

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

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

Etude cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase de *Phoenix dactylifera* L cv Deglet-Nour par l'acide ascorbique et l'acide oxalique

Présenté par :

M. ATHMANI Chawki

Mlle. Djellali Souad

Devant le jury :

Président: GOUZI Hicham

Rapporteur : BENACEUR Farouk

Examineur: LEBOUKH Mourad

Université de Laghouat

Université de Laghouat

ENS de Ouargla

Soutenu publiquement le : 15 Mai 2018.

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

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

**Etude cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase
de *Phoenix dactylifera* L cv Deglet-Nour par
l'acide ascorbique et l'acide oxalique**

Présenté par :

M. ATHMANI Chawki

Mlle. Djellali Souad

Devant le jury :

Président: GOUZI Hicham

Rapporteur : BENACEUR Farouk

Examineur: LEBOUKH Mourad

Université de Laghouat

Université de Laghouat

ENS de Ouargla

Soutenu publiquement le : 15 Mai 2018

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

*Nous voudrions exprimer notre sincère gratitude à notre encadrant Mr **Benaceur Farouk**, pour la qualité de son encadrement, ses conseils judicieux, ses aides, ses encouragements et pour nous avoir guidée durant toute la période de notre travail malgré ses nombreuses préoccupations.*

*Nous remercions chaleureusement Mr **Gouzi Hichem**, pour ses conseils, ses directives et ses remarques constructives*

Nous avons eu le privilège de bénéficier de sa large expérience à travers les précieuses remarques apportées à notre travail.

*Et aussi nos remerciements s'adressent en particulier
tous les enseignants de département de biologie*

*En définitive, nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin, à la réussite de ce travail pour lequel nous avons tant consacré en y mettant aussi
tout notre cœur.*

Merci 

Dédicaces

*Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à
tous Ceux qui me sont chers,*

A Ma chère Mère

*Qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a
jamais cessé de prier pour moi.*

A la Mémoire de Mon Père

*Puisse Dieu, le tout puissant L'avoir en sa sainte
Miséricorde*

*A Mes Chers Frères, et Ma plus Belle Sœur "ASOUMA" et
Son fils " Mohamed Islam "*

A Ma Chère Amie " Souad Djellali "

*A tout Ma Famille " ATHMANI " Et à tous Ceux Que J'aime
A tout Personnes Qui M'ont Encouragé ou Aidé au
Long de Mes études.*

Chaouki



Dédicaces

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

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

A la Mémoire de Mon Très Cher Père

Qui je pense serais très fière de moi, Puisse Dieu, le tout puissant L'avoir en sa sainte miséricorde.

A Ma Très Chère Mère

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel, et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être,

Puisse dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A Toute Ma Grande Famille, " DjellalI "

A Mes Meilleurs Amies Chacune à Son Nom.

A la fin je dédie très chaleureusement ce mémoire à mon

Binôme d'étude " Athmani Chaouki " qui ma aidé et supporté dans Les moments difficiles.

Souad



Tableau des matières

	page
Introduction.....	01
Partie I : Synthèse bibliographique Chapitre 01 : Le palmier dattier et La datte	
I. Le palmier dattier.....	03
I.1.Historique sur le palmier dattier	03
I.2.Généralité sur le palmier dattier <i>Phoenix dactylifera L</i>	03
I.3.Position systématique.....	04
I.4.La classification botanique.....	04
I.5.Nom vernaculaire et synonyme.....	05
I.6. Répartition géographique du palmier dattier.....	05
I.6.1. Dans le monde.....	05
I.6.2. En Algérie.....	06
II. Les Dattes.....	07
II.1. Définition de la datte.....	07
II.2.Formation et évolution de la datte.....	08
II.3.Classification des dattes.....	09
II.4.Les variétés de dattes.....	10
II.5.Composition biochimique de la datte.....	11
II.5.1.Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe ".....	11
1. L'eau.....	11
2. Les sucres.....	11
3. Protéines et acides aminés.....	12
4. Les lipides.....	12
5. Fibres.....	12
6. Les vitamines.....	13
7. Les éléments minéraux.....	13
8. Les composés phénoliques.....	13
9. Les enzymes des dattes.....	14
II.5. 2. Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau ".....	15
II.6.Valeur énergétique et nutritionnelle de la datte	15

Chapitre 02 : Généralité sur le brunissement enzymatiques et la PPO

I. Le brunissement enzymatique des dattes.....	16
I.1. Définition.....	16
I.2. Déclenchement, conséquences et catalyse du brunissement enzymatique.....	16
II. La Polyphénol oxydase (PPO)	18
II.1. Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase.....	18
II.2. Définition, nomenclature et classification de la PPO.....	18
II.2.1. Définition.....	18
II.2.2. Nomenclature.....	19
II.2.3. Classification	19
II.3. Source, localisation et rôle de la PPO	20
II.3.1. Source et localisation	20
II.3.2. Rôle de la PPO	20
II.4. Caractéristiques réactionnelles et structurales de la PPO	21
II.4.1. Caractéristiques réactionnelles.....	21
II.4.1.a. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1).....	21
II.4.1.b. Activité o-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1).....	21
II.4.1.c. Activité laccase (E.C. 1.10.3.2).....	21
II.4.2. Caractéristiques structurales.....	23
II.4.2.1. Architecture moléculaire globale	23
II.4.2.2. Le site actif de PPO.....	23
II.5. Effet du pH sur l'activité de la PPO.....	24
II.6. Effet de la température sur l'activité de la PPO	24
II.7. Les substrats de la PPO.....	25

II.8. Les effecteurs de la PPO.....	26
II.8.1. Les activateurs.....	26
II.8.2. Les inhibiteurs.....	26
II.8.2.1 Méthodes physiques.....	27
II.8.2.2 Méthodes chimiques.....	28
II.8.2.3 Les inhibiteurs de synthèse	28
II.8.2.4 Les inhibiteurs naturels.....	29

Parti II : Etude expérimentale

Chapitre 01 : Matériels et méthodes

1. Matériels	30
1.1 Matériels biologiques	30
1.2 Produits chimiques.....	30
2. Méthodes.....	30
2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO.....	30
2.2 Mesure de l'activité de PPO.....	31
2.3 Effet du pH.....	32
2.4 Etude de la stabilité thermique.....	32
2.5 Effet de la concentration de l'enzyme.....	32
2.6 Détermination des paramètres cinétiques.....	33
2.7 Détermination des valeurs d'IC ₅₀	33
2.8 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO.....	33
2.9 Analyse des résultats expérimentaux	34

Chapitre 02 : Résultats et discussions

1. Extraction du polyphénol oxydase de Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L).....	35
2. Les conditions optimales de l'activité pyrocatechol oxydase.....	36
2.1 Effet du pH	36

2.2 Etude de la stabilité thermique.....	38
2.3 Détermination des paramètres cinétiques.....	40
2.4 Effet de la concentration de l'enzyme.....	45
3. Détermination de la valeur d'IC ₅₀ de l'acide ascorbique et l'acide oxalique sur l'activité enzymatique de la PPO	46
4. Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété Deglet-Nour par l'acide oxalique.....	49
Conclusion	55
Références bibliographiques	57

Liste des figures

N° De figure	titre	page
Figure 01	<i>Phoenix dactylifera</i> L Deglet Nour utilisé pour l'échantillonnage.....	04
Figure 02	Carte de répartition géographique du genre <i>Phoenix</i> dans le monde.....	05
Figure 03	Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du dattier.....	07
Figure 04	Les réactions catalysées par la polyphénol oxydase.....	22
Figure 05	Mécanisme d'action de polyphénol oxydases.....	22
Figure 06	Les variétés de dattes (<i>Phoenixdactylifera</i> L.) cv DegletNour.....	30
Figure 07	Extrait brut de la datte (<i>Phaenix dactylifera</i> L CV DegletNour) avant et après centrifugation.....	31
Figure 08	Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) « Deglet Nour».....	35
Figure 09	Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactilyfera</i> L.) cv Deglet Nour en -fonction du pH.....	37
Figure 10	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) après 10 min de traitement thermique.....	39
Figure 11	Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par la catéchol oxydase de Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.):..... (a) Représentation de Michaelis-Menten , (b) Représentation de Lineweaver-Burk .	42
Figure 12	Effet de la concentration de la catéchol oxydase de Deglet Nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L) sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol.....	45
Figure 13	L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de Pyropyrocatechol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Deglet Nour).....	46
Figure 14	L'effet de la concentration de l'acide oxalique sur l'oxydation de Pyropyrocatechol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Deglet Nour).....	47
Figure 15	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Deglet Nour) par l'acide oxalique.....	50
Figure 16	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L , Deglet Nour) par l'acide ascorbique.....	51
Figure 17	Représentation de l'inhibition non compétitive.....	52
Figure 18	Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive.....	52
Figure 19	Représentation de l'inhibition compétitive.....	53
Figure 20	schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive.....	53

Liste des tableaux

N° De tableau	titre	page
Tableau 01	Stades d'évolution de la datte	08
Tableau 02	Caractéristiques morphologiques des trois variétés des dattes.....	10
Tableau 03	.. Teneur en eau (en % du poids frais) des variétés <i>Deglet Nour</i> et <i>Ghars</i>).....	11
Tableau 04	La teneur (%) en sucres de quelque variété des dattes algériennes.....	11
Tableau 05	Composition de la datte <i>Deglet Nour</i> mure en acides gras	12
Tableau 06	Teneurs en fibres totales, solubles et insolubles de la datte <i>Deglet Nour</i>	12
Tableau 07	Teneurs en vitamines et minéraux de la pulpe de <i>Deglet Nour</i>	13
Tableau 08	Teneur en composés phénoliques de variétés de dattes algériennes.....	14
Tableau 09	Composition biochimique des noyaux des dattes Irakiennes.....	15
Tableau 10	Les valeurs de pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales.....	38
Tableau 11	Paramètres cinétiques de quelques polyphénols oxydases d'origine végétale.....	44
Tableau 12	Les valeurs d'IC ₅₀ de l'acide ascorbique comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats.....	48
Tableau 13	Les valeurs d'IC ₅₀ de l'acide oxalique comme inhibiteur trouvée à partir différentes sources de PPO et le catéchol comme substrats.....	48
Tableau 14	Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L</i>) cv <i>Deglet Nour</i> en utilisant le pyroprocatechol comme substrat.....	49
Tableau 15	Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L</i>) cv <i>Deglet Nour</i> en utilisant le pyroprocatechol comme substrat.....	49

Liste des abreviations

AR	L'activité enzymatique résiduelle de la PPO
Cu A	Cuivre de la chaîne A
Cu B	Cuivre de la chaîne B
DIECA	Le diéthylthiocarbamate de sodium
EDTA	L'éthylène diamine tétra-acétique acide
FAO	Food and agricultural organization
His	Histidine
IC₅₀	La concentration de l'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 travail avait comme objectif d'étudier l'effet de l'acide ascorbique et l'acide oxalique sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes « *Phoenix dactylifera L* » cv *Deglet Nour*.

L'activité de PPO a été suivie en utilisant le spectrophotomètre à 410 nm en conditions optimales en terme de pH 5.5 et température 30°C et ceci en présence de catéchol comme substrat. Une inhibition significative a été remarquée en appliquant les deux acides organiques avec plus d'efficacité pour l'acide ascorbique.

Les valeurs d'IC₅₀ ainsi obtenues sont 0,228±0,024mM et 2,40±0,38 mM pour l'acide ascorbique et oxalique respectivement. De même La représentation de **Lineweaver-Burk** indique que l'acide ascorbique joue le rôle d'un inhibiteur compétitif tandis que l'acide oxalique présente un mécanisme non compétitif avec des valeur de K_i égales 0,1876±0,0098 mM et K_{is} 3,4091±0,0651 mM .respectivement .

Mots clés: *Phoenix dactylifera. L*, PPO, acide ascorbique, acide oxalique, Inhibition, catéchol, Brunissement enzymatique.

Introduction

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L, est une culture de plantation importante pour de nombreux pays du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord, y compris l'Algérie.

Le palmier dattier est l'arbre fruitier par excellence de la zone saharienne où il joue à la fois un rôle économique, grâce à la production des dattes qui constituent la base de l'alimentation humaine et animale et un rôle écologique (**Chehma et Longo, 2001 ; Yahia et Kader, 2011**).

L'Algérie est comptée parmi les principaux pays producteurs du monde de la datte sa production en 2013 a été estimée à 848,199 tonnes (**FAOSTAT, 2013**).

Selon les rapports de la FAO (2003), l'Algérie était le 2ème pays producteur de la datte Deglet Nour dans le monde avec un million de palmiers dattiers. Notre pays exporte plus des dattes naturelles que des dattes traitées et transformées. Sachant que les dattes traitées sont plus populaires et plus commercialisées que les dattes naturelles (**Liu, 2003**).

La qualité et la valeur nutritionnelle des fruits de dattes ont été signalées par de nombreux chercheurs (**Al-Farsi et al., 2007 ; Barreveld, 1993**). Elles sont riches en sucres simples comme le glucose et le fructose, elles constituent une bonne source de fibres et de certains minéraux essentiels et renferment en outre des composés phénoliques à maintes vertus thérapeutiques. En effet, ces molécules attirent récemment une attention accrue dans le domaine de la nutrition et de la médecine en raison de leurs propriétés et avantages potentiels pour la santé.

Cependant, ces derniers sont sujets à l'oxydation enzymatique conduisant à l'installation de brunissement ce qui provoque des changements de couleur des fruits (**Lu et al., 2007**). Notant que l'apparence, qui est considérablement influencée par la couleur, est l'un des premiers attributs utilisés par les consommateurs dans l'évaluation de la qualité des aliments. La couleur des fruits peut être influencée par des pigments naturels tels que les chlorophylles, caroténoïdes et anthocyanes ou par des pigments résultant de réactions de brunissement (**Lozano, 2006**).

En effet, l'un des problèmes majeurs de la production et de la commercialisation des fruits est leur brunissement après récolte. Influencé par la manipulation, le traitement et le stockage, ce phénomène est considéré comme probablement la première cause de perte de la qualité post-récolte des fruits, voire même, l'altération profonde de leur saveur et de leur valeur nutritive

Le brunissement enzymatique apparaît suite à l'action d'enzymes appelées polyphénol-oxydases et peroxydases ; ce qui peut conduire à la production de mélanines.

En effet, L'activité de ces deux enzymes peut réduire de façon significative la qualité des fruits après la récolte. Ainsi, le contrôle des activités de ces enzymes est très important pour la préservation des qualités nutritionnelles et propriétés organoleptiques des fruits et légumes (**Šukalović *et al.*, 2010 ; Slatnar *et al.*, 2010**).

Cette étude a pour objectif :

- la mise en évidence de l'activité enzymatique de Polyphénol-oxydase au sein d'une variété de datte étudiée.
- l'influence des différents pH et des différentes températures sur l'activité de cette enzyme ainsi que la détermination de leur pH et température optimale.
- L'effet de certains inhibiteurs de synthèse sur la stabilité de l'activité enzymatique.

En effet, la compréhension des facteurs principaux qui influencent l'activité de la PPO est nécessaire pour envisager des moyens d'inhibition et/ou de contrôle de cette dernière au sein de fruit de Deglet Nour.

Le présent travail s'organise en quatre chapitres. Dans un premier temps, nous abordons la synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres.

- Le **1^{er}** s'articule autour des généralités sur le palmier dattier, la datte et de ses constituants, intérêt et altération.
- Le **2^{ème}** chapitre est consacré à la description du phénomène du brunissement enzymatique avec l'enzyme responsable **PPO**, la réaction d'oxydation et leurs substrats.
- La partie expérimentale décrit la méthodologie et les techniques utilisées dans l'étude de ce travail dans un troisième chapitre et dont le quatrième comprend les résultats obtenus et la discussion.

Suivi par une conclusion générale avec les perspectives envisagées pour poursuivre ce travail.

Une liste des références bibliographiques citées figure à la fin du manuscrit.

Partie 01 :
Synthèse
Bibliographique

Chapitre 01 :
Le palmier dattier et
La datte

1. Le palmier dattier

I.1. Historique sur le palmier dattier :

Le palmier dattier est l'un des arbres fruitiers le plus anciennement cultivé. Les documents les plus anciens en Mésopotamie (Irak actuellement) montrent que sa culture se pratique depuis 3500 ans avant J.C. Dans la même époque, les dattiers étaient cultivés en Irak occidental, à travers l'Arabie et jusqu'en l'Afrique du Nord (**Mazoyer, 2002**), (**Gilles, 2000**).

Ce n'est qu'au milieu du XIX^{ème} siècle que les plantations furent établies dans les vallées chaudes de Californie et dans l'Arizona méridional. Au cours des siècles et au Maghreb, le palmier a fait l'objet de différentes plantations réparties dans des lieux disposants relativement d'eau. Le palmier dattier permet une pérennité de la vie dans les régions désertiques. Ses fruits sont un excellent aliment grâce à leurs effets toniques et légèrement laxatifs (**Munier, 1973**).

I.2. Généralité sur le palmier dattier *Phoenix dactylifera L* :

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 (**Djerbi, 1994**).

Le palmier est une composante essentielle de l'écosystème oasien, grâce à sa remarquable adaptation aux conditions climatiques, la haute valeur nutritive de ses fruits, les multiples utilisations de ses produits et sa morphologie favorisant d'autres cultures sous-jacentes (**Bousdira et al., 2007 ; Bakkaye, 2006**).

Comme toutes les espèces du genre *Phoenix*, il existe des arbres mâles appelés communément **dokkars** ou pollinisateurs et des arbres femelles **Nakhla** (**Chaibi, 2002**).

C'est une espèce arborescente connue pour son adaptation aux conditions climatiques trop sévères des régions chaudes et sèches (**Bouguedri et al., 1994**).



Figure 1: *Phoenix dactylifera* L Deglet Nour utilisé pour l'échantillonnage (Messaid, 2007).

I.3. Position systématique :

La plante *Phoenix dactylifera* L., C'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.4. La classification botanique :

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante Angiosperme Monocotylédone, classée comme suit:

- **Embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Monocotylédones
- **Groupe :** Spadiciflores
- **Ordre :** Palmales
- **Famille :** Arecaceae (Palmaceae)
- **Sous- famille :** Coryphoïdaea
- **Tribu :** *Phoeniceae*
- **Genre :** *Phoeni*

➤ **Espèce : *Phoenix dactylifera* L.**

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

I.5. 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.6. Répartition géographique du palmier dattier :

I.6.1. 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 débutée réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés irakiennes (Bouguedoura, 1991 ; Matallah, 2004).

Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie .Son nombre dans le monde être estimé à 100 millions d'arbres (Matallah, 2004).

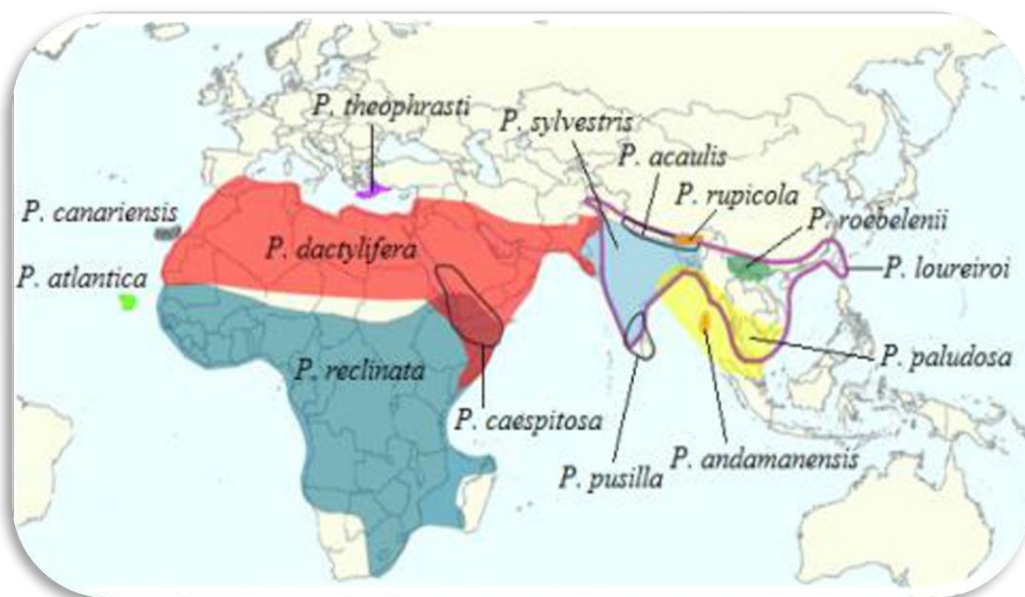


Figure 02: Carte de répartition géographique du genre *Phoenix* dans le monde (<http://ethnoecologie.revues.org/1524>)

I.6.2. 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, 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% (**Anonyme, 2002**).

Notons que sur un nombre de 13,50 millions de plants 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... (**Quinten, 1996**).

I. Les Dattes

II.1. Définition de la datte :

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'une seule graine, appelée communément noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair (Fig3). La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée de :

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

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouges, brunes plus ou moins foncées (**Amellal, 2008**).

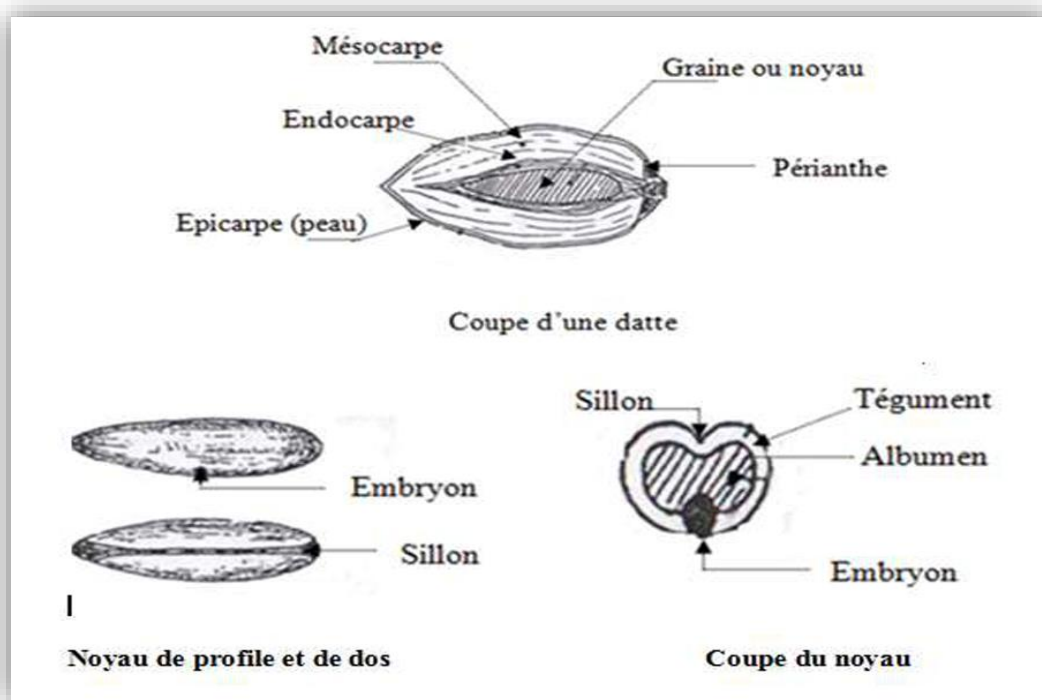


Figure 03 : Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du dattier (**Belguedj, 2002**).

II.2. Formation et évolution de la datte :

Pendant sa formation et sa maturation, le fruit passe par un certain nombre de phases, se résumant en quatre stades appelés par leurs dénominations arabes : Kimri, khalal, Routab et tamar (**Booij et al., 1992**).

On peut distinguer différents stades d'évolution de la datte; chaque stade porte une appellation particulière selon les pays. En Algérie se sont : Loulou, Khalal, Bser, Martouba et Tmer ; cependant, la majorité des auteurs ont adapté la terminologie utilisée en Irak et de nombreux pays arabes (**Al-Shahib et al., 2003**).

Tableau 01 : Stades d'évolution de la datte d'après (**Djerbi, 1994**)

pays	Stades de développement de la datte				
	I	II	III	IV	V
Irak	Hababouk	Kimiri	Khalal	Routab	Tamr
Algérie	Loulou	Khalal	Besr	Martouba	tamr
Libye	-	Gamag	Besr	Routab	Tamr
Mauritanie	Zei	Tefejena	Enguei	Blah	Tamr

Les différents stades de maturation des dattes peuvent être définis comme suit :

➤ **Bounoune, Loulou :**

Ce stade commence juste après la fécondation et dure environ cinq semaines. A ce stade, le fruit est entièrement recouvert par le périanthe et se caractérise par une croissance lente (**Djerbi, 1994**).

➤ **Blah, Khalal ou Kimiri :**

Il se caractérise par la couleur verte, un grossissement rapide du fruit, une augmentation de la concentration en tanins et en amidon, une légère augmentation des sucres totaux et de la matière sèche. Ce stade dure neuf à quatorze semaines (**Djerbi, 1994**).

➤ **Besr ou souffar :**

Au cours de ce stade, la couleur du fruit passe du vert au jaune clair, puis vire au jaune, au rose ou rouge selon les variétés. Cette phase est marquée par une augmentation rapide de la teneur en sucres totaux, de l'acidité active, par contre la teneur en eau diminue. Elle dure trois à cinq semaines (**Djerbi, 1994**).

➤ **Nokar, Routab ou 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.
- L'augmentation de la teneur des monosaccharides qui donne un goût sucré au fruit. Ce stade dure de deux à quatre semaines (**Djerbi, 1994**).

➤ **Tamr ou Tamar :**

C'est le stade final de la maturation de la datte. Le fruit perd beaucoup d'eau, ce qui donne un rapport sucre/eau élevé (**Djerbi, 1994**).

II.3. Classification des dattes :

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

- **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.
- **Les dattes sèches :** dures, avec moins de 20% d'humidité, riche en saccharose. Elles ont une texture farineuse telle que Meche-Degla, Degla Beida.....etc

II.4. Les variétés des dattes :

Elles sont très nombreuses et se différencient par leurs saveurs, consistances, formes, couleurs, poids et dimensions. En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes et les principales variétés cultivées sont :

➤ **Deglet-Nour:**

La variété commerciale excellence, c'est une datte demi-molle de couleur marron foncé considérée comme étant la meilleure variété de datte, sa saveur présente 47% de la production nationale.

➤ **Ghars, DeglatBaida et Mech-Degla :**

Ces variétés sont de moindre importance économique par rapport à Deglet-Nour les plus couramment rencontrées.

➤ **Les variétés communes :**

Elles sont très peu appréciées et des valeurs commerciales faible, on peut citer : Tinissine, Tantboucht, Hamra, Tegaza, Takerbouche (**Noui, 2001**).

Tableau 02: Caractéristiques morphologiques des trois variétés des dattes

(Sayah et Ould El Hadj, 2010).

Caractère de fruit	Variété de dates		
	Ghres	Déglet-Nour	Dégla-Beida
Forme de la date	Ovoïde	Ovoïde	Ovoïde
Couleur au stade tmar	Marron foncé	Marron foncé	Belge
Consistance	Molle et demi-molle	demi-molle	Sèche
Plastisité	Tender	Tender	Dure
Texture	Fibreuse	Fibreuse	Farineuse
Gout	Parfumé	Parfumé	fade
Forme du noyau	Ovoïde	Ovoïde	Ovoïde
Couleur de noyau	Marron	Marron	Belge
Poid de la datte	8.81	10.97	6.69

II.5. Composition biochimique de la datte :

II.5.1. Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe" :

1. L'eau :

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % (Noui, 2007). Le tableau 4 récapitule les teneurs moyennes en eau des dattes *Deglet-Nour* et *Ghars* de différentes régions.

Tableau 03 : Teneur en eau (en % du poids frais) des variétés *Deglet-Nour* et *Ghars*

Variété	Teneur en eau (%) PF 1	Teneur en eau (%) PF 2	Teneur en eau (%) PF 3
Deglet- Nour	22,6	26,67	13,61
Ghars	25,4	22,00	16,42

¹ Variétés de Biskra –Fliache- (Khenfar, 2004).

²Variétés de Biskra -Tolgua-(Daas Amieur, 2009).

³Variétés d'Ouargla (Mimouni, 2015).

2. Les sucres :

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélée essentiellement la présence de trois types de sucres : le saccharose, le glucose et le fructose. Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, la xylose et le sorbitol .La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété, du climat et du stade de maturité de la datte (Açourene et al., 2001).

Généralement les variétés molles sont caractérisées par un taux élevé en sucre réducteur et les variétés sèches par une teneur élevée en saccharose par contre les variétés demi moelle, tel *Deglet- Nour* renferme autant de saccharose que de sucre réducteurs

Tableau 04 : La teneur (%) en sucres de quelque variété des dattes algériennes (Belguedj, 2002).

Constituant par apport à la matière sèche (%)	Type de datte					
	Molle		Demi-molle		sèche	
	Ghars	Tinicine	Deglet-nour	Tafazoiune	Degla-baida	Mech-degla
Sucres totaux	85.28	54.30	71.37	56.90	74	80.07
Sucres réducteurs	80.68	48	22.81	47.70	42	20
saccharose	04.37	05.30	8.74	8.74	30.36	51.40

3. Protéines et acides aminés :

La composition en acides aminés des protéines de la pulpe de datte révèle la présence de 6 à 8 acides aminés indispensables pour l'homme (**Makhloufi, 2010**).

La proportion des protéines dans les dattes est comme suit :

- Les dattes molles (stage Khalal et Rutab) : 1,8%
- Les dattes sèches (stage de Tamar) : 2,4%

4. Les lipides :

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais, qui se concentre dans l'épicarpe (**Djouab, 2007**).

Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation (**Noui, 2007**).

Tableau 05 : Composition de la datte DegletNour mure en acides gras
(**El Arem et al., 2012**).

Acides gras	Teneur en % de la matière grasse totale
Acides gras saturés	56,23
Acides gras mono-insaturés	37,04
Acides gras polyinsaturés	8,11
Acide linoléique	4,52
Acide linolénique	1,90

5. Fibres :

Les dattes au stade Tamar sont riches en fibres alimentaires totales, environ 12,97 à 13,32%de matière sèche (**Sidhu, 2006**) ; ou de 3,57 à 10,9 g/100g de matière fraîche (**Al-Farsi et Lee, 2008**).

Les deux fractions de fibres, solubles et insolubles dans l'eau, ont des avantages avérés pour la santé (**Sidhu, 2006**).

Tableau 06 : Teneurs en fibres totales, solubles et insolubles de la datte Deglet-Nour (**Vayalil, 2012**).

Paramètre	Teneur en % de MS
Fibres totales	14,4
Fibres insolubles	9,19
Fibres solubles	5,16

6. Les vitamines :

En général, la datte ne constitue pas une source importante de vitamines. Mais elle est riche en complexe vitaminique B, telles que B1, B2, B3, B5, B6 et B9 ainsi qu'en vitamine A et K. Les vitamines C et D sont quasiment inexistantes (**Ahmed et al., 2014**).

Le tableau 7 récapitule les teneurs en vitamines et minéraux de la pulpe de Deglet-Nour.

7. Les éléments minéraux :

Il est connu que les dattes mures présentent une assez bonne source de nombreux minéraux (**Sidhu, 2006**).

Les teneurs de la datte Deglet-Nour en minéraux au stade Tamar sont exprimées dans le tableau 7.

Tableau 07 : Teneurs en vitamines et minéraux de la pulpe de Deglet Nour (**USDA, 2012**) (SitE05).

Vitamines	Teneur	Minéraux / 7.1g PF	Teneur mg/7.1g PF
Acide ascorbic total (mg)	0,000	Mg	3
Thiamine (mg)	0,004	Ca	3
Riboflavine (mg)	0,005	P	4
Niacine (mg)	0,090	K	47
Vitamine B6 (mg)	0,012	Fe	0,07
Folate (µg)	1	Zn	0,02
Vitamine A (IU)	1	Na	0,00
Vitamine K (phylloquinone) (µg)	0,200		

8. Les composés phénoliques :

La datte en pleine maturité est riche en métabolites secondaires dits composés phénoliques (**Saafi et al., 2011**).

Le tableau ci-dessous, donne la teneur en composés phénoliques de quelques variétés de dattes algériennes.

Tableau 08 : Teneur en composés phénoliques de variétés de dattes algériennes (**Mansouri *et al.*, 2005**).

Variété	Teneur en mg/100g du poids frais
Tazizaout	2,49
Ougherouss	2,84
Akerbouche	3,55
Tazarzait	3,91
Tafiziouine	4,59
DegletNour	6,73
Tantboucht	8,36

9. Les enzymes des dattes

La datte renferme beaucoup d'enzymes ; ces derniers jouent un rôle très important dans le processus de conversion qui se déroule durant le développement et la maturation des dattes. En effet, ces enzymes sont impliquées dans différentes réactions métaboliques survenant durant la survie du fruit et dont l'activité présente un intérêt particulier pour la qualité nutritionnelle et organoleptique de la datte (**Barreveld, 1993**).

Parmi ces enzymes, celles impliquées dans le métabolisme des glucides, notamment:

Invertase : responsable de la conversion du saccharose en sucre invertis (glucose et fructose) elle influe sur la texture du fruit. Son activité est relative à la fermeté de la datte (**Sidhu, 2006**).

La polygalacturonase et la pectine méthyl estérase : qui convertissent les substances pectiques insolubles de la datte en pectines plus solubles en contribuant au ramollissement du fruit. L'activité polygalacturonase est relativement plus élevée dans la datte molle que dans la datte dure (**Sidhu, 2006**).

La cellulase : qui décompose la cellulose en chaînes plus courtes pour augmenter sa solubilité, ce qui diminuera la teneur en fibres. Cette activité enzymatique atteint son apogée aux stades Rutab et Tamar (**Sidhu, 2006**).

Polyphénol oxydase : est responsable des transformations biochimiques des polyphénols dont l'exemple: les tannins. Cette enzyme joue un rôle très important dans les réactions de brunissement enzymatique des dattes. L'activité de la PPO est la plus élevée au stade Kimri, suivi des stades Khalal et Tamar (**Sidhu, 2006**).

La peroxydase : en effet la datte contient des peroxydases hautement actives. Cependant la littérature concernant la peroxydase de la datte est très rare (**Khali et Attou, 2007**).

II.5. 2. Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau " :

Le noyau présente 7 à 30 % du poids de la datte. Il est composé d'un album en blanc, dur et corné, protégé par une enveloppe cellulosique (**Espiaired, 2002**).

Comparés à la pulpe, le noyau de dattes contient des quantités plus élevées de protéines (6-7%), de lipides (9-10%), de minéraux (1-2%) et de fibres (20-24%). Les principaux minéraux présents dans les graines de datte sont : K, P, Ca, Na, Fe, Mn, Zn et Cu (**Al-Farsi et Lee, 2008 ; Habib et Ibrahim, 2009**).

Le tableau ci-dessous montre la composition biochimique des noyaux de dattes Irakiennes.

Tableau 09 : Composition biochimique des noyaux des dattes Irakienne (**USDA, 2012**).

Constituants	Teneur en %
Eau	06,46
Glucides	62,51
Protides	05,22
Lipides	08,49
Cellulose	16,20
Cendres	01,12

II.6. Valeur énergétique et nutritionnelle de la datte :

La datte constitue un excellent aliment, de grande valeur nutritive et énergétique. La forte teneur en sucre de la pulpe de datte confère à ce fruit une grande valeur énergétique soit : 275 K calories pour 100g de pulpe de datte Deglet-Nour. De point de vue nutritionnelle les dattes sont caractérisées par :

- Assimilabilité facile due à sa grande richesse en sucres réducteur.
- Richesse en éléments minéraux plastiques Ca, S, P, Mg et catalytiques Fe^{+2} , Mn^{+2} .
- Protéines équilibrées quantitativement mais faibles quantités (**Matallah, 2004**).

Chapitre 02 :
Généralité sur le
brunissement
enzymatique et la
polyphénol oxydase

I. Le brunissement enzymatique des dattes

I.1. Définition :

On appelle 'brunissement enzymatique' la transformation enzymatique dans ses premières étapes et en présence d'oxygène de composés phénoliques en polymères colorés le plus souvent bruns ou noirs en passant par des teintes intermédiaires de rose ou rouge. Les pigments sombres formés sont désignés par le terme général de mélanines (**Yoruk et Marshall, 2003; Jeant et al., 2006**).

I.2. Déclenchement, conséquences et catalyse du brunissement enzymatique :

Le brunissement enzymatique peut avoir lieu lors de la croissance des fruits, c'est l'exemple de la datte, ou durant l'endommagement mécanique lors du traitement et des manipulations post récolte (**Eidhin et al., 2005 ; Mann, 2008**), également lors de la conservation et des transformations technologiques (parage, découpage, broyage pour la préparation des jus, déshydratation, conservation au froid et congélation). La formation des pigments bruns n'est cependant pas toujours indésirable ; un certain degré de brunissement est en effet recherché lors de la maturation des fruits secs (dattes, pruneaux et raisins) (**Jeant et al., 2006**).

Ce phénomène se traduit par l'oxydation et la polymérisation des composés phénoliques comme résultat de l'activité enzymatique de phénol oxydases (PPO) et/ou de peroxydases (POD) pouvant conduire à la formation de pigments bruns. Après tout traitement endommageant les cellules, comme la blessure suite à la conservation au froid conduisant à des dommages de la membrane des organites tels que les vacuoles, les composés phénoliques vacuolaires peuvent alors se mettre en contact avec la PPO ; ce qui conduit à leur oxydation rapide (**Rigal, 2001**).

Ce phénomène est accompagné de la perte des qualités nutritionnelles, fonctionnelles et organoleptiques, se traduisant par l'assombrissement, la diminution de la fermeté et l'altération de la saveur. Toutefois, le brunissement dans d'autres cas comme dans le traitement du thé noir, le café et le cacao est bénéfique dans une certaine mesure car il améliore la qualité des boissons à travers les produits savoureux formés (**Yoruk et Marshall, 2003**).

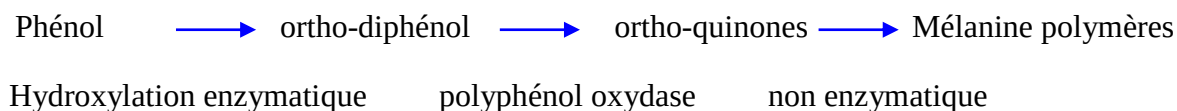
Le brunissement enzymatique s'installe au sein de la datte après sa récolte et augmente avec des teneurs élevées en eau de ce fruit ; cela constitue l'un des facteurs de désordre physiologique de la datte conduisant à une altération de sa qualité et par conséquent une diminution de sa valeur marchande (**Yahia et Kader, 2011**).

Sachant que les phénols oxydés lors du brunissement sont responsables en partie de la flaveur et de la couleur des fruits et légumes (**Shahidi et Naczki, 2004**).

La formation de pigments jaunes et bruns au sein des fruits au cours des réactions de brunissement enzymatique est commandée par les niveaux de phénols, le taux d'activité de la PPO et la présence d'oxygène (**Barrett et al., 2005**).

Il existe de nombreux substrats naturels, mono, di-ou polyphénoliques du brunissement enzymatique dont les plus importants sont les dérivés du pyrocathécol, les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, les flavonoïdes, les tanins et les lignines (**Jeantet et al., 2006**).

Le produit initial de l'oxydation est habituellement le O-quinone qui est hautement instable, ce dernier subit une polymérisation pour donner des pigments bruns de haut poids moléculaire (**Barrett et al., 2005**). D'après (**Allaith, 2008**), la réaction de brunissement enzymatique est la suivante :



II. La Polyphénol oxydase (PPO)

II.1. Historique sur la polyphénol oxydase :

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

La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle du polyphénol oxydase de pomme de terre par **Kubowitz (1938)**. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité. Le polyphénol était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (**Zawistowski et al., 1991**).

Depuis sa découverte, la polyphénol oxydase a été le sujet de recherches intensives. Ces recherches ont porté d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieurs. Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps (**Keilin et Mann, 1938 ; Schoenbein, 1856**), c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger (**Jolivet et al., 1998**).

II.2. Définition, nomenclature et classification de la PPO :

II.2.1. Définition :

La polyphénol oxydase également appelée tyrosinase est une oxydoréductase (1,2-benzenediol: oxygène). C'est une enzyme à cuivre. Et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail. La PPO est présente dans quelques bactéries et mycètes et dans la plupart des végétaux (**Rescigno et al., 2002**).

II.2.2. Nomenclature :

Une pléthore d'études montre que la polyphénoloxydase également connue sous le nom de :phénolase, phénol oxydase, tyrosinase, crésolase, catécholase, diphénolase, o-diphénol oxydase et acide chlorogénique oxydase.

De ces derniers, c'est la polyphénol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme a utilisé différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des o-quinones dans les deux cas (**Matsui et al., 2007**).

Les noms «tyrosinase », « phénol oxydase » et «polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (**Rivas et Whitaker, 1996 ; Sugumaran et al., 1998**).

II.2.3. Classification :

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a mis à jour la nomenclature et a placé la polyphénol oxydase (oxygénase oxydoréductase) dans deux catégories principales comme :

1. **monophénolmonooxygénase**(EC 1.14.18.1) : également connue sous le nom de tyrosinase (cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 o-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 p-diphénol oxydase ou laccase).
2. **o-diphénol : O₂ oxydoréductase** (EC 1.10.3.2): Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (**Zawistowski et al., 1991 ; Mayer, 2006**).

De nos jours, on accepte généralement que la PPO (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase ; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire sont :

- l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase)
- l'oxydation des o-diphénols aux o-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) (**Aydemir et Akkanli, 2006**).

II.3. Source, localisation et rôle de la PPO :

II.3.1. Source et localisation :

Les PPOs ont été découvertes initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs (la pomme, le raisin, la pêche, la poire, banane, la pomme de terre, la datte..), les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (**Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006**).

La localisation subcellulaire de la PPO n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (**Zawistowski et al., 1991 ; Mayer, 2006**).

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

II.3.2. Rôle de la PPO :

La PPO est impliquée dans divers processus tels que la pigmentation des vertébrés et le brunissement des fruits et des légumes. Dans les plantes, les PPOs jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques. Chez les mammifères, elle est responsable de la pigmentation de peau (**Whitaker, 1995**). Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. (**Fenoll et al., 2004**).

La PPO joue un rôle important dans la qualité des produits alimentaires. Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (**Whitaker et Lee, 1995**). L'activité de la PPO a également un impact sur la saveur et l'arôme des produits horticoles, puisque les composés phénoliques jouent un rôle dans le goût amer, sucré, piquant, ou astringent des fruits, de légumes et d'épices (**Tomas-Barberan et Espin, 2001**).

II.4. Caractéristiques réactionnelles et structurales de la PPO :

II.4.1. Caractéristiques réactionnelles :

Le groupe des PPOs comprend essentiellement deux types d'enzymes : l'*o*-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, polyphénol oxydase (PPO) et la *p*-diphénoloxydase ou la laccase. Les deux types d'enzymes sont phénol-oxygène oxydoréductases.

II.4.1.a. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (l'activité crésolase). Cette enzyme est 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 (Fig 4) (Tomas-Barberà et Granata et *al.*, 2005).

II.4.1.b. Activité *o*-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase (l'activité catécholase). Cette enzyme est également appelée catécholase ou catéchol-oxydase (Fig 7) (Tomas-Barberà et Granata et *al.*, 2005).

Les PPOs sont capables d'insérer de l'oxygène dans une position ortho à un groupe hydroxyle existant dans un cycle aromatique, suivi de l'oxydation du diphénol à la quinone correspondante ; l'oxygène moléculaire est utilisé dans la réaction (Fig8) (Mayer, 2006).

II.4.1.c. Activité laccase (E.C. 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité *p*-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité *o*-diphénoloxydase. 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 ping-pong (Fig4) (Tomas-Barberà et Granata et *al.*, 2005).

Les o-quinones produits sont fortement réactifs et peuvent subir des réactions de polymérisation et de cyclisation non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène noir, brun ou rouge, généralement appelé mélanine, soit réagir avec des acides aminés ou des protéines pour produire des composés colorés

(Dicko *et al.*, 2002 ; Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2007).

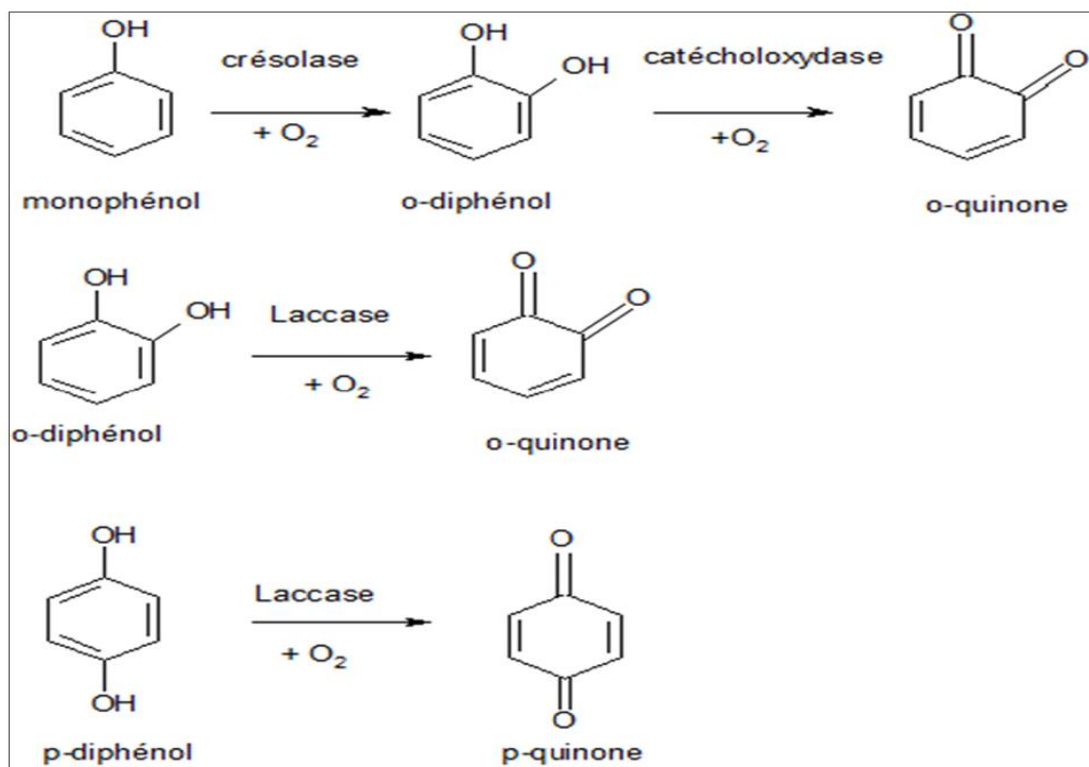


Figure 04 : Les réactions catalysées par la polyphénol oxydase (Rigal *et al.*, 2001).

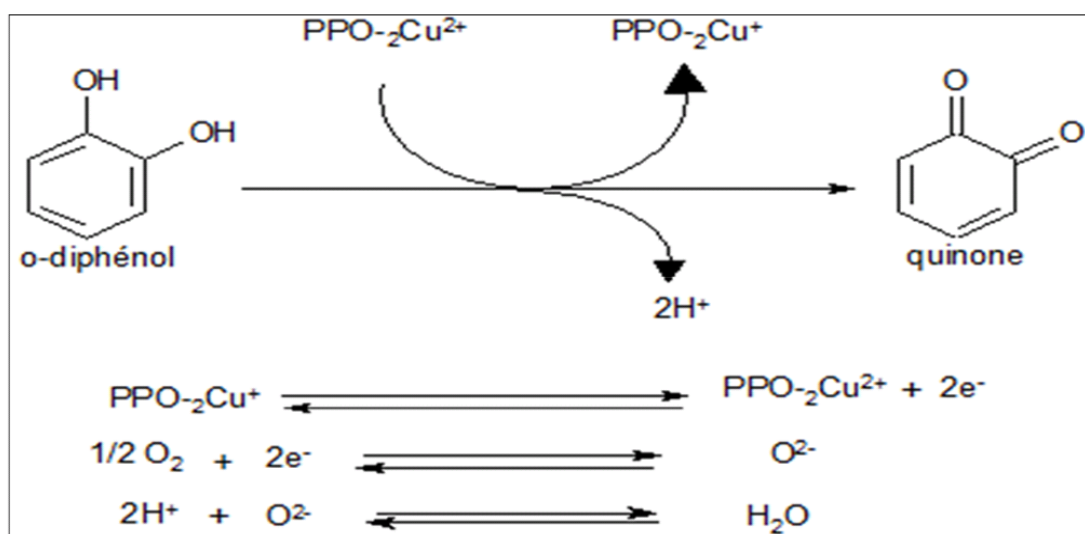


Figure 05 : Mécanisme d'action des polyphénoloxydases (Marshall *et al.*, 2000).

II.4.2. Caractéristiques structurales :

II.4.2.1. Architecture moléculaire globale :

La structure cristallographique de la PPO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (**Claus et Decker, 2006 ; Siegbahn, 2004**). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène. Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables, et des similitudes de séquence primaires (**wang et al., 2007**).

La PPO est une oxydoréductase contenant du cuivre comme groupement prosthétique (**Kavrayan et Aydemir, 2001 ; Mayer, 2006**). La structure du site actif de l'enzyme, dans laquelle le cuivre est lié par six ou sept résidus histidine et un résidu cystéine unique est hautement conservée (**Mayer, 2006**). Les masses moléculaires apparentes des polyphénoloxydases sont comprises entre 12 et 400 kDa (**Zawistowski et al., 1991**). Ces différences de taille s'expliquent notamment par l'existence de formes polymériques de l'enzyme ; actuellement, les auteurs s'accordent pour donner une masse moléculaire apparente voisine de 40 à 45 kDa pour les formes monomériques (**Rigal, 2001**).

Malgré que certains auteurs comme **Lourenço et al., (2000)** et **Yemenicioglu et al., (2003)** trouvent que la PPO n'est pas très résistante à la chaleur ; d'autres à l'instar de **Robinson, (1991)**, **Barrett et al., (2005)** et **Wang et al., (2007)** voient qu'elle est thermiquement résistante.

II.4.2.2. Le site actif de PPO :

Il a été montré que la PPO peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (**Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003**). La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et est trouvé également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (**Mansouri et al., 2005**). La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$) (**Hagbeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006**).

Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices, $\alpha 1$ et $\alpha 4$, et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aide à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50) à l'hélice $\alpha 2$. La paire du cuivre (CuA et CuB) du site actif est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α .

Le Cu A est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice $\alpha 2$, tandis que l'His 109 et His 118 sont au début et au milieu de l'hélice $\alpha 3$. Le second cuivre Cu B, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines sont localisés au milieu d'hélices $\alpha 6$ et $\alpha 7$. La paire de cuivre (Cu A et Cu B) est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Kumar et al., 2008).

II.5. Effet du pH sur l'activité de la PPO ::

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO varie avec la source de l'enzyme et en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur : (1) le type de tampon ; (2) la pureté de la préparation enzymatique et (3) le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés nécessaires pour sa fixation et sa transformation (Kuby, 1991).

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

II.6. Effet de la température sur l'activité de la PPO :

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été étudié intensivement par rapport à l'effet du pH (Vámos-Vigyázó, 1981). Amiot et al., (1997) ont proposé que «la PPO n'est pas une enzyme très thermostable». Les traitements thermiques de courtes durées de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction

irréversible partielle ou totale de sa fonction catalytique (**Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003**).

La diminution d'une partie de l'activité de la PPO à une basse température de chauffage n'est pas étonnante (**Yemenicioğlu, 2002**). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité de substrat, du pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar (**Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003**). L'inactivation thermique de la PPO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (**Mayer et Harel, 1991**).

II.7. Les substrats de la PPO :

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

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

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

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; Trebst et Depka, 1995**).

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

II.8. Les effecteurs de la PPO :

II.8.1. Les activateurs :

La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), les acides gras, les alcools, le choc acide et les protéases (**Espín et al., 2002 ; Seo et al., 2003 ; Gandía-Herrero et al., 2005**). Le SDS peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO de champignon de couche (*Agaricusbisporus*). Il a été également montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. L'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (**Fan et Flurkey, 2004**).

II.8.2. Les inhibiteurs :

Le contrôle de l'activité de la PPO est d'une importance dans la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (**Qiu et al., 2009**). En outre, les inhibiteurs de la PPO ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la PPO sont censés d'avoir de larges applications dans les industries médicales et cosmétiques (**Maeda et Fukuda, 1991**).

Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la PPO peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. En outre, la PPO est l'une des plus importantes enzymes clés impliquée dans le processus muant d'insecte, et la découverte des inhibiteurs de cette enzyme peut être ainsi importante pour le développement de nouvelles alternatives pour le contrôle des insectes (**Juin et al., 2007; Likhitwitayawuid, 2008**).

L'inhibition de la PPO responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire. Dans l'industrie alimentaire, la toxicité relative au mode d'inhibition choisie, le coût de la méthode et/ou des composés chimiques, et l'acceptation de la méthode par le consommateur, des composés chimiques et le produit final aident à la sélection de la méthode d'inhibition (**Barthet, 1997**).

En théorie, le brunissement des fruits et des légumes par la PPO peut être empêché par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (O_2 et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de 2 unités ou plus au-dessous du pH optimum, par des réactions d'inactivation de l'enzyme ou par l'addition des composés qui inhibent la PPO ou qui empêchent la formation de la mélanine (**Whitaker et Lee, 1995**).

Des centaines de composés ont été examinées comme des inhibiteurs du brunissement enzymatique. Les inhibiteurs du brunissement enzymatique doivent être non toxiques, et ne modifie pas le goût, la saveur ni la texture du produit. Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber la PPO et plusieurs méthodes ont été développées (**Whitaker et Lee, 1995**).

II.8.2.1 Méthodes physiques :

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70- 90°C, de la PPO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (**Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003**).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (**Soysal, 2008**). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard.

La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons pouvons induire une inactivation réversible ou irréversible de la PPO à des températures relativement basses, en particulier lorsqu'il s'agit d'un produit sensible à la chaleur (**Rapeanu et al., 2005 ; Terefe et al., 2009 ; Buckow et al., 2009**).

II.8.2.2 Méthodes chimiques :

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source de l'enzyme, de la disponibilité de substrat (O_2 et substrat phénolique), du pH et de la température (Zawistowski et *al.*, 1991).

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la PPO en trois catégories : (1) les agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécule ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitives en ce qui concerne l'oxygène; (2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique ; et (3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphénol) (Burton, 1994).

II.8.2.3 Les inhibiteurs de synthèse :

Puisque la PPO est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska et *al.*, 2002).

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les PPOs de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels de des PPOs de champignon, de cerises, de pommes, de poire, d'abricot et de pommes de terre sont principalement les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques, le dihydrate de phloridzine et certains acides cinnamiques substitués. Les ions halogénures se comportent comme étant des inhibiteurs purement compétitives vis-à-vis de la fixation du dioxygène (Rescigno et *al.*, 2002).

L'acide ascorbique peut également agir directement sur la PPO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2++} en Cu^+ (Zawistowski et *al.*, 1991).

En outre, les composés qui ne ressemble pas à la structure de substrat (exemple : le 4-nitrophenol, la phénylalanine et le 4-chlorophénol) et qui sont lentement oxydés, ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la PPO. Les analogues de substrat tels que les acides aromatiques (exemple : l'acide benzoïque et l'acide cinnamique) se comportent

habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (**Gasowska et al., 2002**).

L'inhibition de la PPO est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites ; SO₂ ; l'acide ascorbique, l'acide érythoriques et les composés à fonction thiol. Les composés à fonction thiol, comme la L-cystéine, le glutathion, le dithiotreitol, le mercaptoéthanol et le thiourée, sont des inhibiteurs efficaces de la PPO de plusieurs sources (**Rescigno et al., 2002**).

Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP) agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de la PPO mais on sait pas s'il agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (**Jolivet et al., 1998**).

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la PPO, soit en réagissant avec les o-quinones. Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu²⁺ du site actif de la PPO (**McEvily et al., 1992 ; Ates, 2000**).

Les cyclodextrines peuvent inhibées la PPO par fixation au substrat phénolique (**Irwin et al., 1994**). L'acide citrique inactive la PPO par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu. La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas seulement spécifique pour les PPO (**Ates, 2000**).

II.8.2.4 Les inhibiteurs naturels :

Plus récemment, les plantes sont considérées comme étant une source potentielle des inhibiteurs de la PPO (**Baurin et al., 2002**). Un certain nombre d'inhibiteur de la PPO des sources naturelles ont été identifiés. Ils appartiennent à deux grand groupes : les polyphénols et les aldéhydes et d'autres dérivés (**Rescigno et al., 2002**). Parmi les composés isolés le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercetine, la morine, la lutéoline, l'ansaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique sont des inhibiteurs puissants de la PPO (**Parvez et al., 2007**).

Partie 02 :
Étude
Expérimentale

Chapitre 01 :

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1 Matériels biologiques :

La datte (Variété Deglet-Nour) 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 de l'eau distillée, séchées et conservées à 4°C.



Figure 06 : La variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet Nour –**google images**

1.2 Produits chimiques :

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

2. Méthodes

2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO :

La PPO a été isolée à partir des dattes de la variété Deglet Nour, selon le protocole d'extraction 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 4°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 gaz. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo ScientificHeλIOSγSpectrophotometer, England).

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

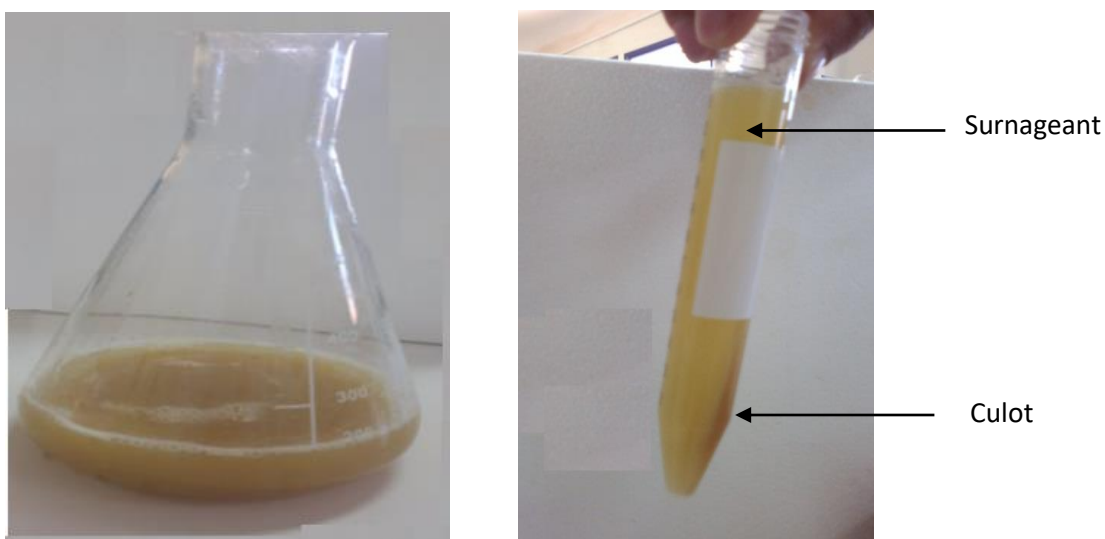


Figure 07 : Extrait brut de la datte (*Phoenix dactylifera*L CV DegletNour) avant et après centrifugation.

2.2 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 ScientificHeλIOSγSpectrophotometer, 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.

2.3 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 80mM est utilisé comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

2.4 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 5,5 pour la variété de Deglet-Nour (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 80mM 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.

2.5 Effet de la concentration de l'enzyme :

La vitesse initiale de l'oxydation de la pyrocatechol à 80mM par la PPO de Deglet Nour a été mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 100 µl. L'activité enzymatique a été mesurée dans les conditions optimales décrites ci-dessus (pH 5.5, tampon acétate de sodium 0.05 M et à 30°C).

2.6 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 (*Phoenixdactylifera* L.) cv Deglet Nour, l'activité enzymatique est mesurée à pH : 5,5, tampon acétate de sodium à 0.05 M) et à 30°C, à différentes concentrations de catéchol comprises entre 10 à 120 mM.

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

2.7 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 5,5 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs : d'acide ascorbique (0,1à 0,5 mM),et l'acide oxalique (0,5 et 3mM)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 ascorbique et/ou oxalique) (**Chen et al, 1998**).Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité en absence d'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 2 fois.

2.8 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO :

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur (0,15et 0,25mM pour l'acide ascorbique tandis que pour l'acide oxalique des concentrations valant 1,5 et

3Mm ont été utilisées) 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**)

2.9 Analyse des résultats expérimentaux :

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

Table Curve 2DTM (JandelScientificWindows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). EnzymeKineticsProTM 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 discussions

1. Extraction du polyphénol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) :

La PPO a été facilement isolée à partir de la variété de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-Nour 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 (Fig8).

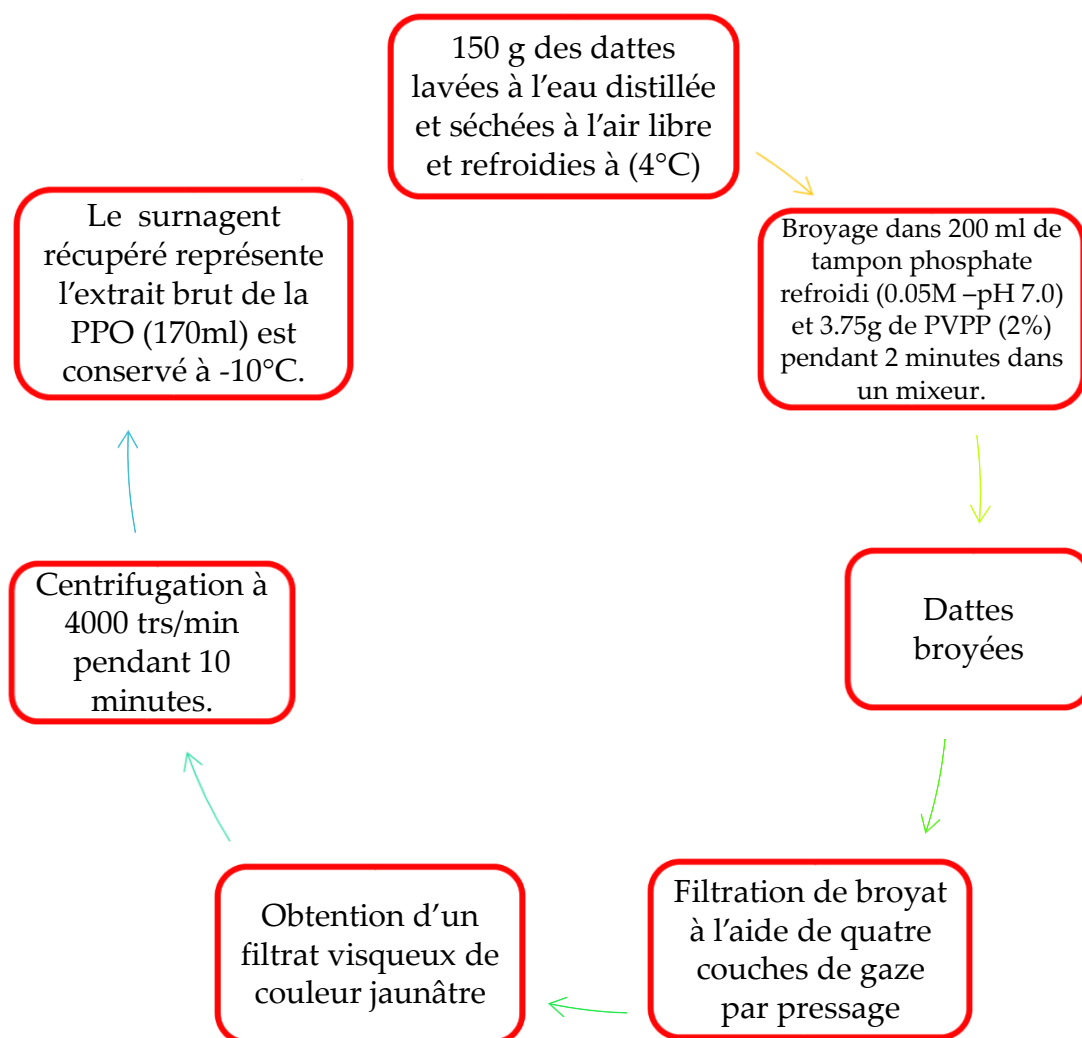


Figure 08 : Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) « DegletNour».

2. Les conditions optimales de l'activité pyrocatechol oxydase :

2.1 Effet du pH :

L'influence du pH sur l'activité pyrocatecholase des dattes cv Deglet Nour 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 09 représente le profil de l'activité pyrocatechol oxydase relative en fonction du pH en présence de pyrocatechol comme substrat. Ainsi ,une valeur de pH=5,5 correspondant au max de pic relativement proportionnelle à l'activité optimale a été déduite. De part et d'autre de ce pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la 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**).

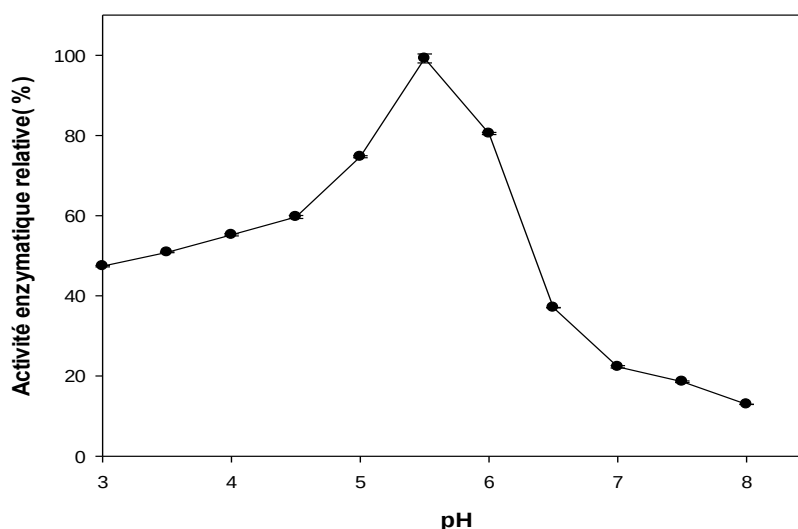


Figure 09 : Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera*L.) cv Deglet Nour en fonction du pH. (En présence de pyrocatechol comme substrat).

Comme l'indique de Tableau 10, la PPO de datte est plus active dans les conditions acides que dans les conditions alcalines, ce qui est nettement différent par rapport à la plus part des PPOs qui montrent une activité PPO maximale dans le domaine de pH neutre ou proche de la neutralité. Toutefois, l'activité faible de la PPO à pH 7.0 peut être exploitée, le brunissement enzymatique des dattes durant leur stockage ou leur transformation peut être contrôlée par l'utilisation des solutions neutres. Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; Yoruk et Marshall, 2003).

Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994 ; Luh et Phthalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Kolcuoğlu et al., 2006).

Tableau 10: les valeurs de pH optimal de la PPO obtenue à partir de différentes sources végétales.

Source	pH optimal	Référence bibliographique
Laitue (<i>Lactuca sativavar</i> , capitata L.)	5.5	Gawlik-dziki et al.,2007
Fraise (<i>Fragariaananassa</i>)	5.0	Dalmadi et al.,2006
Banane	6.5	Ünal (2005)
Chou-fleur (<i>Brassicaoleraceavar</i> , botrytis italica)	5.7	Gawlik-Dziki et al., 2007
Poire suvage (<i>Pyruselaegrifolia</i>)	6.0	Yerlitürk et al.,2008
Fleur de viol (<i>rapeflower</i>)	5.5	Sun et al.,2012
Songe paté (<i>Amorphophallus paeoniifolius</i>)	6.5	Singh et Wadhwa, 2017
Epine noire (<i>Prunus spinosa</i> L. subsp)	7.0	Baltas et al.,2017
Datte (Zahdi et Barhee)	6.8	Sachde et al.,1989
Apricot (<i>Prunusarmeniaca</i> L.)	4.5	Derardja et al.,2017
Datte Deglet nour (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	5.7	Notre travail

2.2 Etude de la stabilité thermique :

La Figure 10 représente les résultats de l'étude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.). On constate que l'activité catécholase est stable thermiquement vis-à-vis de gradient croissant de températures supérieures et que vitesse d'inactivation thermique est plus grande au-delà de la température 50 °C. Les températures supérieures à 40°C provoquent une diminution progressive de l'activité enzymatique. Après 10 min de traitement à 55, 60 et 70°C, l'activité de la PPO est réduite par 18.1, 20.0 et 32.2 %, respectivement.

Une activité catécholase résiduelle non négligeable d'environ 40% a été mesurée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C. L'enzyme est presque totalement dénaturée à 90°C. Par conséquent, il semble que la PPO de la variété Deglet Nour d'Algérie est plus thermostable par rapport aux PPOs obtenues à partir de la fraise (*Fragariaananassa*) (Dalmadi et al., 2006), de la mangue (*Mangifera indica* L. CV. "Tainong") (Wang et al., 2007), du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (Gouzi et Benmansour, 2007), du raisin (*Vitis vinifera* sp. sativa) (Rapeanu et al., 2005). des truffes (*terfezia leonis*) (Maache et Bendjedja, 2011), des fraises (Serradell et al., 2000) ; de la pomme

(Eidhin et al., 2006) ; et de la céleri (Yağar, 2004)

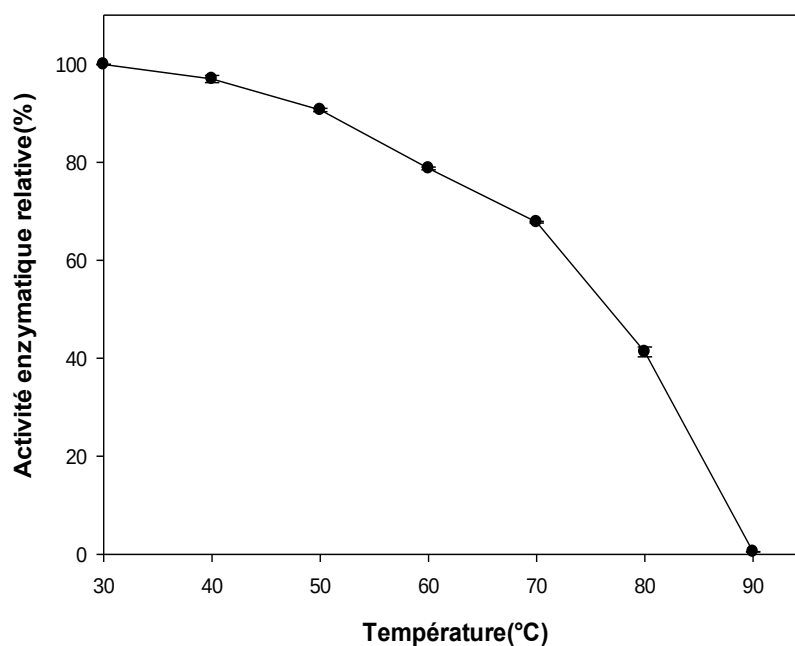


Figure 10 : Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la ppo des dattes DegletNour (*Phoenix dactylifera* L.) après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatéchol comme substrat).

Yağar (2004) a montré que la PPO extraite à partir du céleri (*Apiumgraveolens* L) perde environ 70% de son activité initiale à 50°C et environ 85% de son activité à 60°C pendant 30 min du traitement thermique (pH 5.5 tampon phosphate 0,05 M), 0.2 ml enzyme, catéchol à 20 mM).

L'étude de la thermostabilité de la PPO du Châtaigne (*Castaneahehryi*), montre que l'activité de l'enzyme diminue de 10% lorsqu'elle est incubée pendant 30 min à 40°C (pH 5.5 tampon phosphate de potassium à 0,025 M); 20 µl d'enzyme, catéchol à 3.3 mM). Par conséquent cette enzyme demeure thermolabile (**Xu et al., 2004**).

La diminution de l'activité enzymatique au-dessus de 40°C pourrait être due d'une part aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire et d'autre part de la destruction du site actif de l'enzyme et d'autre part à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont, certaines sont extrêmement thermolabiles (**Khatun et al., 2001 ; Yemenicioğlu, 2002**).

Il est également probable qu'un chauffage doux cause la dissociation de quelques formes oligomériques de la PPO en monomères moins actifs (**Yemenicioğlu, 2002**).

Doğan et al., (2005) suggèrent qu'une diminution du pourcentage de l'activité résiduelle aux températures élevées peut être réellement due au déploiement de la structure tertiaire de l'enzyme pour former une structure secondaire qui est dépourvue d'activité catalytique.

Il est plus notable qu'à des températures relativement, élevées plusieurs liaisons faibles qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées et par conséquent l'enzyme devient inactive (**Tuena de Gómez-Puyou et Gómez-Puyou, 1998**).

La PPO n'est pas une enzyme extrêmement thermostable (**Amiot et al., 1997**).

La tolérance thermique des enzymes dépend également de la spécificité de substrat, et au pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003**).

Elle peut être liée aussi à la maturité de la plante et des formes moléculaires de l'enzyme (**Zhou et Feng, 1991**). En général, la PPO n'est pas une enzyme très stable à la température par rapport à d'autres enzymes responsables de la dégradation de la qualité alimentaire et son inactivation thermique est une forme d'inhibition (**Amiot et al., 1997 ; Mayer et Harel, 1991**).

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

2.3 Détermination des paramètres cinétiques :

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité catécholase a été étudié dans une gamme de concentration catéchol comprise entre 20 et 100 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.5 à température de 30°C). Les valeurs des paramètres cinétiques V_{max} , K_m et ont été calculées à partir des représentations de **Michaelis-Menten** (Equation (1)) et de **Lineweaver-Burk** (Equation (2)) selon les équations suivantes (**Dalmadi et al., 2006**) :

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

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

Où

V_0 est la vitesse initiale de la réaction ($\mu\text{mol/l/min}$).

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

$[S]$ est la concentration de catéchol (mM).

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

La constante de **Michaelis-Menten** (K_m) mesure l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat, la faible valeur de ce paramètre signifie que l'enzyme a une forte affinité vis-à-vis de son substrat (**Siddiq et al., 1992**).

D'après la Figure 11 on observe que lorsque la concentration du catéchol augmente de 20 à 100 mM, l'activité catécholase augmente jusqu'à 100 mM. Au-delà de cette concentration saturante en substrat, l'activité enzymatique diminue en raison du phénomène d'inhibition par excès de substrat (**Gouzi et Benmansour, 2007; Mayberry et Mallette, 1962 ; Palmer, 1963 ; Duckworth et Coleman, 1970**).

Il s'avère que le substrat à des concentrations très élevées, peut empêcher fortement sa propre conversion en produit (**Palmer., 1985**). Cet effet inhibiteur est souvent attribué à une forte inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction, et parfois à la compétition entre le produit et le substrat (**Palmer, 1985 ; Macrae et Duggleby, 1968**).

Les valeurs des paramètres cinétiques apparents sont :

$$V_{\max} = 0,533 \text{ Abs/min},$$

$$K_m = 91,8395 \text{ mM}$$

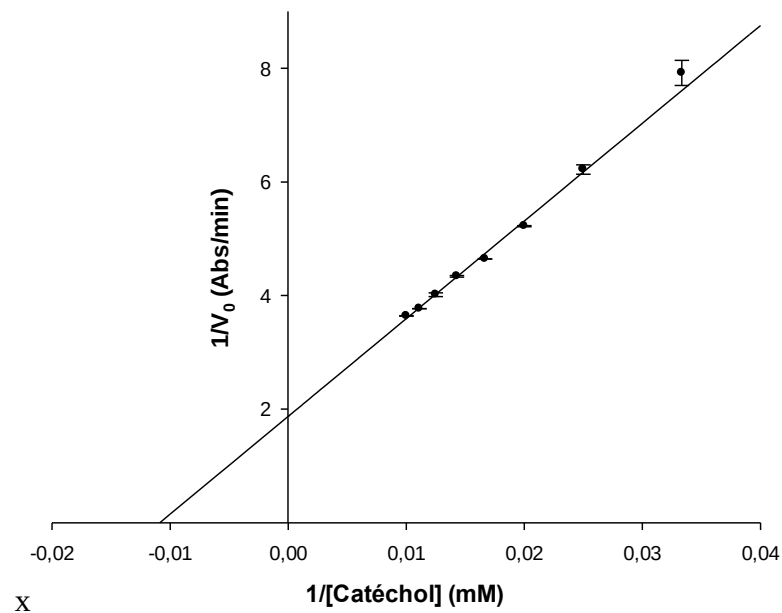
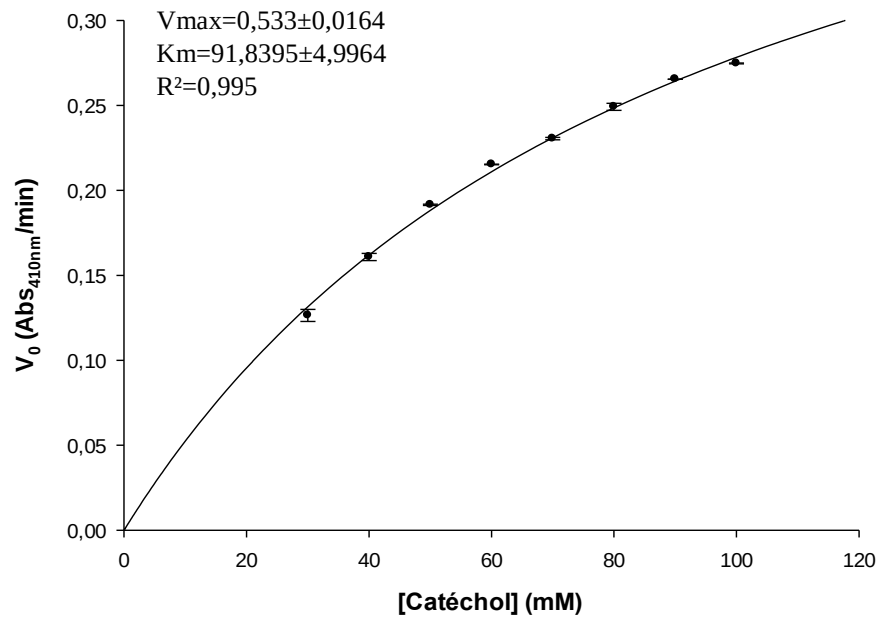


Figure 11: Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par la catéchol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L): (a) Représentation de **Michaelis-Menten**, (b) Représentation de **Lineweaver-Burk**.

On constate que la valeur de la constante de **Michaelis-Menten** est plus élevée par rapport à celle trouvée pour les PPOs des autres sources végétales. Par conséquent, la PPO de Deglet Nour d'Algérie a une faible affinité pour le pyrocatechol comme substrat.

Les valeurs de la constante de **Michaelis-Menten** de la PPO pour le catéchol comme substrat rapportées dans la littérature sont comme suit : 10.7 mM, pour la PPO de l'artichaut (*Cynarascolymus* L.) (**Dogan et al., 2005**); 2.45 mM pour la PPO de truffe (*Terfezialeonis* L.) (**Maache et Bendjeadia, 2011**) ; 5.55 mM, pour la PPO de la poire (*Pyruscommunis*) (**Ziyan et Pekyardimci, 2004**) ; 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighiaglabra* L.) (**Kumar et al., 2008**) ; 2 mM, pour la PPO d'avocat.

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

Gouzi et Benmansour (2007), Wang et al., (2007) et Önez et al., (2008) ont trouvé des valeurs de K_m de 0.4 mM, 6.3 mM et 3.65 mM pour le catéchol comme substrat, pour la PPO du champignon de Paris (*Agaricusbisporus*), de la PPO de la mangue (*Mangiferaindica* L.) et du raisin (*Vitisvinifera* L.) respectivement.

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

Le tableau suivant résume les valeurs des paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétales avec différents substrats utilisés.

Tableau 11: Paramètres cinétiques de quelques polyphénols oxydase d'origine végétale

Source	Substrat	V _{max}	K _m mM	Référence bibliographique
Cerise (<i>Malpghiaglabra</i>)	Catéchol	6,97(μM/min)	10,7	Dogan et al .,(2005)
	Pyrogallol	13,93	11,6	
Blé (<i>Triticumaestivum</i>)	Catéchol	.21(UI/min ml)	0.1243	Erat et al.,(2010)
	Pyrogallol	2.43	0.1040	
	4- méthylcatéchol	3.02	0.8861	
Aubergine <i>Solanummelongena L</i>	Catéchol	2,34(μM/min)	2.973	Todaro et al.,(2011)
	4- methylcatechol	5,55	2.122	
	Acide chlorogénique	2,31	1,351	
Persil <i>Petroselinumcrispum</i>	Catéchol	0,39(Abs/ml min)	7,9.10 ⁻⁴	Doğru & Erat.,(2012)
	Pyrogallol	0,07	7,4.10 ⁻⁴	
	4- méthylcatéchol	0,05	9,7.10 ⁻⁴	
	L-Dopa	0,02	1,5.10 ⁻⁴	
	Dopamine	0,35	5,93	
	Catéchin	0,06	1,6.10 ⁻²	
Radis (<i>Raphanussativus</i>)	Acide gallique	233(UI/min ml)	4,2	Goyeneche et al. .,(2013)
	Acide pyrogallique	4348	6,3	
	Acide chlorogénique	302	7,2	
	L-tyrosine	495	9,3	
	Catéchol	1587	28,3	

2.4 Effet de la concentration de l'enzyme :

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la PPO dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat. L'oxydation a été réalisée avec une concentration saturante en catéchol, soit 80 mM de volume réactionnel et différents volumes d'extrait enzymatique allant de 10 à 120 µl par 1 ml de volume réactionnel.

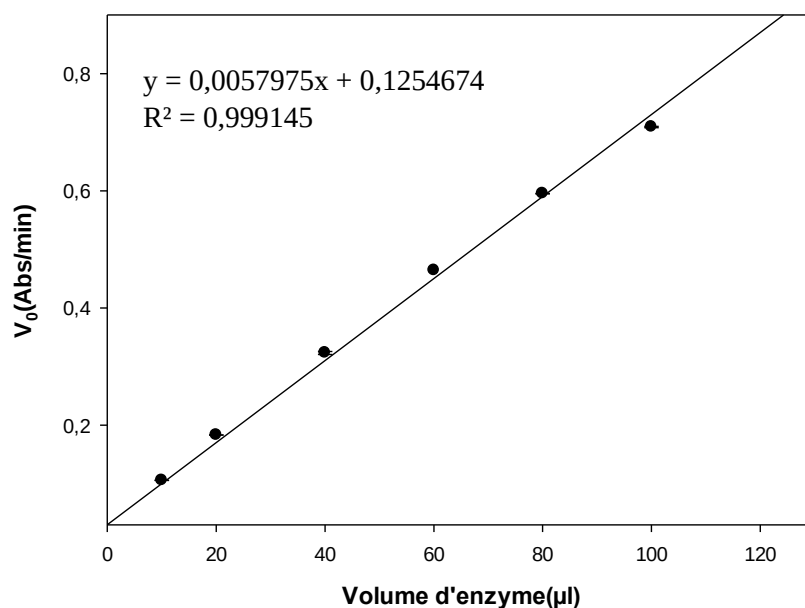


Figure 12: Effet de la concentration de la catéchol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L) sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 5.5 ; 30°C ; catéchol 40 mM)

La figure 12 montre que l'activité catécholase dépend de la concentration de l'enzyme et est directement proportionnelle à sa concentration dans le milieu réactionnel. Ce même comportement a été également décrit par **Ziyan et Pekyardimci, (2004)** et **Gouzi et Benmansour, (2007)**.

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

3. Détermination de la valeur d'IC₅₀ de l'acide ascorbique et l'acide oxalique sur l'activité enzymatique de la PPO :

L'effet de différentes concentrations d'acide ascorbique et/ou l'acide oxalique sur l'oxydation de la pyropyrocatechol sur l'activité enzymatique de la polphénol oxydase des dattes *Phoenix dactylifera L* cv deglet-Nour a été étudié.

Les résultats trouvés, montre que la concentration de de 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=0,228±0,024 et d'IC₅₀=2,40±0,38 en présence d'acide ascorbique et d'acide oxalique, respectivement.

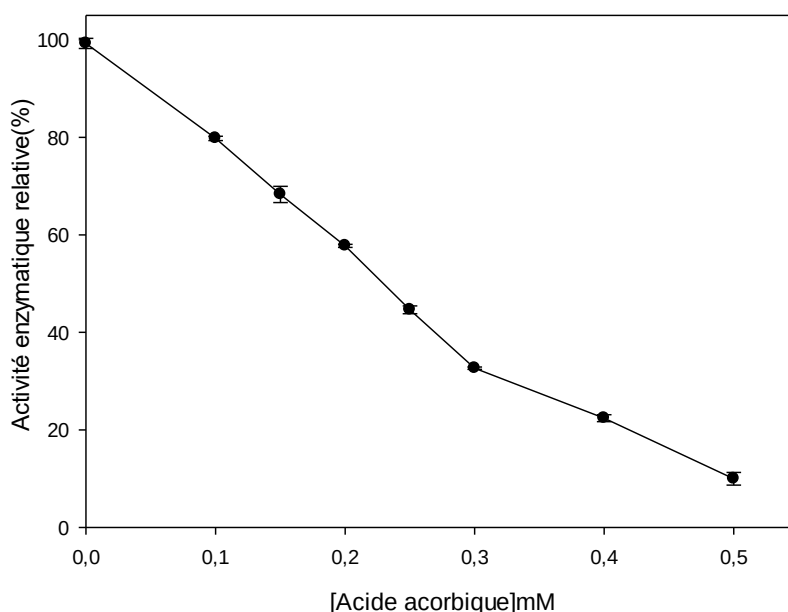


Figure 13 : L'effet de la concentration de l'acide ascorbique sur l'oxydation de Pyropyrocatechol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L* cv Deglet Nour). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5.5).

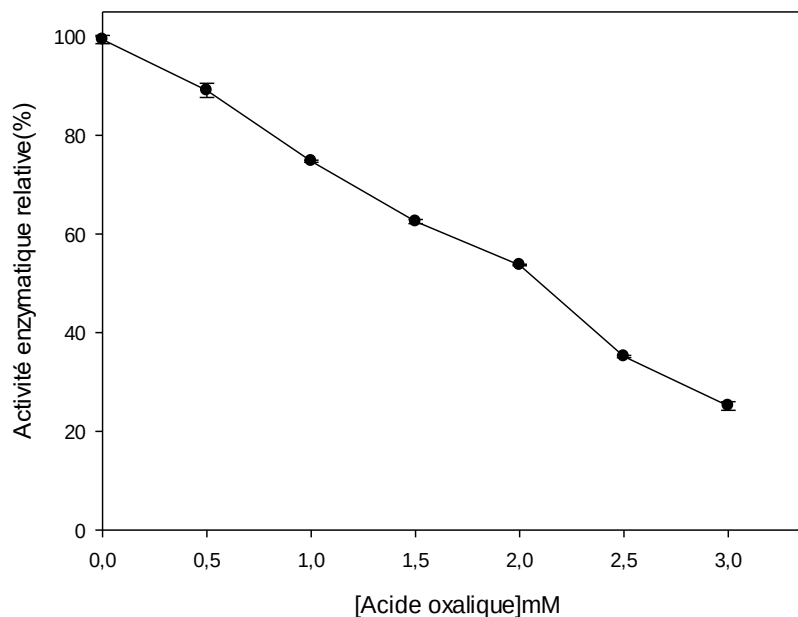


Figure 14 : L'effet de la concentration de l'acide oxalique sur l'oxydation de Pyropyrrocatechol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L cv Deglet Nour*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5.5).

Pour mieux comparer l'effet de l'acide ascorbique et/ou l'acide oxalique sur les PPOs d'origine végétale et celle de datte Deglet-Nour, les valeurs d'IC₅₀ de l'acide oxalique ainsi que l'acide ascorbique trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans les Tableaux (12 et 13) respectivement.

La valeur IC₅₀ était calculée, qui est définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%. Une valeur faible d'IC₅₀ indique que l'inhibiteur est puissant.

Tableau 12 : Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide ascorbique comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats

Source	Type de substrat phénolique	IC ₅₀ (mM)	Référence
Champignon de paris (<i>agaricusbisporus</i>)	Catéchol	0.147	Gouzi et al.,2010
Champignon de paris(<i>agaricusbisporus</i>)	Catéchol	1.00	Chen et al. 2003
Turffes (<i>terfeziàleonis</i>)	Catéchol	8.2	Gouzi., 2014
Plaquemine	Catéchol	5.00	Arzu et al. 2004
Turffes (<i>terfeziàleonis</i>)	L-Tyrosine	2.82	Djaïd et Kouidri 2015
Datte (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Catéchol	0.22	Notre étude

On remarque que l'affinité de la PPO de Champignon de paris (*Agaricus bisporus*) et de Deglet-Nour vis-à-vis de l'acide ascorbique est relativement similaire. La PPO de truffes semble être la moins sensible à l'acide ascorbique.

Tableau 13 : Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide oxalique comme inhibiteur trouvée à partir de différentes sources de PPO et le catéchol comme substrats.

Source	Type de substrat Phénolique	IC ₅₀ (mM)	Référence
Champignon de paris (<i>agaricusbisporus</i>)	Catéchol	1.1	Son et al. (,2000)
Turffes (<i>terfeziàleonis</i>)	Catéchol	8.21	Chàher et benmbàrek., (2011)
plaquemine	Catéchol	0.031	Arzu et al.,(2004)
Artichaut(<i>Cyanrascolymuys</i>)	Catéchol	0.194	Aydemir.,(2014)
Datte (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Catéchol	2.4	Notre étude

En revanche, on remarque l'efficacité de l'acide oxalique vis-à-vis de la PPO des dattes est moyenne par rapport aux autres sources et que l'acide ascorbique semble être plus puissant que l'acide oxalique avec un rapport d'environ 100 fois.

4. Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété Deglet-Nour par l'acide oxalique

L'effet inhibiteur de l'acide oxalique sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO des dattes cv Deglet Nour est étudié en utilisant le pyropyrrocatechol 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 ces acides organiques pour le substrat utilisé (Pyropyrrocatechol) est indiqué dans les tableaux 14 et 15.

Les valeurs « R^2 » proches de 01 indiquent bien que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

Tableau 14 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L*) cv Deglet Nour en utilisant le pyropyrrocatechol comme substrat

Inhibiteur	[I] mM	K_{is}	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
Acide oxalique	0			1,1088±0,06248	0,989	
	1,5	3,4091±0,0651	200,3860±14,738	0,7638±0,0434	0,987	Non compétitive
	3			0,5978±0,0336	0,986	

Tableau 15 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera L*) cv Deglet Nour en utilisant le pyropyrrocatechol comme substrat

Inhibiteur	[I] mM	K_i	K_m	V_{max}	R^2	Type d'inhibition
Acide ascorbique	0		112,4328±13,4158		0,989	
	0,15	0,1876±0,0098	206,44±16,1785	0,9368±0,0729	0,987	compétitive
	0,25		268,760±19,364		0,986	

Les valeurs de (K_{IS} , K_I) indiquées dans le tableau 14 et 15 suggère que ces acides organiques inhibent efficacement l'activité de la PPO de la variété Deglet Nour en présence de pyrocatechol, de même ce tableau montre que les représentations graphiques de $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$, est une série de courbes a une intersections , avec une diminution de la valeur V_{max} et pareillement, même valeur du K_m pour l'acide oxalique et est une série de courbes a une intersections, avec une diminution de la valeur K_m et pareillement, même valeur du V_{max} .

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de pyrocatechol par la PPO des dattes, suit une cinétique de **Michaelis-Menten**. La cinétique d'inhibition de ces acides organiques, agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de **Lineweaver-Burk**. Les résultats ainsi trouvées est représenté dans les figures (15 et 16) ci-dessous.

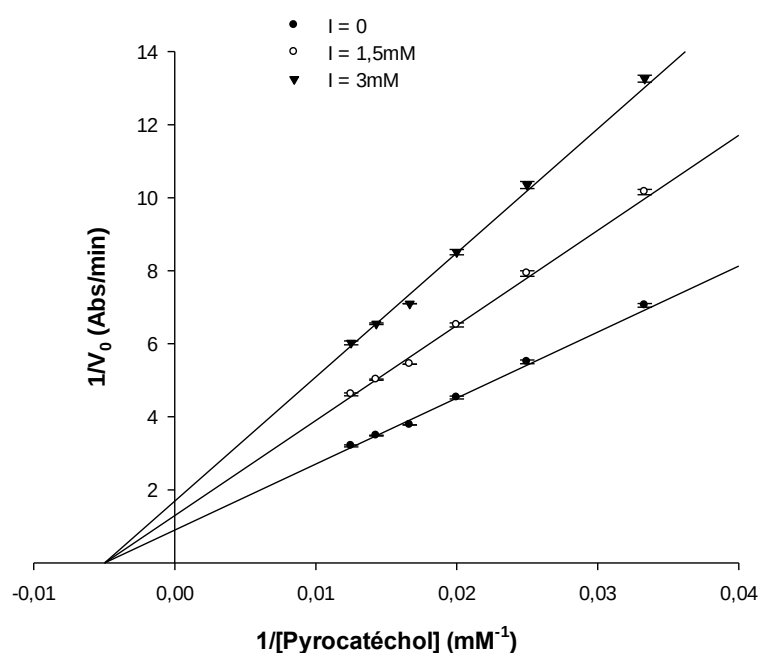


Figure 15 : Graphique de **Lineweaver-Burk** de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv DegletNour*) par l'acide oxalique . Les concentrations d'acide oxalique sont 0 (●), 1,5(○), et 3(▼)

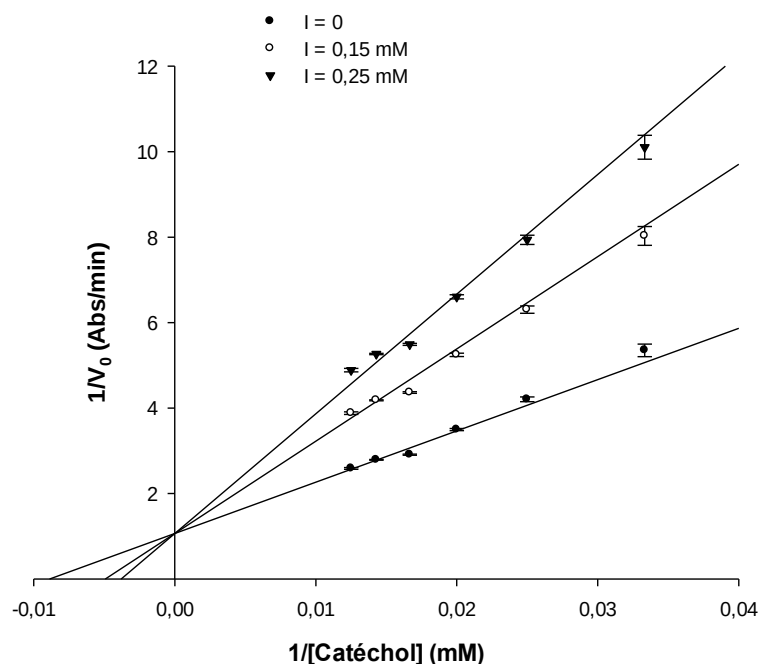


Figure 16 : Graphique de **Lineweaver-Burk** de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv DegletNour*) par l'acide ascorbique. Les concentrations d'acide ascorbique sont 0 (●), 0,15(○), et 0,25(▼)

En présence de l'acide oxalique (fig15) nous remarquons une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ($1/[S]$) mais de différentes pente. Ceci indique que le type d'inhibiteur est non compétitif pour cet acide organique.

L'acide oxalique 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 tableaux (14 et 15), le constante d'inhibition (K_I) pour l'acide ascorbique, utilisant le pyrocatéchol comme substrat $0,1876 \pm 0,0098$ mM .

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

$$1/V_0 = (\alpha K_m / V_{\max}) / ([S] + \alpha') / V_{\max}$$

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).

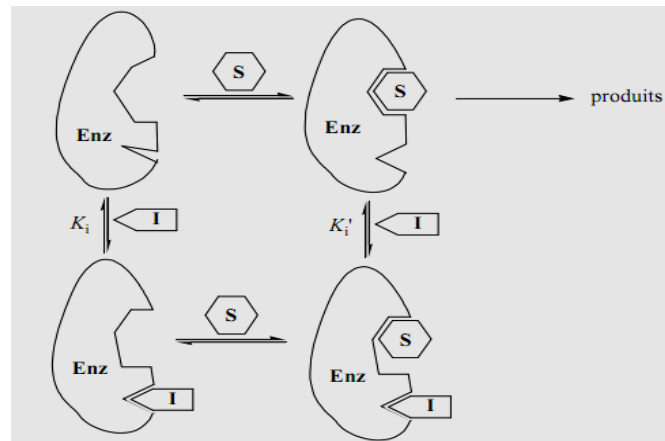


Figure 17 : Représentation de l'inhibition non compétitive
(Keillor, 2004)

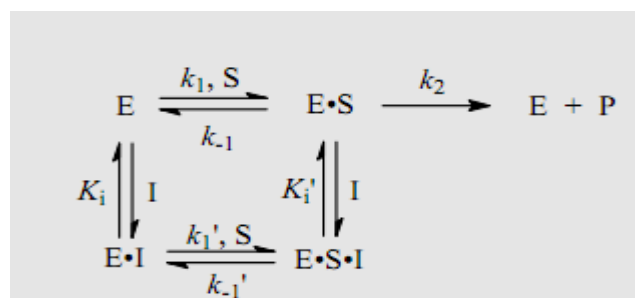


Figure 18: Schéma de type **Michaelis-Menten** de l'inhibition non compétitive
(Keillor, 2004)

L'inhibition par l'acide oxalique peut être fondée sur l'hypothèse que l'enzyme est inactivée en liant l'inhibiteur par chélation au cuivre du site actif de l'enzyme en présence du substrat (**Ferrar et Walker, 1993**). Les PPOs de sources différentes peuvent présenter un mécanisme d'inhibition différent, par exemple **Tulin, (2004)** ; **Fujita et Tono, (1988)** ; **Huang et al., (1996)** ont étudié la PPO des artichauts, des aubergines et des poires, respectivement, et leurs résultats sont en accord avec notre étude. En outre les PPO de céleri, de champignon, et de blé (**Tulin et Gulay, 2006** ; **Son et al., 2000** ; **Erat et al., 2010**) ont présenté un mécanisme d'inhibition compétitif.

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

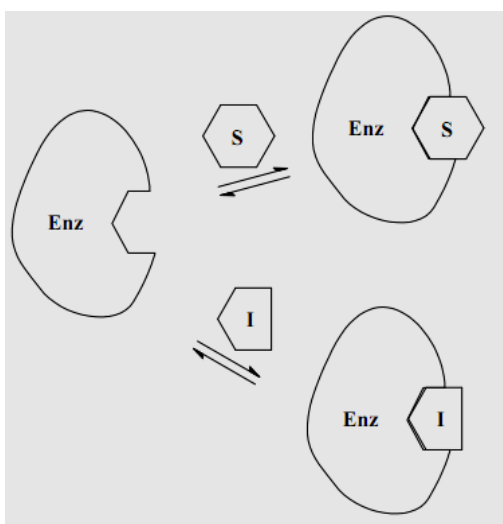


Figure 19 : Représentation de l'inhibition compétitive (**Keillor, 2004**)

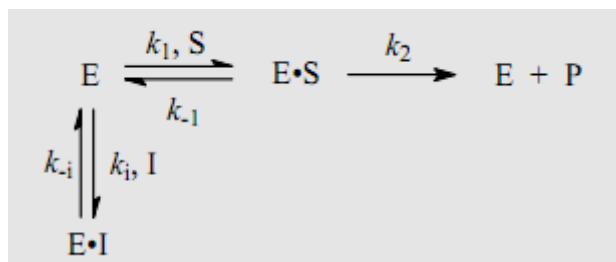


Figure 20 : Schéma de type **Michaelis-Menten** de l'inhibition compétitive (**Keillor, 2004**)

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

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

Avec :

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

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

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

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

Les constantes d'équilibre de fixation de ces deux inhibiteurs sur l'enzyme libre, K_I , sont obtenues à partir de la représentation graphique de la constante de **Michaelis-Menten** apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'acide ascorbique et/ou l'acide oxalique.

Comme s'est indiqué dans le Tableau (14) et la constante d'inhibition (K_I) pour l'acide ascorbique, utilisant le catéchol comme substrat est $3,4091 \pm 0,0651 \text{ mM}$

Pour l'acide ascorbique nos résultats sont similaires avec ceux trouvés pour la PPO extraite d'artichauts (*Cynarascolymus L.*) (**Tülin, 2003**), cependant, ils sont en désaccord avec ceux obtenus pour la PPO extraite de blé (*Triticumaestivum L.*) où l'effet de l'acide ascorbique a été décrit comme non compétitif avec le catéchol comme substrat (**Erat et al., 2010**). Ce qui indique que le type d'inhibition peut dépendre de l'origine de la PPO étudiée.

L'acide ascorbique est le composé chimique le plus fréquemment utilisé pour la réduction chimique des o-quinones en composés o-diphénoliques pour le contrôle du brunissement des fruits et légumes. Mais, son effet est temporaire (**Nicolas et al., 1994**) il empêche le brunissement tant qu'il est présent sous forme réduite (**Schwartz et al., 2001**).

Son caractère inhibiteur est lié à son action comme un antioxydant plutôt qu'un inhibiteur de l'enzyme puisqu'il réduit la quinone formée par l'enzyme en diphénol initial avant qu'elle entame les réactions secondaires qui mènent au brunissement (**Golan et al., 1984**).

Conclusion

Les dattes Deglet-Nour *Phoenix dactylifera* L. Est un fruit de grande valeur nutritionnelle est commerciale. L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique causé par la polyphénol oxydase.

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

L'application de l'acide ascorbique et/ou l'acide oxalique comme des inhibiteurs pour réduire le brunissement dû à l'enzyme PPO des dattes *Phoenix dactylifera* L cv Deglet Nour est ainsi rapportée pour la première fois.

D'après les résultats obtenus à partir de ce travail, on conclue que, l'acide ascorbique et/ou l'acide oxalique présentent un mécanisme compétitif et non compétitif respectivement dont l'acide oxalique 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 tandis que l'acide ascorbique se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

D'après les valeurs d'IC₅₀, ces derniers acides organiques peuvent être considérés comme étant des inhibiteurs efficaces. Ces deux acides organiques sont non toxiques et peu couteux ce qui rend leur utilisation comme étant des agent anti-brunissement très appropriée.

Afin d'améliorer le pouvoir inhibiteur des acides organiques, il est envisageable de l'associer avec d'autre agents d'anti brunissement tel que l'acide ascorbique ou carrément avec en faisant appel à un autre moyen physique par exemple comme l'inactivation thermique.

Comme perspectives, il serait plus intéressant d'étudier l'effet de ces deux inhibiteurs sur les propriétés cinétiques et thermodynamiques de la PPO des dattes.

*Références
Bibliographiques*

« A »

- Acourene, S., Buelguedj, M., Tama, M., et Taleb, B. (2001).** *Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des ziban. Revue Recherche Agronomique, N° 8. Ed. INRAA, 19-39 p.*
- Ahmed, J., Al-Jasass, F. M., et Siddiq, M. (2014).** *Date fruit composition and nutrition. Dates: Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits, 261-283p.*
- Al-Farsi, M. A., and Lee, C.Y. (2008).** *Nutritional and functional properties of dates: a review. Critical reviews in food science and nutrition, 48(10), 877-887p.*
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M., and Al-Rawahy, F. (2007).** *Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their byproducts. Food Chemistry, 104(3), 943-947p.*
- Allaith, A.A. (2008).** *Antioxidant activity of Bahraini date palm (Phoenix dactylifera L.) fruit of various cultivars. International Journal of Food Science & Technology, 43(6), 1033-1040p.*
- AL-Shahib, W., and Marshall, R. J. (2003).** *The fruit of the date palm: it's possible use as the best food for the future International Journal of Food Sciences and Nutrition, 54, 247-259 pp.*
- Anonyme, (2002).** *Statistiques agricoles : Superficies et productions. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Série A, 5-6 p.*
- Aydemir, T., and Akkanli, G. (2006).** *purification and characterization of poly phenoloxidase from celery root (Apium graveolens) and the investigation on enzyme activity of some inhibitors. Int J. food Sci Technol. 41.1090-10p.*

« B »

- Bakkaye, S. (2006).** *Lexique phœnicicole en arabe et en mozabite. CWANA, HCA et RAB98/G31. 14-16, 24-25, 31p.*
- Barrett, D.M., Somogyi, L.P., and Ramaswamy, H.S. (2005).** *Processing fruits (Sciences and Technology). Second ed. CRC Press, Orlando, USA, 841 p.*

- Barreveld, W. H. (1993).** *Date palm products* FAO Agricultural Services Bulletin, FAO, Rome, Italie. 101, 211 p.
- Belguedj, M. (2002).** *Les ressources génétiques du palmier dattier : caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du Sud-Est Algérien.*
- Booij, I., Piombo, G., Risterucci, J. M., Coupe, M., Thomas, D., et Ferry, M. (1992).** *Etude de la composition chimique de dates à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (Phoenix dactylifera L.).* Journal of Fruits, vol. 47, N° 6, 667-677pp.
- Bouguederi, L., Maanani, F., Missaoui, M., Bounagua, N., et Dore, J.C. (1994).** *Analyse typologique d'une population de palmiers dattiers males (Phœnix dactylifera L.) au moyen de différentes approches multiparamétriques.* Améliorant. Prod. Agro. Milieu Aride. 6 : 263-277pp.
- Bouguedoura, N. (1991).** *Connaissance de la morphogénèse du palmier dattier. Etude in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs.* Mémoire de doctorat. U.S.T.H.B. Alger. 201 p.
- Bousdira, K. (2007).** *Contribution à la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une valorisation de la biomasse : caractérisation morphologique et biochimique des dattes de cultivars les plus connus de la région du Mzab, classification et évaluation de la qualité.* Thèse Mag. Dép. Technologie alimentaire. Uni. Boumerdès, 123pp.
- Buelguedj, M., (2002).** *Les ressources génétiques du palmier dattier : caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du Sud-Est Algérien.* Revue annuelle de L'INRAA N°1/2002. 28-289 p.

« C »

- Chaibi, N. (2002).** *Potentialités androgénétiques du palmier dattier Phoenix dactylifera L et culture in vitro d'anthères.* Biotechnologie Agron Soc Environ.6, 201-207 pp.
- Chao, C.T., and Krueger, R. R. (2007).** *The date palm (Phoenix dactylifera L.): overview of biology, uses, and cultivation.* HortScience, 42(5), 1077-1082p.
- Chen, L., and Flurkey, W.H. (2002).** *Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms.* Current topics in phytochemistry. Vol. 5, 109-120 pp.
- Claus, H., and Decker, H. (2006).** *Bacterial tyrosinases.* Systematic and Applied Microbiology, Vol. 29. Issue 1, 3-14 pp.

« D »

- Daas Amiour, S. (2009).** *Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (Phoenix dactylifera L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique. Mémoire de magister, Université de Batna.*
- Dalmadi, I., Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., and Hendrickx, M. (2006).** *Characterisation and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (Fragaria ananassa) polyphenol oxidase: A kinetic study. Journal of Food Biochemistry, 30, 56–76p.*
- Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. (2002).** *NOTE & TIPS. Zymography of Monophenolase and o-Diphenolase Activities of Polyphenol oxidase. Analytical Biochemistry Vol.306, 336-339 pp.*
- Djerbi, M. (1994).** *Précis de phoeniculteurs. FAO, 192 p.*
- Djerbi, M. (1994).** *Précis de phoeniculteurs. FAO, 192 p.*
- Djouab, A. (2007).** *Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Memoire de Magister.option génie alimentaire, Université de Boumerdès.24 p.*
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., and Alkan, M. (2005).** *Purification and characterization of Ocimum bacilicum L. Polyphenol Oxidase. Journal Of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53, No. 26, 10224-10230 pp.*
- Derardja A eddine, Pretzler M, Kampatsikas I, Barkat M, Rompel A.** *Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from Apricot (Prunus armeniaca L.)*
- Duckworth, H.W., and Coleman, J.E. (1970).** *Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 245, No. 7, 1613-1625*

« E »

- Eidhin, N., Myrphy, E., and O'Beirne, D. (2006).** *Polyphenol Oxidase from Apple (Malus domestica Borkh .cv Bramley' Seedling) purification strategies and characterization. Journal Of Food Science. Vol. 71, No. 1, 51-58 pp.*
- El-Arem, A., Saafi, E. B., Flamini, G., Issaoui, M., Ferchichi, A., Hammami, M., and Achour, L. (2012).** *Volatile and nonvolatile chemical composition of some date fruits (Phoenix dactylifera L.) harvested at different stages of maturity. International Journal of Food Science & Technology, 47(3), 549-555p.*

Espiard, E. (2002). *Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc. Lavoisier, Paris. 147-155 p.*

« F »

Fang, Z., Zhang, M., & Wang, L. (2007). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in bayberries (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.). *Food Chemistry*, 100, 845–85p.

FAO, (2003). *The marketing potential of date palm fruits in the European market, FAO commodity and Trade Policy Research Working Paper No. 6, Pascal Liu (Ed.), Raw Materials, Tropical and Horticultural Products Service Commodities and Trade Division, FAO, Rome*

Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., and Tudela, J. (2004). *Action Mechanism of Tyrosinase on meta-and para-Hydroxylated Monophenols. Biol. Chem., Vol. 381, 313-320 pp.*

Fernandez, D., Lourd, M., Ouinten, M., et Geiger, J. P. (1995). *Le Bayoud du palmier dattier: une maladie qui menace la phoéniculture. Phytoma: la Défense des Végétaux, (469), 36-40p.*

« G »

Ghazi, F., et Sahraoui, S. (2005). *Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantbouchet et Hamraia. Mémoire d'Ingénieur. Institute national d'agronomie. Alger, 81 p.*

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

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

Gouzi, H. and Benmansour, A. (2007). *Partial purification and characterization of Polyphenol Oxidase Extracted from Agaricus bisporus (J.E. Lange) Imbatch. International Journal Of Chemical Reactor Engineering. Vol. 5.Article A76.*

« H »

Habib, H. M., and Ibrahim, W. H. (2009). *Nutritional quality evaluation of eighteen date pit varieties. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 60, 99–111p.*

« I »

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

« J »

Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P. et Brulé G. (2006). *Sciences des aliments, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 383 p.*

Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., and Pellon, G. (1998). *Agaricus bisporus browning: a review. Mycol. Res. Vol. 102, No. 12, 1459-1483 p.*

« K »

Khatun, S., Absar, N., and Ashraduzzaman, M. (2001). *Purification, characterization and effect of physico-chemical agents on stability of phenoloxidase from sajna (Moringa oleifera L.) leaves at mature stage. Pakistan journal of biological sciences Vol. 4, Issue 9, 1129-1132 pp.*

Khenfar, B. (2004). *Contribution à l'étude de quelques caractéristiques morphologiques de quatre cultivars de palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) dans la région de droh (Wilaya de Biskra). Mémoire d'Ingénieur. Département d'agronomie. Université de Batna.*

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

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. Vol.110, 328-333 pp.*

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. Vol.110, 328-333 p.*

« L »

Liu, P. (2003). *The marketing potential of date palm fruits in the European market. FAO Commodity and Trade Policy Research Working Paper (FAO).*

Lorenço, E.J., Neves, V.A., and DaSilva, M.A . (2000). *Polyphenol oxydase from sweet potato: purification and properties. J. Agric. Food chem., Vol. 40, 2369-2373 pp.*

Lozano, J.E. (2006). *Fruit manufacturing Scientific Basis, Engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance. Springer Sciences Business Media, LLC. Bahia Blanca, Argentine. 237 p.*

Lu, S., Luo, Y., Turner, E., and Feng, H. (2007). *Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. Food Chemistry, 104(2), 824–829 p.*

« M »

- Makhloufi, A. (2010).** *Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (Matricaria pubescens (Desf.) et Rosmarinus officinalis L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Mémoire de obtenir le grade de doctorat d'état en biologie. université Aboubaker Belkaid. Bechar,166P.*
- Mann, H. S., Alton, J.J., Kim, S., and Tong, C.B. (2008).** *Differential expression of cell-wall modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage.* *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1), 152-157p.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., and Kefalas, P. (2005).** *Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (Phoenix dactylifera).* *Food chemistry*, 89(3), 411-420p.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., and Kefalas, P. (2005).** *Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (Phoenix dactylifera).* *Food Chemistry*, 89, 411–420.-816p.
- Marshall, M. R., Kim, J., and Wei, C. (2000).** *Enzymatic browning in fruits, vegetables and sea foods.* *FAO: Rome, Italy*, 40 p.
- 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*
- Matsui, K. N., Granado, L. M., De Oliveira, P. V., and Tadini, C. C. (2007).** *Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions.* *LWT-food science and technology*, 40(5), 852-859p.
- Mayer, A. M. (2006).** *Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places, A review.* *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331p.
- Mayer, A., and Harel, E. (1991).** *Phenoloxidases and their significance in fruits and vegetables.* *Food Enzymology*, Edited by P.F. Fox (Elsevier Publisher). 373-397 p.
- Mayer, A.M., and Harel, E. (1979).** *Polyphenol oxidase in plants.* *Phytochemistry*, Vol. 18,193-215p.
- Mazoyer, M. (2002).** *Larousse agricole, le monde agricole au XXI émesiècle. Ed. Mathilde Majorel. 224p*

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.*

Mimouni, Y. (2015). *Développement de produits diététiques hypoglycémisants à base de dattes molles variété «Ghars», la plus répandue dans la cuvette de Ouargla. Thèse de doctorat, Université de Ouargla.*

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 »

Nagai, T., and Suzuki, N. (2001). *Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 3922.*

Nimet Batlas, Semra Pakyildiz, Zehra can; Barbaros Dincer et Sevgi Kolayli *International Journal of Food Properties Volume 20, 2017 - Issue Pages 1377-1391.*

Noui, (2001). *Optimisation de la production de la biomasse Saccharomyces cerevisiae cultiver sur extrait de dates. Mémoire d'ing. Agr. Batna. 6p.*

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., Karakus, E., and Pekyardimci, S. (2008). *Izmir grape Polyphenol Oxidase (Vitis vinifera L) partial purification and some kinetic properties. Journal of Food Biochemistry. Vol. 32, 398-414 pp.*

Ozenda, P. (2004). *Flore et végétation du Sahara. Troisième édition. CNRS édition. 750005 Paris, 92, 438, 662 p.*

« P »

Palmer, J.K. (1963). *Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. Plant Physiology. 508 513 pp.*

Peyron, G. (2000). *Cultiver le palmier dattier. Guide illustré de formation. Quae, France, 112*

« Q »

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 »

Rapeanu, G., Mircea B. (2005). *Thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase extractated from white grapes food technology, Vol IX, n° .1*

Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., and Sanjust, E. (2002). *Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, Vol. 17, N° .4, 207 218 pp.*

Rivas, N.D.J., and Whitaker, J.R. (1996). *Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. Plant Physiol. Vol. 52, 501-507p.*

Rodakiewicz-Nowak, J., and Ito, M. (2003). *Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from Streptomyces sp. REN-21. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. Vol. 78, Issue 7, 809 pp.*

Rodakiewicz-Nowak, J., and Ito, M. (2007). *Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from Streptomyces sp. REN-21. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. Vol. 78, Issue 7, 809-816 p.*

« S »

Saafi, E. B., Louedi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M. F., Hammami, M., and Achour, L. (2011). *Protective effect of date palm fruit extract (Phoenix dactylifera L.) on dimethoate induced oxidative stress in rat liver. Experimental and Toxicologic Pathology, 63(5), 433 441p.*

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.*

Siddiq, M., and Jerryn, C. (2000). *Physico-chemical properties of polyphenol oxidase from d'Anijou and Bartlttpears (Pyrus Communis.l.) Journal of Food Processing and Preservation 24 (2000) 353-364p.*

Sidhu, J.S. (2006). *Date fruits production and processing. Dans: Hui, Y.H. (Ed.), Handbook of Fruits and Fruit Processing. Blackwell, Oxford, 391–419 pp.*

Siegbahn, P.E.M. (2004). *The catalytic cycle of catechol oxidase. J Biol Inorg Chem. Vol. 9, 577-590pp.*

Siegbahn, P.E.M. (2004). *The catalytic cycle of catechol oxidase. J Biol Inorg Chem. Vol.9, 577-590 pp.*

Singh A1,2, Wadhwa N1. J Food Sci Technol. :2085-2093. doi: 10.1007/s13197- 017-2647-z . *Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from elephant foot yam (Amorphophallus paeoniifolius).*

Slatnar, A., Mikulic, P., Kovsek, M., Halbwirth, H., Stampar, F., Stich, K., et Veberic, R. (2010). *Enzyme activity of the phenylpropanoid pathway as a response to apple scab infection. Annals of Applied Biology, 156(3), 449-456.*

Šukalović, V., Veljović-Jovanović, S., Maksimović, J.D., Maksimović, V., and Pajić, Z. (2010). *Characterisation of phenol oxidase and peroxidase from maize silk. Plant Biology, 12(3), 406-413p.*

« T »

Tirichine, H.S. (2010). *Etude ethnobotanique, activité antioxydants et analyse photochimique de quelques cultivars de palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) du Sud-Est Algérien. Mémoire du diplôme de Magister en biologie. Université d'ORANes Senia,106p.*

Tomás-Barberán, F. A., and Espin, J.C. (2001). *Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81(9), 853-876p.*

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.*

« V »

Vayalil, P.K. (2012). *Date fruits (Phoenix dactylifera Linn): an emerging medicinal food. Critical reviews in food science and nutrition, 52(3), 249-271p.*

« W »

Wang, J., Jiang, W., Wang, B., Zhengli, G., Liu, S., et Luo, Y. (2007). *Partial purification of Polyphenol Oxidase in Mango (Mangifera indica L.cv. TAINGONG) Pulp. Journal of Food Biochemistry. Vol.31, 45-55 pp.*

Whitaker J., and 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, 2-7p.*

Whitaker, J. R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences. In : New York: Marcel Dekker braz. J. Food technol., Vol.8, N°. 3, pp. 233-242, 2.ed, 625 pp.*

Wrigley, G. (1995). *Date-palm (Phoenix dactylifera L.). Dans: Smartt J., Simmonds N.W. (Eds.), The evolution of crop plants (2 ème ed.), Longman, Essex, United Kingdom, 399–403 p.*

Wuyts, N., Waele, D., Swennen, R. (2006). *Research article Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (Musa acuminata Grande naine) roots, Plant Physiology and Biochemistry 44, 308–31p.*

« X »

Xu, J., Zheng, T., and Meguro, S. (2004). *Purification and characterization of polyphenol oxidase from henry chestnuts (Catanea henryi). J Wood Sci., Vol. 5, 260-265 pp.*

« Y »

Yağar, H., and Sağiroğlu, A. (2002). *Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. Turk J Chem. Vol. 26, 97-103 pp.*

Yahia, E. M., and Kader, A.A. (2011). *Date (Phoenix dactylifera L.). Dans: Yahia E. M (Ed), Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, 41–79 p.*

Yemenicioğlu, A. (2002). *Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. Eur Food Res Technol. Vol. 214, 313-319 pp.*

Yemenicioğlu, A., and Cemeroğlu, B. (2003). *Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (Prunus armeniaca L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. J. Agric. Food chem., Vol. 51, N°. 8, 2371-2379 p.*

Yoruk, R., and Marshall, M. R. (2003). *Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review1. Journal of Food Biochemistry, 27(5), 361-422p*

« Z »

Zaid, A., and Arias-Jimenez, E.J. (2002). *Date palm cultivation. FAO plant production and protection paper. 156, Rev. 1. FAO. Rome*

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

Ziyan, E., and Pekyardimci, S. (2004). *Purification and Characterization of Pear (Pyrus communis) Polyphenol oxidase. Turk J Chem. Vol. 28, 547-557 p.*

Résumé

Ce travail avait comme objectif d'étudier l'effet de l'acide ascorbique et l'acide oxalique sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes « *Phoenix dactylifera L* » cv *Deglet Nour*. L'activité de PPO a été suivie en utilisant le spectrophotomètre à 410 nm en conditions optimales en terme de pH5.5 et température 30°C et ceci en présence de catéchol comme substrat. Une inhibition significative a été remarquée en appliquant les deux acides organiques avec plus d'efficacité pour l'acide ascorbique. Les valeurs d'IC₅₀ ainsi obtenues sont 0,228±0,024 mM et 2,40±0,38mM pour l'acide ascorbique et oxalique respectivement. De même La représentation de **Lineweaver-Burk** indique que l'acide ascorbique joue le rôle d'un inhibiteur compétitif tandis que l'acide oxalique présente un mécanisme non compétitif avec des valeur de KI égales 0,1876±0,0098 mM et K_{IS} 3,4091±0,0651 mM .respectivement .

Mots clés: *Phoenix dactylifera. L*, PPO, acide ascorbique, acide oxalique, Inhibition, catéchol, Brunissement enzymatique.

ملخص:

الهدف من هذا البحث هو دراسة تأثير حمض الأسكوربيك و حمض الأكساليك على النشاط الإنزيمي للفينول أوكسيداز للتمور كنصف دقلة نور. حيث يتم متابعة نشاط الفينول أوكسيداز باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند 410 نانومتر في الظروف المثلى من حيث درجة الحموضة pH5.5 ودرجة الحرارة 30 درجة مئوية وهذا في وجود الكاتيكول كركيزة. وقد لوحظ أن هناك تثبيط كبير للإنزيم من خلال تطبيق اثنين من الأحماض العضوية وبشكل أكثر كفاءة "حمض الأسكوربيك". إن قيم IC₅₀ التي تم الحصول عليها هي 0,228±0,024 و 2,40±0,38 لحمض الأسكوربيك والأكساليك على التوالي. وبالمثل ، يشير تمثيل **Lineweaver-Burk** إلى أن حمض الأسكوربيك يعمل كمثبط تنافسي بينما يعرض حمض الأكساليك آلية غير تنافسية بقيم K_I تساوي 0,1876±0,0098mM و K_{IS} 3,4091±0,0651 mM على التوالي.

الكلمات المفتاحية : دقلة نور، الفينول أوكسيداز ، حمض الاسكوربيك حمض الأكساليك ، تثبيط ، الكاتيكول ، والإسمرار الإنزيمي.

Abstract :

The objective of this work was to study the effect of ascorbic acid and oxalic acid on the PPO enzymatic activity of "Phoenix dactylifera L" dates as a Deglet Nour variety. The PPO activity was monitored using the spectrophotometer at 410 nm in optimal conditions in terms of pH5.5 and temperature 30 ° C and this in the presence of catechol as a substrate. Significant inhibition was noticed by applying the two organic acids more efficiently for ascorbic acid. The IC₅₀ values thus obtained are 0,228±0,024mM and 2,40±0,38mM for ascorbic and oxalic acid respectively. Similarly The **Lineweaver-Burk** representation indicates that ascorbic acid acts as a competitive inhibitor while oxalic acid exhibits a no competitive mechanism with K_{IS} values of K_I 0,1876±0,0098 mM and K_{IS} 3,4091±0,0651 mM respectively.

Key words: Phoenix dactylifera. L, PPO, ascorbic acid, oxalic acid, Inhibition, catechol, enzymatic browning.

