

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique
Université de Ghardaïa
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : **MOSBAH Khadidja**

MOULAY LAKHDAR Soumia

Thème :

**Effet anti-brunissement enzymatique de différents extraits de
Phoenix dactylifera L., de trois variétés (Deglet Nour, Ghars et
Adala) de la région de Metlili- Ghardaïa**

Soutenu publiquement le : 03/10/2020

Devant le jury :

M. BENBEKHETI Z.	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	Président
M^{me}. BENSANIA W.	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	Promotrice
M^{lle}. KEBILI Z.	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	Examinatrice

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier Dieu Tout-Puissant de nous avoir donné force et patience afin que nous puissions terminer ce travail

Nous voudrais exprimer notre gratitude à Mme BENSAMA Wafa Maitre assistante au département de Biologie à l'université de Ghardaïa nos promotrice de mémoire, pour nous avoir confié ce travail. Nous leur suis très reconnaissante pour la qualité des nombreux conseils, leur attention, et bien évidemment pour les connaissances et leur expérience de la recherche qu'ils ont su nous transmettre, et qui nous en suis sûre nous seront bénéfiques dans les années futures.

Nos remerciements vont aussi à Mr. MOULAY et Mr. MESAITTA, qui les fonctionnaires dans la conduite de l'organisation des laboratoires, merci pour vos efforts en tant que votre valeur.

Ce travail n'aurait pas pu se faire sans l'aide de toutes les personnes qui ont pris de leur temps pour analyser mes échantillons.

Nous adresse notre reconnaissance à tous les membres du jury pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail :

Mr BENBEKHE77 Z. le président,

Mlle. KEB77 Z. pour avoir été l'examinatrice.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

A ma chère mère, A mon cher père,

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs,

A mon cher frère et mes tendres sœurs pour leurs complicités et leurs soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A ma binôme, Khadidja, Pour sa entente et sa sympathie

A mes amies, pour leurs aides et supports dans les moments difficiles

Je dédie cette thèse à tous ceux qui gardent la foi malgré tous les obstacles qui se présentent.



Dédicace

*J'adresse, surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à **ma mère, mon père** et, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.*

*Mes dédicaces sont adressées à mes deux chères soeurs **hadjer** et **kaouter**, ainsi qu'à mes adorables frère : **saleh***

*Mes dédicaces ne seront pas complètes sans cité mes copines : **soumia**, **mailouda**. A tous ceux qui me sont chers*

يعد التحكم في الاسمرار الإنزيمي ضرورياً للحفاظ على الجودة التجارية للمنتجات الغذائية وتلبية احتياجات المستهلك. لذلك، يجب أن يأخذ منتجي التمور في الاعتبار طريقة حفظها بعد الحصاد للحفاظ على نضارتها ومنع تدهورها وتغييرها.

تهدف هذه الدراسة الى البحث عن مثبطات طبيعية المصدر لإنزيمين: البيروكسيداز و البولي فينول اكسيداز المستخرج من تمور *Phoenix dactylifera L.*؛ لثلاثة اصناف (دقلة نور ، غرس ، ادالة) من منطقة متليلي - غرداية ؛ كمحاولة للتقليل من بعض مشاكل الاسمرار الإنزيمي في التمر.

خصصت المرحلة الاولى من هذه الدراسة الى إجراء الاستخلاص الإنزيمي باستخدام طريقتين، بواسطة الماء المقطر و PVP. بعد ذلك مباشرة تم اختبار المستخلصات الخام لنشاطها الإنزيمي ، وذلك باستخدام غاياكول وبيروكاتيكول كركائز لإنزيمين البيروكسيداز و البولي فينول اكسيداز على التوالي.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها فعالية إيجابية حيث ان مستخلصات PVP أظهرت افضل مستويات من النشاط الإنزيمي مقارنة بالمستخلصات المائية. كما أظهرت نتائج تأثير تركيز الركيزة على النشاط الإنزيمي لـ POD و PPO استجابة ميكانيكية كلاسيكية بقيم متغيرة لـ V_{max} و K_m .

يشير تقييم نشاط مضادات البيروكسيداز إلى أن المستخلصات المختلفة التي تمت دراستها قادرة على تثبيط POD ، بينما لم يلاحظ أي تأثير مع صنف دقلة نور. في المقابل، لم تظهر المستخلصات نفسها أي فعالية مثبطة ضد PPO. كما تم الحصول على تثبيط مختلط غير تنافسي وغير تنافسي مع المستخلصات بمعدل تثبيط أقوى.

تم اختبار تثبيط البولي فينول اكسيداز باستخدام حمض الأسكوربيك ، حيث أظهرت النتائج أن حمض الأسكوربيك تسبب في انخفاض معنوي في نشاط PPO مع نسب تثبيط تصل إلى 53.09% لـ المستخلص الإنزيمي TPS-PVP من صنف ادالة.

الكلمات المفتاحية: تمور *Phoenix dactylifera L.* ، الاسمرار الإنزيمي ، البولي فينول اكسيداز ، البيروكسيداز ، التثبيط ، بيروكاتيكول ، غاياكول.

Résumé

Le contrôle du brunissement enzymatique était essentiel pour maintenir la qualité commerciale des produits alimentaires et satisfaire les besoins des consommateurs. De ce fait, la production des dattes à tenir en compte leurs conservations post récolte pour le maintien de leurs fraîcheurs et la prévention de leurs dégradations et altérations.

La présente étude est consacrée pour la recherche des inhibiteurs d'origine naturelle des deux enzymes : peroxydase et polyphénol oxydase extraites à partir des dattes de *Phoenix dactylifera L.*, de trois variétés (Deglet Nour, Ghars et Adala) récoltées de la région de Metlili – Ghardaïa; comme une essai pour aider à atténuer certains des problèmes du brunissement enzymatique des dattes.

Tout d'abord, une extraction enzymatique a été réalisée selon deux méthodes, par l'eau distillée et Tampon-PVP. Ainsi, les extraits bruts ont été testés directement pour leurs activités enzymatiques, en utilisant le gaïacol et pyrocatechol comme des substrats pour les deux enzymes POD et PPO respectivement. Les résultats obtenus ont montré une activité positive et les extraits Tampon-PVP présentent des meilleurs taux d'activité enzymatique par rapport les extraits eau distillée. Egalement, l'influence de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique de la POD et de la PPO fait apparaitre une réponse michaelienne classique avec des valeurs variables de V_{max} et K_m .

L'évaluation de l'activité anti-peroxydase indique que les différents extraits étudiés sont habiles à inhiber la POD, alors qu'aucun effet n'est noté avec la variété Deglet Nour. Par contre, les mêmes extraits n'ont montré aucune efficacité inhibitrice contre la PPO. Ainsi, l'inhibition de la PPO a été testée avec l'acide ascorbique, les résultats montrent que l'acide ascorbique a provoqué une diminution significative de l'activité de la PPO avec des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 53.09 % pour l'extrait enzymatique TPS-PVP de la variété Adala. Une inhibition de type in-compétitif et non compétitif mixte a été obtenue avec les extraits au taux d'inhibition plus puissant.

Mots clés: dattes de *Phoenix dactylifera L.*, brunissement enzymatique, polyphénol oxydase, peroxydase, inhibition, pyrocatechol, gaïacol.

Abstract

Enzymatic browning control was essential to maintaining the commercial quality of food products and meeting consumer needs. Therefore, the production of dates must take into account their post-harvest conservation to maintain their freshness and prevent their degradation and alteration.

This study is consecrated to the research for inhibitors of natural origin of the two enzymes: peroxidase and polyphenol oxidase extracted from the dates of *Phoenix dactylifera L.*, of three varieties (Deglet Nour, Ghars and Adala) harvested from the Metlili – Ghardaïa region; as an assay to help alleviate some of the problems of dates enzymatic browning.

First, enzymatic extraction was carried out using two methods, distilled water and the Tampon -PVP. Thus, the raw extracts were tested directly for their enzymatic activity, using gaïacol and pyrocatechol as substrates for both POD and PPO enzymes respectively. The results obtained showed positive activity and the Tampon PVP extracts showed better rates of enzymatic activity compared to the Water extracts. Also, the influence of substrate concentration on the enzymatic activity of the POD and PPO shows a classic Michaelian response with variable values of V_{max} and K_m .

The evaluation of the anti-peroxidase activity indicates that the different extracts studied are able to inhibit the POD, while no effect is noted with the variety Deglet Nour. However, the same extracts showed no inhibitory efficacy against PPO. Also, the inhibition of PPO was tested with the ascorbic acid, the results show that ascorbic acid caused a significant decrease in the activity of PPO with percentages of inhibition of up to 53.09% for TPS-PVP enzymatic extract of the Adala variety. A mixed non-competitive and an uncompetitive inhibition type was obtained with the extracts at the more potent inhibition rate.

Keywords: *Phoenix dactylifera L.*, enzymatic browning, polyphenol oxidase, peroxidase, inhibition, pyrocatechol, gaïacol.

Liste des Tableaux

Tableau 1: Classification botanique du palmier dattier	16
Tableau 2: Production des principales variétés des dattes par la compagnie agricole (2018/2019)	18
Tableau 3: Quelques caractéristiques des variétés étudiées	19
Tableau 4: Différents tests de criblage phytochimique	23
Tableau 5: Résultats de criblage phytochimique des différents extraits des constituants de Phoenix dactylifera L. pour trois variétés : Deglet Nour, Ghars et Adala.....	32
Tableau 6: Tableau récapitulatif de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des extraits bruts des trois variétés étudiées (Deglet Nour, Ghars et Adala).....	35
Tableau 7: Les paramètres cinétiques de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des dattes de Deglet Nour, Ghars et Adala	38
Tableau 8: Type d'inhibition, K_i , K_m et V_{max} de la POD des dattes Ghars et Adala par les différents extraits inhibiteurs.....	50

Liste des figures

Figure 1: Délimitations administratives de Ghardaïa	13
Figure2: Figuration schématique du palmier dattier	14
Figure 3 : Coupe longitudinale de la datte	16
Figure 4: Les dattes de trois variétés étudiées	19
Figure 5: Les différents organes étudiés du palmier dattier.....	20
Figure 6 : Oxydation du gaïacol en tetragaiacol	26
Figure7 : Rendement d'extraction des extraits des végétaux.....	34
Figure 8: Taux d'inhibition de l'activité peroxydase (extrait ED) par les extraits de différents organes du palmier dattier	40
Figure 9: Taux d'inhibition de l'activité peroxydase (extrait TPS- PVP) par les extraits de différents organes du palmier dattier (%)......	41
Figure 10: Effets des extraits de périanthes, de palmes et de pédicelles du palmier dattier sur l'activité de la PPO.....	43
Figure11: Taux d'inhibition d'activité du polyphénol oxydase (extrait ED et TPS-PVP) par l'acide ascorbique.....	46
Figure12 : Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes (extrait ED et TPS-PVP) par l'extrait de pédicelles de la variété Adala.....	48
Figure 13 : Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes (extrait ED et TPS-PVP) par l'extrait de périanthes de la variété Ghars.....	48
Figure 14 : Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes (extrait ED et TPS-PVP) par l'extrait de palmes de la variété Ghars.....	49

Liste des abréviations

ED	:	Eau Distillée
IC₅₀	:	Concentration Inhibitrice de 50%
Ki	:	Constante d'inhibition
Km	:	Constante Michaélienne
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
POD	:	Peroxydase
PPO	:	Polyphénol Oxydase
PVP	:	Polyvinylpyrrolidone
Qx	:	Quintaux
T	:	Température
TPS	:	Tampon de phosphate de sodium
Vmax	:	Vitesse maximale

Table des matières

ملخص , Résumé, Abstract	I
Liste des tableaux	II
Liste des figures	III
Liste des abréviations	IV
Table des matières	V
Introduction générale	1
Chapitre 01 : Matériel et Méthodes	
I.1. Matériel	12
I.1.1. Réactifs chimiques.....	12
I.1.2. Matériel végétal	12
I.1.2.1. Situation et limite géographique de la région d'étude	12
I.1.2.2. Description botanique et systématique.....	14
I.1.2.3. Principales caractéristiques des dattes et ses propriétés thérapeutiques	16
I.1.2.4. La production des dattes dans la région de Ghardaïa :	18
I.1.2.5. Choix des variétés	18
I.2. Méthodes d'analyse.....	19
I.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons	19
I.2.2. Préparation des extraits des végétaux	21
I.2.2.1. Calcul le rendement d'extraction	22
I.2.3. Criblage phytochimique des extraits des végétaux	22
I.2.4. Préparation des extraits enzymatiques de la PPO et de la POD	24
I.2.4.1. Extraction par TPS -PVP	25
I.2.4.2. Extraction par l'eau distillée	25
I.2.5. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques.....	26
I.2.5.1. Principe de la méthode.....	26

I.2.5.2. Mode opératoire	26
I.2.6. Mesure de l'activité enzymatique.....	27
I.2.6.1. Mesure de l'activité enzymatique de la PPO	27
I.2.6.2. Mesure de l'activité enzymatique de la POD	27
I.2.7. Test d'inhibition	28
I.2.7.1. Mesure de l'activité anti-peroxydase	28
I.2.7.2. Mesure de l'activité anti-polyphénol oxydase	29
I.2.7.3. Détermination des paramètres cinétiques	30
 Chapitre 02 : Résultats et Discussion	
II.1. Rendement d'extraction des extraits des végétaux	30
II.2. Criblage phytochimique des extraits des végétaux.....	31
II.3. Extraction de la PPO et de la POD des dattes de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	33
II.4. Détermination des paramètres cinétiques de la PPO et de la POD.....	37
II.5. Activité anti-enzymatique (Test d'inhibition)	39
II.5.1. Activité anti-peroxydase	40
II.5.1.1. Effet inhibiteur des extraits de différents organes du palmier dattier sur la peroxydase (extraite par l'eau distillée).....	40
II.5.1.2. Effet inhibiteur des extraits de différents organes du palmier dattier sur la peroxydase (extraite par TPS-PVP)	41
II.5.2. Activité anti-polyphénol Oxydase.....	43
II.5.2.1. Effet inhibiteur des extraits de différents organes du palmier dattier sur la PPO	43
II.5.2.2. Effet inhibiteur d'acide ascorbique sur la PPO.....	45
II.6. Etude cinétique de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes	47
Conclusion	53
Références bibliographiques	58
Annexes	76

Introduction

Générale



Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est l'une des cultures fruitières les plus anciennes et les plus importantes dans les régions arides de la péninsule arabique, de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient (Baduel, 1980). Le nom scientifique « *Phoenix dactylifera* » du palmier dattier provient du mot phénicien "Phoenix" qui signifie palmier, dénommé par Linné en 1734 (Chevalier, 1952); alors que "dactylifera" provient du mot grec "dactylos" qui signifie le doigt, illustrant la forme en doigt des dattes. Le palmier dattier était connu dès la deuxième période de l'ère secondaire, à la fin du Jurassique. On en compte douze espèces fossiles en Europe (Eocène, première période de l'ère tertiaire) (Tourer, 1967).

Il permet la subsistance dans un milieu aux ressources limitées. En effet, le palmier dattier est associé aux milieux arides et semi-arides, mais il ne peut s'installer que dans des endroits où les ressources hydriques souterraines compensent les précipitations insuffisantes (Aziz, 2002). Souvent, il existe environ 1200 espèces de palmiers dans les régions tropicales et subtropicales (Decary, 1964). Economiquement et en raison de la demande en croissance rapide, la production des dattes a augmenté au fil des ans (Al-Alawi et al., 2017).

Egalement, il contribue beaucoup à la biodiversité agricole par sa richesse en cultivars des dattes et constitue dans les écosystèmes sahariens, le pivot de l'agriculture oasienne (Chao et Krueger, 2007). Il assure la principale ressource financière vu son importance écologique et socio-économique dans les oasis des régions désertiques (El Hadrami et al., 2005).

Les fruits des palmiers dattiers peuvent être considérés comme un aliment presque idéal qui fournit une large gamme des nutriments essentiels avec des nombreux avantages potentiels pour la santé (Manickavasagan et al., 2012). Généralement, les dattes sont une grande source des glucides et peuvent être aussi une source importante de potassium pour les consommateurs réguliers (Ahmed et al., 1995). La durée d'évolution des fruits est de 100 à 200 jours, selon la précocité des variétés, les conditions écologiques et les conditions de la culture (Peyron, 2000). Généralement, les dattes sont regroupées selon plusieurs critères; la variété, la forme (les dattes pressées, sèches, les dattes destinées à la

transformation industrielle..), la dimension (petites, moyennes, grosses) et la qualité (forme, couleur et texture du fruit) (Chafi et *al.*, 2015).

Selon les données de la FAO entre 2017 et 2018, la production totale mondiale des dattes était de 8526218 tonnes. Elles sont cultivées principalement en Égypte, Arabie Saoudite, Iran, Algérie et Iraq etc. Les quatre principaux producteurs des dattes sont L'Égypte détenant 18,2 pour cent (ou 1552141 tonnes) de parts de production, l'Arabie saoudite 14,8 pour cent (1263525,5 tonnes), l'Iran 14,1 pour cent (1203179 tonnes) et l'Algérie 12,6 pour cent (1076629,5 tonnes) (FAO, 2018).

En Algérie, le palmier dattier occupe une superficie évaluée à 167.000 hectares, localisées au Nord-est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (Ghazi et Sahraoui, 2005). La diversité génétique du phœnicicole algérien permet d'enregistrer plus de 800 variétés, qui sont distribués en plus de 18 millions d'unités (Lounes et Boualem, 2015).

Toutefois, l'exportation des dattes en Algérie est restée relativement petite une fois comparée à la production totale. Indépendamment des problèmes de vente, le niveau bas des exportations est également dû à un manque des structures industrielles, en particulier pour le traitement et conditionnement des dattes (Boubekri, 2010). De plus, les importateurs (européens) des dattes repartissent celles-ci en deux catégories selon des critères très arbitraires: les dattes fines ou exportables dont le type Deglet Nour et les dattes communes (Ghars, Degla-beida, Mech-degla, Tazerait, Tantboucht,...), qui sont en général de faible valeur marchande et très difficiles à conserver (Dowson et Aten, 1963, Louvet et *al.*, 1970).

Au niveau national, la wilaya de Ghardaïa est classée au cinquième rang en terme de production de dattes avec une production totale de 604 000,30 quintaux des dattes. En effet, les variétés les plus abondantes sont Deglet Nour, Ghars, Azerza, Timjuhart et Adala (Aissa et *al.*, 2011). En raison économique, les variétés Deglet Nour, Degla beida, Mech degla et Ghars sont les plus commerciales et les autres n'ont pas de valeur dans le Nord du pays et nullement à l'étranger (Hannachi, 2012).

La variété Deglet Nour est une variété commerciale par excellence et particulièrement appréciée sur les marchés locaux et Européens. Les statistiques actuelles prouvent que l'Algérie est le principal producteur et exportateur de la datte Deglet Nour; dont elle constitue 53,9% de la production nationale (Ben-Abbes, 2018). Ce cultivar est caractérisé par sa consistance demi molle, sa couleur claire et son aspect transparente, ce qui lui offre une valeur marchande élevée (Barreveld, 1993). De même, la variété Ghars est de bonne valeur marchande au niveau national (Hannachi, 2012).

En outre, le fruit de *Phoenix dactylifera* L., la datte, a une valeur nutritionnelle grande, qui a élevé son classement comme l'un des meilleurs fruits au monde. En effet, à côté de sa haute teneur en fibres, glucides, vitamines et minéraux au stade de pleine maturité, il contient également des niveaux importants des métabolites secondaires, y compris les composés phénoliques (Amiour et Hambaba, 2016).

Les composés phénoliques sont des substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, ils sont présents chez tous les végétaux supérieurs et regroupent une très grand groupes des structures chimiques hétérogènes qui variées selon les espèces considérées, les organes, les tissus et les stades physiologiques (une répartition qualitative et quantitative très inégale). Ils sont présents dans la vacuole en formes simples et solubles ainsi que des formes polymérisées plus ou moins solubles ; ou bien en formes insolubles associées à la paroi (Macheix, 1996). Aussi, ils se trouvent dans des organes végétaux différents (fruits, légumes, tubercules...), et dans différentes parties non comestibles d'une plante comprennent la racine, la tige, la feuille, la fleur, et la graine (Macheix et *al.* 1990).

Les composés phénoliques jouent le rôle d'un indicateur de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) et participent à l'orientation de choix de l'homme pour sa consommation (Macheix et *al.* 1990). Généralement, la couleur est le premier attribut perçu par le consommateur et est corrélé à une représentation de la qualité globale du produit (Korbél, 2014). Cependant, ils sont soumis à une oxydation conduisant à un brunissement enzymatique, qui provoque la perte des propriétés organoleptiques de ce fruit et réduit donc son appréciation par le consommateur. Bien brunissant est souhaitable

pendant le développement du fruit, son développement continu après la maturation et la récolte entraîne des dommages (Amiour et Hambaba, 2016).

La sensibilité des dattes à l'altération qui est considéré d'autant plus importante tant que les conditions de stockage et d'entreposage ne sont pas adéquates et sa mauvaise conservation sur les lieux de production entraîne des modifications indésirables de l'apparence, du goût et de la valeur nutritive des fruits. Aussi, elle joue un rôle majeur dans la commercialisation des dattes au niveau local et international (Matallah, 2004 ; Khali et *al.*, 2007).

Généralement, avant la commercialisation, la qualité des produits alimentaires est perdue par la croissance des micro-organismes et la production ultérieure des toxines au cours de transport et au stockage par des réactions chimiques (Rahman et *al.*, 1997; Leung, 2017). De nombreuses réactions chimiques complexes sont impliquées dans les événements susmentionnés, avec la réaction de Maillard, la caramélisation, l'oxydation des lipides et les réactions catalysées par des enzymes endogènes jouant un rôle prédominant (Whitaker, 1985).

Actuellement, il existe des nombreux procédés de transformation dans le monde qui permet d'augmenter significativement la durée de conservation des denrées alimentaires et d'apporter une valeur ajoutée aux produits (Korbel, 2014). Souvent, la préservation de la couleur et de la saveur est obtenue par l'ajout des produits chimiques, tels que des antioxydants, ou l'élimination des composants indésirables. La conservation des aliments implique aussi l'amélioration ou préservation de la texture (Whitaker, 1985).

Avec l'accent croissant mis sur l'acceptation des aliments par le consommateur, la rétention de la couleur originale est devenue une question de grande importance. À cet égard, la nécessité d'empêcher la formation de couleur indésirable pendant le traitement a toujours été un défi pour les technologues alimentaires. Dans des nombreux produits végétaux comestibles, la formation des plusieurs nuances des couleurs noir bleuâtre a été observé, généralement appelé « brunissement ». Ces changements de couleur ou de brunissement sont considérés comme indésirables pour le consommateur, sauf dans certains produits alimentaires, comme les céréales cuites au four, le thé noir et le café

torréfié, où un degré de brunissement spécifique est souhaitable et constitue une partie essentielle du processus de production (Robert, 1991).

Par ailleurs, les réactions de brunissement sont largement rencontrées dans les produits alimentaires et constituées avec d'autres propriétés organoleptiques, la base de l'acceptabilité de l'aliment. Le brunissement aura lieu lorsque le tissu végétal fait suite à l'altération lors des traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage et broyage) ou technologiques (congélation-décongélation, irradiation) ou encore naturels (infection fongique) entraînant des modifications importantes des produits transformés, diminue fortement leurs attractivités organoleptiques (composés phénoliques) et leurs richesses en composés d'intérêts nutritionnels (glucides, lipides, protéine, etc.) (Arslan et Doğan, 2005, Kolcuoğlu et *al.*, 2007). Ce phénomène pourrait être attribué à des réactions enzymatiques ou non enzymatiques (Khali et Selselet-Attou, 2007).

Le brunissement enzymatique est l'une des réactions qui affecte la couleur des aliments et touche plus les tissus qui sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage. Cette réaction est le résultat de la transformation des composés phénoliques en polymères colorés (quinones) (Aljawish, 2013). Ces quinones hautement réactives réagissent ensuite spontanément et non spécifiquement pour polymériser les protéines et autres composants cellulaires produisant la mélanine, des pigments foncés amorphes (Mayer, 1986). Ce phénomène peut provoquer des changements délétères dans l'apparence et les propriétés organoleptiques du produit alimentaire, entraînant une durée de conservation plus courte, une valeur marchande réduite et, dans certains cas, une exclusion complète du produit alimentaire des certains marchés (Cheriot, 2007).

La formation des pigments par brunissement enzymatique est déclenchée par l'enzyme polyphénol oxydase (PPO: oxygène oxydoréductase; EC 1.14.18.10). L'activité de PPO est présente dans les aliments qui sont particulièrement sensibles au brunissement oxydatif, par exemple les pommes de terre, les pommes, les bananes (Whitaker et Lee, 1995). Avant la maturation dans les fruits et légumes non coupés ou non endommagés, les substrats phénoliques naturels sont séparés de l'enzyme PPO par compartimentation et il n'y a pas de brunissement (Queiroz et *al.*, 2008). Les réactions de brunissement catalysées

par le polyphénol oxydase (PPO) sont d'une importance significative dans l'industrie des fruits et légumes (Yoruk et Marshall, 2003).

La PPO est une métalloprotéine contenant du cuivre qui catalyse à la fois l'hydroxylation des monophénols en diphénols appelée activité crésolase et l'oxydation subséquente en o-quinones désignée sous le nom d'activité catécholase. Par la suite, les o-quinone peuvent polymériser spontanément pour former des composés de poids moléculaire élevé ou des pigments bruns (mélanine) (McEvily et *al.*, 1992). Ainsi, cette enzyme est trouvée dans les fruits, les légumes et les animaux et présentant de même structure et des caractéristiques fonctionnelles semblable pour les différentes sources biologiques (Vaughn et Duke, 1984).

De plus, le brunissement post-récolte des fruits et légumes est principalement attribuée à l'oxydation de composés phénoliques par la polyphénol oxydase (PPO) et / ou la peroxydase (POD). La peroxydase (EC.1.11.1.x), est l'une des enzymes qui utilise divers peroxydes comme donneur d'hydrogène pour catalyser un certain nombre des réactions oxydatives. Ainsi, la POD est impliqué dans la dégradation de la couleur et de la saveur des produits horticoles ; dont elle catalyse l'oxydation des composés phénoliques en présence de peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation des produits bruns. De ce fait, le rôle éventuel de PPO en tant que promoteur de l'activité POD est suggérée car le peroxyde d'hydrogène est généré lors de l'oxydation catalysée par PPO des composés phénoliques (Amiour et Hambaba, 2016).

Chez les plantes, en plus de la réaction de brunissement, la POD est impliqué dans le métabolisme de l'auxine, la formation de lignine, la réticulation des composants de la paroi cellulaire, la défense contre les agents pathogènes ou l'allongement cellulaire (Koua et *al.*, 2009).

Par contre, le brunissement non-enzymatique ou bien la réaction de Maillard, c'est l'ensemble des réactions qui se produit lors du chauffage et initiée par l'addition d'une fonction amine sur une fonction carbonyle pour former une multitude des composés aux propriétés aromatiques et colorantes (Jaeger et *al.*, 2010).

Les produits formés au cours du brunissement enzymatique font un problème majeur aux productions des différents produits alimentaires (fruits et légumes), cette réaction est catalysée par les composés phénoliques comme substrat avec des enzymes peroxydases et polyphénol oxydases. Les produits formés par cette réaction est en fonction de la concentration en substrat phénolique oxydé (Belem et *al.*, 2017). Souvent, les deux enzymes catalysent plus d'une réaction et agissent sur un grand nombre de substrats. Ils se présentent sous plusieurs formes dans les espèces (Vámos-Vigyázó et Haard 1981).

Divers mécanismes et techniques pour inhiber les activités indésirables des telles enzymes dans les aliments ont été développés au fil des ans par les scientifiques de l'alimentation afin de maintenir la qualité, prolonger la durée de conservation de produit végétale et commander l'activité de ces enzymes. Généralement, ils peuvent être inhibés par des agents chélatants ou bien des agents réducteurs agissant sur les quinones formées en restituant les o-dihydroxy phénols pour le polyphénol oxydase (Vámos-Vigyázó et Haard, 1981).

L'inactivation thermique est la méthode la plus répandue pour stabiliser les fruits et légumes en raison de sa capacité pour détruire des micro-organismes et pour inactiver certains enzymes (les hydrolases) (Tighilet et Khettal, 2014).

Des autres méthodes traditionnelles sont impliquées pour conserver les produits alimentaires comme le contrôle de l'activité de l'eau impliquant la déshydratation et le salage. Cependant, ces techniques présentent certaines limites, telles que : la modification de la qualité première de certains aliments, et la préférence des consommateurs pour certains aliments crus et «naturels». Ainsi, des nouvelles techniques potentiellement viables telles que la modification chimique des enzymes et d'autres inhibiteurs de protéines d'origine naturelle ont donc été développées pour aider à atténuer certains de ces problèmes (Ashie et *al.*, 1996).

En raison de l'importance économique du brunissement, les PPO et POD ont été largement étudiés en relation avec leurs propriétés physico-chimiques. En revanche, les connaissances sur le rôle de ces enzymes dans la physiologie végétale sont encore limitées

et pourraient augmenter grâce à la caractérisation fonctionnelle des homologues PPO qui sont maintenant identifiés dans plusieurs espèces de cultures (Taranto et *al.*, 2017).

Actuellement, les PPO et POD sont devenues l'objet de toutes les attentions des chercheurs traitant de la conservation des produits alimentaires par l'application de plusieurs procédés de traitements qui réduisent ou bien évitent l'oxydation enzymatique; mais ne répondent pas à la demande actuelle des consommateurs qui ont des tendances croissantes dans la sélection des aliments considérés comme non seulement de valeur nutritive élevée, mais aussi de haute qualité (Vámos-Vigyázó, 1981).

Notre étude sera consacrée par conséquent à la recherche des inhibiteurs d'origine naturelle des deux enzymes : peroxydase et polyphénol oxydase extraites à partir des dattes de *Phoenix dactylifera* L., de trois variétés (Deglet Nour, Ghars et Adala) récoltées de la région de Metlili – Ghardaïa; comme une étude pour aider à atténuer certains des problèmes de brunissement enzymatique des dattes.

Cette étude est présentée selon le plan suivant:

- Une Introduction générale décrivant les principales données relatives à cette étude tels que le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., la production de dattes en Algérie, le brunissement, les enzymes polyphénol oxydase et peroxydase, les composés phénoliques.
- En deuxième lieu, une étude expérimentale comprenant un chapitre de Matériel et Méthodes qui explique l'ensemble des produits chimiques utilisés, les méthodes d'extraction et caractérisation des paramètres enzymatiques de deux enzymes PPO et POD pour chaque variété, l'extraction et le criblage phytochimique des différentes parties du palmier dattier (périanthes, pédicelles et les folioles du palmier) de trois variétés et l'évaluation de leur pouvoir à inhiber l'activité enzymatique de la peroxydase et de la polyphénol oxydase.
- Le deuxième chapitre des résultats et discussion qui a été trouvé à partir du travail réalisé en premier chapitre: le criblage phytochimique, caractérisation des

deux enzymes PPO et POD étudiés et le pouvoir inhibiteur des extraits de différentes parties étudiées (péricarpes; pédoncules et les folioles du palmier) de trois variétés du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., Deglet Nour, Ghars et Adala.

- On terminera cette étude par une Conclusion générale donnant les principaux résultats obtenus durant cette étude ainsi que les perspectives qui feront l'objectifs d'ultérieurs travaux et une liste complète des références bibliographiques pour l'ensemble des parties.

Chapitre 01 :

Matériel et Méthodes



I.1. Matériel

I.1.1. Réactifs chimiques

Tous les produits chimiques et solvants utilisés sont de qualité analytique. Ils ont été fournis par *l'Université de Ghardaïa* (laboratoire pédagogique du département de biologie).

I.1.2. Matériel végétal

Notre travail a porté sur l'étude des paramètres cinétiques de deux enzymes responsables au brunissement enzymatique, la polyphénol oxydase (PPO) et la peroxydase (POD), des dattes de *Phoenix dactylifera* L., de trois variétés : Ghars, Deglet Nour et Adala de la région de Metlili-Ghardaïa. Ainsi, on va étudier le pouvoir inhibiteur des extraits des différents organes du palmier dattier de ces trois variétés (les périanthes, les pédicelles et les palmes) vis-à-vis les deux enzymes PPO et POD.

Les échantillons des dattes, des périanthes, des pédicelles et des palmes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), de trois variétés faisons l'objet de cette étude ont été récoltés de manière aléatoire au cours du mois Octobre et Novembre 2019, de la région de Metlili, située à 40Km du centre de la Wilaya de Ghardaïa.

I.1.2.1. Situation et limite géographique de la région d'étude

La région de Metlili, encore appelée Metlili des Châamba, est une Daïra de la wilaya de Ghardaïa en Algérie située à 40 km au sud de Ghardaïa et à 504 km de la capitale Alger (Figure 01) (Ruffié et al., 1962). Elle est considérée parmi les trois grandes oasis du Sahara algérien (Ouargla, El Golea et Metlili) (Passager, 1958).

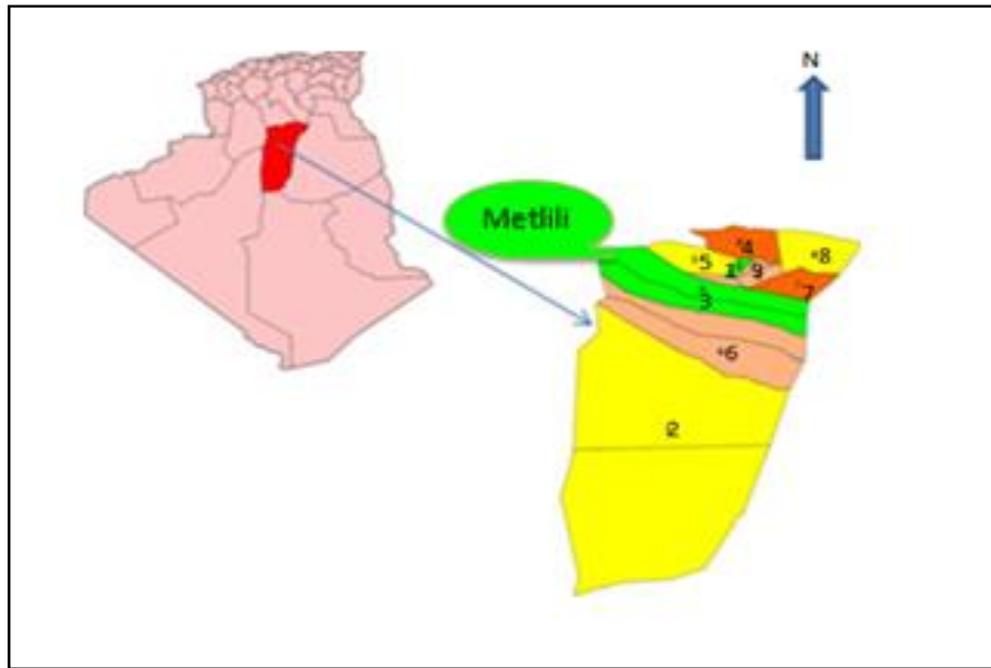


Figure 02: Délimitations administratives de Ghardaïa (Bensemaoune et *al.*, 2018)

1. Ghardaïa • 2. El Meniaa • 3. Metlili • 4. Berriane • 5. Daïa Ben Dahoua • 6. Mansoura • 7. Zelfana • 8. Guerrara • 9. Bounoura

La Daïra de Metlili se situe à 32°21' N., 3°31'E et à une altitude moyenne de 542 mètres, avec une superficie de 7300 Km², limitée par Ghardaïa, Dhaya, Bounoura, El-Ateuf, Zelfana et la Wilaya de Laghouat au Nord, Mansoura au Sud, la Wilaya d'Elbayedh à l'Ouest et la Wilaya de Ouargla à l'Est (Saïd, 2007).

Elle se caractérise par une flore naturelle pauvre, cela peut être à cause de la structure et la nature défavorable du sol. La verdure existante est plutôt créée par l'homme où la culture dominante est la phœniciculture, entre ces palmiers dattiers on trouve les cultures maraîchères (Guemari et *al.*, 2009). Les vents de sable fréquents se produisent en printemps et en automne, dont la fréquence annuelle est de 20 j / an (Ben Semaoune, 2008).

D'après O.N.M (2013), le climat de la région est classé aride, avec une pluviométrie rare et aléatoire, dont la moyenne annuelle atteint rarement 70 mm, la température est caractérisée par une amplitude journalière et saisonnière importante, dont la moyenne annuelle est de l'ordre de 22°C.

I.1.2.2. Description botanique et systématique

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) a été décrit pour la première fois par le botaniste Linné en 1734. Le terme *Phoenix* proviendrait de Phoinix, nom du dattier chez les Grecs de l'Antiquité qui le considéraient comme l'arbre des Phéniciens; *dactylifera* vient du latin *dactylus*, dérivant du grec *dactylos*, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin *fero*, porté en référence aux fruits (Ben-Abbes, 2018; Chevalier, 1952).

Le palmier dattier est une plante monocotylédone, arborescente à croissance apicale dominante. Le diamètre du tronc de l'arbre demeure généralement stable sous les mêmes conditions à partir de l'âge adulte, il contient des faisceaux qui semblent relier directement chaque racine à une palme bien déterminée. Le stipe est couvert régulièrement des cicatrices des anciennes palmes. L'arbre est subdivisé en 3 parties: un système racinaire, un organe végétatif (tronc et de feuilles) et un organe reproductif composé d'inflorescences mâles ou femelles (Figure 02) (Sedra, 2003).

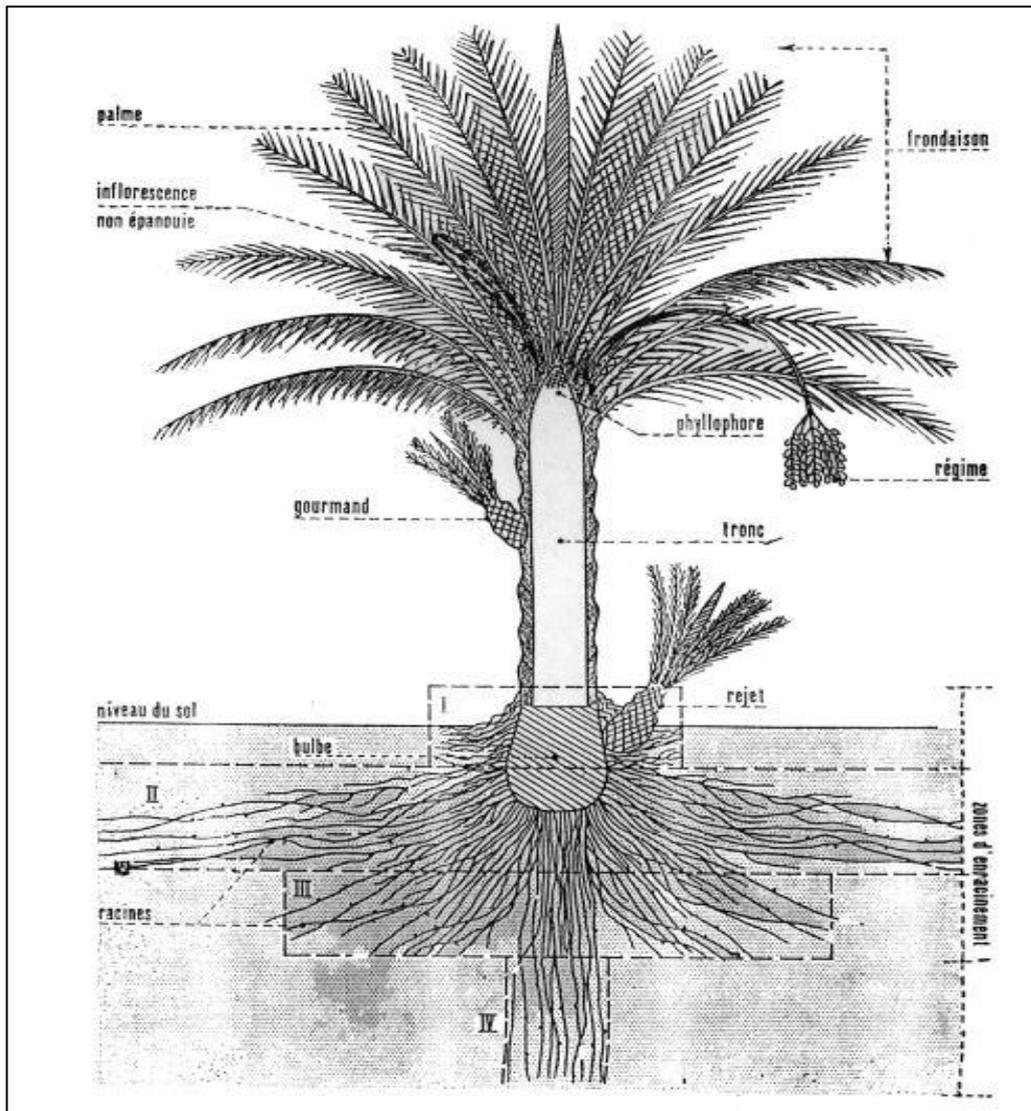


Figure 02: Figuration schématique du palmier dattier (Munier, 1973).

De plus, il s'agit d'une plante pérenne dioïque ($2n=36$) dont l'organe reproductif de palmier dattier est composé d'inflorescences mâles (Dokhar), ou femelles (Nakhla) qui sont portés sur des pieds différents (Tourer, 1967).

Généralement, le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante thermophile, il possède une grande capacité d'adaptation où il peut s'installer à partir d'une température de $+7$ à $+10^{\circ}\text{C}$, mais les températures où leur intensité de végétation est maximale sont supérieures à 30°C . Le palmier dattier se stabilise ensuite et commence à décroître à partir de 38°C - 40°C (Peyron, 2000).

Le genre *Phoenix* appartient à la famille des Arecaceae comprend environ 2500 espèces (El Hadrami et *al.*, 2005). Le palmier dattier est une espèce appartenant au genre *Phoenix* qui comporte au moins douze espèces, parmi eux est *dactylifera* (Nixon, 1950), sa position systématique était donné dans le tableau 01:

Tableau 1: Classification botanique du palmier dattier (Albano, 2002)

Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Monocotylédones
Ordre :	Arecales
Famille :	Arecaceae
Sous- famille :	Coryphoidées
Tribu :	Phoenicées
Genre :	<i>Phoenix</i>
Espèce :	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

I.1.2.3. Principales caractéristiques des dattes et ses propriétés thérapeutiques

Le fruit du dattier, la datte, contient une seule graine, vulgairement appelée noyau est de forme ovale à cylindrique. La datte est constituée d'un mésocarpe charnu, protégé par un fin péricarpe. Le noyau est entouré d'un endocarpe, il est de forme allongée, plus ou moins volumineux, sa consistance est dure et cornée (figure 03) (Munier, 1973). La couleur de la datte est variable selon les cultivars: jaune plus ou moins clair, jaune ambré translucide, brun plus ou moins prononcé, rouge ou noire (Saint-Pierre, 1870).

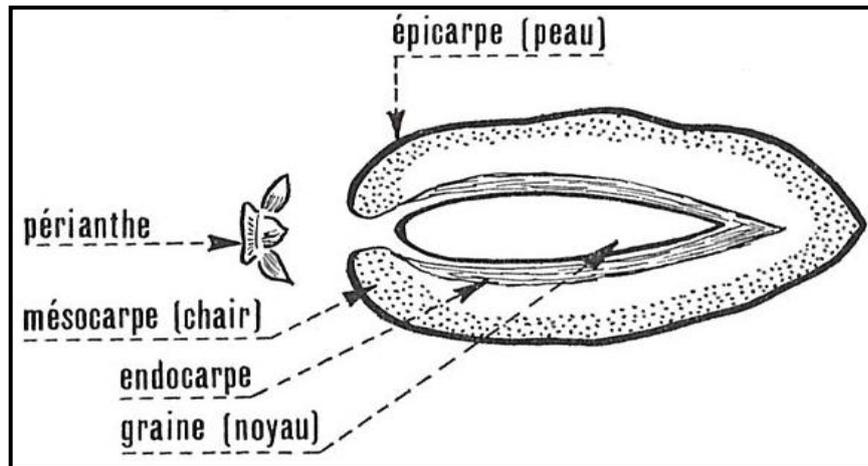


Figure 03 : Coupe longitudinale de la datte (Munier et *al.*, 1973).

La qualité commerciale des différentes classes existant des dattes repose sur leurs consistances (Djerbi, 1994). Celle-ci dépend du stade de maturation du fruit et de la teneur en eau de la pulpe; elle peut être molle, demi-molle ou dure (Saint-Pierre, 1870; Munier, 1973) (Annexe 01).

Les dattes sont considérées parmi les meilleurs aliments énergétiques de l'être humain. La composition à prédominance des sucres, riche en minéraux avec présence de quelques protéines et vitamines offrent à la datte une assimilabilité facile par le corps humain et la qualifient pour un aliment énergétique appréciable (Munier et *al.*, 1973 ; Baliga et *al.*, 2011).

La richesse nutritionnelle des dattes en fait une source précieuse d'énergie et des nutriments. Autant, elles ont été long temps employées par les médecins comme analgésique. Selon Hippocrate, les fruits de palmier dattier permet de combattent certains maladies (maladies pectorales, rhumatismes, bronchite, toux...), et aussi de favoriser une bonne digestion grâce à leurs fibres (Selvam, 2008).

La datte est riche en minéraux qui permettent de réduire la pression artérielle (Bouchardat, 1865). Également, elles sont riches en antioxydants tel que les composés phénoliques et les caroténoïdes qui sont des composés empêchant l'accumulation des graisses dans l'organisme, notamment au niveau des artères. Ainsi, ces antioxydants sont des anti-âge par excellence, dont elles permettent de lutter contre le vieillissement des cellules (Meryem et Aicha, 2013).

I.1.2.4. La production des dattes dans la région de Ghardaïa :

D'après les statistiques de Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, l'Algérie se classe en quatrième position en la production des dattes. Les exportations des dattes n'ont pas dépassé les 3% de la production globale de l'année 2018, qui atteint un peu plus de 11 millions de quintaux pour un nombre de palmiers estimé de 43 303 d'unités. L'Algérie ont un prix à l'exportation le plus cher, car il exporte une bonne qualité des variétés: Deglet Nour (Zaid et Dewet, 1999).

Les régions phœnicicoles se situent généralement au sud de l'atlas saharien et couvrent 17 wilayas. La wilaya de Ghardaïa est classée au cinquième rang national en termes de production des dattes. La production des dattes par variété dans la wilaya de Ghardaïa et en particulière dans la région de Metlili se présente comme suit (tableau 02) :

Tableau 2: Production des principales variétés des dattes par la campagne agricole (2018/2019)

Région	Wilaya de Ghardaïa			Daïra de Metlili			
	Les variétés	Deglet Nour	Ghars et analogues	Awla	Deglet Nour	Ghars et analogues	Awla
Nombre totale (palmier)		563 249	239 699	494 562	65 430	26 635	87 688
Production obtenu (Qx)		240 000	100 000	264 000	31 000	13 858	50 743

I.1.2.5. Choix des variétés

Afin d'étudier le pouvoir inhibiteur de quelques organes du palmier dattier (périanthes, pédicelles et palmes) vis-à-vis deux enzymes responsables au brunissement enzymatique des dattes, la polyphénol oxydase et la peroxydase, nous avons choisi trois variétés du palmier dattier : Ghars, Deglet Nour et Adala comme source d'extrait enzymatique et inhibiteur.

Le choix des variétés est orienté par leurs disponibilités, leurs valeurs de marchande. Ainsi, les variétés des dattes choisies sont les variétés les plus répandues dans les palmeraies de la région de Ghardaïa. Le tableau III représente quelques caractéristiques des variétés étudiées:

Tableau 3: Quelques caractéristiques des variétés étudiées (Belguedj et Tirichine, 2011)

	Deglet Nour	Ghars	Adala ou Tadela
Date de maturité	Novembre	Aout, Septembre	Aout, Septembre
Utilisation de la datte	Fraiche, conservée	Fraiche, conservée	Fraiche, conservée
Mode de la conservation	Froid, sacs	Ecrasé, pillé	Froid, sacs
Couleur de la datte au stade Tamar	Miel	Ambrée	Marron clair
Consistance de la datte au stade utilisé	Demi-Molle	Molle	Molle
Gout	Parfumé, excellente	Parfumé	Parfumé

I.2. Méthodes d'analyse

I.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons

Dans ce travail, nous avons nécessité deux types des échantillons, les dattes comme source d'extrait enzymatique et les différents organes de *Phoenix dactylifera* L. comme source des molécules bioactives à une capacité d'inhiber l'activité enzymatique de la PPO et de la POD. Les dattes ont été sélectionnées d'une manière aléatoire, mais d'une façon

identique en termes de taille, de couleur et de stade de la maturation complète, Tamar. Au cours de laquelle, la couleur de l'épiderme et de la pulpe fonce progressivement, ce qui est attribuée à l'activité croissante des différents enzymes (Hasnaoui et *al.*, 2011). Elles appartiennent à une palmeraie de la région de Metlili – Ghardaïa (figure 04).

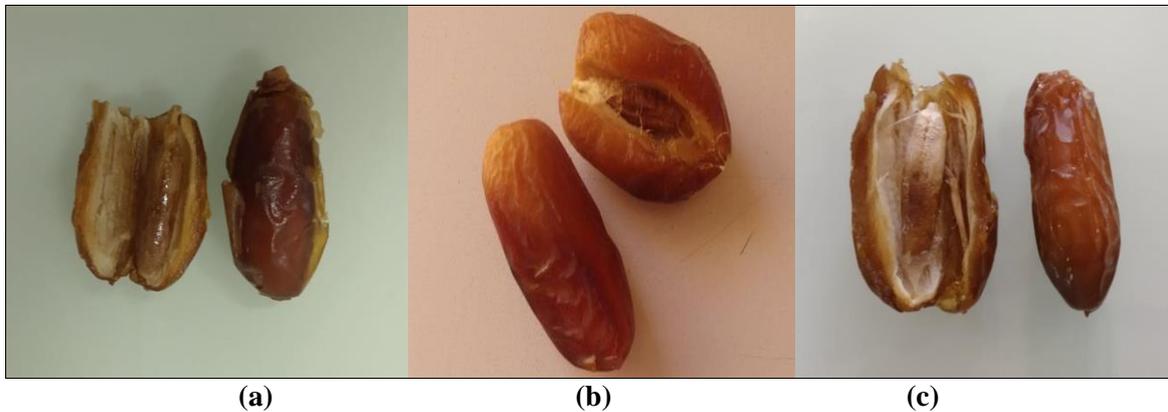


Figure 04: Les dattes de trois variétés étudiées, (a) : Ghars, (b) : Deglet Nour, (c) : Adala
(Mosbah et Moulay Lakhdar, 2020)

Souvent, une suffisante des dattes de trois variétés (Ghars, Deglet Nour et Adala) sont récoltées puis acheminées au laboratoire. Avant de la conservation des dattes à -20°C , nous avons effectué un triage à fin d'éliminer toutes les dattes qui sont immatures, écrasées ou attaquées par les oiseaux et les insectes. Après, on fait un lavage des dattes à l'eau distillée pour éliminer les particules de terre, les poussières et les débris végétaux.

L'autre type des échantillons qui représentés par les différents organes du palmier dattier : périanthes, pédicelles et palmes; ils ont été récoltés au cours du mois Octobre et Novembre 2019 à partir de la même palmeraie de la région de Metlili (figure 05).

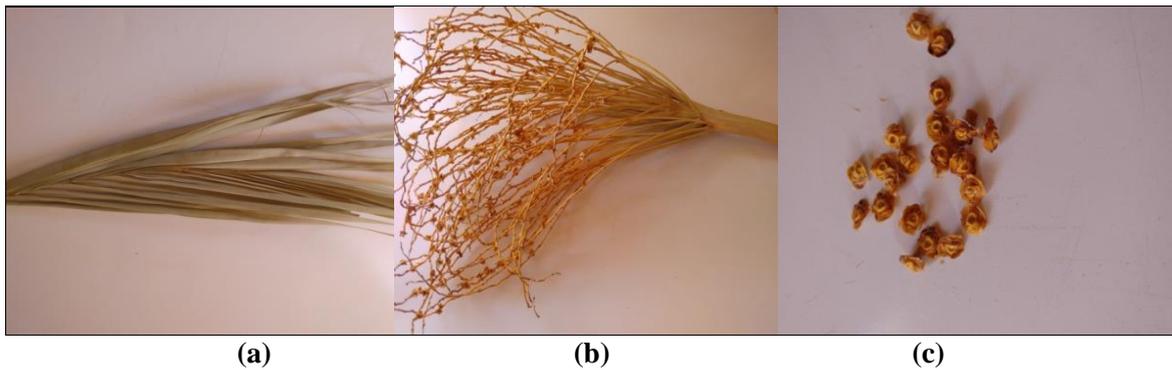


Figure 05: Les différents organes étudiés du palmier dattier, (a) : Palme, (b) : pédicelle, (c) : périanthe) (Mosbah et Moulay Lakhdar, 2020)

Les différents échantillons sont nettoyés et débarrassés de poussières et d'autres impuretés par l'eau distillée, puis mis à l'ombre pour sécher à température ambiante et sous aération continue jusqu'au séchage complet. Ensuite, les trois échantillons complètement séchés ont été soumis à un broyage et à un tamisage. La poudre fine homogène obtenue a été conservée dans des récipients en verre hermétiquement fermés, étiquetés et stockés à l'abri de l'humidité jusqu'à utilisation.

I.2.2. Préparation des extraits des végétaux

Les extraits des végétaux ont été obtenus par la méthode de macération. Elle consiste en une extraction solide-liquide à une température ambiante pour extraire les principes actifs. L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par Falleh et *al.* (2008) avec quelque modification.

Une quantité de 1g de poudre obtenue des périanthes, des pédicelles et des palmes est macérée dans une solution hydro-méthanolique (20 ml) de rapport volume méthanol/eau (8/2) pendant un temps de 48h à température ambiante, et à l'abri de l'air et la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation et l'évaporation de solvant d'extraction.

Le macérât a été filtré sur papier Wattman N°3 et le filtrat obtenu a été évaporé à sec par le rota vapeur de type (HeizbadHei-VAP Heidolph), puis mis dans l'étuve à 40°C pour assurer l'évaporation complète du solvant d'extraction. Les résidus sont repris dans un

volume déterminé de méthanol et les conservés dans un tube en verre hermétiquement fermé à 4°C jusqu'à leur étude.

I.2.2.1. Calcul le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé par rapport à la matière sèche initiale selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \{\text{PES/ PPI}\} \times 100$$

-PES : poids de l'extrait sec (g);

- PPI : poids de la poudre initial (g).

I.2.3. Criblage phytochimique des extraits des végétaux

Les différentes réactions chimiques ont pour objectif de caractériser et rechercher les principaux groupes et familles chimiques des métabolites secondaires existants dans les différents organes étudiés de *Phoenix dactylifera* L. et ceci par une caractérisation qualitative. Les molécules mises en évidence sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, coumarines et quinones libres), les composés terpéniques (terpénoïdes, stéroïdes et saponines), les composés azotés (alcaloïdes) et les composés réducteurs. Le tableau 04 illustre les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés ainsi que les résultats positifs.

Tableau 4: Différents tests de criblage phytochimique

Groupes chimiques	Protocol	Résultats positifs
Tanins	<ul style="list-style-type: none"> • 0.2ml d'extrait • quelque gouttes Fe Cl₃ à (1%) • incubation pendant 15 min à 50°C 	La présence des tanins est indiqué par une coloration verdâtre ou bleu noir (Evans et <i>al.</i> , 2002)
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> • 2 ml d'extrait • 2ml d' HCL • 2ml(NH₄OH) 	Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes. (Ribéred-Gayon, 1968).
Coumarines	<ul style="list-style-type: none"> • 2ml d'extrait • 3ml d NaOH (10%) 	L'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines (Diallo, 2000).
Quinones libres	<ul style="list-style-type: none"> • 5ml d'extrait • gouttes de NaOH (1%) 	Le développent une couleur qui vire au jaune rouge ou violette (Dohou, 2004).
Alcaloïdes	<ul style="list-style-type: none"> • 1ml de chaque extrait • 5ml d'acide chlorhydrique à 1% Mélange /2 (E1, E2) <ul style="list-style-type: none"> • E1 : traité par 5 gouttes de réactif de Mayer • E2 : traité par 5 gouttes de réactif de Wagner 	La formation d'un précipité blanc ou brun révélé la présence des alcaloïdes (Chaouch et Dadamoussa, 2001).
Terpénoïdes	<ul style="list-style-type: none"> • 5 ml d'extrait • 2ml d'anhydride acétique • 1ml d'acide sulfurique 	L'apparition d'une couleur mauve ou violette indique un test positif (Saha et Bandyopadhyay, 2017).
Stéroïdes	<ul style="list-style-type: none"> • 5ml de l'extrait • 5 ml d'anhydride acétique • 0.5ml de H₂SO₄ 	l'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (Harborne, 1998).

Composés réducteurs	<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml de l'extrait • 2ml d'ED distillée • 2ml de la liqueur de Fehling • chauffer au bain marie à 40°C 	un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (EL-Haoud et <i>al.</i> , 2018).
Saponosides : Test de mousse	<ul style="list-style-type: none"> • Introduire 10ml d'extrait dans un tube à essai • Puis agité pendant quelque secondes • Laissez au repos pendant 15min 	Une hauteur persistante de mousse supérieur à 1cm indique la présence des saponines (EL-Haoud et <i>al.</i> , 2018).

I.2.4. Préparation des extraits enzymatiques de la PPO et de la POD

Dans la plupart des fruits et légumes, les enzymes sont présentes sous forme soluble ainsi que sous forme liée aux cellules. Les rapports de ces formes peuvent varier pendant la maturation. De ce fait, l'extraction de la POD et de la PPO est trouvée certaines difficultés telles que la solubilisation des enzymatique liée aux cellules pour l'obtention d'une préparation soluble (Haard, 1973). Aussi, la prévention de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques endogènes et la formation des pigments, dont ces derniers peuvent s'associer avec la protéine enzymatique et la rendre insoluble et inactive (Vamos-Vigyazo, 1981).

La fraction soluble peut être extraite par l'eau distillée ou un tampon de faible force ionique avec un moyen de prévenir l'oxydation et la polymérisation du phénol pendant l'extraction enzymatique. Généralement, l'élimination des substrats des extraits de matériel végétal qui sont souvent les composés phénoliques endogènes peut réduire la formation des pigments indésirables dans l'extrait enzymatique par la fixation à un polymère insoluble. Le piègeur de phénol le plus largement utilisé est le polyvinylpyrrolidone (PVP); en raison de sa capacité fixatrice des composés phénoliques (Mayer et Harel, 1979; Zawistowski et Biliaderis, 1991; Ziyani et Pekyardimci, 2004).

La recherche vers l'extraction d'une grande quantité des enzymes et par un procédé commode est le but de plusieurs travaux. Souvent, plusieurs méthodes d'extraction du polyphénol oxydase et de la peroxydase ont été développées, parmi ces méthodes rencontrées dans la littérature, nous avons choisi deux procédures d'extraction. La première méthode est l'utilisation de l'eau distillée pour extraire la PPO et la POD, par contre la deuxième méthode est basée sur l'utilisation du tampon de phosphate de sodium avec le PVP comme un piègeur de phénol.

I.2.4.1. Extraction par TPS - PVP

L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par Al-Jassabi *et al.* (2013) avec quelque modification. Une quantité de 30g des dattes, dénoyautée et découpée en fragments, a été broyée dans 100ml d'une solution de tampon phosphate de sodium (0.1M, pH 6.8) contenant du polyvinylpyrrolidone PVP (0.5% P/V). Le broyage fait manuellement à l'aide d'un mortier – pilon jusqu'à l'obtention d'un broyat bien homogénéisé. Le broyat subit ensuite une agitation pendant une heure puis filtré par le montage de filtration.

Après, la solution est centrifugée pendant une heure à 4000g et 4°C, à l'aide d'une centrifugeuse Beckman (modèle J2-21). Le surnageant obtenu constitue l'extrait enzymatique brut qui est conservé à - 20°C pour l'analyse.

I.2.4.2. Extraction par l'eau distillée

L'extraction des enzymes est réalisée selon le protocole décrit par Ponce *et al.* (2004) avec quelque modification. Une quantité de 15g des dattes a été broyée et homogénéisée manuellement avec 50 ml d'eau distillée. Une filtration à l'aide de deux couches de la gaze et une centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes à 4°C ont été réalisées. Le surnageant obtenu a été utilisé comme extrait enzymatique. Les extraits enzymatiques ainsi obtenus sont divisés en petites parties dans des tubes Eppendorf et conservés à -20°C.

I.2.5. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

I.2.5.1. Principe de la méthode

L'estimation des quantités des protéines de chaque extrait enzymatique brut est réalisée avant de pouvoir établir le taux des activités enzymatiques selon la méthode de dosage de Bradford (1976). Cette méthode colorimétrique est basée sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après sa liaison avec les acides aminés aromatiques et aussi l'arginine, la lysine et l'histidine présents dans la protéine.

La densité de la couleur bleue se traduit par un changement d'absorbance proportionnel à la concentration des protéines dans l'échantillon et la densité optique de la solution est déterminée à 595 nm. Par interpolation linéaire d'une gamme étalon contenant de l'albumine sérique bovine, les concentrations protéiques ont été calculées.

I.2.5.2. Mode opératoire

Un volume de 0,1 ml d'extrait de protéine est ajouté à 2,5 ml de réactif de bleu de Coomassie. Après 2 min de stabilisation de la couleur, la densité optique du mélange est déterminée à 595 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

En avant du dosage des protéines, un réactif de bleu de Coomassie doit être le préparé comme suit: 10 mg de poudre de bleu de Coomassie est dissous dans 5 ml d'éthanol à 95%, puis on y ajoute 10 ml d'acide phosphorique à 85%. Le mélange résultant est ajusté avec l'eau distillée à un volume final de 100 ml, puis filtré et maintenu à froid (4°C) jusqu'à le dosage.

Les concentrations de protéine sont déterminées par référence à une gamme étalon à base d'albumine sérique bovine (BSA), dont la concentration varie de 0 à 100 µg/ml, préparée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons (Annexe 02).

I.2.6. Mesure de l'activité enzymatique

I.2.6.1. Mesure de l'activité enzymatique de la PPO

Plusieurs méthodes aient été inventées pour déterminer l'activité du polyphénol oxydase. Le suivi direct de la formation des o-quinones à partir des substrats par spectrophotométrie est la méthode la plus utilisée pour mesurer l'activité de la PPO.

Dans cette étude, l'activité enzymatique de la PPO a été déterminée selon le protocole établi par Lee et *al.* (2007), par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 420 nm pour le pyrocatechol comme substrat. L'oxydation du pyrocatechol se traduit par l'apparition de la couleur rouge-brun (Waite, 1976).

Un mélange de 0,95 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 6,8) et 0,05 ml de l'extrait enzymatique a été incubée pendant 5 minutes à 25°C. Ensuite, la réaction est démarrée par l'ajout de 0,5 ml du substrat (pyrocatechol) à 0,2 M. La variation de la densité optique a été suivie à 420 nm. La cuve de référence pour la mesure UV-visible contient la solution de tampon phosphate (0.1M, pH 6,8).

La vitesse initiale (V_0) est calculée à partir la pente de la partie linéaire de la courbe d'absorbance en fonction du temps. Ainsi, les paramètres cinétiques (la constante de Michaelis-Menten (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}) de l'enzyme) ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk.

Dans notre étude, une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme (μ l) qui a provoqué un changement de 0,01 absorbance en 1 min (U) (Daas Amiour et Hambaba, 2016).

I.2.6.2. Mesure de l'activité enzymatique de la POD

L'activité enzymatique de la peroxydase a été mesurée par méthode colorimétrique en utilisant le protocole décrit par Ponce et *al.* (2004), en prenant le gâiacol comme substrat et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme donneur d'hydrogène. L'oxydation

enzymatique du gaïacol génère du tetragaïacol, composé rouge rouille qui absorbe la lumière à environ 470 nm.

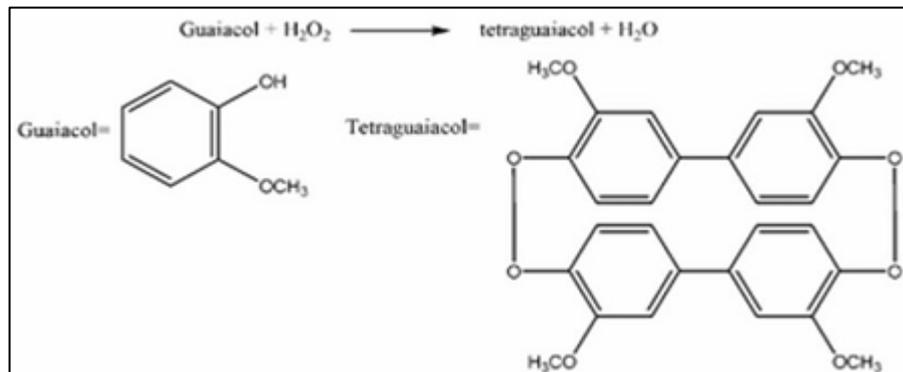


Figure 06 : Oxydation du gaïacol en tetragaïacol (Corban et al., 2011)

La solution du substrat a été préparée en mélangeant 1 ml de gaïacol (1%), 1 ml de peroxyde d'hydrogène (0,3%) et 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 6,8). Dans 2,87 ml de la solution du substrat et 0,03 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 6,8), 0,1 ml d'extrait enzymatique a été ajouté. L'activité enzymatique a été suivie par la mesure de la variation de l'absorbance à 470 nm pendant 5 min à température ambiante.

I.2.7. Test d'inhibition

Les activités anti-enzymatiques ont été évaluées par les enzymes utilisés dans le processus du brunissement enzymatique: la PPO et la POD. A cet effet, différents extraits des organes du palmier dattier (périanthes, pédicelles et palmes) de trois variétés (Ghars, Deglet Nour et Adala) ont été testés pour son pouvoir inhibiteur vis-à-vis deux enzymes responsables au brunissement enzymatique des dattes : PPO et POD; en utilisant le pyrocatechol et le gaïacol comme des substrats respectivement.

I.2.7.1. Mesure de l'activité anti-peroxydase

L'inhibition de la peroxydase par les extraits des différents organes du palmier dattier (périanthes, pédicelles et palmes) a été mesurée suivant le protocole décrit par Ponce et al. (2004). Un milieu réactionnel a été préparé par 2,87 ml de solution de substrat,

0,03 ml de différents extraits à tester et 0,1 ml d'extrait enzymatique. La variation de l'absorbance a été suivie à 470 nm pendant 5 min à température ambiante.

➤ **Expression du taux d'inhibition (%)**

Le taux d'inhibition de la peroxydase exprimé en pourcentage est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Activité initiale}^* - \text{Activité résiduelle}^{**}}{\text{Activité initiale}} \times 100$$

* Activité enzymatique ($\Delta\text{DO} / \text{min}$) mesurée en absence des extraits du palmier dattier

**Activité enzymatique ($\Delta\text{DO} / \text{min}$) mesurée en présence des extraits du palmier dattier

I.2.7.2. Mesure de l'activité anti-polyphénol oxydase

Le protocole établi par Lee et *al.*, (2007) a permis la mesure de l'activité du polyphénol oxydase en présence des extraits de différents organes étudiés du palmier dattier.

0,5 ml d'extrait de périanthes, de pédicelles et de palmes a été mélangé avec 0,05 ml de l'extrait enzymatique et 0,45 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 6,8). Après une incubation pendant 5 minutes à 25°C, un volume de 0,5 ml de pyrocatechol (0,2 M) a été ajouté. La lecture de la densité optique a été déterminée à 420 nm.

Ainsi, nous avons essayé de tester l'effet inhibiteur de l'acide ascorbique sur l'activité de la PPO de nos extraits enzymatiques bruts, comme un agent chimique d'anti-brunissement. Alors, dans les conditions expérimentales précédemment utilisées, en absence et en présence de l'acide ascorbique, l'activité de la PPO a été mesurée dans le milieu réactionnel standard contient le pyrocatechol comme substrat.

➤ Expression du taux d'inhibition (%)

Le taux d'inhibition du polyphénol oxydase exprimé en pourcentage est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Activité initiale*} - \text{Activité résiduelle**}}{\text{Activité initiale}} \times 100$$

* Activité enzymatique ($\Delta\text{DO} / \text{min}$) mesurée en absence des extraits des palmiers dattiers

**Activité enzymatique ($\Delta\text{DO} / \text{min}$) mesurée en présence des extraits des palmiers dattiers

I.2.7.3. Détermination des paramètres cinétiques

Les résultats de test d'inhibition ont encouragé d'accomplir à l'étude de l'activité inhibitrice de nos extraits qui présentant un pourcentage d'inhibition plus grand, plus de 50%, vis-à-vis la PPO et la POD en vue de déterminer le type d'inhibition et les constantes cinétiques en présence de chaque extrait.

Alors, pour chaque extrait, nous avons testé deux dilutions 50% et 100%. Ensuite, pour chaque dilution nous avons étudié la cinétique enzymatique en fonction de cinq concentrations du substrat (soit le pyrocatechol ou le gaïacol pour la PPO et POD respectivement) appartenant toutes au domaine de linéarité de la cinétique de l'enzyme préalablement établie. La procédure expérimentale est la même décrite précédemment pour le test d'inhibition.

La représentation graphique : $1/V = f(1/[S])$, nous informe sur le type d'inhibition et permet de déterminer les paramètres cinétiques en présence et en absence d'inhibiteur. Tandis que, la constante d'inhibition (K_i) a été calculée à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur. K_i représente la constante de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) (Chen et al., 1998).

Chapitre 02:

Résultats et Discussion



II.1. Rendement d'extraction des extraits des végétaux

La méthode d'extraction utilisée dans ce travail est l'extraction par macération à froid. C'est une méthode traditionnelle, a été couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant, avec ou sans agitation à température ambiante (Spigno et al., 2007), ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules bioactives qui sont sensibles aux changements de température pour une durée déterminée (Lecheb, 2010).

Cette macération a été effectuée par un mélange hydro alcoolique, méthanol/eau (8/2 V/V) pour extraire les principes actifs. De ce fait, neuf extraits ont été obtenus à partir d'une simple macération à froid.

Le rendement d'extraction a été déterminé par rapport la masse initiale de la matière végétale étudiée, les résultats ont été exprimés en pourcentage. Les rendements d'extraction des différents organes étudiés du palmier dattier des trois variétés sont reportés dans la figure ci-dessous :

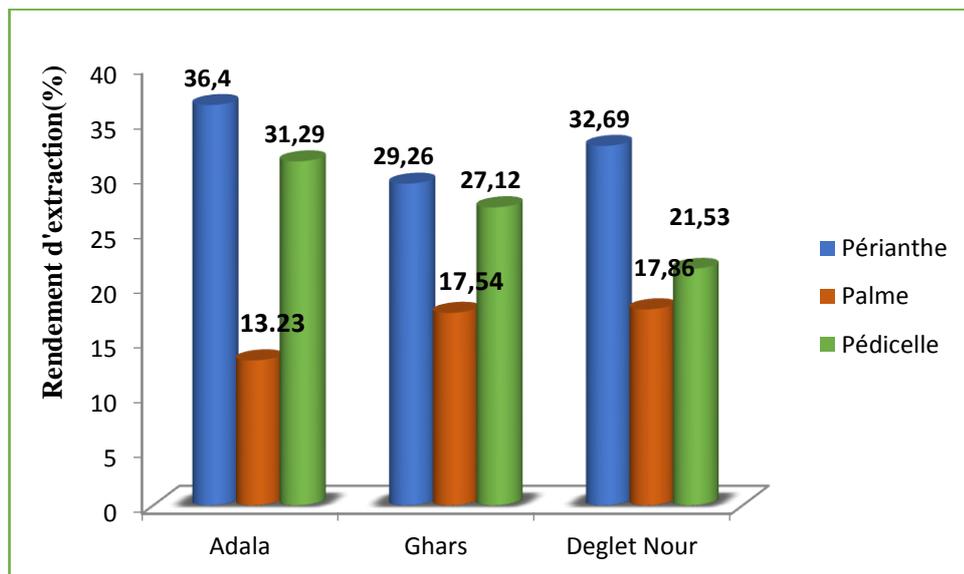


Figure 07: Rendement d'extraction des extraits des végétaux

L'analyse générale des résultats obtenus montre que le rendement d'extraction est varié entre 13.23 % et 36.40 %. Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'extrait des périanthes d'Adala, tandis que le plus faible est celui de l'extrait des palmes de la même variété. On observe ainsi que le rendement d'extraction pour l'organe périanthe est plus grand par rapport à ce des autres organes pour les trois variétés. Ce qui indique que la composition de la solution de substrat présente plus les molécules actives et les molécules les plus solubles des périanthes dans le solvant hydro-méthanolique choisi.

Dans cette étude, la méthode d'extraction utilisée est la macération à froid qui est relativement peu coûteuse, la plus simple et aussi permet de préserver la bio-activité de ses principes actifs et de maximiser le temps de contact du solvant avec le matériel végétal (Khenfer et Medjouel, 2016).

Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction à température ambiante qui permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. Cette méthode est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant et la durée d'extraction (Spigno *et al.*, 2007).

II.2. Criblage phytochimique des extraits des végétaux

Les inhibiteurs de la peroxydase et du polyphénol oxydase présents dans les ressources naturelles ont été étudiés dans plusieurs plantes. Cependant, la recherche sur des groupements chimiques naturels dans les constituants du palmier dattier qui peuvent être responsables à l'inhibition du brunissement enzymatique, induit par la PPO et la POD, reste à établir.

Dans ce but, on a effectué un criblage phytochimique par la mise en place d'un ensemble de réaction de caractérisation de différents composés à savoir : les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes, coumarines et quinones libres), les composés terpéniques (terpénoïdes, stéroïdes et saponines) et les composés azotés (alcaloïdes).

Les tests ont été réalisés sur les extraits de différents constituants du palmier dattier pour les trois variétés étudiées en utilisant des réactifs spécifiques de révélation. Les résultats sont exprimés selon l'intensité du précipité ou de la coloration, qui est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 05.

Tableau 5: Résultats de criblage phytochimique des différents extraits des constituants de *Phoenix dactylifera* L. pour trois variétés : Deglet Nour, Ghars et Adala.

Groupes chimiques	Variétés								
	Adala			Ghars			Deglet Nour		
	périanthe	palme	pédicelle	périanthe	palme	pédicelle	périanthe	palme	pédicelle
Tanins	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+	+	+	+	+	+	+	+	+
coumarines	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Quinones libres	+	++	++	-	-	+	++	++	++
Alcaloïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpénoïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stéroïdes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Composés réducteurs	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Saponines	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Présence importante. ++ : Présence moyenne. + : Présence faible. - : Absence

Les tests phytochimiques sur les extraits des différents constituants du palmier dattier pour les trois variétés étudiées ont révélés la richesse de ces constituants en composés phénoliques (les tanins, les flavonoïdes, les coumarines et les quinones) et les composés

réducteurs. Tandis que, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les saponines, ils n'ont pas été détectés.

Généralement, les composés phénoliques sont tenus comme bons remèdes dans le traitement des maladies respiratoires et contre la toux. Ainsi, ils ont reconnu par ses propriétés antiseptiques, antibactériennes, antifongiques et une forte activité antioxydante (Kris-Etherton et *al.*, 2002). En fait, les effets bénéfiques des fruits sur la santé sont généralement attribués, en plus les vitamines, les minéraux et les fibres, aux flavonoïdes (Chaira et *al.*, 2009). Biglari et *al.* (2008) ont rapporté que la teneur en ces métabolites dans les dattes, variait de 1,62 à 3,07, de 1,65 à 4,71 et était de 81,79 mg en termes d'équivalents catéchine / 100 g de poids sec pour la datte molle, la datte demi-molle et la datte sèche, respectivement.

D'autre part, les tannins sont des composés hautement polymérisés, ils sont responsables au l'astringence des fruits comme les dattes influenceront des facteurs tels que le goût et la valeur nutritionnelle. Souvent, les tanins étaient connus pour leurs capacité de combinaison avec des protéines et formaient un complexe insoluble (Spencer et *al.*, 1988). Au cours de l'extraction des enzymes de banane, Young (1965) suggère que lorsque les cellules sont brisées, les tanins s'adsorbent sur les débris cellulaires de toutes les cellules et se lient aux protéines.

II.3. Extraction de la PPO et POD des dattes de *Phoenix dactylifera* L.

De nos jours, l'intérêt biotechnologique des enzymes va en croissant du fait des avantages économiques et environnementaux que ces dernières offrent comparativement aux catalyseurs chimiques. Parmi ces enzymes d'intérêt figurent les peroxydases (POD) et polyphénol oxydases (PPO) qui sont des enzymes répandues dans le règne végétal et jouent apparemment un rôle important dans les plantes (Baaziz et Saaidi, 1988).

Moins de 1% est la quantité des protéines totales de la PPO présente dans les fruits et les végétaux. Cette caractéristique devrait être prendre en considération avant d'essayer

d'extraire de cette enzyme. Ainsi, la recherche vers l'extraction d'une grande quantité de l'enzyme et par un procédé commode est le but de plusieurs travaux (Gouzi, 2014).

Pendant l'extraction enzymatique, le brunissement de l'extrait brut a été contourné avec succès par l'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits des plantes qui sont responsable à la formation des quinones et des pigments indésirables dans l'extrait enzymatique. La fixation des composés phénoliques à un polymère insoluble est l'un des moyens très efficace de prévention contre l'oxydation des phénols pendant l'extraction des enzymes ; dont le plus souvent utilisés est le polyvinylpyrrolidone (PVP) (Mayer et Harel, 1979; Zawistowski et Biliaderis, 1991 ; Ziyan et Pekyardimci, 2004).

Dans cette étude, deux méthodes d'extraction du polyphénol oxydase et peroxydase ont été utilisées. La première c'est une méthode maîtrisable et facile à mettre en œuvre et qui est basée sur l'eau distillée comme solvant d'extraction. La deuxième méthode est encore largement utilisée et qui nécessite des moyen moins couteuse, elle est basée sur l'utilisation de tampon phosphate avec le PVP comme un piègeur de phénol. Ainsi, les extraits bruts ont été testés directement pour leur activité enzymatique de la PPO et de la POD.

L'activité enzymatique a été mesurée en utilisant le gaïacol et pyrocatechol comme des substrats pour les deux enzymes POD et PPO respectivement. Les résultats de l'activité des deux enzymes dans les deux extraits bruts sont représentés dans le tableau 06.

Tableau 6: Tableau récapitulatif de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des extraits bruts des trois variétés étudiées (Deglet Nour, Ghars et Adala).

Variétés	Extraits	Volume total (ml)	Activité enzymatique totale de POD (U)	Activité enzymatique totale de PPO (U)	Protéine totale (µg)	Activité spécifique de POD (U/µg)	Activité spécifique de PPO (U/µg)
Adala	TPS-PVP	27	18.28	24.62	9.08	2.01	2.71
	ED	15	15.92	16.16	3.64	4.37	4.44
Deglet Nour	TPS-PVP	24	2.82	6.2	3.54	0.79	1.75
	ED	14.5	1.24	4.92	1.79	0.69	2.74
Ghars	TPS-PVP	25	69.9	27.42	7.54	9.27	3.63
	ED	14	33.8	29.16	3.58	9.43	8.13

D'après les résultats du tableau 06, on a constaté que l'activité du polyphénol oxydase et de la peroxydase est positive pour tous les extraits testés. Ainsi, quelque soit la source enzymatique, les extraits TPS-PVP présentent des meilleurs taux d'activité enzymatique par rapport les extraits ED, à l'exception de l'activité enzymatique de PPO variété Ghars, l'extraction par ED est la plus grande.

Pour l'activité peroxydasique, nous avons observé que le taux diffère selon la source enzymatique utilisée ainsi le type de la méthode d'extraction utilisée. Il est apparu que l'extrait enzymatique de la variété Ghars et plus particulièrement l'extrait TPS-PVP présente le taux d'activité peroxydase le plus élevé avec une valeur de 69.9 U. Pourtant, les extraits de la variété Deglet Nour montrent les plus faibles taux d'activité enzymatique avec des valeurs de 2.82 U et 1.24 U pour les extraits TPS-PVP et ED respectivement, ce qui explique la meilleur résistance de cette variété aux conditions de conservation.

D'autre part, la PPO montre une activité un peu supérieure à celle obtenue par rapport la peroxydase pour les variétés Adala et Deglet Nour. Quant aux extraits TPS-PVP et ED de la variété Deglet Nour, ils ont de faible taux d'activité polyphénol oxydasique. Le meilleur taux d'activité (29.16 U) a été enregistré pour l'extrait ED de la variété Ghars.

Généralement, on a noté une faible activité enzymatique pour les deux enzymes, ce qui peut être perdu par l'inactivation de la PPO et POD au cours les étapes de l'extraction de ces enzymes, soit par TPS-PVP ou eau distillé. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures, celles obtenus par Baijal et *al.* (1972) sur l'extraction des enzymes de bananier. Alors que Young (1965) a constaté les mêmes résultats où il a expliqué que l'inactivation des enzymes a effectuée au cours les étapes de broyage et d'homogénéisation pendant l'extraction. Ainsi, elle ne se produite que lorsque le tissu a été dispersé dans un mélangeur ou par une autre procédure rigoureuse qui a cassé la plupart des cellules.

Également, cette inactivation est peut-être en raison de la liaison de l'enzyme par une leucoanthocyanine. Ce comportement a pu être expliqué quand on s'est rendu compte que les phénols se combinent avec les enzymes de manière réversible par liaison hydrogène, et irréversiblement par oxydation suivie des condensations covalentes (Loomis et Battaile, 1966). Pifferi et *al.* (1974) ont découvert que les composés contenant un cycle benzénique présentaient une plus grande efficacité que les composés aliphatiques, et que la majorité des inhibiteurs puissants étaient des composés aromatiques ou sulfhydriles.

En outre, la quantité en protéines totales dans les deux extraits d'enzyme est très faible, d'ordre microgrammes puisque les dattes sont considérées parmi les meilleurs aliments énergétiques de l'être humain. En effet, les pulpes des dattes contiennent 70% des sucres facilement digestibles, principalement du glucose, le saccharose et le fructose; fibres alimentaires et contiennent moins de protéines et de graisse (Munier, 1973).

Egalement, il est clair la richesse de l'extrait TPS-PVP en protéines par contre l'extrait ED, ce qui implique la grande activité enzymatique détectée dans ces extraits. Les plus grandes difficultés à dominer lors de l'extraction de PPO et POD sont la prévention de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques et la formation des pigments pendant le broyage de la matière végétale. Par conséquent, les pigments peuvent s'associer avec la protéine enzymatique et la rendre insoluble et inactive (Vèmos-Vigyázó, 1981). L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits par le PVP a permis d'obtenir d'une préparation soluble ou bien d'assurer la solubilité des protéines

enzymatiques (Ziyan et Pekyardimci, 2004). Alors, cela peut expliquer la différence en quantité des protéines totales entre les deux extraits.

D'autre part, l'activité spécifique pour la plus part des extrait enzymatique d'ED est plus grande par rapport au celle de TPS-PVP. Puisque, l'activité enzymatique spécifique est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique volumique et la concentration totale en protéine de l'extrait enzymatique. Ainsi, la grande quantité des protéines totales dans les extraits TPS-PVP est grande par rapport aux extraits ED qui a permis d'expliquer la diminution du rapport entre l'activité enzymatique et la concentration totale en protéine. Aussi, ces résultats montrent la diversité de l'extrait TPS-PVP par la présence de plusieurs types des enzymes autre du polyphénol oxydase et la peroxydase.

II.4. Détermination des paramètres cinétiques de la PPO et de la POD

Une activité enzymatique 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, la diminution de la concentration du substrat et la polymérisation du produits (Vámos-Vigyázó et Haard, 1981). L'activité de la PPO et POD peuvent s'appliquer à une grande variété des substrats (Whitaker et Lee, 1995).

Dans ce travail, on s'intéresse au dosage du produit libéré lors de l'oxydation du pyrocatechol ou bien le gaïacol, par PPO et POD des dattes respectivement. Les paramètres physico-chimiques sont maintenus constants (tampon phosphate (0.1 M, pH 6.8) et température 25°C). Egalement, une gamme de concentration de pyrocatechol et gaïacol a été préparée.

L'évolution de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de chaque substrat est suivie pour la POD et PPO des trois variétés Adala, Ghars et Deglet Nour. Nos résultats expérimentaux ont été exprimés par les paramètres cinétiques de l'enzyme V_{max} et K_m qu'ont été déterminés à l'aide des représentations de Linweaver –Burk (Annexe 03).

La constante de Michaelis, ou la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (K_m), permet de déterminer l'affinité et la force de liaison de l'enzyme pour son substrat. Une valeur élevée de K_m signifie que l'enzyme a une faible affinité pour son substrat. De même, la valeur de V_{max} est un autre paramètre permettant d'avoir une idée sur la vitesse maximale de la réaction. Le tableau suivant (07) résume les valeurs obtenues de ces paramètres.

Tableau 7: Les paramètres cinétiques de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des dattes de Deglet Nour, Ghars et Adala

Variétés	Type d'extrait	POD		PPO	
		V_{max} (U)	K_m (M)	V_{max} (U)	K_m (M)
Deglet Nour	ED	24.87	0.08	16.53	0.28
	TPS-PVP	18.28	0.03	19.20	0.22
Ghars	ED	56.81	0.18	21.32	0.13
	TPS-PVP	26.24	0.06	54.64	0.35
Adala	ED	19.34	0.04	15.67	0.14
	TPS-PVP	19.23	0.07	37.31	0.45

D'après les résultats du tableau 07, les extraits d'ED ou de TPS-PVP des différentes variétés montrent des valeurs variables de V_{max} et K_m de la PPO et POD. Généralement, cela peut être interprété par le type de substrat, le tampon, la température, la source d'enzyme, la méthode d'extraction utilisée (Arslan *et al.*, 1997; Dogan et Dogan, 2004).

Les valeurs de la constante d'affinité K_m de la PPO rapportées dans la littérature sont comme suit : Dattes Barhee et Zahdi (3.5 et 8.75mM) (Sachde *et al.*, 1988), le mangue (3.49 mM) (Prabha et Patwardhan, 1982), le coing (4.54mM) (Yağar et Sağiroğlu, 2002) pour le catéchol en tant que substrat expérimental.

II.5. Activité anti-enzymatique (Test d'inhibition)

Le contrôle de l'activité de la PPO et de la POD est important pour la prévention du brunissement des végétaux et fruits. En effet, des nombreux paramètres influencent le brunissement enzymatique dans les fruits et légumes. Il s'agit de la nature et la concentration en composés phénoliques, la concentration en enzymes, le pH, la température et l'oxygène (Jolivet et *al.*, 1998 ; Qiu et *al.*, 2009).

Le brunissement des fruits et des légumes par les enzymes PPO et POD peut être empêché par l'inactivation thermique de ces enzymes, par l'élimination de leurs substrats nécessaires pour la réaction, par l'abaissement du pH au-dessous du pH optimum ou par l'addition des composés qui inhibent la PPO ou la POD (Vamos-Vigyazo, 1981 ; Whitaker et Lee, 1995).

Des centaines des composés ont été examinés comme des inhibiteurs chimiques du brunissement enzymatique, parmi lesquels : les agents de chélation pour le cuivre, les inhibiteurs non-compétitifs ou compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique, des agents réducteurs (les sulfites; l'acide ascorbique) (Zawistowski et Biliaderis, 1991), les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques et les acides carboxyliques (Mayer et Harel, 1979 ; Nicolas et *al.*, 1994). A condition que ces composés ne doivent pas être toxiques, et ne doivent pas modifier le goût, la saveur ou la texture du produit (Vamos-Vigyazo, 1981).

De ce fait, une série des études a été menée pour chercher des inhibiteurs naturels qui diminuent ou inhibent la vitesse de la réaction du brunissement. Pour cet objectif, différents extraits des organes du palmier dattier (périanthes, pédicelles et palmes) de trois variétés (Ghars, Deglet Nour et Adala) ont été testés pour son pouvoir inhibiteur vis-à-vis deux enzymes responsables au brunissement enzymatique des dattes : PPO et POD; en utilisant le pyrocatechol et le gaïacol comme des substrats respectivement.

II.5.1. Activité anti-peroxydase

II.5.1.1. Effet inhibiteur des extraits de différents organes du palmier dattier sur la peroxydase (extraite par l'eau distillée)

Afin d'analyser les effets anti-peroxydase de nos extraits du palmier dattier, nous avons procédé à l'évaluation de l'efficacité des extraits des périanthes, des pédicelles et des palmes des trois variétés étudiées (Ghars, Deglet Nour et Adala) sur l'activité peroxydasique de l'extrait ED des dattes de même variétés étudiées. Les résultats sont présentés dans la figure 08.

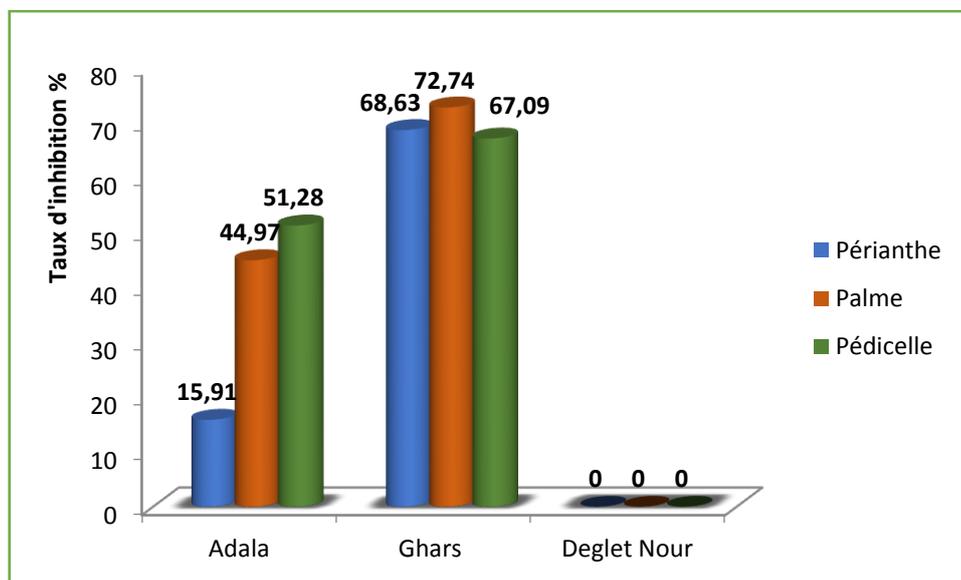


Figure 08: Taux d'inhibition de l'activité peroxydase (extrait ED) par les extraits de différents organes du palmier dattier

D'après les résultats de la figure 08, nous avons observé que le taux d'inhibition de l'activité peroxydasique diffère selon la source enzymatique utilisée et les extraits des différents constituants du palmier dattier à tester. Il est apparu ainsi que l'extrait des palmes présente le meilleur taux d'inhibition vis-à-vis l'activité enzymatique de la peroxydase des dattes pour la variété Ghars par rapport les autres extraits testés, avec un pourcentage de 72,74 %.

Pour la variété Adala, l'extrait de pédicelle a enregistré un taux d'inhibition le plus élevé (51,28 %) contre la peroxydase. Tandis que, l'extrait des périanthes montre l'activité inhibitrice la plus faible, avec un pourcentage de 15,91 % pour la même variété. Par contre, les extraits des différents constituants de Deglet Nour n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique de la peroxydase.

II.5.1.2. Effet inhibiteur des extraits de différents organes du palmier dattier sur la peroxydase (extraite par TPS-PVP)

Puisque l'extrait enzymatique des dattes est préparé par deux méthodes, extrait ED et TPS-PVP, alors on va ainsi examiner l'efficacité des extraits des périanthes, des pédicelles et des palmes de trois variétés étudiées (Ghars, Deglet Nour et Adala) sur l'activité peroxydasique de l'extrait TPS-PVP des dattes. Les résultats sont présentés dans la figure 09.

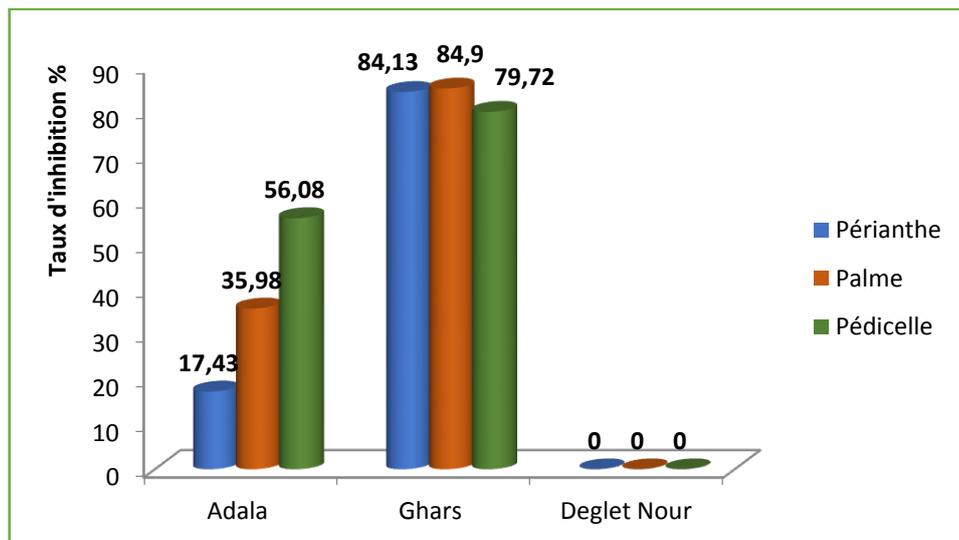


Figure 09: Taux d'inhibition de l'activité peroxydase (extrait TPS-PVP) par les extraits de différents organes du palmier dattier

D'après les résultats obtenus de l'étude d'inhibition de la peroxydase (extrait TPS-PVP), on observe que la plus part des extraits des différents constituants du palmier dattier

des variétés étudiées exercent des activités inhibitrices sur l'activité des peroxydases extraites des dattes des mêmes variétés (figure 09).

Les taux d'inhibition observés varient selon les constituants du palmier dattier testés et la variété des dattes étudiée. À l'exception des extraits des périanthes, des palmes et des pédicelles de la variété Deglet Nour, ils n'ont pas d'effet sur l'activité de la peroxydase des dattes de la même variété.

Ainsi, l'étude d'inhibition de la peroxydase extraite par le TPS-PVP a montré une capacité très élevée des extraits des périanthes, des palmes et des pédicelles de la variété Ghars à inhiber la peroxydase avec des taux d'inhibition plus de 79 %. De plus, l'activité de la peroxydase pour la variété Adala est inhibée par les extraits des différents constituants du palmier dattier avec des taux d'inhibition variant de 17,43 % (périanthes) à 56,08% (pédicelles).

À signaler que le meilleur taux d'inhibition (84,13 %) est obtenu par l'extrait de palmes sur la peroxydase de la variété Ghars, alors que le taux le plus faible est obtenu par l'extrait des périanthes (17,43 %) sur la peroxydase de la variété Adala.

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet inhibiteur des extraits des différents constituants du palmier dattier sur l'activité peroxydase extraite par l'eau distillé et le polyvinylpyrrolidone ont montré que l'efficacité inhibitrice de ces extraits vis-à-vis la peroxydase extraite par le TPS-PVP est meilleure que celle de l'extrait enzymatique d'ED.

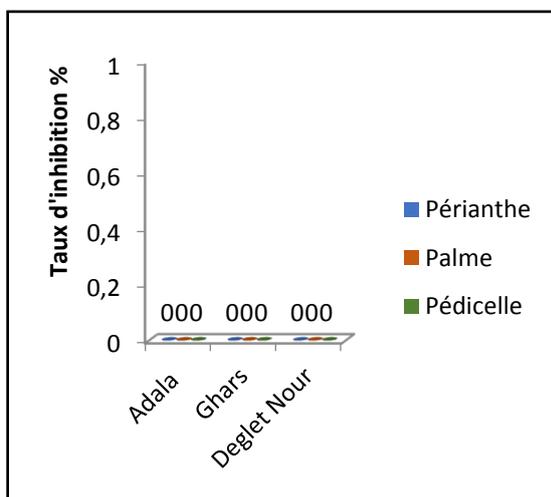
Les différents potentiels d'inhibition de nos extraits du palmier dattier peuvent être attribués à la présence et à la variabilité en substances bioactives en termes de nature chimique et de quantité. En effet, le criblage phytochimique des différents organes étudiés du palmier dattier montre la différence en composition chimique entre ces organes et peut être en son teneur. Ainsi, la variation génétique entre les trois variétés peut être attribuée à la synthèse des substances différentes.

D'autre part, que ce soit la méthode d'extraction (par ED ou TPS-PVP), l'efficacité d'inhibition dépend aussi de la source de l'extrait enzymatique utilisée. Cette variabilité d'action peut s'expliquer par l'existence de plusieurs formes d'enzymes (iso-enzymes) dans un même matériel végétal et au niveau d'un même tissu, l'affinité de ces enzymes au substrat, ainsi que par la différence de leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques. La variation des paramètres tels que le pH et la température du milieu réactionnel peut influencer également sur la spécificité de la POD d'une manière non négligeable (Lee et Klein, 1989; Shannon et *al.*, 1996).

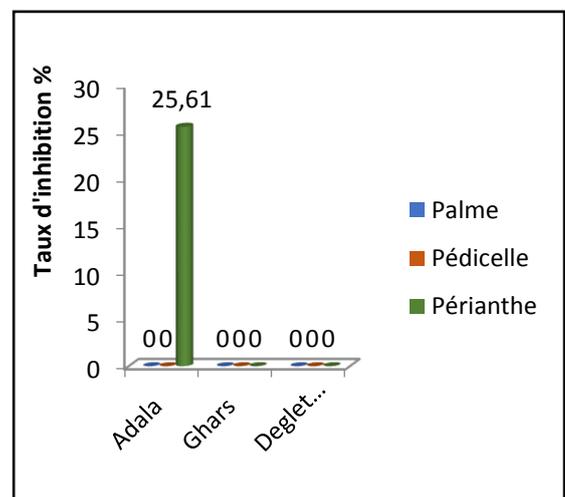
II.5.2. Activité anti-polyphénol Oxydase

II.5.2.1. Effets des extraits de différents organes du palmier dattier sur la PPO

L'activité enzymatique du polyphénol oxydase (extraite par ED ou TPS-PVP) a été mesurée par spectrophotométrie en utilisant le pyrocatechol comme substrat, en présence et en absence des extraits des différents constituants du palmier dattier (des périanthes, des pédicelles et des palmes) des trois variétés étudiées (Ghars, Deglet Nour et Adala). Les résultats du test d'inhibition de la PPO sont résumés dans la figure 10.



Extrait ED de la PPO



Extrait TPS-PVP de la PPO

Figure 10: Effets des extraits de périanthes, de palmes et de pédicelles du palmier dattier sur l'activité de la PPO

Les résultats obtenus du test d'inhibition de la PPO, extraite par l'ED ou le TPS-PVP, par les extraits des palmes, des pédicelles et des périanthes de trois variétés n'ont montré aucune efficacité inhibitrice. A l'exception, l'extrait des périanthes de la variété Adala qui a présenté un taux d'inhibition très faible (25.61 %).

Généralement, les différents extraits testés ont montré une efficacité inhibitrice exercée seulement sur la peroxydase. Les résultats de Richard et Gaillard (1997) suggèrent un rôle synergique à la fois pour la peroxydase et la polyphénol oxydase dans la formation des polymères brun pendant le vieillissement de la poire (indépendant ou dépendant de H₂O₂).

Egalement, Sottomayor et *al.*, (1998) ont signalé que les peroxydases végétales présentent une grande capacité à oxyder les composés phénoliques en composés hautement polymériques. Selon les travaux de López-Serrano et Ros Barceló, (2002), les produits d'oxydation des flavonoïdes (catéchine) donnent des mélanges des produits hétérogènes de différents degrés de polymérisation qui peuvent agir comme des inhibiteurs pour l'enzyme elle-même.

Au contraire des résultats que nous avons obtenus pour les extraits du palmier dattier, des travaux ont rapportés que les extraits d'autres plantes ont une meilleure efficacité inhibitrice de la PPO. L'étude réalisée par Kim et *al.* (2005) montre que les extraits d'oignon diminuent le taux du brunissement de la poire avec une efficacité allant jusqu'à 54,1 % par l'inhibition de l'activité de la PPO. Ces résultats sont confortés par les travaux de Lee, (2007) qui a montré que la PPO de taro est inhibée par les extraits d'oignon avec des taux de 54,8 % jusqu'à 68,5 %. Des autres études ont également rapporté des effets similaires lors de l'utilisation d'extraits naturels sur l'activité des PPO de plantes (Espín et Wichers, 1999; Jang et *al.*, 2002).

A la fin, la différence de taux d'inhibition d'un extrait à un autre et d'une source enzymatique à une autre, peut s'expliquer par la présence des plusieurs formes d'enzyme (iso-enzymes) dans l'extrait enzymatique qui présentent des spécificités et des propriétés

structurales et physicochimiques variables et/ou par la nature des molécules actives des extraits inhibiteurs d'origine végétale (Schmitz et *al.*, 2008).

II.5.2.2. Effet inhibiteur d'acide ascorbique sur la PPO

L'inactivation des enzymes par traitement thermique est la méthode la plus efficace pour contrôler le brunissement enzymatique des fruits et des légumes, mais il ne s'agit pas d'une solution de rechange pratique pour le traitement des aliments frais. Comme le brunissement est une réaction oxydative, il peut être retardé par l'élimination de l'oxygène de la surface coupée du fruit ou du légume, bien que le brunissement se produise rapidement lorsque l'oxygène est réintroduit (Luh et al., 1986).

Une approche plus commune pour la prévention du brunissement des aliments a été l'utilisation d'agent anti brunissement. Le rôle majeur des agents réducteurs ou antioxydants dans la prévention du brunissement est leur capacité à réduire chimiquement les o-quinones formées enzymatiquement ou endogènes en diphénols incolores, ou à réagir de manière irréversible avec les o-quinones pour former des produits incolores stables analogues à l'action de sulfites (McEvily et al., 1992).

Lors de l'extraction des PPO, les conditions doivent permettre une solubilisation complète de la fraction enzymatique insolubles (liée aux membranes) tout en prévenant l'oxydation des polyphénols endogènes par la fraction enzymatique (De Rigal, 2001).

Les quinones formés par l'oxydation des polyphénols présent dans l'extrait enzymatique, serait susceptible d'induire une inactivation de l'enzyme. Pour cela, les milieux d'extraction sont habituellement ajoutés des composés réducteurs comme l'acide ascorbique, la cystéine ou d'adsorbants des phénols comme le polyvinylpyrrolidone (PVP) (Nicolas et al., 1994).

L'activité de PPO de dattes Deglet Nour, Ghars et Adala a été mesurée en utilisant l'acide ascorbique, à une concentration 0.2M avec le pyrocatechol comme substrat.

Les résultats du figure (11) montrent que l'acide ascorbique a provoqué une diminution significative de l'activité de la PPO avec des pourcentages d'inhibition allant de 6.4 % jusqu'à 53.09 % pour l'extrait de Adala eau et Adala TPS-PVP respectivement.

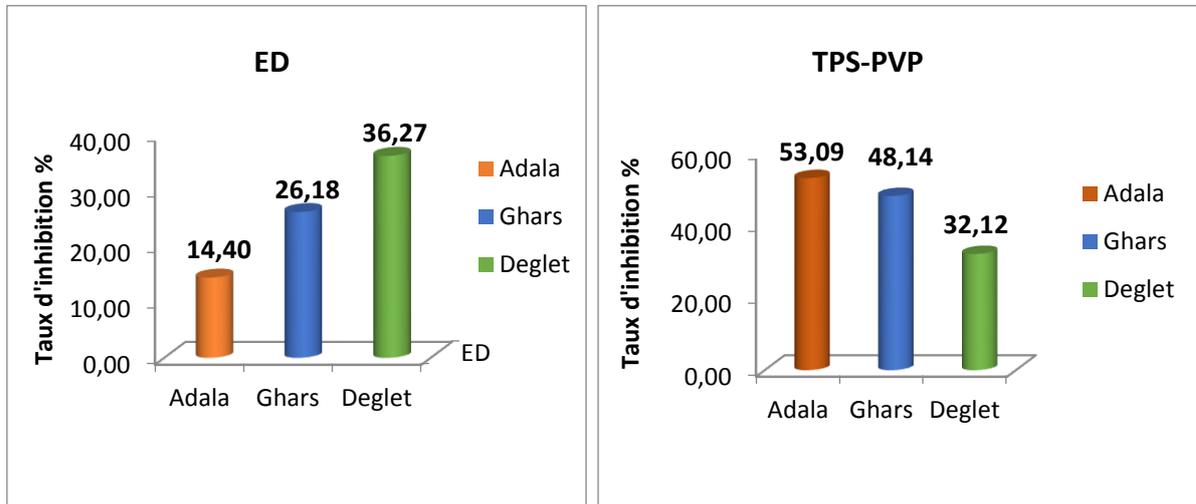


Figure 11 : Taux d'inhibition d'activité du polyphénol oxydase (extrait ED et TPS-PVP) par l'acide ascorbique

Les résultats d'effet inhibiteur d'acides ascorbique sur la PPO montrent que ce dernier a provoqué une diminution significative de l'activité de la PPO avec des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 53.09 % vis-à-vis l'extrait enzymatique TPS-PVP de la variété Adala.

L'effet inhibiteur de l'acide ascorbique sur l'activité de la PPO a également été confirmé dans l'étude de Amieur et Hambaba (2016) qui ont constaté que l'inhibiteur le plus efficace des deux activités (de PPO et POD) est l'acide ascorbique avec une activité résiduelle PPO de 4,79% pour Deglet Nour, 7,73% pour Ghars et une activité résiduelle POD de 0% dans les deux variétés. Ainsi, l'étude de Li-Qin et al. (2009) a marqué que l'indice de brunissement des tranches de pêche traitées à 0,2% d'acide ascorbique était < 2,5 après 10 jours de stockage.

Dans d'autres recherches sur les fruits et légumes, la capacité inhibitrice d'acide ascorbique a été attribuée par que l'acide ascorbique est un réducteur qui agit en réduisant les quinones générées par PPO en phénols (Amiour and Hambaba, 2016). Ainsi, il a empêché la formation de polymères bruns sans agir directement sur l'enzyme (Bayindirli, 2010).

II.6. Etude cinétique de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes

D'après les résultats ainsi obtenus de l'étude d'effet inhibiteur des extraits des différents constituants du palmier dattier contre les deux enzymes responsables au brunissement enzymatique des dattes pour les trois variétés : la PPO et la POD, il s'est avéré que nos extraits n'ont pas aucun effet sur l'activité enzymatique de la PPO. Au contraire, certains extraits ont provoqué une diminution significative de l'activité de la POD avec un pourcentage atteint de 80%.

Les résultats du test d'inhibition ont encouragé d'accomplir à l'étude de l'activité inhibitrice de nos extraits qui présentant un pourcentage d'inhibition plus grand, plus de 50%, vis-à-vis la POD en vue de déterminer le type d'inhibition et les constantes cinétiques en présence de chaque extrait. De ce fait, le graphique de l'inverse de la vitesse initiale d'oxydation du gaïacol à diverses concentrations d'inhibiteur ($1/V_{max}$) en fonction de l'inverse de la concentration de substrat ($1/S$) a été établi (figures 12, 13 et 14).

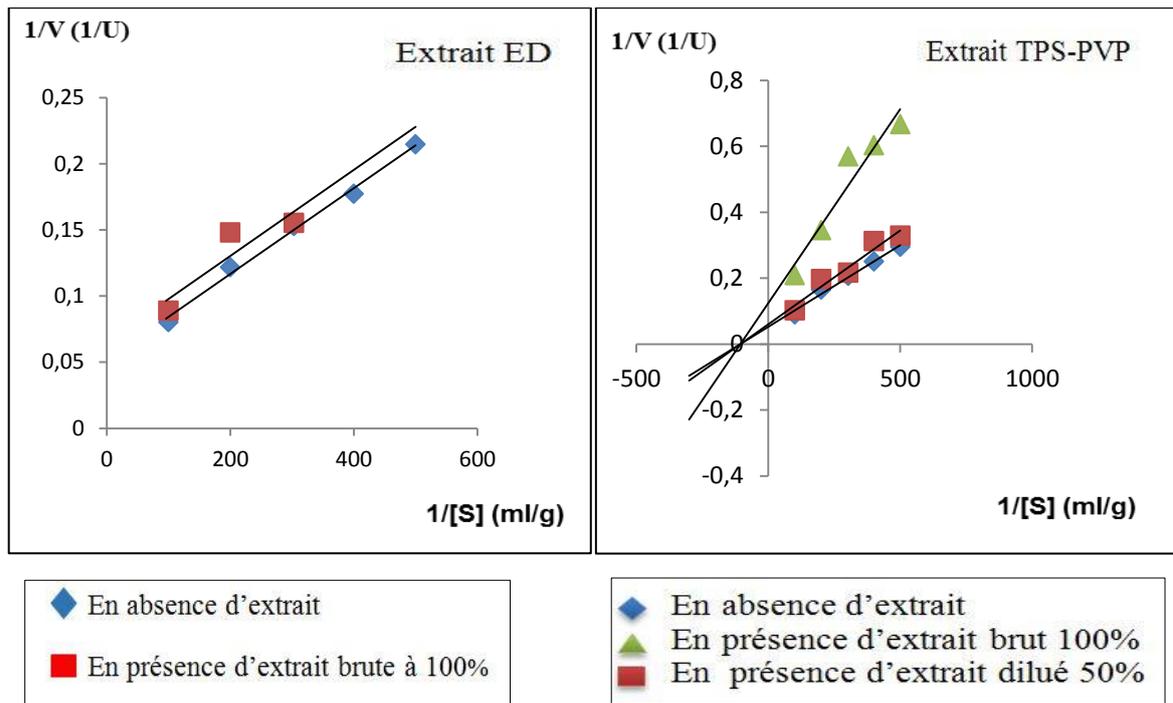


Figure 12 : Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes (extrait ED et TPS-PVP) par l'extrait de pédicelles de la variété Adala.

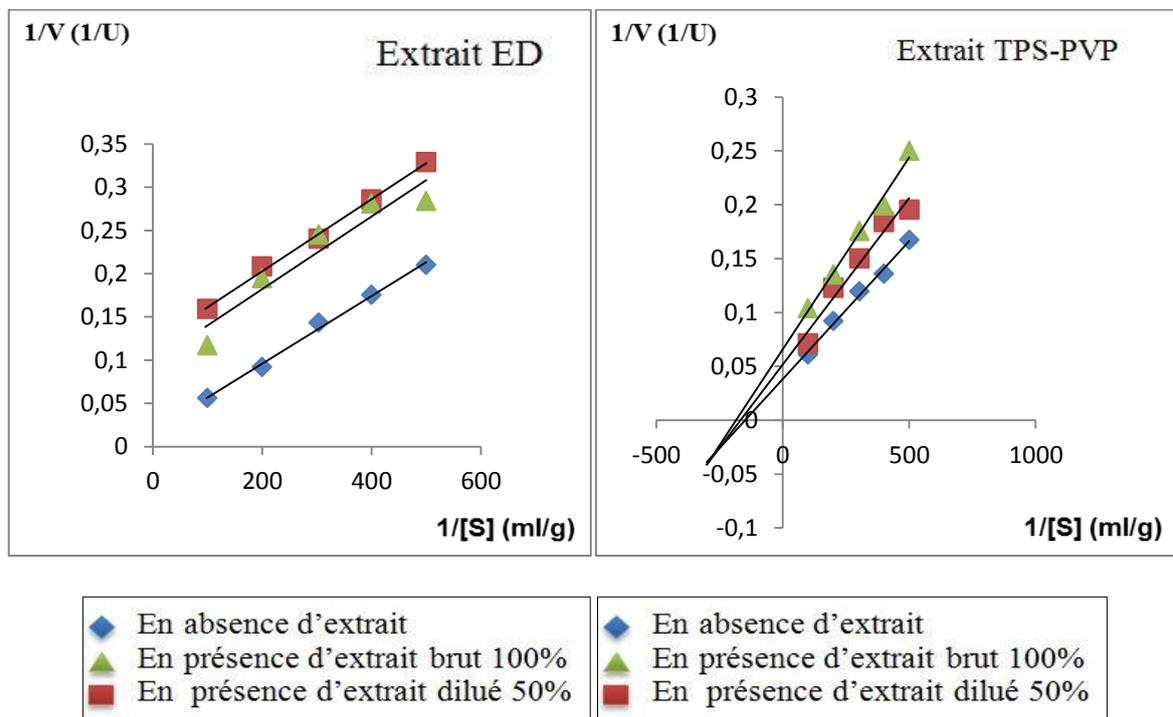


Figure 13 : Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes (extrait ED et TPS-PVP) par l'extrait de périanthes de la variété Ghars.

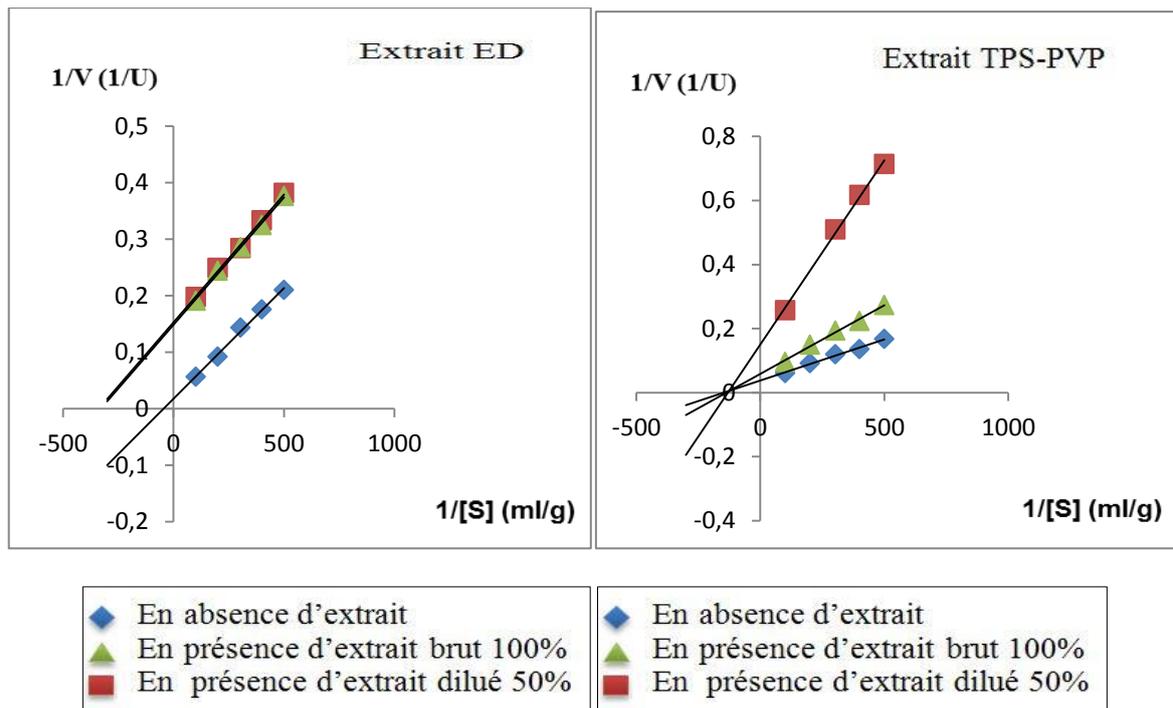


Figure 14 : Le graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes (extrait ED et TPS-PVP) par l'extrait de palmes de la variété Ghars.

Les extraits des périanthes et palmes de la variété Ghars et l'extrait des pédicelles de la variété Adala étant les inhibiteurs de la POD les plus efficaces. Alors, nous avons cherché à établir leurs modes d'action par l'étude de leurs types d'inhibition. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 08.

Tableau 8: Type d'inhibition, K_i , K_m et V_{max} de la POD des dattes Ghars et Adala par les différents extraits inhibiteurs.

Extrait Inhibiteur	Type d'extrait enzymatique	K_i (M)	K_m (M)	V_{max} (UE)	Type d'inhibition
Pédicelles Adala	ED	1041.16	0.04	19.34	incompétitif
	TPS-PVP	161.10	0.07	19.23	non compétitif
Périanthes Ghars	ED	113.67	0.18	56.81	incompétitif
	TPS-PVP	805.54	0.06	26.24	non compétitif mixte
Palmes Ghars	ED	45.68	0.18	56.81	incompétitif
	TPS-PVP	24.16	0.06	26.24	non compétitif

L'étude de type d'inhibition, des extraits des périanthes et palmes de la variété Ghars et des pédicelles pour la variété Adala, a été réalisée sur les peroxydases de deux types d'extrait enzymatique ED et TPS-PVP pour chaque extrait inhibiteur. Les résultats obtenus (tableau 08) montrent que les extraits des pédicelles, périanthes et palmes agissent comme inhibiteurs in-compétitifs sur la POD d'extrait ED, alors qu'ils agissent comme inhibiteurs non compétitifs mixte sur la POD d'extrait TPS-PVP.

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. La faible constante d'inhibition (K_i) est enregistrée pour l'extrait de palmes de la variété Ghars contre l'extrait enzymatique TPS-PVP de la POD, avec une valeur de 24,16 M, ce qui signifie sa plus forte affinité de liaison à l'enzyme. Par contre, l'extrait de pédicelles de la variété Adala a montré une grande valeur de K_i , égale 1041.16 M.

Les extraits des pédicelles, périanthes et palmes montre une activité inhibitrice de type in-compétitif vis-à-vis l'extrait enzymatique d'ED de la peroxydase. Cet effet est probablement dû à la présence dans ces extraits de composés actifs qui ne présentent pas

d'analogie structurale avec le substrat, mais peuvent agir en se liant au complexe enzyme-substrat et pas à l'enzyme seule. Ce type d'inhibition conduit à l'augmentation de l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat.

Toutefois, les extraits des périanthes et des palmes de la variété Ghars présentent une activité inhibitrice de type non compétitif simple contre l'extrait enzymatique TPS-PVP de la POD. Dans ce cas, l'inhibition simple signifie que l'inhibiteur affecte l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, sans pour autant se fixer sur le site actif du substrat (Macrae et Duggleby, 1968).

Egalement, les résultats montrent ainsi la présence d'un type d'inhibition non compétitif pour l'extrait de pédicelle de la variété Adala. Les composés actifs de ces extraits qui sont responsables n'empêche pas la formation du complexe enzyme-substrat, mais empêche ce dernier de conduire à la formation des produits de réaction. Aussi, ils préservent l'affinité de l'enzyme pour son substrat constante ($1/K_m$), dont la constante d'inhibition (K_i) est de 161.10 M.

Comme c'est indiqué dans le tableau (08), les extraits des pédicelles, des périanthes et des palmes agissent de manière différente d'un extrait enzymatique à un autre. Cela peut expliquer soit par la présence d'une forme différente d'enzyme dans les extraits enzymatiques ED et TPS-PVP ; ou bien par la présence des plusieurs formes d'enzyme pour chaque extrait. Ainsi, les deux méthodes d'extraction enzymatique permet d'extraire en plus des substances qui peuvent interagir en synergie avec les molécules actives des extraits inhibiteurs; ce qui explique la mention des taux d'inhibition élevés pour certains extraits et de déterminer des modes d'action différents.

Des études antérieures ont démontrées que les antioxydants naturels agissent comme des inhibiteurs des enzymes de brunissement, PPO et POD, des fruits et des légumes (Jang et *al.*, 2002). Selon Maier et Metzler (1965), les tanins sont des inhibiteurs compétitives des enzymes de brunissement des dattes. Ils sont responsables aussi au leurs brunissement non enzymatique.

Enfin, l'efficacité inhibitrice et les différents modes d'actions exercés par nos extraits vis-à-vis les deux enzymes peuvent être accordés à la présence des différentes substances bioactives en termes de nature chimique et de quantité. Ces composés diminuent ou inhibent la vitesse de réaction de brunissement en éliminant un (des) élément (s) actif (s) de réaction. Alors, les résultats d'inhibition obtenus avec la POD et PPO ne peuvent pas être applicables avec les mêmes enzymes provenant d'une source différente, donc elles pourraient varier de manière significative (Ferrar et Walker, 1996).

Conclusion



Le contrôle du brunissement enzymatique était essentiel pour maintenir la qualité des aliments et satisfaire les besoins des consommateurs. L'industrie alimentaire s'efforce actuellement d'éliminer l'utilisation des produits chimiques dans les aliments en raison de la prise de conscience des effets secondaires qui peuvent être apportés par les produits chimiques. De ce fait, les inhibiteurs de la PPO et de la POD présents dans les ressources naturelles ont été étudiés dans plusieurs plantes.

Cependant, la recherche sur les agents anti-brunissement naturels des dattes reste à établir. Ainsi, les informations scientifiques sur la manière dont les inhibiteurs naturels peuvent influencer l'activité enzymatique de la PPO et de la POD sont limitées.

Notre étude s'est consacrée par conséquent à la recherche des inhibiteurs d'origine naturelle des deux enzymes : peroxydase et polyphénol oxydase extraites à partir des dattes de *Phoenix dactylifera* L., des trois variétés (Deglet Nour, Ghars et Adala) récoltées de la région de Metlili – Ghardaïa; comme une essai pour aider à atténuer certains des problèmes de brunissement enzymatique des dattes.

Notre choix s'est porté sur ces fruits puisqu'ils constituent un aliment incomparable pour les algériens durant toutes les saisons avec une grande valeur énergétique. D'autre part, pour un but d'approfondir les connaissances dans le domaine agroalimentaire via la mise en place des moyens préventifs du brunissement enzymatique des dattes par l'étude de l'effet inhibiteur de quelques produits naturels du palmier dattier y a compris les palmes, les pédicelles et les périanthes.

Pour cela, nous avons opté une extraction par macération, en utilisant un mélange hydro-alcoolique: méthanol/eau (8/2 V/V) pour obtenir les extraits des végétaux. Le criblage phytochimique sur les extraits des périanthes, des pédicelles et des palmes pour les trois variétés étudiées a révélé la richesse de ces organes en les tanins, les flavonoïdes, les coumarines, les quinones et les composés réducteurs. Quand les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les saponines, ils n'ont pas été détectés.

D'autre part, nous avons préparé un extrait enzymatique brut des dattes par deux méthodes d'extraction (par l'eau distillé et par le polyvinylpyrrolidone) à fin de tester l'effet inhibiteur des extraits des périanthes, des pédicelles et des palmes vis-à-vis l'activité enzymatique de la Peroxydase et de la Polyphénol Oxydase, qui sont impliquées dans le brunissement enzymatique, aussi de déterminer leurs paramètres cinétiques.

Les résultats obtenus ont montré une activité enzymatique positive pour tous les extraits testés, en utilisant le gaïacol et le pyrocatechol comme des substrats pour la POD et la PPO respectivement. Aussi, quelque soit la source enzymatique, les extraits TPS-PVP présentent des meilleurs taux d'activité enzymatique par rapport les extraits d'ED. Il est apparu ainsi que l'extrait enzymatique de la variété Ghars et plus particulièrement l'extrait TPS-PVP présente le taux d'activité peroxydase le plus élevé avec une valeur de 69.9 U. Pourtant, les extraits TPS-PVP et ED de la variété Deglet Nour exposent les plus faibles taux d'activité enzymatique de la POD et de la PPO.

L'influence de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique de la POD et de la PPO fait apparaître une réponse michaelienne avec des valeurs variables de V_{max} et K_m , ce qui peut être interpréter par le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, la présence ou non des iso-enzymes et la méthode d'extraction utilisée.

Le test de l'effet inhibiteur des extraits des différents organes étudiés du palmier dattier sur l'activité enzymatique de la POD et de la PPO extraites des dattes a mis en exergue la grande capacité inhibitrice de certains d'entre eux. En effet, les extraits des palmes, des périanthes et des pédicelles de la variété Ghars présentent les meilleurs taux d'inhibition (84.9%, 84.13% et 79.72% respectivement) contre l'activité de la POD extraite par TPS-PVP. De plus, l'activité peroxydase de la variété Adala est inhibée par les extraits des différents constituants du palmier dattier avec des taux d'inhibition variant de 15.91% (périanthes) à 56,08% (pédicelles). Tandis que, les trois organes étudiés de la variété Deglet Nour ne présentent aucun effet anti-peroxydasique.

Par contre, dans le cas de la PPO extraite par l'ED ou le TPS-PVP, les extraits des palmes, des pédicelles et des périanthes de trois variétés n'ont montré aucune efficacité inhibitrice. A l'exception, l'extrait de périanthes de la variété Adala qui a présenté un très faible taux d'inhibition (25.61 %). Egalement, l'effet inhibiteur de l'acide ascorbique sur la PPO a été examiné. Les résultats montrent que l'acide ascorbique a provoqué une diminution significative de l'activité de la PPO avec des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 53.09 % vis-à-vis l'extrait enzymatique TPS-PVP de la variété Adala.

L'étude de type d'inhibition des extraits, des périanthes et des palmes de la variété Ghars et des pédicelles pour la variété Adala, a été réalisée sur les peroxydases de deux types d'extrait enzymatique ED et TPS-PVP pour chaque variété. Les résultats obtenus montrent que les extraits des pédicelles, périanthes et palmes agissent comme inhibiteurs in-compétitifs sur la POD extraite par ED, alors qu'ils agissent comme inhibiteurs non compétitifs mixte sur la POD extraite par TPS-PVP.

La faible constante d'inhibition (K_i) est enregistrée pour l'extrait des palmes de la variété Ghars contre l'extrait enzymatique TPS-PVP de la POD, avec une valeur de 24, 16 M, ce qui signifie sa plus forte affinité de liaison à l'enzyme. Par contre, l'extrait des pédicelles de la variété Adala a montré une grande valeur de K_i , égale 1041.16 M.

De cette étude, il semblerait que les différents organes du *Phoenix dactylifera* L., constituent une bonne source de biomolécules à valoriser en application agroalimentaire pour leurs effets anti-brunissement enzymatique principalement lors de la conservation et/ou lors des processus biotechnologiques de transformation des dattes.

Il serait donc intéressant de procéder à une caractérisation qualitative, des extraits des palmes, des pédicelles et des périanthes du palmier dattier principalement en métabolites de type secondaire. Puis identifier et isoler les principes actifs responsables des effets anti-enzymatiques.

Egalement, cette étude a ouvert des nouvelles perspectives sur l'utilisation des inhibiteurs naturels pour remplacer les agents contenant du sulfite qui pourraient nuire à la santé humaine. Ainsi, l'extraction et l'étude de PPO et POD issues des autres variétés Algérienne du *Phoenix dactylifera* L. ou autres matières végétales locales riches en ces enzymes ont été requis.

A la fin, la prévention de la réaction du brunissement constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant la conservation des produits alimentaires, donc la découverte des inhibiteurs puissants permet d'inactiver et/ou de ralentir de cette réaction est très importante.

Références

Bibliographies



-
-
- ✓ AISSA, T., MALEK, B., ABDERRAHMANE, B. MESSAOUDA, G., 2011, Application des indicateurs ethnobotaniques de la diversité au palmier dattier, *Algerian Journal of Arid Environment*, 1, 9-9.
 - ✓ ALBANO P.-O., 2002, La connaissance des palmiers (Culture et utilisation), Edisud, France, 359 p.
 - ✓ AL-JASSABI S., SAAD A., SATYAKEERTHY T.R., ABDULLAH M.S., 2013, Characterization of Polyphenol Oxidase from *Zyzyphusspina-christi* from Iraq, *Middle-East Journal of Scientific Research*, 14 (2): 155-160.
 - ✓ ALJAWISH, A., 2013, Fonctionnalisation enzymatique de chitosane par des composés phénoliques: évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères, Thèse de doctorat, Université de LORRAINE, 303p.
 - ✓ ALTUNKAYA, A., GOKMEN, V., 2008, Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*), *Food Chemistry*, 107(3), 1173-1179.
 - ✓ ALYWARD, F., HAISMAN, D., 1969, Oxidation system in fruits and vegetables-their relation to the quality of pressured products, *Advances in Food Research*, 17: 1-76.
 - ✓ AMIOT, M.J., TACHINI, M., AUBERT, S., NICOLAS, J., 1992, Phenolic compounds and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity, *J. Food Sci.*, 57, 958-962.
 - ✓ AMIOUR, S. D. & HAMBABA, L. 2016. Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 77-82.
 - ✓ ARBAOUI, S., SOUFI, S. BETTAIEB, T., 2018, Contrôle du brunissement enzymatique en culture in vitro: Cas de l'amaryllis (*Amaryllis belladonna* L.), *Journal of New Science*, 60 (4), 6p.
 - ✓ ARSIAN, O., DOGAN, S., 2005, Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2, 3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1499-1504.

-
-
- ✓ ARSLAN, O. & DOĞAN, S. 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2, 3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1499-1504.
 - ✓ ARSLAN, O., TEMUR, A., TOZLU, İ., 1997, Polyphenol oxidase from *Allium* sp, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2861-2863.
 - ✓ AUBERT S., AMIOT M.J., NICOLAS J, 1992, Les critères de brunissement des pommes. *Sciences des Aliments*, 12, 625-647
 - ✓ BALIGA, M. S., BALIGA, B. R. V., KANDATHIL, S. M., BHAT, H. P., VAYALIL, P. K., 2011, A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food research international*, 44, 1812-1822.
 - ✓ BARRETT, D.M., SOMOGYI, L.P., RAMASWAMY, H.S., 2005, Processing fruits (Sciences and Technology), 2^e éd, CRC Press, Orlando, USA, 841 p.
 - ✓ BARREVELD W.H., 1993, Date palm products, FAO agricultural service bulletin n°101, Rome
 - ✓ BAYINDIRLI, A., 2010. Enzymes in fruit and vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications, Taylor and Francis Publishing, CRC Press, London, 197–214.
 - ✓ BELGUEDJ, M., TIRICHINE, A., 2011, Ressources génétiques du palmier dattier (Caractéristiques des cultivars de Ghardaïa), 3D, Dossier N2, *Revue Annuelle*, 1112-3478.
 - ✓ BEN ABBES, F., 2011, Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « *Phoenix dactylifera* L. », Mémoire de Magister en Génie des procédés pharmaceutiques. Université Ferhat Abbas-Sétif, 79 p.
 - ✓ BENCHELAH, A. C., MAKKA, M., 2008, Les dattes : intérêt en nutrition, *Phytothérapie*, 6 (2) : 117-121p.
 - ✓ BENSEMAOUNE, Y., BEZIOU, S., SENOUSI, A. CHEHMA, A. 2018. Le système d'élevage camelin dans la région de Ghardaïa : Situation et perspectives, *Revue des Bioressources*, 8, 21-33.
 - ✓ BIGLARI, F., ALKARKHI, A. F., EASA, A. M., 2008, Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran, *Food chemistry*, 107(4), 1636-1641.

-
-
- ✓ BOTES, P., ZAID, A., 1999, Climatic requirements of date palm, Date palm cvcultivation, FAO, Rome, 58-107.
 - ✓ BOUABIDI, H., Reynes, M., Rouissi, M. B., 1996, Critères de caractérisation de quelques cultivars de palmiers dattier du sud tunisien, INRAT, 69 :73-87.
 - ✓ BOUBEKRI, A., 2010, Optimisation des traitements thermiques de la datte Algérienne «Deglet-Nour», Thèse de doctorat, Université de HADJ-LAKHDAR, Batna, Algérie.
 - ✓ BOUDRAR, C., BOUZID, L., NAIT LABRI, H., 1997, Etude des fractions minérale et glucidique de la datte Deglet-Nour au cours de la maturation, Mémoire d'Ingénieur, INA, El-Harrach, Alger, 60 p.
 - ✓ BURTON, S. G., 1994, Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review, *Catalysis Today*, 22: 459-487.
 - ✓ CHAFI, A., BENABBES, R., BOUAKKA, M., HAKKOU, A., KOUDDANE, N., BERRICHI, A., 2015, Pomological study of dates of some date palm varieties cultivated in Figuig oasis, *Journal of Material and Environmental Science*, 6, 1266-1275.
 - ✓ CHAIRA, N., SMAALI, M. I., MARTINEZ-TOMÉ, M., MRABET, A., MURCIA, M. A., FERCHICHI, A., 2009, Simple phenolic composition, flavonoid contents and antioxidant capacities in water-methanol extracts of Tunisian common date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.), *International journal of food sciences and nutrition*, 60, 316-329.
 - ✓ CHEFTEL, J. C., CHEFTEL, H., 1976, Le brunissement enzymatique. In Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, *Tec. Doc.*, Lavoisier, 353-363.
 - ✓ CHEN, Q. X., LU, H. Y., ZHOU, C. M., LIN, H. N., ZHOU, M., 1998, The effect of N- thiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase, *IUBMB Life*, 45, 465-73.
 - ✓ CHEN, H. J., HO, T.C., 1997, Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2374-2378.
 - ✓ CHEN, J. S., CHAREST, D. J., MARSHALL, M. R., WEI, C. I., 1997, Comparison of two treatment methods on the purification of shrimp polyphenol oxidase, *J. Sci. Food Agric.*, 75: 12–18.

-
-
- ✓ CHERIOT, S., 2007, Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides, Thèse de doctorat, *L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement*, 208p.
 - ✓ CHEVALIER, A., 1952, Recherches sur les Phoenix africains, *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 32, 205-236.
 - ✓ DAAS AMIOUR, S., 2017, Mise en évidence et inhibition du brunissement enzymatique post récolte des dattes Deglet Nour et Ghars, Thèse de doctorat, Université de Batna 2, Batna.
 - ✓ DAKHIA, N., BENSALAH, M. K. ROMANI, M., DJOUDI, A. M., BELHAMRA, M., 2013, Etat phytosanitaire et diversité variétale du palmier dattier au bas sahara-algerie, *Journal Algérien des Régions Arides*, 13p.
 - ✓ DAVID MORAKINYO, S., 2016, Partial Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Two Commonly Consumed Eggplants (*Solanum melongena depressum* and *Solanum gilo*) in Nigeria, *Biochemistry and Molecular Biology*, 1,10p.
 - ✓ DJERBI, M., 1994, Précis de phoeniciculture. Ed. FAO, Rome, 23-191.
 - ✓ DOGAN, S., TURAN, Y., ERTORK, H., ARSLAN, O., 2005, Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynarascolymus L.*), *J. Agric. Food Chem.*, 53, 776-785.
 - ✓ DOGAN, S., DOGAN, M., 2004, Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*), *Food chemistry*, 88, 69-77.
 - ✓ DORANTES-ALVAREZ, L., CHIRALT, A., 2000, Color of minimally processed fruits and vegetables as affected by some chemical and biochemical changes, In: Alzamora, S.M., Tapia, M.S. Lopez-Malo, A., *Eds.*, 111–126.
 - ✓ DOWSON, V. H. W., ATEN, A., 1963, Récolte et conditionnement des dattes, Progrès et Mise en Valeur-Agriculture, Collection FAO fre no. 72.
 - ✓ DUBOST, D., 1991, Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis Algérienne, Thèse de doctorat, Université de Ouargla, 547p.

-
-
- ✓ ELLEUCH, M., BESBES, S., ROISEUX, O., BLECHER, C., DEROANNE, C., Drira, N. E., ATTIA, H., 2008, Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre. *Food chemistry*, 111(3), 676-682.
 - ✓ ESPIARD, E., 2002, Introduction à la transformation industrielle des fruits, Ed. Tech et Doc- Lavoisier, 360 p.
 - ✓ ESPIN, J. C., GARCIA-RUIZ, P.A., TUDELA, J., VARON, R., GARCIA-CANOVAS, F., 1998, Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2968-2975.
 - ✓ ESPÍN, J. C., 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. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, 3518-3525.
 - ✓ FALLEH, H., KSOURI, R., CHAIEB, K., KARRAY-BOURAOUI, N., TRABELSI, N., BOULAABA, M., ABDELLY, C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
 - ✓ FAN, Y., FLURKEY, WH., 2004, Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65, 671-678.
 - ✓ FERRAR, P. H., WALKER, J. R., 1996, Inhibition of phenol oxidases: a comparative study, *Journal of Food Biochemistry*, 20, 15-30.
 - ✓ GHAZI, F., SAHRAOUI, S., 2005, Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantboucht et Hamraïa. Mémoire d'ingénieur, Institut national d'agronomie, Alger, 45p.
 - ✓ GOLBEK, J. H., CAMMARATA, K. V., 1981, Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme, *Plant Physiol*, 67, 977-984.
 - ✓ GOULART, P. F., ALVES, J. D., MAGALHAES, M., LIMA, L., MEYER, L., 2003, Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits. *Food Chemistry*, 83, 7-

-
-
- ✓ GOUPY, P., MACHEI, J., NICOLA, J., VAROQUAUX, P., 1994, Partial purification and characterization of endive (*Cichoriumendivia* L.) polyphénoloxydases, *Sci. Alim.*, 14, 751-762.
 - ✓ GOUZI, H., 2006, Contribution à l'étude du polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. Conception d'un système à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques en solution, Mémoire de Magister, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, Tlemcen, 147p.
 - ✓ GOUZI, H., 2011, Etude des propriétés du polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) du champignon de Paris (*Agaricusbisporus* J.E Lange Imbach), Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, Tlemcen.
 - ✓ GOUZI, H., 2014, Extraction et caractérisation biochimique des polyphénols oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée, Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, Paris.
 - ✓ GUEMARI, F., BOUALEM, R., HAMODI, S., 2009. Etude des sysetmes traditionnels de capatge des eaux et d'irrigation dans les oasis de la vallee de M'Zab cas des oasis de METLLILI, EL ATEUF, GUERRARA, BENI IZGUENE, BERRIANE ET BOUNOURA, Thèse de magister, univercité Kasdi Merbah Ouargla, Ouargla.
 - ✓ HANNACHI, S., KHITRI, D., BENKHALIFA, A., BRAC DE PERRIERE R. A., 1998, Inventaire variétal de la palmeraie algérienne, *Ed. Anep.*, Rouiba, Alger. 225 p.
 - ✓ HAREL, E., MAYER, A. M., SHAIN, Y., 1964, Catechol Oxidases from Apples, their Properties, Subcellular Location and Inhibition, *Physiologia Plantarum*, 17(4), 921-930.
 - ✓ HASEGAWA, S., MAIER, V. P., 1980, Polyphenol Oxidase of Dates, *Agric. Food Chem.*, 28, 891-893
 - ✓ HASNAOUI, A., ELHOUMAIZI, A., HAKKOU, A., WATHELET, B., SINDIC, M., 2011, Physico-chemical characterization, classification and quality evaluation of date palm fruits of some Moroccan cultivars, *Journal of Scientific Research*, 3, 139-149.
 - ✓ Hurst, W. J., 2008, Methods of analysis for functional food, 2^é edition, Taylor and Francis, London, 548p.

-
-
- ✓ JANG, M. S., SANADA, A., USHIO, H., TANAKA, M., OHSHIMA, T., 2002, Inhibitory effects of 'Enokitake' mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. *LWT-Food Science and Technology*, 35, 697-702.
 - ✓ JANOVIĆ-KLAPP, A., RICHARD, F., NICOLAS, J., 1989, Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties, *Phytochemistry*, Vol. 28, No. 11, 2903-2907.
 - ✓ Janovitz-Klapp, A.H. Richard, F.C., Goupy, P. & Nicolas, J.J., 1990, Inhibition studies on apple polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 926-931.
 - ✓ JEANTET, R., BARON, F., NAU, F., ROIGNANT, M., BRULE, G., 1999, High intensity pulsed electric fields applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation, *J. Food Protection*, 62, 1381-1386.
 - ✓ JEANTET, R., CROGUENNEC, T., SCHUCK, P., Brulé G., 2006), *Sciences des aliments, Tec. et Doc.*, Lavoisier, Paris, 383p.
 - ✓ JIANG, Y., LI, J., JIANG, W., 2005, Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature, *LWT-food Science and Technology*, 38(7), 757-761.
 - ✓ JOLIVET, S., ARPIN, N., WICHERS, H. J., PELLON, G., 1998, Agaricus bisporus browning: a review, *Mycol. Res.*, 102: 1459-1483.
 - ✓ KAHN, V., ANDRAWIS, A., 1985, Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone, *Phytochemistry*, 24, 905-908.
 - ✓ KAHN, V., LINDNER, P., ZAKIN, V., 1995, Effect of kojic acid on the oxidation of o-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase, *J. Food Biochem.*, 18, 253-271.
 - ✓ KENDRI, S., 1999, Caractéristiques biochimiques de la biomasse "Saccharomyces cerevisiae" produite à partir des dattes "Variété Ghars", Mémoire d'Ingénierie. Département d'agronomie, Batna, 51p.
 - ✓ KHALI, M., SELSELET-ATTOU, G., 2007, Effect of heat treatment on polyphenol oxidase and peroxidase activities in Algerian stored dates, *African Journal of Biotechnology*, 6 (6), 790-794.
 - ✓ Khatun, S., Absar, N., Ashraduzzaman, M. 2001. Purification, Characterization and Effect of PhysicoChemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringaoleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4: 1129-1132.

-
-
- ✓ KHENFER, S. & MEDJOUEL, M. *Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale de la région sud du Sahara Algérien.*
 - ✓ KIM, M.-J., KIM, C. Y. & PARK, I. 2005. Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chemistry*, 89, 181-184.
 - ✓ KOLCUOĞLU, Y., COLAK, A., SESLI, E., YILDIRIM, M. & SAGLAM, N. 2007. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, 101, 778-785.
 - ✓ Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. 2006. "Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiotamastoidea*)." *Food Chemistry.*, Vol. 101, 778-785
 - ✓ KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E. & ETHERTON, T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113, 71-88.
 - ✓ Lasram, M., Mzali, M. T., Rhouma, A. (2002).Le palmierdattier, In :l'arboriculturefruitière en Tunisie, 2 : 202-207.
 - ✓ LECHEB, F. 2010. *Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique de la matière grasse du noyau des dattes: essai d'incorporation dans une crème cosmétique de soin.*
 - ✓ LEE, M. Y., LEE, M. K. & PARK, I. 2007. Inhibitory effect of onion extract on polyphenol oxidase and enzymatic browning of taro (*Colocasia antiquorum* var. *esculenta*). *Food chemistry*, 105, 528-532.
 - ✓ LEE, M.-K. 2007. Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 102, 146-149
 - ✓ Lerch K. (1981). Metal ions In biological systems, Sigel H. (Ed), Marcel Dekker 13, 143-186.

-
-
- ✓ Li-Qin, Z., Jie, Z., Shu-Hua, Z., Lai-Hui, G., 2009. Inhibition of browning on the surface of peach slices by short-term exposure to nitric oxide and ascorbic acid. *Food Chem.* 114, 174–179.
 - ✓ Loncle, D. 1992. Génie enzymatique.
 - ✓ López-Nicolás, J. M., Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, Á. et García-Carmona, F. (2007): Modèle cinétique de brunissement enzymatique du jus de pomme en présence de cyclodextrines: utilisation de la maltosyl- β -cyclodextrine comme antioxydant secondaire. *Food Chemistry*, 101: 1164-1171.
 - ✓ LÓPEZ-SERRANO, M. & ROS BARCELÓ, A. 2002. Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxidation. Their possible implications in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) browning reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1218-1224.
 - ✓ Lounes, M., Boualem, B. (2015). Le fonctionnement de la filière dattes dans la région de Touggourt Sud-est Algérien.
 - ✓ LOUVET, J., BULIT, J., TOUTAIN, G. & RIEUF, P. 1970. LE BAYOUD, FUSARIOSE VASCULAIRE DU PALMIER DATTIER SYMPTOMES ET NATURE DE LA MALADIE MOYENS DE LUTTE: È. *Al Awamia*, 35, 161-162.
 - ✓ Macheix, J. J., Sapis, J. C., Fleuriet, A., & Lee, C. Y. (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 30(4), 441-486.
 - ✓ Macheix, J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). Phenolic compounds in fruit processing. Dans: Macheix, J., Fleuriet, A. Billot, J. (eds.), *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 239-312.
 - ✓ Macheix, J.-J., A. Fleuriet and C. Jay-Allemand (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, PPUR presses polytechniques.
 - ✓ Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chemistry*, 89(3) : 411-420 p.
 - ✓ Martinez M.V., Whitaker J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 195-200.

-
-
- ✓ MATALLAH, M. 2004. Contribution à l'étude de la conservation des dattes de la variété Deglet-Nour: Isotherme d'adsorption et de désorption. *Alger, Institut National Agronomique d'El Harrach, Mémoire de fin d'études Ingénieur d'Etat.*
 - ✓ MAYER, A. & HAREL, E. 1991. Phenoloxidasas and their significance in fruits and vegetables. *Food Enzymology*, Edited by PF Fox. Elsevier Publisher). Pp.
 - ✓ MAYER, A. M. & HAREL, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18, 193-215.
 - ✓ McEvily, A.J., Iyengar, R. & Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *CRC CritRev Food Sci. Nutr.*, 32, 253-273.
 - ✓ Munier, P. (1973). Le palmier dattier *Techniques agricole et productions tropicales.* Paris Maison Neuve et Larose, 143-174.
 - ✓ MUNIER, P. 1973. *Le palmier-dattier*, Maisonneuve & Larose.
 - ✓ Nezam El-Dim, A. M. (2000). Date palm post-Harvest Processing technology in Egypt. In : Hamdan, I. Y. (ed), Hegazi, N. A. (ed), *Date palm : Post-Harvest Processing technology*, FAO, Rome, 42-73.
 - ✓ NICOLAS, J. J., RICHARD-FORGET, F. C., GOUPY, P. M., AMIOT, M. J. & AUBERT, S. Y. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34, 109-157.
 - ✓ Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J., & Aubert, S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(2), 109-157.
 - ✓ O.N.M., 2013. Données climatiques de la région de Ghardaia. Ed. Office National de la Météorologie, Ghardaia.
 - ✓ Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. I., Kocacaliskan, I., Şakiroğlu, H. 1995. Polyphenol oxidase from Amasya apple. *Journal of Food Science*, 60: 495-499.
 - ✓ Packer L. 2001. *Flavonoids and other polyphenols.* Ed Academic Press, California, 483 p.
 - ✓ Park E.Y., Luh B.H. (1985). Polyphenol oxidase of kiwi fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 678-684.
 - ✓ PASSAGER, P. 1958. Historical, Geographic and Medical Study of Metlili, Algeria, Sahara. *Arch. Inst. Pasteur d'Algerie*, 36, 508-74.

-
-
- ✓ Patnaik, PR. 2002. Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology*. 31: 198-200. polyphenol oxidase. *Turk J Chem*. 28: 547-557. Portabella mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
 - ✓ Pincemail, J., C. Heusele, F. Bonté, R. Limet and J. Defraigne (2001). "Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement." *Act Med Int* 4: 18-23.
 - ✓ PONCE, A., DEL VALLE, C. & ROURA, S. 2004. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 199-204.
 - ✓ Prabha T. N. And Patwardhan M. V.1982. Purification and properties of polyphenoloxidase of mango peel (*Mangifera indica*). *J. Biosci.*, Vol. 4, Number 1, March 1982, pp. 69-78.
 - ✓ PRABHA, T. & PATWARDHAN, M. 1982. Purification and properties of polyphenoloxidase of mango peel (*Mangifera indica*). *Journal of Biosciences*, 4, 69-78.
 - ✓ QIU, L., CHEN, Q.-H., ZHUANG, J.-X., ZHONG, X., ZHOU, J.-J., GUO, Y.-J. & CHEN, Q.-X. 2009. Inhibitory effects of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*, 112, 609-613.
 - ✓ Raymond, J., Rakariyatham, N. et Azanza, J. L. (1993). Purification et quelques propriétés de la polyphénol oxydase à partir de graines de tournesol. *Phytochemistry*, 34 : 927-931.
 - ✓ RICHARD, F. & GAUILLARD, F. 1997. Oxidation of chlorogenic acid catechins, and 4-methyl a catechol in mode by combination of pear polyphenol oxidase and proxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2472-2476.
 - ✓ Riedacker A. (1990). *Physiologie des arbres et arbustes en zone aride*, Ed .J. Libbey, Paris.323-327 p.
 - ✓ Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267: 3801-3810

-
-
- ✓ Rolle, R.S., Guizani, N., Chen, J.S., Marshall, M.R., Yang, J.S. and Wei, C.I. 1991. Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Biochem.* 15: 17–32.
 - ✓ RUFFIÉ, J., DUCOS, J. & LARROUY, G. 1962. Étude hémotypologique des populations de la région du M'Zab (département des Oasis). *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, 3, 354-371.
 - ✓ Sachde A. G., Al-Bakir' A. Y. and Abdul-Raheem J. A. K. (1989). Polyphenol oxidase from barhee and zahdi dates .ii. Characterization. *Journal of Food Biochemistry* 12, 241-251.
 - ✓ SACHDE, A. G., AL-BAKIR, A. Y. & ABDUL-RAHEEM, J. A. 1988. Polyphenol oxidase from Barhee and Zahdi dates. II. Characterization. *Journal of Food Biochemistry*, 12, 241-252.
 - ✓ SAÏD, Z. M. 2007. *Contribution à l'étude des paramètres de production (lait) et de la reproduction chez le dromadaire population CHAÂMBI dans la région de Metlili*. Ingénieur d'Etat en Agronomie Saharienne, KASDI Merbah Ouargla.
 - ✓ Sawaya, W. N., Khalil, J. K., Khatchadourian, H. A., Safi, W. M., & Mashadi, A. S. (1983). Sugars, tannins and some vitamins contents of twentyfive date cultivars grown in Saudi Arabia at the khalal (mature color) and tamer (ripe) stages. In *The first symposium on the date palm*. King Fayçal University Al Hassan Kingdom of Saudi Arabia (pp. 468-478).
 - ✓ Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., and Liu, Q. 2001. The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 381a-381h.
 - ✓ SOTTOMAYOR, M., LOPEZ-SERRANO, M., DICOSMO, F. & ROS BARCELÓ, A. 1998. Purification and characterization of α -3', 4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *FEBS letters*, 428, 299-303.
 - ✓ SPENCER, C. M., CAI, Y., MARTIN, R., GAFFNEY, S. H., GOULDING, P. N., MAGNOLATO, D., LILLEY, T. H. & HASLAM, E. 1988. Polyphenol complexation—some thoughts and observations. *Phytochemistry*, 27, 2397-2409.

-
-
- ✓ SPIGNO, G., TRAMELLI, L. & DE FAVERI, D. M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81, 200-208.
 - ✓ STAGOS, D., PORTESIS, N., SPANOU, C., MOSSIALOS, D., ALIGIANNIS, N., CHAITA, E., PANAGOULIS, C., RERI, E., SKALTSOUNIS, L. & TSATSAKIS, A. M. 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4115-4124.
 - ✓ Subcellular location and inhibition. *Physiol. Plant.*, 17, 921-930.
 - ✓ Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as
 - ✓ Tortoe, C., Orchard, J., & Beezer, A. (2007). Prevention of enzymatic browning of apple cylinders using different solutions. *International journal of food science & technology*, 42(12), 1475-1481.
 - ✓ Toutain G. (1972). Les maladies du palmier dattier et sa fusariose vasculaire. Ed. F.A.O, Rome : 21 – 28.
 - ✓ TOUTAIN, G. 1972. II. PROGRESSION DU BAYOUD EN PALMERAIES ETABLIES SUR TERRAIN SALE. *Al Awamia*, 42, 65-75.
 - ✓ Valero E., Varon R., and Garcia-Carmora F. (2002). Tyrosinase-Mediated Oxidation of Acetaminophen to 4-Acetamido-o-Benzoquinone. *Bio. Chem. Vol 383*, pp 1931-1939.
 - ✓ Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
 - ✓ Vandercook, C.E., Hasegawa, S. & Maier, V.P. (1980). Dates. Dans: Nagy, S. & Shaw P.E. (Eds.). *Tropical and Subtropical Fruits*. AVI Publishing Co, Westport, Connecticut, pp.506–541.
 - ✓ Varoquaux, P. 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse Univ. de Dijon, 134 p.
 - ✓ VAUGHN, K. C. & DUKE, S. O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 60, 106-112.

-
-
- ✓ Vémos-Vigyâzô, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
 - ✓ Waite J.H. (1976). Calculating Extinction Coefficient for Enzymatically Produced o-Quinones. *Analytical Biochemistry.* 75, 211-218.
 - ✓ Wang, J., Jiang, W., Wang, B., Liu, S., Gong, Z., and Luo, Y. 2007. Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tainong") pulp. *Journal of Food Biochemistry.* 31: 45-55.
 - ✓ Wesche - Ebeling, P. , et Montgomery , MW (1990). Polyphénol oxydase de fraise: son rôle dans la dégradation des anthocyanines. *J. Food Sci.* 55 : 731-734
 - ✓ Whitaker J., Lee C. Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention.* J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society: 2-7.
 - ✓ WHITAKER, J. R. & LEE, C. Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview. ACS Publications.
 - ✓ Wilson, K., Walker, J. 1996. *Practical biochemistry principles and techniques.* Fourth Edition.
 - ✓ Xu, J; Zheng, T; Meguro, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol
 - ✓ Yagar H., Sagioglu A. 2002. Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem* 26, 97 - 103.
 - ✓ YAĞAR, H. & SAĞIROĞLU, A. 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 97-104.
 - ✓ Yemenicioğlu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
 - ✓ Yemenicioğlu, A., Cemeroğlu, B. 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.
 - ✓ Yoruk, R., Marshall, MR. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry.* 27: 361-422.
 - ✓ YOUNG, R. E. 1965. Extraction of enzymes from tannin-bearing tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 111, 174-180.

- ✓ ZAID, A. & DE WET, P. 1999. Climatic requirements of date palm. Date palm cultivation. FAO, Roma (Italia).
- ✓ ZAWISTOWSKI, J. & BILIADERIS, C. 1991. Polyphenol oxidase. In 'Oxidative enzymes in foods'.(Eds DS Robinson, NAM Eskin) pp. 217–273. Elsevier Science Publishers: London.
- ✓ Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- ✓ ZIYAN, E. & PEKYARDIMCI, Ş. 2004. Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turkish Journal of Chemistry*, 28, 547-558.

Annexes

[Annexe 01]

Fournisseur et type des appareils utilisés au cours de l'expérimentation

Appareil	Fournisseur	Type
Centrifugeuse	Beckman (modèle J2-21).	N° série 215862
Bain Marin	Jisico .J-BAS8	N°série 1005-5
Spectrophotomètre	SpectroScan 40	N° série 12400674
Rota vapeur	HeizbadHei-VAP Heidolph	

Les composés chimiques et leurs structures

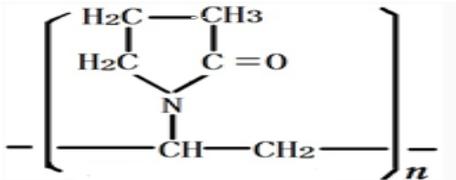
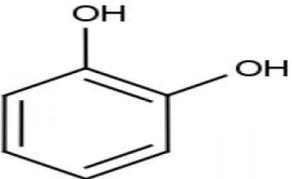
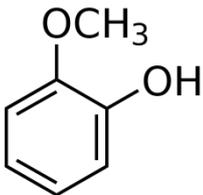
Les composés chimiques	La formule brute	La structure chimique
Polyvinylpyrrolidone PVP	$(C_6H_9NO)_n$	
Pyrocatechol	$C_6H_6O_2$	
Gaiacol	$C_7H_8O_2$	



Figure 1: Différents stades de maturation de la datte (Al-Mssallem, Hu et al. 2013)

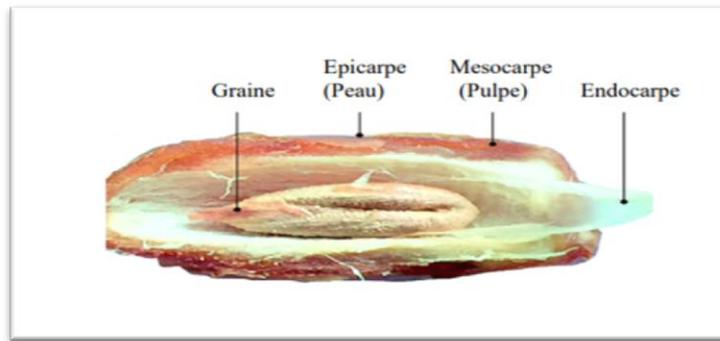


Figure 2: L'anatomie du fruit de la datte(Stade Tamr) (Ghnimi, Umer et al. 2017)

[Annexe 02]

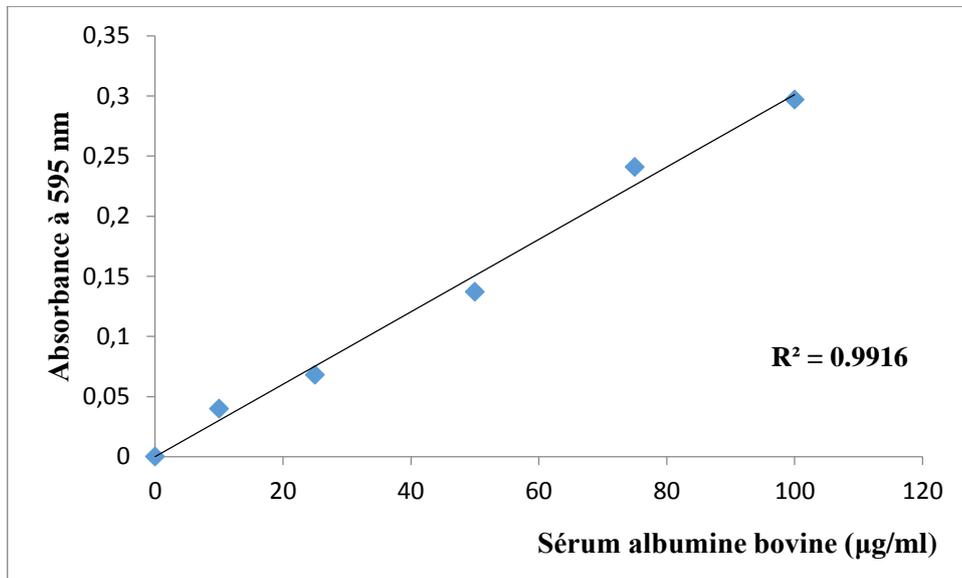
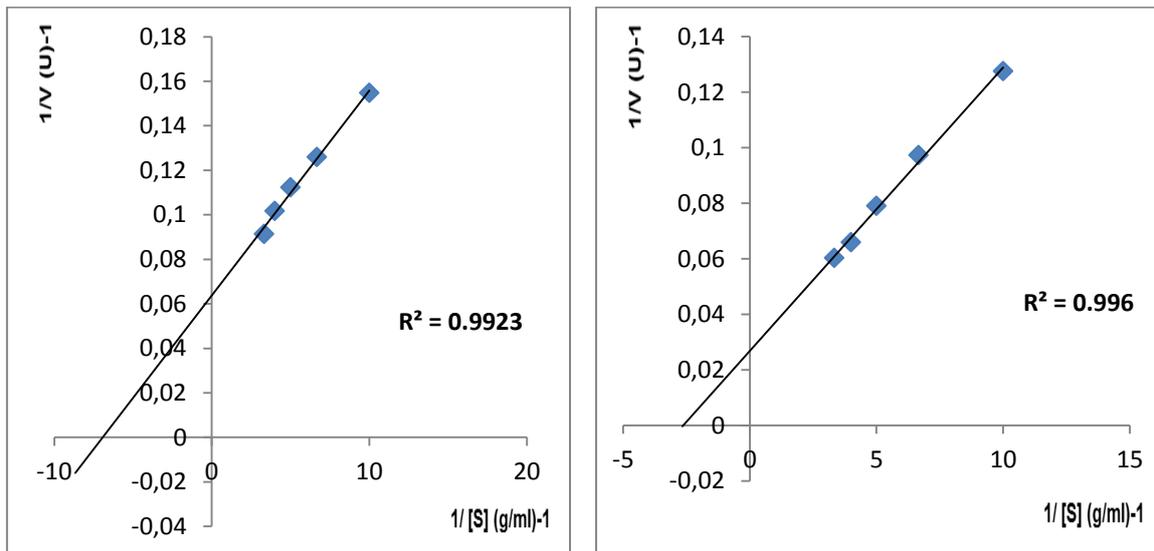


Figure 3: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford

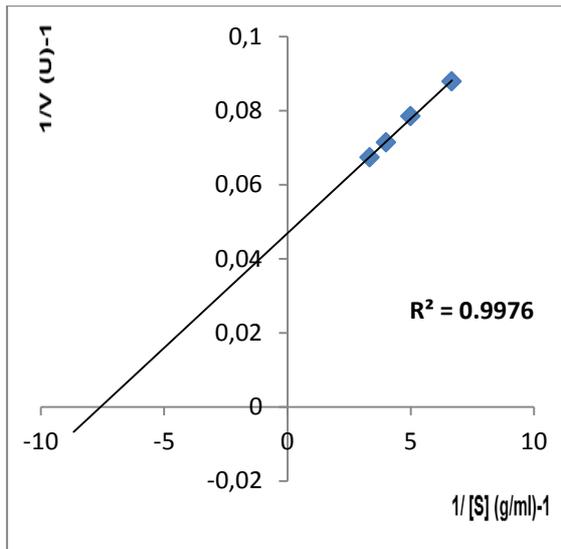
(1976)

[Annexe 03]

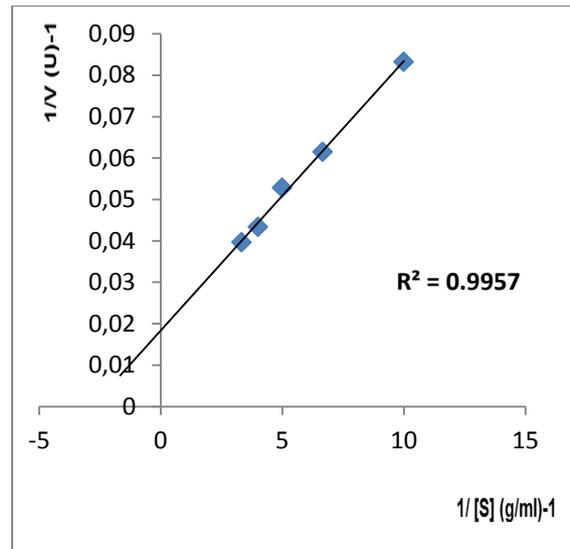


a) Extrait ED (Adala)

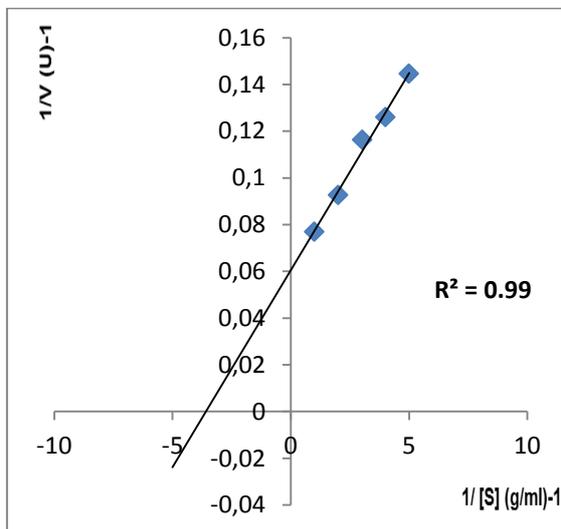
b) Extrait TPS-PVP (Adala)



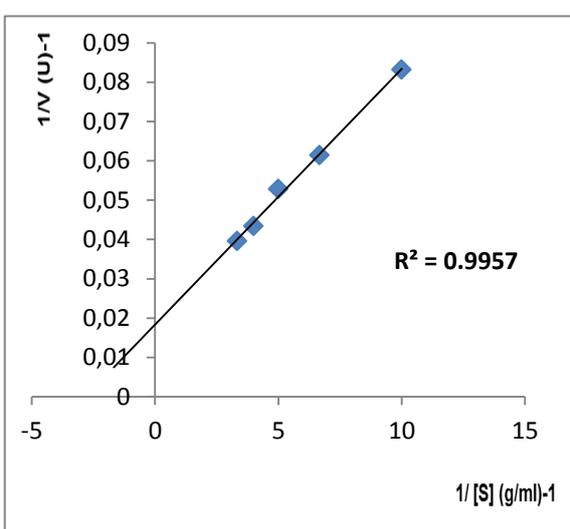
c) Extrait ED (Ghars)



d) Extrait TPS-PVP (Ghars)

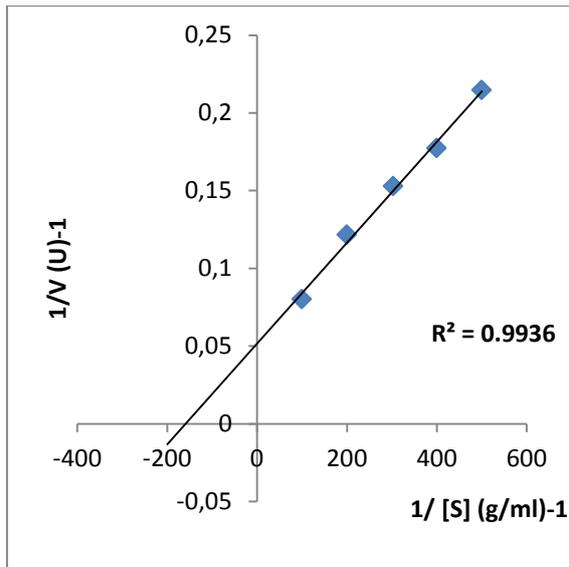


e) Extrait ED (Deglet Nour)

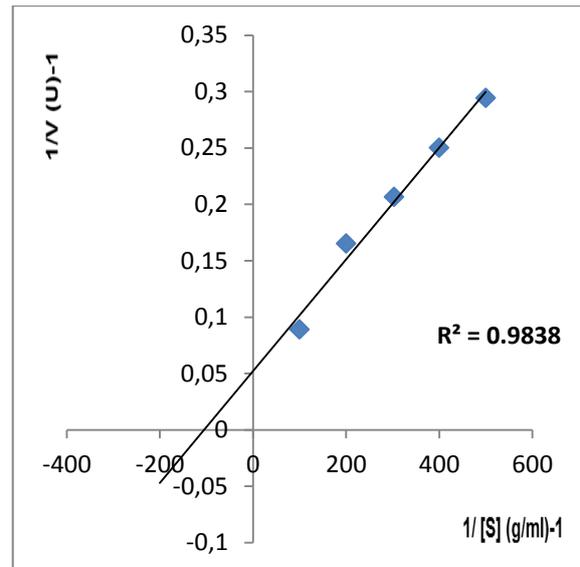


f) Extrait TPS-PVP (Deglet Nour)

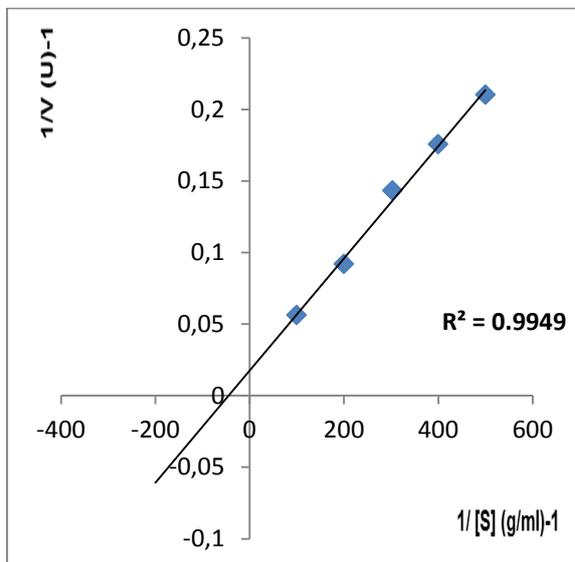
Figure 4 : La représentation graphique de Lineweaver-Burk de la cinétique enzymatique de la PPO



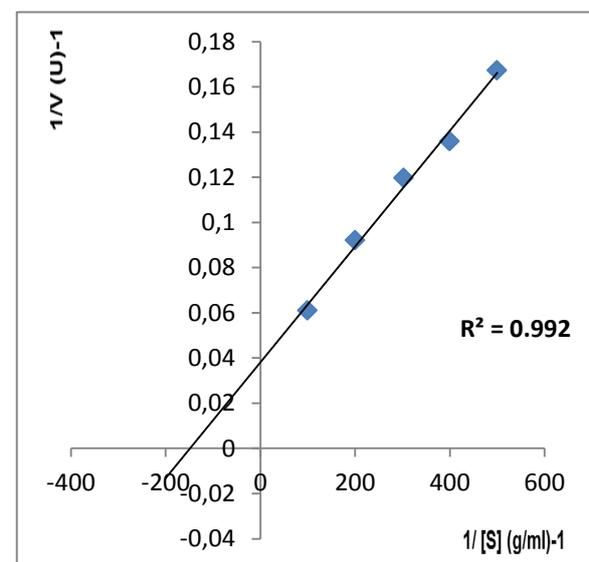
a) Extrait ED (Adala)



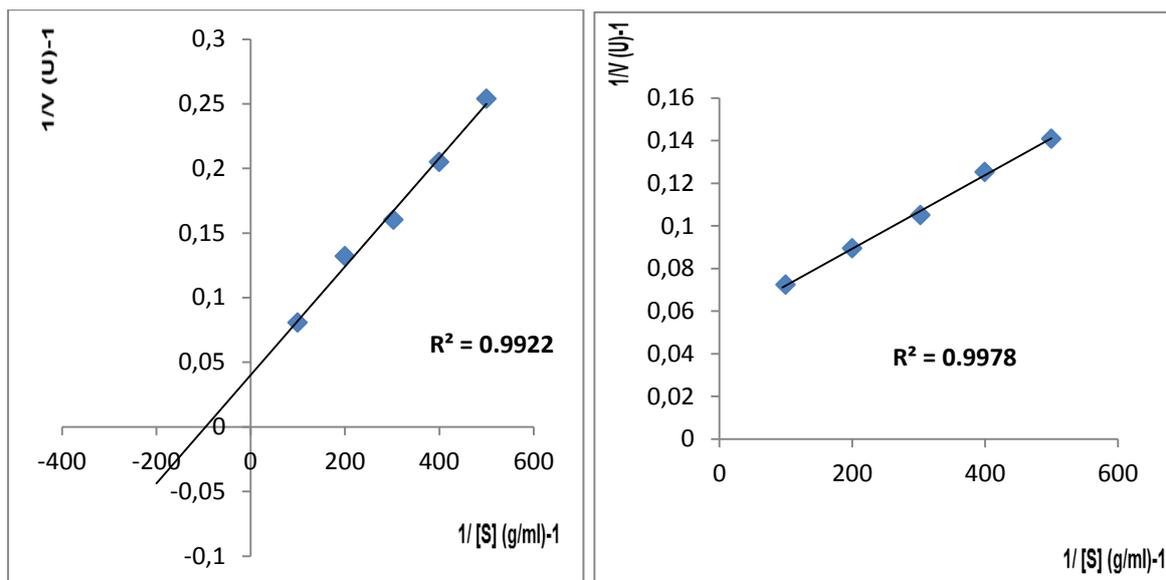
b) Extrait TPS-PVP (Adala)



c) Extrait ED (Ghars)



d) Extrait TPS-PVP (Ghars)



e) Extrait ED - Deglet Nour

f) Extrait TPS-PVP - Deglet Nour

Figure 5 : La représentation graphique de Lineweaver-Burk de la cinétique enzymatique de la POD