

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Année : 2023/2024

N° d'enregistrement :

.....

THESE

Présentée par :

Mme. BENSANIA Wafa

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

**Effet des extraits naturels sur l'inhibition du
brunissement enzymatique des dattes**

Soutenu publiquement le : 05/05/2024

Devant le jury composé de :

HADJADJ Soumia	Professeur	Univ. Kasdi Merbah Ouargla	Présidente
DJERIDANE Amar	Professeur	Univ. Amar Telidji Laghouat	Directeur de thèse
TELLI Alia	MCA	Univ. Kasdi Merbah Ouargla	Examinatrice
BAKLI Mahfoud	MCA	Univ. Ghardaïa	Examineur
BELGUIDOUM Mahdi	MCA	Univ. Ghardaïa	Examineur
HAMMOUDI Roukia	MCA	Univ. Kasdi Merbah Ouargla	Examinatrice

Année universitaire 2023/2024

A la mémoire de mon père

A ma mère

A mon mari Said

A mes enfants Ines et Aymen

A mes sœurs Madjeda et Nadia

Remerciement

Je remercie, avant tout, dieu le tout puissant qui m'a permis de donner la force, le courage et la patience d'achever ce modeste travail.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, Monsieur DJERIDANE Amar, Professeur à l'université Université Amar Telidji (Laghouat) pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, ses conseils avisés, son écoute, sa patience et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse de chaleureux remerciements à Mm HADJADJ Soumia, Professeur à l'université KASDI Merbah-Ouargla pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de cette thèse. J'exprime mes remerciements également à Mlle. TELLi Alia et Mlle. HAMMOUDI Roukia, maîtres de conférences à l'université KASDI Merbah-Ouargla qu'ont accepté de juger ce travail et de participer au jury. Merci également à M. BAKLI Mahfoud et M. BELGUIDOUM Mahdi, maîtres de conférences à l'université de Ghardaïa qu'ont accepté de participer à l'examen de mon travail.

Mes vifs remerciements vont aussi à M. KEMASSI Abdellah, BENBRAHIM Fouzi, BENSEMAOUNE Youcef et BELGHIT Said pour leur soutien et leurs nombreux conseils ainsi je les remercie pour sa bienveillance, sa gentillesse et ses encouragements.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur BOURAS Nouredine, BELHACHEMI Mohammed Elhabib, KRAIMAT Mohammed, ROUARI Linda et BELABASSI Ouarda pour ses nombreux conseils et suggestions en tant que scientifiques et techniques.

Je désire en outre remercier l'administration de la faculté SNV (université de Ghardaïa), d'avoir d'accueillir dans les laboratoires pédagogiques de la faculté durant la réalisation de la partie expérimentale de ce travail et tout le personnel des laboratoires pour leur accueil et soutien et qu'ont tout mis en œuvre pour que cette étude soit réalisée dans les meilleures conditions.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble des collègues et amis et plus particulièrement à DAREM S., BENHAMOUDA S., BEDJADJ N. et HAMDI A. pour leur soutien moral tout au long de ce travail.

Enfin, que tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de ma profonde gratitude.

تأثير المستخلصات الطبيعية على تثبيط الاسمرار الانزيمي للتمر

يؤثر الاسمرار الانزيمي للفواكه والخضروات سلبيًا على اللون والمذاق والنكهة والقيمة الغذائية. وبالتالي، فإن استخدام المركبات الطبيعية ذات القدرة المضادة للاسمرار سيكون ذا أهمية بلا شك لقبول هذه المنتجات على نطاق واسع من قبل المستهلكين. من هذا المنظور، تهدف الدراسة الحالية لتقييم التأثيرات المضادة للأكسدة و الاسمرار لمستخلصات بعض أجزاء *Phoenix dactylifera* L. (النخلة)، لخمس أصناف محلية من التمر: دقلة نور، الغرس، تادالة، تزرزيت و بنت قبالة، من منطقة متليلي- غرداية.

أظهر التحليل الفيتو كيميائي للمستخلصات وجود كميات كبيرة من عدة مجموعات من المركبات الطبيعية مثل العفص، الكومارين والمركبات المرجعة. كما أظهر التحليل الكمي لمختلف المستخلصات أنها غنية بالفينولات، حيث تراوحت قيمها بين 10,65 و 48,98 ميليغرام مكافئ من حمض الغاليك بالنسبة لواحد غرام من المادة الجافة. وبالمثل، فإن مستويات الفلافونويد المسجلة في المستخلصات المدروسة تتراوح بين 01,75 و 15,75 ميليغرام مكافئ للروتين / غرام من المادة الجافة. ومع ذلك، تم تسجيل علاقة إيجابية جيدة بين محتوى الفلافونويد وكمية الفينولات الكلية ($R^2=0,994$).

تم أيضًا تقييم الفعالية المضادة للأكسدة في المختبر لمستخلصات *Phoenix dactylifera* L. من خلال اختبارات DPPH، ABTS و FRAP. حيث أشارت نتائج نشاط مضادات الأكسدة إلى أن مستخلصاتنا يمكن أن تحل محل مضادات الأكسدة الاصطناعية نظرًا لأن لديها قدرة عالية جدًا على تثبيط الجذور الحرة مقارنةً بتلك التي لوحظت في مضادات الأكسدة المرجعية.

ومن ناحية أخرى أظهرت نتائج النشاط المضاد للاسمرار أن المستخلصات تمتلك فعالية تثبيطية هامة ضد انزيم البيروكسيداز المستخلص من التمر، كما أظهرت هذه الدراسة أن أجزاء مختلفة من نخيل التمر، وخاصة صنف الغرس، يمكن استخدامها كعوامل فعالة وطبيعية لتأخير الاسمرار.

بالإضافة إلى ذلك، سمح لنا تحليل HPLC-MS بتحديد وجود العديد من المركبات الفينولية مثل حمض الكوماريك، حمض 4-ميثوكسي بنزويك، حمض الفيروليك، النارينجينين، الكايمفيرول، الكيرسيتين، الفالينين، المريسيتين، حمض الفوليك، الروتين، حمض الغاليك وحمض الكلوروجينيك.

وفقًا لهذه الدراسة، يبدو أن الأجزاء المختلفة لنخلة التمر تشكل مصدرًا جيدًا للجزيئات الحيوية، وخاصة المركبات الفينولية التي يمكن استخدامها في التطبيقات الغذائية أو في صناعة الأدوية لتأثيراتها المضادة للأكسدة والإنزيمية المضادة للاسمرار.

الكلمات المفتاحية: غرداية، *Phoenix dactylifera* L.، المركبات الفينولية، القدرة المضادة للأكسدة، التأثيرات المضادة للاسمرار.

Effet des extraits naturels sur l'inhibition du brunissement enzymatique des dattes

Le brunissement enzymatique a un impact négatif sur la couleur, le goût, la saveur et la valeur nutritionnelle des fruits et légumes. Ainsi, l'utilisation des anti-brunissements naturels serait d'une importance indubitable pour une plus large acceptation de ces produits par les consommateurs. Dans cette perspective, la présente étude a été conçue pour évaluer les effets antioxydants et anti-brunissements des extraits de sous-produits de cinq variétés des dattes locales du *Phoenix dactylifera* L. : Deglet Nour, Ghars, Tadala, Tezerzait et Bent Keballah, récoltés de la région de Metlili-Ghardaia.

L'analyse phytochimique des extraits a révélé la présence des quantités importantes de plusieurs groupes de composés naturels, tels que les tanins, les coumarines et les composés réducteurs. Ainsi, l'analyse quantitative a montré la richesse de différents extraits en phénols totaux avec des valeurs variant entre 10,65 et 48,98 mg EAG/g MS. De même, les teneurs des flavonoïdes des différents extraits étudiés comprennent entre 1,75 et 15,07 mg ER/g MS. Toutefois, une relation positive ($R^2 = 0,994$), a été enregistrée entre le contenu en flavonoïdes et la quantité des phénols totaux.

La capacité antioxydante *in vitro* des extraits du *Phoenix dactylifera* L. a été également évaluée par les tests DPPH, ABTS et FRAP. Les résultats de l'activité antioxydante suggèrent que nos extraits peuvent remplacer les antioxydants synthétiques puisqu'ils présentent un potentiel inhibiteur des radicaux libres très important à celui observé pour les antioxydants de référence.

D'autre part, les résultats de l'activité anti-brunissement ont montré que les extraits présentaient un effet potentiel d'inhibition sur l'activité enzymatique de la peroxydase des fruits du palmier dattier. Cette étude montre que différentes parties étudiées du palmier dattier, en particulier la variété Ghars, peuvent être utilisées comme agents efficaces et naturels pour retarder le brunissement.

En outre, l'analyse par HPLC-MS nous a permis d'identifier plusieurs composés phénoliques tels que l'acide coumarique, l'acide 4-méthoxybenzoïque, l'acide férulique, la naringénine, le kaempférol, la quercétine, la valinine, la mérycétine, l'acide folique, la rutine, l'acide gallique et l'acide chlorogénique.

D'après cette étude, il semblerait que les différents organes du *Phoenix dactylifera* L., constituent une bonne source de biomolécules particulièrement les composés phénoliques à valoriser en application agroalimentaire ou en industrie pharmaceutique pour leurs effets antioxydants et anti-brunissement enzymatique.

Mots-clés : Ghardaïa, *Phoenix dactylifera* L., Composés phénoliques, Capacité antioxydante, Effets anti-brunissement.

Effect of natural extracts on the inhibition of enzymatic browning of dates

Enzymatic browning in fruits and vegetables has a negative impact on color, taste, flavor, and nutritional value. Thus, the use of natural compounds with anti-browning capacity would be of indubitable importance for more widespread consumers' acceptance of these products. In this perspective, the present study was designed to select the natural antioxidant and anti-browning effects of the extracts of by-product from five varieties of local dates of *Phoenix dactylifera* L.: Deglet Nour, Ghars, Tadala, Tezerzait and Bent Keballah, harvested from the Metlili- Ghardaïa region.

Phytochemical analysis of the extracts revealed the presence of significant quantities of several groups of natural compounds, such as tannins, coumarins and reducing compounds. Thus, the quantitative analysis showed the richness of different extracts in total phenols with values varying between 10.65 and 48.98 mg EAG/g DM. Likewise, the flavonoid contents of the different extracts studied are between 1.75 and 15.07 mg RE/g DM. However, a positive relationship ($R^2 = 0.994$) was recorded between the flavonoid content and the quantity of total phenols.

The *in vitro* antioxidant capacity of *Phoenix dactylifera* L. extracts was also evaluated by the DPPH, ABTS and FRAP tests. The antioxidant activity results suggest that our extracts can replace synthetic antioxidants since they have a very high free radical inhibiting potential compared to that observed for the reference antioxidants.

On the other hand, the results of anti-browning activity showed that the extracts exhibited a potential inhibition effect on the enzymatic activity of peroxidase from fruits of date palm. This study shows that different studied parts of date palm, especially the Ghars variety, can be used as effective and natural agents in delaying browning.

In addition, HPLC-MS analysis allowed us to identify several phenolic compounds such as coumaric acid, 4-methoxybenzoic acid, ferulic acid, naringenin, kaempferol, quercetin, valinin, merycetin, folic acid, larutin, gallic acid and chlorogenic acid.

According to this study, it seems that the different organs of the *Phoenix dactylifera* L. constitute a good source of biomolecules, particularly phenolic compounds to be used in food applications or in the pharmaceutical industry for their antioxidant and enzymatic anti-browning effects.

Keywords: Ghardaïa, *Phoenix dactylifera* L., Phenolic compounds, Antioxidant capacity, Antibrowning effects.

Liste des abréviations

ABTS	: 2,2A-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid.
ACP	: Analyse en composantes principales.
BHA	: Butylhydroxyanisole.
DPPH	: 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
EC₅₀	: Concentration efficace médiane.
EAG	: Equivalent en acide gallique.
EQ	: Equivalent en quercétine.
ER	: Equivalent en rutine.
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène.
FRAP	: Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (Ferric reducing antioxidant power).
Ki	: Constante d'inhibition.
Km	: Constante Michaélieenne.
I%	: Pourcentage d'inhibition.
LOX	: Lipoxygénase.
MDA	: Malondialdéhyde.
MF	: Matière fraîche.
MS	: Matière sèche.
PAL	: Phénylalanine ammoniac lyase.
POD	: Peroxydase.
PPO	: Polyphénol Oxydase.
PVP	: Polyvinylpyrrolidone.
Qx	: Quintaux.
r	: Coefficient de corrélations de Pearson.
R²	: Coefficient de régression.
R (%)	: Rendement d'extraction.
T	: Température.
TPS	: Tampon de phosphate de sodium.
TPTZ	: Ferric 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine.
Trolox	: Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroma-2-carboxylique.
UV-vis	: Ultra violet-Visible.
Vmax	: Vitesse maximale.

N°	Titre	Page
Tableau 1	: Liste des produits chimiques utilisés dans ce travail	6
Tableau 2	: Quelques caractéristiques des variétés des dattes étudiées.	9
Tableau 3	: Production des dattes par la compagne agricole de la Daïra de Metlili (2021).	10
Tableau 4	: Différents tests de criblage phytochimique.	14
Tableau 5	: Aspect et couleur des extraits des différents organes du <i>Phoenix dactylifera</i> L.	30
Tableau 6	: Résultats du screening phytochimique des extraits végétaux du <i>Phoenix dactylifera</i> L.	34
Tableau 7	: Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de différents extraits étudiés	38
Tableau 8	: Valeurs d'EC ₅₀ des différents extraits et standards mesurées par le test de DPPH•	46
Tableau 9	: Valeurs d'EC ₅₀ des différents extraits et standards mesurées par le test d'ABTS•+	55
Tableau 10	: Tableau récapitulatif de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des extraits bruts des cinq variétés étudiées.	60
Tableau 11	: Paramètres cinétiques de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des dattes de cinq variétés étudiées.	64
Tableau 12	: Constante d'inhibition (K _i) et type d'inhibition des différents extraits inhibiteurs vis-à-vis l'activité de la POD des dattes.	72
Tableau 13	: Molécules détectées dans les trois fractions d'extrait de périanthes selon les résultats de LC/MS-MS	77
Tableau 14	: Molécules détectées dans les trois fractions d'extrait de pédicelles selon les résultats de LC/MS-MS	79
Tableau 15	: Valeurs de coefficient de corrélation de Pearson entre les activités antioxydantes, les activités anti-brunissement et teneurs en phénols totaux et des flavonoïdes.	84
Tableau 16	: Contribution des variables (%).	89

N°	Titre	Page
Figure 1	: Localisation de la région de Metlili dans la willaya du Ghardaïa.	7
Figure 2	: Dattes de cinq variétés étudiées.	11
Figure 3	: Différents organes étudiés du palmier dattier, (a) : Palme, (b) : pédicelle, (c) : périanthe.	12
Figure 4	: Réduction du radical libre DPPH• en présence d'antioxydant.	18
Figure 5	: Réduction du tripyridyl-triazine ferrique (Fe ³⁺ -TPTZ) en présence d'antioxydant.	19
Figure 6	: Formation du radical cation ABTS•+.	20
Figure 7	: Oxydation du catéchol par PPO.	23
Figure 8	: Oxydation du guaïacol en tetraguaïacol.	24
Figure 9	: Rendements d'extraction des extraits végétaux du <i>Phoenix dactylifera</i> L.	31
Figure 10	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	36
Figure 11	: Courbe d'étalonnage de la rutine	37
Figure 12	: Pourcentages des flavonoïdes par rapport les phénols totaux.	43
Figure 13	: Valeurs de FEAC des extraits de <i>P. dactylifera</i> et des standards.	51
Figure 14	: Taux d'inhibition de l'activité de peroxydase par les extraits de différents organes du palmier dattier.	66
Figure 15	: Taux d'inhibition de l'activité de polyphenol oxydase par les extraits de différents organes du palmier dattier.	68
Figure 16	: Graphique de Lineweaver-Burk d'inhibition de l'activité de la POD des dattes par les différents extraits du <i>Phoenix dactylifera</i> L.	71
Figure 17	: Chromatogramme LC-MS/MS de périanthes du <i>Phoenix dactylifera</i> L.	76
Figure 18	: Chromatogramme LC-MS/MS de pédicelles du <i>Phoenix dactylifera</i> L.	78
Figure 19	: Distribution des échantillons testés dans le plan factoriel ACP	88

Dédicace	I
Remerciement	II
المخلص	III
Résumé	IV
Abstract	V
Liste des Abréviations	VI
Liste des Tableaux	VII
Liste des Figures	VIII
Introduction générale	1

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1. Produits chimiques	6
I.2. Matériel végétal	6
I.2.1. Zone d'échantillonnage	7
I.2.2. <i>Phoenix dactylifera</i> L.	8
I.2.3. Choix du matériel végétal	8
I.3. Méthodes	10
I.3.1. Préparation des échantillons	10
I.3.2. Préparation des extraits végétaux	12
I.3.3. Screening phytochimique des extraits	13
I.3.4. Analyse quantitative	15
I.3.4.1. Dosage des phénols totaux	15
I.3.4.2. Dosage des flavonoïdes	16
I.3.5. Activité antioxydante	17
I.3.5.1. Test du DPPH	17
I.3.5.2. Test de FRAP	19
I.3.5.3. Test d'ABTS	20
I.3.6. Mesure de l'activité anti-enzymatique	21
I.3.6.1. Préparation des extraits enzymatiques	22
I.3.6.2. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques	22
I.3.6.3. Mesure de l'activité enzymatique	23
I.3.6.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la PPO	23
I.3.6.3.2. Mesure de l'activité enzymatique de la POD	24

I.3.6.4. Test d'inhibition	25
I.3.6.4.1. Mesure de l'activité anti-polyphénol oxydase	25
I.3.6.4.2. Mesure de l'activité anti-peroxydase	25
I.3.7. Caractérisation des molécules bioactives	26
I.4. Analyse statistique	28
Chapitre II : Résultats et discussion	
II.1. Rendements d'extraction des extraits végétaux	29
II.2. Screening phytochimique des extraits végétaux	33
II.3. Teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes	35
II.4. Pouvoir antioxydant	44
II.4.1. Test du DPPH	44
II.4.2. Pouvoir réducteur ferrique (test FRAP)	50
II.4.3. Test d'ABTS	53
II.5. Activité anti-brunissement enzymatique	59
II.5.1. Activités enzymatiques de la PPO et POD des dattes du <i>Phoenix dactylifera</i> L.	59
II.5.2. Détermination des paramètres cinétiques de la PPO et de la POD	63
II.5.3. Résultat du test d'inhibition	65
II.5.3.1. Activité anti-peroxydase	66
II.5.3.2. Activité anti-polyphénol oxydase	68
II.5.4. Etude cinétique de l'inhibition de l'activité de la POD des dattes	70
II.6. Caractérisation des molécules bioactives	75
II.7. Etude statistique	84
II.7.1. Corrélation entre les teneurs en phénols totaux et les différentes activités	84
II.7.2. Analyse en composantes principales	88
Conclusion générale	91
Références bibliographiques	94
Annexes	
Annexe 01	114
Annexe 02	117
Annexe 03	118
Annexe 04	121
Annexe 05	123
Annexe 06	127



Introduction générale



Phoenix dactylifera L.(palmier dattier) est l'une des cultures fruitières les plus anciennes et les plus importantes pour les populations d'Asie du Sud-Ouest et d'Afrique du Nord (**Haimoud et Allem, 2023**). En outre, les dattes peuvent être cultivées en Australie, au Mexique, en Amérique du Sud, en Afrique australe et aux États-Unis (**Al-alawi et al., 2017 ; Ahmad Mohd Zain et al., 2022**).

En raison de ses exigences écologiques, le palmier dattier constitue le pivot de l'écosystème saharien et la base de l'existence et de la durabilité des oasis. En effet, il est mieux adapté aux conditions climatiques difficiles des régions sahariennes et subsahariennes (**Sedra, 2003**). Egalement, il contribue beaucoup à la biodiversité agricole par sa richesse en cultivars des dattes (**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**).

Le palmier dattier appartient à la famille des *Arecaceae* (Angiospermes, monocotylédones), composée d'environ 200 genres et plus de 2 500 espèces (**Rekis, 2020**). Le genre *Phoenix* comprend 14 espèces, dont *Phoenix dactylifera* L. Le nom d'espèce *dactylifera* signifie "doigt" qui fait référence aux grappes de fruits produites par cette plante (**Al-Alawi et al., 2017**).

Environ 75% du territoire mondial avec l'espace de 1,35 million d'hectares couvrant les productions de palmiers dattiers se trouve dans la juridiction arabe (**Al-shuraym, 2022**). Ces dernières années, l'Algérie a été le quatrième producteur mondial de fruits de palmier dattier, après Égypte, Arabie Saoudite et Iran, ainsi le neuvième en termes d'exportateur mondial (**Benouamane, 2022**). Au niveau national, la wilaya de Ghardaïa est classée parmi les premiers en termes de production de dattes, dont les variétés les plus abondantes sont Deglet Nour, Ghars, Tezerzait, Bentkaballah, Timdjouhart et Tadala (**Aissa et al., 2011; Bouguedoura et al., 2015**).

Le fruit du palmier dattier est une source importante de nutriments et de composés bioactifs tels que les glucides, les fibres alimentaires, les minéraux et les vitamines avec des avantages bénéfiques pour la santé tels que des activités anticancéreuses, antioxydantes, antimicrobiennes, antidiarrhéiques et anti-inflammatoires (**El Bakouri et al., 2021**). En outre, de nombreux composés phytochimiques bioactifs identifiés dans les fruits de la datte tels que les acides phénoliques simples (acide gallique, acide vanillique, acide syringique), les caroténoïdes (lutéine, β -carotène), les flavonoïdes et leurs dérivés (catéchine, épi-catéchine, quercétine, apigénine), des phytostérols (cholestérol, campestérol, β -sitostérol), des phénylpropanoïdes (acide caféique, acide 5-O-caféoylshikimique, acide férulique...) et des anthocyanes (**Zihad et al., 2021 ; Ghnimi et al., 2017**).

Tout cela montre que les dattes sont très importantes pour une alimentation saine et qu'elles contribuent à l'amélioration de la santé humaine (**Sarraf et al., 2021**).

La composition chimique, la couleur, la douceur et la texture des dattes sont très variées en fonction de plusieurs paramètres, notamment la variété de dattes, le stade de récolte des fruits, le traitement post-récolte, le stockage, les conditions du sol ainsi que l'origine géographique des dattes (**Al-Alawi et al, 2017 ; Zihad et al., 2021**).

Les dattes font l'objet d'une importante activité commerciale. Cependant, la sensibilité à l'altération et le manque de maîtrise des méthodes de conservation sur les sites de production peuvent poser de sérieux problèmes aux cultivateurs et aux exploitants (**Sarraf et al., 2021**). En règle générale, la qualité marchande et la valeur économique des dattes sur les marchés locaux et internationaux, et ses produits connexes, sont déterminées par de nombreux critères tels que la couleur, la saveur, le goût (taux de sucre), l'humidité (26-30 %) et l'absence de défauts tels que les insectes, fissures et dommages superficiels (**Al-Amrani et al., 2020**).

La détérioration des dattes pendant le stockage est une perte chimique et physiologique majeure qui affecte la qualité et le goût des fruits. L'un des phénomènes les plus graves qui se produisent dans les dattes pendant le stockage et affectent la couleur est la réaction de brunissement (**Al-Amrani et al., 2020**). Le processus de brunissement est un phénomène naturel par lequel il y a un changement de couleur vers le brun ou le brun foncé au fil du temps ; il se produit dans les fruits et légumes et entraîne une détérioration des propriétés nutritionnelles et sensorielles. Du fait de leur impact important sur la qualité des aliments, les processus de brunissage sont ainsi devenus un défi pour l'industrie agro-alimentaire (**Hamdan et al., 2022**). Ainsi, il 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 et leurs richesses en composés d'intérêts nutritionnels (**Arslan et Doğan, 2005; Kolcuoğlu et al., 2007**).

Ce phénomène pourrait être attribué à des réactions enzymatiques ou non enzymatiques, selon le mécanisme impliqué (**Chandrasekhar, 2021**). Dans les produits alimentaires, la réaction de brunissement non enzymatique est un processus qui produit une pigmentation brune dans les aliments, par une réaction chimique impliquant un seul composé ou plusieurs constituants dans les aliments, sans aucune enzyme impliquée. Cette réaction comprend la réaction de Maillard,

la caramélisation et l'oxydation de l'acide ascorbique (**Moon et al., 2020 ; Hamdan et al., 2022**). Le deuxième grand groupe de réactions de brunissement est le brunissement enzymatique qui est induit par des contraintes mécaniques et physiques, se produisant après la récolte pendant le traitement et le stockage d'une grande variété de fruits et légumes. Par conséquent, cela affecte non seulement l'alternance des couleurs, mais entraîne des pertes nutritionnelles et organoleptiques, entraînant également une moindre commercialisation et une moindre acceptation par les consommateurs (**Taranto et al., 2017**).

Une fois que les fruits et légumes sont endommagés mécaniquement ou dans un environnement défavorable, les composés phénoliques à l'intérieur seront oxydés en quinones et se termineront par une transformation semblable à la mélanine par la polyphénol oxydase (PPO) ou la peroxydase (POD), lorsque l'oxygène est disponible. De plus, l'activité de la lipoxygénase (LOX) et l'accumulation de malondialdéhyde (MDA) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ont été exposées pour participer au développement du brunissement. De même, le phénol et la phénylalanine ammoniac lyase (PAL) jouent un rôle clé dans l'incidence du brunissement (**Kaewjumpol et al., 2021 ; Qiao et al., 2021**). En revanche, la perte d'intégrité de la membrane lors des coupures et des dommages mécaniques est associée à plusieurs facteurs de stress, conduisant à une formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui causent des dommages oxydatifs aux lipides, aux protéines et aux acides nucléiques (**Dias et al., 2020**).

Lapolyphénol oxydase (PPO, oxygène oxydoréductase) est une métallo-enzyme à cuivre abondamment répondue dans le monde végétal (banane, pomme, avocat, pêche, poire, champignon, pomme de terre, papaye artichaut, laitue,...) (**Martinez et Whitaker, 1995**). Il est abondamment distribué dans le cytoplasme, tandis que ses substrats phénoliques se trouvent dans les vacuoles. Lorsque les organites cellulaires sont endommagés, le PPO se mélange à son substrat (composés phénoliques), catalysant l'oxydation des mono-phénols en o-diphénols. Une réaction de polymérisation convertit ensuite les o-diphénols en quinones. Pendant le stockage, les quinones polymérisent de manière non enzymatique pour produire des polymères hétérogènes foncés appelés mélanines qui sont visibles à la surface coupée des tissus. Les conséquences de ces réactions sont principalement la diminution de la durée de conservation et la perte des qualités organoleptiques du fruit par oxydation de ses composés phénoliques endogènes (**Yoruk and Marshall, 2003 ; Al-Jassabiet al., 2013; Taranto et al., 2017**).

Egalement, le phénomène de brunissement des fruits et légumes est lié à l'activité de peroxydase (POD) (**Al-Amrani et al., 2020**). La peroxydase est une enzyme contenant de l'hème qui

utilise divers peroxydes comme donneur d'hydrogène pour catalyser un certain nombre des réactions oxydatives. Ainsi, la POD est responsable de la détérioration du goût et de la couleur des produits horticoles. En présence de peroxyde d'hydrogène, qui est un produit de la réaction du PPO avec des composés phénoliques, la POD catalyse l'oxydation des composés phénoliques, entraînant la production des composés bruns (**Amiour et Hambaba, 2016**). Tandis que, la contribution relative de ces enzymes de brunissement (PPO et POD) varie selon les espèces (**Kaewjumpol et al., 2021**).

Au cours des dernières décennies, les produits formés au cours du brunissement enzymatique font un problème majeur aux productions des différents produits alimentaires (fruits et légumes). De ce fait, diverses méthodes ont été développées pour prévenir et/ou atténuer ce phénomène afin d'améliorer la qualité du produit, d'allonger la durée de conservation et de contrôler l'activité enzymatique. Par conséquent, ces méthodes sont attribuées pour inactiver les enzymes de brunissement ou pour éviter le contact entre l'enzyme et son substrat, soit en ajoutant des solutions d'antioxydants, soit en maintenant l'intégrité structurelle de l'aliment (**Ioannou, 2013**).

Bien que les solutions antioxydantes soient les piègeurs de ERO les plus efficaces ; ils peuvent réduire les niveaux de ERO dans les organismes et retarder le brunissement (**Dou et al., 2021**). En fait, les antioxydants peuvent réagir avec l'oxygène pour supprimer l'initiation du brunissement. Ils sont également capables de réagir avec des intermédiaires, stoppant ainsi la réaction en chaîne et inhibant la réalisation de la mélanine (**Moon et al., 2020**). Généralement, l'acide ascorbique et ses dérivés et les sulfites sont des antioxydants largement étudiés pour prévenir le brunissement des fruits (**Dias et al., 2020**).

Cependant, compte tenu des risques pour la santé et de la toxicité des antioxydants synthétiques, les consommateurs exigent actuellement le remplacement des composés synthétiques par des composés naturels dérivés de plantes, de sous-produits agricoles et de déchets comme ingrédients alimentaires (**Venturi et al., 2019**). Les avantages apportés par les extraits de plantes en tant que conservateurs naturels, entre autres, tels que faible toxicité, faible coût, biodégradabilité, renouvelabilité, etc. Ces dernières années, l'intérêt pour les composés phénoliques végétaux s'est accru. Ils servent d'excellents agents anti-brunissement et antioxydants en raison de leurs multiples groupes hydroxyle et de leur structure cyclique phénol (**Hamdan et al., 2022**).

De nombreuses études ont rapporté l'utilité d'extraits de plantes provenant de différentes parties de plantes (feuilles, fleurs, fruits et graines) comme additifs anti-brunissement et

antioxydants pour les aliments (Moon et al., 2020 ; Kaewjumpol et al., 2021 ; Hamdan et al., 2022). Par conséquent, il existe des rapports très limités qui parlent de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques dans les dattes pendant la maturation et le stockage (Al-Amrani et al., 2020). Dans cette perspective, la présente étude a été conçue pour sélectionner les extraits naturels les plus prometteurs pour les activités antioxydantes et anti-brunissement des sous-produits du palmier dattier (pédicelle, périanthe et palmes), de cinq variétés à savoir Ghars, Deglet Nour, Tezerzait, Bent Keballah et Tadala de la région Metlili-Ghardaïa. Suivant la recherche bibliographique élaborée, ce travail sur l'étude du potentiel de ces sous-produits dans l'atténuation de l'oxydation et du brunissement est représenté une originalité scientifique.

Pour cela, le programme de recherche s'articule autour de trois parties : la première partie de ce travail a été consacrée à la préparation des extraits végétaux, à l'étude phytochimique des extraits préparés puis au dosage des phénols totaux et flavonoïdes. La seconde partie a été focalisée sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenues par la mesure *in vitro*, de leur effet piègeur du radical libre DPPH (Test de DPPH $\cdot$), leur pouvoir réducteur ferrique (Test de FRAP), et leur propriété antioxydante vis-à-vis le radical cationique ABTS $\cdot^+$. Tandis que, la troisième partie a été destinée à l'examen de l'activité anti-brunissement enzymatique de ces extraits par la mesure *in vitro* de leur pouvoir inhibiteur de lapolyphénol oxydase et la peroxydase. Enfin, nous avons concentré notre étude à la caractérisation des extraits prometteurs.



Partie expérimentale





Matériel et Méthodes

I. 1. Produits 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) (**Tableau1**).

Tableau 1 : Liste des produits chimiques utilisés dans ce travail.

Produits	Marque
Acide chlorhydrique (HCl) (37%), Hydroxyde de sodium (NaOH), Phosphate de sodium dibasique dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O), Phosphate de sodium monobasique dihydraté (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), pyrocatechol, 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s triazine (TPTZ) (C ₁₈ H ₁₂ N ₆), Chlorure de sodium (NaCl), Sulfate de fer (II) heptahydraté (FeSO ₄ .7H ₂ O), Réactif Folin-Ciocalteu, Acide gallique (C ₇ H ₆ O ₅), l'acide sulfurique (H ₂ SO ₄), CCM analytique, dichlorométhane (CH ₂ Cl ₂), Acide acétique (CH ₃ COOH), Méthanol (CH ₃ OH), Ethanol (C ₂ H ₆ O), Guaiacol (C ₇ H ₈ O ₂), polyvinylpyrrolidone, ABTS (2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂),	Sigma Aldrich
Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃).	Pearce
Chlorure d'aluminium AlCl ₃ .	Fluka
Chlorure de fer (FeCl ₃),	Biochem
Hydroxyde d'ammonium (NH ₄ OH),	Cheminova
Anhydride acétique (C ₄ H ₆ O ₃), Réactif de Fehling, Acide ascorbique (C ₆ H ₈ O ₆).	Prolabo

I.2. Matériel végétal

Le matériel végétal étudié est présenté par certains organes du *Phoenix dactylifera* L., de cinq variétés (Ghars, Deglet Nour, Tadala, Tezerzait et Bent Keballah) d'origine d'une palmeraie à Metlili, située à 40 Km du centre de la Wilaya de Ghardaïa. La récolte a été effectuée au cours du mois Octobre 2015.

Pour cette étude, les dates de cinq variétés sélectionnées ont été utilisées au stade de maturation, tamer. Les échantillons uniformes et sans dommages ont été triés et stockés dans un

congélateur à -20°C jusqu'à une analyse plus approfondie. Les périanthes, les pédicelles et les palmes du *Phoenix dactylifera* L., des mêmes variétés, ont été sélectionnés pour être testés comme inhibiteurs du brunissement enzymatique des dattes et évalués leur pouvoir antioxydant.

I.2.1. Zone d'échantillonnage

La matière végétale a été récoltée au niveau de la région de Metlili (Wilaya de Ghardaïa). Cette région est située à 600 km au sud de la capitale de l'Algérie (Alger). La Daïra de Metlili se situe à $32^{\circ}21'$ Nord, $3^{\circ}31'$ Est et à une altitude moyenne de 542 mètres, avec une superficie de 7300 Km^2 , 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 (**Ben Semaoune, 2008**).

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 vitesse moyenne annuelle du vent est de 12,1 Km/h . Le climat de la région est classé aride, avec une pluviométrie rare et aléatoire, dont la précipitation totale annuelle atteint 22,86 mm/an . La température est caractérisée par une amplitude journalière et saisonnière importante, dont elle a noté 23°C comme moyenne annuelle (**Tutiempo, 2020**).

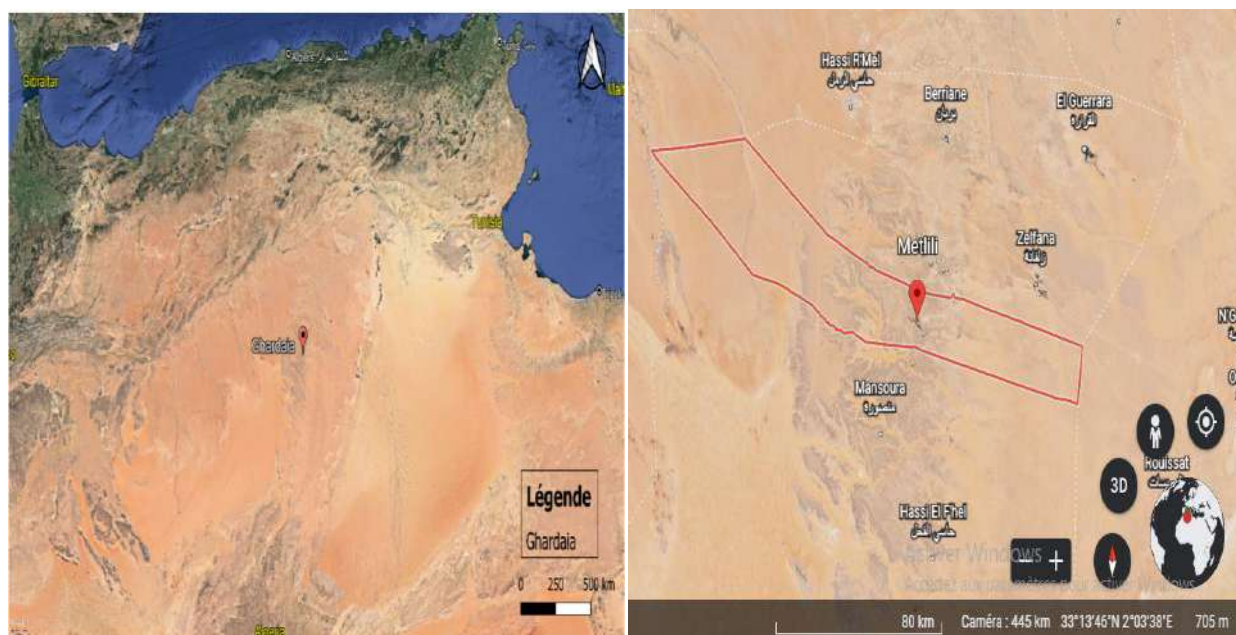


Figure 1: Localisation de la région de Metlili dans la wilaya du Ghardaïa (Google earth).

I.2.2. *Phoenix dactylifera* L.

Phoenix dactylifera L., également connu sous le nom du palmier dattier, est l'une des espèces les plus importantes de l'écosystème oasien en raison de son adaptation aux climats rigoureux des régions chaudes et sèches (**Toutain, 1979**). Il fait partie de la famille des *Arecaceae* et de l'ordre des *Arecales*. *Dactylifera* est l'une des douze espèces du genre *Phoenix* (**Munier et al., 1973**).

Le palmier dattier est une espèce monocotylédone, arborescente à croissance apicale dominante avec un stipe de 20 à 30 mètres de haut, portant une couronne de palmes (4 à 7 m de longueur). En général, une fois adulte, le diamètre du tronc reste stable dans les mêmes conditions. Les vieilles cicatrices palmaires recouvrent régulièrement le stipe (**Munier et al., 1973; Zaid et Arias-Jimenez, 2002**). De plus, c'est une plante vivace 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 (**Chaibi, 2002; Aberlenc-Bertossi, 2017**).

Le fruit du dattier, connu sous le nom de datte, contient un seul grain communément appelé noyau et a une forme ovale à cylindrique. Un mésocarpe de couleur charnu protégé par un péricarpe fin constitue la datte. Le noyau est entouré d'un endocarpe, de forme angulée, plus ou moins volumineux, ainsi sa consistance est dure et cornée (**Munier, 1973**). Selon les cultivars, la couleur des dattes peut être jaune plus ou moins clair, jaune ambré translucide, brun plus ou moins prononcé, rouge ou noire. Également, sa consistance peut être molle, demi-molle ou dure, ces dernières sont dites dattes sèches à cause de l'aspect farineux de leur chair (**Munier, 1973; Toutain, 1979**).

I.2.3. Choix du matériel végétal

La matière végétale utilisée dans ce travail consiste le cultivar « Deglet Nour » qui préside les marchés mondiaux, et autres quatre cultivars Ghars, Tadala, Tezerzait et Bent Keballah de dattes algériennes. Les cinq variétés sont choisies en fonction de leur mérite gastronomique, de leur qualité marchande et de leur large consommation au niveau national. Aussi, les cultivars choisis sont les plus largement trouvés dans les palmeraies de la région de Ghardaïa. Le **Tableau 2** représente quelques caractéristiques des variétés des dattes étudiées.

Tableau 2 : Quelques caractéristiques des variétés des dattes étudiées (**Belguedj et Trichine, 2011**).

	Deglet Nour	Ghars	Tadala	Tezerzait	Bent Keballah
Synonymes locaux	Elketnoor, degla	Ighes, ghudane	Taddela, adelt	Azerza, tazerzayt, tazerza	Bent qbala, bent khabala
Date de maturité	Novembre	Aout, Septembre	Aout, Septembre	Septembre, Octobre	Septembre, Octobre
Utilisation de la datte	Fraiche, conservée	Fraiche, conservée	Fraiche, conservée	Fraiche, conservée	Fraiche, conservée
Mode de la conservation	Froid, sacs	Ecrasé, pilé	Froid, sacs, écrasé	Ecrasé, pilé	Froid, écrasé,
Couleur de la datte	Miel	Ambrée	Marron clair	Miel	Miel
Consistance de la datte au stade utilisé	Molle	Molle	Molle	Molle	Molle
Gout	Parfumé	Parfumé	Parfumé	Parfumé	Parfumé
Texture	Fibreuse	Fibreuse	Fibreuse	Fibreuse	Fibreuse

La majorité des wilayas du Sahara abritent la culture des variétés du palmier dattier retenues dans cette étude. Chaque ensemble de cultivars est en fait adapté à une ou plusieurs régions en fonction des conditions climatiques (**Belguedj, 2002**).

Les régions phéniciennes s'étendent sur 17 wilayas et sont majoritairement situées au sud de l'Atlas saharien. Selon les statistiques de Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (**MADR, 2022**), la wilaya de Ghardaïa est classée au cinquième rang national en termes de production des dattes. Le **Tableau 3** qui suit décrit la production des dattes dans la région de Metlili.

Tableau 3 : Production des dattes par la compagne agricole de la Daïra de Metlili (**Direction des Services Agricoles de Ghardaïa, 2021**).

	Région	Deglet Nour (Dattes fines)	Ghars et Analogues (Dattes molles)	Deglet Beida et Analogues (Dattes sèches)	Total
Nombre de palmiers existants	Metlili	66 882,00	27 069,00	88 414,00	182 365,00
	Seb Seb	16 789,00	5 475,00	26 362,00	48 626,00
Production dattes (Qx)	Metlili	32 034	14 274	51 704	98 012,00
	Seb Seb	7 729	3 134	10 402	21 265,00

I.3. Méthodes

I.3.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons constitue la première étape de toute analyse et très importante pour des résultats fiables. La connaissance de la nature et la forme de l'échantillon (dur et massif, échantillon biologique, poudre, ...), l'information recherchée et la composition de l'échantillon permettent de mettre en place la méthode de préparation d'un échantillon. Dans ce travail, nous avons utilisé deux types des échantillons, les dattes comme source d'extrait enzymatique et les différents organes du *Phoenix dactylifera* L. comme source des molécules bioactives a une capacité d'inhiber l'activité des deux enzymes PPO et POD.

Souvent, une quantité des dattes de cinq variétés (Ghars, Deglet Nour, Tadala, Tezerzait et Bent Keballah) sont récoltées d'une palmeraie de la région de Metlili – Ghardaïa puis acheminées au laboratoire (**Figure 2**). Les dattes ont été sélectionnées d'une manière aléatoire, mais d'une façon uniforme en termes de taille, de couleur et du stade de la maturation complète, tamar. Au cours de laquelle, les dattes présentent une couleur brunâtre, une texture douce et un aspect ridé. Les fruits perdent une grande partie de leur humidité et la teneur en sucre atteint des valeurs proches de 72 à 88% de la matière sèche à maturation (**Hasnaoui et al., 2011 ; Fernandez-Lopez et al., 2022**).

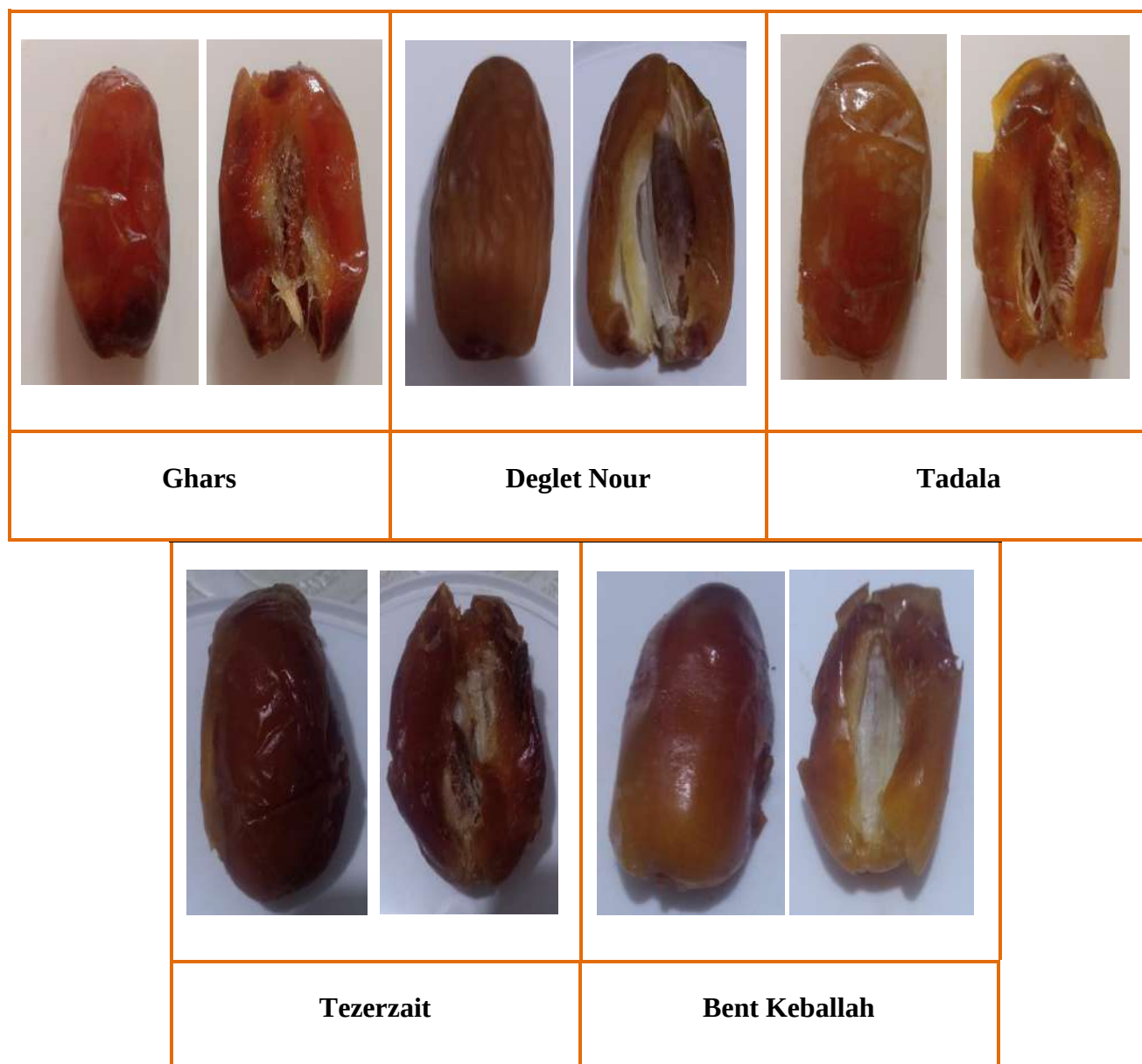


Figure 2: Dattes de cinq variétés étudiées (Bensania, 2023)

Avant de la conservation des dattes à - 20°C, nous avons effectué un triage à fin d'éliminer toutes les dattes qui sont moins matures, écrasées ou agressées par les oiseaux et les insectes. Après, on fait un lavage des dattes par l'eau distillée à pour but d'écarter les particules de terre, les poussières et les débris végétaux.

Les autres échantillons (périanthes, pédicelles et palmes) sont nettoyés et débarrassés de poussières et d'autres impuretés par l'eau distillée, puis séchés à température ambiante, à l'ombre et sous aération continue jusqu'à le séchage complète (**Figure 3**). Ensuite, les trois échantillons

complètement séchés ont été broyés en poudre fine qui a été conservée dans des bouteilles en verre hermétiquement fermés, étiquetés et stockées à l'abri de l'humidité jusqu'à l'utilisation.

**(a)****(b)****(c)**

Figure Error! Bookmark not defined.: Différents organes étudiés du palmier dattier, (a) : palme, (b) : pédicelle, (c) : périanthe (**Bensania, 2019**)

I.3.2. Préparation des extraits végétaux

L'extraction consiste à arracher le maximum des substances actives contenues dans l'échantillon par l'utilisation de différentes méthodes selon la nature des composés à extraire. En raison de sa facilité de manipulation, la température ambiante, l'utilisation de moindres quantités de solvant et de sa grande reproductibilité, la méthode de macération est celle utilisée dans la présente étude pour extraire les biomolécules. En effet, la macération comprend à laisser reposer la matière végétale dans un solvant pendant une durée déterminée, à fin d'extraire les principes actifs tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes (**Hamia et al., 2014**).

Protocole expérimental

Selon la méthode décrite par **Djeridane et al. (2006)**, l'extraction est réalisée avec quelque modification. Brièvement, une quantité de 1g de poudre précédemment obtenu 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 48 heures à température ambiante et à l'obscurité pour de prévenir les phénomènes d'oxydation et l'évaporation de solvant d'extraction. Les macérats ont été filtrés sur papier Wattman et les filtrats obtenus ont été évaporés à sec par un évaporateur rotatif de type Heidolph (HeizbadHei-VAP). Les résidus sont repris dans un volume déterminé de

mélange méthanol-eau et les conservés dans un tube en verre hermétiquement fermé à 4°C jusqu'à leur étude.

Détermination du rendement d'extraction

La masse de l'extrait après évaporation du solvant est appelée rendement d'extraction, elle s'exprime en pourcentage (%) par rapport à la masse de départ de la plante soumise à l'extraction. Le rendement est déterminé selon la formule suivante : $R(\%) = (P1 - P2/P3) \times 100$.

P1: poids du ballon après évaporation ;

P2: poids du ballon vide;

P3: poids de la matière végétale de départ (**Mahmoudi et al., 2013**).

I.3.3. Screening phytochimique des extraits

La présence de familles des molécules actives est révélée par le criblage phytochimique qui est un ensemble des tests qualitatifs utilisés pour déterminer la constitution chimique des extraits. Ces tests sont fondés sur des procédés de précipitation ou réactions de coloration. Les observations faites sous lampe UV peuvent également être utiles.

Les molécules mises en évidence pour les différents organes étudiés du *Phoenix dactylifera* L. sont : les composés phénoliques (comme les flavonoïdes, les tanins, les quinones libres et les coumarines), les composés terpéniques (terpénoïdes, stéroïdes et saponines), les composés azotés (alcaloïdes) et les composés réducteurs. Le **Tableau 4** illustre les divers groupes chimiques sélectionnés pour les tests et les réactifs spécifiques utilisés ainsi que les résultats positifs.

Tableau 4: Différents tests de criblage phytochimique

Groupes chimiques	Protocol	Résultats positifs
Tanins	• 0.2mL d'extrait • quelque gouttes FeCl₃ à (1%) • incubation pendant 15 min à 50°C	La présence des tanins est indiqué par une coloration verdâtre ou bleu noir (Trease et Evans, 1987)
Flavonoïdes	• 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. (Paris, 1969).
Coumarines	• 2mLd'extrait • 3mLNaOH (10%)	L'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines (Rizk, 1982).
Quinones libres	• 5mL d'extrait • gouttes de NaOH (1%)	Le développement d'une couleur qui vire au jaune rouge ou violette (Oloyede, 2005).
Alcaloïdes	• 1mL de chaque extrait • 5mL d'acide chlorhydrique à 1% Mélange /2 (M1, M2) • M1 : traité par 5 gouttes de réactif de Mayer • M2 : traité par 5 gouttes de réactif de Wagner	La formation d'un précipité blanc ou brun révélé la présence des alcaloïdes (Majob et al., 2003).
Terpénoïdes	• 5 mL d'extrait • 2mL d'anhydride acétique • 1mL d'acide sulfurique	L'apparition d'une couleur mauve ou violette indique un test positif (Ayoola, 2008).

Stéroïdes	• 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(Bhandary et al., 2012).
Composés réducteurs	• 1 mL de l'extrait • 2mL d'eau 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 (Khandelwal, 2006)
Saponosides	• 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 (Kumar, 2009).

I.3.4. Analyse quantitative

I.3.4.1. Dosage des phénols totaux

Principe

Les différents extraits des organes végétatifs du *Phoenix dactylifera* L. ont été dosés à l'aide d'une méthode colorimétrique mise au point par **Singleton et Ross (1965)**, par l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu, qui est modifié sa propriété colorimétrique en interagissant avec des molécules spécifiques (**Bahorun, 1997**).

Ce réactif est formé d'un mélange d'acide phosphotungestique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) qui ont été réduits en oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) par les phénols dans un milieu basique. Ces produits de réduction présentent une absorption maximale à 760 nm et ils sont proportionnels à la quantité des phénols totaux trouvés dans l'extrait analysé. Les résultats d'absorption obtenus sont traduits en des valeurs massiques à l'aide d'une courbe d'étalonnage standard d'acide gallique (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Mode opératoire

Dans des tubes à essais, 100 μL de chaque extrait des organes végétatifs du *Phoenix dactylifera* L. sont ajoutés à 500 μL de Folin-Ciocalteu dilué dix fois, bien mélanger et laisser pendant 5 minutes dans l'obscurité et à température ambiante. Ultérieurement, 2 mL de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2%) ont été ajoutés dans les tubes qu'ils sont bien agités et ensuite incubés à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après 30 minutes d'incubation, pour chaque solution, la lecture de la densité optique a été déterminée à 760 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS (SpectroScan 40).

Dans les mêmes paramètres de fonctionnement, une courbe d'étalonnage est réalisée simultanément en utilisant différentes concentrations d'acide gallique comme contrôle positif. Toutes les mesures sont effectuées en triplicata. Les concentrations des phénols totaux contenues dans les extraits du palmier dattier pour les cinq variétés sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage d'acide gallique (**Figure 10**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par un gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g).

I.3.4.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

Le contenu des extraits en flavonoïdes a été mesuré par la méthode modifiée de **Lamaison et Carnat (1991)** avec le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). En effet, le chlorure d'aluminium réagit avec les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes formant un complexe flavonoïde- Al^{3+} stable qui produit une coloration jaunâtre dorée instantanée dont l'intensité est proportionnellement à la concentration de flavonoïdes dans l'échantillon (**Ekpo et al., 2020**).

Afin de quantifier les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits, une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde étalon, la rutine, a été tracée.

Mode opératoire

Brièvement, 1 mL d'extrait est ajouté à 1 mL de solution de chlorure d'aluminium AlCl_3 à 2%, ainsi le mélange est vigoureusement agité. Après 20 min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue dans le même spectrophotomètre à une longueur d'onde de 409 nm contre un blanc. Egalement, les mêmes procédures ont été effectuées pour la rutine à

différentes concentrations, ainsi les valeurs de l'absorbance obtenues nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la rutine (**Figure 11**). Toutes les expériences sont effectuées en triplicata.

Les concentrations des flavonoïdes contenues dans les différents extraits sont calculées, en se référant à la courbe d'étalonnage de la rutine. Les résultats sont exprimés en mg équivalent la rutine par un gramme de la matière végétale sèche (mg ER/g).

I.3.5. Activité antioxydante

La capacité d'un composé à ralentir ou empêcher la production des radicaux libres est nécessaire pour déterminer dans quelle mesure il peut les piéger. La mise en évidence du pouvoir antioxydant et anti-radicalaire des extraits des différents organes du palmier dattier (périanthes, pédicelles et palmes) a été réalisée par trois tests chimiques *in vitro* : test du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl); test du FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) et test d'ABTS (2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)).

I.3.5.1. Test du DPPH

Principe

La mesure de l'activité anti-radicalaire des différents extraits a été examinée dans un premier lieu par le test du DPPH suivant le protocole décrit par **Lee et al. (1998)**. La réduction d'une espèce radicalaire en présence d'un donneur d'hydrogène (antioxydant), c'est le principe de ce test.

Le test DPPH est un test colorimétrique basé sur une mesure spectrophotométrique de la capacité d'une espèce antioxydante à réduire les radicaux DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) de couleur violette en solution de couleur jaunâtre (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine), lorsque leurs électrons non appariés sont appariés avec l'hydrogène de l'antioxydant. Le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un extrait végétal peut être déterminé par le suivi de la décoloration à l'aide de spectrophotométrie à une longueur d'onde 517 nm donc une faible absorbance indique une meilleure activité anti-radicalaire (**Figure 4**) (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Bougateg et al., 2009 ; Christodoulou et al., 2022**).

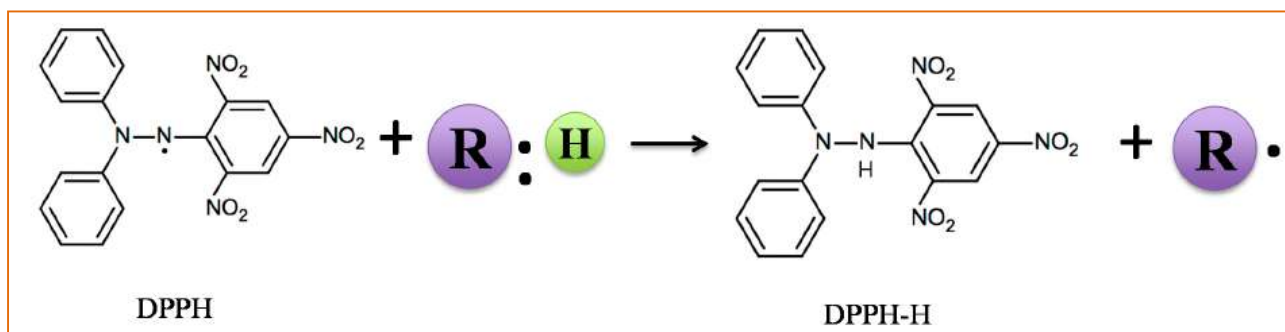


Figure 3: Réduction du radical libre DPPH• en présence d'antioxydant (Liang et Kitts, 2014).

Mode opératoire

Pratiquement, un volume de 100 μ L des différentes concentrations des solutions d'extraits et des antioxydants de référence, qui ont été solubilisés dans le méthanol, sont ajoutés à 1 mL de la solution méthanolique du DPPH (250 μ M). Le milieu réactionnel est agité vigoureusement puis laissé à l'obscurité pendant 30 minutes pour permettre à la réaction de se produire. L'absorbance du mélange est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible à 517 nm. A titre de comparaison, la puissance anti-radicalaire des standards (Trolox et acide ascorbique) a été mesurée en utilisant la même méthode que ci-dessus.

À partir des mesures de la densité optique de chaque extrait ou antioxydant de référence à différentes dilutions, le pourcentage d'inhibition du DPPH a été calculé à l'aide de la formule suivante (Yu et al., 2004).

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_{\text{Témoin}} - A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{Témoin}}) * 100$$

Où : $A_{\text{Témoin}}$: désigne l'absorbance de DPPH• seul sans antioxydant.

$A_{\text{Echantillon}}$: représente l'absorbance de DPPH• en présence de l'antioxydant.

Ensuite, le traçage du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des extraits ou des antioxydants standards choisis a permis d'obtenir la concentration EC_{50} qu'elle s'agit la concentration nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH• (Dieng et al., 2017).

I.3.5.2. Test de FRAP

Principe

La capacité réductrice de nos extraits a été estimée en utilisant la méthode décrite par **Benzie et Strain (1996)** avec quelques modifications. La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est un essai simple, rapide, peu coûteuse et ne nécessite aucun équipement particulier. Elle est universelle, peut être appliquée aussi chez des plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (**Bougandora et Bendimerad, 2013**).

Ce test est basé notamment sur la mesure de l'aptitude des agents antioxydants en milieu acide à réduire le complexe ferrique-tri(2-pyridyl)triazine (Fe^{+3} -TPTZ) en un complexe ferreux-tri(2-pyridyl)triazine (Fe^{+2} -TPTZ) de couleur bleu intense mesurable à 593 nm. Alors, l'augmentation de l'absorbance suggère que l'extrait a une puissante capacité réductrice (**Ou et al., 2002 ; Ghaisas et al., 2008**). Par conséquent, l'indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'une molécule est son pouvoir réducteur (**Gheffour et al., 2015**).

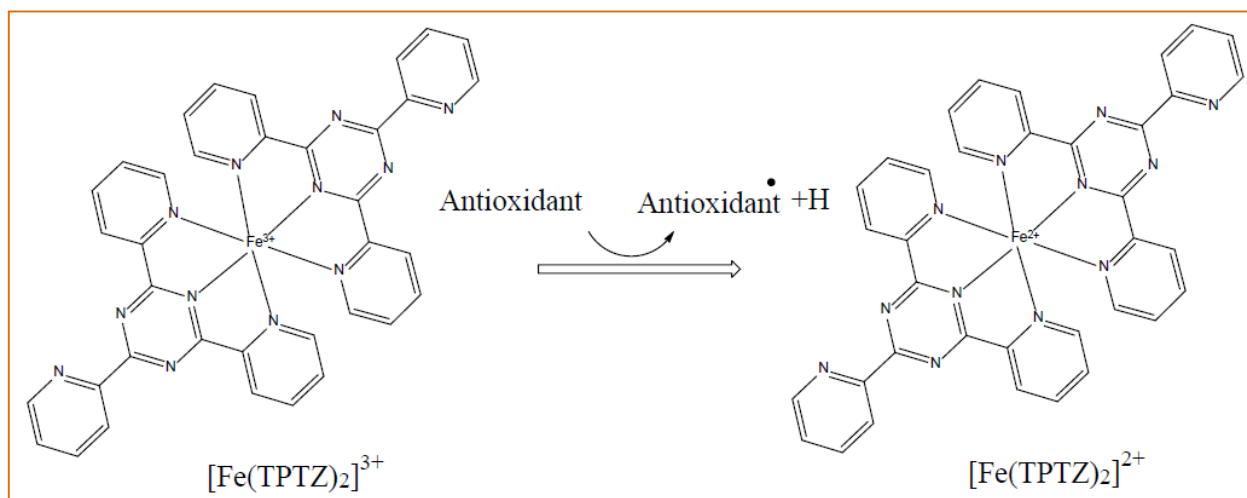


Figure 4: Réduction du tri(2-pyridyl)triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en présence d'antioxydant (**Christodoulou et al., 2022**).

Mode opératoire

Brièvement, 100 μL de chaque extrait est mélangé avec 1 mL du réactif FRAP qui est formé par le mélange de 25 mL du tampon d'acétate (300 mM, pH 3,4), 2,5 mL de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) et 2,5 mL de la solution du trichlorure de fer ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM). La variation de l'absorbance à 593 nm est déterminée après une incubation pendant 7 min à température ambiante.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le FeSO_4 comme étalon. Les résultats sont exprimés en des valeurs de FEAC (Ferroussulphate Equivalent Antioxydant Capacity): mmol/mL de fer ferreux (mmol/ml Fe^{2+}) par l'utilisation de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de FeSO_4 . Dans un souci de comparaison du pouvoir réducteur de nos extraits, nous avons testé l'acide ascorbique et le Trolox qui sont pris comme des antioxydants de référence.

I.3.5.3. Test d'ABTS

Principe

La capacité des extraits des périanthes, des pédicelles et des palmes à piéger le radical stable 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) est déterminée par une méthode décrite par **Cano et al. (1998)**.

Le test d'ABTS est basé sur la transformation du radical cationique $\text{ABTS}^{\bullet+}$ de coloration vert bleu en ABTS incolore grâce à la présence d'un antioxydant. Le radical préformé ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) a été produit par oxydation d'un électron d'ABTS avec un système enzymatique contenant une peroxydase et le peroxyde d'hydrogène (**Villaño et al, 2004**).

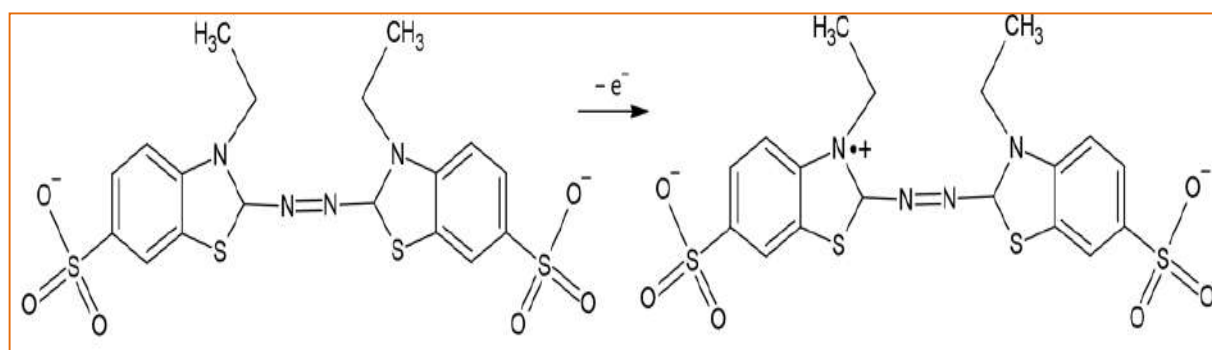


Figure 5: Formation du radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (**Kut et al., 2022**).

Le dosage du radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) est basé sur la mesure de la décoloration après l'addition d'une substance susceptible à un effet antioxydant. Quand une solution du radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) est mélangée avec un composé donneur d'électron / hydrogène, la forme réduite du radical est générée et accompagnée d'une perte de couleur qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 415 nm (**Chen et al., 1997**).

Mode opératoire

En brièvement, le complexe bleu vert du radical (ABTS^{•+}) est formé par le mélange d'une peroxydase (0,2 mg/mL dans un tampon phosphaté à un pH=6,8), peroxyde d'hydrogène (1mM) et d'une solution aqueuse d'ABTS (20mM). La réaction est démarrée par l'ajout de 100 µL de chaque dilution de l'extrait à un 1 mL de la solution radicalaire d'ABTS^{•+}. Après une incubation pendant 5 min à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est réalisée à 415 nm en utilisant le même spectrophotomètre utilisé pour les procédures expérimentales précédentes.

L'activité antioxydante liée à l'effet de neutralisation du radical d'ABTS^{•+} est calculée en pourcentage d'inhibition à l'aide des densités optiques de différentes dilutions d'extrait et la formule suivante (Dieng et al., 2017):

$$\% \text{d'inhibition} = (A_{\text{Témoin}} - A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{Témoin}}) * 100$$

Où,

$A_{\text{Témoin}}$: désigne l'absorbance d'ABTS^{•+} seul sans échantillon (antioxydant).

$A_{\text{Echantillon}}$: représente l'absorbance d'ABTS^{•+} en présence d'échantillon (l'antioxydant).

Ensuite, le traçage du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration des extraits ou des antioxydants standards choisis a permis d'obtenir la concentration EC₅₀ qu'elle s'agit la concentration d'échantillon nécessaire pour neutraliser 50% des radicaux libres (Dieng et al., 2017). Ce test permet alors, d'obtenir des informations sur le pouvoir anti-radicalaire de nos extraits comparativement au Trolox et l'acide ascorbique prisent comme des antioxydants de référence.

I.3.6. Mesure de l'activité anti-enzymatique

La mesure de l'activité anti-enzymatique a été déduite pour les deux enzymes PPO et POD qui ont été intervenu dans le processus du brunissement enzymatique. A cet effet, différents extraits des organes du palmier dattier (périanthes, pédicelles et palmes) de cinq variétés (Ghars, Deglet Nour, Tadala, Tezerzait et Bent keballah) 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 guaiacol comme des substrats respectivement.

I.3.6.1. Préparation des extraits enzymatiques

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 100 mL d'une solution de tamponphosphate 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 une filtration sous vide.

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.3.6.2. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

Principe

L'estimation des quantités des protéines de chaque extrait enzymatique brut est réalisée 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 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. Les concentrations protéiques ont été calculées par une courbe d'étalonnage de l'albumine sérique bovine.

Mode opératoire

Un volume de 0,1 mL d'extrait de protéine est ajouté à 2,5 mL du réactif de bleu de Coomassie (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 le filtrat est maintenu à froid (4°C) jusqu'à le dosage). 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. 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 6**).

I.3.6.3. Mesure de l'activité enzymatique

I.3.6.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la PPO

Plusieurs méthodes aient été inventées pour déterminer l'activité de la polyphénol oxydase. Souvent, 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.

Principe

Dans cette étude, l'activité enzymatique de la PPO des dattes a été mesurée suivant le protocole décrit par **Lee et al. (2007)** à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant comme substrat le pyrocatechol. L'oxydation du pyrocatechol se traduit par la production de l'o-benzoquinone d'une couleur rouge-brun mesurable à 420 nm (**Waite, 1976, Yoruk et Marshall, 2003**).

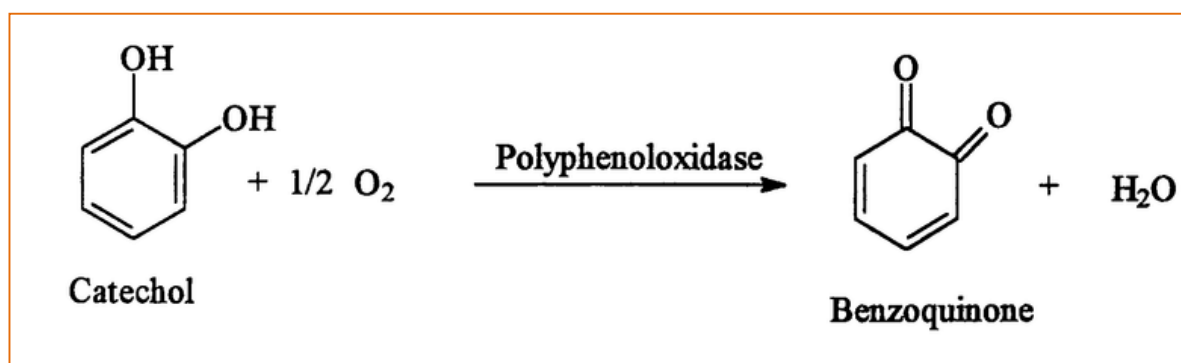


Figure 6: Oxydation du catéchol par PPO (**Dutta et Sarkar, 2014**)

Mode opératoire

Un mélange de 0,95 mL de tampon phosphate (0,1M, pH 6,8) et 0,05 mL d'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 valeur adoptée pour le coefficient d'extinction moléculaire d'o-benzoquinone est 1417 M⁻¹.cm⁻¹. Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme qui produit 1 µmol d'o-benzoquinone par min (**Gouzi et al., 2012**).

La vitesse initiale (V₀) a été déterminée à l'aide de la pente de la partie linéaire du tracé des densités optiques 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 calculés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk.

I.3.6.3.2. Mesure de l'activité enzymatique de la POD

Principe

Le protocole décrit par **Ponce et al. (2004)** a été utilisé pour mesurer l'activité enzymatique de la peroxydase, le guaïacol servant de substrat, donneur d'hydrogène, en présence de peroxyde (H_2O_2) qui sera réduit en molécule d'eau. L'oxydation enzymatique du guaïacol produit un composé rouge rouille absorbant la lumière à environ 470 nm, le tétraguaïacol.

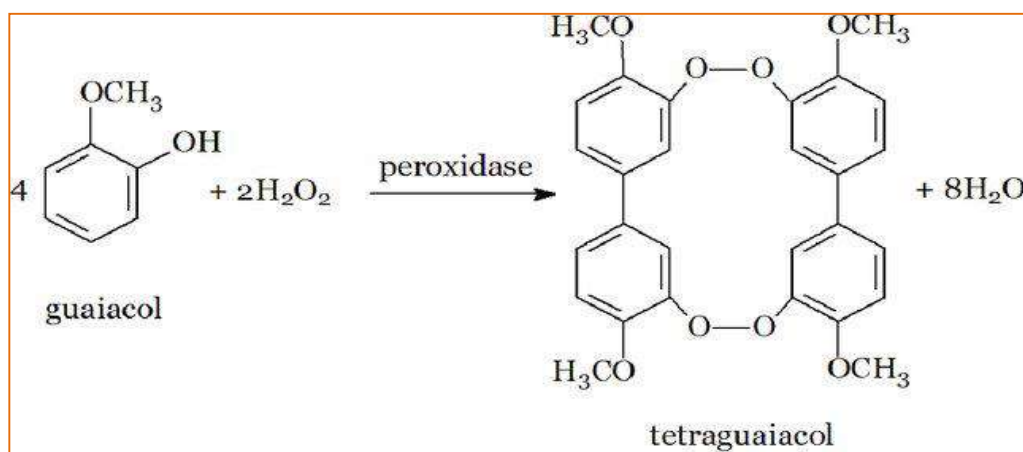


Figure 7: Oxydation du guaïacol en tétraguaïacol (**Radulescu et al., 2019**).

Mode opératoire

La solution du substrat a été préparée en mélangeant 1 mL du guaïacol (1%), 1 mL du peroxyde d'hydrogène (0,3%) et 10 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 6,8). La réaction enzymatique est menée à température ambiante par le mélange de 2,87 mL de la solution du substrat, 0,03 mL du tampon phosphate (0,1 M, pH 6,8) et 0,1 mL d'extrait enzymatique. L'activité enzymatique a été suivie par la mesure de la variation de l'absorbance à 470 nm.

La valeur adoptée pour le coefficient d'extinction moléculaire du tétraguaïacol est $5157,51 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme qui produit 1 μmol de tétraguaïacol par min (**Coupé et al., 1972**).

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 de l'enzyme (K_m et V_{max}) ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk.

I.3.6.4. Test d'inhibition**I.3.6.4.1. Mesure de l'activité anti-polyphénol oxydase**

Le protocole établi par **Lee et al., (2007)** a permis la mesure de l'activité de polyphénol oxydase en présence des extraits de différents organes étudiés du palmier dattier. Brièvement, un volume de 0,5 mL d'extrait (de périanthes, de pédicelles ou de palmes) a été mélangé avec 0,05 mL de l'extrait enzymatique et 0,45 mL de tampon phosphate (0,1M, pH6,8). 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.

Expression du taux d'inhibition (%) :

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

$$\%d'inhibition = (A_{\text{contrôl}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{contrôl}}) * 100$$

D'où :

$A_{\text{contrôl}}$: désigne l'absorbance du contrôl (en absence des extraits du palmier dattier) ;

A_{Extrait} : désigne l'absorbance en présence des extraits du palmier dattier.

I.3.6.4.2. 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. À une température ambiante, la variation de l'absorbance a été suivie à 470 nm.

Expression du taux d'inhibition (%) :

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

$$\%d'inhibition = (A_{\text{contrôl}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{contrôl}}) * 100$$

D'où :

$A_{\text{contrô}}$: désigne l'absorbance du contrôle (en absence des extraits du palmier dattier) ;

A_{Extrait} : désigne l'absorbance en présence des extraits du palmier dattier.

Ainsi, nous avons essayé de tester l'effet inhibiteur de l'acide ascorbique sur l'activité de la PPO et de la POD 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, les activités enzymatiques de la PPO et de la POD ont été mesurées, en utilisant le pyrocatechol et le guaiacol comme des substrats respectivement.

I.3.7. Caractérisation des molécules bioactives

L'analyse qualitative des extraits végétaux bruts est une opération demandant un passage précieux de plusieurs étapes. Le choix efficient de l'étape assure ultérieurement un bon résultat avec le minimum de difficultés. Selon les moyens mis à notre disposition, la procédure de caractérisation des extraits comprend une étape d'extraction des composés d'intérêts, puis une étape de purification par chromatographie sur colonne et enfin une étape de caractérisation par LC-MS.

Les procédures de la purification et de caractérisation s'effectuent pour la variété Ghars du *Phoenix dactylifera* L.. Le choix du matériel végétal est fixé sur les extraits des deux organes étudiés du palmier dattier pour cette variété (périanthes et pédicelles) qui sont démontrés des taux d'inhibition les plus élevés.

***Analyse par CCM**

Les extraits issus de l'extraction, qui sont toujours de composition chimique très complexe, sont soumis à des méthodes de séparation. Plusieurs techniques chromatographiques ont été employées soit individuellement, soit combinées pour la séparation de divers constituants d'un mélange. Les analyses sur couche mince des extraits ou fractions sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice. Les systèmes de solvant que nous avons employés sont constitués d'un mélange binaire de dichlorométhane et le méthanol en variant le rapport selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et après révélation. Après leur développement, les chromatogrammes sont révélés par la vanilline sulfurique suivie de chauffage à 100°C. L'utilisation du réactif sur les plaques de chromatographie sur couche mince après élution, permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes, d'obtenir des renseignements supplémentaires sur le type d'une molécule et éventuellement permettre de localiser certains composés invisibles sans dérivatisation chimique.

****Séparation par chromatographie sur colonne***

Dans la présente étude, le choix est fixé à la chromatographie sur colonne qui est une méthode préparative trouvée sa place dans tout les laboratoires et les études qui intéressées par les extraits végétaux. La séparation et la purification de nos extraits a été effectuée à l'aide d'une colonne ouverte en gel de silice à filtre au fond. Les différents métabolites secondaires sont séparés à l'aide d'un gradient d'élution dichlorométhane/méthanol (CH_2Cl_2 -MeOH) en commençant par le CH_2Cl_2 seulement puis en diminuant son volume jusqu'à la fin où le dernier lavage de la colonne se fait par le méthanol seulement. Les proportions utilisées sont comme suit : 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 % et finalement 100% du méthanol. Des fractions de 5ml ont été collectées et testées sur plaque CCM. Puis, les métabolites secondaires répartis dans les fractions collectées sont caractérisés par LC-MS.

****Analyse avec LC-MS***

L'analyse qualitative des constituants présents dans les extraits de périanthes et de pédicelles du palmier dattier, variété Ghars, a été performé en utilisant UPLC/ESI/MS/MS Shimadzu 8040 ultra-élevée sensibilité avec la technologie UFMS équipé avec une pompe binaire Nexera XR LC-20AD.

La séparation a été réalisée avec une colonne Ultra-force C18 (ID 4,6 mm × 150 mm, taille de particules 3 μm ; Restek) et la température du four était de 35 °C. La séparation chromatographique a été réalisée en utilisant un mélange de phase mobile A (eau, acide formique 0,1 %) et de méthanol comme phase mobile B en mode gradient comme suit : 0,1 min à 2 min A 95 %, 2 min à 15 min A 95 %, 15 min à 18 min A 5 %, 18 min à 20 min A 5 %, 25 min à 25 min A 95 %. Le débit a été établi à 0,4 mL/min et le volume d'injection était de 5 μL passé à travers un filtre Millex-LCR (PTFE) avec des tailles de pores de 0,22 μm . La séparation a été effectuée à température ambiante et l'analyse a duré 25 minutes.

Le MS/MS a utilisé les conditions ESI comme suit : 230 KPs de gaz CID ; dynode de conversion -6,00 Kv ; température d'interface 350 °C ; température DL 250 °C ; débit de gaz de nébulisation de 3,00 L/min, bloc chauffant à 400 °C ; débit de gaz de séchage de 15,00 L/min. Le spectromètre de masse à piège à ions a été utilisé à la fois dans les ions négatifs et positifs avec le mode MRM. Une identification précise a été faite en fonction de leurs fragments typiques et par comparaison avec les standards disponibles dans la base de données développée.

I.4. Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel Microsoft Office Excel (2007). Les résultats des tests effectués *in vitro* sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ déviation standard (SD), $n=3$. Une analyse à sens unique de test de variance, ANOVA (Statistica 10), accompagné du test HSD de Tukey a été appliquée pour déterminer la différence entre les parties du palmier dattier. Statistiquement, la différence avec une probabilité $p < 0,05$ a été jugée significative. Ainsi, une analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT 2014, afin de déterminer le coefficient de corrélation (coefficient de Pearson) et de faire l'évaluation en composantes principales (ACP) pour distinguer la relation entre les extraits en fonction de leur teneur en phénol et de leurs activités antioxydantes et anti-brunissements.



Résultats et Discussion

II.1. Rendements d'extraction des extraits végétaux

La préparation des extraits des différents constituants du *Phoenix dactylifera* L. a été réalisée par une méthode traditionnelle, la macération. De ce fait, une simple macération à froid a été réalisée pour la poudre des périanthes, pédicelles et palmes de cinq variétés locales du palmier dattier dans un solvant hydro-alcoolique (méthanol/eau) de rapport 8/2 (V/V) ; ces solvants sont plus utilisés pour une haute récupération de composés antioxydants. Néanmoins, l'utilisation de la poudre à pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage. D'autre part, les solvants organiques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (Satyajit et al., 2006).

Les résidus d'extraction sont pesés pour calculer le rendement ; celui-ci varie en fonction de l'espèce végétale, la richesse de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité. Généralement, les quinze extraits obtenus présentent un aspect pâteux pour tous les extraits avec des couleurs différentes. Ils ont subi une analyse biochimique et les étudiés pour leurs pouvoirs antioxydantset leurs activités anti-brunissements vis à vis deux enzymes des dattes des mêmes variétés sélectionnées (PPO et POD). La couleur et l'aspect de chaque extrait sont consignés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**).

Tableau 5: Aspect et couleur des extraits des différents organes du *Phoenix dactylifera* L.

Variété	Extrait	Couleur	Aspect
Ghars	Pédicelle	Marron claire	Pâteux
	Périanthe	Marron claire	Pâteux
	Palme	Verte	Pâteux
Deglet Nour	Pédicelle	Marron claire	Pâteux
	Périanthe	Marron claire	Pâteux
	Palme	Verte	Pâteux
Tadala	Pédicelle	Marron claire	Pâteux
	Périanthe	Marron claire	Pâteux
	Palme	Verte	Pâteux
Bent Keballah	Pédicelle	Marron claire	Pâteux
	Périanthe	Marron claire	Pâteux
	Palme	Verte	Pâteux
Tezerzait	Pédicelle	Marron claire	Pâteux
	Périanthe	Marron claire	Pâteux
	Palme	Verte	Pâteux

En général, les couleurs des extraits sont entre marron foncé, marron claire et verte. Par conséquent, la présence de plusieurs types de pigments (tels que les chlorophylles, les caroténoïdes, les anthocyanes, les flavones, les flavonoles, les lycopènes, les flavo-xanthine et les lutéines) peut être expliquée la variation de couleur entre les extraits (Hasnaoui et al., 2011 ; Al-Qarni and Bazzi, 2020 ; Alahyane et al., 2024).

Le rendement d'extraction a été déterminé par rapport au poids de matière végétale sèche rendu en poudre pour les différentes parties étudiées du palmier dattier (les périanthes, les

pédicelles et les palmes) pour les cinq variétés sélectionnées. Les résultats ont été exprimés en pourcentage (P/P) et ils sont représentés dans l'histogramme ci-dessous :

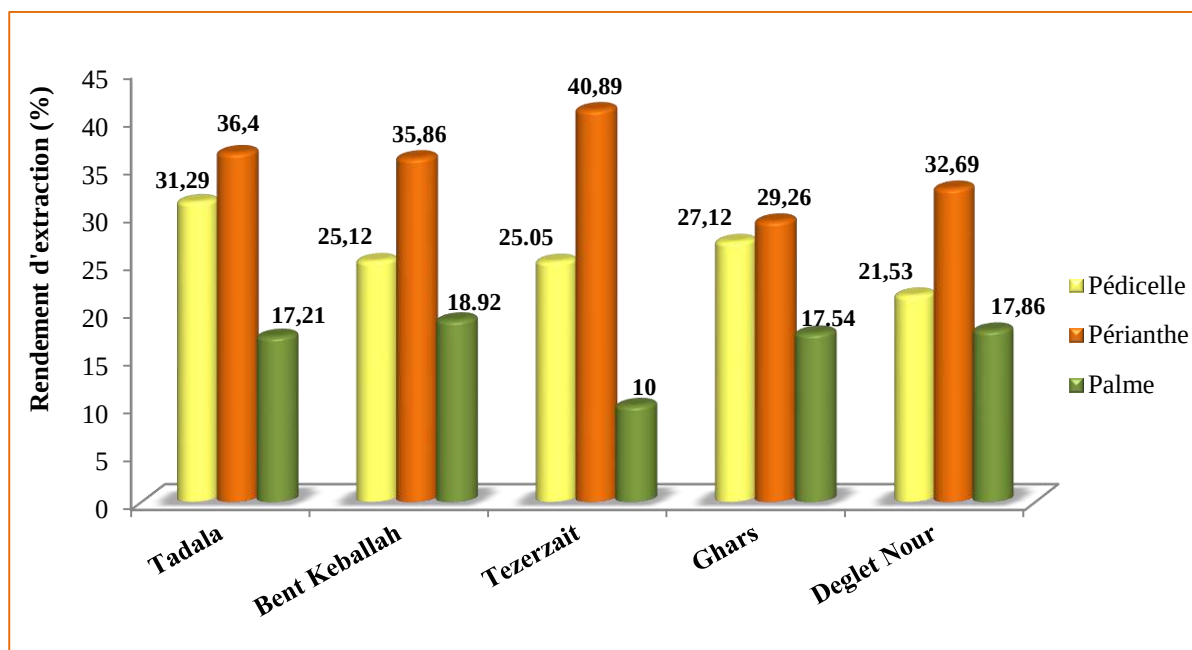


Figure 9 : Rendements d'extraction des extraits végétaux du *Phoenix dactylifera* L.

Le calcul des rendements par rapport au poids total de la matière végétale sèche des différentes parties étudiées du palmier dattier montrent que la plupart des extraits ont donné des masses en extraits sec supérieures à 10 g/100 g de matière végétale sèche. En général, les rendements d'extraction hydro-méthanolique varient considérablement, dont les pourcentages enregistrés sont compris entre 10 % et 40,89 %. Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'extrait des périanthes de Tezerzait, tandis que le plus faible est celui de l'extrait des palmes de la même variété.

Au regard l'histogramme, les teneurs d'extraction obtenues entre les cinq variétés sont très proches entre eux pour chaque partie du palmier dattier avec une légère richesse pour les différents organes de la variété Tadala. Alors, la légère variation qui notée entre les rendements d'extraction est implique une disposition structurale approximative des composés bioactifs trouvés dans les extraits des variétés.

Du point de vue de rentabilité en poids, les extraits des périanthes de cinq variétés ont noté les pourcentages les plus supérieurs en comparaison avec les autres constituants du palmier dattier qui sont classés comme suit : les extraits des pédicelles puis des palmes. Cela peut être expliqué par la

nature des composés contenus dans les extraits des périanthes et aussi probablement à la nature de solvant utilisé pour l'extraction qui assure une grande solubilité de leurs molécules bioactives.

Dans ce travail, l'extraction des substances bioactives est effectuée par la méthode de macération à froid qui extrait le plus des composés tout en évitant leur probable dénaturation ou altération du fait des hautes températures utilisées dans les autres méthodes d'extraction. Elle repose sur la capacité des composés bioactifs à se dissoudre dans un solvant d'extraction. Le choix de ce dernier doit être adéquat et bien sélectionné selon la nature des composés à étudier et l'activité ciblée pour commencer l'extraction (**Naczket Shahidi, 2004**). Pour cela, le type de solvant choisi dans cette étude est le mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau) qui vient dans plusieurs littératures pour sa capacité d'extraire les molécules bioactives en particulier les composés phénoliques à des activités importantes. En général, les composés phénoliques sont classés comme des molécules hydrosolubles et sont principalement extraits par des solvants de moyenne à forte polarité (**Conforti et al., 2007; Paduch et al., 2007; Chirinos et al., 2007**). D'ailleurs, **Djeridane et al., (2015)** ont montré que le méthanol, l'acétone et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés antioxydants.

Bien que, les composés phénoliques constituent un ensemble des molécules aux très grandes diversités structurales ; ils ont varié des simples composés aux substances très polymérisés qui incluent des proportions variables de composés phénoliques : acides, anthocyanes et tannins, entre autres. Ils peuvent également exister sous forme de complexes avec des constituants végétaux (**Ferguson, 2001**). Les modifications chimiques provoquées par les composés phénoliques au niveau de la plante entière ont pour effet de modifier significativement leur solubilité dans l'eau et de provoquer des modifications de leur répartition au niveau de la cellule et/ou des tissus végétaux. Au niveau cellulaire, tous les composés phénoliques à un caractère hydrophile plus ou moins prononcé se retrouvent dans la vacuole. Ils ressemblent le plus souvent à des formes simples et à certaines formes polymérisées comme les tannins. Tandis que, les composants des parois cellulaires, qui se présentent sous diverses formes liées aux structures lipidiques, ont été appelés phénols insolubles (**Machiex et al., 2005**).

A la lumière de ces informations, nous avons pu constater que le mélange hydro-méthanolique extrait la plus part des phénols qui sont présents dans la vacuole ; ce ne peut être le cas pour les phénols insolubles au niveau des parois pecto-cellulosiques qui peuvent être les constituants majoritaires de quelques organes du palmier dattier comme les palmes. Alors le recours à des étapes supplémentaires (par exemple l'hydrolyse chimique ou enzymatique ou bien

l'acidification lors une purification des anthocyanes, fractions phénoliques très polaires) peuvent être nécessaires pour extraire le maximum d'ensemble des composés phénoliques avant les analyser et de les doser, en particulier dans les études quantitatives des constituants d'une plante (**Machiex et al., 2005**).

En plus, dans le cadre d'optimisation de la méthode d'extraction des molécules bioactives et plutôt les composés phénoliques pour être mieux adapté à leur nature chimique, leur solubilité et leur degré de complexité, on ajout la durée d'extraction, la nature du solvant, le type du contact matière-solvant, le volume du solvant et la température (**Dopico-García et al., 2007; Hayouni et al., 2007; Silva et al., 2007; Spigno et al., 2007**). En outre, le rendement a été significativement affecté par l'organe, la variété, l'origine géographique, la nature chimique de la plante, les conditions de la récolte et la durée de stockage, ainsi que les techniques d'extraction utilisées (la taille des particules de l'échantillon, les solvants d'extraction, ...) (**Falleh, 2008, Messaoudi et al., 2021**).

II.2. Screening phytochimique des extraits végétaux

La réalisation des tests phytochimiques a pour objectif de détecter les divers groupes chimiques de substances bioactives persistantes dans les extraits de différents constituants du palmier dattier pour les cinq variétés étudiées à savoir : les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins, quinones libres et coumarines), les composés terpéniques (terpénoïdes, stéroïdes et saponines) et les composés azotés (alcaloïdes).

Ces tests servent des réactions qualitatives de caractérisation de différents composés, l'analyse des résultats se fait en basant sur la formation des complexes insolubles ou des colorations par des réactifs spécifiques à chaque catégorie des composés (**Ailli et al., 2019**). Les résultats sont exprimés selon le précipité ou l'intensité de la coloration, qui est relative à la quantité de la molécule visée. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Résultats du screening phytochimique des extraits végétaux du *Phoenix dactylifera* L.

Variété	Extrait	Tanins	Flavonoïdes	coumarines	Quinones	Alcaloïdes	Terpénoïdes	Stéroïdes	Composés réducteurs	Saponines
Ghars	Pédicelle	+++	+	++	-	-	-	-	++	-
	Périanthe	+++	+	++	-	-	-	-	++	-
	Palme	+++	+	++	-	-	-	-	++	-
Deglet Nour	Pédicelle	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
	Périanthe	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
	Palme	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
Tadala	Pédicelle	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
	Périanthe	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
	Palme	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
Bent Keballah	Pédicelle	+++	+	++	-	-	-	-	++	-
	Périanthe	+++	+	++	-	-	-	-	++	-
	Palme	+++	+	++	-	-	-	-	++	-
Tezerzait	Pédicelle	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
	Périanthe	+++	+	++	++	-	-	-	++	-
	Palme	+++	+	++	++	-	-	-	++	-

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

Les tests phytochimiques sur les extraits des différents constituants du palmier dattier pour les cinq 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. L'absence de ces principes actifs dans les extraits des différentes parties du palmier dattier pour les cinq variétés étudiées peut justifier que ces organes sont pauvres en ces composés ou bien les méthodes d'extraction et le système de solvant utilisé dans notre travail ne sont pas satisfaisants pour l'extraction de ces métabolites désirés.

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 aux flavonoïdes (**Chaira et al., 2009**). D'autre part, les tannins sont des composés hautement polymérisés, ils sont responsables de l'astringence des fruits comme les dattes influenceront des facteurs tels que le goût et la valeur nutritionnelle. Souvent, les tanins étaient connus pour leur capacité de combinaison avec des protéines et formaient un complexe insoluble (**Spencer et al., 1988**).

En conclusion, cette étude phytochimique qualitative montre que tous les groupes chimiques identifiés au niveau des extraits de trois organes étudiés de cinq variétés du palmier dattier, leur confèrent des propriétés biologiques et des applications industrielles importantes. Toutefois, très peu d'étude ont été réalisées sur le plan phytochimique de palmes du *Phoenix dactylifera* L. et aucun travail sur la composition chimique de périanthes et de pédicelles n'a été trouvé.

II.3. Teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes

Les composés phénoliques constituent le groupe principal qui contribue à l'activité antioxydante des végétaux, fruits, céréales et d'autres matériels à base de plantes. Ces composés possèdent aussi diverses activités biologiques. C'est la raison pour laquelle, le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes de quelques sous produits du palmier dattier a été effectué dans cette étude. Les quantités des phénols totaux et des flavonoïdes correspondantes ont été exprimées en milligramme d'équivalents de l'étalon utilisé par gramme de la matière sèche (mg EE/g MS). Pour cet objectif, deux droites d'étalonnages ont été tracées à l'aide des différentes concentrations des solutions d'étalons.

La quantification des composés phénoliques d'une manière satisfaisante pour un extrait végétal brut est difficile. Pourtant, une approximation de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par des méthodes colorimétriques, en particulier par l'utilisation d'un réactif de Folin-ciocalteu. D'ailleurs, la méthode adaptée par **Singleton et Ross (1965)** est une méthode analytique biochimique, très approuvable sur le plan faisabilité et reproductibilité (**Merouane et al., 2014**).

Subséquemment, la réduction en milieu alcalin du mélange de composés phosphotungstique (WO_4^{2-}) et phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) issus du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, qui se traduit par la formation des produits de couleur bleu (tungstène et de molybdène), est à la base du dosage des phénols totaux dans les extraits des différentes parties étudiées. Les produits de réduction ont une absorption maximale à 760 nm, avec une intensité corrélative à la quantité de phénols totaux présents dans l'extrait (**Li et al., 2007**). En outre, l'acide gallique est le standard de ce dosage qui est un composé moins coûteux et qui dissout facilement dans l'eau. Alors, une courbe d'étalonnage d'acide gallique à différentes concentrations a été tracée (**Figure 10**).

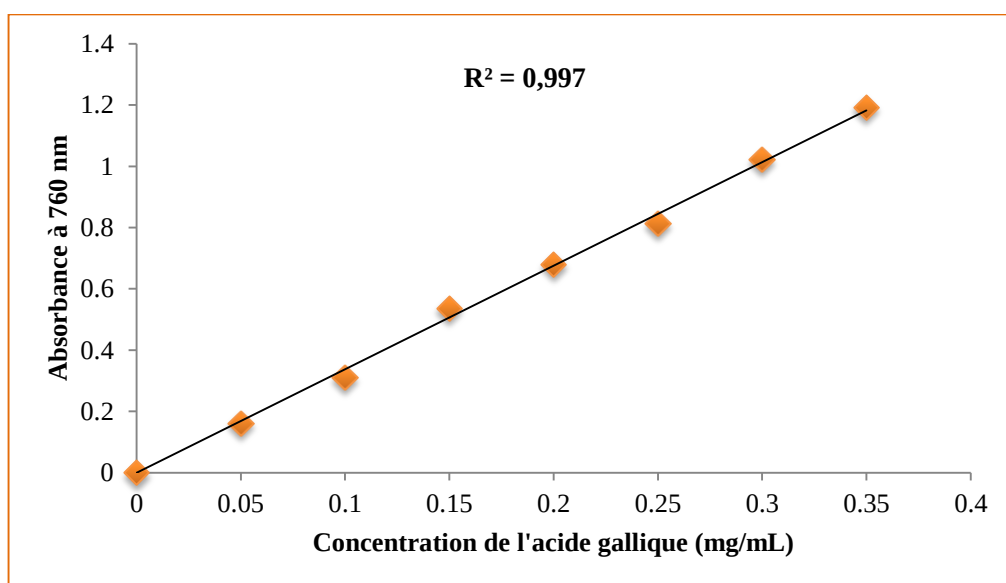


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les composés phénoliques les plus largement reconnus sont les flavonoïdes, qui ont été découverts dans la majorité des parties de la plante, y compris les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les graines et les baies (**Lee et al., 1994**). La méthode de **Lamaison et Carnat (1991)**, qui utilise le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) comme réactif, a été suivie pour quantifier les flavonoïdes.

Cette méthode est simple, peu coûteuse et permet de former un complexe jaunâtre très stable, absorbant la lumière UV à une longueur d'onde de 409 nm (Ekpo et al., 2020). À l'aide d'une courbe d'étalonnage de la rutine, l'estimation des teneurs des flavonoïdes dans les divers extraits a été déduit (Figure 11).

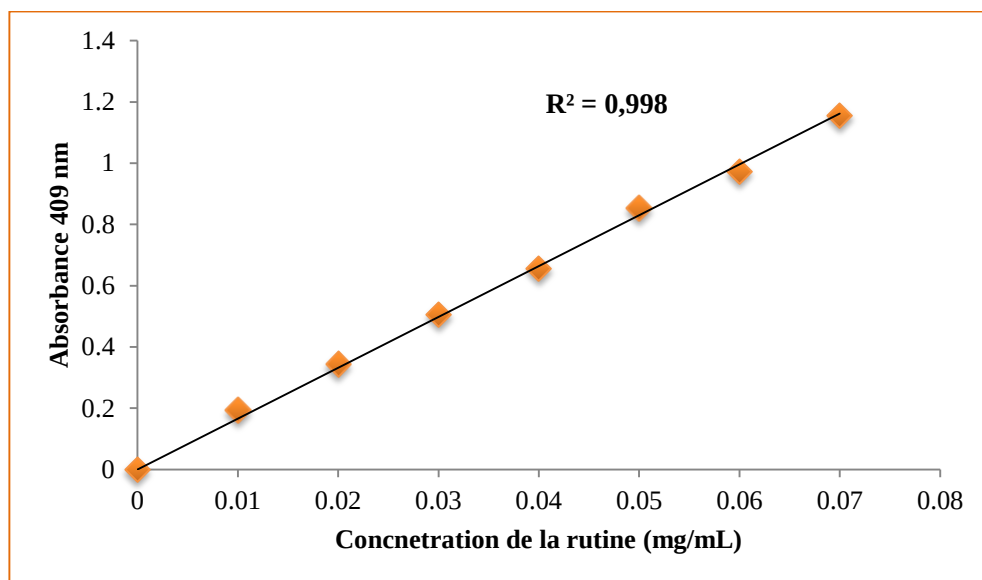


Figure 81 : Courbe d'étalonnage de la rutine

A l'analyse des courbes d'étalonnage mesurant l'absorbance à différentes concentrations d'acide gallique et de rutine, les concentrations des phénols totaux et des flavonoïdes dans divers extraits sont calculées et exprimées en milligrammes équivalents en acide gallique et en rutine par gramme de la matière végétale sèche respectivement (mg EAG/g MS, mg ER/g MS). Le **Tableau 7** est exposé l'ensemble des résultats obtenus.

Tableau 7: Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de différents extraits étudiés

Variété	Extrait	Teneur en Phénols Totaux (mg EAG/g)	Teneur en Flavonoïdes (mg ER/g)
Ghars	Pédicelle	15,43 ± 0,034 ^{b,c}	02,83 ± 0,015 ^{a,b}
	Périanthe	12,29 ± 0,027 ^{a,b}	03,55 ± 0,085 ^{a,b}
	Palme	48,98 ± 0,155 ⁱ	15,07 ± 0,013 ^e
Deglet Nour	Pédicelle	12,74 ± 0,018 ^{a,b}	02,57 ± 0,022 ^{a,b}
	Périanthe	11,90 ± 0,028 ^{a,b}	03,23 ± 0,085 ^{a,b}
	Palme	27,72 ± 0,005 ^{d,e}	12,52 ± 0,035 ^{d,e}
Tadala	Pédicelle	11,26 ± 0,008 ^a	02,11 ± 0,040 ^a
	Périanthe	10,65 ± 0,007 ^{a,b}	01,75 ± 0,003 ^{a,b}
	Palme	29,50 ± 0,005 ^e	08,95 ± 0,065 ^{c,d}
Bent Keballah	Pédicelle	23,51 ± 0,012 ^d	05,78 ± 0,604 ^a
	Périanthe	28,96 ± 0,004 ^e	01,95 ± 0,005 ^{a,b,c}
	Palme	48,04 ± 0,008 ⁱ	09,07 ± 0,008 ^{c,d}
Tezerzait	Pédicelle	18,65 ± 0,015 ^f	03,60 ± 0,041 ^{b,c}
	Périanthe	33,85 ± 0,016 ^c	07,25 ± 0,109 ^{a,b}
	Palme	19,22 ± 0,003 ^c	02,07 ± 0,018 ^a

Remarque : Les données reflètent les moyennes ± SD. a, b, c, d, e, f, i : montrant des différences significatives entre les différentes parties à $P < 0,05$ sur la base d'une ANOVA unidirectionnelle suivie du test HSD de Tukey.

L'analyse globale des résultats obtenus dans le **Tableau 7** a dévoilé que les différents extraits du *Phoenix dactylifera* L. pour les cinq variétés possèdent des teneurs en phénols totaux très importantes et en relation avec l'organe et la variété étudiée. Les teneurs en phénols totaux des divers extraits de cinq variétés varient entre 10,65±0,007 et 48,98±0,155mg EAG/g MS. La meilleure teneur est consignée par l'extrait des palmes de la variété Ghars; par contre l'extrait des périanthes de la variété Tadala a consigné la valeur la plus faible.

Également, les résultats du dosage spectrophotométrique des phénols totaux montrent que les extraits de la variété Bent Keballah sont les plus riches en composés phénoliques par rapport les autres variétés. Nous notons aussi que l'extraits des palmes pour les cinq variétés marque une grande teneur par rapport aux autres extraits au sein d'une même variété, à l'exception l'extrait des palmes de Tezerzait qui est placé en deuxième par sa teneur en composés phénoliques.

D'autre coté, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence des relations hautement significatives pour le contenu phénoliques entre les organes et entre les variétés (**Annexes 5**). Ces résultats peuvent également exprimer à l'échelle du contenu globale de la plante, par ce que le contenu en composés phénoliques a une répartition bien déterminée et spécifique dans les cellules ou les tissus composant le végétal pour la même espèce. D'ailleurs, la répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une plante a été rapportée par plusieurs auteurs (**Gianmaria et al., 2011; Rao, 2012**).

A titre comparative de nos teneurs en phénols totaux avec celles apportées dans la littérature, on constate que les teneurs de nos extraits sont supérieures par rapport à ceux trouvées par **Tirichine (2010)** qui a trouvé des teneurs en phénols totaux de 123,44 mg EAG/10g, 145,87 mg EAG/10g et 225,72 mg EAG/10g pour les extraits des palmes des variétés Timjouhart, Deglet Nour et Ghars respectivement. Cependant, **Laouini et al., (2012)** dans ses travaux sur les palmes de certaines variétés du *P. dactylifera* de la région d'Oued Souf a montré des teneurs en composés phénoliques totaux beaucoup plus élevées que nos extraits des palmes (215,24 mg EAG/g et 179,30 mg EAG/g pour la variété Ghars et Deglet Nour respectivement). En revanche, des faibles concentrations de composés phénoliques extraits des palmes de quatre variétés du palmier dattier (Rawthan, Rabeaa, Barny et Ajwa), récoltées dans le gouvernorat d'Al-Madinah, ont été marquées dont la teneur phénolique variait de 5,54 à 7,71 mg/g de poids sec (**Habeeb, 2021**).

On peut noter que la capacité de la plante à convertir la lumière du soleil en composés organiques peut être affectée par une variété de facteurs. Souvent, des facteurs chimiques, physiques et biologiques, qu'ils soient externes ou internes intervenant dans la modulation de l'expression du métabolisme phénolique (par exemple la lumière, la température, le potentiel osmotique, la nutrition de la plante, ...)(**Machiex et al., 2005**). En autre coté, plusieurs travaux ont montré l'implication de divers stress tels que les stress thermiques et hydriques dans la synthèse des composés phénoliques (**Falah et al., 2006 ; Dibacto et al., 2021**), de fait que les contraintes abiotiques du milieu (sécheresse, salinités, température élevée, ensoleillement) stimulent la biosynthèse de ces molécules (**Ksouri et al., 2006; Koç et al., 2010**). Cela dépend également de la

procédure d'extraction et de la méthode de mesure (**Messaoudi et al., 2013**). Le temps et la température d'extraction sont des paramètres importants qui doivent être optimisés pour minimiser le coût du processus d'extraction, tenant compte du fait que les composés phénoliques d'intérêt peuvent commencer à se dégrader à certaines températures (**Vargas, 2022**).

En plus, les variations qualitatives et quantitatives des composés phénoliques sont affectées par le stade de développement, le génotype, les pratiques culturales et l'état de conservation et pourtant n'y ait pas des règles générales strictes pour ces variations (**Kwon et al., 2006; Falah et al., 2006**). Alors, qu'ils soient de nature physique, chimique ou biologique, les facteurs environnementaux ont un impact significatif sur le métabolisme phénolique. Donc, une étude phytochimique quantitative plus précise de ces composés sur notre plante doit être avancée par une étude approfondie soulignant l'effet de l'environnement sur la plante à l'échelle moléculaire.

En outre, il est clair que les teneurs en phénols totaux déterminées par une méthode colorimétrique sont inférieures aux teneurs des extraits bruts. Cela indique que les extraits bruts obtenus par une extraction solide-liquide avec un solvant hydro-méthanolique reflètent une autre quantité des composés non phénoliques comme les protéines, les sucres et les pigments qui peuvent être extraites aisément par le mélange méthanol/eau. D'une part, d'autre part, la fiabilité et reproductibilité de la méthode de dosage des phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu (**Machieux et al., 2005**). Cette méthode est considérée comme la meilleure pour la détermination du taux des phénols totaux des extraits de plantes. Cette méthode est avantageuse pour les raisons suivantes ; (I) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, (II) la disponibilité du réactif de Folin et la méthode qui est bien standardisée, (III) la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent colorée, (IV) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (**Naczek et Shahidi, 2004 ; Boussoussa et al., 2014**).

La réponse de ce test est à peu près proportionnelle au nombre de groupes hydroxyles phénoliques dans un extrait donné (**Katalinic et al., 2006**). Néanmoins, cette méthode manque de spécificité, le dosage ne permettant pas de distinguer les différents groupements hydroxyles et il peut également interagir avec les acides aminés (tyrosine et tryptophane des protéines), les sucres réducteurs (le glucose et le fructose), les sulfites, l'acide ascorbique et l'acide tartrique; ce qui provoque après des problèmes d'interférence pendant toute évaluation phénolique (**Boizot et Charpentier, 2006**). La quantification des phénols totaux par une telle méthode donne des résultats très globaux avec aucune information sur les nombreux composés inclus dans les extraits

(Machixet *al.*, 2005). Néanmoins, il convient d'évaluer au préalable pour chaque extrait la quantité de composés non phénoliques pouvant interférer avec le réactif de Folin. De ce fait, un adsorbant synthétique, la polyvinylpyrrolidone (PVP), peut l'être utilisée pour réduire l'interférence des composés phénoliques dans la préparation des échantillons puisqu'elle a la capacité de lier une large gamme de composés phénoliques et à rester insoluble en solution (Robinson *et al.*, 2017 ; Ke-zhuo *et al.*, 2019).

En réalité, il ne trouve pas une méthode permettant de doser précisément et simultanément la totalité des composés phénoliques présents dans un extrait végétal brut (Macheix *et al.*, 2005). Toutefois, la quantification de ces composés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permettra la séparation et la quantification de composés phénoliques ainsi que la connaissance des principales classes de composés phénoliques présentes dans chaque extrait ainsi que leurs quantités relatives. L'élucidation de la structure est souvent réalisée en utilisant HPLC avec l'analyse par spectrométrie de masse, ainsi que d'autres techniques pertinentes.

En revanche, l'analyse quantitative du **Tableau 7** indique des teneurs en flavonoïdes variant entre $01,75 \pm 0,003$ et $15,07 \pm 0,013$ mg ER/g MS. La valeur maximale est obtenue avec l'extrait des palmes de la variété Ghars, tandis que la valeur la plus faible en flavonoïdes a été enregistrée pour l'extrait des périanthes de la variété Tadala. Au regard de ces résultats, on constate que les cinq variétés présentent des bonnes teneurs en flavonoïdes avec une distribution contingente entre les différents constituants. Desquelles, l'extrait des palmes de la plus part des variétés montre sa richesse en flavonoïdes contre les autres organes. Egalement, l'analyse des résultats entre les variétés a montré toujours la richesse de variété Ghars en phénols totaux et flavonoïdes par rapport aux autres variétés. Ainsi, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence des relations hautement significatives pour le contenu des flavonoïdes entre les variétés et entre variétés-organes (**Annexes 5**).

Par ailleurs, Bengag (2009) a quantifié la teneur en flavonoïdes des palmes de certains cultivars du *Phoenix dactylifera* L., il a été trouvé des faibles valeurs (soit de 24,258 et 69 mg ER/10 g Ms pour les variétés Deglet Nour et Ghars successivement). En outre, l'étude de Tirichine (2010) sur les palmes de quelques cultivars du palmier dattier de sud-est Algérien a présenté des teneurs plus élevées en flavonoïdes de 58,58 et 66,12 mg d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait méthanolique sec pour les variétés Ghars et Deglet Nour successivement. Des résultats semblables ont été montrés par l'étude d'Adaika et Ramdani (2015) sur les feuilles du *Phoenix dactylifera* L.

de la région de l'Oued Souf, dont ils ont trouvé des teneurs très supérieures en flavonoïde ($95,93 \pm 0,147$ mg ER/g).

Ainsi, **Laouiniet al., (2012)** ont estimé des teneurs très élevées en flavonoïdes, soit de 101,09 et 93,42 mg ER/g Ms pour les extraits des palmes du *Phoenix dactylifera* L. de la région d'Oued Souf, pour les variétés de Ghars et Deglet Nour respectivement. Par contre, des teneurs comparables en flavonoïdes des palmes de quatre cultivars de palmier dattier (Rawthan, Rabeaa, Barny et Ajwa), collectés dans le gouvernorat d'Al-Madinah, ont été marquées par **Habeeb (2021)**. Les niveaux de flavonoïdes variaient entre 1,02 et 2,06 mg/g de poids sec. Généralement, pour les pédicelles et les périanthes, il y a une manque d'étude quantitative sur les phénols totaux et les flavonoïdes et aucun résultat n'a été rapporté par d'autres auteurs sur ces deux parties des variétés étudiées.

Toutefois, une difficulté a été trouvée au cours la comparaison de nos résultats avec ceux rapportés par la bibliographie. Cela peut être dû à l'application des méthodes d'extraction différentes, la diversité génétique des variétés qui caractérise par fois une région seulement, les conditions de stockage et de la récolte de la matière végétale...etc. Ce qui réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études. Également, il faut toutefois appuyer qu'il ne s'agit ni de même solvant ni de mêmes protocoles d'activité, ni de matériel de départ (sec, frais), ni de même durée de conservation et de température d'étude ; ce qui pourrait expliquer l'intervalle observé entre nos résultats et ceux de la bibliographie.

Ainsi, les spectres d'absorbance des flavonoïdes sont variés selon des transformations chimiques telles que la méthylation, l'hydroxylation, la glycosylation et la condensation avec d'autres composés, phénoliques ou non. De plus, la solubilité des flavonoïdes est dépend à la polarité du solvant d'extraction, au nombre et de la position des groupements hydroxyles libres, au poids moléculaire et même du nombre, du type et de la position de la liaison des glucides avec les flavonoïdes (**Bourgou et al., 2016; Telli, 2017**). A titre de simplifier la présentation des résultats, nous avons représenté dans l'histogramme qui suit (**Figure 12**) les différentes valeurs du contenu en flavonoïdes exprimés en pourcentages par rapport au contenu en phénols totaux.

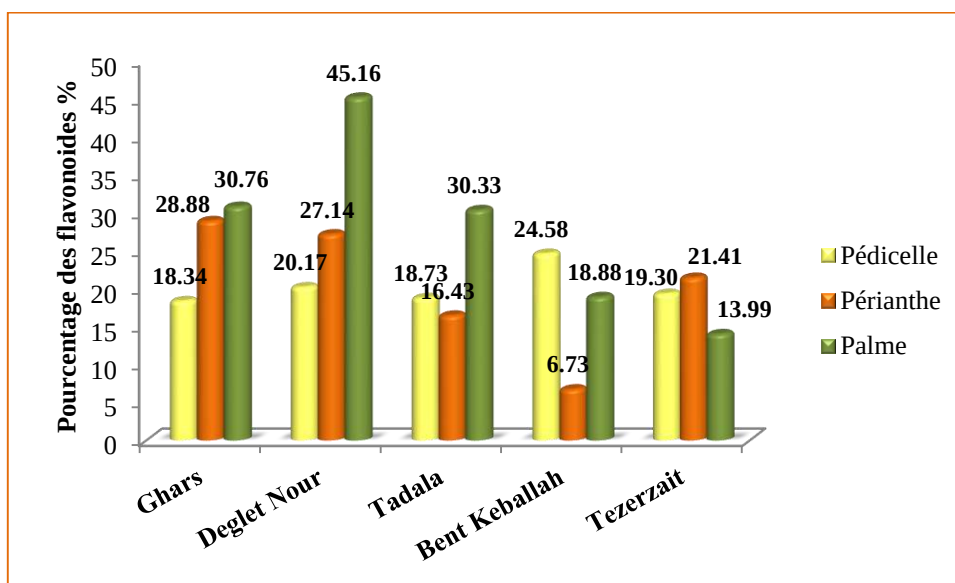


Figure 12 : Pourcentages des flavonoïdes par rapport les phénols totaux.

Ces résultats représentent la différence de contenu en flavonoïdes entre les différents extraits des organes du palmier dattier pour cinq variétés. Les pourcentages des flavonoïdes dans les extraits des pédicelles varient avec une large étendue au voisinage de 24% tandis que les extraits des périanthes et des palmes atteignent 28% et 45% respectivement. Aussi, ces valeurs montrent une distribution comparable entre les variétés pour chaque organe.

Il est clair que les taux des flavonoïdes sont moins par rapport à ceux des phénols totaux (la plus part moins 50%) ce qui indique que nos extraits sont pauvres en ces composés et le reste pourrait être d'autres composés phénoliques ayant des arrangements chimiques différents que ceux des flavonoïdes; soit un composé majoritaire avec un pourcentage élevé, soit plusieurs composés à différents rapports et parmi lesquels, les acides phénoliques, les tanins, les stilbènes ...etc, présentes en quantités importantes. À l'issue de cette étude, l'analyse des composés phénoliques par des méthodes spectroscopiques (UV-Visible) peut offrir une estimation satisfaisante pour l'identification quantitative et qualitative de ces molécules.

II.4. Pouvoir antioxydant

La recherche intensive aux composés antioxydants naturels est cheminée parallèlement avec le développement des méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante de ces substances. L'activité antioxydante d'une substance correspond à sa capacité de prévenir ou retarder l'oxydation de substrat susceptible d'être oxydé (**Pastrej et Priymenko, 2007**). Actuellement, de nombreuses méthodes sont appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante des composés purifiés ou des extraits bruts qui peut être évaluée par leurs capacités de balayer les radicaux libres, la capacité de la chélation de métaux de transition comme le fer et l'inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ERO (**Yu et al., 2004**). En effet, les méthodes de piégeage des radicaux libres spécifiquement l'intervenir des chromogènes radicalaires sont les plus couramment utilisées (**Moure et al., 2001**). Elles sont basées sur le maintien ou la perte de la coloration de ce réactif dans le milieu réactionnel, dont la présence d'antioxydants conduit à la disparition de ces chromogènes. La facilité, la rapidité et la sensibilité de ces méthodes attribuent à un vaste champ d'utilisation (**Krishnaiah et al., 2010**).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de plusieurs méthodes pour tester la capacité de piégeage d'un radical libre et l'activité antioxydante totale d'un extrait de plante (**Ksouri et al., 2009**). Généralement, de nombreuses techniques qui peuvent distinguées en fonction de leurs fondements d'analyse, les modalités expérimentales et les différentes contributions des antioxydants à la capacité antioxydante totale (**Wojdyło et al., 2007**). Dans ce présent travail, l'activité antioxydante des différents extraits du palmier dattier de cinq variétés sélectionnées a été évaluée *in vitro* par trois tests différents : balayage du radical DPPH•, balayage du radical ABTS•+ et le pouvoir de réduction ferrique (test FRAP).

II.4.1. Test du DPPH

Le pouvoir antioxydant des molécules et des extraits peut être mesuré à l'aide de diverses méthodes, celles basées sur la décoloration de solution d'un chromogène radicalaire restent les plus pratiques en raison de leur simplicité, rapidité, sensibilité, reproductibilité et non couteuse. L'existence d'une substance provoque une rupture de la réaction en chaîne qui produit de ces radicaux, antioxydant, va conduire à la décoloration de la solution du radical (**Bozin et al., 2008**). Le

DPPH• (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable, accepte un électron ou un proton pour donner une molécule stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. Les antioxydants réagissent avec le DPPH• pour le convertir en α - α , diphényl- β -picryl-hydrazine, de couleur jaune (Yen et al., 2005).

Egalement, le calcul des pourcentages d'inhibition du radical DPPH• est basé sur les mesures de l'absorbance des différentes dilutions de chaque solution d'extrait qu'ils permettent ensuite de tracer les courbes montrant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits. Ainsi, la concentration des extraits nécessaire pour neutraliser 50% de la concentration initiale de radicaux libres dans le milieu, ou EC₅₀, est déduite. De tel façon que la capacité anti-radicalaire des composés est inversement proportionnelle à la valeur d'EC₅₀ (Markowicz Bastos et al., 2007).

Plusieurs travaux de recherche ont fait appel à certains antioxydants standards comme témoins positifs dévoilant des propriétés antioxydantes puissantes. Les plus populaire étant la vitamine C, le BHA (Butylhydroxyanisole), le BHT (Butylhydroxytoluène), et le Trolox (Liang et al., 2010). Dans cette étude, nous avons choisie Trolox et l'acide ascorbique, en basant sur leurs disponibilités dans le laboratoire. Suivant les mêmes conditions opératoires des différents extraits du palmier dattier, l'activité antioxydante des standards a été mesurée.

L'évolution du pourcentage d'inhibition % en fonction les différentes concentrations (mg/mL) des extraits hydro-méthanolique du *Phoenix dactylifera* L. pour les cinq variétés ou les standards choisis a été tracés (Annexe 1). Ainsi, les régressions linéaires des tracées ont permis de déduire les concentrations des antioxydants trouvés dans nos extraits exprimés en $\mu\text{g/mL}$ qui sont indispensable pour réduire 50% du radical DPPH• (EC₅₀). De même, nous avons calculé les EC₅₀ de l'acide ascorbique et du Trolox afin de les comparer avec ceux de nos extraits. Les valeurs d'EC₅₀ déterminées sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Valeurs d'EC₅₀ des différents extraits et standards mesurées par le test du DPPH•.

Variété	Extrait	EC ₅₀ µg/mL
Ghars	Pédicelle	05,7 ± 01,0 ^{b,c}
	Périanthe	06,8 ± 00,1 ^{b,c,d}
	Palme	07,1 ± 00,1 ^{c,d}
Deglet Nour	Pédicelle	06,6 ± 00,5 ^{b,c,d}
	Périanthe	08,1 ± 01,1 ^d
	Palme	07,1 ± 00,1 ^{c,d}
Tadala	Pédicelle	06,1 ± 00,6 ^{b,c}
	Périanthe	12,9 ± 00,2 ^e
	Palme	05,1 ± 00,3 ^{a,b}
Bent Keballah	Pédicelle	06,3 ± 00,1 ^{b,c,d}
	Périanthe	06,6 ± 01,0 ^{b,c,d}
	Palme	03,8 ± 00,1 ^a
Tezerzait	Pédicelle	03,7 ± 00,1 ^a
	Périanthe	03,3 ± 00,1 ^a
	Palme	05,1 ± 00,2 ^{a,b}
Standard	Trolox	02,8 ± 00,1 ^a
	Acide ascorbique	53,2 ± 00,9 ^f

Remarque : Les données reflètent les moyennes ± SD. a, b, c, d, e, f : montrant des différences significatives entre les différentes parties à P < 0,05 sur la base d'une ANOVA unidirectionnelle suivie du test HSD de Tukey.

Le pouvoir antioxydant des différents extraits déterminée à partir les valeurs d'EC₅₀ qui sont inversement proportionnelles à l'activité antioxydante. De telle sorte, plus la valeur d'EC₅₀ est faible, plus l'activité est puissante. D'après les résultats du test de piégeage du radical libre DPPH•, nos extraits des différentes parties du palmier dattier étudiées pour les cinq variétés ont montré des activités anti-radicalaires potentielles. Nous notons des valeurs d'EC₅₀ varient globalement entre 03,3±00,1 et 12,9±00,2 µg/mL, dont la plus faible valeur a été enregistrée pour l'extrait des périanthes de la variété Tezerzait. On note aussi des activités anti-radicalaires voisines à ce dernier pour les extraits de pédicelles de la variété Tezerzait et de palme de la variété Bent Keballahavec des valeurs d'EC₅₀ de 03,7±00,1 et 03,8±00,1 µg/mL respectivement. Alors que la plus élevée valeur d'EC₅₀ est notée pour l'extrait des périanthes de la variété Tadala, ce qui indique sa faible activité anti-radicalaire contre le radical DPPH• par rapport les autres extraits.

Il a noté également que les extraits des périanthes ont une capacité antioxydante faible à celle des autres constituants pour les quatre variétés à l'exception de la variété Tezerzait. Autant, cette variété représente généralement une capacité potentielle de réduire les radicaux libres du DPPH• pour les trois organes étudiés ce qui peut être expliqué par leurs richesses en composés phénoliques et en flavonoïdes dont l'activité anti-radicalaire a été largement documentée. De plus, on constate que l'extrait des palmes des deux variétés Ghars et Deglet Nour, ainsi des variétés Tadala et Tezerzait ont représenté des valeurs d'EC₅₀ égales, ce qui peut expliquer par la présence des mêmes molécules spécifiques et actives chez chaque deux variétés. En revanche, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence des relations hautement significatives pour le pouvoir anti-radicalaire (DPPH•) entre les organes, les variétés et entre les variétés-organes.

Généralement, les extraits des palmes notent des valeurs EC₅₀ plus élevées que celles des autres organes pour la plus part des variétés bien que leurs teneurs en phénols totaux et flavonoïdes soient plus hautes. Ce phénomène peut être lié à la configuration chimique des composés phénoliques. Puisque, dans les structures phénoliques liées, les groupes hydroxyles donneurs d'électrons ou d'hydrogène pourraient être bloqués pour participer au test de piégeage. En conséquence, les composés phénoliques liés ont généralement un potentiel de piégeage inférieur à celui des composés phénoliques libres (Majid et al., 2023).

Egalement, la différence enregistrée entre les extraits des organes et entre les variétés peut être aussi expliquée par l'effet combinée de diverses substances qu'elles peuvent contenir, tels que les polyphénols, les glycosides, les peptides, les acides organiques....etc. Ainsi, il est possible de dire que la différence de capacité anti-radicalaire de nos extraits entre eux pourrait être causée par la

présence et/ou la quantité de molécules spécifiques potentiellement actives de flavonoïdes et/ou phénoliques dans les extraits.

En outre, l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits bruts des différents constituants du palmier dattier a été faite en comparaison avec celle déterminée pour le Trolox et l'acide ascorbique, comme antioxydants de référence. En effet, le Trolox et l'acide ascorbique ont révélé un pouvoir de piéger le radical libre DPPH• très puissant avec des valeurs d'EC₅₀ de 02,8±00,1 µg/mL et 53,2±00,9 µg/mL respectivement. D'après ces résultats, on s'aperçoit que nos extraits testés ont dévoilé des activités anti-radicalaires intéressantes à celles déterminées pour les antioxydants standards. Puisqu'ils agissent à des faibles doses pour certains extraits que l'acide ascorbique, mais reste significativement inférieure à celle de Trolox. Néanmoins, certains antioxydants de référence sont utilisés en thérapie et en industrie alimentaire, mais se sont accusés d'être dangereux pour la santé en particulier le BHA (**Shahin, 2008**). Alors, les résultats suggèrent que certains extraits peuvent remplacer les antioxydants de synthèse puisqu'ils présentent un potentiel inhibiteur des radicaux libres très puissant à celui observé pour l'acide ascorbique.

D'ailleurs, l'activité anti-radicalaire des extraits de deux variétés Ghars et Deglet Nour de la région d'Oued Souf a été investiguée par **Laouini et al., (2012)**. Cette étude a été menée sur les palmes du palmier dattier en utilisant le radical libre stable, DPPH•. Ces extraits ont montré un pouvoir antioxydant plus puissant, dont les valeurs d'EC₅₀ égales 2,98 µg/mL et 3,74 µg/mL pour les variétés Ghars et Deglet Nour respectivement.

Une autre étude menée par **Benouamane et al. (2022)** a montré que les concentrations des extraits des palmes des variétés Ghars et Deglet Nour de la région de Biskra qui sont nécessaires pour réduire 50% du radical DPPH• sont égales 20,92 µg/mL et 12,2 µg/mL respectivement lorsque l'extraction a été menée par le méthanol. Alors, cette différence des résultats est probablement liée à la variation dans la constitution chimique, des facteurs saisonniers, la variété ou la région géographique où ils sont cultivés.

Le test DPPH est fréquemment utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des aliments ainsi que déterminer la capacité d'une substance à se comporter comme un donneur d'hydrogène. Également, il peut être utilisé pour mesurer les effets antioxydants d'émulsions solides ou liquides dans les systèmes biologiques complexes. De plus, il a été adopté pour étudier les propriétés

antioxydantes des composés dans plusieurs systèmes de solvants différents y compris l'éthanol, l'acétone aqueuse, le méthanol, l'eau alcool et benzène (Kedare et Singh, 2011).

L'avantage de cette méthode est que le radical DPPH• est autorisé à réagir avec plusieurs types d'échantillons et que le temps donné pour ce test permet suffisamment de réagir lentement même avec des antioxydants faibles. Le test de DPPH• peut être utilisé en milieu aqueux ou en solvants organiques, alors il peut être utilisé pour examiner à la fois les antioxydants hydrophiles et lipophiles. Ainsi, afin de réduire la possibilité de dégradation thermique des molécules examinées, l'efficacité antioxydante est évaluée à température ambiante. Toutefois, cette méthode est limitée car le radical DPPH• interagit avec d'autres radicaux. Aussi, le radical DPPH• pose le problème de son instabilité en présence de lumière vu que son absorbance à 517 nm diminue sans aucun agent antioxydant ne soit ajouté ; également l'interférence de l'absorbance des composés de l'échantillon pourrait être un problème pour l'analyse quantitative (Kedare et Singh, 2011).

En conséquence, un moyen pratique d'évaluer la capacité antioxydante des plantes est le test de DPPH•. Les radicaux libres de DPPH• sont réduits en présence de composés antioxydants avec des groupes donneurs d'hydrogène, tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques totaux, à la suite de la création de composés non radicalaires. La capacité des composés phénoliques à piéger les radicaux libres est le résultat de leurs groupes hydroxyle, qui soutiennent également leurs caractéristiques redox, leur capacité de donneur d'électrons, leur activité antioxygène singulet et leur capacité de chélation des métaux. Il a été démontré que la classe de polyphénols déterminant l'action anti-radicalaire la plus efficace était les flavones (Dibacto et al., 2021). D'après nos résultats, les extraits du *P. dactylifera* ont une forte capacité à neutraliser les radicaux libres. Ceci est provoqué par les composés phénoliques substantiels des extraits, qui ont été identifiés par le dosage phytochimique.

D'ailleurs, les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, ont le potentiel de servir d'agents antioxydants en inhibant la production d'espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. Généralement, le nombre et la localisation des groupes hydroxyles par rapport aux groupes carboxyles fonctionnels déterminent l'activité anti-radicalaire. La configuration structurale des composés phénoliques influence leur pouvoir piégeage des radicaux libres, qui sont des agents pathogènes dans de nombreuses maladies. Souvent, ils ont la capacité de chélater le fer, ce qui diminue son excès (Hayes et al., 2011).

Les activités biologiques pour lesquelles les flavonoïdes sont connus s'expliquent en partie par leurs effets antioxydants. Les propriétés antioxydantes de ces composés comprennent la neutralisation des enzymes oxydantes et la chélation des traces d'ions métalliques qui sont responsables de la génération des ERO, en plus de l'inhibition et la désactivation des radicaux libres (**Halliwell, 1994**). Le lien entre les structures chimiques des flavonoïdes et leurs propriétés antioxydantes a été interprété dans plusieurs travaux, dont les flavonoïdes qui en ferment un groupement OH sur le cycle C et/ou des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B sont les plus actifs (**Marfak, 2003**). Les flavonoïdes ont la capacité d'agir comme des pièges de radicaux en transférant un atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. En conséquence, la structure moléculaire génératrice de radicaux est devenue plus stable (**Javanovic et al., 1994**).

II.4.2. Mesure du pouvoir réducteur ferrique (test de FRAP)

Un indicateur significatif du potentiel d'une substance à inhiber l'oxydation est sa capacité réductrice qui a fréquemment un profil similaire à celui des teneurs en les composés antioxydants dont la composition et la teneur affectent leur pouvoir réducteur. Parfois, les caractéristiques antioxydantes des composés phénoliques sont étroitement liées à leur capacité réductrice (**Paixao et al., 2007**).

Alors, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des différents constituants du *Phoenix dactylifera* L. pour les cinq variétés étudiées a été déterminée en second lieu par le test FRAP qui est un essai simple, rapide et reproductible. Ainsi, il peut être adopté sur les plantes, les plasmas, ainsi que sur les extraits organiques et aqueux puisqu'il est universel (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**). Malgré le fait que le fer est nécessaire à l'apport d'oxygène pour les activités enzymatiques et la respiration, c'est un métal réactif qui cause des dommages oxydatifs aux tissus et cellules vivants. Alors, il est indispensable l'existence des antioxydants à une capacité réductrice provoquant la transformation du complexe ferrique Fe^{3+} en forme ferreuse Fe^{2+} (**Bourgou et al., 2008**).

Le test de FRAP (Ferric reducing antioxidant power) a été décrit initialement par (**Benzie et Strain, 1996**) et modifié par **Pulido et al., (2000)**. Cette technique est adoptée pour mesurer l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} sous forme d'un complexe avec le tripyridyl-triazine (TPTZ). En effet, les antioxydants ayant une propriété réductrice agissent comme des donneurs d'électrons pour conduire la conversion du complexe ferrique (couleur jaune) en fer ferreux (couleur bleu verdâtre). Ce qui permet de le quantifier par spectrophotométrie UV-

Visible à une longueur d'onde égale 595nm, dont l'intensité est relative à la capacité réductrice (Gülçin et al., 2007 ; Karagozler et al., 2008 ; Sudan et al., 2014, Raghavendra et al., 2015).

La capacité de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer Ferreux (Fe^{2+}) par les antioxydants présents dans nos extraits est déterminé à l'aide d'une courbe d'étalonnage de la solution de sulfate ferrique (FeSO_4) et les résultats sont exprimés en des valeurs de FEAC (Ferroussulphate Equivalent Antioxydant Capacity): mmol/mL de fer ferreux (mmol/mL Fe^{2+}) (Taşkin et al., 2021). Les résultats du pouvoir réducteur du fer par les extraits du *P. dactylifera* sont figurés dans l'histogramme ci-dessous (Figure 13). Les valeurs obtenues sont comparées à celles des antioxydants standards qui sont : l'acide ascorbique et le Trolox. L'accroissement de l'absorbance est associé à une augmentation de la capacité de réduction des extraits d'essai.

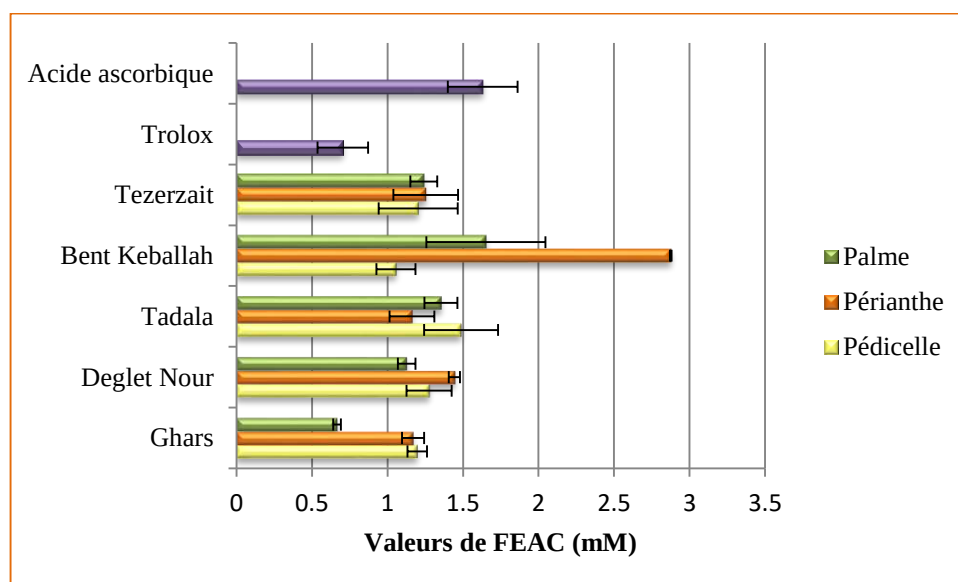


Figure 13 : Valeurs de FEAC des extraits du *P. dactylifera* et des standards.

Les résultats de la Figure 13 montrent que les extraits des différents organes du *P. dactylifera* possèdent un pouvoir de réduction ferrique très important par rapport aux antioxydants standards. Généralement, l'ensemble des valeurs de FEAC varient globalement entre $0,666 \pm 0,026$ et $2,875 \pm 0,001$ mM (Annexe 2). Cela reflète simplement la nature des extraits contenant un ou plusieurs agents réducteurs ayant des affinités différentes pour l'ion Fe^{3+} . L'extrait de périante de la variété Bent Keballah exerce la meilleure capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) ($2,875 \pm 0,001$ mM), alors que l'extrait des palmes de la variété Ghars a signé le pouvoir réducteur le plus inférieur par rapport aux autres extraits avec une valeur de FEAC égale $0,666 \pm 0,026$ mM. Cependant, cet extrait qui est riche en polyphénols et plus particulièrement

exhibe un pouvoir réducteur très faible. Cela signifie que le pouvoir réducteur des extraits ne se corrèle pas avec le contenu en composés phénoliques. Alors, les extraits donnant ainsi un potentiel antioxydant remarquable, est donc partiellement attribuée à la présence d'autres substances plus actives que celles présentes dans cet extrait.

Globalement, tout les extraits présentent des valeurs de FEAC supérieures à 1mM à l'exception l'extrait des palmes de la variété Ghars qui a marqué un faible pouvoir réducteur de fer malgré qu'il a noté la meilleure teneur en phénols totaux et en flavonoïdes ce qui indique que les molécules bioactives contenant dans cet extrait n'ont pas la capacité réductrice de fer. Parallèlement, les différents constituants du palmier dattier pour les cinq variétés sélectionnées sont démontrés des valeurs de FEAC proches entre eux ce qui expliqué par la présence des mêmes agents réducteurs.

Toutefois, on remarque que l'extrait de périanthe de la variété Bent Keballah a enregistré une grande valeur de FEAC, alors le meilleur potentiel réducteur de fer. Tandis que sa teneur en flavonoïdes est la plus faible par rapport les autres extraits. Ces résultats pourront être expliqués par le fait que l'extrait de périanthe de la variété Bent Keballah est riche en d'autre famille des composés phénoliques ayant une propriété antioxydante puissante représentée par un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort. En effet, **Ouyang et ses collaborateurs (2019)** ont montré que l'activité de chélation des ions métalliques est souvent attribuée aux acides phénoliques. Tandis que les autres extraits qui ont montrés un pouvoir réducteur moins important pourraient renfermer des molécules à un potentiel réducteur moins fort.

Dans cette méthode, des mêmes concentrations d'acide ascorbique et de Trolox sont utilisées comme des contrôles positifs. Le pouvoir de réduction ferrique exercé par l'acide ascorbique est égal à 1,630 mM, il parait être deux fois plus important que celui de Trolox (0,703 mM). Quant aux extraits testés, nous pouvons déduire que les différents extraits du *P. dactylifera* présentent des pouvoirs réducteurs supérieur à celui du contrôle positif (Trolox : 0,703 mM) ; et ils ont capable de les remplacer les antioxydants de synthèse.

D'autre part, de nombreuses études ont évalué l'effet réducteur des ions ferriques par les extraits de diverses plantes. L'étude menée par **Laouini (2014)** sur les palmes du palmier dattier de la région d'Oued Souf et leur capacité à restaurer le fer en fer ferreux a montré une forte capacité réductrice avec des valeurs d'IC₅₀ égales 322,46±11,37 µg/mL, 382,13±2,85 µg/mL pour les variétés de Ghars et Deglet Nour respectivement. Ces résultats peuvent être attribués à la

concentration des extraits, la présence des substances spécifiques à des propriétés antioxydantes puissantes et la région de collecte des échantillons.

Toutefois, un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses composés phénoliques ne disposent pas des groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice. Ces constatations pourraient indiquer que les composés phénoliques ne sont pas les principaux chélateurs et réducteurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange complexe d'acides organiques, d'acides aminés et de sucres qui peuvent contribuer également à la chélation ou réduction des métaux de transition (**Vermeris et Nicholson, 2006 ; Andersen, 2016 ; Götzke et al., 2019**).

En conclusion, le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante est un aspect qui ne peut être négligé, car il faut considérer que les composés phénoliques réagissent d'une manière différente selon le nombre de groupes phénoliques et que la teneur en phénol totaux ne reflète pas forcément la totalité des antioxydants présents dans un extrait (**Athamena et al., 2010**). Donc, le pouvoir réducteur exercé par nos extraits et en particulier l'extrait de périnthe de la variété Bent Keballah apparaît alors comme une alternative prometteuse dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques originaux. Ainsi, de l'ensemble de ces résultats, il provient que les propriétés réductrices des métabolites secondaires contenant dans nos extraits testés permettent d'envisager leur utilisation comme élément actif dans le traitement de certaines maladies.

II.4.3. Test d'ABTS

Afin de valider les résultats de l'activité antioxydante de nos extraits obtenus précédemment par le test du DPPH et de FRAP, nous avons utilisé un troisième essai reposé sur le pouvoir de piéger le proton du radical cationique ABTS^{•+}. Ce test a été exposé par **Miller et Rice-Evans (1993)** comme la première fois. Cette méthode est dépend du pouvoir d'un composé (antioxydant) à piéger le radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

Le test d'ABTS a été fréquemment employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés dans les aliments de nourriture et des boissons en raison de son adéquation dans les phases aqueuse et lipidique. La génération du radical cation (ABTS^{•+}) peut être effectuée par divers systèmes : enzymatiques utilisant le myoglobine ou la peroxydase, soit chimiques avec permanganate de potassium (K₂Mn₂O₈) ou persulfate de potassium (K₂S₂O₈); en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Villaño et al., 2004**).

Dans notre étude, le radical cation stable (ABTS^{•+}), qui est un chromophore bleu-vert à un maximum d'absorption vers 700nm, a été produit par oxydation d'un électron d'ABTS (molécule incolore) avec un système enzymatique contenant la peroxydase et le peroxyde d'hydrogène. Le dosage du radical (ABTS^{•+}) est basé sur la mesure de la décoloration après l'addition d'une substance susceptible à un effet antioxydant. Quand une substance donatrice d'un électron / hydrogène est mélangée avec une solution du radical (ABTS^{•+}), la forme réduite du radical est générée et accompagnée d'une perte de couleur (Yu et al., 2004; Christodoulou et al., 2022).

L'activité anti-radicalaire des extraits de différentes parties du palmier dattier pour les cinq variétés a été mesurée en étudiant la décoloration du milieu réactionnel après avoir obtenu l'absorbance stable de témoin et l'ajout de l'extrait végétal antioxydant. Ainsi, le calcul des pourcentages d'inhibition (I%), correspondant chaque concentration des extraits, a permis d'établir une régression linéaire entre ces valeurs du pourcentage et les différentes valeurs de concentrations des extraits ou les antioxydants de référence (Trolox et acide ascorbique) (Annexes 3).

Par conséquent, ces tracés nous pouvons déduire les valeurs d'EC₅₀ de chaque extrait, qui l'on définie par la concentration d'extrait indispensable pour réduire 50% des radicaux libres dans un milieu réactionnel, dont la valeur inférieure correspond à l'efficacité la plus supérieure ; elle est exprimée en µg/mL (Dias et al., 2020). De même, nous avons calculé les EC₅₀ des standards (Trolox et acide ascorbique) à fin de les comparer avec celles de nos extraits. Les valeurs d'EC₅₀ obtenues sont résumées dans le Tableau 9.

Tableau 9: Valeurs d'EC₅₀ des différents extraits et standards mesurées par le test d'ABTS⁺⁺

Variétés	Extraits	EC ₅₀ µg/mL
Ghars	Pédicelle	03,8±00,3 ^{d,e}
	Périanthe	03,4±00,4 ^{c,d,e}
	Palme	02,0±00,1 ^{a,b}
Deglet Nour	Pédicelle	08,1±01,1 ^f
	Périanthe	03,4±00,4 ^{c,d,e}
	Palme	02,0±00,7 ^{a,b}
Tadala	Pédicelle	04,1±00,1 ^e
	Périanthe	02,4±00,2 ^{a,b,c}
	Palme	01,9±00,1 ^{a,b}
Bent Kaballa	Pédicelle	04,4±00,4 ^e
	Périanthe	02,7±00,1 ^{b,c,d}
	Palme	01,2±00,1 ^a
Tezerzait	Pédicelle	08,9±00,4 ^f
	Périanthe	02,4 ±00,2 ^{a,b,c}
	Palme	02,4±00,1 ^{a,b,c}
Standard	Trolox	01,4±00,1 ^a
	Acide ascorbique	08,8±00,1 ^f

Remarque : Les données reflètent les moyennes ± SD. a, b, c, d, e, f : montrant des différences significatives entre les différentes parties à P < 0,05 sur la base d'une ANOVA unidirectionnelle suivie du test HSD de Tukey.

Dans la plus part des travaux, qui utilisant le test d'ABTS^{•+} comme une méthode d'évaluation de leurs produits à examiner, l'activité antioxydante totale est exprimée par deux valeurs, soit un pourcentage de réduction de coloration relative un control (TAA %), soit par une valeur massique équivalente un référence qui est généralement le Trolox (TEAC: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity). Dans ce travail, on préfère d'utiliser le paramètre "EC₅₀" (concentration efficace médiane) (**Brand-Williams et al., 1995 ; Bondet et al., 1997**). Puisque dans une raison de comparaison, le plus important est l'efficacité de l'antioxydant à faible dose. C'est que la recherche des sources riches en antioxydants est importante surtout dans but industrielle, mais la nouvelle recherche est à une tendance de trouver des molécules puissantes et plus actives en faibles concentrations. A ce fait le paramètre EC₅₀ est mieux pour cette approche et permet d'arranger les extraits suivant leur pouvoir anti-radicalaire croissant à fin de les sélectionner pour des études chimiques approfondies.

D'après les résultats mentionnés dans le **Tableau 9**, il est bien apparu que nos extraits possédant une activité très puissante pour piéger le radical (ABTS^{•+}), qui se traduit par des faibles valeurs d'EC₅₀. Ces valeurs sont comparables avec celle de l'antioxydant standard, ce qui suggère que nos extraits peuvent remplacer les antioxydants de synthèse. Globalement, les valeurs d'EC₅₀ sont comprises entre 01,2±00,1 et 08,9±00,4 µg/mL. La valeur la plus faible d'EC₅₀ est inscrite par l'extrait de palmes de la variété Bent Keballah qui peut expliquer par sa richesse en des composés à une activité anti-radicalaire très forte. On note aussi une activité antioxydante voisine à ce dernier pour l'extrait des palmes de la variété Tadala. Tandis que, la variété Tezerzait a enregistré une faible activité anti-radicalaire avec une valeur d'EC₅₀ égale 08,9±00,4 µg/mL, pour l'extrait de pédicelles. Généralement, les résultats obtenus suggèrent que nos extraits montrent une bonne activité antioxydante. Du fait la présence de nombreux groupements hydroxyles, les composés phénoliques offrent un potentiel antioxydant très élevé pouvant réagir avec les radicaux libres (**Sokol-Letowska, 2007**).

L'analyse des résultats du tableau au-dessus montre ainsi que les deux extraits des périanthes des variétés Ghars et Deglet Nour ont une forte activité anti-radicalaire avec des valeurs d'EC₅₀ identique (03,4±00,4 µg/mL), à cause les deux extraits à des teneurs équivalentes en phénols totaux et en flavonoïdes, de ce fait ils manifestent d'une même manière vis-à-vis le radical (ABTS^{•+}). Par contre, les deux extraits de même organe pour les variétés Tadala et Tezezait qui renfermant des quantités en phénols totaux et flavonoïdes assez loin, mais présentant une activité anti-radicalaire semblable ce qui indique la présence des mêmes substances antioxydantes spécifiques. Aussi, les extraits des palmes de cinq variétés présentent des activités anti-radicalaires voisines et fortes. Ce

qui montre clairement que ces extraits ayant des mêmes molécules actives qui réagissent de même façon avec le radical (ABTS^{•+}).

En outre, les agents antioxydants de synthèse actuellement utilisés en industrie alimentaire ainsi qu'en médecine sont présumés nocifs pour la santé humaine et particulièrement le BHA (**Contini et al., 2008**). La comparaison d'activité antioxydante de nos extraits avec celle des antioxydants de référence (Trolox et acide ascorbique) suggère que nos extraits peuvent remplacer les antioxydants synthétiques puisqu'ils présentent un potentiel inhibiteur des radicaux libres très important à celui observé pour les antioxydants de référence; et notamment les extraits des palmes, plus précisément de la variété Bent Keballah qui a enregistré le pouvoir anti-radicalaire le plus puissant avec une valeur d'EC₅₀ la plus faible même par rapport à l'antioxydant de référence. La comparaison des résultats de nos extraits et ceux parvenus des antioxydants de référence en but de divulguer le mécanisme d'action de nos extraits, nous a permis d'écrire une approximation entre la valeur d'EC₅₀ de Trolox et celle des extraits potentiels des palmes pour les cinq variétés. Ainsi, les valeurs d'EC₅₀ des extraits des pédicelles sont équivalentes à la valeur d'EC₅₀ d'acide ascorbique. Ces résultats permettent la prévision du mode d'action de chaque ensemble des extraits comme une étape primaire à l'espoir de l'approfondie.

Par ailleurs, peu d'étude sur des propriétés antioxydantes du palmier dattier par le balayage du radical (ABTS^{•+}) ont été achevés. En effet, la comparaison de l'activité anti-radicalaire de nos extraits avec celle rapportée par **Laouini (2014)**, qui a concerné par l'étude de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de trois cultivars du palmier dattier Algérien, de la région d'Oued Souf, a montré des valeurs 0,0188 mg/mL, 0,0202 mg/mL pour les variétés Ghars et Deglet Nours successivement. Donc, les extraits de nos variétés sélectionnées disposent une activité anti-radicalaire très élevée par contre à celle des variétés de l'Oued. Toutefois, il faut souligner qu'il ne s'agit pas de même mode opératoire entre les deux travaux qui peut influencer sur les résultats. Ainsi, les réactifs utilisés dans ces tests réagissent différemment avec la large gamme de composés phénoliques présents dans les échantillons en raison des différences dans leurs structures et leurs concentrations (**Alam et al., 2021**).

Également, les résultats résolus par le test d'ABTS pour les différents extraits (des pédicelles, des périanthes et des palmes) affirment la grande sensibilité de ce test, dont il présente des valeurs d'EC₅₀ plus faibles par rapports à celles remportées par le test du DPPH. La différence qui est examinée entre les deux tests peut s'expliquer par les mécanismes supposés dans les réactions du balayage des radicaux et la solubilité de nos extraits dans les différents solvants utilisés dans les

deux tests, tous ont influé sur leur effet (**Bayala, 2014**). Pareillement, la mieux solubilité d'ABTS dans les solvants aqueux et organiques à la fois favorise l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits dans différents milieux, en particulier les solutions tamponnées dont les composés d'extrait réagissent rapidement avec l'ABTS^{•+} au contraire d'autre radicaux comme DPPH[•]. Alors, il permet l'étude de tous les composés de propriétés hydrophiles et lipophiles, en particulier les composés phénoliques (**Awika et al., 2003**).

Autant, la méthode d'ABTS est meilleure choix que d'autre méthode en raison de son extra flexibilité d'utiliser à des valeurs de pH différentes (cette propriété est négligeable pour le radical DPPH[•], dont il est très sensible au pH acide) et est une avantage pour l'étude d'activité antioxydante des extraits en des solvants acidiqes (**Awika et al., 2003 ; Vargas, 2022**). Subséquemment, pour notre expérience on élimine l'effet de la variation du pH comme un facteur de risque au radical (ABTS^{•+}) et le choix d'un tampon neutre au cours de préparation de ce radical a pour effet de garder l'activité de l'enzyme peroxydase à toute influence du pH et de travailler dans des conditions semblables au corps humain.

D'autre part, l'ABTS présente l'avantage de sa simplicité, peu couteuse et à une cinétique de réaction très rapide. Cependant, il expose un inconvénient de non stabilité des radicaux libres générés pendant de longstems. En effet, l'absorbance du radical (ABTS^{•+}) est très sensible aux facteurs environnementaux que la température et la lumière où leur effets comme des pro-oxydants est montrés en plusieurs études (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**); aussi la durée de vie de ce radical est plus courte comme tout les radicaux libres nécessitant une préparation frai pour chaque expérience (**Goudable et Favier, 1997**). La coloration bleu vert due à la formation de radical libre (ABTS^{•+}) après le mélange de peroxydase, peroxyde d'hydrogène et ABTS dans une solution tomponnée est sensible à la présence des antioxydants dont l'addition des extraits au milieu réactionnel est suivante par une décoloration immédiate indiquant la réduction des radicaux (ABTS^{•+}) par les antioxydants des extraits (**Yu et al., 2004**). La détermination du temps optimal pour lequel mesure l'absorbance de décoloration est un point de discussion de plusieurs chercheurs (**Villaño et al., 2004**). Généralement, l'accomplissement de ce type de réaction où le taux de réaction varié largement avec l'antioxydant est déterminé par l'étude de cinétique de la réaction jusqu'à la stabilité qui est fixéepour notre expérience après un intervalle de temps de 5min.

En raison de la complexité des matériaux antioxydants et leur mécanisme d'action, il est évident qu'aucune méthode de test unique n'est capable de pourvoir une image entière du profil d'un échantillon antioxydant étudié et ne permet pas à aperçu tous les modes d'actions des composés; puisque chaque molécule a un mécanisme d'action spécifique selon sa conformation structural, alors une combinaison de différentes méthodes est nécessaire. En fin, malgré ces limites, le test ABTS est une méthode qui peut être utile pour le dépistage primaire de nouveaux antioxydants pour d'éventuelles études approfondies.

Bien que, les molécules de sous-produits du *P. dactylifera* sont typiquement des donneurs d'électronset peuvent diminuer les substances d'oxydation lors du processus de peroxydation des lipides (Islam et al., 2018). En effet, les substances phénoliques ont le pouvoir de piéger les radicaux libres et de servir de donneurs d'hydrogène et d'agents réducteurs. Par conséquent, les extraits de palmes, de pédicelles et de périnthés du palmier dattier contiennent une quantité appréciable de composés phénoliques, qui peuvent considérablement aider aux effets antioxydants, agissant ainsi comme donneurs d'électrons ou de protons pour arrêter la réaction en chaîne qui produit des radicaux. Finalement, les différents organes du *P. dactylifera* peuvent être utilisés comme source naturelle d'antioxydants dans les industries pharmaceutiques ou alimentaires. Ainsi, des recherches supplémentaires devraient être menées pour isoler et identifier les composants auxquels l'activité antioxydante de ces extraits est attribuée, car ils ne sont pas encore identifiés.

II.5. Activité anti-brunissement enzymatique

II.5.1. Extraction de la PPO et POD des dattes du *Phoenix dactylifera* L.

L'application et l'étude détaillée de diverses enzymes dans les processus catalytiques augmentent de jour en jour en raison de leur nature écologique, de leur spécificité de substrat et de leur origine biologique. Parmi ces enzymes intéressantes, on peut citer les polyphénol oxydases (PPO) et les peroxydases (POD) qui sont des enzymes répandues dans le règne végétal et présentes dans différentes parties des plantes ; ils semblent jouer un rôle crucial dans les plantes (Taranto et al., 2017). Moins de 1% est la quantité des protéines totales de la PPO représente dans les fruits et les végétaux. Cette caractéristique devrait être prise 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).

Plusieurs méthodes d'extraction de la polyphénol oxydaseet peroxydase ont été étenduesdans la littérature, le plus abondamment utilisée est celle qui nécessite des moyen moins couteuse est la

méthode de **Al-Jassabi et al., (2013)** avec quelques modifications ont été introduites dans la procédure d'extraction. L'activité enzymatique a été mesurée en utilisant le guaiacol et pyrocatechol comme des substrats pour les deux enzymes POD et PPO respectivement. Les résultats de l'activité enzymatique totale des deux enzymes dans les cinq extraits bruts sont représentés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des extraits enzymatiques des dattes de cinq variétés étudiées.

Variétés	Volume total (mL)	Activité enzymatique totale de POD ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Activité enzymatique totale de PPO ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Protéine totale (μg)	Activité spécifique de POD ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$)	Activité spécifique de PPO ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{g}$)
Ghars	25	4065,93	5805,22	07,54	539,12	769,75
Deglet Nour	24	164,03	1312,63	03,54	46,28	370,38
Tadala	27	1063,30	5212,42	09,08	117,09	573,99
Bent Keballah	26	502,57	3709,24	03,76	133,61	986,15
Tezerzait	25	264,08	2866,61	06,78	38,90	422,33

Généralement, les extraits bruts des dattes ont montré une activité enzymatique considérable qui reste stable, même pendant plusieurs semaines à -20°C . D'après les résultats du **Tableau 10**, on a constaté que l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase et de la peroxydase est positive pour tous les extraits testés, en utilisant le guaiacol et pyrocatechol comme des substrats. Ainsi, quelque soit l'activité enzymatique a dosé, l'extrait enzymatique de la variété Ghars présente des meilleurs taux d'activité enzymatique par rapport les autres sources enzymatiques.

Pour l'activité peroxydasique, nous avons observé que le taux diffère selon la source enzymatique utilisée. Il est apparu que l'extrait enzymatique de la variété Ghars présente le taux d'activité peroxydase le plus élevé avec une valeur de $4065,93 \mu\text{M}/\text{min}$. Pourtant, l'extrait de la variété Deglet Nour montre le plus faible taux d'activité enzymatique avec une valeur de $164,03 \mu\text{M}/\text{min}$. D'autre part, la PPO montre une activité un supérieure à celle obtenue par la peroxydase pour toutes les variétés. Quant l'extrait enzymatique de la variété Deglet Nour, il a noté de faible taux d'activité polyphénol oxydasique ($1312,63 \mu\text{M}/\text{min}$). Le meilleur taux d'activité ($5805,22 \mu\text{M}/\text{min}$) a été enregistré pour l'extrait de la variété Ghars.

Néanmoins, l'activité spécifique pour la plus part des extrait enzymatique est plus faible. 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 présence d'une masse importante des protéines totales dans les extraits par rapport l'activité enzymatique enregistrée pour les deux enzymes pourrait être expliqué la diminution du rapport entre l'activité enzymatique et la concentration totale en protéine. Aussi, ces résultats montrent la diversité des extraits enzymatiques des dattes par la présence de plusieurs types des enzymes autre que la polyphénol oxydase et la peroxydase tels que : invertase, cellulase, endo-1,4- β -D-glucanase (EGase) et β -galactosidase (β -Gal), pectine méthylestérase (PME) qui sont accompagnés les réactions biochimiques et événements physiologiques pendant le développement et la maturation des dates de différentes cultivars (**Rastegar et al., 2012**).

Autant, **Benaceur et al. (2019)** ont démontré une activité spécifique de 101,67 U/mg pour l'extrait de la variété Tadala. Par contre, **Farouk et al. (2020)** ont noté une grande activité spécifique pour l'extrait des dattes royales, Deglet Nour, d'ordre 3630 U/mg. La différence peut liée à la diversité génétique, la source de l'enzyme et le protocole expérimental utilisé lors l'extraction. Souvent, l'inactivation des enzymes a effectuée au cours les étapes de broyage et d'homogénéisation pendant l'extraction.

L'homogénéisation des tissus est nécessaire pour libérer les protéines des cellules et des compartiments cellulaires dans des solutions tampons stabilisatrices. Le processus nécessite la rupture de la membrane cellulaire externe, des membranes intracellulaires et des structures extracellulaires environnantes. Ici, la consistance tissulaire définit la méthode d'homogénéisation appropriée. Au cours de l'homogénéisation tissulaire, l'intégrité cellulaire est perturbée et les protéines sont libérées des compartiments intracellulaires entraînant des réactions de protéolyse et de dégradation enzymatique supprimant les modifications protéiques post-traductionnelles (**Kwiatkowski et al., 2016**).

Les composés phénoliques végétaux peuvent se lier de manière covalente ou non covalente avec des protéines. Parmi les deux types d'interactions, les preuves suggèrent que les composés phénoliques et les protéines se lient principalement par des liaisons non covalentes qui sont des interactions réversibles et que l'interaction est créée par une association hydrophobe qui peut ensuite être stabilisée par une liaison hydrogène. De plus, les interactions impliquant des liaisons non

covalentes sont sensibles aux facteurs environnementaux (tel que la température et le pH). Par contre, les liaisons covalentes provoquent des interactions irréversibles entre les composés phénoliques et les molécules de protéines. L'association des composés phénoliques avec des protéines entraîne ainsi la formation d'agrégats insolubles (**Shahidi et Dissanayaka, 2023**). 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**).

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**). Toutefois, la fixation des composés phénoliques à un polymère insoluble lors l'extraction des enzymes est l'un des moyens les plus efficace pour empêcher l'oxydation des phénols ; dont le plus souvent utilisés est le polyvinylpyrrolidone (PVP). Cet additif est une résine échangeuse d'ions à la capacité fixatrice des composés phénoliques et donc empêchant la formation des polymères (**Zawistowski et Biliaderis, 1991; Ziyan et Pekyardimci, 2004; Robinson et al., 2017; Selvarajan et al., 2018; Sabarre Jr et Yagonia-Lobarbio, 2021**). Il est bien documenté que l'oxydation des composés phénoliques par la PPO produit des quinones qui inhiberaient la PPO. Egalement, 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, Farouk et al., 2020**).

De plus, un tampon approprié à température glacée est normalement utilisé dans l'extraction de PPO et POD pour solubiliser les enzymes libérées tout en maintenant la stabilité des enzymes. Avant l'extraction, le tissu végétal frais est refroidi sur de la glace, nettoyé et haché rapidement. Ces étapes doivent être réalisées en un minimum de temps afin de minimiser la dégradation endogène. Ainsi, le hachage de la source végétale en petits morceaux améliorerait l'efficacité de l'extraction en augmentant la surface exposée au tampon (**Sabarre Jr et Yagonia-Lobarbio, 2021**).

Par conséquence, les enzymes PPO et POD s'avèrent être des enzymes intracellulaire, elles doivent être éliminée par la perturbation de la structure cellulaire de la plante. Dans l'ensemble du

processus d'extraction, la stabilité des deux enzymes et ses éventuelles inactivations sont des préoccupations primordiales. Le développement de la procédure d'extraction et la sélection des conditions d'extraction doivent être orientés vers la réalisation de ces objectifs.

II.5.2.Détermination des paramètres cinétiques de la PPO et de la POD

La mesure de la vitesse de disparition du substrat ou de la vitesse de synthèse du produit peut être utilisée pour déterminer l'activité d'une enzyme. Egalement, la mesure doit être limitée à la phase de début de la réaction pour éviter que l'enzyme ne soit inactivée par le produit de la réaction, que la concentration du substrat chute et que les produits ne se polymérisent (**Vámos-Vigyázó et Haard, 1981**). Une large gamme des substrats peut être affectée par l'activité de la PPO et POD (**Whitaker et Lee, 1995**).

Dans ce travail, on s'intéresse au dosage du produit libéré lors de l'oxydation du pyrocatechol ou bien le guaïacol, par PPO et POD des dattes respectivement. Les paramètres physico-chimiques sont maintenus constants (tampon phosphate (0,1M, pH 6,8) et température 25°C). Egalement, une gamme de concentration de pyrocatechol et guaïacol 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 cinq variétés Ghars, Deglet Nour, Tadala, Bent Keballah et Tezerzait.

De plus, l'équation de Lineweaver-Burk a été utilisée pour ajuster les résultats expérimentaux. Les tracés montrant que le modèle cinétique de Michaelis-Menten, qui prend en compte le phénomène d'inhibition par excès de substrat, est parfaitement adapté par l'oxydation du pyrocatechol et guaïacol par la PPO et POD des dattes. Les résultats ont été exprimés par les paramètres cinétiques de l'enzyme V_{max} et K_m qui ont été déterminés à l'aide des représentations de Lineweaver-Burk (**Annexe 4**). 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 avec son substrat. La 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 11** résume les valeurs obtenues de ces paramètres.

Tableau 11: Paramètres cinétiques de l'activité enzymatique de la PPO et de la POD des dattes de cinq variétés étudiées.

Variétés	POD			PPO		
	V _{max} (ΔA/min)	K _m (M)	V _{max} /K _m (ΔA/min /M)	V _{max} (ΔA/min)	K _m (M)	V _{max} /K _m (ΔA/min /M)
Ghars	26,24	0,063	416,50	54,64	0,355	153,91
Deglet Nour	18,28	0,030	609,33	19,20	0,226	84,95
Tadala	19,23	0,077	249,74	37,31	0,450	82,91
Bent Keballah	76,92	0,560	137,35	34,48	0,172	200,46
Tezerzait	11,49	0,065	176,76	19,60	0,084	233,33

D'après les résultats du **Tableau 11**, les extraits enzymatiques bruts de la PPO et POD des dattes des différentes variétés montrent des valeurs variables de V_{max} et K_m. En effet, le suivi de la cinétique de POD en utilisant le guaïacol comme substrat montre des valeurs de K_m comprises entre 0,030 et 0,560 M et des vitesses maximales de la réaction de 11,49 à 76,92 ΔA/min. La meilleure affinité contre l'enzyme POD est présentée par l'extrait enzymatique des dattes de Deglet Nour, par contre l'extrait de Bent Keballah est présenté la meilleure activité catalytique.

Pareillement, les paramètres cinétiques de la PPO étaient de 0,084 à 0,450 M pour K_m et de 19,20 à 54,64 ΔA/min pour V_{max} en utilisant le pyrocatechol comme substrat. La meilleure affinité contre l'enzyme POD est présentée par l'extrait enzymatique des dattes de Tezerzait, par contre l'extrait de Ghars est présenté la meilleure activité catalytique.

La valeur K_m d'une enzyme représente son affinité envers son substrat ; des valeurs plus faibles indiquent un niveau plus élevé d'affinité avec le substrat. Néanmoins, le substrat optimal doit être sélectionné suivant son efficacité catalytique la plus élevée (V_{max}/K_m). De plus, il apparaît que la source de l'enzyme et le substrat utilisé ont un impact sur l'efficacité catalytique (**Farouk et al., 2020**). Alors en termes d'efficacité catalytique, le guaïacol semble être la substance préférée du POD puisqu'il présente des valeurs élevées par rapport la PPO.

Tandis que, le pyrocatechol semble être le meilleur substrat pour la PPO de différentes sources d'enzyme avec des valeurs inférieures de K_m. En effet, une autre étude sur la PPO des dattes Tadala et Deglet Nour a montré que des faibles valeurs de K_m (35 mM et 37,7 mM pour le

pyrocatéchol comme substrat respectivement) (**Benaceur et al., 2019 ; Farouk et al., 2020**). Ainsi, **Sachde et al., (1988)** a dévoilé une grande affinité du substrat vis-à-vis de PPO des dattes de BarheetZahdi (K_m égale 3,5 et 8,75mM respectivement).

De plus, les valeurs de la constante d'affinité K_m de la PPO rapportées dans la littérature sont comme suit : le mangue (15,1 mM) (**Palma-Orozco et al., 2014**), le châtaigne (14,30 mM)(**Xu et al., 2004**), le bourrache (2,24 mM) (**Alici et Arabaci, 2016**), graine de lotus (6,04mM) (**Cai et al., 2015**), myrtille (15mM) (**Siddiq et Dolan, 2017**) et chair d'artichaut (4,03 mM) (**Ziyan et Pekyardimci, 2003**) pour le catéchol en tant que substrat expérimental. Généralement, cette variation peut être interpréter par le type de substrat, le tampon, la température, la source d'enzyme, la concentration ionique, la température, la méthode d'extraction utilisée et le pH du milieu (**Gouzi, 2004; Benaceur et al., 2019**).

II.5.3. Test d'inhibition

Le contrôle de l'activité de deux enzymes PPO et POD est important pour la prévention du brunissement des végétaux et fruits. En effet, l'oxydation enzymatique des fruits et légumes est influencée par un large éventail de facteurs. Ils concernent la nature et la concentration des composés phénoliques, la concentration des enzymes, le pH, la température et l'oxygène (**Jolivet et al., 1998 ; Qiu et al., 2009**).

En outre, le brunissement enzymatique des végétaux et fruits par les enzymes PPO et POD peut être inhibé ou ralenti 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'ajout des inhibiteurs de la PPO ou la POD. De nombreuses substances ont été étudiées pour leur potentiel en tant qu'inhibiteurs chimiques de l'oxydation enzymatique, y compris : les agents chélatants du cuivre, les inhibiteurs non-compétitifs ou compétitifs vis-à-vis des substrats phénoliques, des agents réducteurs (comme les sulfites et l'acide ascorbique), les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques et les acides carboxyliques (**Zawistowski et Biliaderis, 1991; Nicolas et al., 1994; Moon et al., 2020 ; Hamdan et al., 2022**). A condition que ces composés ne sont pas toxiques, et n'altèrent pas la saveur, le goût ou l'apparence 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 cinq variétés (Ghars,

Deglet Nour, Tadala, Bent Keballah et Tezerzait) ont été testés pour son pouvoir inhibiteur vis-à-vis deux enzymes responsables au brunissement enzymatique des dattes : PPO et POD; avec l'utilisation du pyrocatechol et du guaiacol comme des substrats appropriés.

II.5.3.1. Activité anti-peroxydase

Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéressons à la recherche sur l'efficacité des extraits des périanthes, des pédicelles et des palmes de cinq variétés étudiées (Ghars, Deglet Nour, Tadala, Bent Keballah et Tezerzait) à inhiber l'activité de la peroxydase extraite des dattes de même variétés étudiées. Le taux d'inhibition de l'activité anti-peroxydase est déterminé par une méthode colorimétrique, qui permet d'estimer le taux de tetraguaiacol (produit coloré) suite à la dégradation du guaiacol (substrat incolore) en présence d' H_2O_2 . Les résultats sont présentés dans la **Figure 14**.

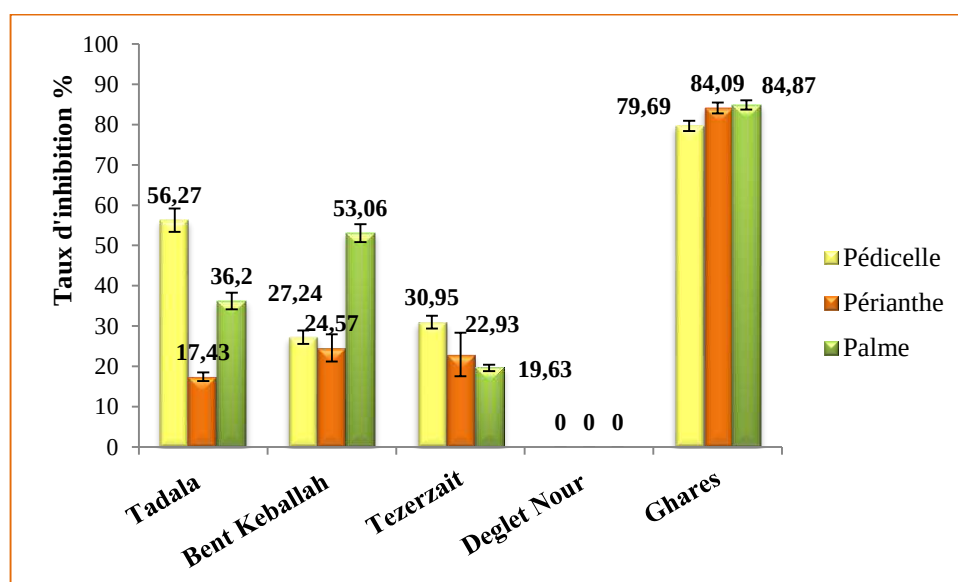


Figure 14: Taux d'inhibition de l'activité de peroxydase par les extraits de différents organes du palmier dattier

Selon les résultats de l'étude d'inhibition de la peroxydase, la plus part des extraits des différents constituants du palmier dattier des variétés étudiées ont des effets inhibiteurs sur l'activité enzymatique des peroxydases des dattes des mêmes variétés (**Figure 14**). Ainsi, le taux d'inhibition varie selon la source d'enzyme étudiée et les extraits des différents constituants du palmier dattier à tester.

Généralement, les taux d'inhibition varient de 17,43% à 84,87%. La plus grande activité anti peroxydase des extraits du palmier dattier est enregistrée dans les extraits de la variété Ghars principalement celle des palmes avec un pourcentage d'inhibition allant jusqu'à 84,87 %. Tant que l'extrait des périanthes de la variété Tadala a déduit le taux d'inhibition le plus faible sur la peroxydase (17,43 %).

En ce qui concerne les variétés Tadala, Tezerzait et Bent Keballah, leurs extraits présentent des activités inhibitrices à des degrés variables. Néanmoins, les extraits des périanthes, des palmes et des pédicelles de la variété de Deglet Nourn'ont pas d'effet sur l'activité de la peroxydase des dattes de la même variété. 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 par rapport les autres organes testés.

La présence et la variabilité des composés bioactifs en termes de type chimique et de quantité peuvent être responsables des divers potentiels d'inhibition de nos extraits du palmier dattier. En effet, le criblage phytochimique des différents extraits des organes étudiés du palmier dattier montre la différence en composition chimique entre les variétés sélectionnées et peut être en sa teneur. Alors, la variation génétique entre les cinq variétés peut être attribuée à la synthèse des substances différentes.

D'autre part, que ce soit la méthode d'extraction, la source de l'extrait enzymatique étudiée affecte l'efficacité d'inhibition. Ainsi, l'existence de plusieurs formes enzymatiques (iso-enzymes) au sein d'un même matériel végétal et au niveau d'un même tissu, l'affinité de ces enzymes au substrat et la différence de leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques peuvent expliquer cette variabilité d'action. **Farouk et al. (2020)** a confirmé l'existence de trois formes de PPO de dattes royales ou bien d'iso-enzymes. Egalement, la présence d'iso-enzymes a été signalée pour d'autres sources de PPO. De plus, la variation des paramètres tels que le pH et la température du milieu réactionnel peut influencer également sur la stabilité de la structure de l'enzyme POD et sa spécificité (**Chattopadhyay et Mazumdar, 2000**).

II.5.3.2. Activité anti-polyphénol oxydase

L'activité enzymatique de la polyphénol oxydase 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 cinq variétés étudiées (Ghars, Deglet Nour, Tadala, Tezerzait et Bent Keballah). Les résultats du test d'inhibition de la PPO sont résumés dans la **Figure 15**.

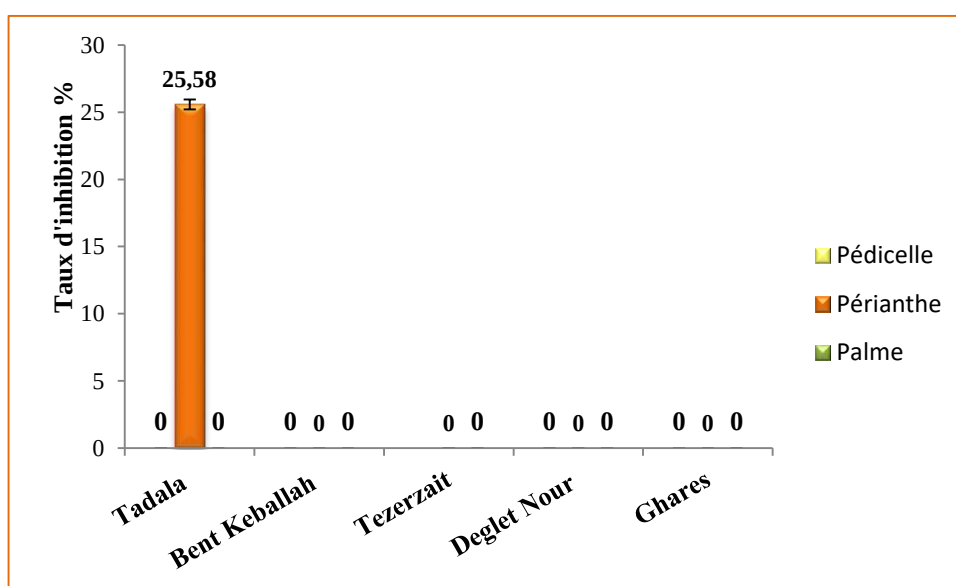


Figure 15: Taux d'inhibition de l'activité de polyphenol oxydase par les extraits de différents organes du palmier dattier.

Les résultats obtenus du test d'inhibition de la PPO extraite des dattes par les extraits des pédicelles, des périanthes et des palmes de cinq variétés n'ont montré aucune efficacité inhibitrice. A l'exception, l'extrait des périanthes de la variété Tadala qui a présenté un taux d'inhibition très faible (25,58 %). Alors, les différents extraits testés ont montré une efficacité inhibitrice exercée seulement sur la peroxydase.

Les peroxydases présentent une grande capacité de catalyser la polymérisation oxydative des composés phénoliques pour former des polymères insolubles (**Chagas et al., 2015**). 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. Ainsi, **Nogales-Delgado (2021)** a souligné la possibilité d'effets synergiques entre la peroxydase et la polyphénol oxydase dans la formation des polymères brun dans les cas où l'intégrité des tissus et la compartimentation des

cellules sont endommagées et tous les composants de brunissement sont mise en contact (les phénols, l'oxygène et les enzymes tels que PPO ou POD).

Dans la littérature, les composés dérivés des acides cinnamique et benzoïque sont les inhibiteurs compétitifs les plus couramment trouvés pour la PPO dans les cerises, les pommes, les poires, les pêches et les pommes de terre (**Bobo et al., 2022**). Pareillement, plusieurs études se sont concentrées sur les extraits de plantes en tant que sources de composés inhibiteurs dans la réaction de la polyphénol oxydase. Par exemple, l'étude de **Kim et al., (2005)** montre que l'activité de la PPO est inhibée par les extraits d'oignon, qui ont une efficacité allant jusqu'à 54,1 % pour réduire le taux du brunissement de la poire. Les résultats sont étayés par les recherches de **Lee, (2007)**, qui ont démontré que les extraits d'oignon inhibent la PPO de taro à des taux allant de 54,8 % à 68,5 %. **Klimczak et Gliszczyńska-Świgło (2017)** ont été étudiés l'influence de cinq extraits de thé vert sur l'activité de la polyphénol oxydase (PPO) dans le jus de pomme frais trouble, alors que l'activité PPO a diminué jusqu'à 96 %. Ainsi, l'ajout d'extraits d'oignon, de piment et d'ananas chauffés a montré un effet inhibiteur plus fort sur la PPO du gingembre dont l'extrait de piment chauffé était le meilleur inhibiteur naturel de la PPO du gingembre (47,97 %) de manière compétitive (**Lim et Wong, 2018**). Selon les analyses spectrophotométriques, **Mercimek et al. (2015)** ont été constatés que l'inhibition de l'activité de la PPO de pomme de terre par les extraits de piment, de citron et de betterave rouge était respectivement de 70,54 et 60 %.

En outre, en raison de comparaison avec le potentiel inhibiteur de nos extraits, l'effet de l'acide ascorbique sur les activités PPO et POD des dattes de Ghars a été examiné. A une concentration 0,2M, l'acide ascorbique a eu un fort effet inhibiteur sur les activités de la PPO et POD, avec des taux d'inhibition de 48,14% et 95,28% respectivement. L'étude d'**Amiour et Hambaba (2016)** a également confirmé l'effet inhibiteur de l'acide ascorbique sur l'activité enzymatique de PPO. Ils 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 de 0% dans les deux variétés pour l'activité résiduelle POD. Ainsi, **Li-Qin et al. (2009)** ont noté qu'après 10 jours de stockage, l'indice de brunissement des portions de pêche traitées à 0,2% d'acide ascorbique était inférieur à 2,5.

Généralement, lors de l'extraction des PPO, les conditions opératoires doivent permettre la solubilisation enzymatique complète de la fraction membranaire insoluble tout en empêchant la

fraction enzymatique d'oxyder les polyphénols endogènes (**De Rigal, 2001**). Puisque, les quinones formées par l'oxydation des polyphénols présents dans l'extrait enzymatique peuvent entraîner l'inactivation de l'enzyme. Pour cela, des agents réducteurs comme l'acide ascorbique, la cystéine ou des composés adsorbants des phénols comme le polyvinylpyrrolidone (PVP) sont habituellement ajoutés au milieu d'extraction (**Nicolas et al., 1994**). Alors, la capacité inhibitrice d'acide ascorbique a été attribué au fait qu'il fonctionne comme un réducteur, réduisant les quinones générées par PPO en diphénols incolores ou à réagir de manière irréversible avec les o-quinones pour produire des produits incolores stables ; soit par la chélation et la réduction de deux atomes de cuivre depuis le site actif (**Amiour et Hambaba, 2016 ; Baltas et al., 2017 ; Farouk et al., 2020**). Ainsi, il a empêché la formation de polymères bruns sans agir directement sur l'enzyme (**Bayindirli, 2010**).

En fin, la variation du taux d'inhibition entre les différents extraits et sources enzymatique peut s'expliquer par la présence de diverses formes enzymatique (iso-enzymes) dans l'extrait enzymatique qui présentent des caractéristiques structurales et physico-chimiques variables, ainsi que par la constitution des molécules actives dans les extraits végétaux qui inhibent l'activité enzymatique (**Schmitz et al., 2008; Farouk et al., 2020**).

II.5.4. Etude cinétique d'inhibition de l'activité de la POD des dattes

Selon les résultats d'étude des effets inhibiteurs des extraits des différents constituants du palmier dattier contre les deux enzymes responsables au brunissement enzymatique des dattes pour les cinq 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 réduction importante de l'activité de la POD avec un pourcentage atteignant 80% comme les extraits de périanthes et de palmes de la variété Ghars.

Ces résultats ont encouragé d'accomplir à l'étude de l'effet inhibiteur des extraits qui présentant un pourcentage d'inhibition plus de 50%, vis-à-vis la POD en vue de déterminer le type d'inhibition et les paramètres cinétiques en présence de chaque extrait. De ce fait, le graphique de l'inverse de la vitesse initiale d'oxydation du guaiacol à diverses concentrations d'inhibiteur ($1/V_{max}$) en fonction de l'inverse de la concentration du substrat ($1/S$) a été établi (**Figures 16**).

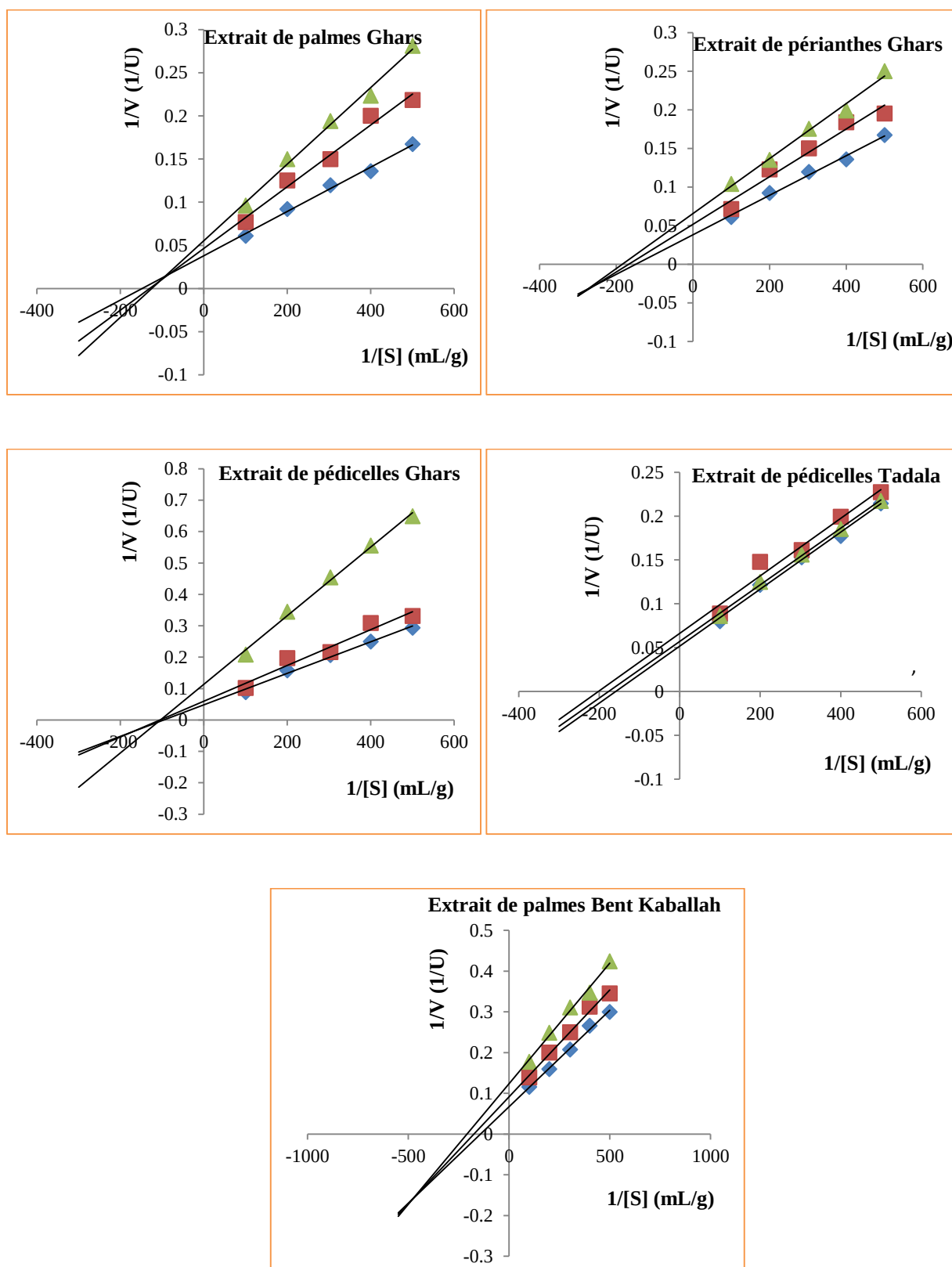


Figure 16: Graphique de Lineweaver-Burk d'inhibition de l'activité de la POD des dattes par les différents extraits du *Phoenix dactylifera* L..

Les extraits des pédicelles, périanthes et palmes de la variété Ghars et l'extrait des pédicelles de la variété Tadala ainsi que l'extrait des palmes de la variété Bent Keballah étant les inhibiteurs de la POD les plus efficaces avec des taux d'inhibition plus de 50%. Alors, nous nous sommes penchés sur les nombreuses sortes d'inhibitions qu'ils présentent dans le but de déterminer leurs modes d'action. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: Constante d'inhibition (K_i), IC_{50} et type d'inhibition des différents extraits inhibiteurs vis-à-vis l'activité de la POD des dattes.

Variété	Extraits	K_i (mg/mL)	IC_{50} (mg/mL)	Type d'inhibition
Tadala	Pédicelles	110,28	27,90	incompétitif
Ghars	Pédicelles	23,33	17,01	non compétitif
	Périanthes	83,33	17,39	non compétitif mixte
	Palmes	24,33	10,33	non compétitif mixte
Bent Keballah	Palmes	53,33	17,81	non compétitif mixte

L'étude de type d'inhibition des différents extraits sélectionnés a été réalisée sur l'activité peroxydasique pour chaque extrait inhibiteur. Les résultats acquis (**Tableau 12**) dévoilent que l'extrait de pédicelles de la variété Tadala agit comme inhibiteur compétitif sur la POD, alors que l'extrait de pédicelles de la variété Ghars agit comme inhibiteur non compétitif simple. Tandis que, les extraits de périanthes et de palmes de la variété Ghars agissent comme des inhibiteurs non compétitifs de type mixte. L'extrait de palmes de la variété Bent Keballah agit comme inhibiteur non compétitif mixte vis-à-vis l'activité de la POD. Alors, les extraits des pédicelles, des périanthes et des palmes agissent de manière différente d'un extrait enzymatique à un autre. Cela peut être expliqué soit par la présence d'une forme d'enzyme différente dans les extraits enzymatiques ; ou bien par la présence des iso-enzymes pour chaque extrait.

Le graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_{app}), qui dépend de la concentration de l'inhibiteur, est utilisé pour calculer la constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_i . La faible constante d'inhibition (K_i) est enregistrée pour l'extrait de pédicelles de la variété Ghars contre l'extrait enzymatique de la POD, avec une valeur de 23,33

mg/mL, ce qui signifie sa plus forte affinité de liaison à l'enzyme. Par contre, l'extrait de pédicelles de la variété Tadala a exhibé une grande valeur de K_i , égale 110,28 mg/mL.

Dans cette recherche, la cinétique d'inhibition de la POD des dattes par des différents extraits du palmier dattier en utilisant le guaïacol comme substrat est suivie. Selon les tracés de Lineweaver-Burk obtenus pour les extraits de périanthe et de palmes de la variété Ghars, les deux inhibiteurs ont modifié les valeurs de V_{max} (lorsque la concentration de l'inhibiteur augmente, V_{max} diminuent). Ainsi, ces inhibiteurs se lient à la fois avec l'enzyme libre et avec l'enzyme liée au substrat, mais avec des affinités différentes. Cela suggère que la capacité d'inhibition des extraits de périanthe et de palmes était de type mixte.

Les inhibiteurs des palmes et des périanthes peuvent avoir eu un impact sur l'affinité de l'enzyme pour le guaïacol, mais ils ne se sont pas liés au site actif de l'enzyme, selon le concept d'inhibition de type mixte. Leurs constantes d'inhibition respectives, K_i , ont été déterminées comme étant de 24,33 et 83,33 mg/mL. En raison de sa valeur K_i inférieure, on peut affirmer que l'extrait de palmes est l'inhibiteur le plus puissant. Selon les données, les composés chimiques inhibiteurs trouvés dans les périanthes et les palmes peuvent se lier à la fois au complexe enzyme-substrat et à l'enzyme libre afin d'exercer leurs effets inhibiteurs. De plus, l'affinité d'une enzyme pour un substrat ou un inhibiteur dépend de leurs interactions de l'autre (**Ramsay et Tipton, 2017 ; Buker et al., 2019**).

D'autre part, l'enzyme POD est inhibée de manière non compétitive simple par l'extrait de pédicelles de la variété Ghars. Dans le cas d'une inhibition non compétitive simple, l'inhibiteur et le substrat peuvent se lier simultanément à la molécule d'enzyme. Il est clair que deux molécules doivent se lier à des sites différents de l'enzyme. La présence d'un inhibiteur n'affecte pas la liaison au substrat mais interfère avec le fonctionnement catalytique de l'enzyme (**Sinan, 2012**). Alors, les composés actifs de cet extrait n'arrêtent pas le complexe enzyme-substrat de se former ; au contraire, ils l'empêchent de conduire à la formation de produits de réaction (**Yadav et Magadum, 2017**). De plus, ils maintiennent l'affinité de l'enzyme ($1/K_m$) constante pour son substrat, dont la constante d'inhibition (K_i) est de 23,33 mg/mL. Egalement, l'extrait de pédicelles de la variété Tadala montre une activité inhibitrice de type incompétitif vis-à-vis l'extrait enzymatique de la peroxydase. L'effet est probablement causé par les molécules actives incluses dans ces extraits, qui ne ressemblent pas structurellement au substrat mais peuvent fonctionner en se liant au complexe

enzyme-substrat plutôt qu'à l'enzyme seule. Cette sorte d'inhibition indique que l'affinité de l'enzyme pour son substrat à augmenter.

Des travaux précédents ont montrés la capacité des antioxydants naturels d'arrêter ou de réduire le brunissement des fruits et des légumes par l'inhibition des enzymes PPO et POD (**Jang et al., 2002**). Selon diverses études, les flavan-3-ols (comme la catéchine et l'épicatéchine), les flavonols et les flavones (comme la lutéoline et la rutine) et les acides phénoliques (comme les acides p-coumarique et caféique) étaient les produits chimiques phénoliques les plus répandus trouvés dans les palmes du palmier dattier pourrait être responsable de l'inhibition de la POD observée (**Abu-Reidah et al., 2017 ; John et Shahidi, 2019; Benouamane et al., 2022**). Ces substances bioactives, notamment les composés phénoliques, interagissent avec le site actif des enzymes en générant une liaison hydrogène, ce qui réduit l'activité des enzymes PPO et POD, car leur structure comprend le groupement hydroxyle (**Hamdan et al. 2022**).

Afin d'arrêter le brunissement enzymatique et d'augmenter la qualité nutritive des aliments, plusieurs études se sont concentrées sur la recherche d'agents anti-brunissement prometteurs provenant de sources naturelles telles que des extraits de fruits, de plantes, d'herbes ou de légumes. Ces extraits possèdent un certain nombre de substances bioactives qui fonctionnent comme des agents anti-brunissements pour ralentir le développement du brunissement (**Lee et al., 2007 ; Liu et al., 2012 ; Baltas et al., 2017 ; Dias et al. 2020**). À cet égard, les extraits de périanthes, de pédicelles et de palmes du palmier dattier peuvent être contribué de manière significative à réduire l'oxydation et peut fonctionner comme un agent anti-brunissement pour arrêter la détérioration des aliments.

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 différents composés bioactifs, tant en termes de composition chimique et de quantité. De fait que ces substances ralentissent ou empêchent la vitesse de réaction du 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**).

II.6.Caractérisation des molécules bioactives

Au cours des dernières décennies, les études scientifiques les plus modernes sont fixées à la recherche des nouvelles molécules actives, ou des matières premières pour la hémisynthèse à partir des plantes. La mise en évidence de principes actifs d'une plante entière devra être approfondie l'étude afin de permettre d'isoler et de caractériser d'éventuels nouveaux composés ou de trouver des composés déjà connus qui pourront être utilisés pour des études chimio-taxonomiques (McChesney et al., 2007). La purification et l'isolement des composés bioactifs des plantes sont des techniques qui ont connu un nouveau développement ces dernières années. Ces techniques modernes offrent, d'une part, la possibilité de mettre en parallèle le développement et la disponibilité de nombreux essais biologiques avancés et, d'autre part, de fournir des techniques précises d'isolement, de séparation et de purification. L'objectif lors de la recherche de composés bioactifs est de trouver une méthode appropriée permettant de sélectionner la matière source pour la bioactivité telle qu'un antioxydant ou un antibactérien, combinée à la simplicité, à la spécificité et à la rapidité (Altemimi et al., 2017).

La sélection et la collecte de matières végétales sont considérées comme des étapes principales pour isoler et caractériser un composé phytochimique bioactif. La prochaine étape implique une récupération d'informations ethnobotaniques pour discerner d'éventuelles molécules bioactives. Des extractions peuvent ensuite être réalisées avec divers solvants pour isoler et purifier les composés actifs responsables de la bioactivité. Ainsi, des techniques de chromatographie sur colonne peuvent être utilisées pour l'isolement et la purification des composés bioactifs. Les instruments développés tels que la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) accélèrent le processus de purification de la molécule bioactive. En revanche, différentes variétés de techniques spectroscopiques telles que l'UV-visible, l'infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectroscopie de masse peuvent identifier les composés purifiés (Altemimi et al., 2017 ; Abubakar et Haque, 2020).

Les propriétés prometteuses d'inhibition du brunissement enzymatique des dattes par les extraits du *Phoenix dactylifera* L., variété Ghars, peuvent être attribuées à un ou plusieurs des constituants individuels des extraits de différents ses organes (périanthes, pédicelles et des palmes) et éventuellement à l'effet synergique de ces constituants. Ceci nous a encouragé à mener une analyse phytochimique et une identification des constituants chimiques disponibles dans les différentes parties du palmier dattier d'origine locale (Ghardaïa- Algérie).

L'identification structurale des extraits a été effectuée du premier temps par une séparation par chromatographie sur colonne. Les fractions obtenues sont analysées qualitativement en utilisant LC-MS, réalisée dans les laboratoires du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques (CRAPC) d'Ouargla.

Caractérisation d'extrait de périanthes

Les composés phénoliques présents dans les fractions d'extrait de périanthes du palmier dattier, variété Ghars, ont été provisoirement identifiés par analyse UPLC/ESI/MS/MS (**Figure 17**).

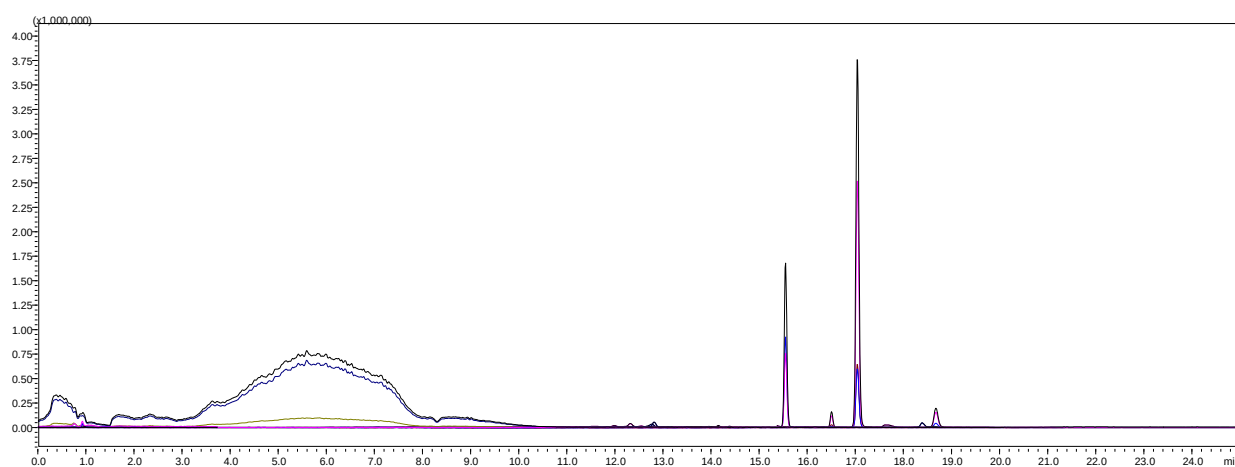


Figure 17: Chromatogramme LC-MS/MS de périanthes du *Phoenix dactylifera* L.

Les profils des composés phénoliques individuels obtenus avec des analyses LC-MS/MS d'extrait de périanthes et l'évolution de leurs quantités sont présentés au **Tableau 13**.

Tableau 13 : Molécules détectées dans les trois fractions d'extrait de périanthes selon les résultats de LC/MS-MS

Molécule	Rt (Min)	Formule Moléculaire	Aire fraction 1	Aire fraction 2	Aire fraction 3
Hydroxyquinoléine	1.015	C ₉ H ₇ NO	0	0	12535
Thymol	0.754	C ₁₀ H ₁₄ O	81601	4080	39659
Acide 2-méthoxybenzoïque	0.756	C ₈ H ₈ O ₃	1378062	275536	565546
Acide 4-mythoxybenzoïque	0.756	C ₈ H ₈ O ₃	1607018	665104	579159
Acide coumarique	0.755	C ₉ H ₈ O ₃	8356902	22503	3378916
Acide kojique	0.948	C ₆ H ₆ O ₄	0	68686	0
Acide férulique	12.551	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	482773	282699	421928
Naringénine	10.889	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	163502	0	173218
Bêta-carotène	12.629	C ₄₀ H ₅₆	0	17430	0
Kaempférol	11.989	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	928178	201716	892349
Quercétine	12.321	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	262357	449005	361577
Valinine	8.483	C ₈ H ₈ O ₃	474563	0	612252
Chrysine	13.909	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	5462	20697	21318
Mérycétine	17.043	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	4422975	11777839	14854379
Acide folique	17.62	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	310946	470916	221500
Rutine	18.678	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1512772	1076556	370381
4-Hydroxy coumarine	0.746	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	12746	25392	1197
Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	4.395	C ₇ H ₆ O ₄	41027	17061	21977
Acide caféique	6.104	C ₉ H ₈ O ₄	33665	12637	56979
Acide cis-p.coumarique	7.071	C ₉ H ₈ O ₃	57294	17981	34692
Acide salicylique	7.781	C ₇ H ₆ O ₃	266265	150494	223552
Acide gallique	11.114	C ₄ H ₄ O ₄	307022	213530	290025
Lutéoline	11.026	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	15412	11811	4015
Hespérétine	12.124	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	56097	55978	53285
Acide chlorogénique	15.549	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1055594	2928578	4276278

D'après le **Tableau 13**, de nombreux composés phénoliques ont été identifiés dans les chromatogrammes par LC-MS/MS. On peut voir que les principaux composés phénoliques trouvés dans le périanthe du *Phoenix dactylifera* L. sont l'acide coumarique, l'acide 4-mythoxybenzoïque, l'acide férulique, naringénine, kaempférol, quercétine, valinine, Mérycétine, l'acide folique, rutine, l'acide gallique et l'acide chlorogénique. Néanmoins, l'acide Syringique, la catéchine hydratée et l'acide sinapique ne sont pas détectés dans l'extrait de périanthe.

Caractérisation d'extrait de pédicelles

L'analyse qualitative des constituants présents dans les fractions d'extrait de pédicelles du palmier dattier, variété Ghars, a été performé en utilisant UPLC/ESI/MS/MS (**Figure 18**).

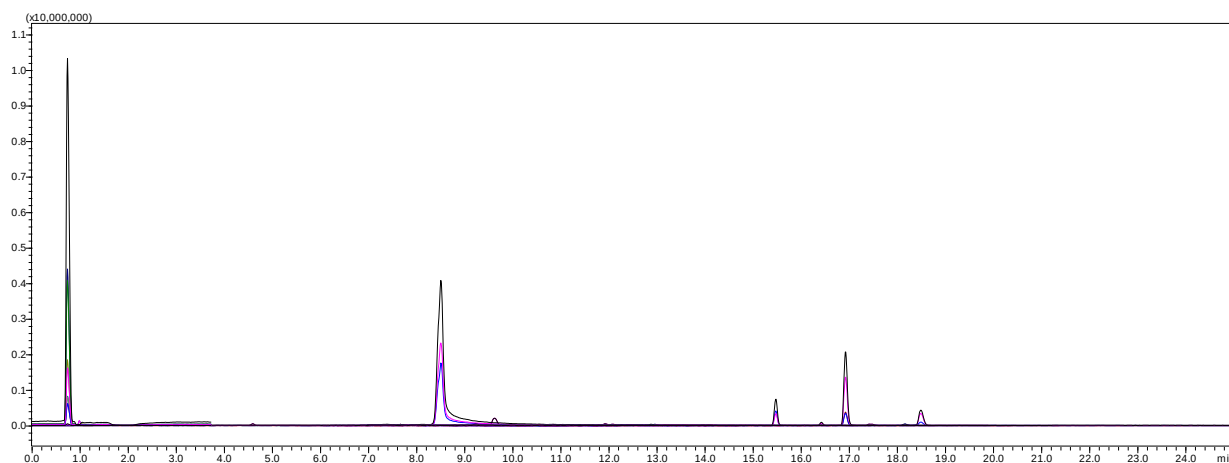


Figure 18 : Chromatogramme LC-MS/MS de pédicelles du *Phoenix dactylifera* L.

Les profils des composés phénoliques individuels obtenus avec des analyses LC-MS/MS d'extrait de pédicelles et l'évolution de leurs quantités sont présentés au **Tableau 14**.

Tableau 14 : Molécules détectées dans les trois fractions d'extrait de pédicelles selon les résultats de LC/MS-MS.

Molécule	Rt (Min)	Formule Moléculaire	Aire fraction 1	Aire fraction 2	Aire fraction 3
Hydroxyquinoléine	0.996	C ₉ H ₇ NO	0	18529	0
Thymol	0.746	C ₁₀ H ₁₄ O	36663	142611	181804
Acide 2-méthoxybenzoïque	0.747	C ₈ H ₈ O ₃	1171494	2889614	3372377
Acide 4-mythoxybenzoïque	0.746	C ₈ H ₈ O ₃	865637	3495365	4277749
Acide coumarique	0.746	C ₉ H ₈ O ₃	4502713	18281033	22006413
Acide kojique	1.029	C ₆ H ₆ O ₄	166486	326762	452081
Acide férulique	9.627	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	3901475	1949933	1230813
Naringénine	8.804	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	180698	159632	136549
Bêta-carotène	11.116	C ₄₀ H ₅₆	23513	41923	0
Kaempférol	12.082	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	859078	971817	934961
Quercétine	12.518	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	145457	112345	81914
Valinine	8.51	C ₈ H ₈ O ₃	6.03E+08	25356146	3122417
Chrysine	13.968	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	11766	7432	9027
Mérycétine	16.929	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	5428135	7380619	3934575
Acide folique	17.427	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	311372	373057	390223
Rutine	18.497	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	289160	2395381	253197
Acide sinapique	0	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	0	0	36444
4-Hydroxy coumarine	0.749	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	14929	23057	26997
Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	4.6	C ₇ H ₆ O ₄	75338	243456	396950
Acide caféique	8.134	C ₉ H ₈ O ₄	63472	367046	244815
Acide cis-p.coumarique	9.247	C ₉ H ₈ O ₃	526664	321447	262453
Acide Syringique	8.47	C ₉ H ₁₀ O ₅	2923	5484	9158
Acide salicylique	9.558	C ₇ H ₆ O ₃	392107	231932	289577
Acide gallique	11.824	C ₄ H ₄ O ₄	305488	213878	213662
Lutéoline	12.431	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	34240	22190	98676
Hespérétine	12.445	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	39808	50072	46812
Acide chlorogénique	15.481	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	994916	1557833	865349

D'après le **Tableau 14**, de nombreux composés phénoliques ont été identifiés dans les chromatogrammes par LC-MS/MS. On peut voir que les principaux composés phénoliques trouvés dans le pédicelle du *Phoenix dactylifera* L. sont l'acide coumarique, l'acide férulique, l'acide kojique, l'acide 4-mythoxybenzoïque, l'acide férulique, kaempférol, quercétine, merycetine, l'acide folique, rutine, acide 3,5-dihydroxybenzoïque, l'acide caféique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique. L'extrait de pédicelles est caractérisé par la présence d'une grande

quantité de naringénine et valinine ; aussi la présence d'acide syringique qu'il n'est pas détecté dans l'extrait de périanthes du palmier dattier. Généralement, les profils phénoliques des différents organes du palmier dattier (périanthes et pédicelles) n'ont pas été rapportés auparavant. Il existe très peu d'information dans la littérature concernant le profil phénolique des palmes du palmier dattier. Bien qu'il existe plusieurs rapports sur le profil phénolique HPLC des dattes (**John et Shahidi, 2019**).

De plus, les profils phénoliques présentés dans les chromatogrammes par LC-MS/MS de périanthes et pédicelles ont montré une superficie très importante pour l'acide coumarique, l'acide 2-méthoxybenzoïque, l'acide 4-méthoxybenzoïque, la valinine, le mérycétine, la rutine et l'acide chlorogénique par rapport les autres composés identifiés. La comparaison des surfaces de différents composés identifiés permet de remarquer ainsi la présence d'acide coumarique et de mérycétine en une grande quantité dans l'extrait de périanthes ; ce qui peut être jugé sa capacité importante de ralentir le brunissement enzymatique par l'inhibition de la peroxydase. Ainsi, les deux composés sont présentés des grandes surfaces dans les chromatogrammes d'extrait de pédicelles. Ce dernier est caractérisé ainsi par la présence de vaniline en une grande quantité par rapport l'extrait de périanthes qui montre une pauvreté pour ce composé.

La catéchine, l'épicatéchine et l'acide chlorogénique ont été signalé comme des substrats à hautes efficacité pour le PPO végétal. Dans de nombreux cas, l'enzyme a montré une plus grande affinité envers ces composés. Les chercheurs ont provoqué un brunissement *in vitro* en exposant individuellement les principaux composés phénoliques des fruits au PPO et ils ont découvert que les catéchines monomères (catéchine et épicatechine) et les procyanidine dimères (procyanidine B) provoquent un brunissement plus intense par rapport autres composés phénoliques du raisin. De plus, l'épicatéchine s'est avérée être le substrat endogène optimal du litchi et de la pomme PPO. De même, l'acide chlorogénique s'est avéré être le principal responsable du brunissement de la pomme de terre, et il a également été signalé comme un substrat clé dans les pommes (**Derardja et al., 2022**). Alors, l'absence de la catéchine et l'épicatéchine dans la composition phénolique des extraits des périanthes et des pédicelles, qui sont des substrats à hautes efficacité pour le PPO végétal, peut être expliquée le pouvoir inhibiteur puissant de ces extraits.

John et Shahidi, (2019) ont étudié les composés phénoliques dans les palmes et ont détecté de l'acide p-hydroxybenzoïque, l'épicatéchine, l'acide p-coumarique, la quercétine-3-galactoside, l'acide férulique, la rutine, l'hétéroside d'isorhamnétine, l'isorhamnétine-3-rhamnoglucoside. Tous ces composés ont été également trouvés par **Ziouti et al., (1996)**. Ces chercheurs ont notés que les

flavonoïdes se sont avérés être les principaux composés phénoliques dans les palmes principalement d'hétérosides de flavonol. Ainsi, les flavan-3-ols faisaient partie de la composition phénolique des feuilles, les principaux étant la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine.

Subséquemment, **Benouamane et al., (2022)** ont été caractérisés les palmes du palmier dattier par HPLC-MS. Ils ont identifiés un total de 21 composés phénoliques. Ces composés sont des acides phénoliques (tels que les acides coumariques et caféiques), des flavonols et les flavonones (comme la lutéoline et la rutine) et les flavan-3-ols (comme la catéchine et l'épicatéchine).

Egalement, l'isolement de six constituants des palmes du *Phoenix dactylifera* L. d'origine Saoudienne a été réalisé en succès dans l'étude de **Suleiman et al., (2021)**. Ainsi, l'analyses phytochimiques approfondies menées sur les extraits des palmes ont conduit à l'isolement de trois composés : triterpène (acide oléanolique), phénoliques (alcool vanillylique) et stérol-glycoside (β -Sitostérol-3-O- β -d-Glucoside) pour la première fois.

Plusieurs études se sont concentrées sur les extraits de plantes en tant que sources de composés inhibiteurs dans la réaction de la polyphénol oxydase. Dans la littérature, les composés dérivés des acides cinnamique et benzoïque sont les inhibiteurs compétitifs les plus couramment trouvés pour la PPO dans les cerises, les pommes, les poires, les pêches et les pommes de terre. En revanche, certains flavonols pourraient être des inhibiteurs phénoliques. Ils ont trouvé que la quercétine était la plus inhibante, suivie de la myricétine et du kaempférol. Encore, les acides phénoliques (acide p-coumarique, acide férulique, acide benzoïque et acide cinnamique) sont les composés qui se sont révélés agir comme inhibiteurs de la PPO. Par conséquent, l'acide gallique (acide phénolique), la myricétine (flavonoïde) et les 3-flavanols détectés dans l'extrait de thé vert pourraient probablement être responsables de l'inhibition de la PPO observée lorsque l'extrait de thé vert était appliqué sur des pommes de terre fraîchement coupées (**Bobo et al., 2022**).

D'ailleurs, les extraits des périanthes et de pédicelles du *Phoenix dactylifera* L. sont caractérisés par la présence de quercétine, de myricétine, du kaempférol, d'acide p-coumarique, d'acide férulique et d'acide gallique cela peut indiquer que l'effet inhibiteur puissant de nos extraits contre l'activité enzymatique de POD a été attribués aux ces composés. Généralement, la quercétine est l'un des flavonoïdes les plus abondants trouvés dans ces extraits. Ce composé montre la capacité d'inhibition de la PPO via de multiples mécanismes : en éliminant les radicaux du peroxyde

d'hydrogène (**Benkeblia, 2005**) et en chélatant le cuivre sur le site actif de l'enzyme (**Vhangani et Van Wyk, 2021**).

En outre, le travail de **Sroka et al., (2017)** a permis d'étudier l'effet de certains flavonoïdes sur les processus d'oxydation catalysés par les oxydoréductases telles que la lipoxygénase et la peroxydase. Le plus puissant inhibiteur de la lipoxygénase était le kempferol. Par contre, la peroxydase était plus fortement inhibée par la quercétine et la lutéoline.

Dias et ses collègues ont étudié les activités d'inhibition de la PPO et de la POD d'extraits méthanoliques dérivés de feuilles et de branches de fraisier. Les auteurs ont noté que les feuilles et les branches de fraisier ont montré un effet significatif sur la réduction de l'activité PPO et POD. En effet, 37 composés phénoliques des branches de fraisier ont été identifiés, ces composés bioactifs contiennent le groupe hydroxyle dans la structure des composés phénoliques, de sorte qu'ils interagissent en formant une liaison hydrogène au site actif des enzymes et réduisent ainsi l'activité enzymatique (PPO et POD). En dehors de cela, l'extrait de feuilles et de branches de fraisier ayant une activité de piégeage des radicaux libres (donneurs d'électrons ou d'hydrogène) pourrait contribuer à l'activité anti-brunissement. Par exemple, les composés phénoliques trouvés dans les feuilles et les branches de fraisier étaient l'acide gallique, le type procyanidine B, la catéchine, l'épicatéchine et les flavonols. Ces composés phénoliques se sont révélés être des inhibiteurs efficaces de la PPO et de la POD (**Dias et al., 2020**).

Les plus grandes propriétés potentielles anti-brunissements et antioxydantes du jus de raisin ont été attribuées à la présence de composés phénoliques (catéchines, acides chlorogénique, épicatechine, procyanidine B1 et B2) et d'acides organiques (acide ascorbique, acide citrique et acide malique), qui ont été identifiés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (**Hamdan et al., 2022**).

Récemment, il y a eu un intérêt accru pour la préparation d'écorce de racine et murier et d'extraits de brindilles en tant qu'agents anti-brunissement naturels dans les systèmes alimentaires. Il existe une grande quantité de composés phénoliques. Selon l'analyse de caractérisation des composés responsables des propriétés anti-brunissements via l'investigation chromatographique, une grande quantité de composés phénoliques et de ses dérivés, à savoir la morine, la rutine, le resvératrol, la maclurine et la flavone ont été identifiés, ce qui a montré l'inhibition naturelle de la tyrosinase et effets antioxydants (**Hamdan et al., 2022**).

De plus, l'analyse phytochimique sur les pelures de mangues a clarifié la présence de plusieurs composés bioactifs tels que les flavonoïdes. Ainsi, il est évident que les extraits de peau de mangue ont le potentiel s'être utilisés dans des agents anti-brunissements naturels. Les composés isolés des extraits de peau de mangue, y compris la magniférine, l'acide gallique et le protocatéchique, ont démontré la puissance inhibition de la PPO avec une IC_{50} de 0,3 mg/mL (**Hamdan et al., 2022**).

Le traitement par l'acide férulique a été efficace en réduisant l'activité enzymatique de PPO. En effet, l'effet anti-brunissement de l'acide férulique est dû au groupe hydroxyle en tant que donneur d'électrons à la quinone intermédiaire et à la réticulation de l'enzyme avec une liaison hydrogène faible. L'acide férulique pourrait inhiber l'activité de la PPO en tant qu'inhibiteur compétitif. En fait, les acides carboxyliques aromatiques, des acides cinnamiques et analogues, comme les acides p-coumarique, férulique et sinapique, représentant des inhibiteurs compétitifs de la PPO en raison de leur structure similaire aux substrats phénoliques (**Barbagallo et al., 2012**). Dans le cas du son de blé, sa composition est riche en acide férulique et p-coumarique. Ces composés ont montré une certaine efficacité dans l'inhibition spécifique de la PPO (**Sukhonthara, Kaewka et al., 2016**).

En revanche, l'analyse par LC-MS des organes du palmier dattier a révélé la présence d'acide p-hydroxybenzoïque qui était le principal composé phénolique lié aux parois des cellules. Ainsi, la présence d'acide caféique qui est connu pour être toxique pour les microorganismes et pourrait être impliqué dans les mécanismes de défenses des plantes (**John et Shahidi, 2019**). Également, l'analyse de composés phénoliques de nos extraits a permis de noter la présence l'acide salicylique qui joue un rôle important dans les réponses de défenses des plantes face aux attaques d'agents pathogènes. De plus, l'un des mécanismes d'action d'acide salicylique est l'inhibition de la catalase et l'ascorbate peroxydase (**Durner et Klessig, 1995**).

II.7. Etude statistique

II.7.1. Corrélation entre les teneurs en phénols totaux et les différentes activités

De nombreuses études suggèrent que les polyphénols sont les principaux composés responsables des activités antioxydantes et anti-brunissement enzymatique. Afin d'évaluer la présence de relations entre la teneur phénolique et les activités antioxydantes et anti-brunissement enzymatique, nous avons utilisé le coefficient de corrélation de Pearson (r) entre les différentes activités et la teneur en composés phénoliques. En effet, le coefficient de Pearson est un indice reflétant une relation linéaire et il varie entre -1 et +1. Autant, une valeur du coefficient de Pearson absolue de 1 indique une relation linéaire parfaite, tandis que, une corrélation proche de 0 indique l'absence de relation linéaire entre les variables. Néanmoins, le signe du coefficient indique la direction de la relation. Souvent, une valeur négative (corrélation négative) signifiant que lorsqu'une des variables augmente, l'autre diminue ; tandis qu'une valeur positive (corrélation positive) indique que les deux variables varient ensemble dans le même sens.

Tableau 15 : Valeurs de coefficient de corrélation de Pearson entre les activités antioxydantes, les activités anti-brunissement et teneurs en phénols totaux et des flavonoïdes.

Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,828	1					
DPPH	-0,382	-0,156	1				
ABTS	-0,240	-0,305	-0,153	1			
FRAP	0,004	-0,154	-0,085	-0,092	1		
POD	0,269	0,195	-0,176	-0,194	-0,208	1	
PPO	-0,268	-0,222	0,799	-0,144	-0,105	-0,171	1

Les coefficients de corrélation de Pearson ont été déterminés pour la teneur phénolique totale et flavonoïdes, de l'activité antioxydante et anti-brunissement enzymatique des 15 extraits du palmier dattier. Le **Tableau 15** révèle des paramètres significativement et fortement corrélés les

uns aux autres, tandis que les autres corrélations significatives étaient faibles, négatives ou incohérentes, ou bien n'étaient pas significatives, ce qui suggère l'absence de modèle d'association entre les paramètres testés et les méthodes d'analyse.

Il ressort clairement de cette étude que les teneurs en phénols totaux des 15 extraits sont bien corrélées avec ses contenus en flavonoïdes. En effet, une corrélation positive très significative a été observée entre la teneur total en phénols et le contenu des flavonoïdes avec un coefficient de corrélation de Pearson $r = 0,828$ ($p = 0,0001$). Ce qu'il peut être déduit que la quantité des flavonoïdes varie relativement avec le contenu en phénols totaux pour tous les extraits. Aussi, cette corrélation a montré l'existence d'une même classe de flavonoïdes dans ces extraits qui varie de manière semblable avec la quantité des phénols totaux. D'ailleurs, toutes les variétés ont montré une corrélation positive non significative entre la teneur total en phénols et en flavonoïdes sauf la variété Tadala qui a présenté une corrélation hautement significative ($r = 0,999$) lorsque la corrélation a été effectuée séparément au sein des paramètres de qualité de chaque cultivar (**Annexes 05**). En revanche, la partie de périanthe du palmier dattier a signalé une corrélation positive très significative par rapport les autres partie étudiées lors l'étude des corrélations au sein des organes ($r = 0,920$). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Rathore et Goyal (2016)** qui ont également observé de fort coefficient de corrélation (0,981) entre le contenu phénolique et la teneur en flavonoïdes.

Les molécules phénoliques et flavonoïdes sont des composants antioxydants importants qui sont responsables de la désactivation des radicaux libres en fonction de leur capacité à donner des atomes d'hydrogène aux radicaux libres. Ils possèdent également des caractéristiques structurales idéales pour éliminer les radicaux libres. Différents rapports de la littérature indiquent une corrélation linéaire entre la teneur totale en phénols et en flavonoïdes et la capacité antioxydante (**Aryal et al., 2019**). Néanmoins, les trois tests d'activité antioxydante et le contenu en composés phénoliques sont faiblement corrélés : test de DPPH ($r = -0,382$), test d'ABTS ($r = -0,240$) et test de FRAP ($r = 0,004$). Même observation a été constaté entre le pouvoir antioxydant et le contenu des extraits en flavonoïdes dont les coefficients de corrélation estimés sont : test de DPPH ($r = -0,156$), test d'ABTS ($r = -0,305$) et test de FRAP ($r = -0,154$). Ces résultats indiquent que le contenu phénolique de chaque extrait n'était pas directement lié aux activités antioxydantes, mais il existe d'autres composés susceptibles d'être plus actif que les composés phénoliques.

De même, des faibles coefficients de corrélation ont été observés pour DPPH et ABTS, DPPH et FRAP ainsi entre ABTS et FRAP. Ce qui suggère l'absence de modèle d'association entre la capacité antioxydante des molécules des extraits ou de piégeage des radicaux et leurs activités réductrices. Par contre, des fortes corrélations linéaires entre DPPH, ABTS et FRAP ont été rapportées dans des études antérieures pour différentes plantes (**Wootton-Beard et al., 2011 ; Zhang et al., 2011 ; Rumpf et al., 2023**).

En revanche, les valeurs obtenue de coefficient de Pearson montrent également une forte corrélation linéaire ($r = - 0,818$) pour les extraits de pédicelles des cinq variétés étudiées obtenus entre le test de DPPH et le contenu phénolique ; ainsi une corrélation hautement significative entre ce test et les flavonoïdes de même organe ($r = - 0,961$) a été observée (**Annexe 05**). Ces résultats suggèrent que plus de 80% des agents anti-radicalaires de ces extraits sont des composés phénoliques et spécifiquement des flavonoïdes. Ainsi, ces résultats montrent qu'il y a une influence de la concentration en phénols totaux et en flavonoïdes des pédicelles sur l'activité anti-radicalaire. De sorte que les extraits qui renferment des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes élevées présentent des pouvoirs anti-radicalaires les plus fortes. Toutefois, **Sultana et collaborateurs (2014)** ont montré que les composés phénoliques des extraits de chair de datte sont contributeurs majeurs aux activités antioxydantes des extraits ($r = 0,919$). De même, **Rathore et Goyal (2016)** ont signalé qu'il y avait une corrélation élevée entre le contenu phénolique et le DPPH• avec un coefficient de $r = 0,937$ pour les dattes de deux variétés Khuneizi et Zahidi cultivées au Bikaner.

De plus, une forte corrélation positive entre le contenu phénolique des extraits de la variété Tezerzait et le piégeage du radical ABTS^{•+} ($r = 0,999$) a été remarquée. Cette corrélation pourra être interprétée par le fait que ces extraits renferment des composés phénoliques présentant le même effet soit donneur d'un électron ou d'hydrogène pour apparier l'électron célibataire d'ABTS^{•+}. Egalement, la variété Bent keballah a déduit un coefficient de Pearson très élevé et très significatif avec son contenu en flavonoïdes ($r = - 0,999$). Ces résultats indiquent la contribution des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes comme des bons antioxydants pour balayer le radical d'ABTS^{•+}. Aussi, ces résultats sont conformes à ce que plusieurs auteurs ont affirmé dans la littérature, à savoir que l'activité antioxydante potentielle d'un extrait dépend de sa concentration en composés phénoliques (**Katsube et al., 2004 ; Kalia et al., 2008 ; Stagos et al., 2012 ; Amri et al., 2015 ; Guettaf et al., 2016**). On remarque ainsi que l'augmentation des taux en flavonoïdes de la variété Bent keballah soit inversement proportionnelle aux valeurs d'EC₅₀. Cela, implique qu'il y a une influence de la teneur sur l'activité antioxydante de telle sorte que l'activité antioxydante est augmentée avec la

diminution de la concentration de ces molécules. Tandis que, les effets synergiques entre les différents composants antioxydants doivent également être pris en considération car ils contribuent souvent fortement à l'activité antioxydante totale (Dias et al., 2020).

D'autre part, un coefficient de corrélation négatif observé entre le test de FRAP et le contenu en flavonoïdes de la variété Ghars ($r = -0,999$), indique un rôle important de la composition phénolique des extraits dans l'activité antioxydante. Aussi, une relation positive significative a été observée entre l'activité FRAP et la teneur phénolique totale et le contenu en flavonoïdes pour l'organe de périanthe du *Phoenix dactylifera* L. de cinq variétés ($r = 0,906$ et $r = 0,901$ respectivement). Cela signifie que 90 % de l'activité réductrice sont liées aux composés phénoliques.

D'un autre côté, des faibles corrélations ont été notées entre les effets anti-brunissement enzymatique et le contenu phénolique dont les coefficients de corrélation estimés sont de ($r = 0,269$) et ($r = -0,268$) pour l'inhibition de la peroxydase et de la polyphénol oxydase respectivement. Ainsi, des faibles coefficients de corrélation ont été notés entre l'effet inhibiteur des extraits vis-à-vis la peroxydase et de la polyphénol oxydase et le contenu en flavonoïdes ($r = 0,195$ et $r = -0,222$ respectivement). Ces résultats indiquent que le contenu phénolique de chaque extrait n'était pas directement lié aux activités inhibitrices, mais il existe d'autres composés susceptibles d'être plus actifs que les composés phénoliques. De plus, les valeurs obtenues de coefficient de Pearson montrent également une forte corrélation linéaire et très significative ($r = 0,799$, $p = 0,0001$) pour tous les extraits obtenus entre le test de DPPH et l'activité inhibitrice de PPO. Ce résultat suggère que 79% de la capacité d'inhibition de nos extraits est directement proportionnelle à la contribution de leurs activités anti-radicalaire.

Toutefois, les extraits de la variété Tezerzait ont noté une corrélation hautement significative et positive entre le contenu en flavonoïdes et l'activité inhibitrice de POD ($r = 0,999$). D'autre part, les bons coefficients de corrélation observés entre les tests de DPPH et l'inhibition de la POD des extraits des variétés Ghars et Bent Keballah ($r = 0,998$ et $r = -0,999$), indique un rôle important du mécanisme piègeur de radicaux dans l'activité anti-brunissement enzymatique.

II.7.2. Analyse en composantes principales

Pour tenter de mieux identifier les principaux facteurs contribuant à la variation des valeurs de la capacité antioxydante et l'activité anti-brunissement selon les échantillons et les méthodes utilisées, nous avons effectué une analyse en composantes principales (ACP). Cette analyse est effectuée pour fournir une présentation visuelle de toute association et mettre en évidence les paramètres analysés avec une variabilité maximale à partir la matrice de données composée de 15 échantillons x 7 méthodes. Ainsi, l'ACP a été réalisée pour identifier le lien entre les différentes variables à savoir DPPH, ABTS, FRAP, anti-POD et anti-PPO et pour démontrer comment le contenu phénolique total contribue à la capacité en antioxydants ou anti-brunissement du *Phoenix dactylifera* L.. Il est également utile pour comprendre la distribution des composés. Les résultats du plan factoriel de l'ACP sont représentés dans la **Figure 19**.

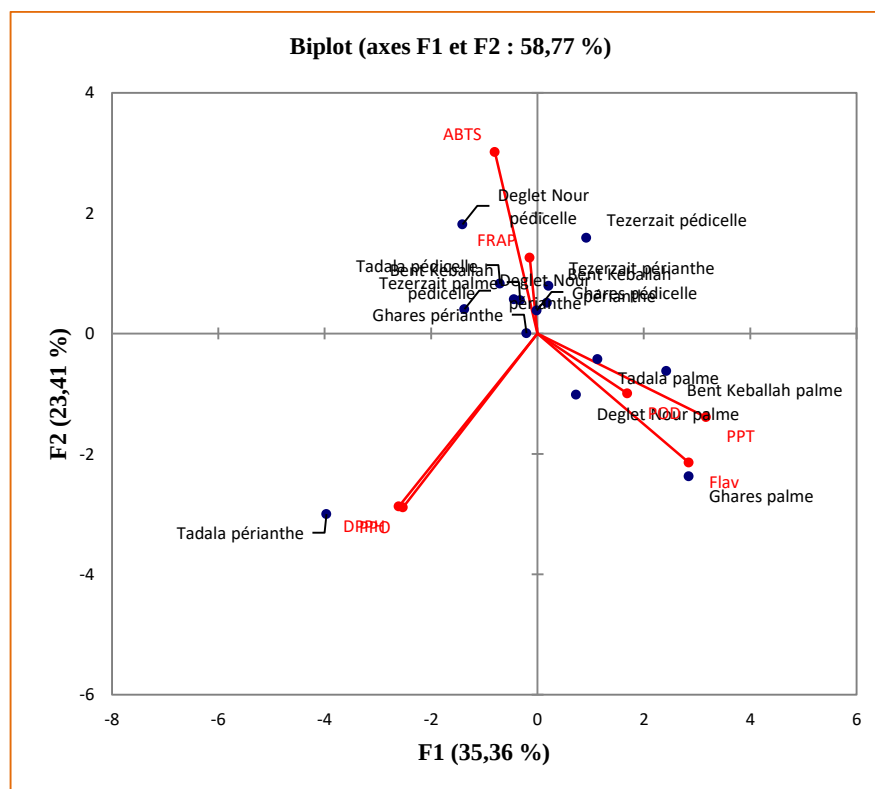


Figure 19: Distribution des échantillons testés dans le plan factoriel ACP.

La répartition des extraits de cinq variétés étudiées en fonction de leur capacité antioxydante (tests DPPH, ABTS et FRAP) et leur activité anti-brunissement enzymatique pour les deux enzymes PPO et POD montre qu'il y avait deux composantes principales expriment une variance totale de 58,77 %. La première composante principale (F1), a une influence dominante, avec une expression de 35,36% de la variation totale. Tandis que, le deuxième axe F2 expliquait avec une

variabilité de 23,41 %. La concentration en composés phénoliques et en flavonoïdes étaient les principaux contributeurs au F1 (28,87% et 23,23% respectivement) ; tandis que le test DPPH, le test d'ABTS et le test d'inhibition de polyphénoloxydase étaient les principaux contributeurs au F2 (23,75%, 26,06% et 23,99% respectivement). Les variables Flav, DPPH et anti-PPO sont partagées identiquement entre les deux axes et contribuent sur l'axe 2 à définir un gradient négatif. Toutefois, aucune contribution a été notée par la teneur en phénol totaux sur l'axe F2 (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Contributions des variables (%).

	F1	F2
PPT	28.8751	5.5554
Flav	23.2387	13.1950
DPPH	19.4731	23.7598
ABTS	1.8401	26.0685
FRAP	0.0606	4.5700
POD	8.1970	2.8613
PPO	18.3155	23.9901

Aussi, les tests DPPH et anti-PPO pointent dans la même direction, ce qui peut s'expliquer par le fait que la capacité d'inhibition d'extraits de périanthe de la variété Tadala est directement proportionnelle à la contribution de leur activité anti-radicalaire. Cette disposition concorde avec la matrice des coefficients de corrélation (**Tableau 15**) dont une corrélation très significative a été noté entre les tests DPPH et anti-PPO ($r = 0,799$, $p = 0,0001$). De ce fait, 79 % des agents anti-radicalaires contre le DPPH de cet extrait est également de bon agent inhibiteur de PPO.

D'autre part, la corrélation hautement positive entre la teneur phénolique totale, le contenu flavonoïdique et le test anti-POD suggère que les composés phénoliques contribuent de manière significative aux activités anti-brunissement enzymatiques des extraits des palmes des variétés Ghars, Deglet Nour, Tezerzait et Bent Keballah. Ainsi que ces extraits étaient riches en composés phénoliques et des flavonoïdes (**Tableau 7**) qu'ils ont étroitement associés à leurs capacités inhibitrices de peroxydase. Par ailleurs, l'extrait des palmes de Ghars était étroitement associé à la teneur en flavonoïdes qu'ils ont bien connu par ses propriétés antioxydantes, ce qui justifie leur meilleur potentiel antioxydant et anti-brunissement enzymatique par rapport aux autres extraits.

De plus, les extraits de pédicelles des variétés Ghars, Deglet Nour, Bent Keballah, Tadala et les extraits des périanthes Ghars et Deglet Nour encore l'extrait de palmes de la variété Tezerzait sont intimement liés au test d'ABTS et le pouvoir réducteur ferrique. Ce résultat est certainement justifié par une très forte corrélation linéaire positive ($r = 0,906$) entre le contenu phénolique des extraits de périanthes et leurs capacité de réduction ferrique (**Annexe 5**). Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques sont des constituants antioxydants majeurs dans certaines plantes et qu'il existe des relations directes entre leur activité antioxydante et la teneur totale en composés phénoliques.

Tandis que, les extraits des pédicelles et périanthes des variétés Tezerzait et l'extrait de périanthes de Bent Keballah n'étaient pas significativement associées à aucune des variables antioxydantes ou anti-brunissements. Cela indique que la teneur phénolique n'est pas le seul important facteur de la capacité antioxydante et d'inhibition du brunissement enzymatique, mais aussi la présence des autres composés bioactifs ayant ces propriétés.

Enfin, les résultats de l'ACP permettent de démontrer que la mesure de la capacité antioxydante et inhibition du brunissement enzymatique de nos extraits dépend de plusieurs facteurs, dont bien entendu la concentration en composés phénoliques. Ainsi qu'à leur nature diversifiée, avec des propriétés hydrophile ou hydrophobe, et de leur mécanisme d'action.



Conclusion Générale



Le contrôle du brunissement enzymatique était essentiel pour maintenir la qualité des aliments et satisfaire les besoins des consommateurs. De nombreuses études ont rapporté l'utilité d'extraits de plantes comme additifs anti-brunissement et antioxydants pour les aliments. Dans cette perspective, la présente étude a été conçue pour évaluer les extraits naturels les plus prometteurs pour l'activité antioxydante et anti-brunissement des sous-produits du *Phoenix dactylifera* L. (pédicelle, périanthe et palmes), de cinq variétés (Ghars, Deglet Nour, Tadala, Bent Keballah et Tezerzait) de la région de Metlili-Ghardaïa ; comme une essai pour aider à atténuer certains des problèmes de brunissement enzymatique des dattes. De ce raison, cette étude est axée du premier temps sur le criblage phytochimique et le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes des différents extraits issus des cinq variétés choisies. Tandis que, le deuxième volet a visé pour l'étude des propriétés antioxydantes et anti-brunissements enzymatiques des extraits, puis une tentative de caractérisation des principaux molécules bioactives du *Phoenix dactylifera* L.. En effet, les résultats obtenus lors de la réalisation de cette thèse nous amène à avancer les conclusions suivantes :

- L'extraction par macération à froid des différents organes du palmier dattier dans un solvant hydro-alcoolique (méthanol/eau) a dévoilé une rentabilité importante qui varie de 10 à 40,89 %. La variété Tezerzait a présenté le meilleur rendement d'extraction ainsi le plus faible par les extraits de périanthes et de palmes respectivement ;
- Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence que nos extraits sont riches en tanins, coumarines, composés réducteurs, quinones et flavonoïdes. Cependant, la recherche sur les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les saponines a donné des résultats négatifs ;
- Le dosage des composés phénolique montre que l'extrait de palmes de la variété Ghars présente la teneur la plus élevée par rapport aux autres extraits ($48,98 \pm 0,155$ mg EAG/g Ms). Tandis que, la teneur la plus faible a été enregistrée pour l'extrait de périanthes de la variété Tadala avec une teneur de $10,65 \pm 0,007$ mg EAG/g Ms ;
- En ce qui concerne les flavonoïdes, les teneurs acquises pour les différents extraits étudiés comprennent entre $1,75 \pm 0,003$ et $15,07 \pm 0,013$ mg ER/g MS. Toutefois, l'extrait de palmes de la variété Ghars a montré son richesse en flavonoïdes. Ainsi, une corrélation positive très significative a été observée entre la teneur total en phénols et le contenu des flavonoïdes avec un coefficient de corrélation de Pearson $r = 0,828$;

Conclusion générale

- Tous les extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux à piéger les radicaux DPPH• et ABTS•+ ; ainsi à réduire le fer ferrique ;
- L'extrait de périanthes de la variété Tezerzait a donné un fort pouvoir piégeur des radicaux DPPH•, il s'est avéré plus active que les antioxydants de référence ;
- Les extraits de périanthes et de palmes de la variété Bent Keballah ont présenté de fortes activités antioxydantes en comparaison avec tous les extraits bruts. Ces extraits ont montré également un fort pouvoir réducteur du fer ferrique et une meilleure capacité antioxydante vis-à-vis le radical ABTS•+ par rapport à les antioxydants de référence utilisés ;
- L'extrait des palmes de la variété Gharsa exhibé la meilleure activité antibrunissement (anti-POD) comparativement à tous les autres extraits (84,87 %) ; tant que aucune efficacité inhibitrice de PPO a montré par tous les extraits, à l'exception l'extrait des périanthes de la variété Tadala ;
- De nombreux composés phénoliques ont été identifiés dans les chromatogrammes par LC-MS/MS des sous produits du *Phoenix dactylifera* L. à savoir l'acide coumarique, l'acide 4-methoxybenzoïque, quercétine, merycetine, rutine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique.

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

Ces résultats restent préliminaires, ce qui nécessite d'autres études approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. Des études à l'échelle moléculaire seront nécessaires pour déterminer d'une part les composés actifs des sous produits du palmier dattier qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part pour étudier les activités antioxydantes *in vivo* des principes actifs afin de déterminer leurs doses préventives et thérapeutiques. Ainsi, d'élargir le panel des activités biologiques comme anti-tumorale, anti-cancéreux, anti-inflammatoire, anti-diabétique, anti-coagulant et autres.

Conclusion générale

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. De plus, la caractérisation *in silico* de ces enzymes des dattes. 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 du ralentir de cette réaction est très importante.

*Références
bibliographiques*

- ✓ Aberlenc-Bertossi, F. (Ed.). (2017). Biotechnologies du palmier dattier. IRD Éditions.
- ✓ Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1.
- ✓ Abu-Reidah, I. M., Gil-Izquierdo, Á., Medina, S., & Ferreres, F. (2017). Phenolic composition profiling of different edible parts and by-products of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by using HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Research International*, 100, 494-500.
- ✓ Adaika, M et Ramdani, B. (2015). Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques par ultrasondes feuilles de *phoenix dactylifera* L .Mémoire de master. Université EchahidHamma Lakhdar El Oued-Algérie.
- ✓ Ahmad Mohd Zain, M. R., Abdul Kari, Z., Dawood, M. A., Nik Ahmad Ariff, N. S., Salmuna, Z. N., Ismail, N., Ibrahim A. H., Krishnan K.T., Che Mat N. F., Atan Edinur H, Abdul Razab M. K. A., Mohammed A., Mohamed Salam S. K. N., Visweswara Rao P., Mohamad S., Hamat B., Zainal Abidin S., Lee Wei L., & Ahmed Shokri, A. (2022). Bioactivity and pharmacological potential of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against pandemic COVID-19: a comprehensive review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 194(10), 4587-4624.
- ✓ Ailli, A., Handaq, N., Touijer, H., Gourich, A. A., Drioiche, A., Zibouh, K., ... & Zair, T. (2023). Phytochemistry and Biological Activities of Essential Oils from Six Aromatic Medicinal Plants with Cosmetic Properties. *Antibiotics*, 12(4), 721.
- ✓ Aissa, T., Malek, B., Abderrahmane, B., & Messaouda, G. (2011). Application des indicateurs ethnobotaniques de la diversité au palmier dattier. *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 1(1), 9-9.
- ✓ Alahyane, A., Elateri, I., Ayour, J., Elqarnifa, S., Lasky, M., Ait-Oubahou, A., Benichou, M., & Abderrazik, M. (2022). Evolution of pigments and their relationship with skin color and sensory profile in date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Brazilian Journal of Biology*, 84, e252426.
- ✓ Al-Alawi, R. A., Al-Mashiqri, J. H., Al-Nadabi, J. S., Al-Shihi, B. I., & Baqi, Y. (2017). Date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.): natural products and therapeutic options. *Frontiers in plant science*, 8, 845.
- ✓ Alam, M. Z., Alhebsi, M. S., Ghnimi, S., & Kamal-Eldin, A. (2021). Inability of total antioxidant activity assays to accurately assess the phenolic compounds of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *NFS Journal*, 22, 32-40.

Références bibliographiques

- ✓ Al-Amrani, M., Al-Alawi, A., & Al-Marhobi, I. (2020). Assessment of enzymatic browning and evaluation of antibrowning methods on dates. *International Journal of Food Science*, 2020.
- ✓ Alici, E. H., & Arabaci, G. (2016). Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1051-1056.
- ✓ Al-Jassabi, S., Saad, A., Satyakeerthy, T. R., & Abdullah, M. S. (2013). Characterization of Polyphenol Oxidase from *Zyzyphus spina-christi* from Iraq.
- ✓ Al-Qarni, S. S. M., & Bazzi, M. D. (2020). Date fruit ripening with degradation of chlorophylls, carotenes, and other pigments. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup2), S827-S839.
- ✓ Al-Shuraym, L. A. (2022). The impact of the onion-garlic extracts to control date palm aphids in Saudi Arabia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21(8), 546-551.
- ✓ Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 42.
- ✓ 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.
- ✓ Andersen O. (2016). Chelation Treatment During Acute and Chronic Metal Overexposures- Experimental and Clinical Studies, in *Chelation Therapy in the Treatment of Metal Intoxication*, Elsevier Inc., pp. 85–252.
- ✓ 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(9), 1499-1504.
- ✓ Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49(6), 462-468.
- ✓ Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., & Koirala, N. (2019). Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from *Western Nepal*. *Plants*, 8(4), 96.

Références bibliographiques

- ✓ Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010).Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese science journal*, 11(1), 69-81.
- ✓ Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003).Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products.*Journal of agricultural and food chemistry*, 51(23), 6657-6662.
- ✓ Ayoola, G. A., Coker, H. A., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 7(3), 1019-1024.
- ✓ Baborun, T. (1997). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists* (Vol. 83).
- ✓ Baltas, N., Pakyildiz, S., Can, Z., Dincer, B., & Kolayli, S. Biochemical properties of partially purified polyphenol oxidase and phenolic compounds of *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* as measured by HPLC-UV. *International journal of food properties*, 2017, 20(sup2), 1377-1391
- ✓ Bastos, D. H. M., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A. C., Cunha, I. B., Carvalho, P. O., & Eberlin, M. N. (2007). Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*, 12(3), 423-432.
- ✓ Bayala, B. (2014). Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; Université Ouaga 1 Professeur Joseph Ki-Zerbo (Ouagadougou, Burkina Faso)).
- ✓ Belguedj, M. (2002). Les ressources génétiques du palmier dattier, caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies du Sud-Est Algérien. *Institut national de la recherche agronomique d'Algérie*, 1, 289.
- ✓ Belguedj M, et Trichine A. (2011) : Genetic resource of the date palm,characteristic of cultivars of Ghardaia,INRAA, pp : 136
- ✓ Benaceur, F., Gouzi, H., Meddah, B., Neifar, A., & Guergouri, A. (2019). Purification and characterization of catechol oxidase from *Tadela (Phoenix dactylifera* L.) date fruit. *International journal of biological macromolecules*, 125, 1248-1256.

Références bibliographiques

- ✓ Benouamane, O., Vergara-Barberan, M., Benaziza, A., Garcia-Alvarez-Coque, M. C., Simo-Alfonso, E., China, B., & Lerma-Garcia, M. J. (2022). Characterization of different cultivars of Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves and pollen by comprehensive two-dimensional liquid chromatography of phenolic compound extracted with different solvents. *Microchemical Journal*, 182, 107874.
- ✓ Bensemaoune, Y., Bezio, S., Senoussi, A., & Chehma, A. (2018). Le système d'élevage camelin dans la région de Ghardaïa: situation et perspectives. *Revue des bios ressources*, 8 (2), 13-13.
- ✓ Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- ✓ Bioud, S. et Hamdellou, A. (2019). Activités biologiques des extraits phénoliques de l'olivier «*Olea europaea* L.» (Doctoral dissertation, Abdelhafid Boussouf University centre-Mila).
- ✓ Bhandary, S. K., Bhat, V. S., Sharmila, K. P., & Bekal, M. P. (2012). Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 2(04), 34-38.
- ✓ Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, In: Numéro spécial, 79-82.
- ✓ Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- ✓ Boubekri, C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- ✓ Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, (9), 14.
- ✓ Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, (9), 14.
- ✓ Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*)

- muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food chemistry, 114(4), 1198-1205.
- ✓ Bouguedoura, N., Bennaceur, M., Babahani, S., & Benziouche, S. E. (2015). Date palm status and perspective in Algeria. Date Palm Genetic Resources and Utilization: Volume 1: Africa and the Americas, 125-168.
 - ✓ Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., & Marzouk, B. (2008). Phenolic composition and biological activities of *Tunisian Nigella sativa* L. shoots and roots. Comptes Rendus Biologies, 331(1), 48-55.
 - ✓ Boussoussa H., Hamia C., Djeridane A., Boudjeniba M., and Yousfi M. (2014). Effect of different Solvent Polarity on Extraction of Phenolic Compounds from Algerian Rhanterium adpressum Flowers and their Antimicrobial and Antioxidant Activities. Curr. Chem. Biol., vol. 8, no. 1, pp. 43–50.
 - ✓ Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igc, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). Food chemistry, 111(4), 925-929.
 - ✓ Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.
 - ✓ Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1), 25-30.
 - ✓ Buker, S. M., Boriack-Sjodin, P. A., & Copeland, R. A. (2019). Enzyme–inhibitor interactions and a simple, rapid method for determining inhibition modality. SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D, 24(5), 515-522.
 - ✓ Cai, X. X., Hong, Y. X., Wang, S. Y., Zhao, L. N., & Rao, P. F. (2015). Purification and enzymatic characteristics of a novel polyphenol oxidase from lotus seed (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). International Journal of Food Science & Technology, 50(4), 1026-1032.
 - ✓ Cano, A., Hernández-Ruíz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M., & Arnao, M. B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, 9(4), 196-202.
 - ✓ Chagas, P. M. B., Torres, J. A., Silva, M. C., & Corrêa, A. D. (2015). Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. International journal of biological macromolecules, 81, 568-575.

Références bibliographiques

- ✓ Chaibi, N., Abdallah, A. B., Harzallah, H., & Lepoivre, P. (2002). Potentialités androgénétiques du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. et culture in vitro d'anthères. BASE.
- ✓ 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(sup7), 316-329.
- ✓ Chandrasekhar, S. (2021). Studying the rate of polyphenol oxidase activity in apples using a colorimeter. Open Science Journal, 6(1).
- ✓ Chao, C. T., & Krueger, R. R. (2007). The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses, and cultivation. HortScience, 42(5), 1077-1082.
- ✓ Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. (2000). Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. Biochemistry, 39(1), 263-270.
- ✓ Chen, I. C., Chang, H. H., Yang, H. W., & Chen, G. L. (2004). Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H₂O₂/HRP system in microplates. Journal of Food and Drug Analysis, 12(1), 12.
- ✓ Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. Separation and Purification Technology, 55(2), 217-225.
- ✓ Christodoulou, M. C., Orellana Palacios, J. C., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Moreno, A., & Hadidi, M. (2022). Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. Antioxidants, 11(11), 2213.
- ✓ Conforti, F., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. Food Chemistry, 102(4), 1096-1104.
- ✓ Congo M. (2012). Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae). Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso, p 42.
- ✓ Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., & Anelli, G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. Food Chemistry, 110(3), 659-669.

Références bibliographiques

- ✓ Coupé, M., Pujarniscle, S., & d'Auzac, J. (1972). Compartimentation de diverses oxydo-réductases (peroxydase, o-diphenol-oxydase et malate déshydrogénase) dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth). *Müll Arg Physiologie Végétale*, 10, 459-464.
- ✓ De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Udo, A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- ✓ Dias, C., Fonseca, A. M., Amaro, A. L., Vilas-Boas, A. A., Oliveira, A., Santos, S. A., Silvestre, A. J. D., Rocha S. M., Isidoro, N., & Pintado, M. (2020). Natural-based antioxidant extracts as potential mitigators of fruit browning. *Antioxidants*, 9(8), 715.
- ✓ Dibacto, R. E. K., Tchuente, B. R. T., Nguedjo, M. W., Tientcheu, Y. M. T., Nyobe, E. C., Edoun, F. L. E., Kamini, M. F. G., Dibanda, R. F., & Medoua, G. N. (2021). Total polyphenol and flavonoid content and antioxidant capacity of some varieties of *Persea americana* peels consumed in Cameroon. *The Scientific World Journal*, 2021.
- ✓ Dieng, S. I. M., Fall, A. D., Diatta-Badji, K., Sarr, A., Sene, M., Sene, M., Mbaye, A., Diatta, W., & Bassene, E. (2017). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(2), 768-776.
- ✓ Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Maamri, S., Djireb, F., & Stocker, P. (2006). Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(6), 719-726.
- ✓ Dohou, N. (2004). Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de thymeleae lythroïdes (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat 2015, P 59).
- ✓ Djeridane, A., Hamdi, A., Bensania, W., Yousfi, M. (2015) : The in vitro evaluation of antioxidative activity, α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of natural phenolic extracts. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 9. 324-331.
- ✓ Dopico-García M.S., Valentão P., Guerra L., Andrade P.B. et Seabra R.M., 2007. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta*, volume 583 (1), p 15-22.
- ✓ Dou, Y., Chang, C., Wang, J., Cai, Z., Zhang, W., Du, H., Gan, Z., Wan, Ch., Chen, J., & Zhu, L. (2021). Hydrogen sulfide inhibits enzymatic browning of fresh-cut Chinese water chestnuts. *Frontiers in Nutrition*, 8, 652984.
- ✓ Ekpo, D. E., Joshua, P. E., Ogidigo, J. O., & Nwodo, O. F. C. (2020). High resolution UPLC-PDA-QTOF-ESI-MS/MS analysis of the flavonoid-rich fraction of *Lasianthera*

Références bibliographiques

- africana* leaves, and in vivo evaluation of its renal and cardiac function effects. *Heliyon*, 6(7).
- ✓ El Bakouri, Z., Meziani, R., Mazri, M. A., Chitt, M. A., Bouamri, R., & Jaiti, F. (2021). Estimation of the production cost of date fruits of cultivar Majhoul (*Phoenix dactylifera* L.) and evaluation of the Moroccan competitiveness towards the major exporting regions in the world. *Agricultural Sciences*, 12(11), 1342-1351.
 - ✓ El Hadrami, A., El Idrissi-Tourane, A., El Hassni, M., Daayf, F., & El Hadrami, I. (2005). Toxin-based in-vitro selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud Fusarium wilt. *Comptes Rendus Biologies*, 328(8), 732-744.
 - ✓ Esra, K. O. Ç., İşlek, C., & Üstün, A. S. (2010). Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Gazi University Journal of Science*, 23(1), 1-6.
 - ✓ Falleh, H. (2008). Phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of a Tunisian *Cynara Cardunculus* L. *CR Biologies*, 331(5), 372-379.
 - ✓ Falleh, H., Ksouri, R., & Abdelly, C. (2007). Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage, *Cynara cardunculus*. *Revue des régions arides*, 341-344.
 - ✓ 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 (5), 372-379.
 - ✓ Farouk, B., Aref, N., Rachid, C., Mourad, L., Emna, K., Fethi, B., Rania, B., Wafa, N., Kenza, B., Boumediene, M., Ali, G., Hubert, C., & Hicham, G. (2020). Characterization of three polyphenol oxidase isoforms in royal dates and inhibition of its enzymatic browning reaction by indole-3-acetic acid. *International journal of biological macromolecules*, 145, 894-903.
 - ✓ Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 89-111.
 - ✓ Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., Sayas-Barberá, E., Navarro-Rodríguez de Vera, C., & Pérez-Álvarez, J. Á. (2022). Biological, nutritive, functional and healthy potential of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.): Current research and future prospects. *Agronomy*, 12(4), 876.
 - ✓ Ghaisas, M. M., Navghare, V. V., Takawale, A. R., Zope, V. S., & Deshpande, A. D. (2008). In vitro antioxidant activity of *Tectona grandis* Linn. *Pharmacologyonline*, 3, 296-305.

Références bibliographiques

- ✓ Gheffour, K., Boucherit, K., & Boucherit-Otmani, Z. (2015). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13(5), 288-294.
- ✓ Ghnimi, S., Umer, S., Karim, A., & Kamal-Eldin, A. (2017). Date fruit (*Phoenix dactylifera* L.): An underutilized food seeking industrial valorization. *NFS journal*, 6, 1-10.
- ✓ Gianmaria F., Amato I., Ingenito A., Zarrelli A., Gabriele P., Antonino P. (2011). Plant polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties. A Review Molecule. *Journal of the Association for Information Science and Technology*. pp. 69; 6–20.
- ✓ Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- ✓ Gouzi, H., Depagne, C., & Coradin, T. (2012). Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 500-506.
- ✓ Götzke L., Schaper G., März J., Kaden P., Huittinen N., Stumpf T., Kammerlander K. K.K., Brunner E., Hahn P., Mehnert A., Kersting B., Henle T., Lindoy L. F., Zannoni G., Weigand J.J. (2019). Coordination chemistry of f-block metal ions with ligands bearing bio-relevant functional groups. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 386. Elsevier B.V., pp. 267–309.
- ✓ Gouzi, H. (2014). Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée (Doctoral dissertation, Paris 6).
- ✓ Gülçin, I., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2007). Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(4), 354-361.
- ✓ Habeeb, T. H. (2021). Inhibitory Action of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Leaf Extract on Pancreatic Lipase and α -Amylase Activities. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 24(7), 733-740.
- ✓ Haimoud, S. (2017). Etude phytochimique et rôles biologiques des variétés de *Phoenix dactylifera* (datte) de l'Algérie (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Département de Nutrition et Sciences des Aliments, Hassiba Benbouali, Chlef).
- ✓ Haimoud, S. A., & Allem, R. (2023). Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit cultivars: HPLC fingerprinting and antibacterial activity. *Foods and Raw Materials*, 11(1).

Références bibliographiques

- ✓ Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8), 253-265.
- ✓ Hamburger, M., & Hostettmann, K. (1991). 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30(12), 3864-3874.
- ✓ Hamdan, N., Lee, C. H., Wong, S. L., Fauzi, C. E. N. C. A., Zamri, N. M. A., & Lee, T. H. (2022). Prevention of enzymatic browning by natural extracts and genome-editing: a review on recent progress. *Molecules*, 27(3), 1101.
- ✓ Hamia, C., Guergab, A., Rennane, N. E., Birache, M., Haddad, M., Saidi, M., & Yousfi, M. (2014). Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressum*. *Annales des Sciences et Technologie*, 6(1), 33-39.
- ✓ 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(1).
- ✓ Hayes, J. E., Allen, P., Brunton, N., O'grady, M. N., & Kerry, J. P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 948-955.
- ✓ Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- ✓ Ioannou, I. (2013). Prevention of enzymatic browning in fruit and vegetables. *European Scientific Journal*, 9(30).
- ✓ Islam, M. Z., Hossain, M. T., Hossen, F., Mukharjee, S. K., Sultana, N., & Paul, S. C. (2018). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Crotalaria pallida* stem extract. *Clinical Phytoscience*, 4(1), 1-7.
- ✓ John, J. A., & Shahidi, F. (2019). Phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of seeds and leaves of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Food Bioactives*, 5, 120-130.
- ✓ Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H. J., & Pellon, G. (1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycological Research*, 102(12), 1459-1483.
- ✓ Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4846-4851.

Références bibliographiques

- ✓ Kaewjumphol, G., Srisamlee, S., Beckles, D. M., & Luengwilai, K. (2021). Enzymatic browning in banana blossoms and techniques for its reduction. *Horticulturae*, 7(10), 373.
- ✓ Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- ✓ Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 94(4), 550-557.
- ✓ Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48, 412-422.
- ✓ Ke-zhuo, Z. H. A. N. G., Ya-qian, Y. U., Rui, T. A. N. G., Yu-qi, Z. H. E. N. G., Jia-jun, G. A. O., & Xing-mao, J. I. A. N. G. (2019). Adsorption performance of polyvinylpyrrolidone for phenols in oil. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 47(11), 1305-1312.
- ✓ Khandelwal KR. *Practical Pharmacology Techniques and Experiments*. Pune, India: Nirali Parkashan; 2006. p. 15-163.
- ✓ Klimczak, I., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2017). Green tea extract as an anti-browning agent for cloudy apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1420-1426.
- ✓ Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- ✓ 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(2), 778-785.
- ✓ Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., E Griel MEd A., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9), 71-88.
- ✓ Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233.
- ✓ Kroyer, G. T. (2004). Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 101-105.
- ✓ Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., & Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible

Références bibliographiques

- medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. Food and Chemical toxicology, 47(8), 2083-2091.
- ✓ Kumar, A., Ilavarasan, R., Jayachandran, T., Decaraman, M., Aravindhan, P., Padmanabhan, N., & Krishnan, M. R. V. (2009). Phytochemicals investigation on a tropical plant, *Syzygium cumini* from Kattuppalayam, Erode district, Tamil Nadu, South India. Pakistan Journal of Nutrition, 8(1), 83-85.
 - ✓ Kwiatkowski, M., Wurlitzer, M., Krutilin, A., Kiani, P., Nimer, R., Omid, M., Manna, A., Bussmann, T., Bartkowiak, K., Kruber, S., Uschold, S., Steffen, P., Lübberstedt, J., Küpker, N., Petersen, H., Knecht, R., Hansen, N. O., Zarrine-Afsar, A., Robertson, W. D., Miller, R. J. D., Schlüter, H. (2016). Homogenization of tissues via picosecond-infrared laser (PIRL) ablation: Giving a closer view on the in-vivo composition of protein species as compared to mechanical homogenization. Journal of proteomics, 134, 193-202.
 - ✓ Kwon, Y. I. I., Vatter, D. A., & Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. Asia pacific journal of clinical nutrition, 15(1), 107.
 - ✓ Lamaison, J. L., & Carnat, A. (1991). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. en fonction de la période de végétation. Plantes médicinales et phytothérapie, 25(1), 12-16.
 - ✓ Laouini, S. E., Segni, L., Ouahrani, M. R., Gherraf, N., & Mokni, S. (2012). Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of leaves extract of date palm grown in Algeria. Journal of Fundamental and Applied Sciences, 4(2), 142-154.
 - ✓ Laouini, S. E. (2014). Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L. dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
 - ✓ 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 (Doctoral dissertation).
 - ✓ 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(2), 528-532.
 - ✓ Lee, S. K., Mbwambo, Z. H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E. J., Mehta, R. G., ... & Pezzuto, J. M. (1998). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. Combinatorial chemistry & high throughput screening, 1(1), 35-46.

Références bibliographiques

- ✓ Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.
- ✓ Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11), 19180-19208.
- ✓ Liebenberg, P. J., & Zaid, A. (2002). Date Palm Cultivation FAO Plant Production and Protection Paper.
- ✓ Lim, W. Y., & Wong, C. W. (2018). Inhibitory effect of chemical and natural anti-browning agents on polyphenol oxidase from ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *Journal of food science and technology*, 55, 3001-3007.
- ✓ Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
- ✓ Madike, L. N., Takaidza, S., & Pillay, M. (2017). Preliminary phytochemical screening of crude extracts from the leaves, stems, and roots of *Tulbaghia violacea*. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*, 9(10), 1300-1308.
- ✓ Majob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian J Pharma Res*, 2, 77-82.
- ✓ Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- ✓ Maisuthisakul, P., Pasuk, S., & Ritthiruangdej, P. (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 229-240.
- ✓ Majid, A., Naz, F., Bhatti, S., & Phull, A. R. (2023). Phenolic Profile and Antioxidant Activities of Three Date Seeds Varieties (*Phoenix dactylifera* L.) of Pakistan. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*, (000), 0-0.
- ✓ Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Mémoire, Université de Limoges, Limoges.
- ✓ María de L. c y Vargas¹, Daniel I. Chan Matú¹, Jorge A. Tamayo Cortez¹, Víctor M. Toledo López¹, Perla del Golfo Garrido Vivas¹, Carlos H. Herrera Méndez². (2022). Effect of extraction conditions on total polyphenols content and in vitro antioxidant activity of Kat

- cucumber (*Parmentiera aculeata*). Agricultural Science Research Journal, Volume (12) Issue (2): 43 – 51.
- ✓ Martinez, M. V., & Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends in Food Science & Technology, 6(6), 195-200.
 - ✓ Mayer, A. M., & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. Phytochemistry, 18(2), 193-215.
 - ✓ McChesney, J. D., Venkataraman, S. K., & Henri, J. T. (2007). Plant natural products: back to the future or into extinction?. Phytochemistry, 68(14), 2015-2022.
 - ✓ Mercimek, H. A., Guzeldag, G., Ucan, F., Guler, K. C., Karaman, M., & Karayilan, R. (2015). Inhibition of polyphenol oxidase purified from potato (*Solanum tuberosum*). Romanian Biotechnological Letters, 20(6), 10961-10968.
 - ✓ Merouane, A., Noui, A., Ali, K. N. B., & Saadi, A. (2014). Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. International journal of biological and chemical sciences, 8(4), 1865-1870.
 - ✓ Messaoudi, A., Dekmouche, M., Rahmani, Z., & Bensaci, C. (2021). Phenolic profile, Antioxidant potential of date (*Phoenix dactylifera* Var. Degla Baidha and Deglet-Nour) seeds from Debila region (Oued Souf, Algeria). Asian Journal of Research in Chemistry, 14(1), 37-41.
 - ✓ Messaoudi, R., Abbeddou, S., Mansouri, A., Calokerinos, A. C., & Kefalas, P. (2013). Phenolic profile and antioxidant activity of date-pits of seven Algerian date palm fruit varieties. International Journal of Food Properties, 16(5), 1037-1047.
 - ✓ Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. Redox report, 2(3), 161-171.
 - ✓ Molnár-Perl, I., & Füzfai, Z. (2005). Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. Journal of Chromatography A, 1073(1-2), 201-227.
 - ✓ Moon, K. M., Kwon, E. B., Lee, B., & Kim, C. Y. (2020). Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products. Molecules, 25(12), 2754.
 - ✓ Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Nuriez M. J., & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. Food chemistry, 72(2), 145-171.
 - ✓ Munier, P., Vilardebo, A., Laville, E., Navilie, R. et Trocellier, E. (1973). Le palmier Dattier, Maisonneuve & Larose 11, rue Victor-Cousin, 11 PARIS (Ve) p 19-211.

Références bibliographiques

- ✓ Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- ✓ Nogales-Delgado, S. (2021). Polyphenoloxidase (Ppo): Effect, current determination and inhibition treatments in fresh-cut produce. *Applied Sciences*, 11(17), 7813.
- ✓ Oloyede, O. I. (2005). Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*, 4(6), 379-381.
- ✓ Osorio-Tobón, J.F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 4299-4315.
- ✓ Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.
- ✓ Ouyang Q., Kou F., Zhang N., Lian J., Tu G., and Fang Z. (2019). Tea polyphenols promote Fenton-like reaction: pH self-driving chelation and reduction mechanism, *Chem. Eng. J.*, pp. 514–522.
- ✓ Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and chemical toxicology*, 41(12), 1727-1738.
- ✓ Paduch, R., Wójciak-Kosior, M., & Matysik, G. (2007). Investigation of biological activity of *Lamii albi flos* extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 110(1), 69-75.
- ✓ Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204-214.
- ✓ Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernández, N. A., Sampedro, J. G., & Nájera, H. (2014). Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mango (*Mangifera indica* cv. *Manila*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9832-9840.
- ✓ Paris, R., & Moyse, H. (1969). *Précis de matière médicale*. Ed Masson Paris.
- ✓ Pastre, J., & Priymenko, N. (2007). Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, 1(4), 180-189.
- ✓ Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2004). Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 37(2), 199-204.

Références bibliographiques

- ✓ Popova, I. E., Hall, C., & Kubátová, A. (2009). Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(2), 217-229.
- ✓ Prouillac, C. (2006). Synthèse et évaluation de nouveaux composés organiques et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- ✓ Qiao, L., Wang, H., Shao, J., Lu, L., Tian, J., & Liu, X. (2021). A novel mitigator of enzymatic browning—hawthorn leaf extract and its application in the preservation of fresh-cut potatoes. *Food Quality and Safety*, 5, fyab015.
- ✓ 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(3), 609-613.
- ✓ Radulescu, C., Buruleanu, L. C., Georgescu, A. A., & Dulama, I. D. (2019). Correlation between enzymatic and non-enzymatic antioxidants in several edible mushrooms species. *Food Engineering*, 1-38.
- ✓ Raghavendra, H. L., Prashith, K. T., Akarsh, S. M., & Ashwini, H. S. (2015). Phytochemical analysis, antifungal and antioxidant activity of leaf and fruit of *Zizyphus xylopyrus* (Retz.) Willd. (Rhamnaceae). *Science, Technology and Arts Research Journal*, 4(4), 83-88.
- ✓ Ramsay, R. R., & Tipton, K. F. (2017). Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. *Molecules*, 22(7), 1192.
- ✓ Rao V. (2012). Management of seed mycoflora of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) *Journal of Oilseeds Research*. vol. 29, pp. 332-335.
- ✓ Rastegar, S., Rahemi, M., Baghizadeh, A., & Gholami, M. (2012). Enzyme activity and biochemical changes of three date palm cultivars with different softening pattern during ripening. *Food Chemistry*, 134(3), 1279-1286.
- ✓ Rathore, R., & Goyal, M. (2016). Harnessing the value addition and nutraceutical potential of date fruits. *Journal of Agriculture and Ecology*, 1, 35-40.
- ✓ Rekis, A., Laiadi, Z., & Mehenni, M. (2020). Morphological characteristics denomination of date palm studied cultivars. *Algerian Journal of Arid Regions (JARA)*, 14(1), 131-140.
- ✓ Ribeiro, B., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2007). Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45(10), 1805-1813.

Références bibliographiques

- ✓ Rizk, A. M., Heiba, H. I., Sandra, P., Mashaly, M., & Bicchi, C. (1983). Constituents of plants growing in Qatar. *Journal of chromatography. A*, 279, 145-150.
- ✓ Robinson, A. L., Lee, H. J., & Ryu, D. (2017). Polyvinylpolypyrrolidone reduces cross-reactions between antibodies and phenolic compounds in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ochratoxin A. *Food chemistry*, 214, 47-52.
- ✓ Rumpf, J., Burger, R., & Schulze, M. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123470.
- ✓ Sabarre Jr, D. C., & Yagonia-Lobarbio, C. F. (2021). Extraction and characterization of polyphenol oxidase from plant materials: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 8(2), 83-95.
- ✓ Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- ✓ Sarraf, M., Jemni, M., Kahramanoğlu, I., Artés, F., Shahkoomahally, S., Namsi, A., Ihtisham, M., Brestic, M., Mohammadi, M., & Rastogi, A. (2021). Commercial techniques for preserving date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit quality and safety: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4408-4420.
- ✓ Satyajit, D., Sarker, Z., Latif, A., and Gray, I. (2006) : Natural product isolation. Second edition. Humana Press Inc ISBN 1-59259-955-9.
- ✓ Sedra, M. H. (2003). Le palmier dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc: techniques phoénicoles et création d'oasis. INRA Editions.
- ✓ Selvarajan, E., Veena, R., & Manoj Kumar, N. (2018). Polyphenol oxidase, beyond enzyme browning. *Microbial bioprospecting for sustainable development*, 203-222.
- ✓ Shahidi, F., & Dissanayaka, C. S. (2023). Phenolic-protein interactions: insight from in-silico analyses—a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 1-21.
- ✓ Siddiq, M., & Dolan, K. D. (2017). Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food chemistry*, 218, 216-220.
- ✓ Silva, E. M., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 381-387.
- ✓ Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Références bibliographiques

- ✓ Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- ✓ Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J. and Wojdyło, A. (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 103:853-859.
- ✓ 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(8), 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(1), 200-208.
- ✓ Sudan, R., Bhagat, M., Gupta, S., Singh, J., & Koul, A. (2014). Iron (FeII) chelation, ferric reducing antioxidant power, and immune modulating potential of *Arisaema jacquemontii* (*Himalayan Cobra Lily*). *BioMed Research International*, 2014.
- ✓ Suleiman, R. K., Iali, W., El Ali, B., & Umoren, S. A. (2021). New constituents from the leaves of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) of Saudi origin. *Molecules*, 26(14), 4192.
- ✓ Sultana, B., Fatima, B., & Mushtaq, M. (2014). In vitro synergism of antimutagenic and antioxidant activities of *Phoenix dactylifera* fruit. *Food Science and Biotechnology*, 23, 881-887.
- ✓ Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, physiological and genetic aspects. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 377.
- ✓ Taşkın, D., Gecim, M., DOĞAN, A., & Beceren, A. (2021). Polyphenolic composition and Antioxidant Effect of Aerial Parts and Roots Extracts from *Scorzonera veratrifolia*. *International Journal of Secondary Metabolite*, 8(3), 284-299.
- ✓ Tirichine, H. S. (2010). Etude ethnobotanique, activité antioxydante et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-Est algérien (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).
- ✓ Toutain, G. (1979). *Eléments d'agronomie saharienne: de la recherche au développement*. (No Title).
- ✓ Trease, E. Evans, W. C. (1987). *Pharmacognosie*. Billiaire Tindall, 13th Edition London, UK, 61-62.
- ✓ Vámos-Vigyázó, L., & Haard, N. F. (1981). Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(1), 49-127.

Références bibliographiques

- ✓ Venturi, F., Bartolini, S., Sanmartin, C., Orlando, M., Taglieri, I., Macaluso, M., Lucchesini, M., Trivellini A., Zinnai, A., & Mensuali, A. (2019). Potato peels as a source of novel green extracts suitable as antioxidant additives for fresh-cut fruits. *Applied Sciences*, 9(12), 2431.
- ✓ Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- ✓ Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS+ method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64(2), 501-509.
- ✓ Waite, J. H. (1976). Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones. *Analytical Biochemistry*, 75(1), 211-218.
- ✓ Whitaker, J. R., & Lee, C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning: an overview.
- ✓ Will, F., Zessner, H., Becker, H., & Dietrich, H. (2007). Semi-preparative isolation and physico-chemical characterization of 4-coumaroylquinic acid and phloretin-2'-xyloglucoside from laccase-oxidized apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 40(8), 1344-1351.
- ✓ Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.
- ✓ Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food research international*, 44(1), 217-224.
- ✓ Xu, J., Zheng, T., Meguro, S., & Kawachi, S. (2004). Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). *Journal of Wood Science*, 50, 260-265.
- ✓ Yadav, G. D., & Magadum, D. B. (2017). Kinetic modelling of enzyme catalyzed biotransformation involving activations and inhibitions. *Enzyme inhibitors and activators*, 73-124.
- ✓ Yen, J. L., Su, N. Y., & Kaiser, P. (2005). The yeast ubiquitin ligase SCFMet30 regulates heavy metal response. *Molecular biology of the cell*, 16(4), 1872-1882.
- ✓ Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review 1. *Journal of food biochemistry*, 27(5), 361-422.
- ✓ Young, R. E. (1965). Extraction of enzymes from tannin-bearing tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 111(1), 174-180.

Références bibliographiques

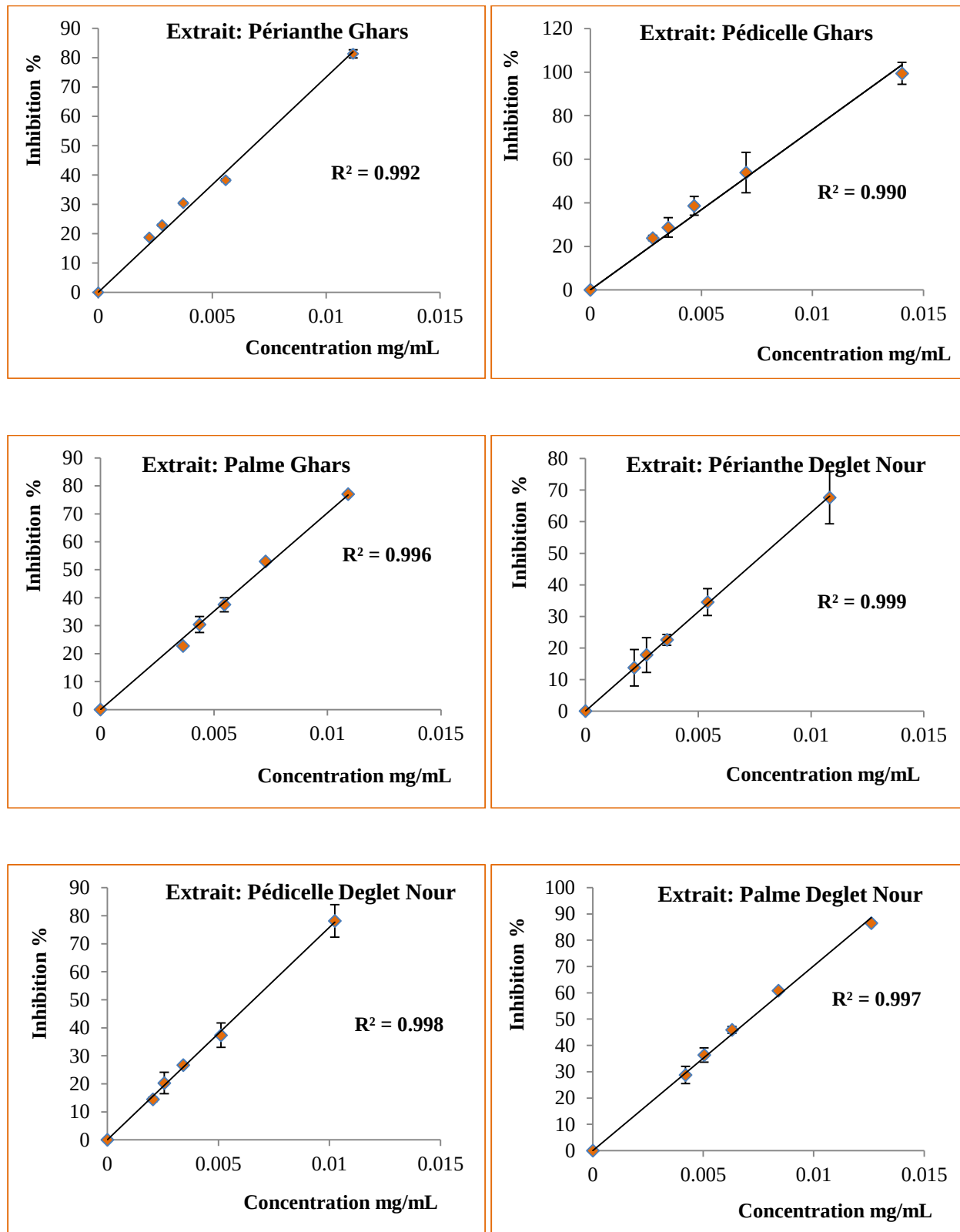
- ✓ Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. (2005). Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food chemistry*, 90(1-2), 199-206.
- ✓ Zawistowski, J. (1991). Polyphenol oxidase. *Oxidative enzymes in foods*, 217-274.
- ✓ Zhang, Z., Pang, X., Xu, D., Ji, Z., & Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1-2), 47-52.
- ✓ Zhang, D., Chu, L., Liu, Y., Wang, A., Ji, B., Wu, W., ...& Jia, G. (2011). Analysis of the antioxidant capacities of flavonoids under different spectrophotometric assays using cyclic voltammetry and density functional theory. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 10277-10285.
- ✓ Zhou, X., Xiao, Y., Meng, X., & Liu, B. (2018). Full inhibition of Whangkeumbae pear polyphenol oxidase enzymatic browning reaction by L-cysteine. *Food chemistry*, 266, 1-8.
- ✓ Zihad, S. N. K., Uddin, S. J., Sifat, N., Lovely, F., Rouf, R., Shilpi, J. A., Sheikh, B. Y., & Göransson, U. (2021). Antioxidant properties and phenolic profiling by UPLC-QTOF-MS of Ajwah, Safawy and Sukkari cultivars of date palm. *Biochemistry and biophysics reports*, 25, 100909.
- ✓ Ziouti, A., El Modafar, C., Fleuriet, A., El Boustani, S., & Macheix, J. J. (1996). Phenolic compounds in date palm cultivars sensitive and resistant to *Fusarium oxysporum*. *Biologia Plantarum*, 38, 451-457.
- ✓ Zitout, M. S. (2007). Contribution à l'étude des paramètres de production (lait) et de la reproduction chez le dromadaire population CHAËMBI dans la région de Metlili (Doctoral dissertation, Université KASDI Merbah Ouargla).
- ✓ Ziyan, E., & Pekyardimci, Ş. (2003). Characterization of polyphenol oxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turkish Journal of Chemistry*, 27(2), 217-226.
- ✓ Ziyan, E., & Pekyardimci, Ş. (2004). Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turkish Journal of Chemistry*, 28(5), 547-558.

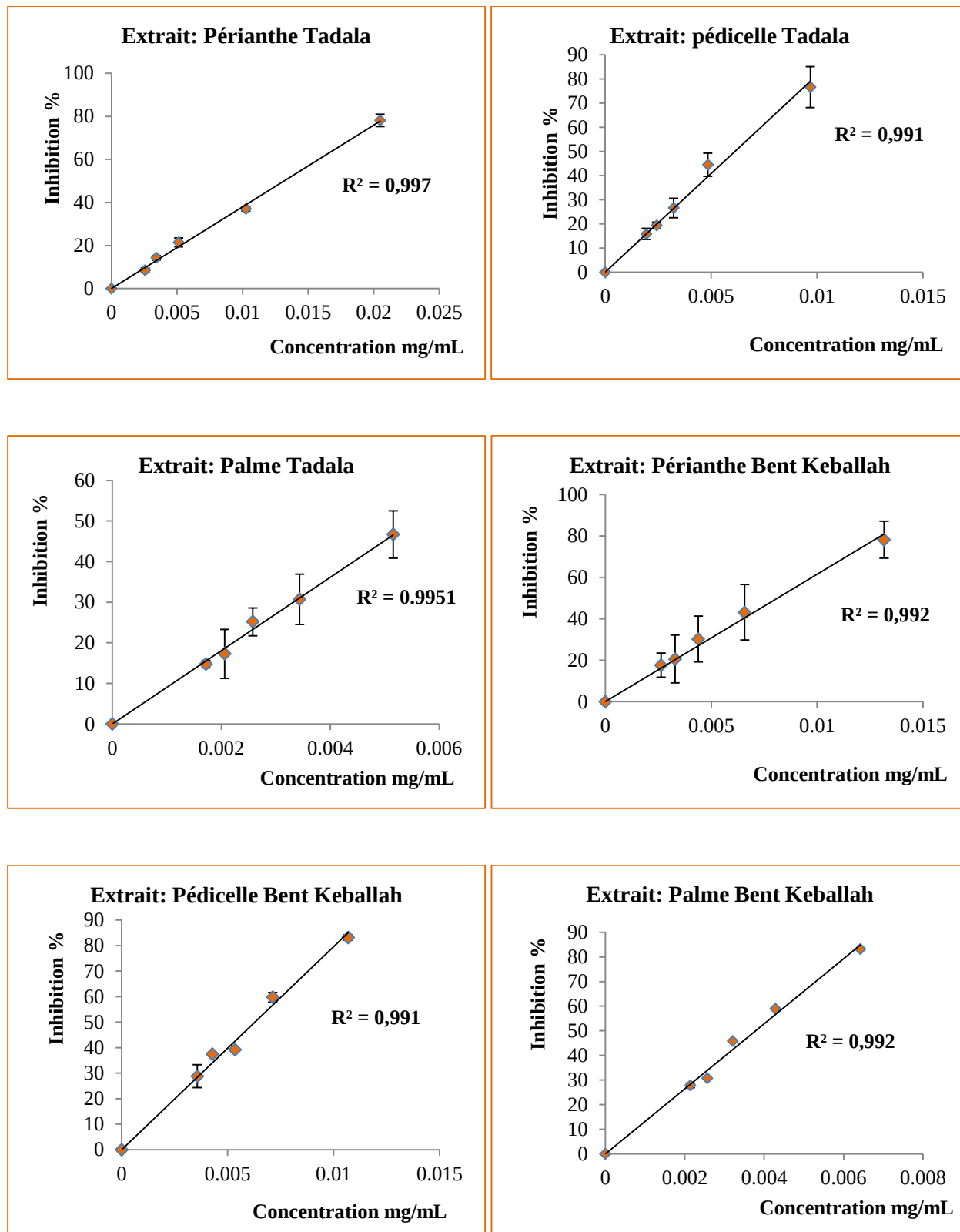
Site web :

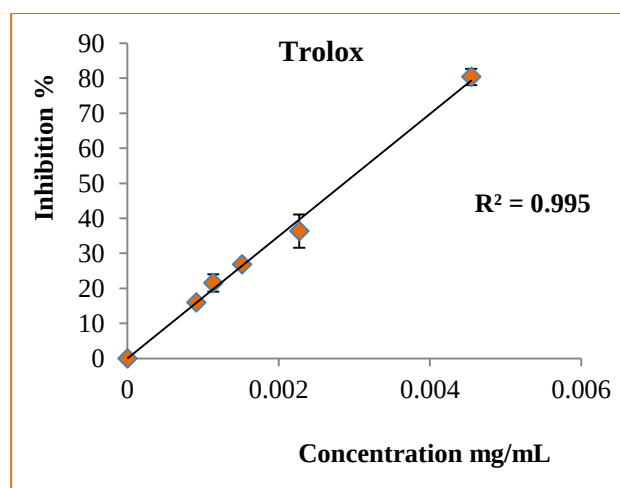
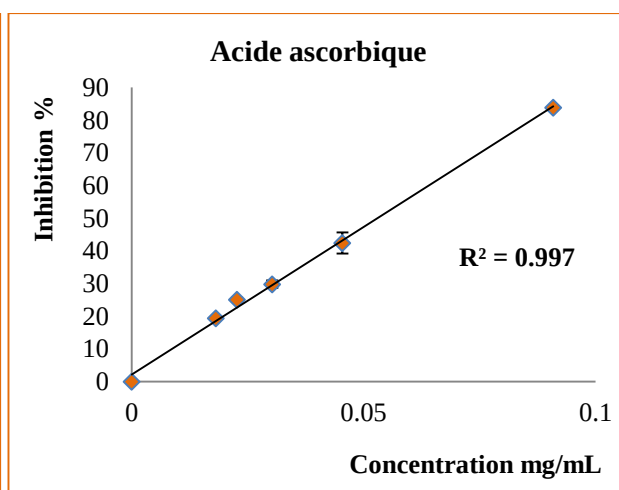
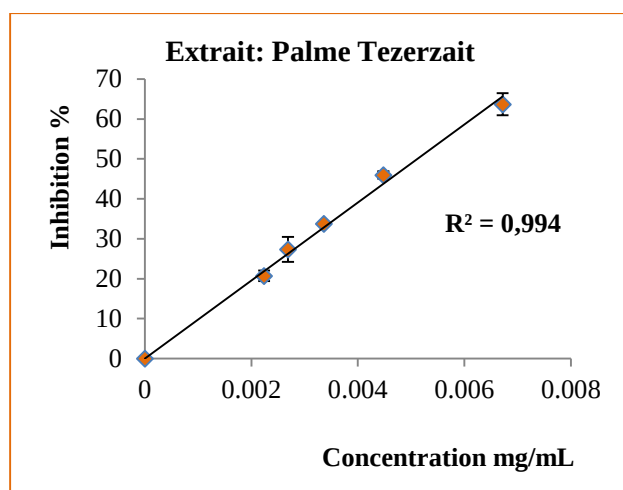
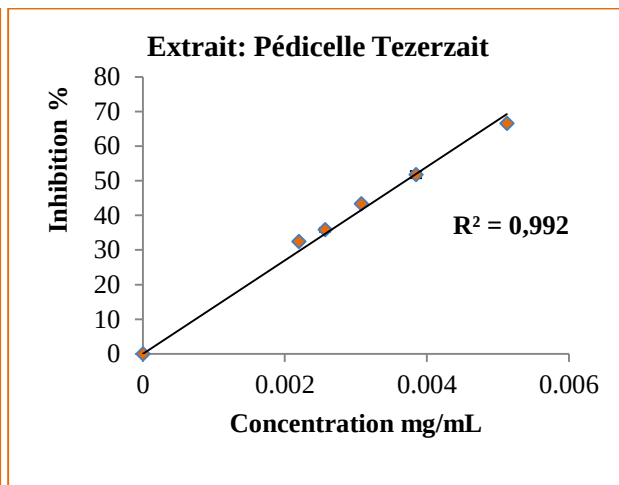
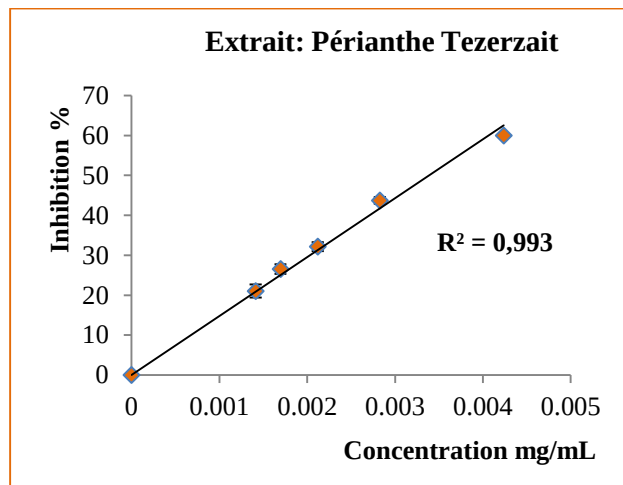
- ✓ <https://fr.tutiempo.net/climat/2020/ws-605660.html>
- ✓ <https://madr.gov.dz>

Annexes

Annexe1 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% du DPPH en fonction de la concentration des extraits étudiés et des antioxydants standards.





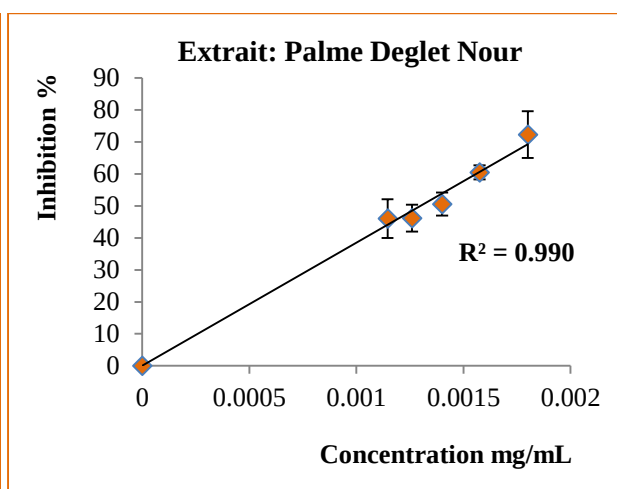
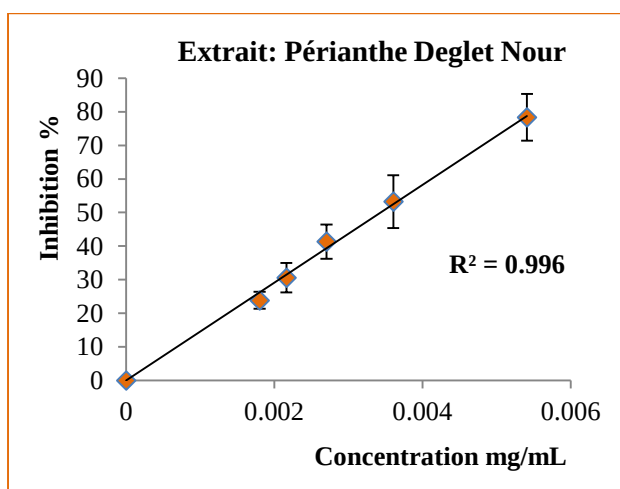
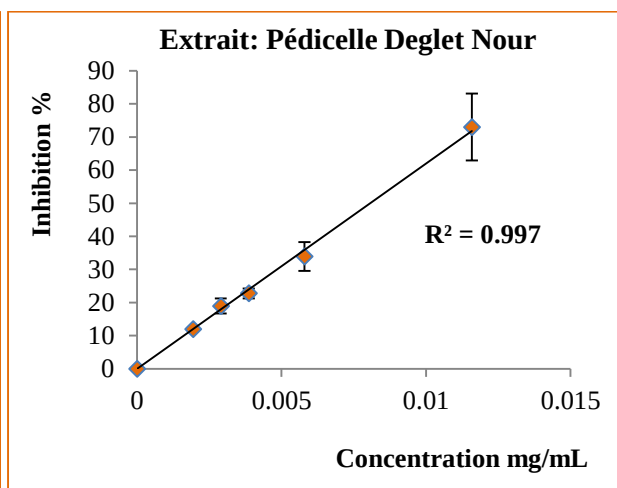
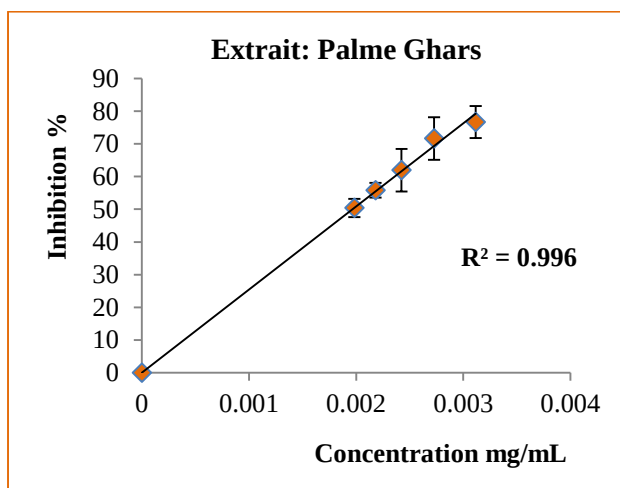
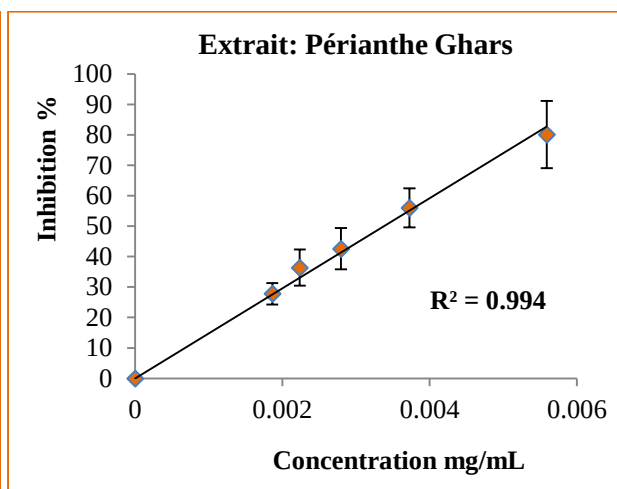
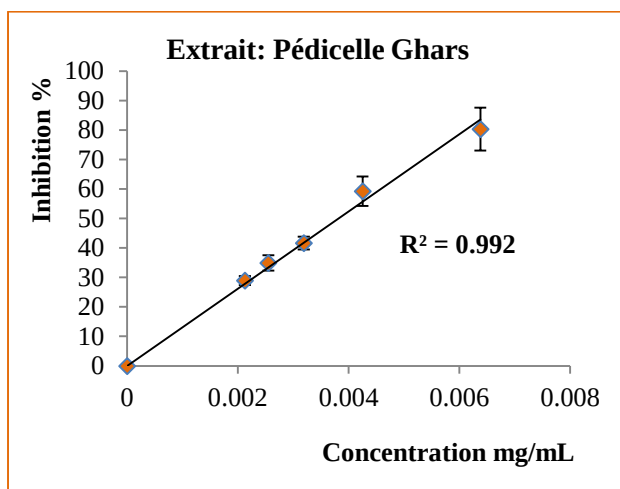


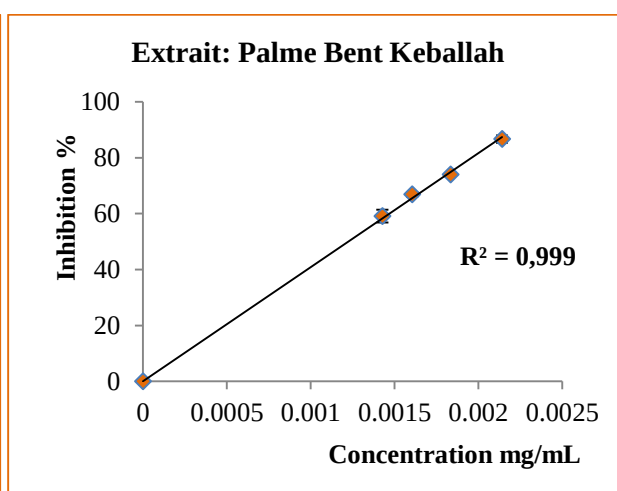
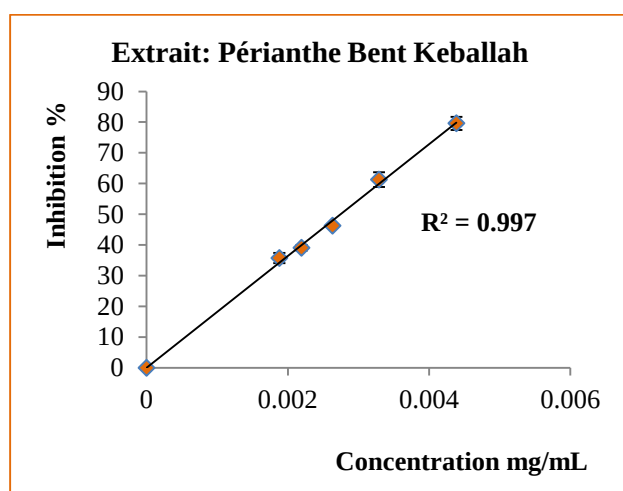
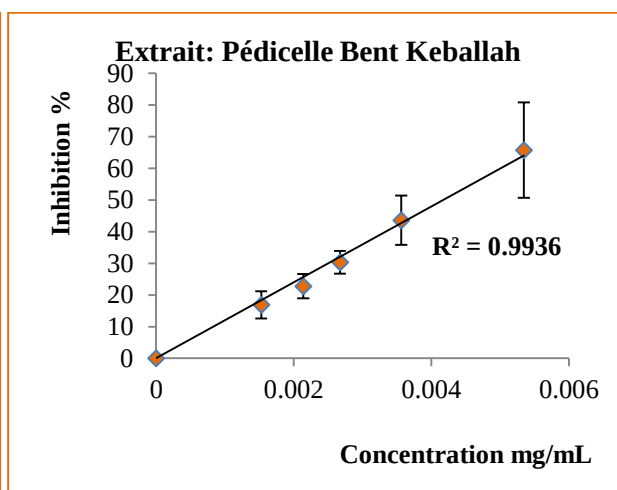
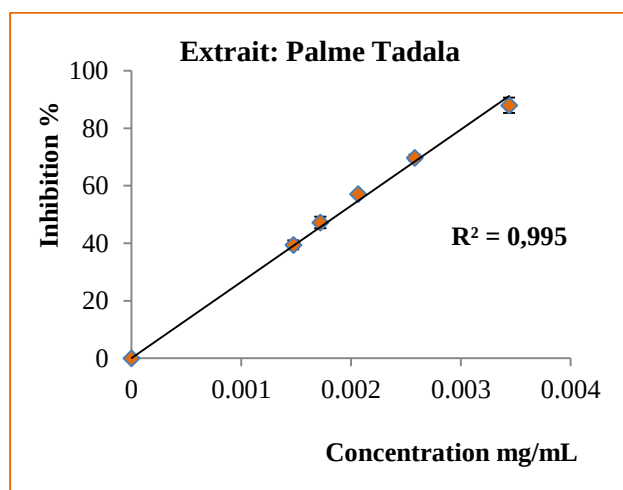
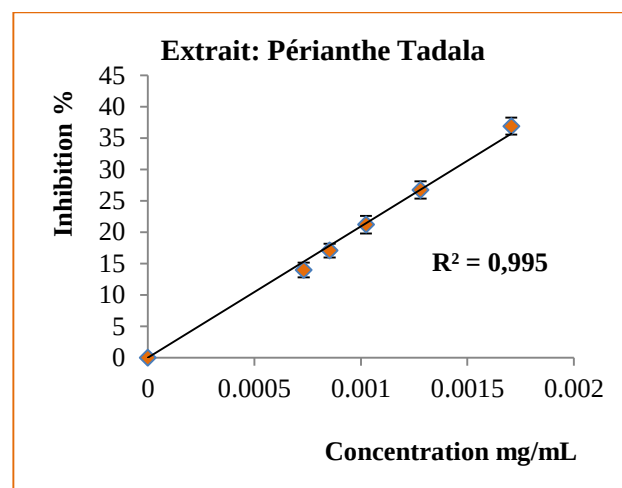
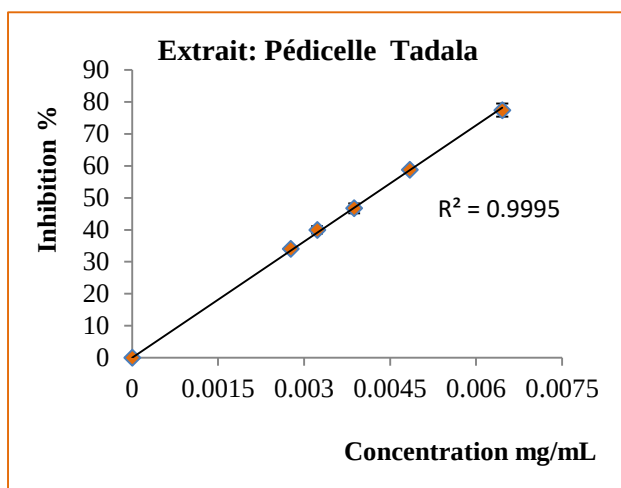
Annexe 2 : Valeurs de FEAC des extraits étudiés et des standards.

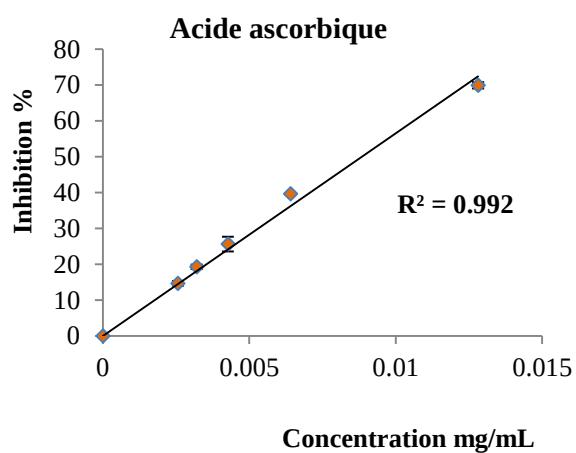
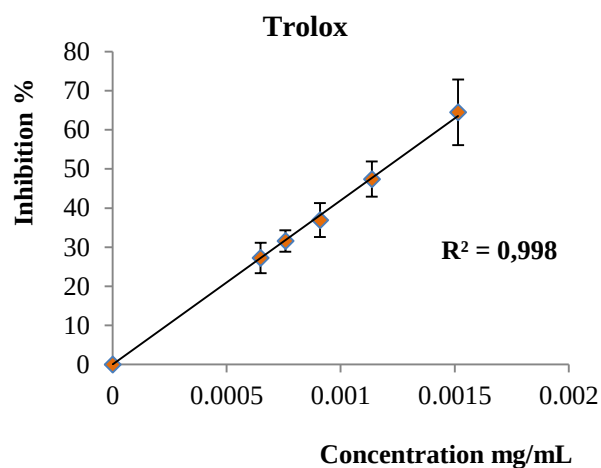
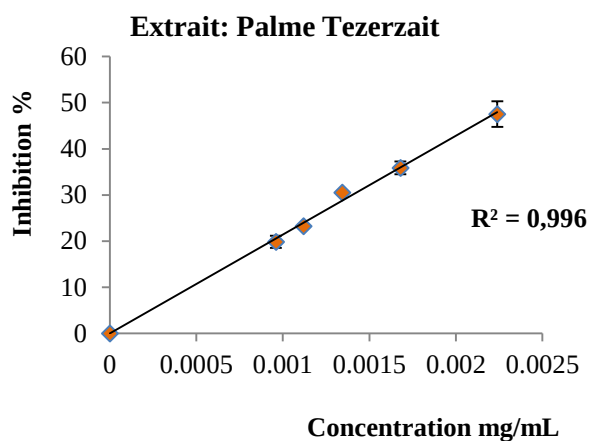
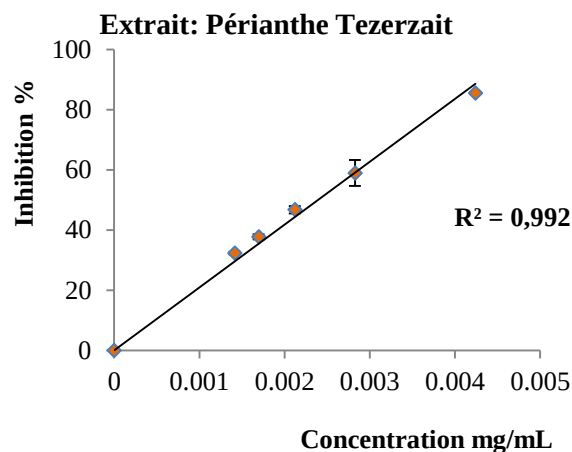
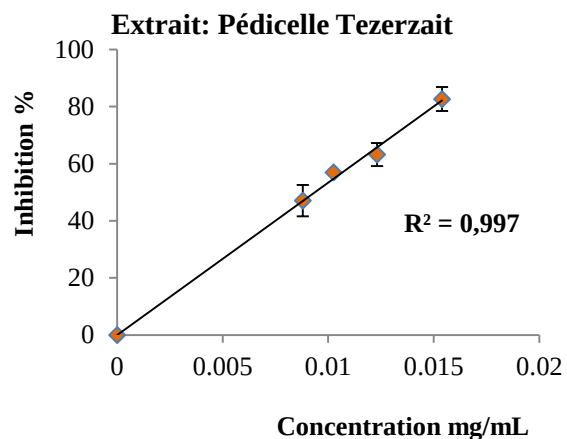
Variétés	Extraits	FEAC (mM)
Ghars	Pédicelle	1,196±0,064 ^{a,b,c}
	Périanthe	1,168 ±0,072 ^{a,b,c}
	Palme	0,666 ±0,026 ^a
Deglet Nour	Pédicelle	1,275 ±0.149 ^{b,c}
	Périanthe	1,443 ±0.036 ^{b,c}
	Palme	1,126±0.057 ^{a,b,c}
Tadala	Pédicelle	1,487 ±0.244 ^{b,c}
	Périanthe	1,161 ±0.148 ^{a,b,c}
	Palme	1,354 ±0.109 ^{b,c}
Bent Keballah	Pédicelle	1,055 ±0.129 ^{a,b}
	Périanthe	2,875 ±0.001 ^d
	Palme	1,651 ±0.335 ^c
Tezerzait	Pédicelle	1,204 ±0.261 ^{a,b,c}
	Périanthe	1,252 ±0.214 ^{b,c}
	Palme	1,240 ±0.089 ^{b,c}
Standard	Trolox	0,703 ± 0,167 ^a
	Acide ascorbique	1,630 ± 0,230 ^c

Remarque : Les données reflètent les moyennes ± SE. a, b, c, d, e, f : montrant des différences significatives entre les différentes parties à P < 0,05 sur la base d'une ANOVA unidirectionnelle suivie du test HSD de Tukey.

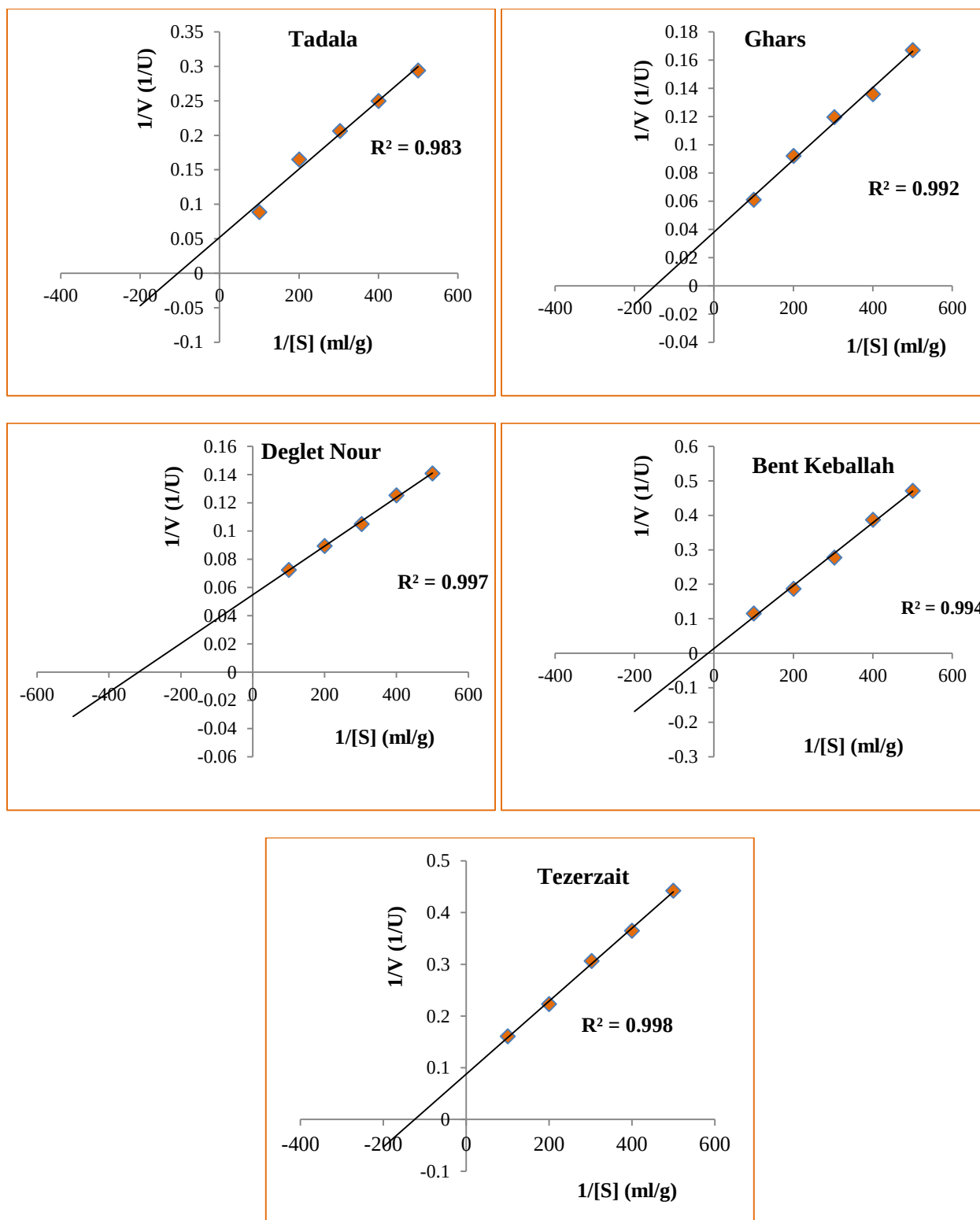
Annexe 3 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% du radical ABTS^{•+} en fonction de la concentration des extraits étudiés et des antioxydants standards.



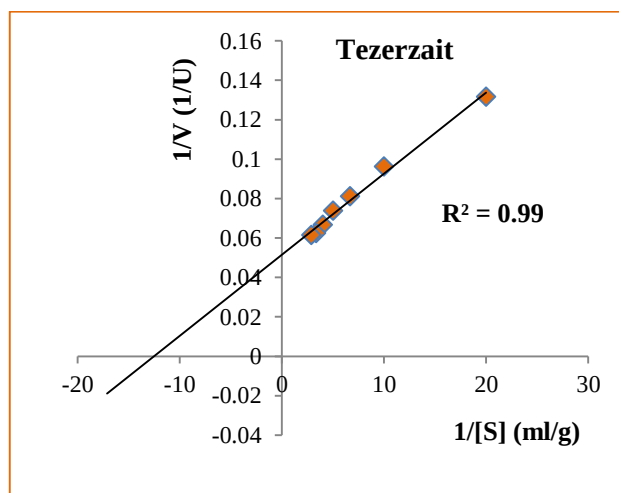
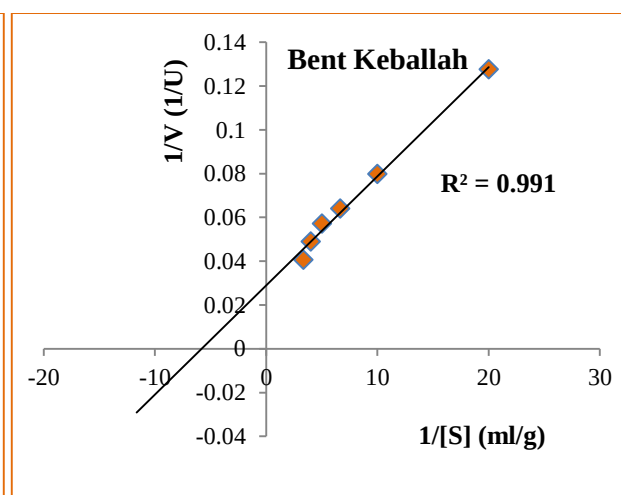
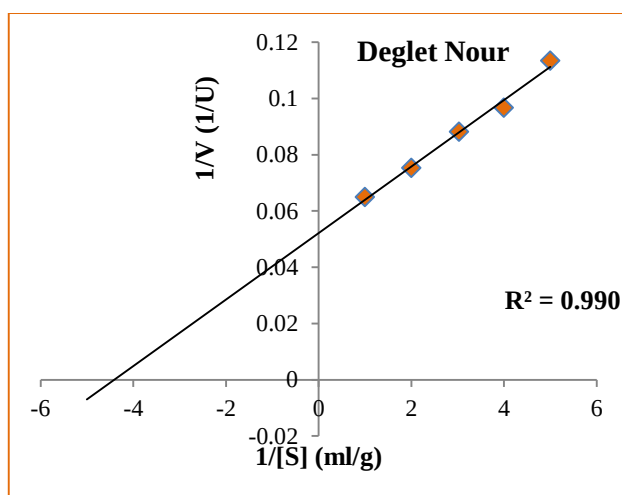
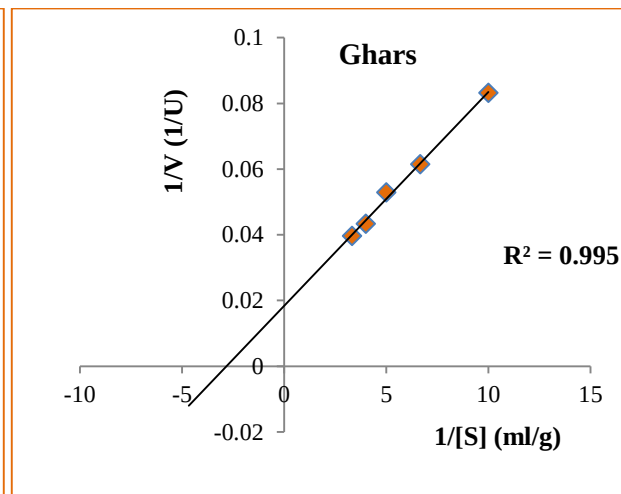
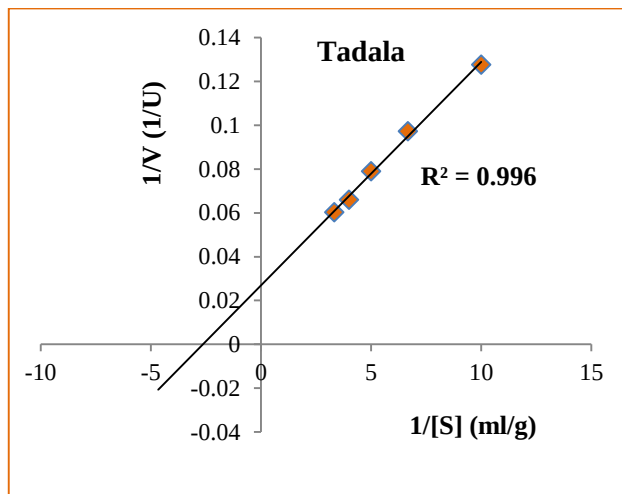




Annexe 4 : a- Graphique de Lineweaver-Burk de l'activité de la POD des extraits enzymatiques des dattes des différentes variétés du *Phoenix dactylifera* L..



Annexe 4 : b- Graphique de Lineweaver-Burk de l'activité de la PPO des extraits enzymatiques des dattes des différentes variétés du *Phoenix dactylifera* L..



Annexe 5 : Les valeurs de coefficient de corrélation de Pearson entre les activités antioxydantes, les activités anti-brunissement et teneurs en phénols totaux et des flavonoïdes selon les variétés et les organes.

Variété Tadala							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,999	1					
DPPH	-0,578	-0,566	1				
ABTS	-0,694	-0,705	-0,184	1			
FRAP	0,077	0,062	-0,857	0,663	1		
POD	-0,047	-0,063	-0,786	0,751	0,992	1	
PPO	-0,475	-0,461	0,992	-0,302	-0,913	-0,856	1

Variété Bent Keballah							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,937	1					
DPPH	-0,953	-0,789	1				
ABTS	-0,942	-0,999	0,979	1			
FRAP	0,016	0,362	0,286	-0,349	1		
POD	-0,955	0,794	-0,999	-0,8021	-0,278	1	
PPO	-	-	-	-	-	-	1

Variété Tezerzait							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,947	1					
DPPH	-0,316	-0,603	1				
ABTS	0,999	0,957	-0,348	1			
FRAP	-0,977	-0,858	0,108	-0,969	1		
POD	0,949	0,999	-0,598	0,959	-0,861	1	
PPO	-	-	-	-	-	-	1

Variété Deglet Nour							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,994	1					
DPPH	-0,214	-0,108	1				
ABTS	-0,648	-0,726	-0,604	1			
FRAP	-0,871	-0,814	0,665	0,192	1		
POD	-	-	-	-	-	1	
PPO	-	-	-	-	-	-	1

Variété Ghars							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,991	1					
DPPH	0,602	0,700	1				
ABTS	-0,957	-0,986	-0,807	1			
FRAP	-0,992	-0,999	-0,696	0,985	1		
POD	0,552	0,655	0,998	-0,768	-0,650	1	
PPO	-	-	-	-	-	-	1

Partie Pédicelle							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,831	1					
DPPH	-0,818	-0,961	1				
ABTS	0,501	0,721	-0,518	1			
FRAP	-0,582	-0,195	0,127	-0,071	1		
POD	-0,188	-0,120	-0,116	-0,713	0,186	1	
PPO	-	-	-	-	-	-	1

Partie Périanthe							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,920	1					
DPPH	-0,458	-0,551	1				
ABTS	-0,314	0,072	-0,075	1			
FRAP	0,906	0,901	-0,180	-0,062	1		
POD	-0,111	0,087	-0,201	0,314	-0,188	1	
PPO	-0,397	-0,648	0,866	-0,517	-0,319	-0,216	1

Partie Palme							
Variables	PPT	Flav	DPPH	ABTS	FRAP	POD	PPO
PPT	1						
Flav	0,659	1					
DPPH	-0,047	0,620	1				
ABTS	-0,727	-0,315	0,521	1			
FRAP	-0,132	-0,535	-0,880	-0,547	1		
POD	0,834	0,436	-0,027	-0,356	-0,353	1	
PPO	-	-	-	-	-	-	1

Annexe 6 : Courbe d'étalonnage d'albumine bovine

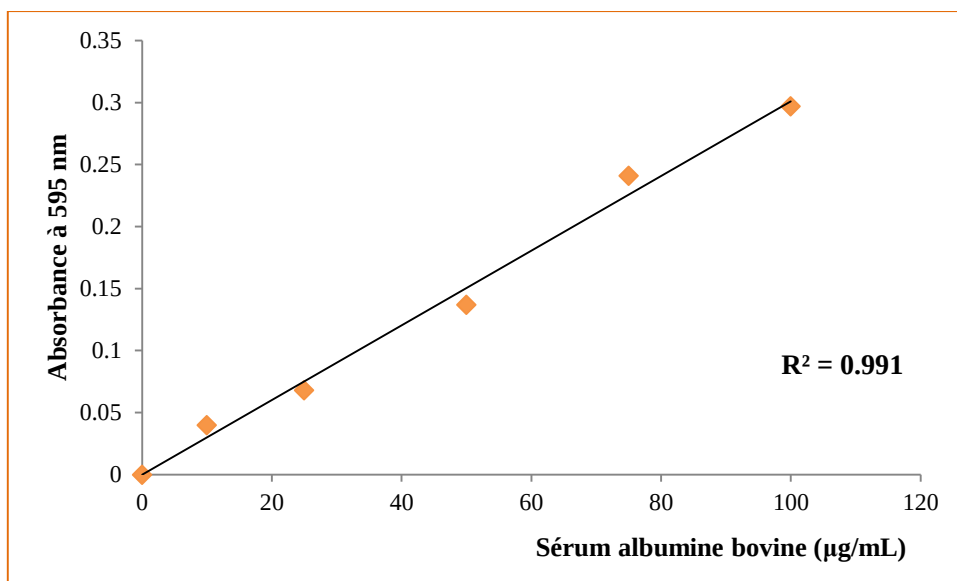


Figure: Courbe d'étalonnage d'albumine bovine