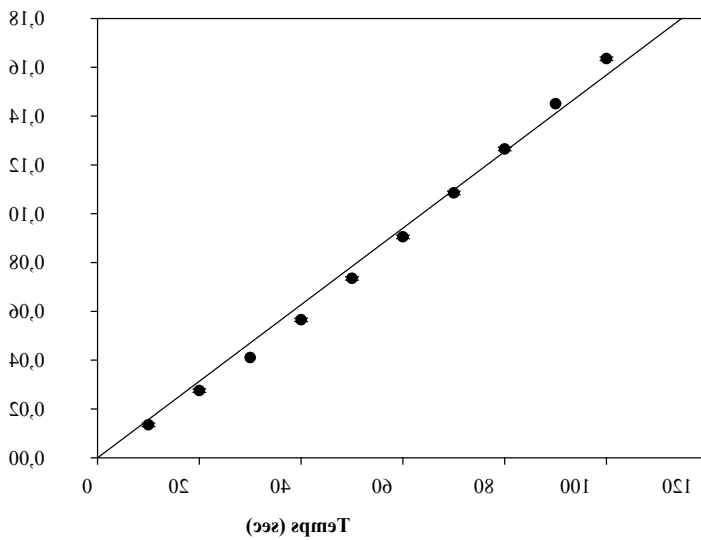
Avec :

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

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

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

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



**Figure 11:** Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la PPO (catéchol à 80 mM, volume de l'extrait enzymatique 20  $\mu$ l (extrait brut), tampon acétate de sodium 0.1 M-pH 5.6, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1 ml).

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

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

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

#### **2.4 Effet du pH**

L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de datte Deglet nour est mesurée à 30°C dans les intervalles de pH 3.6-8. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.6-5.6) et le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 5.8-8). Le catéchol à 40 mM est utilisé comme substrat. Les activités enzymatiques mesurées aux pH supérieurs à 7 ont été corrigées à cause de l'autoxydation du catéchol en *o*-benzoquinone en milieu alcalin (Palmer, 1963).

#### **2.5 Effet de la température**

L'activité résiduelle de la PPO ( $A_t$ ) a été évaluée après incubation des tubes à hémolyse de 1 mm d'épaisseur, contenant 1 ml d'extrait enzymatique brut pendant 10 minutes dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 et 90°C.

Après chauffage, les échantillons sont refroidis rapidement dans l'eau glacée et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 80 mM de catéchol comme substrat.

Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement ( $A_o$ ) (Doğan et al., 2005) selon l'équation suivante :

---

$$\text{Activité enzymatique relative (\%)} = \left( \frac{A_t}{A_o} \right) \times 100$$

---

$$\text{Activité enzymatique relative (\%)} = \left( \frac{A_t}{A_o} \right) \times 100$$

---

Où

$A_o$  : est l'activité enzymatique initiale ;

$A_t$  : est l'activité enzymatique résiduelle à l'instant  $t$ .

Toutes les expériences ont été réalisées deux fois.

#### **2.6 Effet de la concentration de l'enzyme**

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse d'oxydation du catéchol (80 mM) a été étudié par la mesure de la vitesse initiale pour des volumes croissants de l'extrait brut de la PPO

compris entre 5 et 70  $\mu$ l. L'activité catécholase a été mesurée à pH 5,6 (tampon acétate de sodium 0,05M). Toutes les expériences ont été réalisées deux fois et les valeurs moyennes ont été présentées.

### 2.7 Détermination des paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ )

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

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

### 2.8 Etude cinétique de l'effet de l'acide caféique sur l'activité catécholase

#### 2.8.1 Détermination de l'IC<sub>50</sub>

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur (l'acide salicylique) qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de 50% (IC<sub>50</sub>), l'activité de la PPO a été mesurée à 30°C en absence et présence de différentes concentrations de l'acide caféique comprise entre 2.5 et 15 mM, ceci pour une concentration constante du substrat (catéchol à 80 mM).

La valeur d'IC<sub>50</sub> a été déterminée à partir de la représentation du pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Chen et al., 1998).

Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'enzyme en absence d'inhibiteur ( $A_0$ ) (Dogan et al., 2005) selon l'équation suivante :

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

Avec :

$A_0$  : est l'activité diphénolase en absence d'inhibiteur;

$A_I$  : est l'activité diphénolase en présence d'inhibiteur.

Toutes les expériences ont été réalisées deux fois.

#### 2.8.2 Détermination du mécanisme cinétique d'inhibition

Pour déterminer le mécanisme de la cinétique d'inhibition de l'activité catécholase de la PPO des dattes, l'activité enzymatique est mesurée en présence de l'acide caféique à deux concentrations constantes (5 et 10 mM) et à différentes concentration de catéchol comprises entre 40 à 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).

Le constante d'inhibition ( $K_i$ ) a été calculées à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur, comme c'est décrit précédemment (Chen et *al.*, 1998).  $K_i$  représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI). La constante d'inhibition  $K_i$ , est une mesure quantitative du pouvoir inhibiteur des inhibiteurs réversibles.

### **2.9 Analyse des résultats expérimentaux**

L'analyse des données cinétiques observées a été effectué par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants: Excel® (Microsoft Excel 97-2003) et SigmaPlot 2011 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0).

## *Résultats et discussion*

## **1. Détermination des conditions optimales de la mesure de l'activité catécholase**

### **1.1 Extraction de la PPO de Deglet Nour ( *Phoenix dactylifera* L.)**

Le procédé d'extraction de la PPO à partir des dattes décrit par Benchrair et Benchrair (2010) est simple à mettre en œuvre, rapide et a permis d'obtenir un extrait brut de couleur jaunâtre d'une activité PPO élevée. L'ajout du poly(vinyl)polypyrrolidone (PVPP) dans la solution d'extraction de l'enzyme a pour but de clarifier l'extrait enzymatique et de stabiliser sa couleur en éliminant les substrats phénoliques endogènes qui peuvent être oxydés par l'enzyme en o-quinones provoquant ainsi l'inactivation de la PPO (Fang et al., 2007).

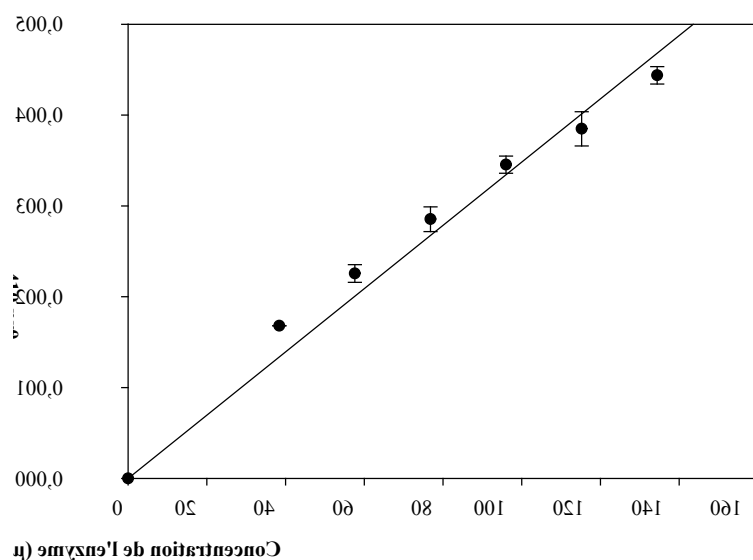
Les activités volumique et spécifique ainsi calculées sont respectivement,  $18.6 \pm 1.1$  UI/ml et  $6.7 \pm 0.4$  UI/mg.

### **1.2 Effet de la concentration de l'enzyme**

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la PPO de datte « Deglet nour » dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer au préalable la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat. L'oxydation a été réalisée avec une concentration saturante en catéchol, soit 80 mM de volume réactionnel et différents volumes d'extrait enzymatique allant de 0 à 135  $\mu$ g/ml de volume réactionnel. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Benchrair et Benchrair (2010).

La Figure 13 représente l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'oxydation de catéchol par la PPO brute de datte Deglet nour en fonction de la concentration de l'enzyme.

Dans cette expérience, le volume de 30  $\mu$ l d'extrait enzymatique est convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.



**Figure 13:** Vitesse initiale d'oxydation du catéchol en fonction de la concentration de la PPO de datte Deglet nous (*Phoenix dactylifera* L.). Le milieu réactionnel (1 ml) contient 80 mM de catéchol dans 0.05 M de tampon acétate de sodium à pH 5.6.

### 1.3 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité catécholase

Les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  de la PPO des dattes ont été estimés on mesurant l'activité catécholase à pH 5.6 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C en présence de différentes concentrations de catéchol comprises entre 5 et 160 mM. Les résultats expérimentaux ont été ajustés à l'aide des équations linéaires et non-linéaire suivantes :

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

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

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

Où

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

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

$S$  est la concentration de catéchol (mM) ;

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

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

La Figure (14) montre que l'activité catécholase augmente jusqu'à 160 mM de catéchol au-delà de laquelle la vitesse initiale reste relativement constante.

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

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

La source	$K_m$ (mM)	pH	Référence bibliographique
Dattes d'Iraq :			
Barhee	3.5-8.75	6	Sachde et al. (1989)
Zahdi		7	
Céleri ( <i>Apium graveolens</i> L.)	29	7	Aydemir et Akkanli (2005)
Pomme	34		Oktay et al. (1995)
Artichaut ( <i>Cynara scolymus</i> L.)	10.7	7	Dogan et al. (2005)
Cerise ( <i>Malpighia glabra</i> L.)	5.2	7	Kumar et al. (2008)
Datte Deglet nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	26.8	5.6	Notre étude
Raisin ( <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Emir)	25.1	4.2	Ünal et Şener (2006)
Champignon de Paris ( <i>Agaricus bisporus</i> )	0.40	7	Gouzi et Benmansour (2007)

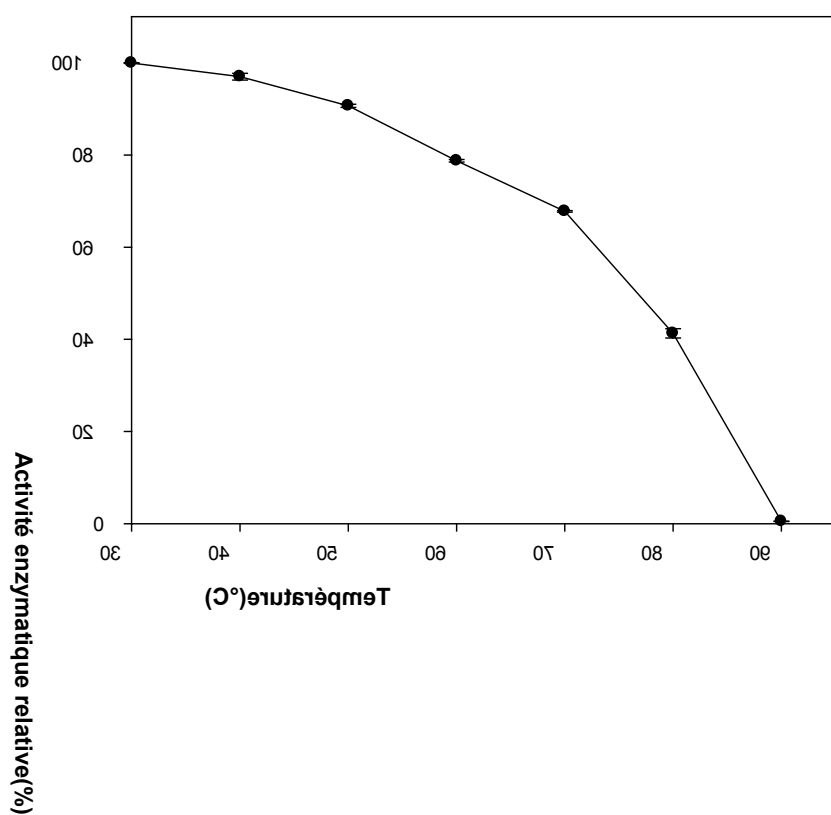
La PPO des dattes Deglet nour a une bonne affinité vis-à-vis du catéchol par rapport aux PPOs d'haricot (*Glycine max* L.) ( $K_m = 71$  mM) (Nagai et Suzuki 2003), du chou de Chine (*Brassica rapa* L.) ( $K_m = 682.5$  mM) (Nagai et al., 2001) et de la fleur de Rape (767 mM) (Sun et al., 2012).

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

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

### 1.4 Stabilité thermique

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de la PPO de datte Deglet nour, sont représentés dans la Figure (16).



**Figure 16:** Stabilité thermique de la PPO de datte (Deglet noir ; *Phoenix dactylifera* L.) après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 80 mM de catéchol dans 0.05 M de tampon acétate de sodium à pH 5.6.

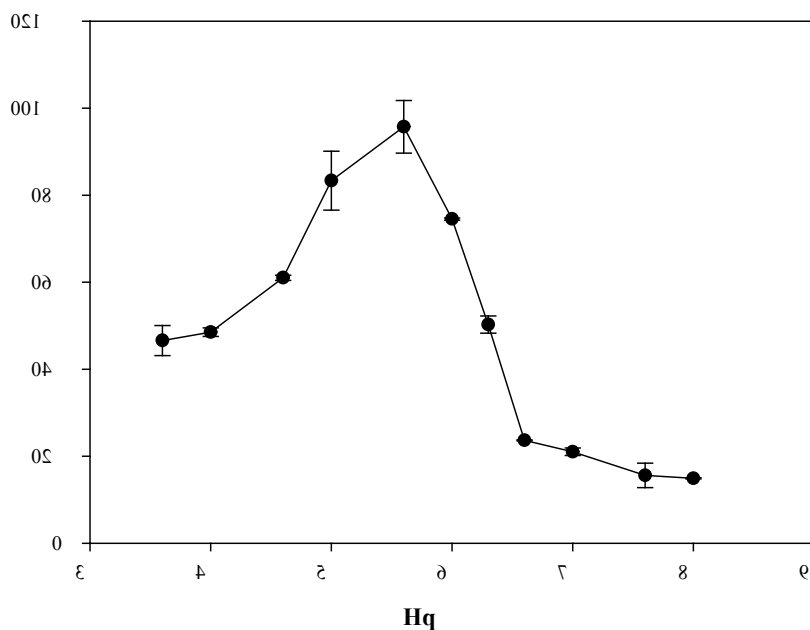
La représentation graphique de l'activité catécholase résiduelle, exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique relative à 30°C pour les différentes températures testées, montre que l'enzyme n'est pas stable thermiquement à des températures supérieures à 40°C. De 40°C à 60°C, l'activité enzymatique résiduelle diminue légèrement (22%). Une inactivation rapide se produit à entre 70 et 80°C. Cette baisse d'activité enzymatique, selon Khatun et al. (2001) ; Yemenicioğlu (2002) ; Doğan et al. (2005b) ; est due aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, à la destruction de son site actif et aussi à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont certaines sont extrêmement thermolabiles. Il est également probable que le chauffage doux, cause la dissociation de quelques formes oligomères de la PPO vers des monomères moins actifs (Yemenicioğlu, 2002).

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique montrent que la PPO de datte Deglet noir est une enzyme thermorésistante. Cette grande thermostabilité peut être expliquée par la présence de sucres.

La PPO des dattes Deglet Nour d'Algérie est plus stable thermiquement que les PPOs des dattes d'Iraqe des variétés Barhee et Zahdi (Sachde et al., 1989), de datte Deglet noir d'Amérique (Hasegawa et Maier, 1980), de champignon de paris (*Agaricus bisporus*) (Gouzi et bennmansour, 2007) et de truffe (*Terfazia leonis*) (Choucha et Zaroual, 2009).

### **1.5 Effet du pH**

Le pH est parmi les facteurs qui influent sur l'activité des enzymes. L'activité catécholase de la PPO de datte Deglet noir (*Phoenix dactylifera* L.) est mesurée à différentes valeurs de pH utilisant le catéchol comme substrat. L'enzyme est active dans la gamme de pH comprise entre 3.6-8 et possède une activité maximale à pH 5.6 avec une activité maximale de moitié à pH 3.6 (Figure 17).



**Figure 17:** Activité catécholase de la PPO de datte Deglet noir (*Phoenix dactylifera* L.) en fonction du pH. Le milieu réactionnel (1 ml) contenant 40 mM de catéchol et 30  $\mu$ l de l'extrait enzymatique est incubé à 30°C.

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

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

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

Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; Yoruk et Marshall, 2003). Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994 ; Luh et Phithalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Kolcuoğlu et al., 2006).

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

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

Source de la PPO	pH optimal	Reference bibliographique
Laitue ( <i>Lactuca sativa</i> var, capitata L.)	5.5	Gawlik-dziki et al. (2007)
Fraise ( <i>Fragaria ananassa</i> )	5	Dalmadi et al. (2006)
Banane	6.5	Ünal (2005)
Poire sauvage ( <i>Pyrus elaeagnifolia</i> )	6	Yerlitürk et al. (2008)
Fleur de viol ( <i>rape flower</i> )	5.5	Sun et al. (2012)
Choux de Chine ( <i>Brassica rapa</i> L.)	5	Nagai et Suzuki. (2001)
Raisin dechaunac	6	Lee et al. (1983)
Datte (Zahdi et Barhee)	6.8	Sachde et al. (1989)
Datte Deglet nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	5.6	Notre travail

## 2. Etude de l'inhibition de la PPO de datte Deglet nour par l'acide caféique

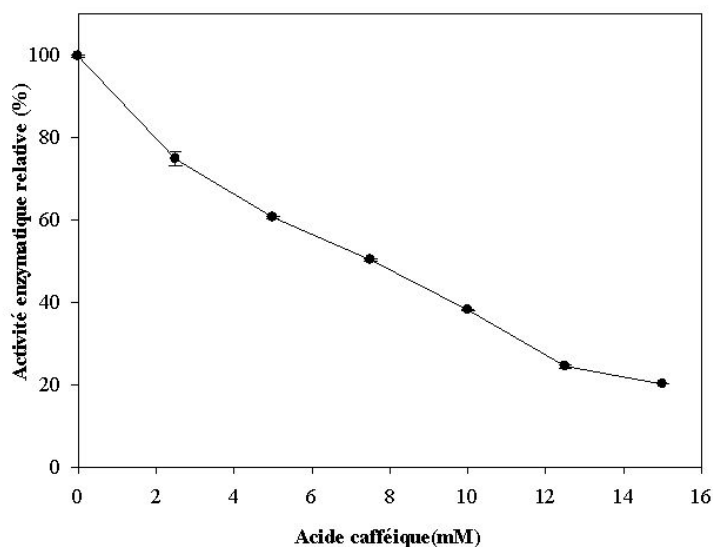
L'inhibition du brunissement enzymatique peut être le résultat de (a) l'inactivation de la catécholase, (b) de l'élimination de l'un des substrats de la réaction ( $O_2$ , polyphénols), et (c) de l'action des inhibiteurs sur les produits de la réaction enzymatique pour empêcher la formation des produits colorés après des réactions secondaires (Doğan et al. 2007).

L'effet inhibiteur de l'acide caffeique sur l'activité catécholase de la tyrosinase de dattes

D'après les résultats trouvés, l'acide caffeique montre une forte inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de la datte, provoquant l'inactivation de l'enzyme même à des moyennes concentrations. La présence de l'acide caffeique dans le milieu réactionnel provoque une augmentation de la phase de latence avant que la vitesse initiale d'oxydation du substrat atteigne l'état stationnaire.

### 2.1 Détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub>

L'effet de différentes concentrations de l'acide caffeique sur l'oxydation du catéchol par la tyrosinase de la datte (*Phoenix dactyifera* L.) est étudié. La Figure (18) montre que l'activité tyrosinase diminue en fonction de la concentration d'acide caffeique dans le milieu réactionnel.

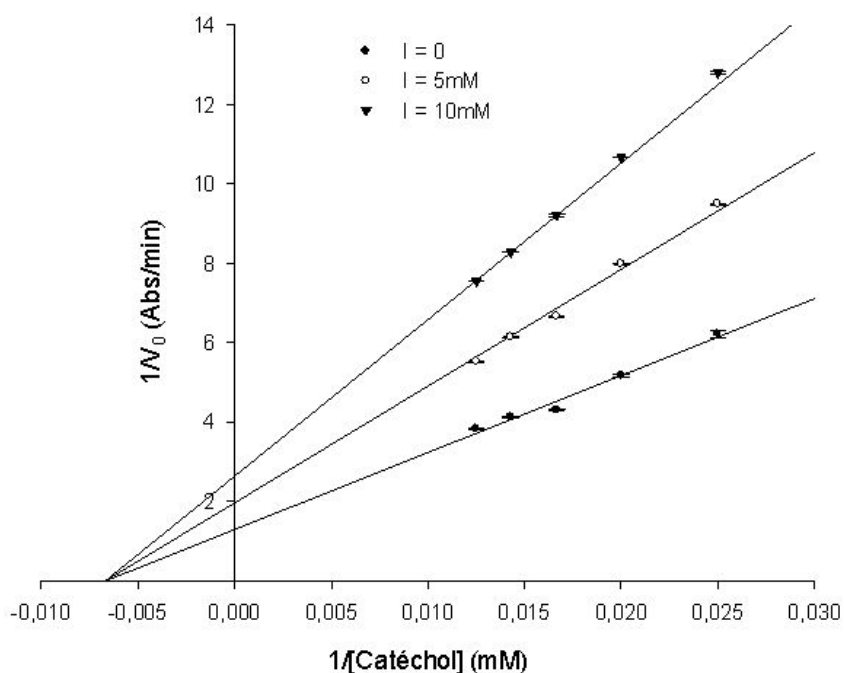


**Figure (18):** Effet de la concentration de l'acide caffeique sur l'oxydation de catéchol de datte Deglet noir. Les conditions d'essai : 30°C, 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.05 M de tampon acétate de sodium (pH 5.6), 80 mM de catéchol, et 30  $\mu$ l de l'extrait enzymatique,. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.

La valeur d' $IC_{50}$  d'acide caffeique définie comme étant la concentration de ce composé pour provoquer une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50 % ainsi calculée égale à 7,31 mM ( $\pm 0,85$ ).

### 2.2 Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité catécholase par l'acide caféique

L'inhibition de l'activité catécholase de la PPO des truffes par l'acide caféique a été étudiée. Les résultats illustrés dans la Figure (19) montrent une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ( $1/[S]$ ) mais de différentes pentes, indiquant que l'acide caféique est un inhibiteur non compétitif. Cet inhibiteur provoque une diminution des valeurs apparentes de  $V_{max}$  et n'as aucun effet sur le  $K_m$  comme le montre les résultats indiqués dans le Tableau (4).



**Figure (20) :** Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de la datte (*Phoenix dactyloides* L.) sur le catéchol par l'acide caffeique. Concentrations de l'acide caffeique sont : 0 (●), 5 (○), et 10 (▼) mM. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.

La valeur du coefficient de régression linéaire ( $R^2$ ) indique bien que les données expérimentales sont parfaitement ajustées par l'équation d'inhibition choisie.

**Tableau (4) :** Les valeurs de  $K_i$ , de  $K_m$ , et de  $V_{max}$  de l'activité catécholase de la PPO de datte en présence de l'acide caffeique.

Acide caffeique (mM)	$K_i$ (mM)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/l/min}$ )	$R^2$
0			0,38±0,03	0.994
5	9,68±0,23	149±16,17	0,50±0,03	
10			0,76±0,05	

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

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

Avec :

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

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_{IS}}$$

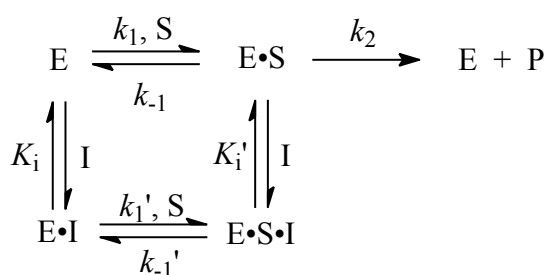
$$K_I = K_{IS}$$

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

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

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

Les constantes d'équilibres de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre,  $K_I$  ; et sur le complexe (ES) ;  $K_{IS}$  sont identiques, ces valeurs sont de 9.68 mM. Ce comportement cinétique montre que l'acide caféique peut se fixer sur l'enzyme libre et également sur le complexe enzyme-substrat (ES) (Figure 20). La présence d'un inhibiteur non compétitif dans le milieu réactionnel n'affecte pas la fixation du substrat avec l'enzyme libre mais affecte la fonction catalytique de l'enzyme.



**Figure 20** : Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non-compétitive (Doğan et al. 2007).

L'inhibition de la PPO par l'acide caféique peut être expliquée par son effet chélateur du site actif de l'enzyme, et aussi par son pouvoir acidulant en abaissant le pH du milieu réactionnel, ce qui réduit l'activité de la PPO. Aux pH inférieurs à 4, la PPO a le plus souvent une activité faible due à la perte du cuivre de son site actif.

A l'heure actuelle, il y a un intérêt substantiel dans l'utilisation des acides organiques tel que l'acide caffeique avec d'autres inhibiteurs pour un meilleur contrôle de brunissement enzymatique induit par la PPO. Par exemple, l'association d'acide ascorbique avec l'acide caffeique est trouvée plus efficace qu'en présence d'acide caffeique seul (Eskin *et al.*, 1971; Sapers 1993). Ceci est probablement dû à la capacité de réduire l'o-quinones pour former des produits incolores stables et/ou par l'abaissement de pH du milieu et l'élimination de cuivre de site actif de l'enzyme.

Kang *et al.* (2009) ont trouvé que l'acide caffeique inhibe l'activité catécholase de la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

Loizzo *et al.* (2012) ont signalé que les dérivés de l'acide caffeique sont des inhibiteurs puissants de la PPO.

# *Conclusion*

La datte Deglet-Nour *Phaenix dactylifera* L. 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 principalement par la polyphénol oxydase (PPO).

Nos résultats ont montré que l'extrait aqueux des dattes Deglet nour contient une activité catécholase élevée. Cette activité est optimale à pH relativement acide. L'étude de la stabilité thermique montre que la PPO des dattes est stable entre 40-50°C.

La cinétique d'oxydation de catéchol par la PPO suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten. Les propriétés biochimiques de la PPO des dattes sont plus ou moins similaires par rapport à ceux des PPOs isolées de plusieurs sources végétales.

L'application de l'acide caféique comme un inhibiteur pour réduire le brunissement des dattes est ainsi rapportée pour la première fois.

L'acide caféique inhibe la PPO des dattes de manière non compétitive en se fixant soit sur l'enzyme libre ou sur le complexe enzyme-substrat.

L'acide caféique est un composé phénolique naturel non toxique qui pourrait être donc utilisé comme un agent de contrôle du brunissement enzymatique des dattes lors de leur stockage ou de leur transformation.

Comme perspectives, il serait plus intéressant d'étudier l'effet de l'acide caféique sur la PPO isolée à partir d'autres variétés de dattes et voir aussi son effet sur leurs propriétés thermodynamiques.

# *Annexe*

**1) Composition du réactif Folin-Ciocalteu :**

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

- **Solution (A) :** mettre dans l'ordre :

• CuSO <sub>4</sub> anhydre	0.05 g
• Tartrate de K <sup>+</sup>	0,1 g
• Carbonate de Na <sup>+</sup> (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	10 g
• NaOH	2 g
• Eau distillée	q.s.p. 100 ml

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

- **Solution (B) :** (A préparer au dernier moment.)

- 0,5 ml de réactif de Folin dans 8,5 l'eau distillée.

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

**2) Préparation de la Solution Tampon acétate : pH de 3,6 à 5,6**

A : Solution d'acide acétique 0,2 M (11,55 mL dans 1 L d'eau distillée)

B : Solution d'acétate de sodium 0,2 M (16,4 g de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na ou 27,2 g de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, 3 H<sub>2</sub>O dans 1 L d'eau distillée).

# *Références bibliographique*

- Abou zied, A. A., & Baghlef, A. O. (1983).** Utilization of date seeds and cheese whey in production of citric acid by *Candida lipolytica*. *Agricultural Wastes*, 8, 131 –142.
- Abou zied, A. A., & Khoja, S. M. (1993).** Utilization of dates in the fermentative formation of citric acid by *Candida lipolytica*. *Zentral Microbiology*, 148, 213 –221.
- Abou zied, A. A., Abderrahman, N., & Baghlef, A. O. (1991).** The formation of oxytetracycline in date-coat medium. *Bioresource Technology*, 37, 179 –184.
- Al obaidi, Z. S., & Berry, D. R. (1982).** Saling up of citric acid fermentation using fermenters. *Date Palm Journal*, 2, 19–33.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., & Shahidi, F. (2005).** Compositional and sensory characteristics of three native sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7586 –7591.
- Al-hooti, S., Sidhu, J. S., & Qabazard, H. (1996).** Objective color measurement of fresh date fruits and processed date products. *Journal of Food Quality*, 20, 257 –266.
- Al-hooti, S., Sidhu, J. S., Al-otaibi, J., Al-ameeri, H., & Qabazard, H. (1996).** Processing of some important date cultivars grown in United Arab Emirates into chutney and date relish. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20, 55 –68.
- Al-Shahib, W., Marshall, R.J., 2002.** Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 719-721.
- Altunkaya, A; Gokmen. V. (2007).** Effect of various inhibitors on enzymatic browning antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*lactuca sativa*). *Food Chemistry*.1174-1175.
- Altunkaya. A., Gokmen. V. (2008).** Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chem.*; 107, 1173-1179.
- Amiot, M.-J ;Lairon, D .** Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Curr. Opin. Lipidol.* 1997, 10, 23-28.
- Anosike, E.O. and Ayaebene, A.O. (1982) .** Propenies of polyphenol oxidase from yam tubers *Dioscorea bu/bifera*. *Phytochem.*,21(8), 1889-1893.
- Anwar-Shinwari, M. (1987).** Iron content of date fruits. *Journal of the College of Science-King-Saud-University*, 18(1), 5 –13.
- Barrevelde W.H. (1993).** Date palm products; **FAO Agricultural Services.** Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Bechrair A., Bechrair F. (2010).** Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.). Mémoire d'ingénieur d'état, département de biologie, université Amar telidji, L'Aghouat.p91.
- Belarbi, A., Aymard, C., Meot, J.M., Themelin, A., Reynes, M., 2000 .** Water desorption, isotherms for eleven varieties of dates. *Journal of Food Engineering* 43, 103 –107.
- Benchelah A-C;M.Maka ;**Les dattes ,de la préhistoire à nos jours ;Ethobotanique phytothérapie(2006)Numéro 1 :43-47.
- Bennaceur M., Lanaud C., Chevallier M. H . and Bounaga N. (1991).** *Plant Breeding* 107, 56 —69.
- Bonner, Jr W.D. 1956.** Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, Vol. 8, pp. 427-452.
- Bonner, W.D .(1955).** *Plant Physiol.*, 56, 274 (1954) .
- Borua, I., Das, P. (2000).** Changes in activities of polyphenol oxidase, acid phosphatase and phenol content in developing chilli varieties susceptible and resistant to *Collectotrichum capsici*. *Crop Research (Hissar)* 19(2): 230 –234.
- Bryngelsson, S.; Dimberg, L. H.; Kamal-Eldin, A. J. Agric. Food Chem. , 2002, 50, 1890-1896.**
- Burton, S.G. 1994.** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*. Vol. 22. pp. 459-487.
- Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; Tudela, J.; Lozano, J. A.; García-Carmona, F. 1987.** L-mimosine a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry*. Vol. 26, pp. 917-919.
- Chang, T. S. 2009.** An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 10, pp. 2440-2475.
- Chen, J.S.; Wei, C.; Marshall, M. R. 1991.** Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 39. pp. 1897-1901.
- Chen, L and Flurkey, W.H. (2002).** Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current topics in phytochemistry*. Vol. 5, pp. 109-120.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K. (1999).** Purification And Characterization Of Polyphenol Oxidase From Potato: I. Purification And Properties. *Journal of Food Biochemistry* Vol 23, pp. 577-592.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K. 1999b .** Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 23. pp. 593-605.
- Choi, S.; Lee, S. K.; Kim, J. E.; Chung, M. H.; Park, Y. I. 2002.** Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation. *Clin.Exp. Dermatol.* Vol. 27, pp. 513-515.
- Claus, H and Decker, H. (2006).** Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 29. Issue 1 , pp. 3-14.
- Claus, H. Decker , Syst. Appl. Microbiol. 29 (2006) 3-14.**

- Craft C. C., Audia W. M. (1962) . Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. Bot. Gaz. 123: 211-219.
- Dawson, C.R and Magee, R.J. (1955). Plant tyrosinase (polyphenol oxidase). *Methods in enzymology*, Vol. 2, pp. 817-831.
- Decker, H., & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 673-687.
- Decker, H., & Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 673-687.
- Decker, H., Schweikardt, T., and Tuzek, F. (2006) . The first crystal structure of tyrosinase. All questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 4546 –4550.
- Dixon M, Webb E C 1964 *Enzymes*. Longmans, London, pp 54-165.
- Djerbi M. (1994). Précis de phœniciculture. FAO, 192 p.
- Doğan S ; Yâsemin A, Doğan M. (2013). Characterisation of polyphenol oxidase from *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (lemon balm). *Food Sci.* 56–165
- Aydemir T., Akkanli G., 2006. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens* L.) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors. *J. Food Sci. Tech.*, 41, 1090 –1098.
- Dogan S., Turan Y., Erturk H., Arslan O., 2005 . Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776 –785.
- Eicken C., Krebs B., Sacchettini J. C. (1999) . Catechol oxidase - structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 677-683
- Escribano, I, Tudela, I, Garcia-Carmona, F. and Garcia-Canovas, F. (1989). A kinetic study of the suicide of the inactivation of an enzyme measured through coupling reactions: application to the suicide inactivation of tyrosinase. *Biochem. J.*, 262, 597-603.
- Eskin N.A.M., Henderson H.M. Townsend R.J., 1971. Browning reactions in foods. In *Biochemistry of Foods*, (N.A.M. Eskin, H.M. Henderson and R.J. Townsend, eds.) pp. 69-83, Academic Press, New York.
- Espiard E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, 147-155.
- Espín, J. C.; Wichers, H. J. 1999. Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, pp. 2638-2644.
- Espín, J.C; Morales, M and Varón, R. (1995). A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry* . 231, pp. 237-246.
- Estanove P. (1990). Note technique : Valorisation de la datte. In *Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens*. Ed. CIHEAM, 301-318.
- Fan Y., Flurkey W.H., 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry.*, 65, 671-678.
- Fenoll, L.G; Rodríguez-López, J.N; Varón, R; García-Ruiz, P.A; García-Cánovas, F and Tudela, J. 2000. Action Mechanism of Tyrosinase on *meta*- and *para*-Hydroxylated Monophenols. *Biol. Chem.*, Vol. 381, pp. 313-320
- Friedman M. (1997) . Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540
- Gamil-Abdel-Hafez, M., Fouad-Shalaby, A., & Akhal, I. (1980) . Chemical composition of 15 varieties of dates grown in Saudi Arabia. Fourth Symposium on biological aspects of Saudi Arabia, 89 –91.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2005). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. *Plant Physiology*, 138, 421 –432.
- Garcia-Borron J. C., Solano F. (2002) . Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173
- Gauillard, F; Richard-Forget, F and Nicolas, J. (1993). New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*. 215, pp. 59-65
- Gilles, P., 2000. Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, 110 p.
- Guizani Nejib , Ghalib Said Al-Saidi , Mohammad Shafiur Rahman , Salwa Bornaz , Ahmed Ali Al-Alawi (2010) State diagram of dates: Glass transition, freezing curve and maximal-freeze-concentration condition ; *Journal of Food Engineering* 99 92 –97
- Hagbbeen, K; Saboury, A.A; Karbassi, F. 2004 . Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta* . 1675. pp. 139-146.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. 2000. *Phytochemistry*. Vol. 55 .pp. 481-504.
- Hasegawa, S. and Maier, V. P. 1980 . Polyphenol oxidase of dates. *J. Agric. Food Chem.* 28, 891-893
- Himmelwright R. S., Eickman N. C., Solomon E. I. (1980) . Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102

- Itoh, K.; Hirata, N.; Masuda, M.; Naruto, S.; Murata, K.; Wakabayashi, K.; Matsuda, H.** 2009. Inhibitory effects of *Citrus hassaku* extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 32, pp. 410-415.
- Iwai, K.; Kishimoto, N.; Kakino, Y.; Mochida, K.; Fujita, T.** 2004. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 52, pp. 4893-4898.
- Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Goupy P. M., Nicolas J. J. (1990)** . Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38: 926-931 .
- Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. (1989)** . Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry* 28: 2903-2907
- Jeong, S. H.; Ryu, Y. B.; Curtis-Long, M.J.; Ryu, H. W.; Baek, Y.S.; Kang, J. E.; Lee, W. S.; Park, K. H.** 2009. Tyrosinase Inhibitory Polyphenols from Roots of *Morus lhou*. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 57, pp. 1195-1203.
- Jiménez, M.; Chazarra, S.; Escribano, J.; Cabanes, J.; García-Carmona, F.** 2001. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, pp. 4060-4063.
- Jolivet, S; Arpin, N; Wichers, H.J and Pellon, G** . (1998). Agaricus bisporus browning: a review. *Mycol. Res.* Vol. 102, No. 12, pp. 1459-1483.
- Jones, K.; Hughes, J.; Hong, M.; Jia, Q.; Orndorff, S.** . 2002. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* Vol. 15, pp. 335-340.
- Joslyn, M.A and Ponting, J.D.** (1951). Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* Vol. 3, pp. 1-44.
- Kang, S.S.; Kim, H.J.; Jin, C.; Lee, Y.S.** (2009). Synthesis of tyrosinase inhibitory (4-oxo-4H-pyran-2-yl)acrylic acid ester derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 188-191.
- Keilin, D and Mann, T.** (1938). Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* Vol. 125, pp. 187-204.
- Klabunde, T; Eicken, C; Sacchettini; J.C and Krebs, B.** (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *nature structural biology*; Vol. 5, No. 12, pp. 1084-1090.
- Kubo, I.; Kinst-Hori, I.** 1999. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.* vol. 47, pp. 4121-412.
- Kubo, I; Kinst-Hori, I.** 1999. 2-Hydroxy-4-methoxy benzaldehyde: a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Med.* Vol. 65, pp. 19-22.
- Kubo, I; Kinst-Hori, I; Chaudhuri, S.K.; Kubo, Y.; Sánchez, Y.; Ogura, T.** 2000. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* Vol. 8, pp. 1749-1755.
- Kuby, S.A. (1991)** . Effect of pH and temperature. In: "A study of enzymes"., Vol.5, pp. 163-190.
- Kuwabara T., Katoh Y. (1999)** . Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035
- Lax A. R., Vaughn K. C. (1991)** . Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.
- Le Berre M.** Mise au point sur le problème du ver de la datte *Myelois ceratoniae* Zeller. *Bull Agr Sahar* 1978 ; 1 : 1-35.
- Lee, H.S.** 2002. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 50, pp. 1400-1403.
- Lee, S. H.; Choi, S. Y.; Kim, H.; Hwang, J. S.; Lee, B. G.; Gao, J. J.; Kim, S. Y.** 2002. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 25, pp. 1045-1048.
- Lerch K. (1981)** . Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine-monooxygenase. in *Metal ions in biological systems*. H. Siegel. New York, Marcel Dekker. 13: 143-186.
- Lerch K. (1982)** . Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa* II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414-6419.
- Leu, Y. L.; Hwang, T. L.; Hu, J. W.; Fang, J. Y.** 2008. Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as tyrosinase inhibitors for dermal use. *Phytother. Res.* Vol. 22, pp. 552-556.
- Lim, J. Y.; Ishiguro, K.; Kubo, I.** 1999. Tyrosinase inhibitory *p*-coumaric acid from ginseng leaves. *Phytother. Res.* Vol. 13, pp. 371-375.
- Loizzo M. R., Tundis R., and Menichini F (2012).** Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11; 378-398.
- Lorente, T. F., & Ferreres, F.** (1988). Nota. Sulfatos de flavonoids en fructos de *Ph\_nix dactylifera*. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 28, 581 -585.
- Luh, B. S., & Phithakpol, B. (1972).** Characteristic of polyphenol oxidase related to browning in cling peaches. *Journal of Food Science*, 27, 264 -268.
- Marangoni AG. (2003),** *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. Wiley, Hoboken, New Jersey, pp. 140 -158.
- Martinez, M. V and Whitaker, J. R.** (1995) . The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*; Vol. 6, pp. 195 -200.

- Masuda, T.; Yamashita, D.; Takeda, Y.; Yonemori, S.** 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* Vol. 69, pp. 197-201.
- Matsuda, H.; Higashino, M.; Chen, W.; Tosa, H.; Inuma, M.; Kubo, M.** 1995. Studies of cuticle drugs from natural sources. III. Inhibitory effect of *Myrica rubra* on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 18, pp. 1148-1150.
- Mattila, P.; Kumpulainen, P.** *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 3660-3667.
- Mayer AA, Harel E (1991)** . Phenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. *Food Enzymology*, Edited by P.F. Fox (Elsevier Publisher). Pp: 373-397
- Mayer, A. M. 1966** . Catechol Oxidase: enzymic liberation from sugar beet chloroplast. *Phytochemistry* 5, 1297-1301.
- Mayer, A.M and Harel, E. 1979** . Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, Vol. 18, pp. 193-215.
- Mayer, A.M. 1987** . REVIEW ARTICLE NUMBER 22. POLYPHENOL OXIDASES IN PLANTS –RECENT PROGRESS. *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 1, pp. 11-20.
- Miyazawa, M.; Oshima, T.; Koshino, K.; Itsuzaki, Y.; Anzai, J.** 2003. Tyrosinase inhibitor from black rice bran. *J. Agric. Food. Chem.* Vol. 51, pp. 6953-6956.
- Miyazawa, M.; Tamura, N.** 2007. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade). *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 30, pp. 595-597.
- Munier, P., 1981:** Origine de la culture sur palmier dattier et sa propagation en Afrique. *Fruits*, 36. n° 7\_8, 437 —450.
- Nacib, N., Nacib, A., Mostefa, G., Larbi, L., Adimi, L., Remmal, M., et al. (1999).** Use of date products in production of thermophilic dairy starters strain *Streptococcus thermophilus*. *Bioresource Technology*, 67, 291–295.
- Nagai, T., & Suzuki, N. (2001).** Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3922.
- Naish-Byfield, S and Riley, P.A.** (1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* Vol. 288. pp. 63-67.
- Nicoli, M. C., Anese, M., & Parpinel, M.** (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 94–100.
- Noui, Y. 2007.** Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Thèse de Magister spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès. 62 p.
- Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994a.** *Agaricus bisporus* Tyrosinase–I. Progress Made In Preparative Methods. *Int. J. Biochem.* Vol. 26. No. 2, pp. 215-221.
- Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994b** . *Agaricus bisporus* Tyrosinase–II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem.* Vol. 26, No. 2, pp. 223-228.
- Proteggente, A. R., Pannala, S. A., Paganga, G., Buren, L. V., Wagner, E., Wiseman, S., De Put, F. V., Dacombe, C., & Rice Evans, C. A.** (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36, 217–233
- Qiu, Q., & Lillehei, K. O.** (1998). Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Medical Hypotheses*, 51(5), 405–409.
- Regnault-Roger, C., Hadidane, R., Biard, J. F., & Boukef, K.** (1987). High performance liquid and thin-layer chromatography determination of phenolic acids in palm (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 25, 61–71.
- Reinhammar B., Malmström B. G. (1981)** . "Blue" copper-containing oxidases. *in Copper Proteins*. T.G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons : 109-149.
- Rescigno, A; Sollai, F; Pisu, B; Rinaldi, A and Sanjust, E** .(2002) Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol. 17, N° 4, pp. 207-218.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G.** (1996). Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
- Robb, D.A.** (1984). Tyrosinase. *In copper Proteins and Copper Enzymes*, ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 207-241.
- Rodríguez-López, J.N; Tudela, J; Varón, R; García-Carmona, F and Garcia-Cánovas, F.** (1992). Analysis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267, No. 6. pp. 3801-3810.
- Ros JR, Rodríguez-Lopez JN, Garcí'a-Ca'novas F (1994)** Tyrosinase:kinetic analysis of the transient phase and the steady-state. *Biochim Biophys Acta* 1204:33–42
- Ryu, Y. B.; Ha, T. J.; Curtis-Long, M. J.; Ryu, H. W.; Gal, S. W.; Park, K. H.** 2008. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus lhou* . *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* vol. 23, pp. 922-930.
- Sachde, A. G., Al-Bakir, A. Y. and Abdul-Raheem, J.A.K. 1989.** Polyphenol oxidase from Barhee and Zahdi dates. I. Purification *J. Food Biochem.* 12, 227-240.
- Sawaya, W.N., Khatchadourian, H.A., Khalil, J.K., Safi, W.M. & Alshalhat, A. (1982).** Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. *Journal of Food Science*, 47, 1489–1492.

- Sawaya, W.N., Safi, W.M., Khalil, J.K. & Mashadi, A.S. (1983).** Physical measurements, proximate analyses and nutrient elements content of twenty-five date cultivars grown in Saudi Arabia at the Khalaal (mature colour) and tamr (ripe) stages. In: Proceedings of the First Symposium on the Date Palm, Saudi Arabia. Pp. 454–467. King Faisal University.
- Schoenbein, C.F. (1856).** On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*, Vol. 11. pp. 137-141.
- Seo.S.Y, Sharma.V.K (2003)** .Mushroom tyrosinase recent prospects. Journal of agricultural food chemistry, 51, 2837-2853
- Shin, N. H.; Ryu, S. Y.; Choi, E. J.; Kang, S. H.; Chang, I. M.; Min, K. R.; Kim, Y. (1998).** Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 243, pp. 801-803.
- Siegbahn, P.E.M. (2004).** The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* Vol.9, pp. 577-590.
- Solomon, E.I; Chen, P; Metz, M; Lee, S-K and Palmer, A.E. (2001).** Oxygen Binding, Activation and Reduction to Water by Copper Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, pp. 4570-4590.
- Solomon, E.I; Sundaram, U.M and Machonkin, T.E (1996).** Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* Vol. 96, No. 7, pp. 2563-2605.
- Steffens, J.C; Harel, E; Hunt, M.D and Thipyapong, P. (1998).** Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Cheze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques) N°87. pp. 223-250.
- Suttirak W., Manurakchinakorn S., (2010).** Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Walailak J. Sci. Tech.*, 7(1), 5-14.
- Thomas, P and Janave, M.T. (1986).** Isoelectric Focusing Evidence for Banana Isoenzymes with Mono and Diphenolase Activity. *Journal of Food Science.* Vol. 51, No. 2, pp. 384-387.
- Thygesen, P.W; Dry, I.B; and Robinson, S.P. 1995 .** Polyphenol oxidase in Potato. *Plant Physiol.* Vol. 109, pp. 525-531.
- Turner, E.M. 1974 .** Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society.*, Vol. 63, pp. 541-547.
- Ünal M.Ü., 2007.** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry.*, 100, 909-913.
- 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. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol. 15, pp. 49-127.
- Van Gelder, C.W.G; Flurkey, W.H and Wichers, H.J. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, Vol. 45, N° 7, pp. 1309-1323.
- Varoquaux P. (1978) .** Contribution à l'étude des propriétés de l' *o*-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doctorat. Faculté des sciences de la vie et de l'environnement. Dijon. 131 p.
- Vaughn K. C., Lax A. R., Duke S. O. (1988) .** Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665
- Vaughn, K.C and Duke, S.O. (1984).** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* Vol. 60, pp. 106-112. Copenhagen.
- Vayalil, P. K. (2002).** Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. *Arecaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,
- Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N. & Proch, J, 2005.** Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 44 –50.
- Walker, J. R. L., & Ferrar, P. H. (1998).** Diphenol oxidase, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 15, 457±498.
- Whitaker J., Lee C. Y. (1995) .** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. in *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.
- Whitaker, J. R. (1994).** Principles of enzymology for the food sciences. In : New York: Marcel Dekker  *Braz. J. Food Technol.*, Vol.8, N° 3, pp. 233-242, 2.ed., pp. 625.
- Xie, L.P.; Chen, Q. X.; Huang, H.; Wang, H. Z.; Zhang, R. Q. 2003.** Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry.* Vol. 68, pp 487-491.
- Yokota, T.; Nishio, H.; Kubota, Y.; Mizoguchi, M. (1998).** The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* Vol. 11, pp. 355-361.
- Yokozawa, T.; Kim, Y.J. 2007.** Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 30, pp. 2007-2011.
- Zawistowski, J; Biliaderis, C.G; and 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), pp. 217-273.-Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* Vol. 9, pp. 577-590.
- Zhang, C.; Lu, Y.; Tao, L.; Tao, X.; Su, X.; Wei, D. (2007).** Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* Vol. 22, pp. 83-90.

---

Zhao, Y. K.; Cao, Q. E.; Liu, H. T.; Wang, K. T.; Yan, A. X.; Hu, Z. D

*.Chromatographia*, 2000, 51, 483-486.

ة كذا نواع : رو قد رو ص انا ل فط ا ي هرك ل ل فط ا اضرح طقت شراد . *phoenix dactylifera* L.

قلا نرقلا صرلا: بوا صلح طظا: ملة يزق نرلا

صم:

زامج سرق زهر ك ل فط ا طنان ل فط ا اضرح لق نم رو قد عو رطلا ص انا زهر ك ل فط ا طقت شراد ط ا فو لم ا اذه ل فط ا ل فط ا رورج م 30 ة رارح و 5,6 ل فط ا صومح و م 410 ة جوم ل فط ا طع و نرلا فط ا .  
ة رارح و 5,6 صومح في فط ا ل فط ا طقت شراد ل فط ا اضرح م ف ا ي زهر ك ل فط ا ف رط نم ل فط ا طقت شراد ل فط ا  
في ن فط ا طنان ل فط ا طقت شراد ل فط ا طعت ن فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد  
IC فط ا طنان في طوم صرق سرق و زهر ك ل فط ا اضرح م 40 ة رارح و 5,6 صومح في فط ا طقت شراد  
9,7 ل فط ا ص انا زهر ك ل فط ا طقت شراد ل فط ا اضرح ن ا ي ك ر فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد  
لوم  
ل فط ا و ا ي زط ا ع ا رط ا في فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد  
ق فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد ل فط ا طقت شراد

**Memory title : Study of the inhibition of polyphenol oxidase of Deglet Nour dates (*phoenix dactylifera* L.) by caffeic acid.**

**Name :** Kacem **First name :** Houssemeddine **Directed by :** Mr Gouzi Hicham

**Abstract:**

The aim of this present work is to study the inhibition of polyphenol oxidase (PPO) of Deglet Nour dates (*Phoenix dactylifera* L.) by caffeic acid. The PPO activity was measured by spectrophotometry at 410 nm, pH 5.6 and 30°C, using catéchol as a substrate. The kinetics of oxidation of catechol by PPO of the date of Deglet Nour perfectly follows the kinetic model of Michaelis-Menten. The values of kinetic parameters were determined at pH 5.6 and 30 ° C. they are: Km = 26 mM and Vmax = 324 µmol/l/min. The concentration of the enzyme influences on the initial rate of the oxidation of catechol. The catecholase activity is optimal at pH 5.6 and 40 ° C. Caffeic acid is a reversible inhibitor of PPO dates and causes a significant decrease in catecholase activity. The IC50 of caffeic acid estimated to be 7.3 mM. The Lineweaver-Burk representation indicates that caffeic acid is a non-competitive inhibitor of the PPO dates with a K1 value equal to 9.7 mM. Caffeic acid is a natural phenolic compound can be used to control enzymatic browning of dates during their storage or their transformations.

Deglet-nour (*Phoenix dactylifera* L.), Polyphénol oxydase, catéchol, Inhibition, Caffeic acid, **Keywords** : browning.

inhibition de la Polyphénol oxydase des dattes Deglet-nour (*Phoenix dactylifera* L.) par l'acide caféique. **Titre du mémoire :** Etude de l'activité de la PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, à pH 5.6 et à 30°C, en présence de catéchol comme substrat.

**Nom:** Kacem **Prénom:** Houssemeddine **Encadreur: M.** Gouzi Hicham

**Résumé :**

inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) des dattes Deglet-Nour (*Phoenix dactylifera* L.) par l'acide caféique. L'activité de la PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, à pH 5.6 et à 30°C, en présence de catéchol comme substrat. La cinétique d'oxydation du catéchol par la PPO de datte Deglet nour suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten. Les valeurs des paramètres cinétiques déterminés à pH 5.6 et à 30°C sont : Km = 26 mM et Vmax = 324 µmol/l/min. La concentration de l'enzyme influence sur la vitesse initiale de l'oxydation de catéchol. L'activité catécholase est optimale à pH 5.6 et à 40°C. L'acide caféique est un inhibiteur réversible de la PPO des dattes et provoque une diminution significative de l'activité catécholase. La valeur d'IC50 de l'acide caféique estimée à 7.3 mM. La représentation de Lineweaver-Burk indique que l'acide caféique est un inhibiteur non compétitif de la PPO des dattes avec une valeur de K1 égale à 9.7 mM. L'acide caféique est un composé phénolique naturel peu être utilisé pour le contrôle du brunissement enzymatique des dattes au cours de leur stockage ou leurs transformations.

**Mots clés :** Deglet-nour (*Phoenix dactylifera* L.), Polyphénol oxydase, catéchol, Inhibition, Acide caféique, Brunissement.