

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

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

Etude cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase de
datte (*Phoenix dactylifera* L. cv Tedala)
par l'acide citrique

Présenté par :
M^{lle}. LABGAÂ Djihad
M^m. NOUIOUA Zineb

Devant le jury :

Président M. BENACEUR Farouk	Université Amar Télidji-Laghouat
Rapporteur M. GOUZI Hicham	Université Amar Télidji-Laghouat
Examineur M. LEBOUKH Mourad	Ecole National Supérieure 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 datte (*Phœnix dactylifera* L. cv Tedala) par l'acide citrique

Présenté par :

M^{lle}. LABGAA Djihad

M^{dm}. NOUIOUA Zineb

Devant le jury :

Président M. BENACEUR Farouk Université Amar Télidji-Laghouat

Rapporteur M. GOUZI Hicham Université Amar Télidji-Laghouat

Examineur M. LEBOUKH Mourad Ecole National Supérieure de
Ouargla

Soutenu publiquement le : 15 Mai 2018

SOMMAIRE

Dédicaces	I
Remerciement	II
sommaire	III
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	V
Liste d'abréviation	VI
Résumé	VII
Introduction générale.....	01

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I	Le palmier dattier	03
I.1	Généralité	03
I.2	Historique	03
I.3	Classification Botanique (Taxonomie)	04
I.4	Ecologie	04
I.5	Cycle biologique	04
II	Les Datte de la Variétés de Tedala	05
II.1	Définition	05
II.2	Stade de maturation des dattes	06
II.3	Classification des dattes	07
II.3.1	Selon la consistance	07
II.3.2	Selon la date de maturation	07
II.3.3	Selon la commercialisation	08
II.4	Production des dattes	08
II.4.1	En Algérie	08
II.4.2	Dans le monde	08
II.5	Caractéristique biochimique des dattes	09
II.6	Les enzymes des dattes	10
II.7	L'intérêt et l'utilisation des dattes	10
III	Polyphénol oxydase	10
III.1	Historique	10
III.2	Nomenclature	11
III.3	Définition	11
III.4	Classification	11

III.5	Source et localisation	12
III.6	Caractéristiques réactionnelles	12
III.7	Structure	13
III.8	Le site actif	14
III.9	Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase.....	15
III.10	Méthode de mesure de l'activité enzymatique	17
III.11	Spécificité de substrat	17
III.12	Effet de PH	18
III.13	Effet de la température.....	18
III.14	Effet des effecteurs	19
III.15	Applications	21
VI	Brunissement enzymatique	21
VI.1	Contrôle de brunissement enzymatique	22
VI.1.1	Moyens physique de contrôle de brunissement enzymatique	22
VI.1.1.1	Les traitement thermiques	22
VI.1.1.2	La congélation	23
VI.1.2	Moyens chimique de contrôle de brunissement enzymatique	23
VI.1.2.1	Agent réducteurs	24
VI.1.2.2	Agent chélateur	24
VI.1.2.3	L'inhibition ciblent l'enzymes	24
VI.2	Les activateurs et les inhibiteurs	24
VI.2.1	Les activateurs	24
VI.2.2	Les inhibiteurs	25

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1	Matériels	27
1.1	Matériels biologiques	27
1.2	Produits chimiques	27
2	Méthodes	27
2.1	Préparation de l'extrait brut de la PPO	27
2.2	Mesure de l'activité de PPO.....	28
2.3	Effet du pH	28
2.4	Etude de la stabilité thermique	28
2.5	Effet de la concentration de l'enzyme	29

2.6	Détermination des paramètres cinétiques	29
2.7	Détermination des valeurs d'IC ₅₀	29
2.8	Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide citrique	30
2.9	Analyse des résultats expérimentaux	30

CHAPITRE III

RÉSULTAT ET DISCUSSION

III.1	Extraction du polyphénol oxydase des dattes	31
III.2	Les conditions optimales de l'activité Pyrocatechol oxydase	32
III.2.1	Effet du pH	32
III.2.2	Etude de la stabilité thermique	33
III.2.3	Effet de la concentration de l'enzyme	34
III.2.4	Détermination des paramètres cinétiques	35
III.2.5	Détermination de la valeur d'IC ₅₀ de l'acide citrique sur l'activité enzymatique de PPO	38
III.2.6	Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété par l'acide citrique	39
	Conclusion	42
	Référence bibliographique.....	43

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mon cher père

Ma chère mère

Mes frères

Mes soeurs

*A toutes mes amies Bey Djahida et Sonne yousra
et Ma binôme ZINEB.*

DJIHAD

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère mère

A mon marie

Mon frère

Ma Sœur

A toutes ma familles et mes amies et qui je les connues et

Surtout ma binôme Djihad.

Zineb

Remerciements

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage »
Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de
m'avoir donné la santé la patience, le courage et la volonté pour achever ce travail.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier monsieur GOUZI HICHAM et BENACEUR
FAROUK pour avoir accepté de diriger ce travail. Nous vous remercie de la
confiance qu'il nous accordée, ainsi que son encouragement et ses précieux conseils
qui nous permis de réaliser cette Mémoire.*

*Nous tenons à remercier tous les enseignants du département de Biologie à
l'université de -Laghouat- qui nous ont permis de bénéficier de leur expériences, de
leur compétences et de leur rigueur scientifique tout le long de notre formation
universitaire.*

*Nos remerciements vont à nos familles ; surtout nos parents, pour leurs innombrables
sacrifices.*

*Nos remerciements vont également à tous nos collègues de Promotion MASTER
Biochimie 2018 pour leur gentillesse et pour leur franche camaraderie ;
particulièrement : Lamrani Meriem, Bey Djahida et Sonne Yousra.*

Liste des figures

N° des Figures	Titre	Page
Figure:01	Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du dattier (Munier., 1973)	05
Figure:02	Stades d'évolution de la datte (Yahiaoui., 1998)	07
Figure:03	schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994; Van Gelder et al., 1997).	13
Figure:04	Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome (Eicken et al., 1999).	15
Figure:05	L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . (Decker, 2005).	15
Figure:06	Structure du site actif de la tyrosinase (Ben-Yosef et al., 2010).	15
Figure:07	Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO d'après Van Gelder et al. (1997) .	16
Figure:08	Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO Solomon et al. (1992) .	17
Figure:09	La variétés de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cvTedala	27
Figure:10	Extrait brut de la datte (<i>Phœnix dactylifera</i> L CV Tedala) avant et après centrifugation	31

Figure:11	Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) « Tedala ».	31
Figure:12	Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala en fonction du pH. (En présence de pyrocatechol comme substrat).	32
Figure:13	Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat).	33
Figure:14	Effet de la concentration de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala sur la vitesse initiale d'oxydation du 4pyrocatechol (tampon acétate 0.05 M-pH 5 ; 30°C ; pyrocatechol 80 mM)	35
Figure:15	Effet de la concentration du pyrocatechol sur la vitesse initiale d'oxydation par la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala	37
Figure:16	de la concentration de l'acide citrique sur l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Tedala)	38
Figure:17	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Tedala) par l'acide citrique	40
Figure:18	Représentation de l'inhibition non compétitive (Keillor, 2004)	40

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau:01	Stades de développement des dattes	06
Tableau :02	Classification des dattes selon leur consistance	07
Tableau :03	Les dix principaux producteurs des dattes	08
Tableau :04	Pourcentage en poids frais des principaux constituants	09
Tableau :05	Les activités des cinq enzymes	10
Tableau :06	Inhibiteurs du brunissement enzymatique	24
Tableau: 08	Les valeurs d'IC50 de l'acide citrique trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats	39
Tableau: 09	Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de <i>tedala</i> par le pyrocatechol comme substrat	41

Liste des abréviations

A0 : Activité Diphénolase En Absence D'inhibiteur

Ao : Activité Enzymatique Initiale

Abs : Absorbance

D-Glucopyranoside : Enantiomères Dextrogyre Du Glucopyranoside

DIECA :Diéthylthiocarbamate De Sodium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOPA : 3,4-Dihydroxy Phénylalanine

EC : Enzyme Commission Numbers

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EI : Enzyme-Inhibiteur

ESI : Enzyme-Substrat-Inhibiteur

IC05 : Concentration De L'inhibiteur De 50% De L'activité

µl : Microlitre.

KH₂ PO₄ :Phosphate De Potassium

KI : Constante D'inhibition

KIS : Con Stante De Dissociation

K_m : Constante De Michaelis-Menten

K_s : Constante D'inhibition Par Le Substrat

L-Tyrosine : Enantiomères Lévoogyre De La Tyrosine

O-Diphénol : Ortho Diphénol

O-Diphénol Oxydase : Ortho Diphénol Oxidase

O-Quinone :Orthoquinone

PPO : Polyphénol Oxydase

PVPP : Polyvinylepolypyrrolidone

Résumé. Ce présent travail a pour objectif d'étudier la cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) extraite à partir de dattes (*Phoenix dactylifera* L. cv Tedala) par l'acide citrique. L'activité enzymatique a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, dans les conditions optimales (pH 5.0; 30°C), en présence du pyrocatechol comme substrat. La PPO de la dattes Tedala est fortement inhibée par l'acide citrique. Le degré d'inhibition de l'enzyme dépend de la concentration de l'inhibiteur. La valeur IC₅₀ de l'acide citrique est estimée à 24.44 mM. La représentation de Lineweaver-Burk montre que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de l'activité catécholase de la PPO avec une valeur de K_I de 44.41 mM. L'acide citrique peut être utilisé pour le contrôle du brunissement enzymatique de la dattes Tedala pendant son stockage.

Mots clés : dattes, Tedala, polyphénol oxydase, acide citrique, inhibition, mécanisme.

Abstract. This work aims to study the inhibition kinetics of polyphenol oxidase (PPO) extracted from Tedala dates (*Phoenix dactylifera* L cv. Tedala) with citric acid as inhibitor. PPO activity was measured spectrophotometrically at 410 nm under optimal condition (pH 5; 30 °C) using pyrocatechol as substrate. PPO activity was strongly inhibited with citric acid. The degree of inhibition of PPO depends on the concentration of the inhibitor. The IC₅₀ value for citric acid was estimated to be 24.44 mM. The Lineweaver-Burk representation indicates that citric acid inhibit PPO with non competitive manner with a KI value of 44.41 mM. The citric acid can be used as anti-browning agent during storage of Tedala date.

Keywords: Datte, Tedala, Polyphenol oxidase, acid benzoic, inhibition, mechanism.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير حمض الستريك على النشاط الانزيمي البوليفينول أوكسيداز PPO المستخلصة من تمر ذو نوعية تدالة (*Phoenix dactylifera* L cv Tedala).

تم قياس نشاط انزيم PPO بواسطة جهاز قياس المطياف الضوئي على طول موجة 410 نانومتر و الظروف المثالية (درجة حموضة 5 و حرارة 30 درجة مئوية في وجود 4-البيروكاتول كدعامة للانزيم).

بينت النتائج المتحصل عليها ان حمض الستريك يثبط بصفة ايجابية على تفاعل الاكسدة لانزيم البيروكاتيكول ولو حظدعا لقيم IC₅₀ (IC₅₀=24,44mM ±0,79) في وجود حمض الستريك.

يظهر تمثيل Lineweaver-Burk أن حمض الستريك فهو مثبط غير تنافسي من النشاط PPO مع قيمة Kis يعادل 44,417 ± 1,477. من خلال هذه الدراسة يمكن استعمال حمض الستريك كعامل كيميائي ضد التشوه الانزيمي لتمر تدالة.

كلمات البحث: تمر تدالة ، انزيم البوليفينول أوكسيداز PPO حمض الليمون، التثبيط، التشوه الأنزيمي

Introduction

Le palmier dattier est considérée comme l'arbre des régions désertiques de globe connues pour leur climat chaud et sec. En Algérie, sa culture est essentiellement localisée dans les régions sahariennes avec plus de 13 millions de palmiers productives donnant une production totale de dattes évaluée à 440 000 tonnes (**Hannachi et al., 1998**). La datte, fruit du palmier dattier est un fruit très exploité en Afrique méditerranéenne.

Les dattes sont riches en nutriments, vitamines, minéraux et oligo-éléments. Elles sont de très bonnes sources de fibres alimentaires et de protéines. Ces fruits sont riches en vitamine C (pour la datte fraîche), vitamine B1, B2, B3 et B5 et de vitamine A1. Il comporte 20 différents types d'acides aminés qui facilitent le processus de digestion. Les dattes sont riches en fibres solubles et insolubles.

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

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

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

Au cours des dix dernières années, certains rapports ont été consacrés sur l'étude de l'inhibition de la PPO de différentes sources par des acides organiques (**Queiroz et al., 2008**). D'après nos connaissances, très peu de travaux ont été consacré à l'étude de l'inhibition de la PPO des dattes d'Algérie (**Sachde et al., 1989 ;**).

Par conséquent, l'objectif principal de notre travail est d'évaluer l'effet inhibiteur de l'acide citrique sur l'activité de la PPO extrait à partir de la variété Tedela de la datte (*Phoenix dactylifera* L.). Les propriétés biochimiques de l'enzyme ont été déterminé à savoir l'effet du pH, de la température et de la concentration du substrat sur l'activité de l'enzyme. La concentration de l'acide benzoïque qui provoque une diminution de l'activité catécholase de l'enzyme à moitié est également calculée. Enfin, le mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque est déterminé. Dans notre travail, nous avons utilisé le pyrocatechol comme substrat phénolique.

Ce présent manuscrit, comporte différentes partie et sera séquencé comme suit :

La première partie concerne une synthèse biobibliographique précise sur les dattes ; la PPO et le brunissement enzymatique. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidences les procédures expérimentales. La troisième partie est dédiée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans la dernière partie.

Synthèse Bibliographique

I- Le palmier dattier

I-1-Généralités

Le palmier dattier : *Phoenix dactylifera* L., provient du mot « *Phoenix* » qui signifie dattier chez les phéniciens, et *dactylifera* dérive du terme grec « *dactulos* » signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit (**Djerbi.,1994**). C'est une espèce arborescente connue pour son adaptation aux conditions climatiques trop sévères des régions chaudes et sèches (**Bouguederi et al., 1994**).

C'est un espèce dioïque, monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbres à palmes produit des dattes (**Gilles., 2000 ;Mazoyer.,2002**).

En général, les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (**Ghazi et sahraoui., 2005**).

Le palmier dattier commence à produire les fruits à un âge moyen de cinq année, et continue la production avec un taux de 400-600 kg/arbre/an pour plus de 60 ans (**Imade et al., 1995**).

I-2-Historique

Il y a quelques millénaires, les dattes représentaient déjà un fruit d'excellence chez les Mésopotamiens et les Egyptiens des temps pharaoniques. Offrandes pour les dieux, véritables viatiques accompagnant les morts dans leur périlleux voyage vers l'au-delà, elles étaient aussi la nourriture indispensable pour le commun de mortels (**Hirasa et Takemasa.,1998 ; Moulai.,2012**)

L'Euphrate, ou furent créées les plus vieilles oasis, que se concentreraient les origines géographiques de l'arbre. C'est la qu'il y aurait été domestiqué et cultivé. Plus précisément, c'est dans le Schott al Arabe, entre le Tigre et l'Euphrate, ou peut-être même en Egypte, dans la vallée du Nil, qu'auraient été inventées ses méthodes de culture. **(Hirasa et Takemasa.,1998 ;Moulai.,2012)**

Certains voient dans les Sumériens les initiateurs en ce domaine. De ces régions, il s'est répandu à l'ouest dans toute l'Afrique du Nord et vers l'est jusqu'en Inde. **(Hirasa et Takemasa.,1998 ;Moulai.,2012)**. Le palmier dattier serait vraisemblablement dans ces régions la première espèce végétale domestiquée par l'homme et il est un des arbres fruitiers les plus cultivés au monde (**Hirasa et Takemasa.,1998 ;Moulai.,2012**). Exportées dans tout le Bassin méditerranéen, par voie maritime ou terrestre, les dattes étaient déjà très prisées des Grecs et des Romains qui en importaient en grande quantité de différentes variétés.

Encore aujourd'hui, au Proche- Orient et au Moyen-Orient, ainsi qu'en Afrique du Nord, qui restent ses zones de prédilection, la datte continue de jouer un rôle important bien que l'alimentation se soit diversifiée (**Hirasa et Takemasa.,1998 ; Moulai., 2012**)

I-3 La classification botanique (Taxonomie)

Le Palmier Dattier est une espèce appartenant au genre *Phoenix* qui comprend environ 2500 espèces (**Dransfield et al., 2008**).

Selon **Feldman (1976)**, la classification botanique de l'une des variété la plus importante des dattes « deglet Nour » ou « *Phoenix dactylifera*L » est la suivante :

- ✓ Groupe: *Spadiciflore.S.*
- ✓ Embranchement :palmacées
- ✓ sous- Embranchement : *Angiospermes.*
- ✓ Classe: *Monocotylédones*
- ✓ Série : *Monocotylédones hypogyne*
- ✓ Ordre: *spadiciflorales*
- ✓ Famille: *palmoe.*
- ✓ Tribu: *Phoenixées./phoenicées*
- ✓ Genre: *Phoenix.*
- ✓ Espèce: *Phoenix dactylifera*L

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

I-4 Ecologie

Le palmier dattier est cultivé comme arbre fruitier dans les régions chaudes ; arides et semi-arides .Cet arbre peut s'adapter à de nombreuses conditions grâce à sa grande variabilité (**Gilles., 2000**). Le dattier est une espèce thermophile ; il exige un climat chaud, sec et ensoleillé. C'est un arbre qui s'adapte à tous les sols .il est sensible à l'humidité pendant la période de pollinisation et au cours de la maturation (**Munier., 1973 ; Toutain., 1979**).

I-5 Cycle biologique

L'arbre consiste de plantes mâles et femelles, et c'est sur la plante femelle que se développent les fruits ou dattes .Un plant male est capable de polliniser entre 40 à 50 plantes femelles .Un palmier dattier produit entre 5et15 bouquets, chaque bouquet peut contenir jusqu'à1000 dattes correspondant à un poids approximatif entre 6 à 8 Kg. Un arbre de palmier commence à produire des dattes à partir de 3 ans, mais généralement entre 3 et 5 ans, il peut rester vivant et productif pendant 150ans environ (**Banchera et al., 2000**).

II-Les dattes de la variété de Tedala

II-1 Définition

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée :

D'une partie non comestible formé par une seule graine dite « noyau », ayant une consistance dure, entouré par une chair (le noyau représente 10 % à 30 % du poids de la datte

Une partie comestible, 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, le climat ainsi que la période de maturation.

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 ambres, rouges, brunes plus ou moins foncées (Djerbi., 1994).

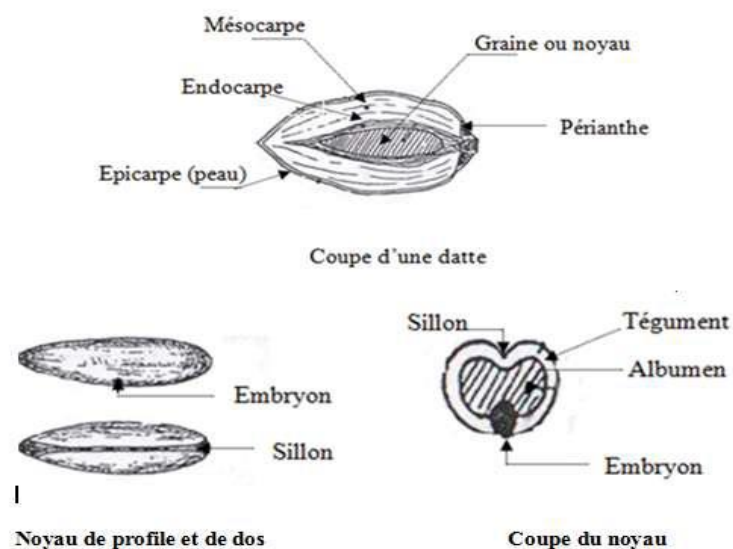


Figure 01: Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du dattier (Munier., 1973).

II-2 Stades de maturation des dattes

Les fleurs fécondées, à la nouaison, donnent un fruit qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte (Gilles, 2000). La datte passe par différents stades d'évolution (Sawaya *et al*, 1983 ; Benchabane *et al*, 1996 ; Al-Shahib et Marshall, 2002). Le Tableau(1) présente les stades d'évolution de la datte et les appellations utilisées en Afrique du Nord et en Irak.

Tableau 01 : Stades de développement des dattes (Djerbi, 1994).

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

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

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

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

Bser ou Bsir, Bissir : Les sucres totaux atteignant un maximum en fin du stade. La couleur vire au jaune, au rouge et au brun, suivant les clones. La datte atteint son poids maximum, au début de ce stade . Il dure en moyenne quatre semaines (Djerbi.,1994).

Martouba ou Routab : C'est le stade de la datte mûre pour certains cultivars. Le poids et la teneur en eau vont diminuer à la fin. La durée de ce stade où le fruit prend une couleur brune est de 2 à 4 semaines. Les tanins émigrent vers les cellules situées à la périphérie du mésocarpe et sont fixés sous forme insoluble (Djerbi.,1994).

Tamar ou Tmar : C'est la phase ultime de la maturation au cours de laquelle, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose) (Djerbi.,1994;Yahiaoui., 1998).

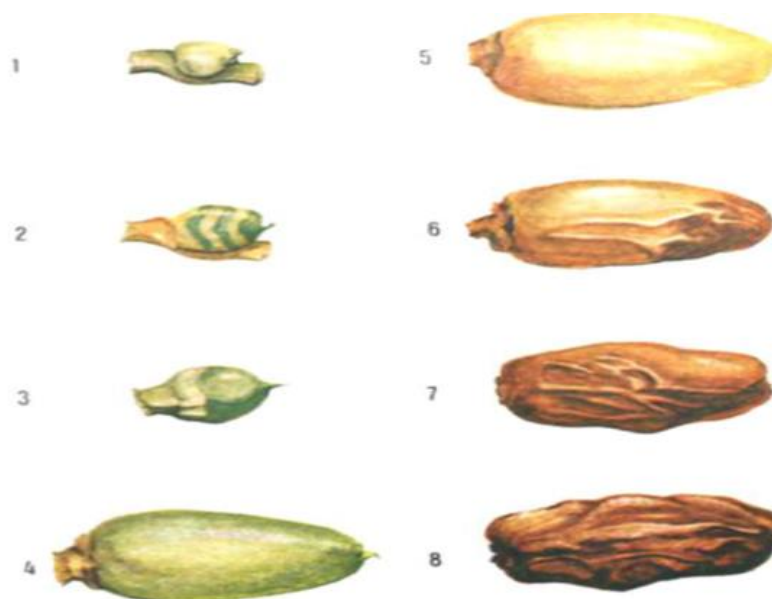


Figure 02 : Stades d'évolution de la datte (1-2 : Stade I ou Loulou, 3-4: Stade II ou Khlal, 5-6: Stade III ou Bser, 7: Stade IV ou Routab 8:Stade V ou Tmar) (Yahiaoui., 1998).

II-3-Classification des dattes

II-3-1 Selon la consistance

Les dattes sont regroupées en trois catégories suivant leur consistance. Cette classification, établie par les américains est valable pour les variétés d'Algérie.

Tableau 02 : Classification des dattes selon leur consistance (Peyron., 2000).

Consistance	Catégorie
Molle	Molle
	Demi-molle
Dure	Demi- sèche
	Sèche

II-3-2 Selon la date de maturation

Les variétés de dattes sont divisées en trois groupes selon leur maturation (Espiard ., 2002; Peyron.,2000) :

- ✓ variétés précoces,
- ✓ variétés demi-précoces
- ✓ et variétés tardives.

II-3-3 Selon la commercialisation

Les différentes dattes qui existent sur le marché national et international repose sur la qualité du fruit. Elles sont réparties en deux catégories ; *dattes à haute valeur marchande*, et *dattes communes*, qui sont généralement de faible valeur marchande (Toutain.,1992).

II-4-Production des dattes

II-4-1 En Algérie

L'Algérie est l'un des plus importants pays producteurs de dattes avec une production annuelle d'environ 400.10³ tonnes de dattes (Madsaee.,2001). Plusieurs variétés de dattiers estimées à environ 200 existent en Algérie. Les cultivars sont le fruit de la sélection paysanne, ils sont qualifiés de "variétés locales". (Hannachi et al., 1998).

II-4-2 Dans le monde

Les principaux pays producteurs de dattes sont : l'Egypte ; l'Iran ; l'Irak ; l'Arabie-Saoudite ; l'Emirat Arab Unis ; la Pakistan ; l'Algérie et le Soudan (tableau 2).La production mondiale de dattes réalisée en 2012 est de 7 millions de tonnes/an (FAO., 2002).

Tableau 03 : Les dix principaux producteurs des dattes (FAO., 2002).

Pays	Pourcentage de la production mondiale (%)
Egypte	17
Iran	14
Arabie Saoudite	13
Emirats	12
Iraq	10
Pakistan	10
Algérie	7
Oman	4
Soudan	4
Libye	2

En effet, du point de vue quantitatif, la production algérienne présente 7% de la production mondiale, alors en parlant de la qualité elle occupe le premier rang (FAO., 2002).

I-5 Caractéristiques biochimiques des dattes

Constituent spécifiquement un important aliment dans les régions arides et semi-arides du monde. Les principaux constituants des dattes sont indiqués dans le Tableau (04).

Tableau04 : Pourcentage en poids frais des principaux Constituent.

Constituent	Pourcentage en poids frais
Sucres	60 à 80% en saccharose 17 à 80% en sucres réducteurs
Eau (Belarbi et al.; 2000).	Peut atteindre au maximum 25%
Protéine	De 2.3 à 5.6%
Lipides	De 0.2 à 0.5 %
Vitamines (Al-Hooti et al., 1995; Al-Shahib et Marshal, 2003; Sawaya et al., 1982).	Vit C ; B1 ;B2 ;A ;riboflavine et niacine
Fibres diététiques	De 6.4a 11.5%
Eléments minérales	Elles varient de 0.1 à 916mg /100g de dattes
Carbohydrates	44 à 88 %
Composés phénoliques (Mansouri et al, 2005 ; Vayalil, 2002 ; Al-Farsi et al, 2005 ; Vinson et al, 2005).	Possèdes une activité anti-oxydent
Macromolécules (Gamil-Abdel-Hafez et al., 1980; Anwar-Shinwari, 1987).	Phosphore ; fer ; potassium ; calcium

II-6 Les enzymes des dattes

Les enzymes jouent un rôle très important dans le processus de conversion qui se déroule durant le développement et de maturation des dattes. L'activité des quatre enzymes citées dans le tableau ci-dessous présente un intérêt particulier pour la qualité final du produit (**Barreveld, 1993**) :

Tableau05 : Les activités des cinq enzymes (**Yahiaoui., 1998**).

Les enzymes	L'effet sur la datte
-------------	----------------------

L'invertase	Responsable de l'inversion du saccharose en sucres réducteurs : glucose et fructose.
la cellulase	Elle décompose la molécule de cellulose en chaînes plus courtes.
la pectinméthylestérase	Elle convertit les substances pectiques insolubles en pectines plus solubles en contribuant au ramollissement du
la polyphénol-oxydase	Elle est responsable de l'oxydation des composés phénoliques conduisant au brunissement de la datte.
La peroxydase	La littérature concernant la peroxydase de la datte est très rare

II-7 l'intérêt et l'utilisation des dattes

Les dattes possèdent plusieurs rôles biologiques pour la santé humaine. Ce sont considérée comme une source riche en éléments nutritifs (Al-Orf *et al.*,2012). La consommation des dattes soulage la constipation et la diarrhée (Rahmani *et al.*,2014), renforce la santé osseuse (Al-Orf *et al.*,2012), combattre les troubles intestinaux (Rahmani *et al.*,2014), et s'opposer à l'anémie (Rahmani *et al.*,2014). Elles peuvent réduire les allergies et le risque de cancer abdominal (Al-Orf *et al.*,2012), à Aider à prendre du poids sainement (Rahmaniet *al.*,2014) et à retrouver de l'énergie rapidement (Al-Orf *et al.*,2012). Les dattes améliorent la vitalité du système nerveux (Rahmani *et al.*,2014) et le système cardiovasculaire (Al-Orf *et al.*,2012). Elle permettre aussi de lutter contre la faiblesse sexuelle (Bahmanpour *et al.*, 2006) et de réduire la cécité nocturne (Al-Orf *et al.*,2012).

III- Polyphénol oxydase

III-1 Historique

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment brun dans les plantes (Whitaker *et Lee.*,1995). Bertrand (1896) à son tour a mis également en évidence la présence d'une enzyme dans la betterave, le dahlia et certains champignons. Bach et Chodat .(1904) ont émis l'hypothèse que le brunissement des tissus végétaux coupés ou broyés était dû à l'action d'une

oxygénase qui catalyserait la peroxydation des o-diphénols. Selon ces auteurs, le peroxyde ainsi formé serait détruit par la peroxydase, conduisant à la formation des composés quinoniques.

La polyphénol oxydase a été extraite pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par **Keilin et Mann (1938)** à partir d'*Agaricus bisporus*. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (**Lerch, 1981; Jolivet et al., 1998**). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte il y'a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la PPO a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomea batatas* (**Klabund et al.,1998**). Et depuis, la PPO a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été porté d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique (**Seo et al.,2003 ;Halalouili et al.,2006 ;Virador et al.,2010 ;Cheng et al.,2013 ;José et al.,2014**).

III-2 Nomenclature

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

III-3 Définition

La PPO également appelée tyrosinase est une oxydoréductase 1,2-benzenediol: oxygène ;est une métalloprotéine contenant deux atomes de cuivre. En présence de l'oxygène moléculaire, elle catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones, qui se polymérisent pour former la mélanine, source de la pigmentation de la peau et le brunissement des fruits et légumes (**zawistowski et al., 1991 ; whitaker, 1995 ; fenoll et al., 2004 ; Kazandjian Et Klivanov, 1985 ; Sapers, 1993**).

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

III-4 Classification

La PPO a été placée dans deux catégories principales :

1) *monophénol monooxygénase ou tyrosinase (EC 1 .14.18.1) :*

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

2) *o*-diphénol : O_2 oxydoréductase (EC 1.10.3.2):

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

III-5 Source et localisation

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

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

III-6 Caractéristiques réactionnelles

En présence d'oxygène moléculaire, la PPO catalyse deux réactions bien distinctes (Figure 2) à savoir l'ortho-hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (catéchols) (activité crésolase ou hydroxylase, monophénolase) (Réaction (1)) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des *o*-diphénol en *o*-quinones, activité fréquemment désignées sous le nom de la polyphénol oxydase, *o*-diphénol oxydase, catéchol oxydase ou activité catécholase (EC 1. 10. 3. 1) (Réaction (2)) (Metzler, 1977 ; Cho et Ahn, 1999 ; Tomas-Barberà et Granata et al., 2005).

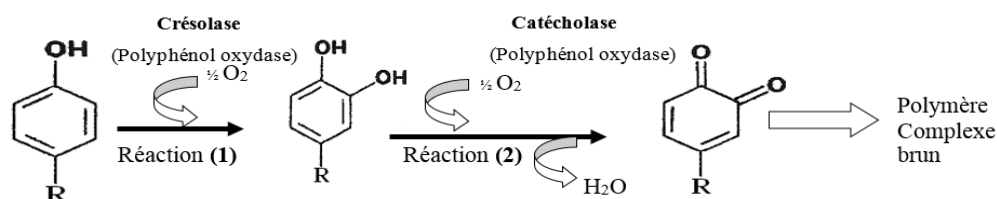


Figure03 : schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994 ; Van Gelder et al., 1997).

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

III-7 Structure

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

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch, 1982**). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (**Klabunde et al., 1998**). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des *o*-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (**Mayer, 1987**). Seule la structure cristalline de la PPO de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (**Klabunde et al., 1998**).

La PPO native du champignon de souche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H_2L_2 . Alors que la forme

active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L₂H. Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la PPO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (**Strothkamp et al., 1976 ; Robb, 1984 ; Zawistowski et al., 1991; Whitaker, 1995 ; Solomon et al., 1996 ; Van Gelder et al., 1997; Jolivet et al., 1998 ; Fan et Flurkey, 2004**).

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

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

III-8 Le site actif

Il a été montré, que la PPO peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (**Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003, Baldwin et al., 1992**). La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (**Mayer et Harel, 1991 ; Turner, 1974**). La structure secondaire de la PPO est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7), (**Jolivet et al., 1998 ; Ros et al., 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken et al., 1999 ; Haghbeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006**).

Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice α_2 .

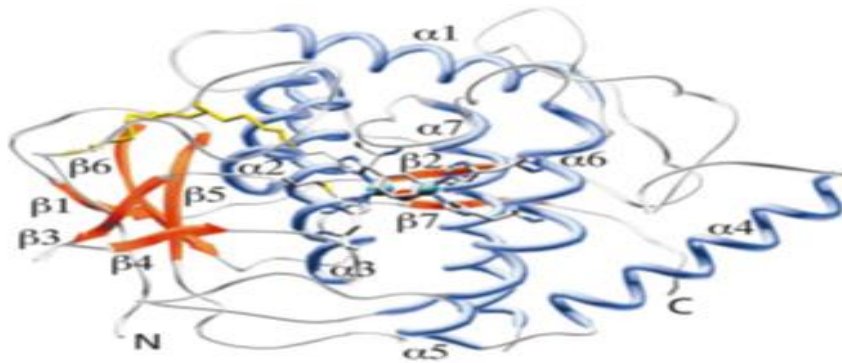


Figure 04: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken, et al., 1999).



Figure 05: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

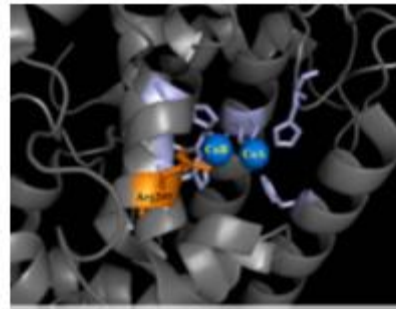


Figure 06: Structure du site actif de la tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet)

La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α . Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est située au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 .

Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (Klabunde et al., 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Van Gelder et al., 1997).

III-9 Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase

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

convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (Figure 07).

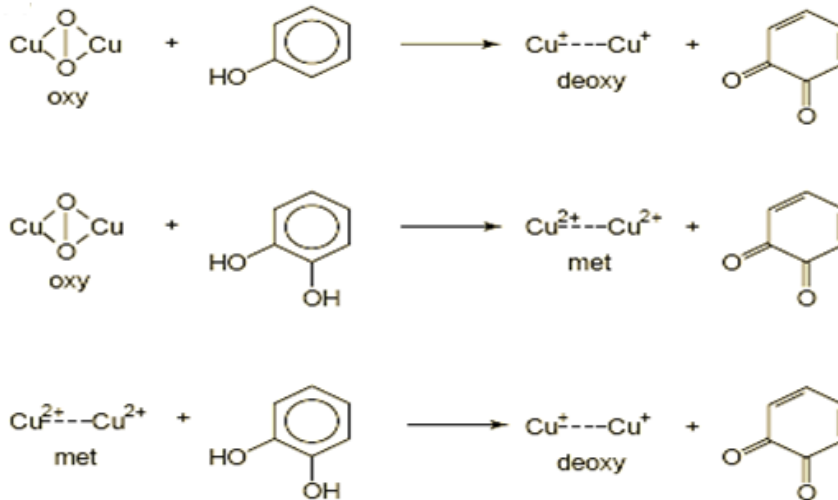


Figure 07: Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO d'après **Van Gelder et al. (1997)**.

Le modèle du mécanisme réactionnel de l'activité catécholase de la PPO est représenté dans la Figure (08).

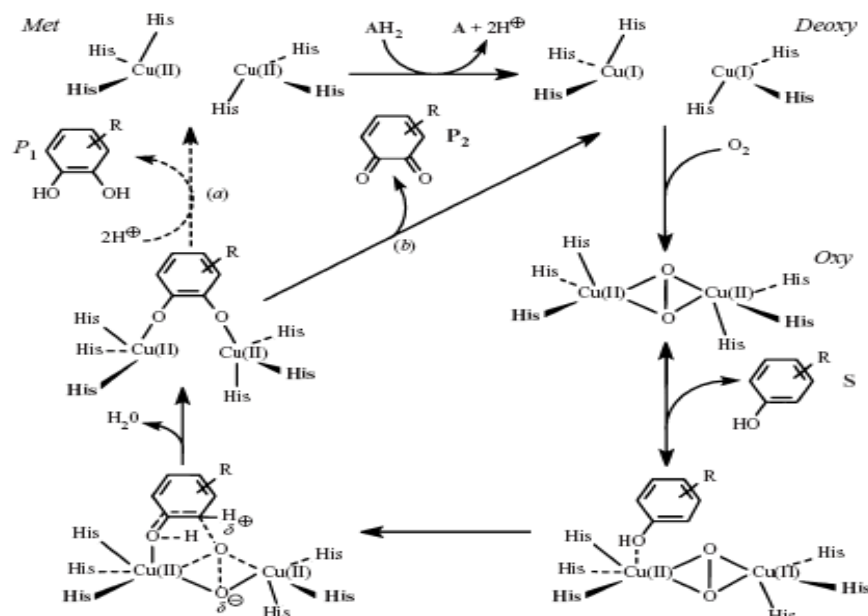


Figure 08: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO **Solomon et al. (1992)**.

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

III-10 Méthodes de mesure de l'activité enzymatique

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

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

III-11 Spécificité de substrat

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

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

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

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

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

III-12 Effet du pH

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO, varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées, il est compris entre pH 4 et 8 (**Mayer et Harel, 1979**). Plusieurs paramètres affectent cette valeur. Nous pouvons citer le type de tampon, la pureté de la préparation enzymatique et le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaires pour sa fixation et sa transformation (**Kuby, 1991**). Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la PPO par : (1) l'inactivation de l'enzyme à cause du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la réaction catalytique, (2) le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou (3) la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H^+ ou les hydroxydes OH^- sont impliqués.

III-13 Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié, comparativement parlant à l'effet du pH (**Joslyn et Ponting, 1951; Vámos-Vigyázó, 1981**). **Amiot et al. (1997)** ont montré que la PPO n'est pas une enzyme thermostable. En effet, des traitements thermiques de courtes durées en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures

comprises entre 70 et 90°C, suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). La diminution d'une partie de l'activité de la PPO après chauffage à une basse température n'est pas étonnante (Yemenicioğlu, 2002). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température, et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; 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).

III-14 Effet des effecteurs

Les activateurs : La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), (Seo et al., 2003 ; Pérez-Gilabert et al., 2004 ; Gandía-Herrero et al., 2005).

Ce dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (Espín et Wichers, 1999). Il a même été montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Vámos-Vigyázó, 1981; Fan et Flurkey, 2004; Van Leeuwen et Wichers, 1999).

Les inhibiteurs : 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. 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 (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (Yemenicioğlu et al., 1997 ; McCord et Kilara, 1983 ; Weemaes et al., 1998a,b ; 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 pouvant 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 (Terefe et al., 2009 ; Weemaes et al., 1998 ; Buckow et al., 2009 ; Rapeanu et al., 2005 ; Devece et al., 1999). Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique.

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 d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O₂ et substrat phénolique) et 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 analogues des phénols compétitives vers des substrats* (phénol et/ou diphénol) (**Robb, 1984; Burton, 1994**). 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 (**Vámos-Vigyázó, 1981; Jolivet et al., 1998; Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska et al., 2002 ; Mayer et Harel, 1979**).

2) *Les agents de chélation généraux pour le cuivre* : petites molécules ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitif en ce qui concerne l'oxygène,

3) *les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique*.

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les PPOs de beaucoup de sources.

Les inhibiteurs potentiels 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 compétitifs vis-à-vis de la fixation du dioxygène (**Rescigno et al., 2002; Robb, 1984**). L'acide ascorbique peut également agir directement sur la PPO du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu²⁺⁺ en Cu⁺ (**Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991**). En outre, les composés qui ne ressemblent 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 comme les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique, se comportent habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (**Robb, 1984; Jolivet et al., 1998; Gasowska et al., 2002 ; Janovitz-Klapp et al., 1990**). 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 (**Kahn, 1985 ; Zawistowski et al., 1991**).

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

(Zawistowski *et al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rescigno *et al.*, 2002). Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP), agissent au tant qu'inhibiteurs compétitifs de la PPO, mais on ne sait pas s'ils agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (Jolivet *et al.*, 1998 ; Vámos-Vigyázó, 1981). Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la PPO, soit en réagissant avec les *o*-quinones (McEvely *et al.*, 1992). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu²⁺ du site actif de la PPO (O'Sullivan, 1969).

Les cyclodextrines peuvent inhibées la PPO par fixation sur le 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 (McEvely *et al.*, 1992). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas spécifique seulement pour les PPO (Mayer et Harel, 1991).

III-15 Applications

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

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

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

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

IV- Brunissement Enzymatique

Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte le plus la couleur des fruits et des légumes, le brunissement enzymatique peut avoir lieu lors de la croissance des fruits, c'est l'exemple de la datte (de Man, 1999; hui, 2004 ; Eidhin *et al.*, 2005 ; Mann, 2008) ou durant l'endommagement mécanique lors du traitement et des manipulations post récolte (de Man, 1999; 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) (Jeantet *et al.*, 2006). Ce brunissement

enzymatique est dû à une oxydation, catalysée par les polyphénoloxydases, des composés phénoliques endogènes par l'oxygène moléculaire où les premiers produits de réaction sont les quinones. Ensuite, les quinones se polymérisent, provoquant l'apparition de pigments généralement bruns ou noirs (mélanines), en passant par des intermédiaires qui vont du rouge au bleu (**Mathew et Parpia, 1971 ; Pierpoint, 1966**). Si l'oxygène, les composés phénoliques et l'enzyme apparaissent comme les trois facteurs essentiels nécessaires à la manifestation du brunissement. 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 (**Zawistowsky et al., 1991**).

Parfois recherchés, ces phénomènes de brunissement dans d'autres cas comme dans le traitement du thé noir (**Eskin 1990; Ullah, 1991**), le café (**Amorim et Melo, 1991**) et le cacao (**Lee et al., 1991; Lopez et Dimick 1991**) 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 saveur et de la couleur des fruits et légumes (**Shahidi et Naczka, 2004**). Les paramètres essentiels responsables du brunissement des fruits sont les teneurs en composés phénoliques et en activités enzymatiques, le pH, température, disponibilité d'oxygène.

IV-1 Contrôle de brunissement enzymatique

Le contrôle de l'activité de la PPO, est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits. (**Jolivet et al., 1998; Qiu et al., 2009**). Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber le brunissement enzymatique et plusieurs techniques essayant d'éliminer les composés responsables de ce brunissement (oxygène, enzyme, cuivre, substrat), ont été développées parmi ces techniques les traitements physico-chimiques.

IV-1-1 Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

IV-1-1-1- Les traitements thermiques

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. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée dans les procédés de

transformation des fruits et légumes frais. (Vámos-Vigyázó., 1981). Les températures appliquées lors du blanchiment varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inactiver. En général, une exposition des PPO à des températures de l'ordre de 70-90° C entraîne la destruction de leur activité catalytique (Vámos-Vigyázó., 1981).

IV-1-1-2- La congélation

Des températures inférieures à – 18° C sont utilisées pour la conservation longue durée des aliments. Les mécanismes d'inactivation des enzymes par la congélation peuvent être expliqués par différentes hypothèses : augmentation de la concentration en inhibiteurs du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état liquide (Tappel., 1966), de modifications du pH ou encore des groupements thiols (Fennema., 1975). De la même façon que pour l'inactivation des enzymes par chauffage, ce procédé présente des inconvénients et provoque notamment des changements de texture. De plus, la congélation fragilise les structures membranaires des cellules et facilite ainsi le brunissement enzymatique lors de la décongélation des produits. (Vámos-Vigyázó., 1981).

IV-1-2 Moyens chimique de contrôle de brunissement enzymatique

Mc Evily et al. (1992) classent les inhibiteurs des PPO en six catégories (Tableau 05) : les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexant, les inhibiteurs d'enzymes, les traitements enzymatiques.

Tableau 06: Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily et al., 1992).

Agents réducteurs	Sulfites et dérivés Acide ascorbique et analogues Cystéine et glutathion
Agents chélateurs	Phosphates EDTA Acides organiques
Acidifiants	Acide citrique Acide phosphorique Acides carboxyliques aromatiques Alcools aliphatiques
Inhibiteurs d'enzyme	Anions Peptides Résorcinols substitués
Traitements enzymatiques	Oxygénases o-méthyltransférase Protéases
Agents complexants	Cyclodextrines

Ces techniques sont le plus utilisées, mais elles présentent cependant des limites organoleptiques. Tel est le cas de l'emploi d'acide citrique (acidification), du bicarbonate de

sodium (alcalinisation) ou encore des thiols (cystéine et glutathion), ces derniers interagissant avec les produits de la réaction pour former des produits d'addition incolores ; toutefois, ces composés d'addition peuvent également entrer dans des réactions d'oxydations couplées avec les *o*-quinones en excès conduisant, d'une part au phénol parental et d'autre part à la formation de produits fortement colorés (**Richard-Forget et al., 1992**). Selon **Nappi et Vass (1994)**, la cystéine serait capable d'inhiber l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon.

IV-1-2-1 Agent réducteur

L'acide ascorbique est un agent réducteur largement utilisé dans l'industrie pour contrôler ce phénomène. Cet antioxydant naturel régénère les *o*-diphénols en réduisant les *o*-quinones formées (**Varoquaux et Sarris., 1979 ; Nicolas et al., 1994 ; Walker et Ferrar., 1995 ; Martinez et Whitaker., 1995**).

Cependant, son effet anti-brunissement n'est que temporaire (**Varoquaux et Sarris., 1979 ; Golan-Goldhirsh et Whitaker., 1984**).

Les travaux de Golan-Goldhirsh et Whitaker (**1984**) montrent les effets inhibiteurs de l'acide ascorbique, du bisulfite de sodium et des composés thiols sur l'activité de la tyrosinase de champignon.

IV-1-2-2-Agents chélateurs

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 (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (**Mayer et Harel., 1979 ; Vámos-Vigyázó., 1981 ; Jolivet et al., 1998 ; Anderson et Morris., 2001 ; Gasowska et al., 2002**).

IV-1-2-3- Inhibition ciblant l'enzyme

Mayer et Harrel (**1979**) ont classé les inhibiteurs qui agissent directement sur la PPO en deux groupes :

□ Le premier groupe est celui des agents chélateurs de métaux, tels que les ions azote, cyanure, halogénés et la tropolone. Le chlore (Cl⁻) est un inhibiteur non compétitif de la PPO.

□ Le second groupe d'inhibiteurs consiste en analogues de substrats : ces acides carboxyliques de la série des acides benzoïque et cinnamique sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO (**Janovitz-Klapp et al., 1990**).

IV-2- Les activateurs et les inhibiteurs

IV-2-1- Les activateurs

La PPO peut être activée par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), par les alcools, et les protéases (Seo et al., 2003, Gandía-Herrero et al., 2005), par un choc de pH acide et alcalin (Joy et al., 1995) et aussi par l'exposition aux acides gras dans les mélanges d'incubation, de même, l'addition des ions du Cu²⁺ dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Fan et Flurkey., 2004).

Le SDS peut activer la PPO de diverses sources, y compris la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Il a été également montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiée (Espin et Wichers., 1999).

IV-2-2- Les inhibiteurs

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 d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O₂ et substrat phénolique) et du pH et de la température (Zawistowski et al., 1991).

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 quercétine, la morine, la lutéoline, l'anisaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique sont des inhibiteurs puissants de la PPO (Parvez et al., 2007).

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1 Matériels biologiques

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



Figure09 : La variété de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) Tedala d'Algérie.

1.2 Produits chimiques

Le phosphate de potassium di- et monobasique (KH_2PO_4 et K_2HPO_4), l'acétate de sodium, le pyrocatechol, l'acide citrique, 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 Tedala, selon le protocole d'extraction développé par **Hasegawa (1980)**. Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. 150g de chair de dattes refroidie préalablement à -15°C sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG, model BB 90E) dans 300 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) comme chélateur des composés phénoliques. Le broyat est ensuite filtré à travers quatre couches de gaze. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo Scientific Helios γ Spectrophotometer, England). Le surnageant récupéré d'un volume total de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait enzymatique brut de la PPO est divisé dans des tubes Eppendorf (2 ml) qui seront conservés à -10°C pour être utilisé ultérieurement.

2.2 Mesure de l'activité de PPO

L'activité de la PPO est déterminée à 410 nm en utilisant le pyrocatechol comme substrat par la mesure directe de la formation du produit o-benzoquinone à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific Helios γ Spectrophotometer, England) ceci en présence d'oxygène/aire (Fan et Flurkey, 2004 ; Espin et al., 1995).

La solution mère de catéchol à 0.16 M est préparé dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5mM (Fan et Flurkey, 2004). Le milieu réactionnel contient 1.0 ml de substrat à 80 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 μ l d'extrait enzymatique. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant 2 min après l'ajout de l'extrait enzymatique.

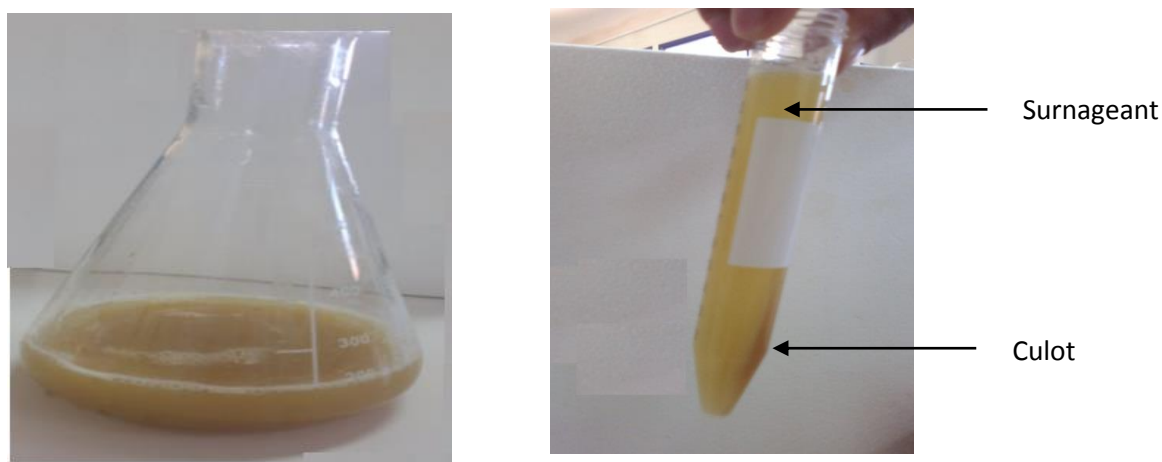


Figure 10 : Extrait brut de la date (*Phoenix dactylifera* L CV Tedala) avant et après centrifugation.

2.3 Effet du pH

L'activité catécholase de la PPO est mesurée à 30°C dans l'intervalle de pH compris entre 3.6 à 10.0. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.6-6.0), le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 6.0-10.0). Le pyrocatechol à 80 mM est utilisé comme substrat. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

2.4 Etude de la stabilité thermique

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

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

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

résiduelle est calculée à partir de la formule suivante :

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

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 du pyrocatechol à 80 mM par la PPO de Tedala est mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 60 μ l. L'activité enzymatique a été mesurée dans les conditions optimales décrites ci-dessus (pH 5.0, tampon acétate de sodium 0.05 M et à 30°C).

2.5 Détermination des paramètres cinétiques

Pour déterminer les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'activité catéchol oxydase de l'extrait brut de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Tedala, l'activité enzymatique est mesurée à pH : 5.0, tampon acétate de sodium à 0.05 M) et à 30°C, à différentes concentrations du pyrocatechol comprises entre 20 à 140 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 $1/[S]$).

2.6 Détermination des valeurs d'IC₅₀

Cette valeur correspond à la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀). L'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 5.0 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'acide citrique comprises entre 5 et 75 mM, ceci pour une concentration constante du 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 citrique) (Chen et al, 1998).

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

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

Avec :

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

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

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

2.7 -Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide citrique

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'acide citrique (20-40 mM) et à différentes concentrations croissantes du pyrocatechol comprises entre 30 et 80 mM. Le mécanisme cinétique d'inhibition de la PPO est déterminé à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat en présence et en absence d'acide citrique (**Arslan et Doğan, 2005**).

2.5 Analyse des résultats expérimentaux

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

RESULTATS ET DISCUSSION

Conclusion

Les dattes (*Phoenix dactylifera* L.) de la variété Tedala est un fruit très apprécié par les consommateurs vue leur bonne qualité organoleptique et nutritionnelle. L'un des problèmes le plus souvent rencontré après la récolte de ce fruit, est surtout le changement de ses propriétés organoleptiques dues aux problèmes de brunissement. Ce phénomène biochimique est causé le plus souvent par la polyphénol oxydase (PPO). Le contrôle du brunissement enzymatique des dattes est possible avec l'utilisation de certains composés organiques d synthèse capables d'inhiber l'activité de la PPO.

Dans ce travail, la polyphénol oxydase des dattes de la variété Tedala a été tout d'abord extraite puis ses caractéristiques biochimiques ont été déterminées. L'activité de la PPO de Tedala est optimale à pH 5.0 et à 50°C. La cinétique de l'oxydation d pyrocatechol suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Meten.

L'étude de l'effet de l'acide citrique sur l'activité de la PPO brute des dattes *Phœnix dactylifera* L cv Tedala est rapportée pour la première fois. En présence du pyrocatechol comme substrat phénolique, l'activité de la PPO était fortement inhibée par l'acide citrique et que le degré d'inhibition de l'enzyme dépend de la concentration de ce composé dans le milieu réactionnel.

L'analyse des résultats de la cinétique d'inhibition montrent que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de la PPO de datte Tedala. Donc ce dernier, se fixe sur l'enzyme libre et également sur le complexe enzyme-substrat. L'acide citrique est non toxique, très soluble dans l'eau et peu couteux peut être donc utilisé dans l'industrie alimentaire comme agent anti-brunissement des dattes de la variété Tedala pendant leur stockage ainsi que leur transformation.

Comme perspectives, il serait envisageable d'étudier l'inactivation thermique de la PPO en présence de l'acide citrique et de déterminer par la suite le changement des paramètres cinétiques et thermodynamique de l'enzyme. Il serait également intéressant de tester l'effet d'autres acides organiques capables d'inhiber la PPO tels que l'acide ascorbique, l'acide oxalique, et l'acide salicylique.

Référence

bibliographique