

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

Etude cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase de *Phoenix dactylifera* L cv Ghars par l'acide caféique

Présenté par :

Mr. MAHIEDDINE Yassine

Mr. KOUIDRI Aissa

Devant le jury :

Président : CHAIBI Rachid

Rapporteur : BENACEUR Farouk

Examineur: GOUZI Hicham

Université de Laghouat

Université de Laghouat

Université de Laghouat

Soutenu publiquement le : 30Mai 2018.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

Etude cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase de *Phoenix dactylifera* L cv Ghars par l'acide caféique

Présenté par :

Mr. MAHIEDDINE Yassine

Mr. KOUIDRI Aissa

Devant le jury :

Président : CHAIBI Rachid

Rapporteur : BENACEUR Farouk

Examineur: GOUZI Hicham

Université de Laghouat

Université de Laghouat

Université de Laghouat

Soutenu publiquement le : 30 Mai 2018.

Remerciement

*On remercie dieu le tout puissant, le clément, le miséricordieux
de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de
terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait
pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de
Mr **F. BENNACEUR**, on le remercie pour la qualité de son
Encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa
Disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous sommes conscients de l'honneur que nous a fait Mr
H. GOUZI en étant président du jury et Mr **M. LABOUKHA**
d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*On remercie aussi Mr **C. ASHMANI** pour Leurs aides et
leurs encouragements.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos
professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont
ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et
professionnelles.*

*Nos profonds remerciements vont également à toutes les
Personnes qui nous ont aidés et soutenue de près ou de loin*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :
A mes parents. Aucun hommage ne pourrait
être à la hauteur de
L'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que
dieu leur procure
Bonne santé et longue vie.

Je le dédie aussi à ma femme la source de mes
efforts, la flamme de Mon cœur qui, grâce à
elle, j'ai eu la volonté et le courage de poursuivre
mes études et qui a su me remonter le moral
dans les moments les plus difficiles. Ses
sacrifices, son soutien moral, sa gentillesse
sans égal, son profond attachement m'ont
permis de réussir mes études.

Mes petits anges **Abderaouf Amír** et **Bachír**
Síradjeddine la lumière de mon chemin.

A tous mes frères et mes sœurs et leurs
familles,

A tous mes amis.

AISSA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents. Aucun hommage ne pourrait

être à la hauteur de

L'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que

dieu leur procure

Bonne santé et longue vie.

Je le dédie aussi à ma femme.

A tous mes frères et mes amis.

YACINE

Tableau des matières

Introduction	01
--------------------	----

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : généralité sur palmier dattier et dattes

I. Palmier dattier : Généralités	03
I.1 Nom vernaculaire et synonyme.....	03
I.2 Position systématique.....	03
I.3 Classification botanique.....	03
I.4 Ecologie.....	04
I.5 Répartition géographique.....	04
I.5.1 Dans le monde.....	04
I.5.2 En Algérie.....	04
II. Les dattes	06
II.1 Définition	06
II.2 Classifications des dattes	07
II.3 Formation et maturation de la datte.....	07
1. Loulou (Hababouk)	07
2. Kimri (Khalal ou Blah)	08
3. Bser (Bsir, Bissir)	08
4. Routab (Martouba)	08
5. Tamar (Tmar)	08
II.4 Les variétés des dattes	08
II.4.1 Deglet-Nour.....	08
II.4.2 Variétés communes	09
II.5 Composition biochimique des dattes	09
1. Sucres.....	09
➤ Sucres totaux.....	09
➤ Sucres réducteurs.....	09
2. Protéines	09
3. Lipides.....	09
4. Teneur en matière grasse.....	09
5. Teneur en pectine.....	09
6. Cellulose	10
7. Vitamines	10
8. Eléments minéraux.....	10
9. composés phénoliques.....	10
10. Les enzymes des dattes et brunissement enzymatique.....	10
• L'invertase.....	10

• La cellulase	10
• La pectinmethylesterase	10
• La polyphenoloxydase	10
II.6 La valeur nutritionnelle et utilisation de la datte	11

Chapitre 02 : la polyphénol oxydase structure, activité et applications

I. Polyphénol oxydase	12
I.1 Historique	12
I.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO.....	12
I.2.1 Définition	12
I.2.2 Classification et nomenclature	12
I.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO	13
I.3.1 Caractéristiques réactionnelles	13
I.3.1.1. Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)	13
I.3.1.2 Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)	13
I.3.1.3 La laccase (EC 1.10.3.2)	14
I.3.2 Caractéristique structurales	15
I.3.2.1 La structure	15
I.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOS	17
I.4.1 Source et localisation.....	17
I.4.2 Rôle physiologique.....	18
I.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique.....	18
I.6 pH et Température optimale.....	19
I.7 Spécificité de la PP.....	22
I.8 Affinité et efficacité	24
I.9 Applications de la PPO	25

Etude expérimentale

Chapitre 01 : matériels et méthodes

I. Matériels.....	27
I.1 Matériels biologiques.....	27
I.2 Produits chimiques.....	27
II. Méthodes	27
II.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO.....	27
II.2 Mesure de l'activité de PPO.....	28
II.3 Effet du pH.....	29
II.4 Etude de la stabilité thermique	29

II.5 Effet de la concentration de l'enzyme.....	29
II.6 Détermination des paramètres cinétiques	30
II.7 Détermination des valeurs d'IC ₅₀	30
II.8 -Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide caféique.....	30
II.9 Analyse des résultats expérimentaux.....	31

Chapitre 02 : résultats et discussions

I.Extraction de la polyphénol oxydase des dattes	32
II. Les conditions optimales de l'activité pyrocatechol oxydase	33
II.1 Effet du pH.....	33
II.2 Etude de la stabilité thermique.....	34
II.3 Effet de la concentration de l'enzyme.....	35
II.4 Détermination des paramètres cinétiques	36
II.5 Détermination de la valeur d'IC ₅₀ de l'Acide caféique sur l'activité enzymatique de la PPO... ..	40
II.6 Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété Ghars par l'Acide caféique.....	41
Conclusion	45
Références bibliographiques	50

Liste des figures

Figure 01	Datte et noyau du palmier dattier.....	06
Figure02	Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.....	14
Figure03	Diffraction aux rayons X de la PPO de <i>V. vinifera</i>	16
	(A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale	
	(B) Représentation de $C\alpha$ de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) avec la PPO de la patate	
Figure04	Site actif de la PPO de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et <i>N. crassa</i> enzyme (vert)	17
	(a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER	
	(b) Détail sur la coordination des chaînes	
Figure05	Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO	19
Figure06	Structure de quelques substrats phénoliques	23
Figure06	La variété de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars.....	27
Figure08	Extrait brut de la datte (<i>Phaenix dactylifera</i> L CV Ghars) avant et après centrifugation	28
Figure09	Protocole d'extraction de polyphénols oxydases des dattes (<i>Phaenix dactylifera</i> L CV Ghars)	32
Figure10	Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars en fonction du pH.	33
Figure11	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars après 10 min de traitement thermique.....	34
Figure12	Effet de la concentration de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol	36
Figure13	Effet de la concentration du pyrocatechol sur la vitesse initiale d'oxydation par la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars	38
	(a) Représentation de Michaelis-Menten ,	
	(b) Représentation de Lineweaver-Burk	
Figure14	L'effet de la concentration de l'Acide caféique sur l'oxydation de Pyropyrocatéchol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Ghars.....	40
Figure15	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Ghars) par l'Acide caféique.....	42
Figure16	Représentation de l'inhibition non compétitive.....	43
Figure 17	Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive.....	43

Liste des tableaux

Tableau 01	Classification botanique des palmiers dattier.....	03
Tableau 02	Nombre de palmier dattier en Algérie.....	05
Tableau 03	Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.	21
Tableau 04	Paramètres cinétiques de quelques polyphénols oxydase d'origine végétale.....	25
Tableau 05	Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de pyrocatechol	39
Tableau 06	Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L</i>) cv <i>ghars</i>	41

Liste des abbreviations

AR	L'activité enzymatique résiduelle de la PPO
Cu A	Cuivre de la chaîne A
Cu B	Cuivre de la chaîne B
FAO	Food and agricultural organization
His	Histidine
IC₅₀	La concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50%
IUB	l'Union Internationale de la Biochimie
K_i	Constante de dissociation du complexe EI
K_{is}	constante de dissociation du complexe ESI
POD	Le Peroxydase
PPO	La polyphénol oxydase
PVP	Le poly vinyl pyrrolidone
PVPP	Le polyvinyle (poly) pyrrolidone
R²	Le coefficient de régression linéaire
SDS	Le sodium dodécyl sulfate
[I]	concentration d'inhibiteur
[S]	La concentration de substrat

« RÉSUMÉ

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

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'inhibiteur utilisé. La valeur d'IC 50 ainsi obtenue est $3,487 \pm 0.15$ mM. La représentation de Lineweaver-Burk indique que l'acide caféique est un inhibiteur non compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{is} égale à $33,5895 \pm 0,5830$ mM.

Mots clés : dattes, PPO, acide caféique, Inhibition, Brunissement enzymatique ,ghars ,spectrophotometrie

INTRODUCTION

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

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

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

La polyphénol oxydase (PPO) est reconnue comme étant la principale enzyme responsable du brunissement des dattes.

La PPO est une métallo enzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (**Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995**) et (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín 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 (**Sapers, 1993**).

Au cours des dix dernières années, certains rapports ont été consacrés sur l'étude de l'inhibition de la PPO de différentes sources par des acides organiques comme des anti-brunissements dans l'industrie alimentaire (**Queiroz et al., 2011**). Par contre, l'inhibition de la PPO des dattes n'a pas suscité l'attention similaire. Pour cela, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer pour la première fois l'effet inhibiteur de l'acide caféique, sur l'activité de la PPO des dattes « *Phenix dactylifera* L cv Ghars » et de déterminer son mécanisme d'inhibition en utilisant le pyrocatechol comme substrat phénolique.

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

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 01

GÉNÉRALITÉS SUR

PALMIER DATTIER ET

DATTES

I. Palmier dattier : Généralités

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

I.1 Nom vernaculaire et synonyme

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

I.2 Position systématique

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

I.3 Classification botanique

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

Tableau 01 : La classification botanique du palmier dattier donnée par (Djebri, 1994) et (Feldman, 1976)

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

I.4 Ecologie

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

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

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

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

I.5 Répartition géographique

I.5.1 Dans le monde

Le palmier dattier fait l'objet d'une plantation intensive en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient.

L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche (**Toutain, 1996**).

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

I.5.2 En Algérie

En général les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis. Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement (**Messaid, 2007**). Pour une superficie de 120830 hectares, cependant 4 wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar 22%, El -oued 21% et Ouargla 15%. (**Messaid, 2007**).

Notons que sur un nombre de 13,50 millions de plantes cultivés, 69,4 % sont productifs.

C'est aussi dans ces régions que sont produites les belles dattes, Deglet Nour et autres variétés commerciales: Ghars , Mech Degla , Degla Baida....etc (**Quinten, 1996**).

Tableau 02 : Nombre de palmier dattier en Algérie (Noui, 2007)

Wilaya	Deglet- nour (datte fine)	Ghars (datte molle)	Degla Beida (datte seche)	Total palmier dattier
Adrar	0	0	2150904	2904150
Laghouat	8470	7650	11580	27700
Batna	700	3900	21270	25870
Biskra	1964460	436530	748200	3149190
Bechar	5650	0	0	770030
Tamanrasset	2970	0	0	167760
Tébessa	49550	49550	10650	68970
Djelfa	2610	860	210	3680
M'sila	18000	0	0	18000
Ouargla	1092330	783850	193130	2310069
El-Bayedh	0	45900	0	193130
Illizi	2250	16340	73030	91620
Tindouf	350	24250	0	24600
El-Oued	1884030	703330	296300	2660883
Khenchla	21290	44800	7370	73460
Naama	0	19600	2600	22200
Ghardaia	377100	154400	378900	910400
Total	3559930	1660761	4048710	13505880

II. Les dattes

II.1 Définition

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

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

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

Les dattes sont en général de forme allongée, oblongue ou ovoïde, mais il en existe cependant quelques-unes pratiquement sphériques, la Tinteboucht d'Algérie notamment. Les dimensions de la datte sont très variables, de 1.5 à 7 ou 8cm de longueur et d'un poids varie de 2 à 7 ou 8g (**Djerbi, 1994**).

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

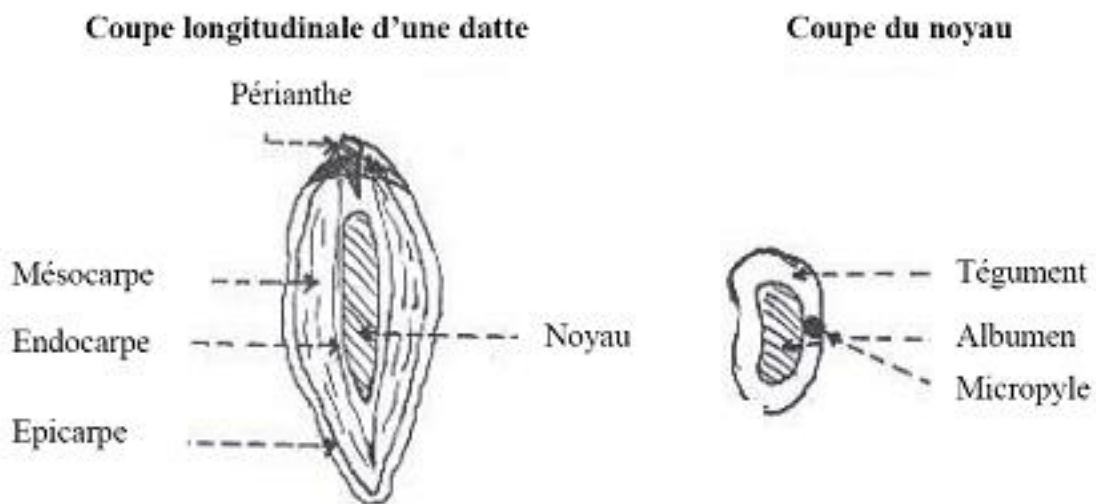


Figure 01 : Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj, 2001)

II.2 Classifications des dattes :

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

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

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

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

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

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

II.3 Formation et maturation de la datte

On distingue cinq stades qui sont :

1. Loulou (Hababouk)

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

2. Kimri, (Khalal ou Blah)

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

3. Bser (Bsir, Bissir)

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

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

4. Routab (Martouba)

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

5. Tamar (Tmar)

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

II.4 Les variétés des dattes :

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

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

II.4.1 Deglet-Nour

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

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

II.4.2 Variétés communes

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

II.5 Composition biochimique des dattes

1. Sucres

La teneur en sucres dans les dattes est très variable selon les variétés.

➤ Sucres totaux

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

➤ Sucres réducteurs

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

La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat.

Elle varie entre 60 et 80 % du poids de la pulpe fraîche. Le glucose et fructose résultant de l'inversion du saccharose (**Siboukeur, 1997**)

2. Protéines

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

3. Lipides

La teneur en lipides des variétés Ghars, Déglet-Nour et Dégla-Beida est faible. Elle est de 0.07 ± 0.06 % pour la variété Ghars, de 0.11 ± 0.0 % pour Déglet-Nour et de 0.12 ± 0.06 % pour Dégla-Beida (**Sayah, 2008**)

4. Teneur en matière grasse

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

5. Teneur en pectine

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

6. Cellulose

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

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

7. Vitamines

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

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

8. Eléments minéraux

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

9- Composés phénoliques

Selon (**Telli, 2009**) pour la variété Ghars, la concentration en polyphénols totaux la plus élevée au cours de premier stade de la maturation (Hababouk ou Loulou). (**Sayah , 2008**) rapporte que la concentration en composés phénoliques de la variété Ghars est de 263.04 ± 6.09 mg/100g, celle de Déglet-Nour est de 195.91 ± 6.98 mg/100g et de Dégla-Beida est de 217.55 ± 4.24 mg/100g.

10- Les enzymes des dattes et brunissement enzymatique

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

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

- **L'invertase**

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

- **La cellulase :**

Elle décompose la cellulose en chaînes plus courtes.

- **La pectinmethylesterase :**

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

- **La polyphenoloxydase :**

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

V. La valeur nutritionnelle et utilisation de la datte

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

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

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

Autres utilisations des dattes dans les confiseries : la production de pâte de dattes, la farine en dattes (cette farine est utilisée en biscuiterie, pâtisserie, aliments pour enfants **(Aït-Ameur, 2001)** et yaourt **(Benamara et al., 2004)**, les Sirops, les crèmes et les confitures de dattes. Egalement il y a l'usage médicinal des dattes : riches en fibres, les dattes facilitent le transit intestinal et exercent un rôle préventif des cancers colorectaux, des appendicites, de la diverticulose, des varices et des hémorroïdes. Ils ont également un effet hypocholestérolémiant **(Albert, 1998 ; Jaccot et Campillo, 2003)**.

CHAPITRE 02

LA POLYPHÉNOL
OXYDASE STRUCTURE,
ACTIVITÉ ET
APPLICATIONS

I. Polyphénol oxydase

I.1 Historique

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

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

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

I.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO

I.2.1 Définition

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

I.2.2 Classification et nomenclature

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

Le nom tyrosinase, très souvent donné à l'enzyme, était, par conséquent, en contradiction avec la nomenclature officielle. C'est pourquoi en 1972, cette nomenclature a été modifiée et le complexe nommé monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène, oxydo-réductase (E.C.1.14.18.1.) (Mesquita et Queiroz,2013)

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

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

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

I.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO

I.3.1 Caractéristiques réactionnelles

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

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

I.3.1.1. Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)

Les monophénol oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (Fig02). Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat.

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

I.3.1.2 Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)

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

I.3.1.3 La laccase (EC 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité p-diphénol oxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase (Figure 02) L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (**Giardina et al.,2010**).

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

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

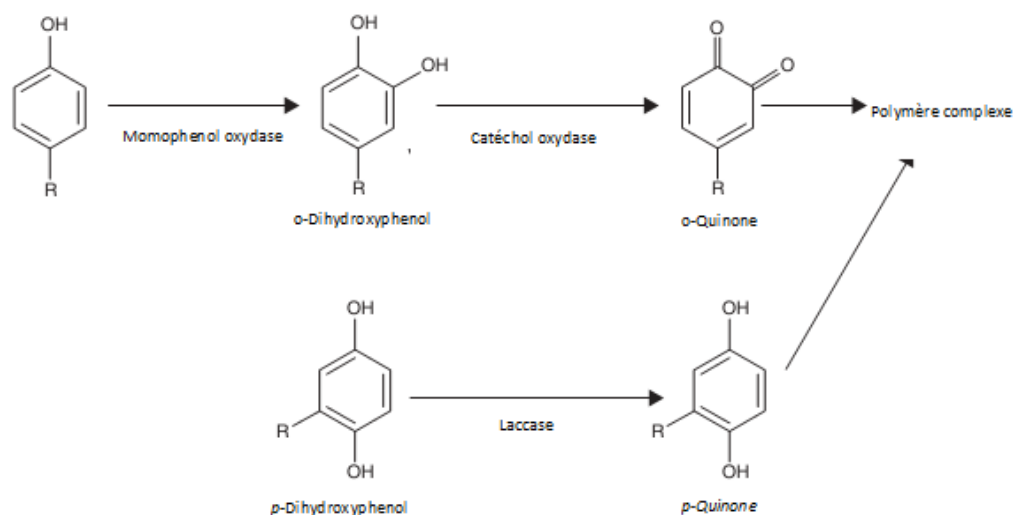


Figure 02 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases.

I.3.2 Caractéristique structurales

I.3.2.1 La structure

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

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

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

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

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

La PPO de *Vitis vinifera* est une protéine monomérique de 38,4 kDa (fig 03). La structure secondaire est essentiellement α -hélicoïdal avec un noyau formé de quatre α -hélices ; $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 12$, et $\alpha 14$, le centre catalytique formé de deux atomes du cuivre est entouré par les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 9$, et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 26 et Cys 25–Cys 88) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle. La paire de cuivre (CuA et CuB) (fig 04) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α . Le CuA est coordonné par l'His 87, His 108, et l'His 117.

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

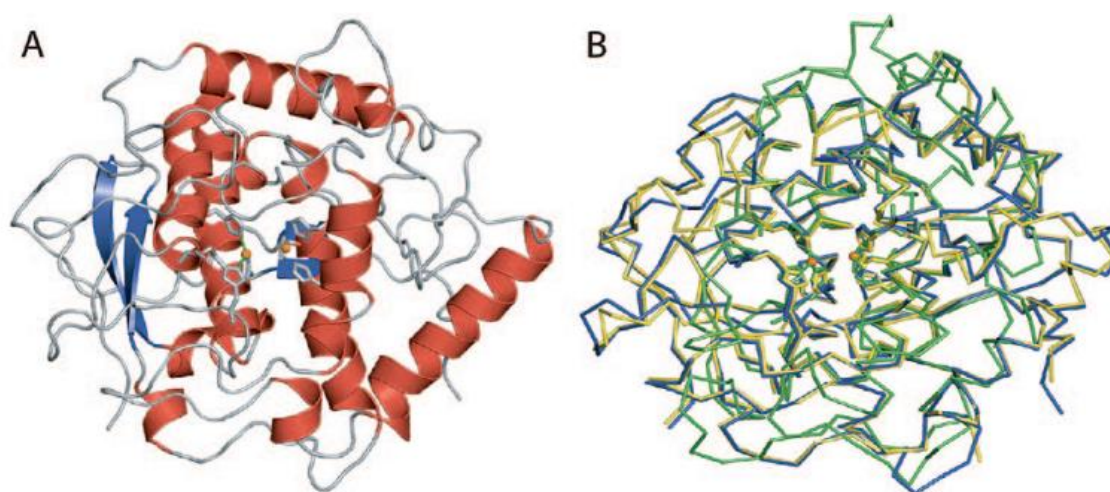


Figure 03 : Diffraction aux rayons X de la PPO de *V. vinifera*. (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, le deux β -feuilles(Bleu), les quatre hélices(Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de Ca de *V. vinifera* PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et *Neurospora crassa* (vert).

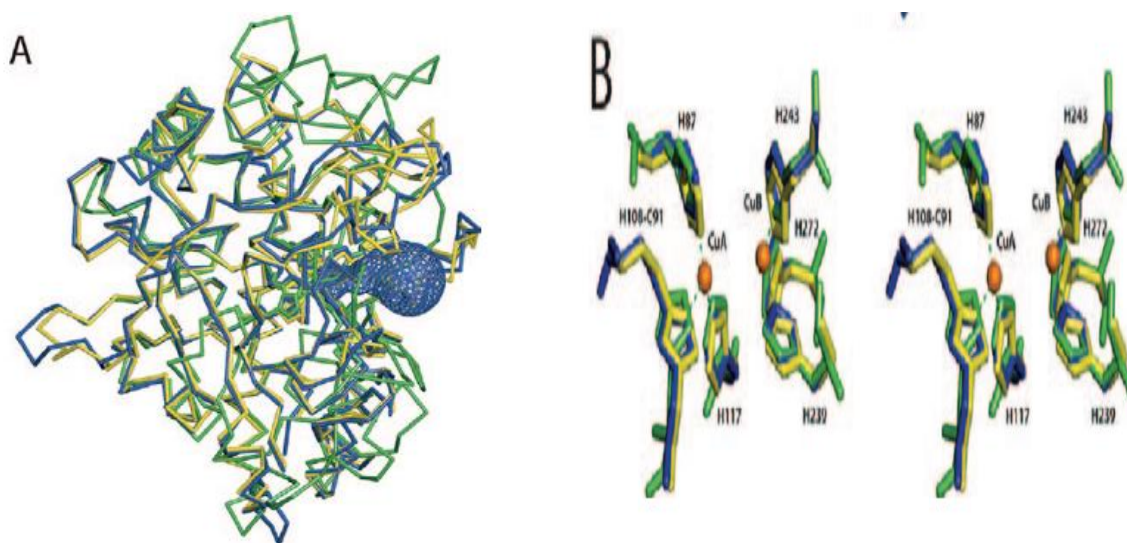


Figure 04 : Site actif de la PPO de *V. vinifera* PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et *N. crassa* enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER, (b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres, la distance internucléaire était :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

I.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOS

I.4.1 Source et localisation

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble peuvent être considérablement inégales.

Le niveau de l'activité de la PPO dans les plantes dépend de l'espèce, du cultivar, de la maturité, de l'âge et le stockage et peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables dans certains cas. L'activité de PPO est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel, 1991).

La localisation subcellulaire attribue à la PPO une fonction physiologique (Mayer et Harel, 1979). L'emplacement de la PPO a toujours été d'un intérêt particulier pour les chercheurs dans le domaine agro-alimentaire. La PPO se trouve dans une variété de fractions subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries et les microsomes (Harel et al., 1964 ; Shomer et al., 1979 ; Mayer et Harel, 1979 ; Martinez et al., 1989). Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker et Lee, 1995). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006).

I.4.2 Rôle physiologique

La localisation spécifique des formes actives des PPOs laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et 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 structuralement associée au photosystème II dans la fève *Vicia faba*. Dans les plantes, les PPOs jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (**Martinez et Whitaker, 1995**).

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

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

Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et al., 1991**).

I.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après (**Sanchez-Ferrer et al., 1995**), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire. La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif (Fig05) passe alors sous forme *Désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite.

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

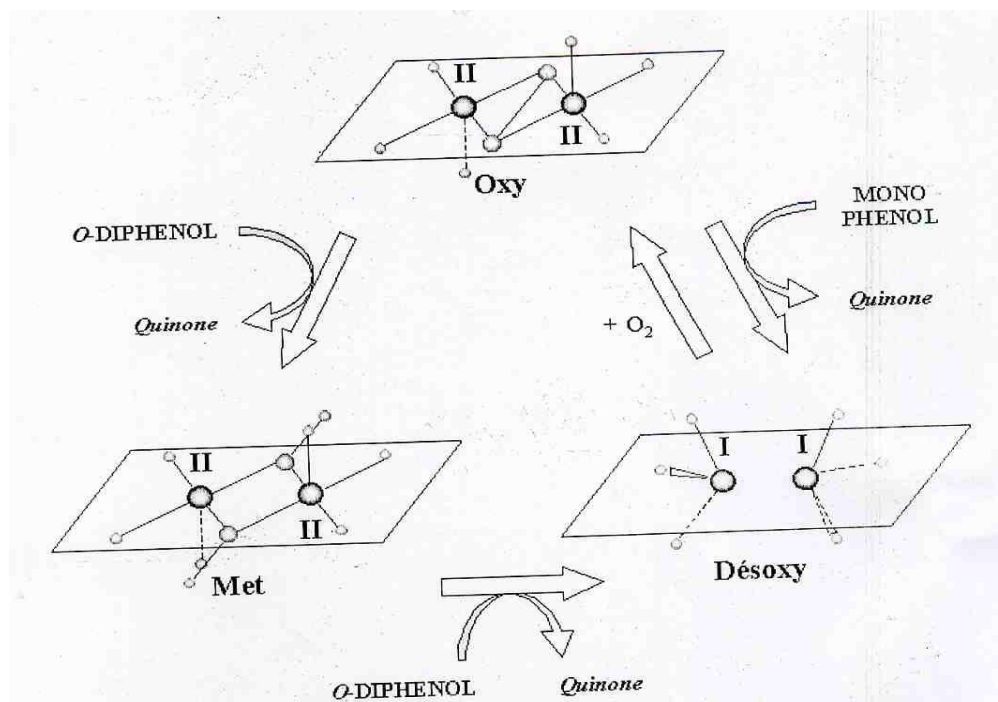


Figure 05 : Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (Met, Deoxy, et Oxy PPO) d'après (Van Gelder et al., 1997).

I.6 pH et Température optimale

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

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme par exemple la PPO de persil (Yusuf et Mustafa,2012) présente une activité maximale à pH 8,5 avec le pyrogallol, mais un pH de 4 avec le 4-méthylcatéchol (Tableau 03).Les valeurs de pH optimum en présence de même substrat vis-à-vis des PPO d'origine différente sont également variables dont en présence de L-dopa, la valeur de pH optimum pour le persil égale à 4,5 (Doğru et Erat, 2012) tandis que pour celle de chèvrefeuille du Japon égale à 7,5 (Goyeneche et al.,2013).

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

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

(Chutintrasri et Noomhorm., 2006), ont montré que l'activité PPO d'ananas, a été réduite d'environ 60% après une exposition à 40-60 °C, pendant 30 min.

La valeur de la température optimale de la PPO dépend notamment de substrat (Tableau 03), du pH optimum, et également de la source de l'enzyme. Elles varient entre 20 et 65°C. Les résultats ainsi récapitulés dans le tableau « I » montrent, que pour une même enzyme, la température optimale peut varier en fonction de substrat, par exemple pour la PPO de radis **(Goyeneche et al., 2013)**, des valeurs de températures optimales égales à 40 °C et 20°C, en présence de catéchol et pyrogallol, respectivement, ont été obtenus.

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

Tableau 03 : Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.

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

I.7 Spécificité de la PP

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

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

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

Ces composés phénoliques sont des substrats primaires de PPO (Figure 06). Les types et les concentrations relatives des phénols naturels varient considérablement pour les différentes sources végétales. Par exemple, la catéchine est un composé phénolique majeur trouvé dans le thé **(Ullah,1991)** et le persil **(Doğru et Erat.,2012)**, tandis que l'acide chlorogénique est présent dans le Radis **(Goyeneche et al.,2013)**, et l'aubergine **(Todaro et al.,2011).**

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

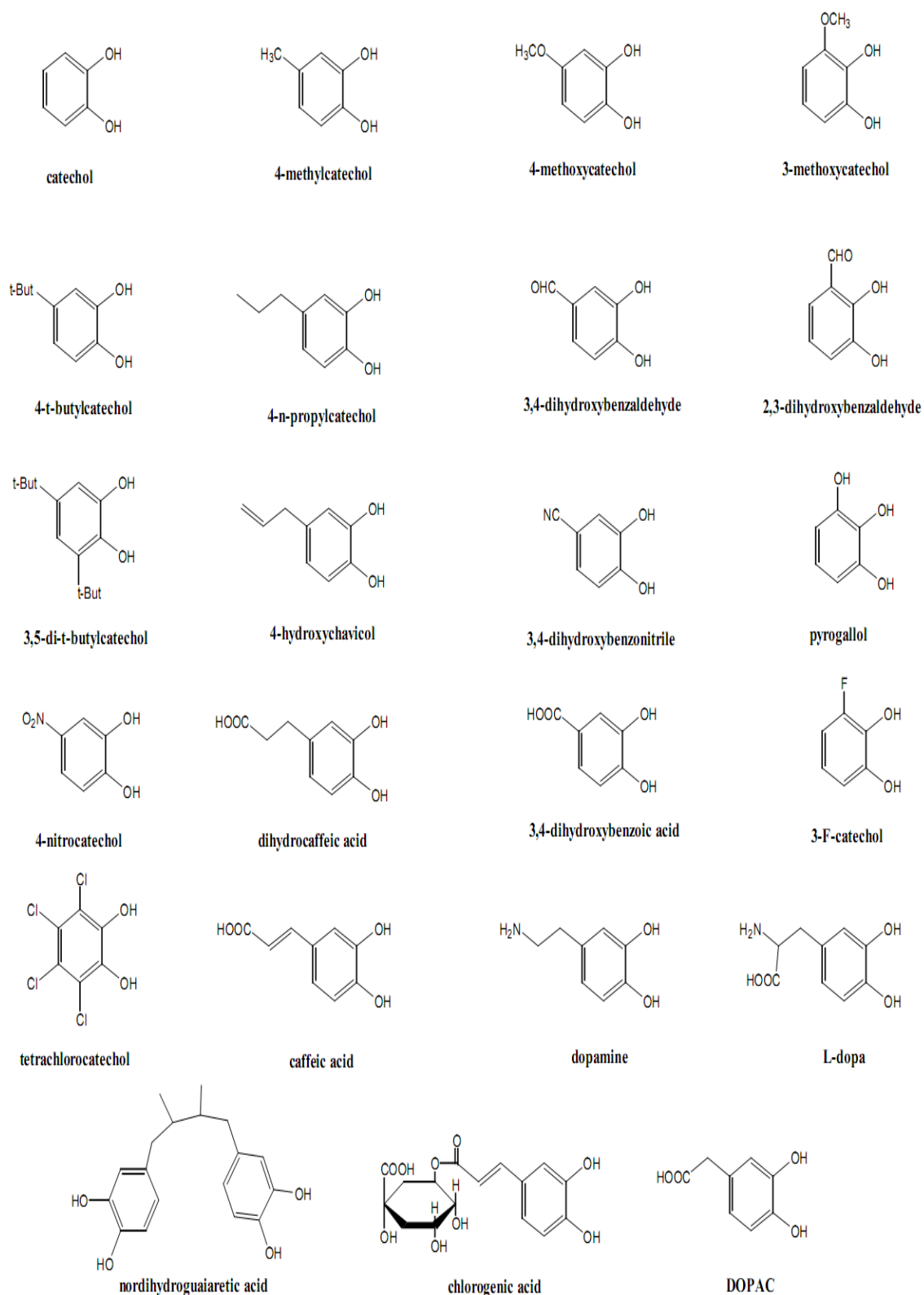


Figure 06: Structure de quelques substrats phénoliques (Majid et al.,2004).

I.8 Affinité et efficacité

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

Les valeurs de K_m égales à 7,9.10 μ M et 1.6.10 mM (Tableau 04) en présence de catéchol et catéchine respectivement (**Doğru et Erat, 2012**). L'affinité change avec le type de substrat utilisé et/ou même entre deux PPO de sources différentes vis à vis de même substrat. Pour la PPO de radis par exemple des valeurs de K_m différentes égales à 4,2mM et 77 mM en présence d'acide gallique et d'acide caféique respectivement ont été estimées (**Goyeneche et al.,2013**).

De même, une valeur de K_m valant 1354 fois plus grande a été estimée pour la PPO de cerise ($K_m= 10,7$ mM, Kumar et al.,2008) par rapport à celle de persil ($K_m=7,9\mu$ M, Doğru & Erat.,2012) et ceci en présence de catéchol comme substrat.

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

Pour la PPO de radis (**Goyeneche et al.,2013**), un rapport de 8 fois plus grand en utilisant l'acide caféique par rapport au catéchol comme substrat a été rapporté (Tableau 04).

Tableau 04 : Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétales

Source	substrat	Vmax	K_m (mM)	Référence bibliographique
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Catéchol Pyrogallol 4-méthylcatéchol	6,97(μM/min) 13,93 12,20	10,7 11,6 5,2	Dogan et al., (2005)
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Catéchol Pyrogallol 4-méthylcatéchol	79.5(μM/min) 8.8(μM/min) 125(μM/min)	10.7 5.2 11.6	Kumar et al., (2008)
Blé (<i>Triticumaestivum</i>)	Catéchol Pyrogallol 4-méthylcatéchol	3.21(UI/min ml) 2.43 3.02	0.1243 0.1040 0.8861	Erat et al.,(2010)
Aubergine (<i>Solanum melongena L</i>)	Catéchol 4-méthylcatechol Acide chlorogénique	2,34(μM/min) 5,55 2,31	2.973 2.122 1,351	Todaro et al.,(2011)
Persil (<i>Petroselinum crispum</i>)	Catéchol Pyrogallol 4-méthylcatéchol L-Dopa Dopamine Catéchin	0,39(Δ Abs/ml min) 0,07 0,05 0,02 0,35 0,06	7,9.10 ⁻⁴ 7,4.10 ⁻⁴ 9,7.10 ⁻⁴ 1,5. 10 ⁻⁴ 5,93 1,6. 10 ⁻²	Doğru & Erat.,(2012)
Radis (<i>Raphanussativus</i>)	Acide gallique Acide pyrogallique Acide chlorogénique L-tyrosine Catéchol Acide caféique	233(UI/min ml) 4348 302 495 1587 1605	4,2 6,3 7,2 9,3 28,3 77.0	Goyeneche et al. ,(2013)

I.9 Applications de la PPO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 01

MATÉRIELS

ET MÉTHODES

I. Matériels

I.1 Matériels biologiques

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



Figure 07 : La variétés de dattes (*Phoenix dactylifera L.*) cv Ghars

I.2 Produits chimiques

Le phosphate de potassium (KH_2PO_4), l'acétate de sodium, le pyrocatechol, l'acide caféique, le polyvinyle (poly)pyrrolidone (PVPP) sont fournis par fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

II. Méthodes

II.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO

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

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. 200g de chair de dattes refroidie préalablement à -15°C sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG ,model BB 90E) dans 300 ml d'une

Solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) comme chélateur des composés phénolique. Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couche de gaze. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo Scientific Spectrophotometer, England).

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

II.2 Mesure de l'activité de PPO

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

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

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

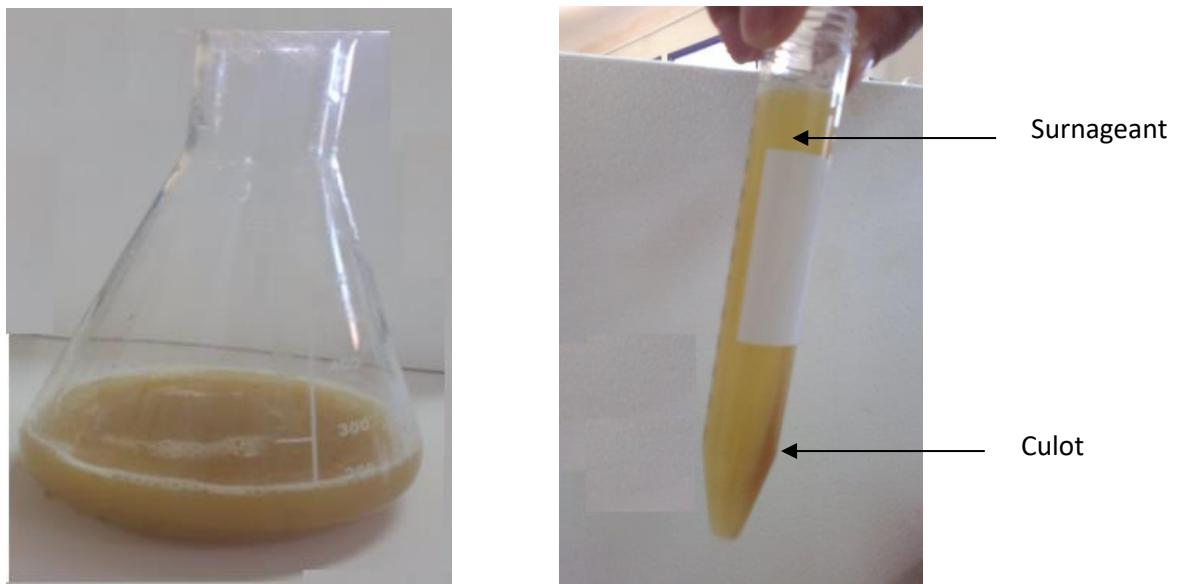


Figure 08 : Extrait brut de la datte (*Phoenix dactylifera* L CV Ghars) avant et après centrifugation.

II.3 Effet du pH

L'activité o-diphénolase de la PPO est mesurée à 30°C dans l'intervalle de pH compris entre 3.5 à 8.0. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.0-6.0), le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 6.0-8.0). Le pyrocatechol à 80 mM est utilisé comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

II.4 Etude de la stabilité thermique

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

Après traitement thermique, les tubes sont refroidis rapidement dans l'eau froide et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 5.0 pour les variétés de Ghars (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 80 mM du pyrocatechol comme substrat.

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

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

Où :

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

A_t est l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

II.5 Effet de la concentration de l'enzyme

La vitesse initiale de l'oxydation de la pyrocatechol à 80mM par la PPO de Ghars est mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 70 µl. L'activité enzymatique a été mesurée dans les conditions optimales décrites ci-dessus (pH 5.0, tampon acétate de sodium 0.05 M et à 30°C).

II.6 Détermination des paramètres cinétiques

Pour déterminer les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'activité pyrocatechol oxydase de l'extrait brut de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L.*) Cv Ghars, l'activité enzymatique est mesurée à pH : 5.0 tampon acétate de sodium à 0.05 M et à 30°C, à différentes concentrations de pyrocatechol comprises entre 20 à 160 mM.

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

II.7 Détermination des valeurs d'IC₅₀

Cette valeur correspond à la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀).

L'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 5.0 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs : d'acide caféique entre 1 et 10mM, pour une concentration constante de pyrocatechol.

Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (acide caféique) (Chen et al, 1998). Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur (A_0) (**Dogan et al., 2005**) selon l'équation suivante :

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

Avec :

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

A_1 : est l'activité diphénolase en présence d'inhibiteur

Toutes les expériences ont été réalisées 3 fois.

II.8 -Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide caféique

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur (2,5 et 5 mM pour l'acide caféique) et à différentes concentrations croissantes de la pyrocatechol comprises entre 30 et 80 mM

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

II.9 Analyse des résultats expérimentaux

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectué par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). Enzyme Kinetics ProTM Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) et Origin 6.0 (Microcal (TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

CHAPITRE 02

RÉSULTATS

ET DISCUSSION

I. Extraction de la polyphénol oxydase des dattes

La PPO a été facilement isolée à partir de la variété de dattes *Phoenix dactylifera* L cv Ghars à l'aide d'un protocole simple à mettre en œuvre. L'extrait enzymatique brut est capable de catalyser l'oxydation de pyrocatechol comme substrat.

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

Le diagramme de l'extraction de la PPO de ces variétés des dattes est récapitulé ci-contre (Fig09.).

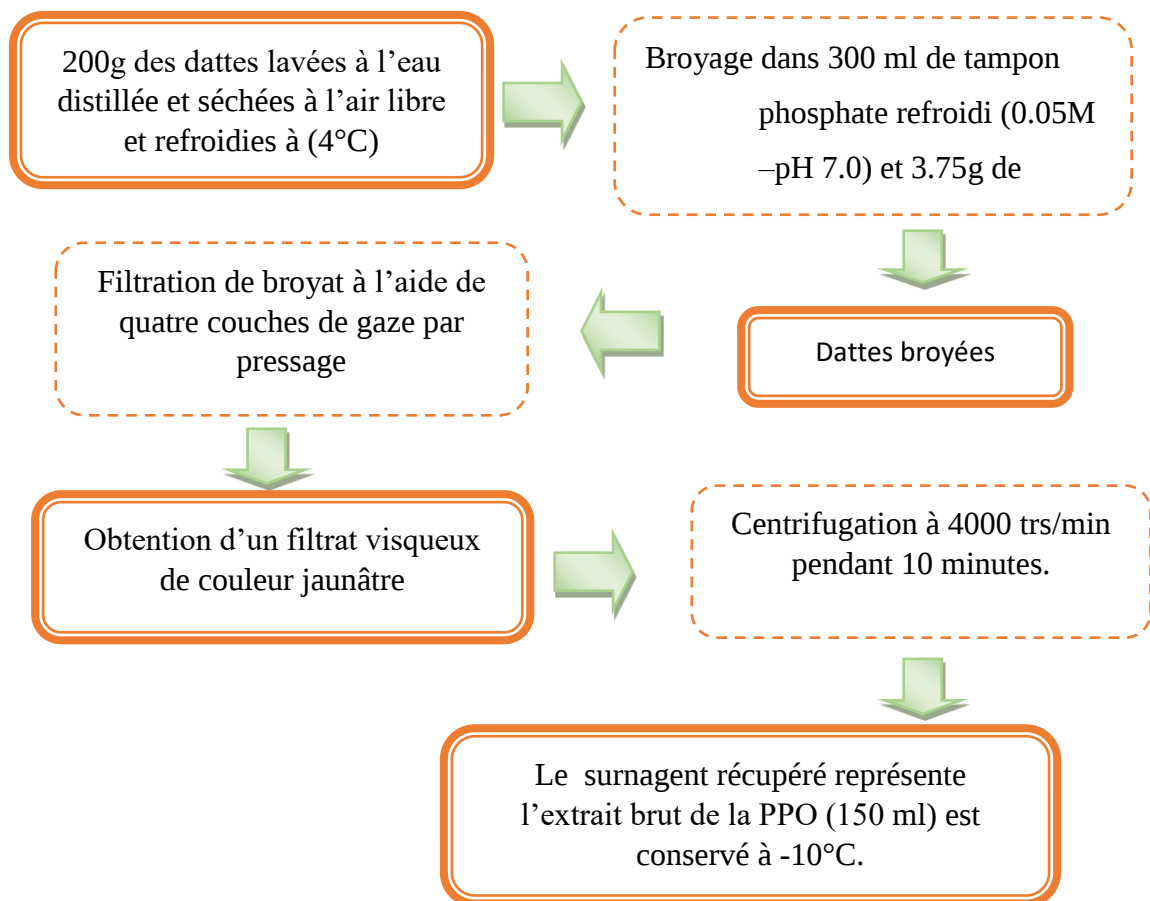


Figure 09: Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) « Ghars ».

II. Les conditions optimales de l'activité pyrocatechol oxydase

II.1 Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité pyrocatecholase des dattes cv Ghars a été déterminée en mesurant les vitesses initiales d'oxydation du pyrocatechol à différents pH compris entre 3.5 et 8.0.

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

La figure (10) représente le profil de l'activité pyrocatechol oxydase relative en fonction du pH en présence de pyrocatechol comme substrat. Ainsi une valeur de pH=5 correspondant au max de pic relativement proportionnelle à l'activité optimale a été réduite. De part et d'autre de ce pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la pyrocatechol et/ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre le site actif de l'enzyme et le pyrocatechol.(Khatun et al., 2001).

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

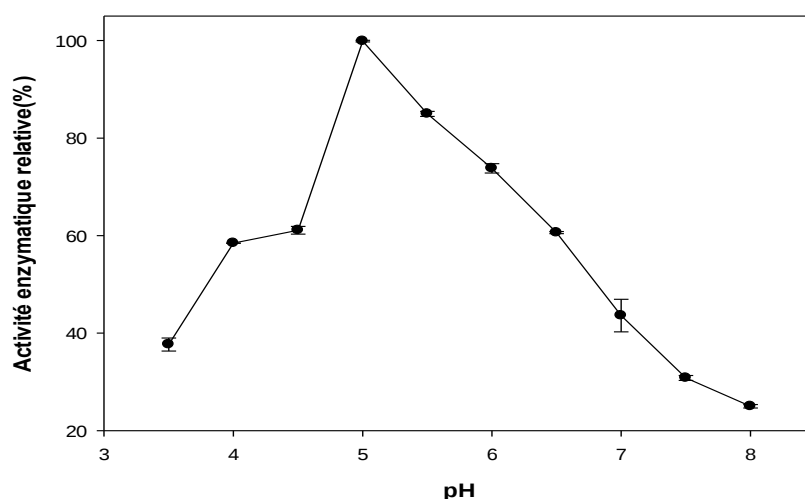


Figure 10 : Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars en fonction du pH. (En présence de pyrocatechol comme substrat).

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

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

II.2. Etude de la stabilité thermique

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

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

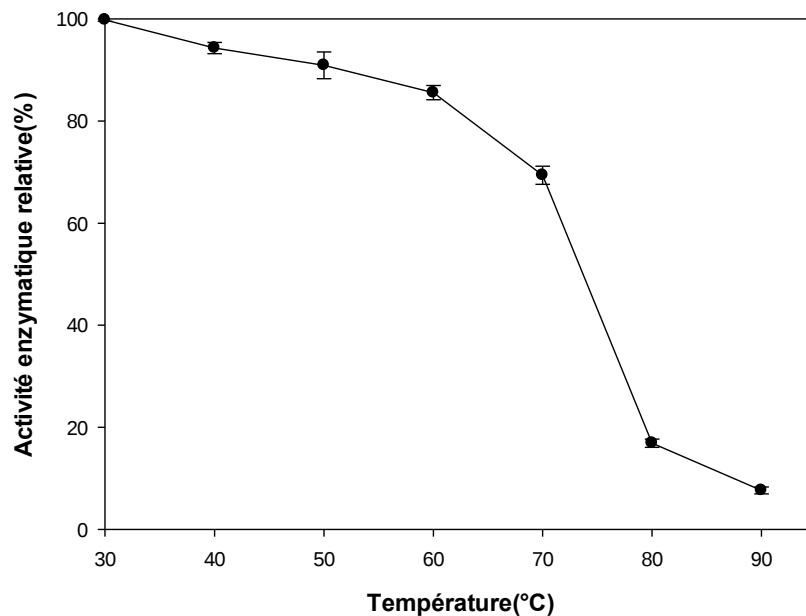


Figure 11 : Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat).

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

(a) de l'effet thermique activateur dont une augmentation exponentielle de la vitesse de la réaction avec la température.

(b) de l'effet thermique dénaturant de la structure de la protéine aux températures plus élevées (**Voet, 2011**).

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

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

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

II.3 Effet de la concentration de l'enzyme

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

La (fig12) représente le résultat de l'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité de la PPO de Ghars. Nous constatons que la vitesse initiale d'oxydation du

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

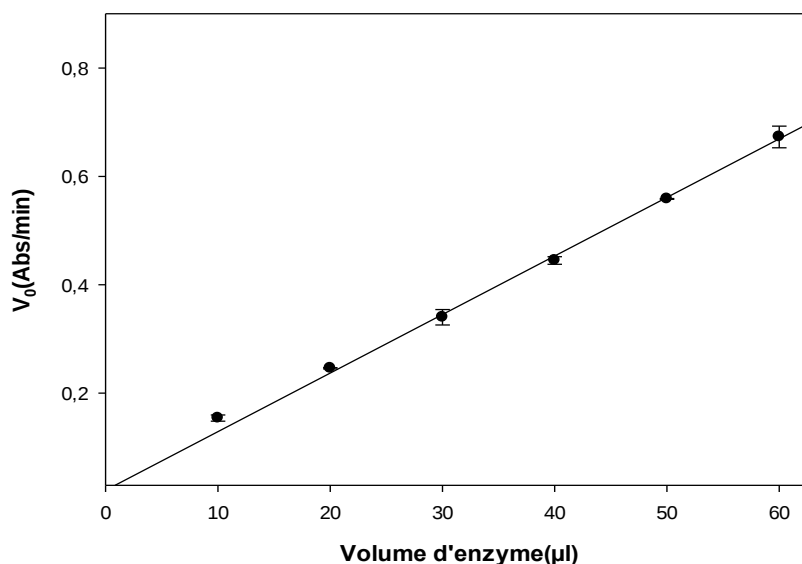


Figure 12 : Effet de la concentration de la PPO de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol (tampon acétate 0.05 M-pH 5 ; 30°C ; pyrocatechol 80 mM)

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

II.4 Détermination des paramètres cinétiques

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

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité pyrocatecholase a été étudié dans une gamme de concentration pyrocatechol comprise entre 20 et 160 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05mM à pH 5.0 à une température de 30°C).

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

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

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

Où :

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

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

$[S]$: est la concentration de catechol (mM) ;

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

Le profil d'évolution de l'activité enzymatique de la PPO de la variété des dattes (Cv Ghars) en fonction de la concentration de pyrocatechol est représenté dans la figure (12).

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

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

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

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

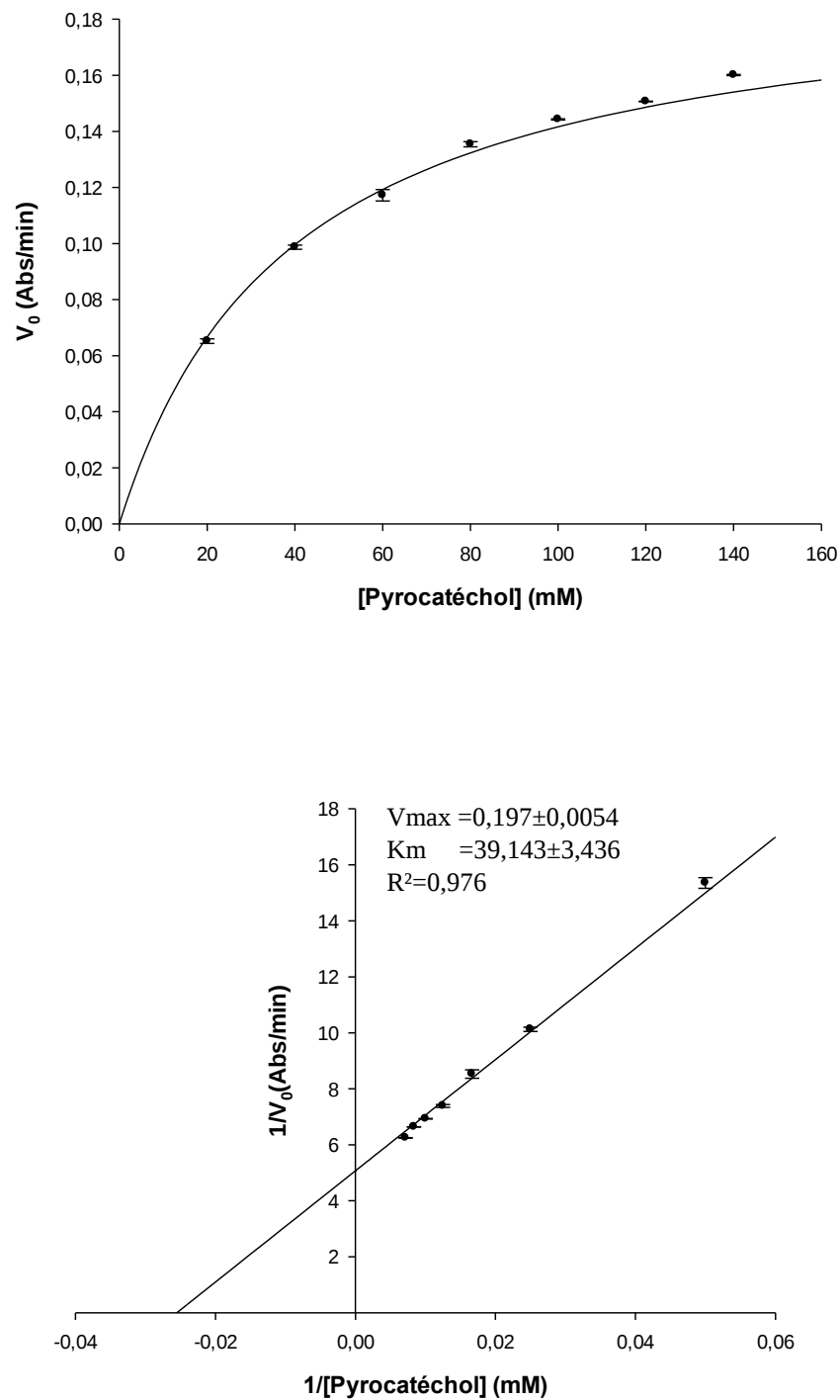


Figure 13 : Effet de la concentration du pyrocatechol sur la vitesse initiale d'oxydation par la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars : (a) Représentation de **Michaelis-Menten**, (b) Représentation de **Lineweaver-Burk**

Les valeurs des paramètres cinétiques ($V_{\max}$ et K_m , et le rapport $V_{\max}/K_m$ efficacité) obtenus à partir de la représentation graphique de double inverse $1/V=f(1/S)$ sont ainsi récapitulées dans le tableau 05.

Tableau 05 : Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de pyrocatechol comme substrat

Source	$V_{\max}$ (Abs/min)	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol/min}$)	$K_m(\text{mM})$	$V_{\max}/K_m$ ($\mu\text{mol/min/mM}$)
Ghars	0,197 $\pm$ 0,0054	0.139 $\pm$ 0,0109	39,143 $\pm$ 3,436	0,00355

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

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

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

Les valeurs de K_m et $V_{\max}$ de la PPO varies avec le type du substrat, le tampon, de la concentration ionique, de la température, de la source de l'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (Arslan et al., 1997 ; Dogan et Dogan,2003 ; Ziyan et Pekyardimci., 2004. Dogan et al., (2005) supposent que le pH affecte aussi les valeurs apparentes du K_m

II.5 Détermination de la valeur d'IC₅₀ de l'Acide caféique sur l'activité enzymatique de la PPO :

L'effet de différentes concentrations d'Acide caféique, sur l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase des dattes *Phoenix dactylifera* L cv Ghars a été étudié.

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

La valeur d'IC₅₀ est définie comme étant la concentration de l'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50% (**Chen et al., 1998**). On a obtenu une valeur

D'IC₅₀=3,487 mM $\pm$ 0,15 en présence d'Acide caféique.

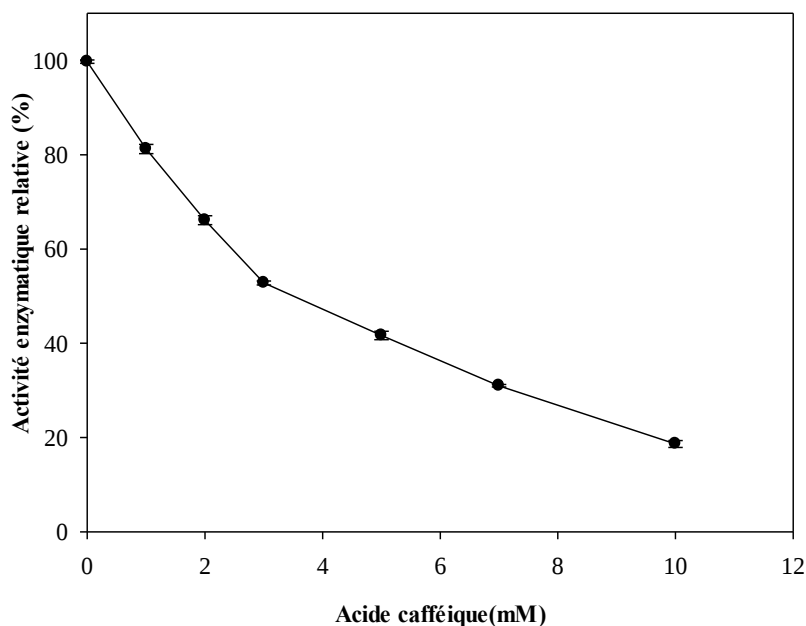


Figure 14 : L'effet de la concentration de l'Acide caféique sur l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera* L cv Ghars). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5).

Au fait le pouvoir inhibiteur du et la valeur d' IC_{50} peut être influencé beaucoup plus de la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors la mesure de l'activité de la PPO des dattes.

II.6 Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété Ghars par l'Acide caféique

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

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

Le coefficient de régression linéaire (R^2) de représentation de lineweaver-Burk en absence et en présence de cet acide organique pour le substrat utilisé (pyrocatechol) est indiqué dans le tableaux (06).

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

Tableau 06 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L*) cv ghars en utilisant le pyrocatechol comme substrat

inhibiteur	[I] mM	K_{is}	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
	0			0,583±0,024	0,989	
Acide caféique	2.5	33,5895±0,5830	125,999±11,007	0,5±0,024	0,987	Non compétitive
	5			0,357±0,024	0,986	

Les valeurs de K_{IS} indiquées dans le Tableau (06) suggère que cet acide organique inhibe l'efficacité l'activité de la PPO de la variété Ghars présence de pyropyrrocatechol, de même ce tableau montre que les représentations graphiques de $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$, est une série de courbes parallèles, avec une diminution de la valeur V_{max} et pareillement, augmentation du K_m .

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de pyropyrrocatechol par la PPO des dattes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de ces acides organique, agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations

graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk. Les résultats ainsi trouvés est représenté dans la figure (15).

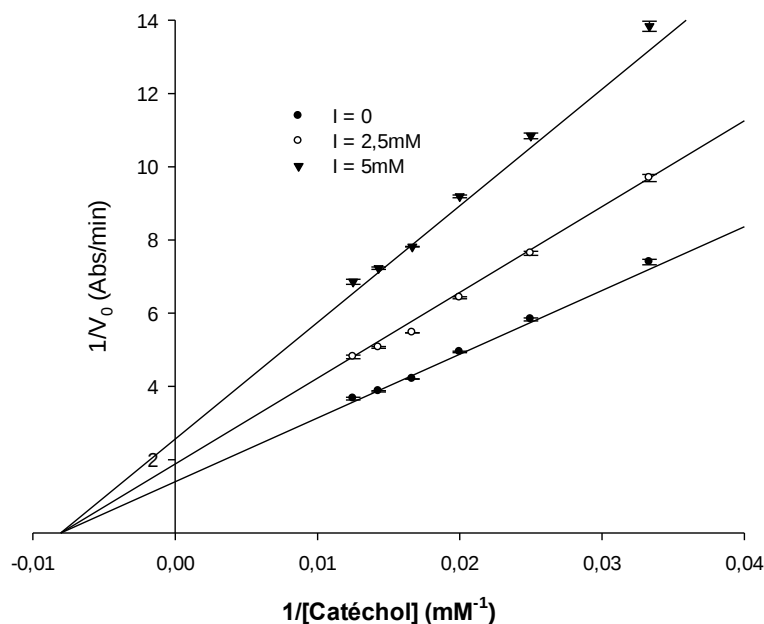


Figure 15 : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Ghars*) par l'Acide caféique. Les concentrations d'Acide caféique sont 0 (●), 2,5 (○), et 5 (▼)

En présence de l'Acide caféique (fig 15) nous remarquons une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ($1/[S]$) mais de différentes pentes. Ceci indique que le type d'inhibiteur est non compétitif pour cet acide organique

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

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_i , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Comme s'est indiqué dans les (Tableau 06), le constante d'inhibition (K_{Is}) pour l'Acide caféique, utilisant le pyrocatechol comme substrat 33,5895mM

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

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

Avec :

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

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

$$K_I = K_{IS}$$

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

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

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

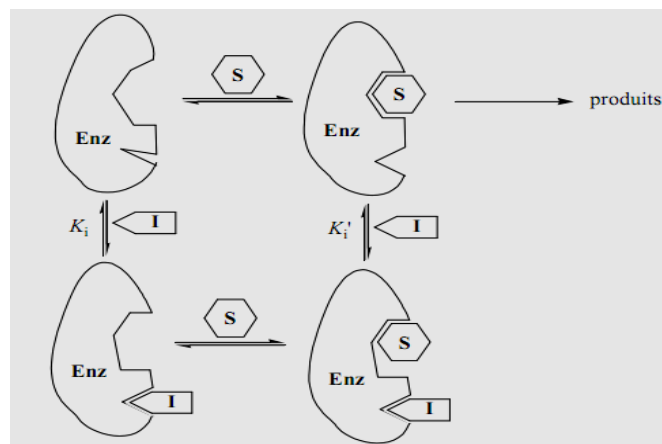


Figure 16: Représentation de l'inhibition non compétitive
(Keillor, 2004)

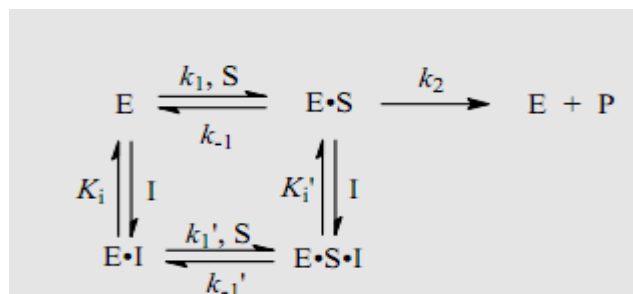


Figure 17 : Schéma de type **Michaelis-Menten** de l'inhibition non compétitive
(Keillor, 2004)

(Urszul et al. 2007) ont trouvé que l'Acide caféique est un inhibiteur non compétitif de la PPO de brocoli *Brassica oleracea* var. *botrytis italica* lorsque le pyrocatechol est utilisé comme substrat. Par contre la PPO de céleri *Apium graveolens* L. présente une inhibition de type compétitif (Tulin et Gulay, 2006).

L'inhibition de la PPO par l'Acide caféique peut être expliquée par son effet chélateur avec le cuivre du site actif de l'enzyme, et aussi par son pouvoir acidulant en abaissant le pH du produit afin de minimiser l'activité de la PPO, à des valeurs de pH inférieures de 4, l'enzyme a peu d'activité en raison de la perte de cuivre du site actif

(Suttirak et Manurakchinakorn, 2010).

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

L'efficacité de l'Acide caféique de retarder le brunissement peut être améliorée par l'addition d'un agent anti-brunissement possédant un mécanisme d'inhibition différent et ou une meilleure stabilité.

CONCLUSION

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

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

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

D'après les résultats obtenus à partir de ce travail, on conclut que, l'acide caféique présente un mécanisme non compétitif.

L'acide caféique inhibe la PPO en se fixant sur le complexe enzyme-substrat (ES), qui se comporte comme étant un inhibiteur non compétitif vis-à-vis du catéchol comme substrat et d'une manière réversible.

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

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

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

- Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J.(2010).** *Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. Electrochimica Acta.* 55: 2363–2367.
- Ameer, Q & Adeloju, S.B.(2009).** *Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. Sensors and Actuators B.* 140: 5–11
- Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I.(1997).** *Polyphenol oxidase from Allium sp.. Journal of Agricultural and Food Chemistry.*45:2861–2863.
- Asav, E., Yorganci, E.,Akyilmaz,E.(2009).***An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. Talanta.* 78 : 553–556.
- Aydemir, T.(2010).** *Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from Rosmarinus officinalis L. International Journal of Food Properties.* 13: 475-485.
- 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.

- B -

- Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M.(2005).** *Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (Penaeus japonicus).” Journal of Food Biochemistry.* 29: 470-485.
- Bertrand G.(1896).***Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelque champignon. C. R. Acad. Sc.,* 123, 463-465.

- C -

- Chutintrasri,B & Noomhorm,A.(2006).** *Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. Lebensmittel-wissenschft.,* 36, 492-495.
- Cui, Y., BarforD, J.P.,Renneberg, R.(2006).** *A disposable, screen-printed electrode for the ampero-metric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. Analytical Sciences.* 22 : 1279-1281.
- Dalmadi,I.,Rapean,G.,Loey,An.,Smout,C.,Hendrickx ,M.(2006).** *Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (Fragaria ananassa) polyphenol oxidase: a kinetic study. Journal of Food Biochemistry,*V 30, p 56–76

- D -

- Dogan, M & Dogan, S.(2003).** *Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii). J Food Chem. 39: 1-9.*
- Dogan,S., Turan,Y., Erturk,H., Arslan,O.(2005).** *Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (Cynara scolymus L.). J Agric Food Chem., 53, 776–785.*
- Doğru,Y,Z &.,Erat,M(2012).** *Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (Petroselinum crispum, Apiaceae) Food Research international,49, 411-415*
- Duran,N.,Esposito,E.(2000).** *Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. Appl. Catal. B Environ. 28: 83–99.*

- E -

- Eicken, C., Krebs, B .,Sacchettini, J.C.(1999).** *Catechol oxidase:structure and activity.Catalysis and regulation.Current Opinion in Structural Biology. 9: 677-683.*
- Erat,M.,Nuri,Y.Gülşah,S,A.,Demirkol,A.(2010).** *Partial characterization of polyphe nol oxidase from a hybridized wheat (Triticum aestivum L.) European Food Research and Technology.23,6,899-905.*
- Es-Safi, N.E., Cheynier, V.,Moutounet, M.(2003).** *Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. J Food Comp Anal. 16:535–553.*

- F -

- Fan, Y & Flurkey, W.H.(2004).** *Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. Phytochemistry. 65: 671-678.*

- G -

- Ghazi, F., et Sahraoui, S. (2005).** *Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte*

communes : Tantbouchet et Hamraia. *Mémoire d'Ingénieur. Institute national d'agronomie. Alger, 81 p.*

Gilles, P. (2000). *Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS, 110 p*

Garcia-Borrón ,J.C., Solano F.(2002). *Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. Pigment Cell Res. 15: 162-173*

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

Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G.(2010). *Laccases: a never-ending story. Cell Mol Life Sci. (3):369-385*

Goyeneche,R., Di Scala,K , Roura.(2013).*Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(Raphanussativus var.sativus) Food Science and Technology.(54), 57-62*

- H -

Haldane, J.B.S.(1930). *The enzymes. Green and Co Ed, Londres.*

Hasegawa, S. and Maier, V. P. (1980). *Polyphenol oxidase of dates. J. Agric. Food Chem. 28, 891-893.*

- J -

Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G.(1998). *Agaricus bisporus browning: a review. Mycol. Res. 102 : 1459-1483*

Jiang, Y. M.(1999). *Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. Food Chemistry. 66:75–79.*

- K -

Keilin, D & Mann, T.(1938). *Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. Proceedings of the Royal Society B. 125: 187-204*

Khatun, S., Absar, N ., And Ashraduzzaman, M.(2001). *Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoxidase from Sajna*

(*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4: 1129-1132.

Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J., Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol*; 5: 1084–90.

Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M. (2008). Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171–174.

Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. (2006). Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*. 101: 778-785.

Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K. (2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.). *Food Chemistry*. 110: 328-333.

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

- L -

Loera, C.O., Pérez, P.M., Cristina, I.B., Rodríguez, J.R and Villaseñor, O.F. (2006). Advances in Agricultural and Food Biotechnology. 323-340.

- M -

Majid, Y., Moridania, B., Arnosiraki, A., Tatiana-Chevaldina, A., Hughscobie, Peter., O'Brien J. (2004). Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*. 145(2): 213-23.

Marques, L., Fleuriot, A., Macheix, J. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem*. 33, 193-200.

Martinez V.M. & Whitaker, R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.

Mayer, A.M.; Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science. 373-398.

- Mesquita,V,L,V.,Queiroz,C.(2013).***Chapter 10 ;Enzymatic Browning. Biochemistry of Foods (Third Edition),387-418.*
- Matallah, M. (2004).** *Contribution à l'étude de la conservation des dates variété Deglet-Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingénieria, INA. El-Harrach. Alger. 79p*
- Messaid, H. (2007).** *Optimisation du processus D'immersion- Réhydratation du système dattes sèches-jus d'Orange. Mémoire du diplôme de Magister. Université M'Hamed BOUGUERA-Boumerdès,96p.*
- Muñoz-Muñoz ,Jl., Garcia-Molina,F., Varon,R., Tudela,J., Garcia,F., Rodríguez-López,Jn .(2010)** *New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase . J Math Chem. .*
- Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. (2010).** *A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 64: 189–194.*
- Mayer A.M.,(2006).** *Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. Phytochemistry., 67, 2318–2331*
- Mayer, A.M.; Harel, E. 1991.** *Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science. 373-398.*
- Munier, P. (1973).** *Le palmier dattier. Ed. , Maisonneuve et Larose, Paris, 367p.*
- Munier, P. (1973).** *Le palmier-dattier. Techniques agricoles et productions tropicales, Maisonneuve et Larose, Paris, France. 221p.*

- N -

- Na-Na,L.,Wei L,Dai-Jie,W.,Yi-Bin Z.,Xiao-Jing ,L.,Xiao W A., Sheng-Bo ,Li.(2013.)** *Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of Lonicera japonica Thunb.Chemistry, V 138,P478- 483.*

Noui, Y. (2007). *caractérisation physico-chimique comparative des deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de magister, université Mohamed BOUGUERA Boumerdès, 112 p.*

- O -

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

- P -

Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M And Garcia-Carmona, F.(2001). *Monophenolase activity of latent Terfezia clavaryi tyrosinase: Characterization and histochemical localization. Physiologia Plantarum. 133: 203-209*

Polaina, J & Maccabe, A P.(2007). *Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p*

- Q -

Queiroz ,C.,Maria,L M,Fialho ,E.,Vera.,Lúci,A.(2008). *Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. Food Reviews International. 24, 361–375*

Quinten, M. (1996). *Diversité et structure génétique des populations algérienne de Fusarium oxysporum agent de la fusariose vasculaire (bayoudh) du palmier dattier, Mémoire de doctorat, El Harrach, Alger. 52 p.*

- R -

Rodriguez C,S & Toca Herrera ,J.L.(2006). *Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol Adv 24 (5):500-13.*

- S -

- Sakiroglu H., Kufrevioglu I.O., Kocacaliskan I., Oktay M., Onganer Y., (1996).** *Purification and characterization of Dog-rose (Rosa dumalis Rechst.) polyphenol oxidase. J. Agric. Food. Chem., 44, 2982–2986.*
- Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N.,(2003).** *Mushroom tyrosinase: recent prospects. J. Agric. Food Chem. 51, 2837–2853.*
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S.(2004).** *Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. Anal. Chem. 76: 178-183*
- Sayah, Z., et Ould El Hadj, M. D. (2010).** *Etude comparative des caractéristiques physicochimiques et biochimiques des dattes de la cuvette de Ouargla. Annales des Sciences et Technologie. (1), Vol. 2: 92p.*
- Simsek, S., & A. Yemenicioglu.(2007).** *Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. Process Biochemistry.*
- Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F.,Sánchez-Ferrer, A.(1998).** *Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. J. Agric. Food Chem. 46: 4924-4930.*
- 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.*

- T -

- Todaro,A.,Cavallaro,R.,Argento,S., Brancand,F.,Spagna,G.(2011).** *Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (solanum melongena L.) .J. Agric. Food Chem,59 (20),11244–11248.*
- Tomita Y, Hariu A, Mizuno C, Seiji M.(1980).** *Inactivation of tyrosinase by dopa. J Invest Dermatol.75(5):379-82.*
- Toutain, G. (1996).** *Rapport de synthèse de l'atelier "Techniques culturelles du palmier dattier". In :Options méditerranéennes, série, N° 28. Le palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain. 201-205 p.*

- U -

Ullah, M.R.(1991). *Tea. In Food Enzymotogy, (P.F. Fox, ed.) pp. 163-187, Elsevier Science Publishing, New York*

Ünal M.Ü.(2007.) *Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (Musa cavendishii). Food Chemistry., 100, 909-913.*

- V -

Vámos-Vigyázó, L..(1981). *Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15: 49-127.*

Van Gelder,C.,W.G., Flurkey, W.H, Wichers, H.J.(1997). *Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. Phyto-chemistry 45, 1309- 1323.*

Virador,V,M.,Grajeda,J,P,R.,Blanco-Labra,L.,Mendiola-Olaya,E.,Smith,M ,G.,Moreno,A., Whitaker.,J,R.(2010). *Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (Vitis vinifera) Polyphenol Oxidase. Agric. Food Chem. , 58, 1189–1201.*

Voet,D., Voet ,J,G.(2011). *Biochemistry, 4th Edition. Courier/Kendallville.USA.*

- W -

WANG, J., JIANG, W., WANG, B., LIU, S., GONG, Z., AND LUO, Y.(2007). *Partial properties of polyphenol oxidase in mango (Mangifera indica L. cv. “Tainong”) pulp. Journal of Food Biochemistry. 31: 45–55.*

Whitaker, J.R.(1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences, second ed. Marcel Dekker, New York. 271–556.*

Whitaker ,J & Lee,C,Y.(1995). *Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In Enzymatic browning and its prevention. J. Whitaker,C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.*

- X -

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

- Y -

Yagar, H.,& Sagiroglu, A. (2002) *Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. Turk. J. Chem. Vol. 26, pp. 97-103.*

Yamada, K., Akiba,Y.,Shibuya,K., KashiwadA, A., Matsuda, K., and hirata, M.(2005).*Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. Biotechnol. Prog. 21: 823-829*

Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N. And Hayashi, N. (2000).*Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (Musa sapientum L.) pulp. J. Agric. Food Chem. 48,2732-2735*

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

- Z -

Zawistowski,J., Biliaderis, C.G.,Eskin, N.A.M.(1991). *Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.*

Zhang,G,H.,, Wang,Y,F.,, Zhang,X,Q, ,Nag,T,Z., Wang,H,X.(2010). *Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom Clitocybe maxima. Process Biochemistry.V45, Pages 627–633*

Zhou,H,W & Feng,X.(1991). *Polyphenol oxidase from yali pear (Pyrus bretschneideri). Journal of the Science of Food and Agriculture,V57, p 307–313.*

Ziyan, E And Pekyardimci, S.(2004).*Purification and characterization of pear (Pyrus communis) polyphenol oxidase. Turk J Chem.28:547-557.*

RÉSUMÉ

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

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'inhibiteur utilisé. La valeur d'IC 50 ainsi obtenue est $3,487 \pm 0.15$ mM. La représentation de **Lineweaver-Burk** indique que l'acide caféique est un inhibiteur non compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{IS} égale à $33,5895 \pm 0,5830$ mM.

Mots clés : dattes, PPO, acide caféique, Inhibition, Brunissement enzymatique, spectrophotométrie, ghars

ملخص

يهدف هذا البحث إلى دراسة تثبيط بوليفينول أوكسيديز في التمر (نوعية الغرس) بواسطة حمض الكافيين. تم قياس نشاط PPO الطيفي عند 410 نانومتر عند درجة الحموضة 5 وعند درجة حرارة 30 درجة مئوية في وجود الكاتيكول كركيزة.

درجة تثبيط PPO يعتمد على تركيز المثبط المستخدم. قيمة IC 50 التي تم الحصول عليها هي $0.15 \pm 3,487$ ميلي مول. يشير تمثيل **Lineweaver-Burk** إلى أن حمض الكافيين هو مثبط غير تنافسي لنشاط PPO بقيمة KIS $33,5895 \pm 0,5830$ ميلي مول.

الكلمات المفتاحية: التمر ، PPO ، الكاتيكول ، حمض الكافيين ، التثبيط ، الاسمرار الإنزيمي، جهاز المطياف الضوئي ، غرس

ABSTRACT

This work aims to study the inhibition of polyphenol oxidase (PPO) dates (*Phoenix dactylifera* L cv *Ghars*) by caffeic acid. PPO activity was measured spectrophotometrically at 410 nm at pH 5 and at 30 ° C in the presence of catechol as substrate.

The degree of inhibition of PPO depends on the concentration of the inhibitor used. The value of IC 50 thus obtained is $3,487 \pm 0.15$ mM The **Lineweaver-Burk** representation indicates that caffeic acid is a noncompetitive inhibitor of PPO activity with a KIS value of $33,5895 \pm 0,5830$ mM.

Key words: dates, PPO, catechol, caffeic acid, Inhibition, Enzymatic browning, ghars, spectrophotometry

