

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليج
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 des produits naturels

THEME

**Etude de l'inhibition de l'activité catécholase de la
Polyphénol oxydase des (dattes « *Phoenix dactylifera.L*
» cv. Ghars) par l'acide benzoïque et l'acide oxalique**

Présenté par :

- Bouamara fatima zohra
- Souri djihad

Président: Dr. Chaibi Rachid

Rapporteur: Mr. Benaceur Farouk (MAA)

Examineur: Mr. Leboukh Mourad

Soutenu publiquement le : Mai 2017.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

*A ma mère : **Khadhra***

Celle qui m'as donné la vie la tendresse et le courage pour réussir.

Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je porte en moi.

En témoignage trouves ici le fruit de tes sacrifices consentis pour mon éducation, l'expression de mon amour et de ma gratitude pour l'affection avec laquelle tu m'as toujours entouré

*A mon père : **Kamel***

*L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de
mon estime et de mon respect.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que dieu te préserve et te procure santé et
longue vie.*

A mes frères :

Mohamed, Souheil, Walid, Nasreddine et Amine

A ma sœur :

Hiba

A mon grand père et ma grand-mère

A mes grands parents disparus

A mes neveux et nièces

A mes beaux-frères et mes belles sœurs

A toutes les familles :

***Bouamara ,Kihel ,Kherag ,Nezzari ,Hamouda ,Benzaoui ,Maiche , Bouarour
,Cheriet,Sabor ,Alleg ,Maamri et Gaouda.***

*A toutes mes amies et ma binôme **Souri djihad** et surtout à la personne qui occupe une place spéciale
dans mon cœur et ma vie **Samira Sabor***

B.fatima zohra

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes très chers parents qui m'ont toujours donné les moyens
pour à ce que j'avais décidé et de réaliser dans
ma vie .*

À mes sœurs et mes frères et mon mari que je les aime beaucoup

Je vous porte toujours dans mes pensées

*Toute ma famille, mes chères amies de promotion Biochimie,
Microbiologie, Ecologie végétale et animale,
Surtout mon binôme Fatima .*

*Je tiens également à ne pas oublier tous ceux qui ont contribué de
près ou de loin à la bonne réalisation de ce travail.*

S. Djihad

Remerciement

*Je remercie le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté, la patience et la santé durant toutes ces années et que c'est grâce à lui que ce travail a pu être réalisé. Je tiens à exprimer ma très grande gratitude à mon rapporteur **Mr Benaceur Farouk** d'avoir proposé le sujet sur lequel j'ai travaillé, et d'avoir assuré la direction et l'encadrement du travail présenté dans ce mémoire.*

*Mes remerciements sont également adressés à l'ensemble des membres du jury, pour leur disponibilité et l'intérêt qu'ils ont accordé au présent travail dont Monsieur **CHAIBI Rachid** qui m'a dirigé, aidé et soutenu, non seulement pour ses encouragements, mais aussi pour ses efforts ; c'est grâce à dieu et à lui, que j'ai pu poursuivre le chemin du savoir, et qui a bien accepté de présider le Jury de ce mémoire et Monsieur **Laboukh Mourad** pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de ce travail. Je voudrais aussi souligner mon extrême gratitude à **Mr Boubrima ; Mr Gouzi** et aussi l'égard de mes enseignants qui m'ont soutenu tout au long de ce cursus universitaire.*

Enfin, je tiens à remercier vivement mes amis pour leur disponibilité, leurs encouragements durant toutes les phases de l'étude et leurs conseils qui m'ont beaucoup soutenu tout au long de ce travail et qu'ils trouvent ici ma plus grande reconnaissance.

Liste des figures

Figures	Titre	Pages
Figure 1	Fruit et graine du dattier.	5
Figure 2	schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont.	10
Figure 3	Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO.	13
Figure 4	Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO.	13
Figure 5	Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan.	16
Figure 6	L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> . Les trois résidus histidines liés au CuA son 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.	16
Figure 7	tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet clair)	16
Figure 8	<i>Phoenix dactylifera L</i> , la variété de ghars d'Algérie	20
Figure 9	Le spectrophotomètre.	22
Figure 10	L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide benzoïque de <i>Phoenix dactylifera</i> . Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,6). Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais.	24
Figure 11	L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide oxalique de <i>Phoenix dactylifera</i> . Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,6). Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais.	25
Figure 12	Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera L</i>) cv <i>Ghers</i> par l'acide	28

benzoïque.

Figure 13 Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenixdactylifera L*) cv Ghers par l'acide oxalique.

29

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	pages
Tableau(1)	Les valeurs d'IC50 de l'acide benzoïque comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats.	16
Tableau(2)	Les valeurs d'IC50 de l'acide oxalique comme inhibiteur trouvée à partir différentes sources de PPO et le catéchol comme substrats.	26
Tableau(3)	Type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (<i>Phoenix dactylifera</i>) avec catéchol comme substrat en présence d'acide benzoïque.	27
Tableau(4)	type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (<i>Phoenix dactylifera</i>) avec catéchol comme substrat en présence d'acide oxalique.	27

Liste des abréviations

PPO : polyphénol oxydase

PVPP : polyvinyle (poly) pyrrolidone

POD : la peroxydase

S : Substrat

R² : coefficient de corrélation

Sommaire

Dédicaces	I
Remerciements	III
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	VI
Liste d'abréviation	VII
Table des matières	VIII
Résumé	XI
Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	3
1.1 Le palmier dattier d'Algérie : répartition géographique et production	3
1.2 Les datte (<i>Phoenix dactylifera</i> L)	4
1.2.1 Définition	4
1.2.2 Classification botanique	5
1.2.3 Evolution physiologique	5
1.2.4 Composition biochimique	6
1.2.5 Le brunissement enzymatique des dattes	7
Chapitre 2 : Polyphénol oxydase	9
2.1 Historique	9
2.2 Nomenclature	9
2.3 Définition	9
2.4 Classification	9
2.5 Source et localisation	10
2.6 Caractéristiques réactionnelles	10
2.7 Structure	11
2.8 Le site actif	12
2.9 Mécanisme réactionnel de l'activité catécholase	13
2.10 Méthode de mesure de l'activité enzymatique	14
2.11 Spécificité de substrat	15
2.12 Effet de PH	15

2.13 Effet de la température	17
2.14 Effet des effecteurs	17
2.15 Applications	19
Chapitre 3 : Matériels et méthodes	20
3.1 Matériels	20
3.1.1 Matériels biologique	20
3.1.2 Produits chimique	20
3.2 Méthodes	21
3.2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO	21
3.2.2 Mesure de l'activité de PPO	21
3.2.3 Détermination des valeurs d'IC ₅₀	22
3.2.4 Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque et l'acide oxalique	23
3.2.5 Analyse des résultats expérimentaux	23
Chapitre 4 : Résultats et discussion	24
4.1 Détermination de la valeur d'IC ₅₀	24
4.2 Etude mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du polyphénol oxydase des dattes	27
Conclusion	32
Références bibliographiques	33

Résumé

Ce travail a pour objectif d'étudier l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) des dattes Ghars (*Phoenix dactylifera* L.) Par l'acide benzoïque et l'acide oxalique. L'activité de la PPO a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, à pH 5.6 et à 30°C, en présence de catéchol comme substrat.

Le degré d'inhibition de la PPO dépend de la concentration du l'acide benzoïque et l'acide oxalique. La valeur d'IC₅₀ de l'acide oxalique est supérieur que l'acide benzoïque (1,9 vs 1,52 mM) montrant l'efficacité de deuxième inhibiteur

La représentation de Lineweaver-Burk indique que l'acide benzoïque et l'acide oxalique sont des inhibiteurs compétitifs et non compétitifs de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{IS} égale à 1,443 mM et 3,6376Mm respectivement.

Le type d'inhibition dépend de la nature du substrat utilisé et de la source d'obtention d'enzyme. Ces deux inhibiteurs peuvent être utilisés pour le contrôle du brunissement enzymatique des dattes au cours de leur stockage ou leurs transformations et son pouvoir inhibiteur peut être amélioré par l'ajout d'un autre agent d'anti-brunissement comme l'acide ascorbique.

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

ABSTRACT

This work aims to study the inhibition of polyphenol oxidase (PPO) of Ghars dates (*Phoenix dactylifera* L.) with benzoic acid and oxalic acid. The PPO activity was measured by spectrophotometry at 410 nm at pH 5.6 and at 30 ° C in the presence of catechol substrate.

The degree of PPO inhibition depends on the concentration of the citric acid. The IC₅₀ of acid oxalic is superior times higher than, benzoic acid (1,9 vs 1,52 mM) showing the efficacy of second inhibitor

The Lineweaver-Burk representation indicates that benzoic acid and oxalic acid are competitive and non-competitive inhibitors of PPO activity with K_{IS} value equal to 1,443 mM and 3,6376 Mm respectively.

The type of inhibition depends on the nature of the substrate used and the obtaining enzyme source. Both inhibitors can be used to control enzymatic browning of dates during their storage or their transformations and its inhibitory potency can be improved by the addition of another anti-browning agent such as ascorbic acid.

Keywords: Ghars, PPO, benzoic acid, oxalic acid, inhibition, enzymatic browning.

يهدف هذا العمل الحالي لدراسة تثبيط أوكسيداز البوليفينول (PPO) (*Phoenix dactylifera* L) مع حمض البنزويك وحمض الأكساليك. وقد تم قياس النشاط PPO بواسطة القياس الطيفي في 410 نيوتن متر عند الرقم الهيدروجيني 5.6 30 درجة مئوية في وجود الركيزة الكاتيكول.

PPO تثبيط يعتمد على تركيز حامض الستريك. و IC₅₀ الأكساليك هو أعلى البنزويك (1,9 1.52 ملم) تظهر فعالية

ويشير التمثيل خطية لبيرك أن حمض البنزويك وحمض الأكساليك ومثبطات التنافسية وغير التنافسية من النشاط PPO مع قيمة K_{IS} يساوي 1.443 3.6376 Mm Mm

نوع تثبيط يعتمد على طبيعة الركيزة المستخدمة ومصدر انزيم الحصول على .. كل من مثبطات يمكن أن تستخدم للسيطرة براوننج الأنزيمية م التخزين أو تحولاتها وفعاليتها المثبطة يمكن تحسينها عن طريق إضافة وكيل آخر لمكافحة إنضاج مثل حمض الاسكوربيك.

: PPO، حمض البنزويك وحمض الأكساليك، كبت، براوننج الأنزيمية.

Introduction

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

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

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

La PPO est une 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, 1991) et (Vámos-Vigyáz , 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 couteux (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 l'acide citrique comme un anti-brunissement dans l'industrie alimentaire (Queiroz et *al.*, 2008). Par contre, l'inhibition de la PPO de datte n'a pas suscité l'attention similaire. Pour cela, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de l'acide benzoïque et l'acide oxalique sur l'activité de la PPO de Ghars et de déterminer ses mécanisme d'inhibition en utilisant le pyrocatechol comme substrat phénolique.

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

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1 Le palmier dattier d'Algérie : répartition géographique et production

Les véritables palmeraies commencent sur le versant Sud de l'Atlas saharien, par les palmeraies Ghars de Biskra (Tolga) à l'Est, par celles du M'zab au centre de Bni-Ounif à l'Ouest. A l'extrême Sud du Sahara, l'Oasis de Djanet constitue la limite méridionale de la palmeraie Algérienne. C'est dans le Nord-Est du Sahara qu'on trouve le 3/4 du patrimoine phoenicicole, à la région de Ziban, d'Oued-Righ et la cuvette d'Ouargla dont la production a été estimée de 849 082 qx en 2006. C'est aussi dans ces régions que sont produites les belles dattes, Ghars et autres variétés commerciales : Deglet Nour, Mech Degla, Degla Beida. (Quinten, 1996). La wilaya de Biskra est considérée comme la première région dattière du pays. Elle représente actuellement 27 % du patrimoine national avec une production dattière annuelle de 90000 tonnes suivi de près par la wilaya d'El-Oued (Anonyme, 2003).

Pendant la campagne phoenicicole (2003/2004), la production de dattes a été estimée de 4 721 540 qx soit une augmentation de 13 % par rapport aux années écoulées. Il est à noter que 49 % du volume global de la production sont représentés par la variété ghars.

Effectivement, l'exploitation du palmier dattier constitue une source de revenus financiers appréciables pour les habitants des oasis.

L'Algérie et la Tunisie sont les premiers exporteurs des dattes en France et en Europe (Guizani et al. 2010). Selon FAO (2005) l'Algérie se classe comme le sixième producteur dans le monde.

L'Algérie occupe le cinquième rang mondial avec une production annuelle entre 400000 et 430000 tonnes dont plus de 48 % (Anonyme, 2003). Elle constitue ainsi une source non négligeable de devises pour le pays.

Dans la société, le palmier dattier joue un rôle important dans le système oasien. Il favorise le développement d'un microclimat propice à la culture d'arbres fruitiers, maraîchers, fourragers ou céréaliers. Le palmier dattier constitue, ainsi, le pilier sur lequel repose tout le système oasien (Quinten, 1995).

1.2 Les dattes (*Phoenix dactylifera* L.)

1.2.1 Définition

La datte est une baie à une seule graine bien qu'on évoque souvent à tort un noyau. Elle contient une seule graine dite "noyau" Figure (1). La partie comestible de la datte, est dite "chair" ou "pulpe", donc elle se compose de :

Partie comestible, représentée par le mésocarpe dont la consistance peut être selon les variétés, le climat ainsi que la période de maturation :

Molle : le mésocarpe est très humidifié avec peu de saccharose (31% d'eau).

Demi-molle : telle que la Deglet Nour (18% d'eau).

Sèche : telle que la Degla Beida, Hamraia et la Mech Degla (12% d'eau).

Partie non comestible, formée par la graine ou le noyau, ayant une consistance dure. Le noyau représente 10 % à 30 % du poids de la datte (Etienne, 2002).

La maturation des dattes est longue, elle débute vers les mois de mars-avril, et leur récolte commence en octobre, dans le nord du Sahara. Dans les oasis du Sahara central, on cueille les premières dattes, une friandise, dès le mois d'aout, et même en juillet. Dans le sud du désert, le régime des pluies diffère, on doit alors cueillir les dattes à la fin de la saison sèche, début juillet, avant les pluies d'été (Benchelal et Maka 2006). Leur couleur va du blanc jaunâtre au sombre très foncé presque noir, en passant par les ambres, rouges et bruns.

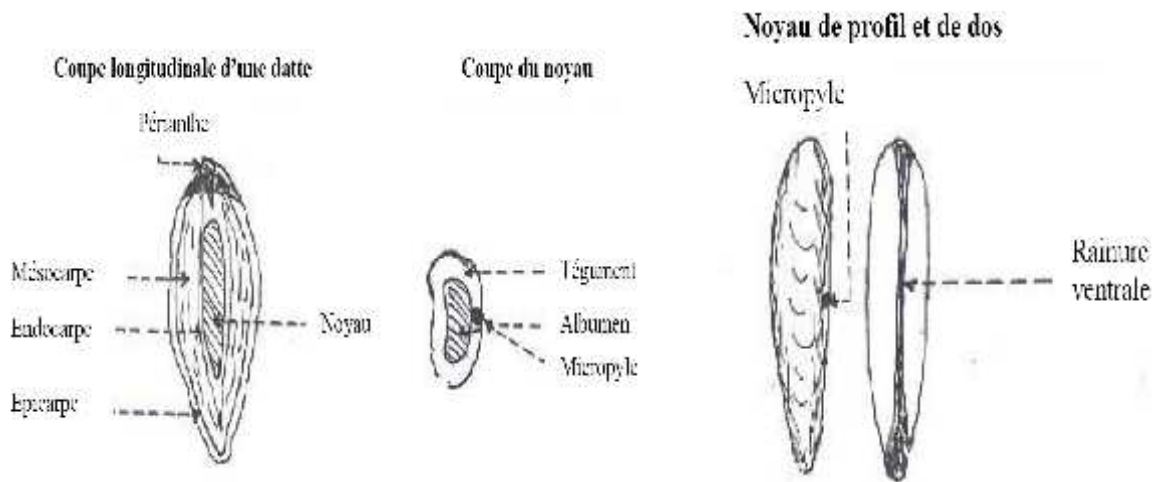


Figure 1 : Fruit et graine du dattier (Munier, 1973 ; Buelguedj, 2001).

1.2.2 Classification botanique

Le palmier dattier dans le règne végétal se classe selon (Feldman, 1974 ; Djerbi, 1994) :

Groupe : Spadiciflore.S

Embranchement : palmacées

Sous –embranchement : angiospermes

Classe : monocotylédones

Série : monocotylédone hypogynes

Ordre : spadiciflorales

Famille : palmoe

Tribu : phoenicées

Genre : *Phœnix*

Espèce : *dactylifera* L.

1.2.3 Evolution physiologique

Depuis la pollinisation jusqu'à la maturation complète de la datte et la récolte, on peut observer trois types d'évolution physiologique de la datte, qui sont (Kharoubi, 1995):

- Une évolution de taille ;
- Une évolution pondérale ;
- Une évolution de la couleur.

1.2.4 Composition biochimiques et valeur nutritionnelle

1.2.4.1 Composition biochimique

Le pH : Le pH de la datte est légèrement acide, il varie entre 5 et 6. Ce pH est préjudiciable aux bactéries mais approprié au développement de la flore fongique (Reynes et al. 1994).

Les minéraux : La datte offre des minéraux et des oligo-éléments en quantité remarquable (Munier, 1973 ; Al-wassat., 2011). Elle en contient entre 1,5 et 1,8%, soit deux à trois fois plus que dans les fruits frais. La datte est parmi les fruits les plus riches en potassium (plus de 670 mg aux 100 g) (Al-wassat, 2011) et en calcium (62 mg) (Frenot et Vierling, 1997 ; Al-wassat, 2011). En magnésium (58 mg) et en fer (3 mg) ; une portion de 50 g de dattes fournit à peu près 10% des besoins quotidiens en fer et en magnésium. Elle renferme également du manganèse, du zinc et une quantité intéressante de cuivre : ce dernier participe à la formation de l'hémoglobine et du collagène (protéine nécessaire à la structure et à la réparation des tissus) dans le corps.

Les fibres alimentaires : La datte procure une portion intéressante de fibres. Quatre dattes fournissent entre 2 et 4 g de fibres, soit entre 5 et 8% de l'apport journalier recommandé. Les fibres insolubles (non absorbées par les intestins) agissent directement sur le transit et les fibres solubles jouent un rôle dans la réduction du taux de cholestérol et par conséquent aident à réduire les risques de maladies cardio-vasculaires (Barreveld, 1993, Al-wassat, 2011).

Le fluor : La datte contient une ration de fluor suffisante pour protéger les dents des caries (Al-wassat, 2011).

Les protides : Son taux de protides atteint 2,5% dans le fruit sec contre 1% maximum dans le fruit frais. Par contre, son pourcentage de lipides reste extrêmement faible (<1%) (Ghazi et Teffahi, 2007 ; Alwassat, 2011).

Les vitamines : Lorsqu'elle est séchée, son apport en vitamines du groupe B est remarquable : vitamine B3 (1,7 mg), vitamine B5 (0,8 mg), vitamine B6 (0,15 mg) et vitamine B2 (0,10 mg). En revanche, la vitamine C diminue considérablement (2 mg contre 15mg dans le fruit frais). (Munier, 1973 ; Al-wassat, 2011).

Les composés phénoliques : Mansouri et ses collaborateurs (2005) ont mené une étude sur des variétés de dattes mûres récoltés sur des palmeraies de Ghardaia. Les différentes variétés analysées ont présenté un contenu phénolique dans la gamme 2,49 - 8,36 mg/100 g du poids à l'état frais.

Les enzymes : La bonne connaissance des activités enzymatiques est d'une importance pratique pour l'aspect qualité en procédés alimentaires. En effet, par la manipulation de la température et l'humidité on peut stimuler ou désactiver l'enzyme suivant un résultat désiré (Barreveld W.H., 1993). L'activité des enzymes est connue pour être en grande relation avec la texture et la couleur des dattes (Zaid, 2002 ; Belarbi, 2001 ; Yahiaoui, 2000 ; Al-Hooti et *al.*, 1997 ; Reynes, 1997 ; Aziza et *al.*, 1986 ; Mutlak et Mann, 1984 ; Smolensky et *al.*, 1975). Parmi les enzymes les plus regardées dans ce sens on trouve la polyphénol oxydase (PPO) et la peroxydase (POD). Selon Belarbi A. (2001), ces deux enzymes sont responsables du brunissement enzymatique du fruit.

1.2.4.2 Valeur nutritionnelle

La datte est un fruit très énergétique. Elle est légendaire pour la perfection qu'on lui connaît. La datte est qualifiée de « la reine des dattes » et l'un des produits phares de l'agriculture algérienne. Dotée d'un goût très doux, juteuse et quasi-transparente, elle est la plus populaire des dattes. Grâce à son effet laxatif, la datte est un aliment essentiel pour les femmes enceintes avant l'accouchement, car elle purgent le colon et les intestins et simplifie ainsi l'accouchement.

Le jus de dattes mixé avec du lait constitue une boisson très nourrissante et fortifiante pour les petits et même pour les grands. Les dattes agissent efficacement sur les troubles intestinaux (Benchelah et Maka, 2006 ; Al-wassat, 2011). Le sirop de datte est une médication intéressante pour traiter l'insuffisance cardiaque et les troubles sexuels (Al-wassat, 2011).

1.2.5 Le brunissement enzymatique des dattes

Le brunissement enzymatique est un problème significatif dans un certain nombre de produits importants, particulièrement fruits tels que des abricots, des pommes, des poires, des pêches, des bananes, et des raisins ; légumes comme pommes de terre, champignons, et laitue ; et fruits de mer tels que la crevette, les langoustes, et les crabes (Sapers, 1993).

Selon Nicolas et Potus, 1993 ; les phénomènes de brunissement des tissus végétaux sont la première manifestation d'un désordre cellulaire après une mise en contact accidentelle de substrats et d'enzymes.

Les substrats phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (Salunkhe, 1990). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont: les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins, responsables de la structure des fruits et légumes. Ils sont transformés en quinones, qui se polymérisent grâce à l'oxygène ; conduisent à des composés plus ou moins colorés. Ils peuvent réagir avec les acides aminés.

Le brunissement enzymatique est dû à des enzymes les polyphénol-oxydases. (Macheix et *al.*, 1990). en général, les dattes sont riches en polyphénols (substrats) dont l'oxydation enzymatique est à l'origine du brunissement plus ou moins intense (Jarrah et *al.*, 1982).

En effet, au cours du stockage, la qualité relative des polyphénols simple et des tanins solubles diminue. Les flavones disparaissent en donnant des composés oxydés de couleur brune ainsi que des acides dactylifériques (Mohamed et *al.*, 1985).

La vitesse de la réaction dépend de la teneur en substrat. Le pH optimum pour la réaction est 5-7, souvent 6-6,5. C'est pourquoi les fruits les plus acides brunissent moins. Tant que les tissus restent sains, il n'y a pratiquement pas de brunissement. (Cheftel et *al.*, 1977).

Chapitre 2 : Polyphénol oxydase

2.1 Historique

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Et fut mise en évidence par Bertrand (1896) dans la betterave ; le dahlia et certains champignons. Depuis sa découverte, la polyphénol oxydase a fait l'objet de recherches intensives (Zawistowski et al, 1991 ; Robb, 1984). 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 (Bonner, 1957).

2.2 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).

2.3 Définition

La PPO également appelée tyrosinase est une oxydoréductase 1,2-benzenediol: oxygène. C'est une enzyme à cuivre (Kazandjian et Klibanov, 1985). La PPO est présente dans quelques bactéries et mycètes et dans la plupart des végétaux (Sapers, 1993).

2.4 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 : O₂ 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).

2.5 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 (Galeazzi *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).

2.6 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).

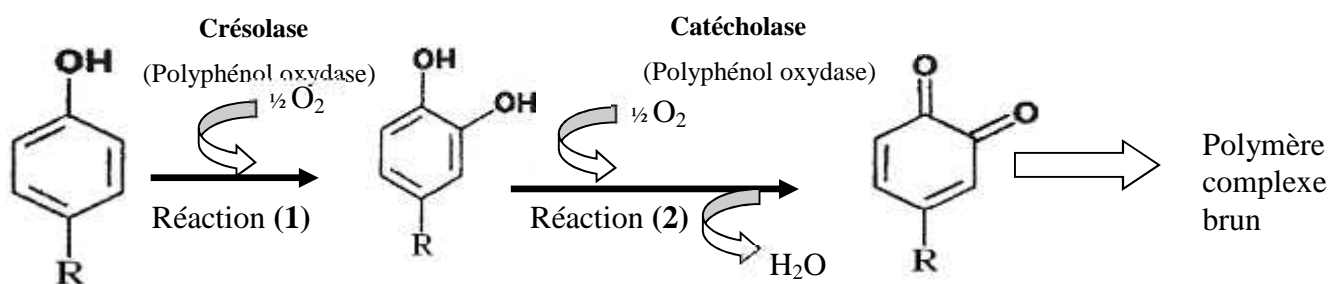


Figure 2: schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994; Van Gelder *et al.*, 1997).

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).

2.7 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 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 histidine 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 H₂L₂ 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 H₂L₂. 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.

2.8 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_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. 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 3). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices (Figure 4). 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 (Figure 5) (Van Gelder *et al.*, 1997).

2.9 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 3).

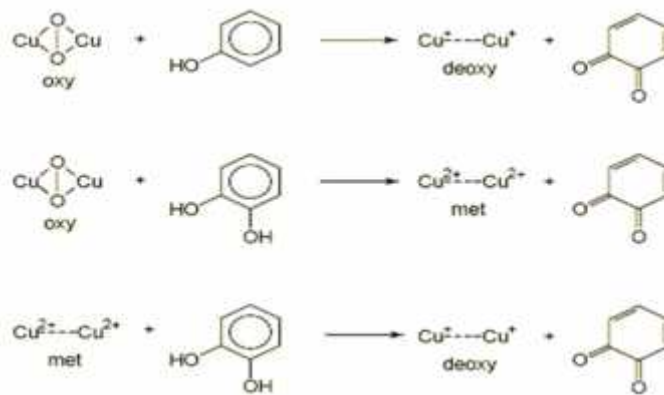


Figure 3: Les trois états fonctionnels de la PPO, Met ; Deoxy et Oxy PPO d'après Van Gelder *et al.* (1997).

Le modèle du mécanisme réactionnel de l'activité catécholase de la PPO est représenté dans la Figure (4).

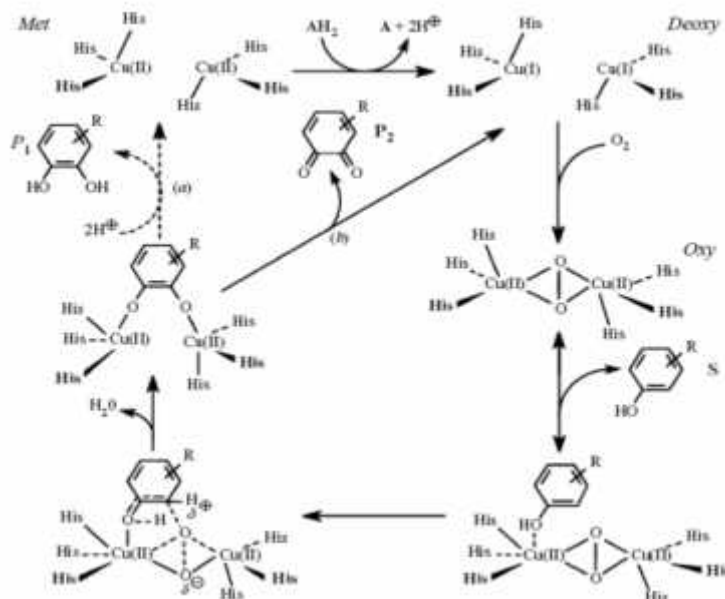


Figure 4: Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO Solomon *et al.* (1992).

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.

2.10 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-Vigyáz , 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-Vigyáz , 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-Vigyáz , 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-Vigyáz , 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).

2.11 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, 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-Vigyáz , 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-Vigyáz , 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.

2.12 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 hydroxyles OH^- sont impliqués.

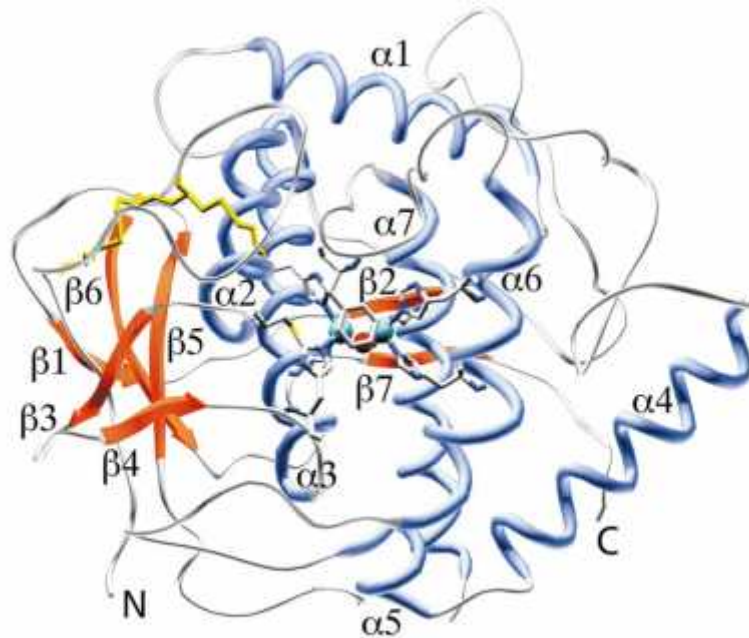


Figure 5: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et al., 1999).

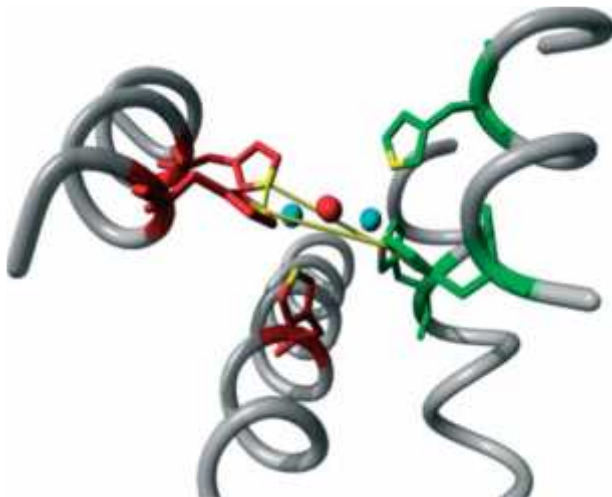


Figure 6: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

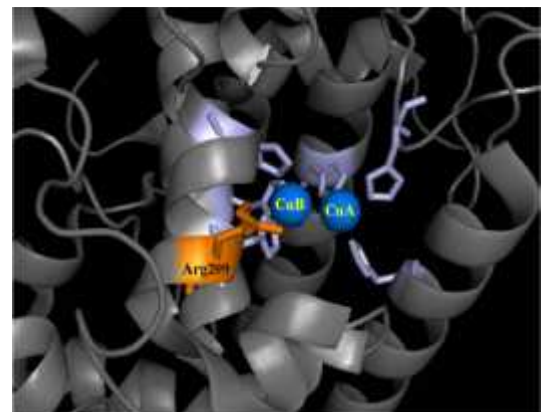


Figure 7 tyrosinase. Les atomes de cuivre (bleu), histidines liées aux atomes de cuivres (violet clair) (Ben-Yosef et al., 2010).

2.13 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-Vigyáz , 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-Vigyáz , 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicio lu et Cemero lu, 2003). La diminution d'une partie de l'activité de la PPO après chauffage à une basse température n'est pas étonnante (Yemenicio lu, 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-Vigyáz , 1981; Yemenicio lu et Cemero lu, 2003). L'inactivation thermique de la PPO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991).

2.14 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-Vigyáz , 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-Vigyáz , 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicio lu et Cemero lu, 2003).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (Yemenicio lu 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 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,
- 2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique,
- 3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphenol) (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'acide, le méthyle xanthate de potassium, L-mimosine et le tropolone (Vámos-Vigyáz , 1981; Jolivet et *al.*, 1998; Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska et *al.*, 2002 ; Mayer et Harel, 1979).

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-Vigyáz , 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 érythorbiques 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-Vigyáz , 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 (MeEvely et *al.*, 1992). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas spécifique seulement pour les PPO (Mayer et Harel, 1991).

2.15 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 les 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).

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1 Matériels

3.1.1 Matériels biologiques

La datte ghars 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 (Figure 8)



Figure (8) : *Phoenix dactylifera L.*, la variété de ghars d'Algérie

3.1.2 Produits chimiques

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

3.2. Méthodes

3.2.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO

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

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. 200g de chair de dattes refroidie préalablement à -15°C sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG ,model BB 90E) dans 300 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) comme chélateur des composés 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 He IOS Spectrophotometer, England).

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

3.2.2 Mesure de l'activité de PPO

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

La solution mère de catéchol à 0.4 M est préparée dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5mM (Fan et Flurkey, 2004).

Le milieu réactionnel contient 1 ml de substrat à 40mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 μl d'extrait enzymatique. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant 2 min après l'ajout de l'extrait enzymatique.



Figure(9) : Le spectrophotomètre (Thermo Scientific He IOS Spectrophotometer, England).

3.2.3 Détermination des valeurs d'IC₅₀

IC₅₀ est fait Pour déterminer 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 7.0 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs (acide benzoïque comprises entre 0.5 et 3 mM et l'acide oxalique comprises entre 0.5 et 3 mM pour une concentration constante de catéchol.

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 benzoïque et acide oxalique) (Chen et al, 1998).

Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur (A₀) (Dogan et al, 2005) selon l'équation suivante :

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

Avec :

A₀ : est l'activité diphénolase en absence d'inhibiteur

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

Toutes les expériences ont été réalisées 3 fois.

3.2.4 -Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque et acide oxalique

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur (1 et 2 mM pour l'acide benzoïque tandis que pour l'acide oxalique des concentrations valant 1,5 mM et 3 mM ont été utilisées) et à différentes concentrations croissantes de la catéchol comprises entre 30 et 80 mM.

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

3.2.5 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 effectué par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). Enzyme Kinetics Pro™ 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.).

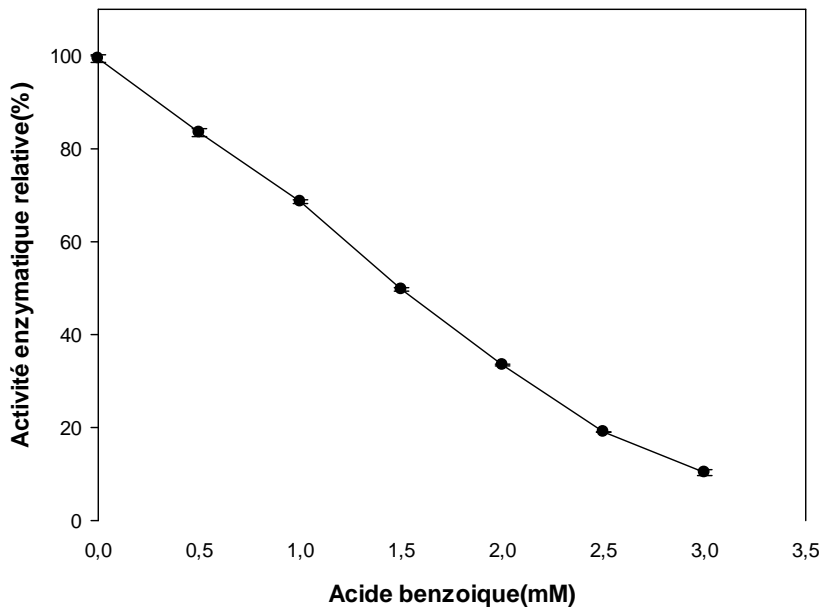
Chapitre 4 : résultats et discussion

4.1- Détermination de la valeur d'IC₅₀

L'effet de différentes concentrations d'acide benzoïque et/ou l'acide oxalique sur l'oxydation de la catéchol par la polyphénol oxydase de la variété de Ghars *Phoenix dactylifera L.*

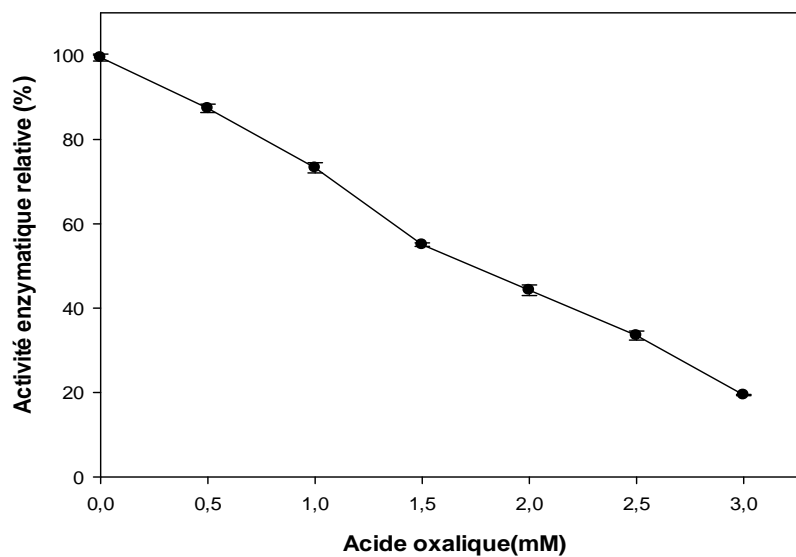
Les résultats trouvés, montre que la concentration de ces deux inhibiteurs dans le milieu réactionnel provoque une diminution significative sur l'activité de la PPO.

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 = 1,52 mM±0,081 mM. et 1,9 mM±0,175 mM en présence d'acide benzoïque et oxalique, respectivement.



Figure(10) : L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide benzoïque de *Phoenix dactylifera L.*

Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,6). Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais.



Figure(11) : L'activité enzymatique relative de l'enzyme PPO des dattes et l'effet de différentes concentrations de l'acide oxalique de *Phoenix dactylifera L.* Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5,6). Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais.

Pour mieux comparer l'effet de l'acide benzoïque et/ou l'acide oxalique sur les PPOs d'origine végétale et celle de datte Ghars, les valeurs d'IC₅₀ de l'acide benzoïque ainsi que l'acide oxalique trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans le Tableau (1 et 2) 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(1) : Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide benzoïque comme inhibiteur trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats

Source	Type de substrat phénolique	IC ₅₀ (mM)	référence
Champignon de paris (<i>agaricus bisporus</i>)	Catéchol	0.147	Gouzi et <i>al.</i> ,2010
Champignon de paris (<i>agaricus bisporus</i>)	Catéchol	1.00	Chen et <i>al.</i> 2003
Turffes (<i>terfezià leonis</i>)	Catéchol	8.2	Gouzi., 2014
Plaquemine	Catéchol	5.00	Arzu et <i>al.</i> 2004
Turffes (<i>terfezià leonis</i>)	L-Tyrosine	2.82	Djaïd et Kouidri 2015
Datte (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Catéchol	1.52	Notre étude

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

Tableau(2) : Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide oxalique comme inhibiteur trouvée à partir différentes sources de PPO et le catéchol comme substrats.

Source	Type de substrat phénolique	IC ₅₀ (mM)	Référence
Champignon de paris (<i>agaricus bisporus</i>)	Catéchol	1.1	Son et <i>al.</i> ,(2000)
Turffes (<i>terfezià leonis</i>)	Catéchol	8.21	Chàher et benmbàrek ., (2011)
Plaquemine	Catéchol	0.031	Arzu et <i>al.</i> ,(2004)
Artichaut (<i>Cyanra scolymuys</i>)	Catéchol	0.194	Aydemir.,(2014)
Datte (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Catéchol	1.9	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 benzoïque semble être plus puissant que l'acide oxalique

4.2-Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase des dattes

L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque et/ou de l'acide oxalique sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO des dattes Ghars est étudié en utilisant le catéchol comme substrat.

Les résultats trouvés, montrent que ces deux inhibiteurs provoquent 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.

Les coefficients de régressions linéaires (R^2) des représentations de lineweaver-Burk en absence et en présence de l'acide benzoïque et/ ou de l'acide oxalique pour le substrat utilisé (catéchol) sont indiqués dans le tableau 3 et 4 respectivement.. Leurs valeurs de R^2 comprises entre (0.996 et 0.994) indiquent bien que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

Tableaux(3) : Type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (*Phoenix dactylifera L.*) avec catéchol comme substrat en présence d'acide benzoïque

Acide benzoïque (mM)	K_I (mM)	K_m (mM)	V_{max} (abs/min)	Type d'inhibition	R^2
0		95,40±7,844			0,996
1	1,443±0,05	148,58 ±10,09	0,50±0,02	Compétitive	0,995
2		244.58±11,75			0,994

Tableaux(4) : type inhibition k_i et k_m de la PPO de datte (*Phoenix dactylifera L.*) avec catéchol comme substrat en présence d'acide oxalique

Acide Oxalique (mM)	K_I (mM)	K_m (mM)	V_{max} (abs/min)	Type d'inhibition	R^2
0			0,5458±0,0244		0,995
1.5	3,6376±0,76	127,4267±8,3808	0,3857±0,02	Non Compétitive	0,994
3			0,299±0,017		0,993

Les valeurs de K_{IS} indiquées dans les Tableaux (3 et 4) suggèrent que l'acide benzoïque, et/ou l'acide oxalique inhibent efficacement l'activité de la PPO des dattes Ghars en présence de catéchol de même ces tableaux montrent que les représentations graphiques de $1/v_0$ en fonction de $1/[S]$, est

une série de courbes parallèles, avec une diminution de la valeur V_{\max} et pareillement, une diminution du K_m .

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de catéchol par la PPO des dattes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de l'acide benzoïque et/ou l'acide oxalique agissant sur l'enzyme a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk. Les résultats trouvés en présence de l'acide benzoïque et/ou l'acide oxalique sont représentés dans les figure (12) et (13) respectivement.

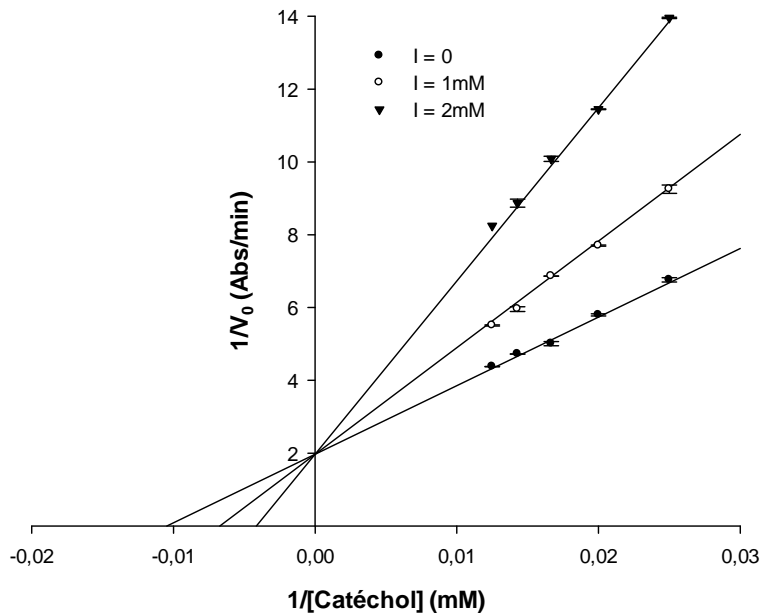
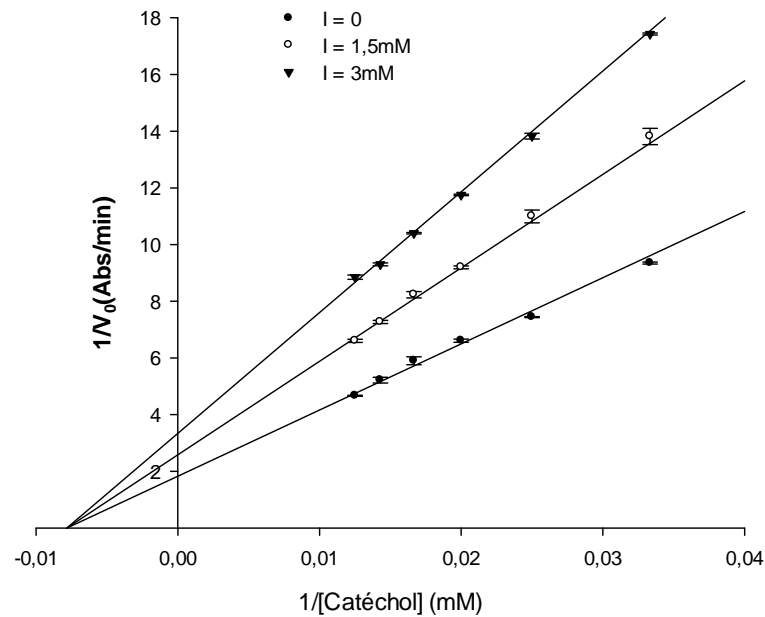


Figure (12): Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L.*) cv. *Ghers* par l'acide benzoïque. Les concentrations d'acide benzoïque sont : 0 (●), 1 (◻), 2 (▲), mM.



Figure(13) : Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L.*) cv. Ghers par l'acide oxalique. Les concentrations d'acide oxalique sont : 0 (●), 1,5 (○), 3 (▲), mM.

Les Figures (12 et 13) montrent respectivement, les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence d'acide benzoïque et d'acide oxalique en utilisant le catéchol

En présence d'acide benzoïque, la représentation graphique de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, et qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées. La valeur de V_{max} demeure constante tandis que, la valeur de K_m augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. En revanche et en présence de l'acide oxalique la figure 13 montre une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ($1/[S]$) mais de différentes pente. Ceci indique un type d'inhibiteur compétitif et non compétitif pour l'acide benzoïque et l'acide oxalique, respectivement.

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 benzoïque 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 c'est indiqué dans les Tableau (3), le constante d'inhibition (K_I) pour l'acide benzoïque, utilisant le catéchol comme substrat est respectivement, 1,443mM

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

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

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{v_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{v_{max}}$$

Avec :

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

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

$$K_I = K_{IS}$$

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

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

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

La constante d'équilibres de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I ; et sur le complexe (ES) ; K_{IS} cette valeur est égale à valeurs sont de 3 ,6376 mM

La présence d'un inhibiteur non compétitif dans le milieu réactionnel n'affecte pas la fixation du substrat avec l'enzyme libre mais affecte la fonction catalytique de l'enzyme.

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 PPO 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.

Conclusion

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

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

D'après les résultats obtenus à partir de ce travail, on conclue que, l'acide benzoïque et/ou l'acide oxalique présentent un mécanisme compétitif et non compétitif respectivement.

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 et d'une manière réversible tandis que L'acide benzoïque se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat

D'après les valeurs d'IC₅₀ ces derniers 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 agents anti-brunissement très appropriée.

Afin d'améliorer le pouvoir inhibiteur des acides organiques, il est envisageable de le associer avec d'autre agents d'anti brunissement tel que l'acide ascorbique ou carrément avec un autre moyen physique 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

Références bibliographiques

- Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J.(2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367.
- Al-Hooti, S.; Sidhu, J.S., (1997). Qabazard, H. Objective color measurement of fresh date fruits and processed date products. *Journal of Food Quality.*, Vol 20: 257-266.
- Anonyme (2003). Ministère de l'agriculture. Statistique agricole. Ministère de l'agriculture. Série A..revue p77.
- Anosike E.O., and Ayaebene, A.O. (1982). Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*. 21, 1889-1893.
- Aoki, S., Suzuki, S. and Tamura, A. (1980). Internal browning of stracking delicious apple during low temperature storage. Report of the National Food Research Inst., No. 38, 56-61.
- Arslan ,Oand Dogan,S .(2005) .Inhibition of polyphénoloxydase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid.journal of the science of food and agriculture Vol.85:1499-1504.
- Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E.(2009). An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- Aziza B. Mustafa, David B. Harper and Donald E. Johnston,(1986). Biochemical changes during ripening of some Sudanese datevarieties. *J. Sci. Food Agric.*,Vol 37:43-53
- Barreveld W H. FAO. (1993). Agricultural Services Bulletin N° 101, Date Palm Products. FAO, Rome, 39p.
- Belarbi A. (2001). Stabilisation par séchage et qualité de la datte Deglet Nour. Thèse de Doctorat de l'ENSIA, Massy.
- Bertrand G.,(1896 b).Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydase d'origine végétale. *C. R. Acad. Sci.*, 122, 1215-1217.
- Bonner, W. D. (1957) .*Annu. Rev. Plant Physiol*. 8, 427.

- Buelguedj A, Nacib N .(2001). Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu à base de jus de dattes .rev.enreg.ren.production et valorisation biomasse.p41-46.
- Burton S G.(1994). Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, 22,459-487
- CHAN, H. T AND YANG, H. Y.(1971). Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. *Journal of food science*. 35: 169.
- Cheftel J.C., Cheftel H. (1977). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Technique et documentation. Lavoisier, Paris, vol. 1, 381 p.
- Chen ,L and Flurkey,W.H.(2002).Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms.*Current topics in phytochemistry*.Vol.5,pp.109-120.
- CHEN Q.X., LU H.Y., ZHU C.M., LIN H.N., ZHOU H.M.(1998). The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.*, 45, 465-73.
- Claus ,H and Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases.*Systematic and Applied Microbiology*, Vol.29, 3-14.
- CUI, Y., BARFORD, J.P., AND RENNEBERG, R.(2006). A disposable, screen-printed electrode for the ampero-metric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22 : 1279-1281.
- DECKER, H AND TERWILLIGER N.(2000). Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- Decker, H.(2005).Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, II: 1159–1173.
- Della L, S., I. Ascone, et al. (1996). "The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy." *J. Biol. Chem*. 271(35): 21025-21030.
- Djerbi M, (1994). Précis de phéniculture, F.A.O, Rome, 191 p.
- Dogan,S., Turan,Y., Erturk,H., Arslan,O.(2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- Dowson V. H. W. et Aten A. (1963). Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO, Rome, Cahier n°72, 1-394.

- Duran,N.,Esposito,E.(2000).Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. Appl. Catal. B Environ. 28: 83–99Eicken et al., 1999
- EL-BAYOUMI, M.A AND FRIEDEN, E.(1957). A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. 79: 4854-4858.
- Erat,M.,Nuri,Y.Gül ah,S,A.,Demirkol,A.(2010). Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum L.*) European Food Research and Technology.23,6,899-905.
- ESPIN, J.C. AND WICHERS, H.J(1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS).Kinetic properties of the SDS-activated isoform. J. Agric. Food Chem. 47, 3518-3525.
- Etienne E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits, Tec Lavoisier, Paris, New York, 147-149-150-151 p.
- FAN, Y AND FLURKEY, W.H.(2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. Phytochemistry. 65: 671-678.
- Feldman, J. F. and Thayer, J. P. (1974), Biochem. Biophys.Res. Commun. 61,917.
- FERRAR P.H., WALKER J.R.L., 1999. Microorganisms as potential source of novel diphenol oxidase inhibitors. J. Food Biochem., 23, 1-15.
- Flurkey, W. H. and Jen, J. J.(1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activity in developing peach. J. Food Sci. 43, 1826-1828, 1831 .
- Frenot M et Vering E, (1997). Biochimie des aliments, diététique des sujets bien portent, Dion, 282 p.
- FUJITA, S., SAARI, N., MAEGAWA, M., TETSUKA, T., HAYASHI, N., & TONO, T.(1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea L.*). Journal of Agricultural Food Chemistry. 43(113)1138–1142
- Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V. C. and Constantinidie, S. M.(1981). Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidase (PPO) from a Dwarf variety of banana (*Musa caendishii, L.*). J. Food Sci. 46, 150-155.
- GANDÍA-HERRERO, F., JIMÉNEZ-ATIÉNZA, M., CABANES, J., GARCIA-CARMONA, F AND ESCRIBANO, J.(2005). Evidence for a common regulation in the

- activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386: 601-607
- GAUILLARD, F., RICHARD FORGET, F. AND NICOLAS, J., (1993). New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity, *Anal. Biochem.*, 215: 59-65
 - Ghazi F et Teffahi M, (2007). Mis en valeur et étude de l'utilité technologique de la fermentation de dattes « cas de la variété Hmira », mémoire d'ingénieur en sciences alimentaires, Mascara, 3-6-9-21p.
 - Golbeck, K. H. and Cammarata, K. V. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase: isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67, 977-984.
 - Guizani a, Ghalib N , Al-Saidi S , Shafiur M, Rahman a, Bornaz b, Al-Alawi a. (2010). State diagram of dates: Glass transition, freezing curve and maximal-freeze-concentration condition, *Journal of Food Engineering* Vol 99 : 92-97
 - HAGHBEEN, K., SABOURY, A.A., KARBASSI, F. (2004). Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1675: 139-146.
 - Harel, E., Mayer, A. M. and Lerner, H. R. (1970). Change in the level of catechol oxidase and laccase activity in developing peach. *J. Sci. Food.* 21, 542-544 .
 - IKEHATA, K AND NICELL, J.A. (2000). Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.* 16: 533-540.
 - JANOVIKZ-KLAPP, A.H., RICHARD, F.C., GOUPY, P.M. AND NICOLAS, J.J. (1990). Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1437-1441.
 - Jarrah a. Z., Benjamin N. D. (1982). Activity of polyphenol oxidase and pectin esterase during different stages of growth and development. *Date Palm Journal.* vol. 1, n°2.
 - Jolivet, S., N. Arpin, et al. (1998). "Agaricus bisporus browning: a review." *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
 - KAHN, V. AND POMERANTZ, S.H. (1980). Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidases. *Phytochemistry* 19, 379-385
 - Kharoubi H. (1995). Essai comparatif de l'effet de deux méthodes de ciselage, avec trois dattes de deux cultivars « Deglet Nour » et « Ghars », mémoire d'ingénieur en agronomie, I.N.F.S.A.S. Ouargla, 103 p.

- Kidron, M., Harel, E. and Mayer, A. M. (1978). Catechol oxidase activity in grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 30-36.
- Klabunde, T., C. Eicken, et al. (1998). "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." *Nat. Struct. Biol.* 5(12): 1084-1090.
- Lerch, J. (1982) .*Biol. Chem.*, Vol(11) :257 6414.
- Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J.(2010). Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B.* 144 : 18–22.
- Macheix J.J., Fleuriet A. et Billot J. (1990). Phenolic compounds in fruit processing. C.R.C. Press, BOCA_RATON. Fruit phenolics, pp 295-322.
- MARTINEZ V.M., WHITAKER J.R.,(1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200
- Mayer, A. M. and harel, E. H. (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochem.* 18, 193-215.
- Mayer, A.M. (1987). review article number 22. polyphenol oxidases in plants—recent progress. *phytochemistry*, vol. 26, no. 1, pp. 11-20.
- MAYER, A.M., HAREL, E AND BEN-SHAUL, R.(1966). Assay of catechol oxidase—A critical comparaison of methods. *Phytochemistry.* 5: 783-789.
- Mayer, A.M.; Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- MCCORD, J. D AND KILARA, A.(1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science*, 48:1479–1483.
- MCEVILY, A.J., IYENGAR, R. AND OTWELL, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32,
- Min, K., Yoo, Y.J.(2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase—SWNTs—Ppy composite electrode. *Talanta.* 80: 1007-1011.
- Mohammed N.A., Nezam deldin a.N. (1985). A study on browning reaction in the major stages maturity of Zahidi date. *Dep. Date and palm. Agric. Water. Reso. Res. Cent. Sci. Res. Council, Baghdad*, 13 p.
- MONTEREALI, M.R., DELLA SETA, L., VASTARELLA, W., PILLOTON R. (2010). A disposable Laccase—Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of

- phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- Munier P,(1973). Le palmier dattier, Maison neuve et larose, Paris. 25-28-31-32-40-48-141-142-221-367p.mushroom tyrosinase by sodium dodecyl sulfate." *Colloid Surface B* 32(2):
 - Mutlak H.H. et Mann J.,(1984). Darkening of dates: Control by microwave heating. *Date Palm Journal*, 3(1), 303-316.
 - Naish-Byfield, S and Riley, P.A.(1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* 288: 63-67.
 - NJAGI J., ChERNOV M.M., LEITER L.C., ANDREESCU S.(2010). Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
 - Ouinten M. (1995). Le palmier dattier dans le système oasien.
 - PEREZ-GILABERT M., MORTE A., G-CARMONA, F.(2004).Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*. 166: 365–370
 - PIFFERRI P.G., BALDASSARI L., CULTRERA R.(1974). Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric.*, 25, 263-270
 - QUEIROZ ,C., MARIA LÚCIA MENDES ,LML., FIALHO ,E., VERA LÚCIA.(2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375.
 - RAPEANU,G.,BULANCEA,M. (2005). thermal inactivation kinetics of polyphenoloxidase extracted from white grapes. *Acta Universitatis Cibiniensis Series e: food technology* Vol. IX no.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*. 17: 207-218
 - Reynes M, Bouabidi H, Piombo G, Risterucci A M., (1994). Caractérisation des principales variétés de dattes cultivées dans la région des Djerid en Tunisie. *Fruit*, 49,289-298 p.
 - Reynes Max. (1997). Influence d'une technique de désinfestation par micro-ondes sur les critères de qualité phisico-chimiques de la datte. Thèse de doctorat de l'INPL.

- Rivas, N. J. and Whitaker, J. R. (1973) . Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears. *Plant Physiol.* 52, 501-507
- Robb, D. A. (1984). Tyrosinase. In *Copper Proteins and Copper Enzymes*, CRC Press ; Boca Raton, U.S.A.. 2. 207-241.
- ROBERT C., ROUCH C., CADET F.(1997). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 59, 355-60.
- ROS, J.R., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N AND GARCÍA-CÁNOVAS, F.(1994). Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- Salunkhe, DK, (1990). Dietary tannins: consequences and remedies. Boca Raton, Florida: CRC press.Vol 268:4384-4397.
- Sapers ,G.M.(1993) .Browning of foods :control by sulfites,antioxidantsand other means .*Food Technol.*,Vol .47,pp.75-84.
- Sato, M. (1976). Phenolase of spinach roots. *Phytochem.*, Vol 15, 1845-1847.
- SEETHARAM, G.B AND SAVILLE, B.A.(2003). Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436–440.
- SEO, S.-Y., SHARMA, V.K., SHARMA, N.,(2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- SHAN, D., MOUSTY, C., AND COSNIER, S.(2004).Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.
- Siegbahn, P.E.M.(2003). The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* 8: 567-576.
- SON S.M., MOON K.D., LEE C.Y.(2000). Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071–4.
- Soysal, C., et Soylemez, Z. (2004). Properties of wheat bran polyphenol oxidase. *Nahrung/Food*, 48, 5–8.
- Strothkamp, K. G., R. L. Jolley, et al. (1976). "Quarternary structure of mushroom tyrosinase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol 70: 519-524.
- Sugumaran, M. (1998). Unified mechanism for sclerotization of insect cuticle. *Adv. Insect Physiol.* 27, 229-334
- TAN, Y., GUO, X., ZHANG, J., KAN, J.(2010). Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics.* 25: 1681–1687.

- Tate, J. N., Luh, B. S. and York, G. K.(1964). Polyphenol oxidase in Bartlett pears. J. Food Sci. Vol 29: 829-836.
 - thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus*
- Traverso-rueda, S. and Singleton, V. L. (1973). Catecholase activity in grape juice and its implication in wine making.. Vol 24: 103-109.
- Trebst, A et Depka, B.(1995). polyphenol oxydase and photpsynthesis research. Photosynththesis Research 46:41-44.
- TULIN, A. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *heads Food Chemistry* 87:59–67.
- Turner, E.M.(1974). Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*.Transactions of the British Mycological Society. 63: 541-547
- VÁMOS-VIGYÁZ , L.(1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 15: 49-127.
- Van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H., et Wichers, H. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*.,Vol 45(7): 1309–1323.
- VAN LEEUWEN J AND WICHERS H.J.(1999). Trosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res.* 103: 413–418.
- VAROQUAUX.,P (1978).Contribution a l'étude des propriétés de m'o-diphenoloxydase du champignon de paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doct., faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'université de Dijon, 131p.
- WEEMAES C.A.,LUDIKHUYZE L.R, VANDENBROECK I.,HENDRICKS M.E.,P.P.TOBBACK.(1998).Activity ,electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphen oloxidasés from apples, avocados ,grapes, pearsandplums, *Lebensm. Wiss. Technol.*31 :440e449.
- WHITAKER J., LEE C. Y.(1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker,C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.
- Wisseman, K. W. and Lee, C. Y. (1980). Polyphenol oxidase activity during grape maturation and wine production. *Am. J. Enol. Vitic.*,Vol 31: 206-311.
- Wong, I. G., Luh, B. S. and Whitaker, J. R.(1971). Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach. *Plant Physiol.*, Vol 48, 14-23.

- Yahiaoui K., (2000). Caractérisation physicochimique et évaluation du brunissement de la datte «Deglet-Nour» au cours de la maturation. Mémoire de magister en sciences alimentaires. Institut national agronomique d'El-Harrach, Alger.
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M. (2005). Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829
- Yemenicioglu, A & Cemeroglu, B. (2003). Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the Presence of Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51:2371-2379.
- Yemenicioglu, A. (2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- YEMENICIOGOLU, A., ZKAN, M., AND CEMEROGOLU, B. (1997). Heat inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M. (1991). Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson, N.A.M Eskin, eds. (London, UK: Elsevier Applied Science). 217-273.
- Ziyani, E and Pekyardimci, S. (2004). Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.