



UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE



DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

en Biologie

Option : Biochimie et Analyse des Bio-produits

Par M^r GHANIA Ahmed

THÈME

**Extraction, caractérisation partielle et activités biologiques
des polysaccharides des noyaux des dattes ; variété Ghars**

Soutenu publiquement le .../.../.....

Devant le jury :

Président	OULD EL HADJ Mohamed Didi	Prof	Univ. Ouargla
Encadreur	OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Prof	Univ. Ouargla
Co-encadreur	BOUAL Zakaria	MCA	Univ. Ouargla
Examineur	SIBOUKEUR Oumelkheir	Prof	Univ. Ouargla
Examineur	DANDOUGUI Hocine	Prof	Univ. Ouargla

Année universitaire 2014/2015

Dédicace

Je dédie ce travail:

A mes Chers PARENTS.

A mon frère unique Achraf.

A mes adorables sœurs: Zahra et Safia.

A mes amis.

Et à tous ceux qui me sont chers

Ahmed GHANIA

Remerciements

A l'occasion de la présentation de mon mémoire du magister, j'ai l'honneur et le devoir d'exprimer mes louanges absolues à ALLAH qui nous a aidé d'achever ce projet et cette étape très importante dans ma vie estudiantine.

*J'exprime mes profonds remerciements à mon encadreur **Mme. OULD EL HADJ-KHLILE Aminata**; Professeur au Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, pour avoir accepté d'encadrer ce mémoire dans le cadre d'un axe de recherche, pour leur présence et disponibilité permanente, pour leurs conseils et soutien et pour l'aide qu'elle m'avez apportée.*

*Ma profonde reconnaissance est adressée à mon Co-encadreur **Mr. BOUAL Zakaria**; maître de conférences A au Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, pour leur aide et leurs conseils incessants, suggestions, leurs orientations tout au long de ce travail, et pour toutes les connaissances qu'il m'avez fait bénéficié au laboratoire.*

*J'exprime mes profondes reconnaissances à **Mr. Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi**; Professeur au Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire et pour leurs encouragements incessants.*

*Je présente mes remerciements les plus sincères à **Mme Mme. SIBOUKEUR Oumelkheir**, Professeur au Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, et **Mr. DANDOUGUI Hocine** Professeur au Département de chimie à l'Université Kasdi Merbah-Ouargla. Je suis honoré pour avoir accepté de juger ce travail.*

Je tiens à remercier le Laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi arides, pour m'avoir fourni les moyens matériels nécessaires à l'expérimentation, ayant permis la réalisation du présent travail.

*J'exprime ma profonde gratitude au responsable des laboratoires pédagogiques du Département des Sciences biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla **Mr. BEGARI** pour son aide.*

*On remercie le laboratoire d'analyse médical «IBN ROCHD» Ghardaïa, et en particulier son Directeur, **Dr. AMMI SAÏD Mustapha** de nous avoir accueilli au sein du Laboratoire.*

Enfin, un grand merci à tous mes enseignants, mes professeurs mes amis (es) et mes collègues du laboratoire et de notre promotion.

GHANIA Ahmed

Listes Des Photos

N°	Titre	page
1	Noyau de dattes	22
2	Poudre de noyau de dattes	22

Liste Des Figures

N°	Titre	page
1	Coupe de fruit de datte (Munier, 1973)	6
2	Coupe de noyau de datte (Munier, 1973)	7
3	α -D-glucose 6 phosphate et α -D-glucose 1 phosphate	10
4	D-glucono- δ -lactone	11
5	D-glucose	11
6	D-glucitol	11
7	β -D-glucosamine et β -D-galactosamine	11
8	Acide muramique et acides sialiques	12
9	Schéma des différentes étapes d'extraction des polysaccharides hydrosolubles à partir de noyaux des dattes	24
10	Schéma des différentes étapes d'extraction des polysaccharides alcalisolubles (0.5 et 4 M) à partir de noyaux des dattes	25
11	Les étapes de tests de phagocytose <i>in vitro</i>	46
12	chromatogramme des extraits polysaccharides des hydrolysats hydrosolubles PNDH et alcalisoluble PNDA 4 et PNDA 0,5 des noyaux des par l'acide trifluoroacétique à 2 M durant 4 heures à 100°C (système 1)	52
13	chromatogramme des extraits polysaccharides des hydrolysats hydrosolubles PNDH et alcalisoluble PNDA 4 et PNDA 0,5 des noyaux des par l'acide trifluoroacétique à 2 M durant heures à 100°C (système 2)	53
14	Temps (en second) de céphaline activée (TCA) de trois extraits hydrosoluble et alcalisoluble de noyaux des dattes de cultivars Ghars à une concentration de 100 μ g/10 μ l.	54
15	l'activité anticoagulante de l'extrait brut des polysaccharides alcaliolubles des noyaux des dattes à 0,5M (PNDA 0,5)	55
16	Activité antioxydante des différentes fractions à la concentration 100 μ g/ml par trois tests : DPPH, ABTS et FRAP	57
17	Activité phagocytaire	59
18	Activité antibactérienne	61

Liste De Tableaux

N°	Titre	page
1	Origine et type des appareils utilisés au cours de l'expérimentation	19
2	Produits utilisés lors de l'expérimentation et leurs caractéristiques	20
3	Préparation de la courbe d'étalonnage des oses totaux	27
4	Préparation de la courbe d'étalonnage de glucose	27
5	Préparation de la courbe d'étalonnage d'acide glucuronique	28
6	Composition de PBS selon Burnat <i>et al.</i> (2013)	38
7	Composition de solution Hanks selon Hanks (1975)	39
8	Test de phagocytose	42
9	Rendements massiques d'extraction de noyaux de dattes de cultivar Ghars	49
10	Composition des extraits de polysaccharides hydro et alcali solubles	50
11	Rapport frontal (Rf) des étalons des oses dans les deux systèmes de CCM	51
12	Rapport frontal (Rf) des oses après l'hydrolyse acide des polysaccharides dans les deux systèmes de CCM	51
13	Les oses compose chaque fraction glucidique	52
14	Résultats de test TP pour l'activité anticoagulante à différentes concentrations de l'extrait brut des polysaccharides alcaliolubles des noyaux des dattes à 0,5M (PNDA0,5).	56

Sommaire

Introduction	1
--------------	---

CHAPITRE I

Partie Bibliographique

I.1.-Généralités	5
I.2.-Systématique de <i>Phoenix dactylifera</i> selon DJERBI (1994)	5
I.3.-Différents parties de dattes	5
I.4.-Anatomie de Noyau de datte	6
I.5.-Composition chimique du noyau de datte	7
I.5.1.-Composition en matière protéique	7
I.5.2.-Composition en matière grasse	7
I.5.3.-Teneur en sucres	7
I.5.4.- Teneur en Cendres	8
I.5.5.-Contenu minéral	8
I.5.6.-Teneur en fibres	8
I.5.7.-Teneur en polyphénols	8
I.6.- Utilisations des noyaux de dattes	8
I.6.1.- Préparation d'une boisson semblable au café:	8
I.6.2.- Préparation de crèmes	9
I.6.3.-Effet protecteur à l'hépatotoxicité	9
I.6.4.- Fabrication de charbon actif	9
II.- Généralités sur les glucides	9
II.1.-Monosaccharides	9
II.1.1.-Dérivés des monosaccharides	10
II.1.2.-Osides	12
II.1.2.1.- Holosides	12
II.1.2.1.1.- Diholosides	12
II.1.2.1.2.-Oligosides	13
II.1.2.1.3.- Polysaccharides	13
II.1.2.1.3.1.- Polysaccharides animaux	13
II.1.2.1.3.1.2.-Polysaccharides végétaux	14
II.1.2.1.3.1.2.1.-Polysaccharides de réserve	14
II.1.2.1.3.1.2.2.-Polysaccharides de structures	14
II.1.2.2.-Hétérosides	16

CHAPITRE II

Matériel Et Méthodes

II.1.- Principe d'étude	18
II.2.- Matériel d'étude	18
II.2.1.-Matériel non biologique	18
II.2.2.- Matériel biologique	23
II.3.-Méthodologie de travail	23
II.3.1.1.- Extraction des polysaccharides hydrosolubles	23
II.3.1.2.- Extraction des polysaccharides alcalisolubles	23
II.4.- Extraction des polysaccharides	26
II.4.1.-Rendement d'extraction	26
II.4.2.-Dosage des composants des extraits bruts des polysaccharides	26
II.4.2.1.- Dosage des oses totaux	26
II.4.2.1.1.- Principe	26
II.4.2.1.2.- Mode opératoire	26
II.4.1.3.- Préparation de la courbe d'étalonnage	27
II.4.2.2.- Dosage des oses neutres	27
II.4.2.2.1.- Principe	27
II.4.2.2.2.-Mode opératoire	27
II.4.2.2.3.- Préparation de la courbe d'étalonnage de glucose	27
II.4.2.3.- Dosage des oses acides	28
II.4.2.3.1.- Principe	28
II.4.2.3.2.-Mode opératoire	28
II.4.2.3.3.- Préparation de la courbe d'étalonnage d'acide glucuronique	28
II.4.2.5.- Dosage des protéines	29
II.4.2.5.1.- Méthode de Bradford (1976)	29
II.4.2.5.1.1.- Principe	29
II.4.2.5.1.2.-Préparation des réactifs	29
II.4.2.5.1.3.- Mode opératoire	29
II.4.3.- Identification des polysaccharides	29
II.4.3.1.- Hydrolyse acide des liaisons Glycosidiques	29
II.4.3.1.1.- Mode opératoire	29
II.4.3.2.- Chromatographie sur couche mince	30
II.4.3.2.1.- Principe	30
II.4.3.2.2.-Mode opératoire	30

II.4.3.2.2.1.- Préparation des phases mobiles	30
II.4.3.2.2.2.-Préparation de la phase stationnaire	31
II.4.3.2.2.3.- Préparation de révélateur	31
II.4.3.2.2.4.-Préparation des cuves et suivi de la CCM	31
II.5.-Activités biologiques des polysaccharides	31
II.5.1.- Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anticoagulante	31
II.5.1.1.- Temps de céphaline kaolin activé (TCK)	32
II.5.1.1.1.- Principe	32
II.5.1.1.2. - Mode opératoire	32
II.5.1.2.-Taux de prothrombine et Temps de Quick (TQ)	33
II.5.1.2.1.- Principe	33
II.5.1.2.2. - Mode opératoire	33
II.5.1.3.- Temps de thrombine (TT)	33
II.5.1.3.1.- Principe	33
II.5.1.3.2. - Mode opératoire	34
II.5.2. - Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante	34
II.5.2.1.- Evaluation de pouvoir antioxydant	34
II.5.2.2. - Effet scavenger du radical DPPH	34
II.5.2.2.1.1. - Principe	34
II.5.2.2.1.2.- Mode opératoire	35
II.5.2.2.2.-Test d'ABTS	35
II.5.2.2.2.1.-Principe	35
II.5.2.2.2.2.- Mode opératoire	36
II.5.2.2.3. - Méthode de FRAP	36
II.5.2.2.3.1.-Principe	36
II.5.2.2.3.2.- Mode opératoire	36
II.5.3.- Activité phagocytaire	37
II.5.3.1.- Principe du test	37
II.5.3.2.- Prélèvement de sang	37
II.5.3.3.-Préparation de <i>Candida albicans</i>	38
II.5.3.4.- Préparation des solutions tampons	38
II.5.3.4.1.- Tampon phosphate saline (PBS)	38
II.5.3.4.1.2.-Mode opératoire	38
II.5.3.4.2.- Solution de Hanks	39
II.5.3.6.-Préparation de polysaccharides	40

II.5.3.7.-Préparation de zymosan	40
II.5.3.8.-Exploration de la phagocytose et récupération des cellules phagocytaires (protocole modifié)	41
II.5.3.9.-Lyse des érythrocytes	41
II.5.3.10.-Préparation de frottis sur lame	41
II.5.3.11.-Fixation par le méthanol	42
II.5.3.12.- Coloration de MGG	42
II.5.3.12.1.-Principe de la coloration	42
II.5.3.12.2.-Préparation de colorant MGG (Merck, 2008)	43
II.5.4.3.12.3.- Procédure de la coloration May-Grünwald-Giemsa	43
II.5.3.13.- Lecture du frottis sous microscope	44
II.5.3.14.- Calcul de la capacité phagocytaire	44
II.5.3.15.- Calcul de l'activité phagocytaire	44
II.5.5.-Activité antibactérienne	45
II.5.5.1.-Principe du test	45
II.5.5.2.-Mode Opérateur	45
II.6.- Etude statistique	47

CHAPITRE III

Résultats et discussions

III.1.- Contenu des noyaux de dattes en polysaccharides	49
III.1.1.- Rendement d'extraction	49
III.1.2.1.- Oses totaux	49
III.1.3.- Caractérisation qualitative des oses par CCM	50
III.2. Activités biologiques	54
III.2.1.- Activité anticoagulante	54
III.2.2.- Activité antioxydante	56
III.2.3.- activité phagocytaire	58
III.2.4.- activité antibactérienne	59
Conclusion	63
Perspectives	63
Référence Bibliographique	66
Annexe	

Introduction

Introduction

Dans le Sahara, il y a une grande diversité des plantes et des arbres qui sont adaptées au climat désertique pour vivre dans ces conditions extrêmes. Parmi ces plantes et la plus connue dans le milieu oasien c'est " le palmier dattier " (Baliga et *al.*, 2010).

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) joue un rôle très important tant sur le plan culturel et socio-économique que sur le plan écologique (Lecheb, 2008). Son fruit (datte) a une haute valeur nutritive. L'Algérie est parmi les grands pays le plus producteur avec 848 mille tonnes en 2013 selon la FAO (Faostat, 2013). On compte plus de 2000 cultivars différents qui existent actuellement dans le monde (Lecheb, 2008).

Les sous-produits du palmier dattier (tronc, feuilles, pédicelles...) sont exploités par les habitants du Sahara, en particulier, les noyaux des dattes sont valorisés à grande échelle (Djerbi, 1994).

De nombreux travaux de recherche consacrés à la valorisation des noyaux de dattes sous forme d'acide acétique (Abou zaid, 1983), de charbon actif (Bouchemal *et al.*, 2008), alimentation de bétail (Abdelbasset, 2012), crème cosmétique à base de noyaux de dattes (Lecheb, 2008).

D'autres travaux s'intéressent aux métabolites primaires des noyaux de dattes, comme les lipides (Besbes et *al.*, 2004; Chaira et *al.*, 2007; Lecheb, 2008), la matière grasse (Al Hooti et *al.*, 1998), les protéines (Rahman et *al.*, 2007), les acides aminés (Bouaziz et *al.*, 2011).

Pour les sucres totaux de noyaux de dattes, des différents auteurs ont signalé une grande teneur des fibres dans les noyaux des dattes (Al Farsi et *al.*, 2007; Rahman et *al.*, 2007; Chaira et *al.*, 2007; Bouaziz et *al.*, 2011). Ces noyaux sont composés d'un galactomannane pour les polysaccharides hydrosolubles (Ishurd et *al.*, 2001) et un hétéroxylane pour les polysaccharides alcalisolubles (Ishurd et *al.*, 2003).

On a longtemps considéré les sucres et leurs dérivés comme des molécules d'importance biologique secondaire, à un rôle de structure (la cellulose par exemple) ou de stockage de l'énergie (amidon ou saccharose). La découverte de l'intérêt des molécules glucidiques dans la détermination des groupes sanguins ou des

glycoconjugués. Forts de ces nouvelles connaissances, les chercheurs ré-évaluent actuellement l'importance des glucides et envisagent pour eux de nombreux rôles et des activités biologiques et pharmaceutiques (Brudieux et *al.*, 2007).

L'intérêt à l'extraction et la caractérisation des polysaccharides des noyaux des dattes dans un premier temps et l'évaluation de leurs activités biologiques, le travail est structuré autour de trois chapitres. Le premier est consacré à une synthèse bibliographique, rappelant le palmier dattier et la composition chimique des noyaux de dattes, avec des généralités sur les polysaccharides et leur intérêt et leur rôle. Dans un second chapitre, la méthodologie suivie pour l'extraction, la caractérisation et l'évaluation de quelques activités biologiques des polysaccharides hydrosolubles et alcalisolubles des noyaux de dattes de cultivars Ghars. Un troisième chapitre présente les principaux résultats obtenus avec la discussion suivie par une conclusion.

CHAPITRE I

Partie Bibliographique

I.1.-Généralités

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* L. par linné depuis 1734. *Phoenix* dérive de Phoinix, nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité, qui le considéraient comme l'arbre des Phéniciens; Dactylifera vient du latin dactylus dérivant du grec daktulos, signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (Munier, 1973).

Le genre *Phoenix* comprend onze espèces, il y a seulement six à fruit consommable comme le palmier dattier qui est à nombre chromosomique $2n = 36$, monocotylédone arborescente (Ben abdallah, 1990), et selon la classification à base de forme et des propriétés organoleptiques; il existe plus de 600 variétés (Baliga, 2010).

Le palmier dattier est une plante vivace et lignifiée, il présente une tige dressée et non ramifiée appelée tronc ou stipe, terminée par un bouquet de grandes feuilles d'aspect penné. Espèce très polymorphe. Elle est cultivée depuis la haute antiquité en Egypte et en Mésopotamie. Actuellement, son aire de culture s'étend dans les zones arides et semi-arides chaudes, allant de la vallée de l'Indus à l'Est jusqu'aux côtes atlantiques à l'Ouest ; ces zones possèdent environ 90 % du nombre total de palmier et donnent l'essentiel de la production mondiale (Djerbi, 1994).

I.2.-Systématique de *Phoenix dactylifera* selon DJERBI (1994)

Groupe : Spadiciflores

Ordre: Palmales

Famille : Palmacées

Sous famille : Coryphoïdées

Tribu : Phoenicées

Genre : Phoenix

Espèce : Phoenix dactylifera L.

I.3.-Différents parties de dattes

La datte est une baie contenant une seule graine, appelée communément noyau. Elle comporte:

- L'épicarpe (peau) ; c'est enveloppe fine cellulosique.
- Le mésocarpe plus ou moins charnu de consistance variable.

- L'endocarpe est réduit à une membrane parcheminée entourant la graine ou noyau.

L'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe sont généralement confondus et appelés chair ou pulpe (Espiard, 2002).

Les dattes sont généralement de forme allongée, oblongue, ovoïde ou arrondie. Leurs dimensions sont très variables selon les variétés ; elles varient de 2 à 8 cm de long et d'un poids de 2 à 8 grammes (Figure 1). La couleur peut être jaune plus ou moins claire, jaune ambré, brun plus ou moins prononcé, rouge ou noir (Djerbi, 1994).

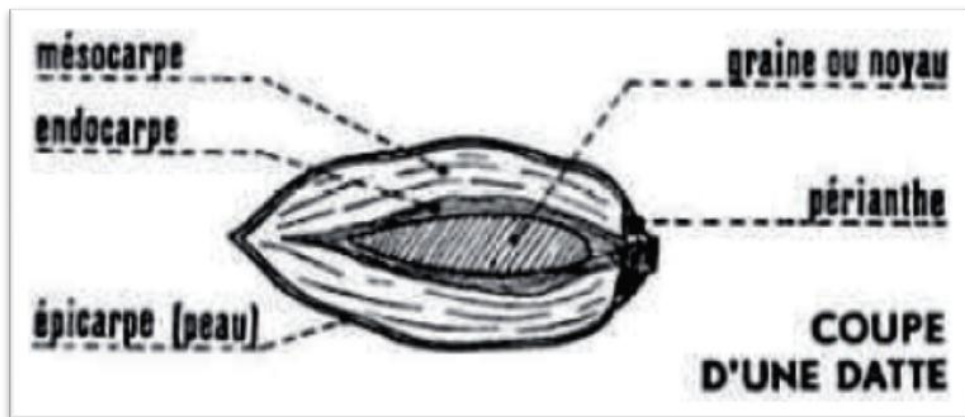


Figure 1.-Coupe de fruit de datte (Munier, 1973)

La consistance constitue aussi une caractéristique du cultivar ; et selon elle, on peut classer les dattes en trois classes :

- **Les dattes molles**, à chair très aqueuse lorsqu'elles sont fraîches, qui nécessitent un traitement visant à la réduction de leur teneur en eau pour être de bonne conservation : Ghars algérienne, Bou Faggous (Maroc), Barhi, Khastawi (Irak), Ahmar (Mauritanie).
- **Les dattes demi-molles**, dont la teneur en eau de la chair est moins élevée que celle de la catégorie précédente, et qui restent de consistance molle : Deglet-Nour (Algérie), Mehjoul (Maroc), Zahdi, Hdraoui (Irak), Sekani (Mauritanie).
- **Les dattes sèches**, dont la pulpe est naturellement sèche : Degla-Beida, Mech Degla (Algérie et Tunisie), Amsersi (Mauritanie) (Munier, 1973).

I.4.-Anatomie de Noyau de datte

La graine, appelée communément noyau, est de forme allongée et de grosseur variable. Son poids représente 7 à 30 % du poids de la datte. Le noyau constitué d'un albumen corné de consistance dure, enveloppé par une membrane cellulosique (Djerbi, 1994) (Figure2).

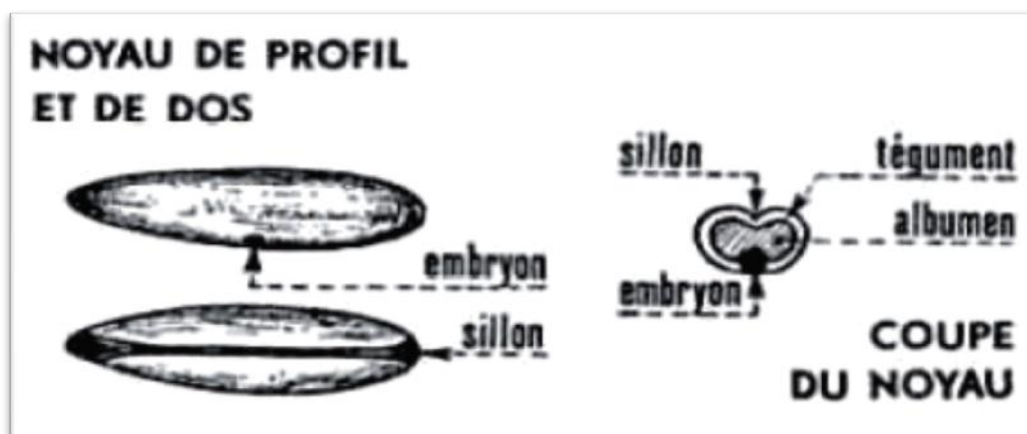


Figure 2. - Coupe de noyau de datte (Munier, 1973)

I.5.-Composition chimique du noyau de datte

I.5.1.-Composition en matière protéique

Il existe des protéines dans les noyaux de dattes, mais elles sont variables selon la région et les différents cultivars. Plusieurs études ont montré des teneurs allant de 2 à 7 % (Lecheb, 2010; Al Farsi et *al.*, 2007; Rahman et *al.*, 2007; Djerbi, 1994).

I.5.2.-Composition en matière grasse

Selon Boudechiche et *al.* (2009), les noyaux de dattes sont très riches en matière grasse, et contiennent des acides gras saturés et insaturés, à une très grande diversité. Leur teneur varie entre 5 et 12% (Lecheb, 2010).

I.5.3.-Teneur en sucres

Les noyaux des dattes comportent des sucres réducteurs et non réducteurs. De nombreuses études ont mis en valeur le contenu glucidique des co produits de dattes (Munier, 1973; Rahman et *al.*, 2007; Chaira, 2007; Lecheb, 2009). Cependant, les fractions de ces composants sont peu documentées. Seuls deux travaux réalisés par Ishurd et *al.* (2001) et Ishurd et *al.* (2003) ont mis en évidence la présence d'un galactomannane hydro-soluble et un hétéroxylane alcali-soluble dans les noyaux des dattes.

I.5.4.- Teneur en Cendres

La teneur en cendres dans les noyaux des dattes est faible, elle varie entre 0,89 et 1.16 % de la matière sèche (Munier, 1973; Besbes *et al.*, 2004; Al Farsi *et al.*, 2007; Lechab, 2010; Rahman *et al.*, 2007; 2013;).

I.5.5.-Contenu minéral

Pour la matière minérale, la plupart des cultivars sont pauvre, et porte des petites quantités entre 1,28% et 3,17% (Boudechiche *et al.*, 2009), mais les résultats des analyses de Chaira, (2007) et Besbes *et al.* (2004) au variété Deglet-Nour et Allig pour les différentes minéraux donné une diversité comme : Na, Fe, P, Zn, Ca, Mg...etc.

I.5.6.-Teneur en fibres

Selon les résultats des analyses d'Al Frasi *et al.* (2007), Le contenu des noyaux en fibres est plus important que celui des autres parties du fruit. Ces composés ont été valorisés dans d'autres études

I.5.7.-Teneur en polyphénols

Les polyphénols sont les métabolites secondaires majeures dans les noyaux des dattes. Lecheb (2008) signale 22,89% de polyphénols dans les noyaux de la variété Mech-deglat. De même, Ardadhani (2010) a étudié 14 variétés iraniennes et a montré des teneurs allant de 4,34% jusqu'à 33,97%. Al Farsi (2007) a étudié les polyphénols de la variété omanienne Mebseeli et a montré la présence de différents types d'acides phénoliques à savoir l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide vanillique ...etc.

I.6.- Utilisations des noyaux de dattes

I.6.1.- Préparation d'une boisson semblable au café:

Selon Rahman *et al.* (2007), les arabes traitaient les noyaux de dattes comme les grains de café pour préparer une boisson très proche du café.

I.6.2.- Préparation de crèmes

Les noyaux de dattes entrent dans le domaine cosmétique dans la préparation des crèmes. Ces crèmes apportent beaucoup de bénéfices comme l'effet anti-ride, protection de derme...etc (Lecheb, 2008).

I.6.3.-Effet protecteur à l'hépatotoxicité

Les noyaux de dattes ont un effet de diminution l'hépatotoxicité, et selon Abdlazize et *al.* (2014), après les tests sur des souris à une intoxication du foie, et après un traitement par les noyaux de dattes, l'intoxication diminue significativement.

I.6.4.- Fabrication de charbon actif

Les travaux de Hazourli et *al.* (2007), et Bouchemal et *al.* (2008), ont permis de fabriquer le charbon actif naturel à base de noyaux de dattes, et selon El nemer et *al.* (2007); ce charbon actif peut être utilisé dans le traitement des eaux usées pour éliminer le chrome (Cr).

II.- Généralités sur les glucides

Les glucides ou saccharides (du grec sackcharon, sucre) sont des composés essentiels pour tous les organismes vivants et sont, en fait, les molécules biologiques les plus abondantes (Voet et *al.*, 2005). On les appelle aussi hydrates de carbone (en anglais, *carbohydrates*) en raison de leur formule élémentaire $C_n(H_2O)_n$ (Wienman et *al.*, 2004).

On distingue les glucides, avec les oses simples (monosaccharides) tels que le glucose ou le galactose, les oligosides (oligosaccharides) tels que le maltose ou le cellobiose, les polysides (polysaccharides) tels que l'amidon, le glycogène ou la cellulose, et les glycoconjugués avec les protéoglycanes, les glycoprotéines et les glycolipides (Wienman et *al.*, 2004).

II.1.-Monosaccharides

Les monosaccharides ou sucre simple (les oses) sont des dérivés aldéhyde ou cétone de chaîne linéaires polyalcools qui contiennent au moins trois atomes de carbone. De telles

substance, le D-glucose et le D-ribulose par exemple, ne peuvent être hydrolysés pour donner des sucres plus simples (Voet et *al.*, 2005).

II.1.1.-Dérivés des monosaccharides

- **Les oses phosphorylés** : La biosynthèse et le métabolisme des oses dans l'organisme, la plupart des systèmes enzymatiques, non pas les oses eux-mêmes, mais leurs dérivés phosphorylés, par exemple: glucose 6-phosphate, le glucose 1-phosphate (Figure 3) (Wienman et *al.*, 2004).

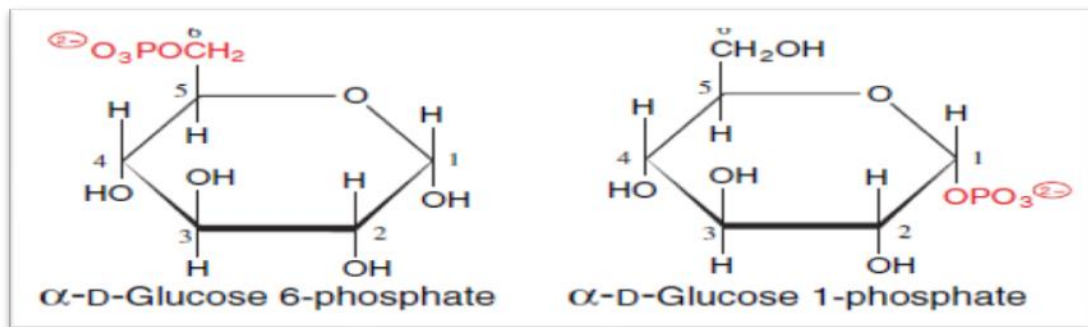


Figure 3.- α -D-glucose 6 phosphate et α -D-glucose 1 phosphate.

- **Les acides aldoniques** : les aldoses sont réducteurs et l'oxydation de leur groupe carbonyle aldéhydique en un groupe carboxyle conduit aux acides aldoniques ; ainsi, au D-glucono- δ -lactone (Figure 4) (Wienman et *al.*, 2004).

- **Les acides uroniques** : l'oxydation du groupe hydroxyle en C-6 donne l'acide uronique correspondant ; ainsi, au D-glucose correspond le D-glycuronate (Figure 5) (Wienman et *al.*, 2004).

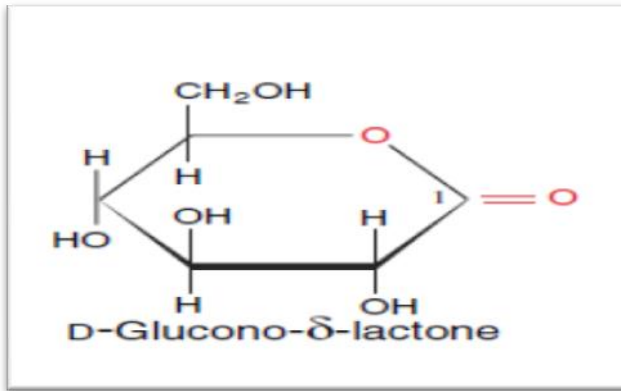


Figure 4.- D-glucono- δ -lactone

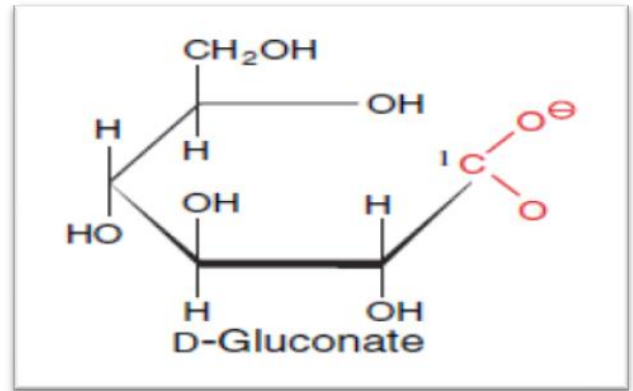


Figure 5.- D-glucose

- **Les alditols**: la réduction du groupe carbonyle aldéhydique des aldoses en un groupe hydroxyle conduit aux alditols ; ainsi, au D-glucose correspond le D-glucitol, souvent appelé sorbitol (Figure 6) (Wienmanet *al.*, 2004).

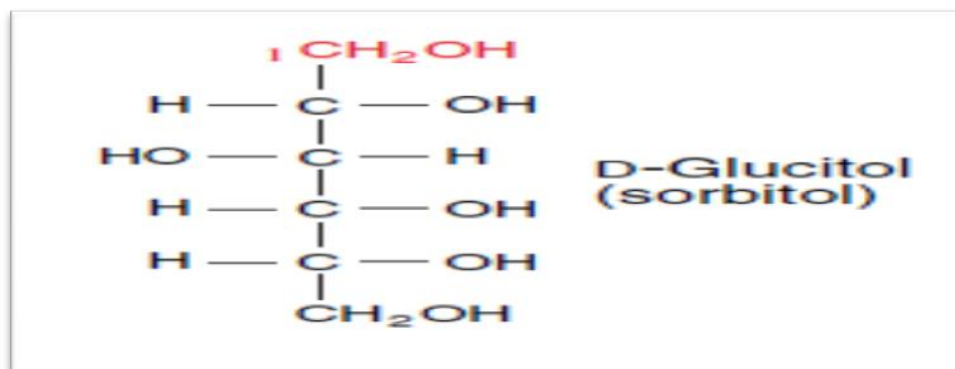


Figure 6.- D-glucitol

- **Les oses amines** : un groupe hydroxyle peut être remplacé par un groupe amine pour donné par exemple, la glucosamine ou la galactosamine (Figure7) (Wienman et *al.*, 2004).

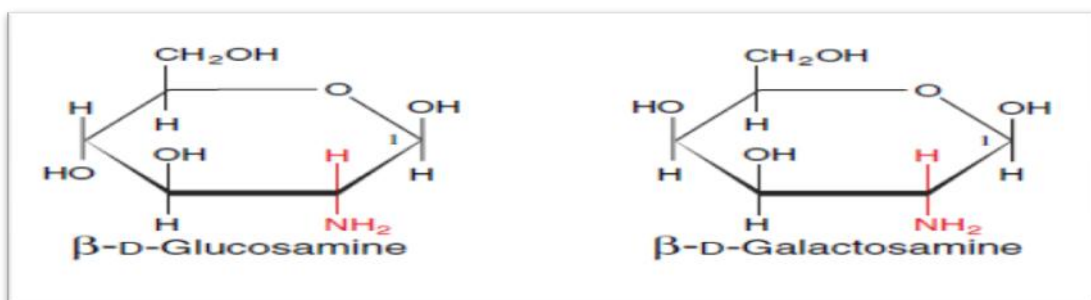


Figure 7. - β -D-glucosamine et β -D-galactosamine.

- **le lactose** : se forme à partir d'une molécule de β -D-galactopyranose et d'une molécule de β -D-glucopyranose ; la liaison est dite β (1-4) (Parreau, 2008).

- **lesaccharose** : résulte de la formation d'une liaison glycosidique α (1-2) entre une molécule de α -D-glucopyranose et une molécule de β -D-fructofuranose ; la formation de cette liaison entraîne la perte des propriétés réductrices (Parreau, 2008).

II.1.2.1.2.-Oligosides

Les oligosides sont de petits polymères comprenant de trois à dix molécules d'oses ; leur diversité est très grande. Ils ont une séquence précise et sont porteur d'une information. Ils sont le plus souvent associés à des lipides (glycolipides) ou à des protéines (glycoprotéines). Chez les cellules animales, les oligosides sont des marqueurs des surface des membranes plasmique ; chez les cellules végétales, ils constituent des signaux de reconnaissance lorsqu'ils sont intégrés aux polysaccharides structuraux de surface (Parreau, 2008).

II.1.2.1.3.- Polysaccharides

Sont des polymères à grande taille, portecentaines à milliers de résidus, on appelé aussi polyosides (Parreau, 2008), à une influence aux critères rhéologiques dans les produit agro-alimentaire comme un agent épaississant, gélifiant ...etc.

II.1.2.1.3.1.- Polysaccharides animaux

- **la glycogène**: est un forme de réserve de glucose sous la forme α -D-glucose; il est stocké dans les cellules hépatiques. C'est un polyoside constitué de longue chaîne formées par des liaisons de type α (1-4) entre les unités et comportant un branchement latéral par α (1-6) toutes les dix unités approximatives (Parreau, 2008).

- **la chitine** : présente dans l'exosquelette des crustacés et des Insectes, est un biopolymère non ramifié constitué de résidus *N*-acétylglucosamine unis, eux aussi, exclusivement par des liaisons β (1-4) (Wienman et *al.*, 2004).

II.1.2.1.3.1.2.-Polysaccharides végétaux

II.1.2.1.3.1.2.1.-Polysaccharides de réserve

- **L'amidon:** est la forme principale de réserve carbonée chez les végétaux. Il est stocké en grande quantité sous forme de grains dans les organes de réserve dont la taille et la forme diffèrent selon les espèces végétales considérées. L'amidon est constitué d'amylose et d'amylopectine (Ruiz, 2005).
- **L'amylopectine:** constituant majoritaire du grain d'amidon (70 à 80 %), est formé de chaînes glucidiques liées en $\alpha(1-4)$ ramifiées en $\alpha(1-6)$ toutes les 12 unités glucidiques environ. La masse moléculaire élevée de ce polymère (10^7 à 10^8 Da) dépend de l'origine et des conditions de culture du matériel biologique étudié (Ruiz, 2005).
- **L'amylose:** constitue une fraction mineure du grain d'amidon (20 à 30 %). Polymère linéaire de glucoses liés en $\alpha(1-4)$, ayant une masse moléculaire comprise entre 10^4 et 10^5 Da, l'amylose a la particularité de présenter une affinité pour l'iode. En effet, le complexe iode-amylose se colore en bleu contrairement à l'amylopectine qui se colore en brun acajou en présence d'iode (Ruiz, 2005).
- **Les laminarines:** des glucanes de réserve de la famille des chrysolaminarines, composés de D-glucose liés en $\beta(1-3)$ et plus ou moins ramifiés en $\beta(1-6)$ ne répondant pas au test du lugol, sont spécifiques de certains embranchements tels que les Chromophytes (algues brunes) (Riz, 2005).

II.1.2.1.3.1.2.2.-Polysaccharides de structures

- **la cellulose:** est la molécule organique la plus abondante sur terre ainsi que le matériau le plus important de la paroi des cellules végétales. La molécule de cellulose est un homopolymère linéaire formé par un enchaînement d'unités cellobiose, motif composé de deux D-glucopyranose en conformation $1C_4$ liés par une liaison glucosidique $\beta(1\rightarrow4)$. Le degré de polymérisation (DP) qui représente le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose est compris entre quelques centaines et plusieurs milliers selon sa provenance et sa situation au sein de la paroi cellulaire. La disposition des hydroxyles libres des glucoses permet l'établissement de liaisons hydrogène intra-chaînes, stabilisant la molécule dans son orientation linéaire ce qui lui confère une certaine rigidité, et de liaisons inter-chaînes qui

relient plusieurs molécules de cellulose et les maintiennent disposées parallèlement. Ainsi, l'association de nombreuses molécules de cellulose permet la formation de micro-fibrilles, qui elles-mêmes s'assemblent en fibres et favorisent l'établissement d'un état solide ordonné, cristallin. La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance aux attaques chimiques et enzymatiques, sa grande résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau. La fraction cellulosique est considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et des bases minérales (Moine, 2005).

- **Les hémicelluloses** : après la cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Contrairement à la cellulose, elles ne peuvent pas être décrites de façon succincte du fait de leur importante diversité. De plus leur structure dépend de leur origine variétale, du tissu ou du type cellulaire, de l'âge des cellules et de leur localisation dans la paroi végétale. Elles diffèrent de la cellulose de par l'hétérogénéité de leur composition monosaccharidique. En général elles sont constituées de chaînes moléculaires plus courtes avec un degré de polymérisation souvent inférieur à 200. A l'origine, les hémicelluloses désignent des polysaccharides pariétaux alcalinosolubles; cependant certains polysaccharides, tels que les arabinanes et les arabinogalactanes sont extraits par l'eau. Donc, par extension, les hémicelluloses regroupent tous les polysaccharides qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques, présents dans les parois cellulaires végétales. Par hydrolyse acide ou enzymatique, les hémicelluloses libèrent des hexoses (glucose, mannose, galactose), des pentoses (xylose, arabinose), des désoxyhexoses (fucose et rhamnose) et des acides uroniques (acide glucuronique et son dérivé 4-*O*-méthyle, acide galacturonique). Les liaisons qui unissent ces motifs sont elles-mêmes variées (Moine, 2005).

- **Les pectines**: Ce sont les constituants essentiels de la lamelle moyenne à la base du «ciment» qui réunit les cellules entre elles. La structure principale des pectines est formée de chaînes faiblement polymérisées d'acides galacturoniques liés en α -(1→4), appelé acide polygalacturonique, sur lesquelles s'insèrent des résidus de L-rhamnose. Chaque unité rhamnose introduit dans la chaîne un coude et confère donc à l'ensemble une configuration en zig-zag. Des chaînes latérales de natures diverses, arabinanes, galactanes et arabinogalactanes sont aussi greffées sur le squelette rhamnogalacturonique, d'où la grande diversité de ces polymères. Les fonctions acides sont souvent estérifiées par des groupements méthyles ou salifiées par des ions monovalents ou divalents tels que K⁺, Na⁺ et Ca²⁺.

La solubilité des substances pectiques dépend de leur masse moléculaire, de la présence de chaînes latérales, mais aussi et surtout du degré de méthylestérification et de la distribution de ces groupements méthyles. Les pectines sont classées suivant leur mode d'extraction, soit à l'eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique) (Moine, 2005).

II.1.2.2.-Hétérosides

Ils comportent une fraction non glucidique appelée aglycane. La liaison entre l'oside et la molécule non glucidique s'établit entre le carbone anomère du glucide (jonction α ou β) et un atome d'oxygène ou d'azote de l'aglycone :

- Les nombreux hétérosides végétaux parmi lesquels l'amygdaline ou amygdalosine (hétéroside cyanogénétique), dont l'hydrolyse libère le mandélonitrile puis l'ion cyanure.
- **Les acides nucléiques** : l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique.
- **Les dérivés possédant des groupes sulfate** comme l'héparine, anticoagulant, qui est un glucosaminoglycane et dont le protomère comprend un acide uronique, une α (1-4) osamine et porte trois fonctions sulfate (Parreau, 2008).

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

II.1.- Principe d'étude

La multiplicité des applications pharmaceutiques et industrielles des polysaccharides conduira à leur accorder, ainsi qu'aux plantes qui les contiennent, une place importante, même si c'est souvent leur fonction d'auxiliaire de fabrication et/ou leur impact diététique et nutritionnel plus que leurs propriétés pharmacologiques qui retiennent l'attention (Bruneton, 2013).

Parmi les propriétés biopharmacologiques des polysaccharides, il est cité les propriétés immunomodulatrices, antitumorales (Meng *et al.*, 2016), antioxydantes (Hu *et al.*, 2016), antivirales (Lee *et al.*, 2011), anticoagulantes (Cai *et al.*, 2013), anti-complément (Xia *et al.*, 2011), anti-inflammatoires (Pereira *et al.*, 2014).

Le présent travail vise à caractériser les polysaccharides issus des noyaux de dattes de cultivars *Ghars* et à rechercher leurs activités biologiques.

II.2.- Matériel d'étude

Le matériel d'étude est composé de matériel non biologique et de matériel biologique.

II.2.1.-Matériel non biologique

L'origine et le type des appareils utilisés au cours de l'expérimentation sont indiqués dans le tableau I. La nature, l'origine, la masse molaire, la densité et la pureté des solvants et des réactifs utilisés au cours de ce travail sont consignées dans le tableau IV.

Tableau I.-Origine et type des appareils utilisés au cours de l'expérience

Appareil	Fournisseur	Type	Lieu De Fabrication
Soxhlet	Velp Scientifica	SER148 Solvent Extractor	Europe
Balance	OHAUS	DISCOVERY DV 215 CD OHAUS	USA
Bain marie	TRADE RAYPA	BAE-4, N° série 66513	GERMANY
Centrifugeuse	SIGMA	6- 15,N° série 121047	GERMANY
Agitateur magnétique	VELP SCIENTIFICA	F20520162	EUROPE
Spectrophotomètre	SHIMADZU	UV mini -1240	EUROPE
PH mètre	WTW	WTW D-82362PH1970	GERMANY
Lyophilisateur	CHRIST	ALPH1-2 LD	GERMANY
Hotte	STERIL-POLARIS	POLARIS 48	EUROPE
Etuve	KARL KOLB	D-6072	GERMANY
Autoclave	PBINTERNATIONAL	01781073707G3	EUROPE
Incubateur	TEGIMENTA CORAS EIA	N° série 27- 4135	SWISS
Microscope numérique	MICROS	MC 50 LED ; N° série 2401986	AUSTRALIE

Tableau II.- Produits utilisés lors de l'expérience et leurs caractéristiques

Produit	Fournisseur	Forme	Formule	Masse molaire (g/mol)	Densité	Pureté %
Ether de pétrole	SIGMA-ALDRICH	Liquide	/	/	/	95
Ethanol	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₂ H ₆ O	46,07		96
Méthanol	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	CH ₄ O	32,04	/	99
Acétone	SIGMA-ALDRICH	Liquide	C ₃ H ₆ O ₂	58,08	0.790-0.792	> 99
Hydroxyde de potassium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	KOH	56,11	/	85
Phénol	FLUKA CHEMIK	Liquide	C ₆ H ₆ O	94,11		90
Phénol	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	C ₆ H ₆ O	94,11	/	99,5
Résorcinol	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	C ₆ H ₆ O ₂	110,11	/	99,5
Acide sulfurique	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	H ₂ SO ₄	98,07	/	98
Glucose	VWR	Solide	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	/	
Hydroxyde de sodium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	NaOH	40	/	97
Carbonate de sodium anhydre	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	Na ₂ CO ₃	105,99	/	99,9
Copper (2) sulfate pentahydrate	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	CuSO ₄ 5H ₂ O	249,68	/	
Bleu de Coomassie	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂			
Acide orthophosphorique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	H ₃ PO ₄		/	85-88
Serum	BIOCHEM	Solide				98

albuminebovin	CHEMOPHARMA					
Diphénylamine	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	C ₁₂ H ₁₁ N	169,23		99
Acétone	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₃ H ₆ O	58,08	/	99,5
Aniline	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₈ H ₇ N	93,13	/	99
Acide acétique	EDEN LABO	Liquide	CH ₃ COOH	60,05	/	99,5
Pyridine	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₅ H ₅ N	79,10	/	99,5
Acétate d'éthyle	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	/	
1-butanol	PROLABO	Liquide	C ₄ H ₁₀ O	74,12	0.807-0.812	99.5
Chloroforme	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Liquide	CHCl ₃	119,38	/	99
Acide trifluoroacétique	Alfa Aesar	Liquide	CF ₃ COOH	114,02	1,49	99
Potassium sodium tartrate tetrahydrate	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	KNaC ₄ H ₄ O ₆ , 4H ₂ O	282,22	/	98
Potassium dihydrogen phosphate anhydre	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	KH ₂ PO ₄	136,09	/	99,5- 100,5
Chlorure de sodium	VWR	Solide	NaCl	58,44	/	100
Chlorure de calcium dehydrate	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	/	96
Bicarbonate de sodium	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	NaCHO ₃	84,01	/	99,5
Rouge de phenol	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S	354,38	/	98-101
Disodium hydrogène phosphate dehydrate	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	177,99	/	99,5
Chlorure de potassium	EDEN LABO	Solide	KCl		/	99

Sulfate de magnésium heptahydraté	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	MgSO ₄ . 7H ₂ O	246,47	/	99,5-103
ABTS	SIGMA	Solide	C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₆ S ₄	548	/	98
DPPH	ALDRICH	Solide	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394	/	
TPTZ	SIGMA-ALDRICH	Solide	C ₁₉ H ₁₂ N ₆	312,33	/	99



Photo 1- Noyau de dattes



Photo 2- Poudre de noyau de dattes

II.2.2.- Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est constitué des noyaux de dattes de cultivars *Ghars* de la région d'Oued Souf, récolté dans les oasis de la commune du Magraine en Octobre 2014.

Le sang est prélevé à partir des volontaires sains, le jour même de son utilisation au niveau du laboratoire IBN ROCHD Ghardaïa. L'absence d'antigène HBs, d'anticorps anti-VIH et d'anticorps anti-VHC est vérifiée.

Des souches bactériennes sont utilisées. Il s'agit de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa*.

II.3.-Méthodologie de travail

II.3.1.1.- Extraction des polysaccharides hydrosolubles

Une quantité de 15gde poudre de noyau de datte est placée dans une cartouche de soxhlet avec 125 ml d'éther de pétrole pendant 8h et 30 min comme temps d'immersion et 60 min comme temps de lavage. L'opération est répétée 12 fois (Besbeset *et al.*, 2004). Après délipidation, la poudre de noyau de dattes est séchée à l'air puis, on lui ajoute 250ml d'eau distillée et l'ensemble est placé au bain Marie pendant 2h à 80°C (Hu *et al.*, 2015) avec une agitation constante. Après la macération, on procède à une centrifugation à 4000xg pendant 12mn et le surnageant est récupéré (Chen *et al.*, 2015). Une deuxième extraction est faite suivant le même protocole puis les deux surnageants sont réunis. L'ajout de 3 volumes d'éthanol à 96% pendant 24h et à une température de 4°C pour la précipitation des polysaccharides. Après centrifugation à 4000xg pendant 12min, le culot est récupéré, lavé trois fois par l'acétone puis lyophilisé(Zhao *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Mei *et al.*,2015).

II.3.1.2.- Extraction des polysaccharides alcalisolubles

L'extraction des polysaccharides alcalisolubles est réalisée par l'ajout de 300ml de solution de KOH (0,5et 4M) (Ding *et al.*, 2014 ; Pinto *et al.*, 2015)au poudre des noyaux des dattes utilisées préalablement, le mélange est mis dans un bain marie à 80°C pendant 2h. Après une centrifugation à 4000g /12min(Chenet *et al.*, 2014) les surnageants sont récupérés et neutralisés par l'HCl, Une quantité de 03

volume d'éthanol est ajouté aux surnageants pour obtenir deux fractions polysaccharidiques PNDA 0,5 et PNDA 4 (Ueno *et al.*, 1982), les deux extraits ont subi un lavage 03 fois par l'acétone, puis ils sont lyophilisés (Huang *et al.*, 2010).

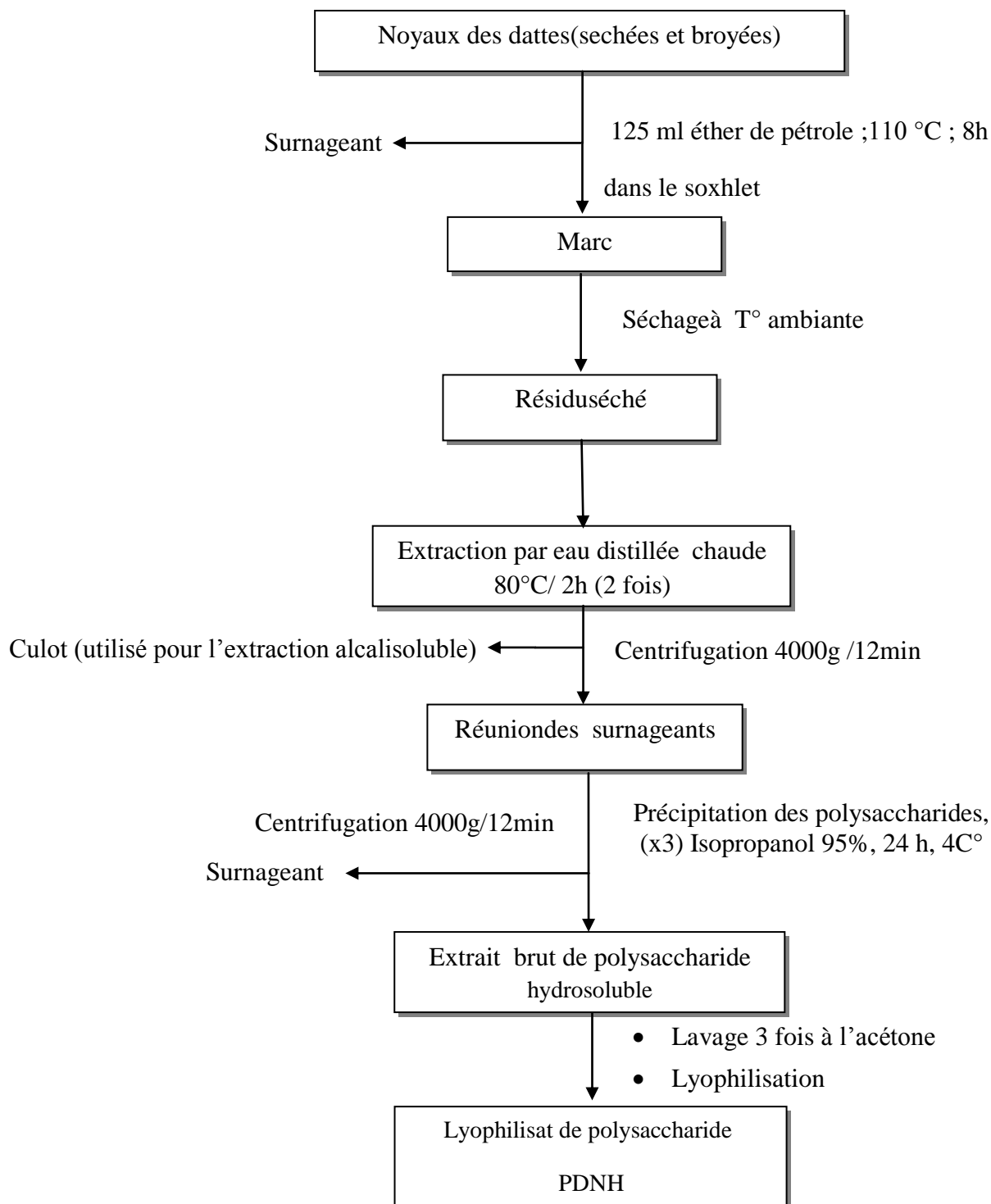


Figure 9. Schéma des différentes étapes d'extraction des polysaccharides hydrosolubles à partir de noyaux des dattes (Besbes *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2014 ; Ghazala *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2015 ; Hu *et al.*, 2015) modifié.

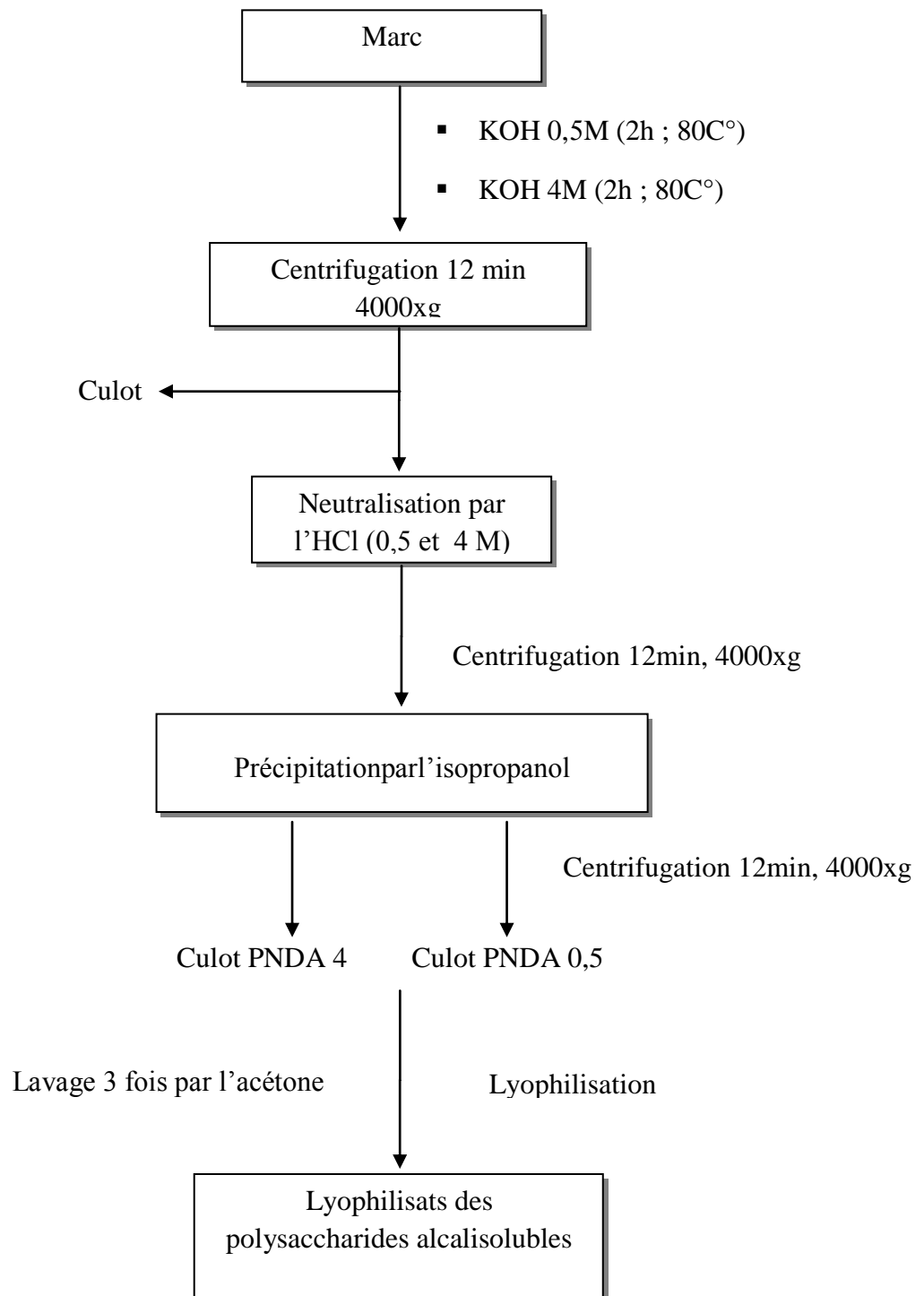


Figure 10.- Schéma des différentes étapes d'extraction des polysaccharides alcalisolubles (0.5 et 4 M) à partir de noyaux des dattes (Ding *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2010; Ueno *et al.*, 1982; Huang *et al.*, 2010) modifié

II.4.- Extraction des polysaccharides

II.4.1.-Rendement d'extraction

Les techniques d'extraction si elles permettent de purifier et de concentrer les molécules extraites ne permettent pas d'en extraire la totalité, il faudra donc déterminer dans chaque condition expérimentale le rendement d'extraction et tenir compte de ce rendement dans le calcul des résultats d'analyse (Gazengel et Orecchiono, 2013).

Le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{\text{Poids des extraits bruts des polysaccharides (g)}}{\text{Poids total de la matière végétale (g)}} \times 100$$

II.4.2.-Dosage des composants des extraits bruts des polysaccharides

Pour le dosage, des solutions de 0,1% sont préparées à partir des échantillons polysaccharidiques hydro et Alcalisolubles. Pour le dosage des oses (totaux, neutres, et acides) une dilution de 1/10 est effectuée (0.01%), alors que les solutions de 0,1% sont utilisées pour le dosage des protéines. Les différentes solutions sont congelées pour les dosages ultérieurs (Dubois, 1956)

II.4.2.1.- Dosage des oses totaux

II.4.2.1.1.- Principe

En milieu sulfurique à chaud, les oses totaux produisent des dérivés du furfural (dérivés aldéhydiques du furane) qui se condensent avec le phénol pour donner un complexe de couleur orange-jaune (Dubois, 1956).

II.4.2.1.2.- Mode opératoire

Un volume de 200µl de solution est mis dans des tubes à essai avec 200µl de phénol à 5% (5g de phénol sont dissout dans 100ml d'eau distillée). Puis, 1 ml d'acide sulfurique est ajouté rapidement et le mélange est agité immédiatement (Dubois *et al.*, 1956). Les tubes sont placés au bain Marie à 100°C pendant 5mn puis refroidis à l'obscurité pendant 30min. L'absorbance est mesurée à 492nm. Les teneurs sont déterminées en référence à une gamme étalon de glucose (Brudieux, 2007).

II.4.1.3.- Préparation de la courbe d'étalonnage

Tableau III.- Préparation de la courbe d'étalonnage de glucose

	Blanc	0,001%	0,002%	0,005%	0,008%	0,01%
Glucose (0,01%) μ l	0	20	40	100	160	200
H ₂ O(μ l)	200	180	160	100	40	0
Phénol (5%) (μ l)	200	200	200	200	200	200
A. sulfurique(ml)	1	1	1	1	1	1

II.4.2.2.- Dosage des oses neutres

II.4.2.2.1.- Principe

En milieu acide et à chaud, les oses neutres produisent des dérivés du furfural qui se condensent avec le résorcinol pour donner un complexe de couleur brun jaune (Dubois, 1956).

II.4.2.2.2.-Mode opératoire

Une solution de résorcinol à 6mg/ml est préparée par l'eau distillée pour doser les oses neutres. La solution est stable pendant un mois lorsqu'elle est conservée à 4°C à l'abri de la lumière (Monsigny *et al.*, 1988).

Dans des tubes à essai 200 μ l des solutions à doser sont mélangés avec 200 μ l de résorcinol et 1ml d'acide sulfurique, puis les tubes sont agités et chauffés dans un bain Marie à 90°C pendant 30mn, ensuite ils sont refroidis dans un bain de glace et à l'obscurité pendant 30mn. La densité optique des solutions est déterminée à 480nm (Monsigny *et al.*, 1988).

II.4.2.2.3.- Préparation de la courbe d'étalonnage de glucose

Tableau IV : Préparation de la courbe d'étalonnage de glucose

	Blanc	0,001%	0,002%	0,005%	0,008%	0,01%
Glucose (0,01%) μ l	0	20	40	100	160	200
H ₂ O(μ l)	200	180	160	100	40	0
Résorcinol (μ l)	200	200	200	200	200	200
A. sulfurique (ml)	1	1	1	1	1	1

II.4.2.3.- Dosage des oses acides

II.4.2.3.1.- Principe

Dans un milieu acide à chaud, les oses sont transformés en dérivés furfuriques. Les acides uroniques transformés en dérivés furfuriques se condensent avec le m-phénylphénol (ou métahydroxydiphényl, MHDP) pour former un complexe de couleur rose (Gimeno-Gilles, 2010).

II.4.2.3.2.-Mode opératoire

Deux réactifs sont nécessaires au dosage des oses acides : une solution de Borax (tétraborate de Sodium) et une solution de méta-hydroxydiphényle (m-HDP).

La solution de borax (0,12M) est préparée en solubilisant 11,44g de borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7, 10\text{H}_2\text{O}$) dans 250ml d'acide sulfurique 96 % pendant 16h à 4°C à l'abri de la lumière. Elle est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Une solution de méta-hydroxydiphényle (m-HDP) à 0,15% est préparée en solubilisant 0,075mg de m-HDP dans 50ml de NaOH (0,5%). La solution est stockée à 4°C à l'abri de la lumière (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).

Pour chaque essai 200µl d'échantillon sont mélangés avec 1,2ml de la solution de borax, les tubes sont agités puis chauffés dans un bain marie à 100°C pendant 5mn. Après un refroidissement dans un bain de glace 20µl d' m-HDP est ajouté. Les tubes sont agités et la densité optique est lue après 5min à une longueur d'onde de 520nm (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).

II.4.2.3.3.- Préparation de la courbe d'étalonnage d'acide glucuronique

Tableau V.-Préparation de la courbe d'étalonnage d'acide glucuronique

	Blanc	0,001%	0,002%	0,005%	0,008%	0,01%
Glc A. (0,01%) µl	0	20	40	100	160	200
H ₂ O(µl)	200	180	160	100	40	0
Borax (ml)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
MHDP (µl)	20	20	20	20	20	20

II.4.2.5.- Dosage des protéines

II.4.2.5.1.- Méthode de Bradford (1976)

II.4.2.5.1.1.- Principe

Cette méthode est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu acide, ce colorant s'adsorbe (fixation par des liaisons non covalentes) sur les protéines, et forme un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595nm. Le changement de colorations se mesure facilement par spectrophotométrie (Gavrilovic *et al.*, 1996).

II.4.2.5.1.2.-Préparation des réactifs

- Bleu de Coomassie: 25ml d'éthanol 95% est mis dans une éprouvette avec 50mg du bleu de Coomassie (poudre) (ajouter petit à petit), une agitation de mélange pendant 2h et Filtré avec un papier Whatman. L'addition de 50ml d'acide phosphorique de 85%, et fait la dilution par l'eau distillée jusqu'à 500ml. Le stockage de mélange dans une bouteille ambrée à la température ambiante (Stable pendant 2 mois).
- La solution étalon est préparée par la dissolution de 0,01g de BSA dans 100ml d'eau distillée.

II.4.2.5.1.3.- Mode opératoire

200µl des solutions à doser sont mélangés avec 2ml de la solution de bleu de Coomassie, la lecture de la densité optique se fait dans un intervalle qui ne dépasse pas une heure à une longueur d'onde de 595nm (Bradford, 1976).

II.4.3.- Identification des polysaccharides

Pour déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, il est procédé à son hydrolyse (Ruiz, 2005).

II.4.3.1.- Hydrolyse acide des liaisons Glycosidiques

II.4.3.1.1.- Mode opératoire

Dans des flacons de petit volume 25mg de l'extrait brut de polysaccharides hydro ou Alcalisolubles est mélangé avec 1ml d'acide Trifluoroacétique de 2M. Le

mélange est chauffé à 100°C à l'étuve pendant 4h puis refroidis au bain de glace et récupéré dans des boîtes de Pétri de petit volume, quelques gouttes de méthanol sont ajoutées. Les boîtes de Pétri sont déposées dans un dessiccateur sous vide pendant 24h. Après évaporation et séchage total de l'hydrolysate, un volume de 500µl de l'eau distillée est ajouté. Les hydrolysats sont récupérés dans des eppendorfs (Morrison et Stewart, 1998; Johansson, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

II.4.3.2.- Chromatographie sur couche mince

II.4.3.2.1.- Principe

La chromatographie sur couche mince est une application particulière de la chromatographie en général. Elle est basée sur le fait que les constituants d'un mélange peuvent avoir des affinités différentes pour un adsorbant donné (Morot-sir, 1991). Pour identifier un produit, le chromatogramme obtenu avec la solution du produit à examiner est comparé avec celui obtenu avec la solution étalon du même produit. Il est supposé qu'il s'agit de la même substance il y a un même tracé dans les deux cas, le calcul de Rf qui correspond au rapport de la distance parcourue par la substance sur la distance parcourue par la phase mobile (front de migration), permet d'identifier les composés qui ont été séparés, la mesure s'effectuant à partir du point de dépôt (Galyet Fraysse, 2012; Ballereau *et al.*, 1993).

II.4.3.2.2.-Mode opératoire

II.4.3.2.2.1.- Préparation des phases mobiles

Deux phases mobiles sont utilisées pour la séparation :

- la phase mobile 1 est constituée d'acétate d'éthyle- méthanol- nbutanol-eau distillée dans un rapport de 16-3-3-2 respectivement (Ghebregzabeier *et al.*, 1976).
- la phase mobile 2 est constituée de chloroforme-nbutanol-méthanol-eau distillée-acide acétique dans un rapport de 4,5-12,5-5-1,5-1,5 (Yang *et al.*, 2010).

II.4.3.2.2.-Préparation de la phase stationnaire

La phase stationnaire présente des plaques en gel de silice qui sont activées avant l'utilisation dans l'étuve à 100°C pendant 5min.

II.4.3.2.2.3.- Préparation de révélateur

La chromatographie n'étant qu'une méthode de séparation, il faut lui adjoindre une méthode de détection afin de permettre une identification des produits séparés (Ballereau *et al.*, 1993). La révélation des spots est réalisée par le NIGRUM qui est préparé par le mélange de deux solutions :

- A : 4g diphénylamine dans 100 ml d'acétone
- B : 96 ml d'acétone complété jusqu'à 100 ml par l'aniline.

Après le mélange de les solutions A et B, 20 ml d'acide Orthophosphorique à 85% (Paulsen *et al.*, 2002).

II.4.3.2.2.4.-Préparation des cuves et suivi de la CCM

Après l'hydrolyse acide des fractions, les hydrolysats sont déposés sous forme de spot en bas des deux plaques à l'aide d'un applicateur. Puis les plaques sont placées verticalement dans deux cuves contenant de la phase mobile de façon à ce que les plaques trempent sur une hauteur d'environ 1cm. Le solvant est laissé monter le long des plaques par capillarité. Au cours de son ascension, il va entraîner les différents constituants du mélange déposé en bas des plaques, les constituants les moins retenus par l'adsorbant étant entraînés le plus facilement. Le solvant est migré jusqu'à le front, puis les deux plaques sont séchées et révélées (Morot-Sir, 1991).

II.5.-Activités biologiques des polysaccharides

II.5.1.- Evaluation *in vitro* de l'activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des polysaccharides issus des noyaux de datte est évaluée *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de test global chronométrique ; le temps du chéphaline-kaolin activé (TCK).

Le pool plasmatique pauvre en plaquette est un mélange de plasmas de 10jeunes adultes comme volontaires sains non traités, dont les TCK sont normaux et

comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang.

Le sang est ensuite centrifugé pendant 10mn à 3000rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le plasma standard obtenu est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation (Athukorala *et al.*, 2007).

II.5.1.1.- Temps de céphaline kaolin activé (TCK)

II.5.1.1.1.- Principe

Cet examen consiste à activer la voie intrinsèque de la coagulation par différentes substances: le Kaolin, ou plus souvent la silice micronisée ou l'acide ellagique. Dans ce test, la céphaline est un phospholipide qui remplace les plaquettes. Le TCK n'est donc pas modifié en cas de thrombopénie ou de thrombopathie. Chez l'adulte, la valeur normale moyenne du TCK est de 30 à 34shabituellement. Un laboratoire doit donc toujours rendre un temps témoin pour permettre l'interprétation du test.

Pour que le Temps de Céphaline Kaolin soit normal, il faut que les facteurs de coagulation de la voie intrinsèque soient normaux : facteur du système contact (facteur XII et XI, kininogène de haut poids moléculaire, prékallitréine), complexe anti hémophilique (facteur IX, facteur VIII), complexe de la prothrombinase (facteur X, facteur V) prothrombine (facteur II), fibrinogène (facteur I) à l'exception des plaquettes (Athukorala *et al.*, 2007). La mesure du TCK est utilisée principalement pour la surveillance des traitements par l'héparine.

Le réactif BIO CK permet la recalcification du plasma en présence d'une quantité standardisée de céphaline (substitut des plaquettes) et d'un activateur du facteur XII(Kaolin). Le kaolin présente le double avantage d'une lecture aisée et d'un temps de lecture plus court (Athukorala *et al.*, 2007).

II.5.1.1.2. - Mode opératoire

La procédure suivie dans la réalisation de ce test est celle pratiquée par ATHUKORALA et ses collaborateurs avec modification. Une quantité de 10µl d'extrait polysaccharidique de 0,1% est ajoutée à 90µl de plasma normal. Le mélange est incubé à 37°C pendant 10mn, puis on ajoute 100µl du réactif céphaline kaolin, on

laisse le mélange 3mn suivi d'une addition de 100µl de CaCl₂ pour une recalcification du plasma. Ainsi le temps d'incubation est mesuré à l'aide d'un coagulomètre de type biomérieux, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (Athukorala *et al.*, 2007).

II.5.1.2.-Taux de prothrombine et Temps de Quick (TQ)

II.5.1.2.1.- Principe

Le temps de Quick explore la voie extrinsèque de la coagulation. Il est le temps de coagulation d'un plasma citraté mis en présence de thromboplastine calcique, qui active le X et jouant le rôle d'activateur tissulaire de la coagulation court-circuit l'intervention des facteurs XII, XI et IX. La mesure s'effectue aujourd'hui à l'aide d'appareils automatiques.

Le résultats du TQ doit être comparé au temps du témoin normal (entre 12 et 14s), mais est souvent exprimé en pourcentage de la normale (TP). L'expression en INR est à réserver aux surveillances des traitements AVK (Caquet, 2004).

II.5.1.2.2. - Mode opératoire

90 µl de plasma et ajouté 10 µl de l'extrait polysaccharidique et incubé à 37 °C pendant 5mn, et addition 200 µl de thromboplastine. Le temps de coagulation est mesuré.

II.5.1.3.- Temps de thrombine (TT)

II.5.1.3.1.- Principe

C'est le test fondamental de la dernière phase de la coagulation au cours de laquelle le fibrinogène se transforme en fibrine. Le TT est la mesure du temps de coagulation d'un plasma citraté auquel est ajoutée de la thrombine calcique qui active la transformation du fibrinogène en fibrine et court-circuit les phases ayant précédé cette transformation. Pour rendre mesurable cette courte étape (le passage du fibrinogène en fibrine), la thrombine est beaucoup diluée (Caquet, 2004).

II.5.1.3.2. - Mode opératoire

90 µl de plasma et ajouté 10µl de l'extrait de polysaccharides incubé dans 37°C pendant 1mn. On additionné 100 µl de réactif de TT pendant 2mn et après mesuré le temps de thrombine.

II.5.2. - Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

Parmi les différents travaux qui ont été effectués pour évaluer les effets des polysaccharides de noyau de datte, leur activité antioxydante.

II.5.2.1.- Evaluation de pouvoir antioxydant

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extrais des plantes. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

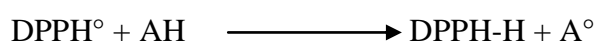
Dans notre étude, nous avons utilisés différents tests chimiques à savoir ; le test Ferric Reducing /Antioxydant Power assay (FRAP) qui permet de mesurer le pouvoir de la réduction des ions de fer, et l'effet scavenger sur le radical 2,2diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le sel d'ammonium de l'acide 2, 2'-azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)(ABTS).

II.5.2.2. - Effet scavenger du radical DPPH

La méthode est basée sur la dégradation du radical. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron au radical synthétique DPPH°. De coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte. Cette méthode est beaucoup utilisée pour étudier des extraits végétaux et alimentaires pour mesurer la capacité antioxydante totale (Thaipong *et al.*, 2006).

II.5.2.2.1.1. - Principe

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH°. La réduction de ce radical par un donneur d'atome d'Hydrogène venant de l'antioxydant à tester AH conduit à la formation de la 2,2diphényl-1-picrylhydrazine incolore DPPH-H et au radical A°(Thaipong *et al.*,2006).



Où AH est un composé capable de céder un H⁺ au radical DPPH.

II.5.2.2.1.2.- Mode opératoire

La solution de DPPH• est préparée par l'ajout de 25mg de radical DPPH• dans 80ml de méthanol à 90%. Le volume est ajusté à 100ml. La solution est préparée à l'avance, au moins 1 à 2hears la solubilisation est difficile, et elle ne se conserve pas plus de 4 à 5 jours à -5°C et à l'obscurité (Afshari *et al.*, 2015).

La solution mère de DPPH concentré est diluée dans le méthanol jusqu'à l'obtention d'une densité optique proche de 1 à 515 nm (Schaich *et al.*, 2015).

- Les extraits à tester

Un volume de 100µl de la solution à tester à 0,1%est mélangé avec 3,9ml de la solution du DPPH• dans des tubes à essai et à l'obscurité et à la température ambiante (POPOVICI *et al.*, 2009). Après 30mnd'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la densité optique est lue à 517nm (Thaipong *et al.*, 2006).

- Courbe d'étalonnage

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard l'ascorbate ou vitamine C. C'est un antioxydant hydrosoluble majeur, réagit rapidement avec l'anion superoxy de et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène. Elle est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (Pourrut, 2008).

On mélange 100µl des extraits polysaccharidiques ou contrôle positif avec 3,9 ml de solution DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) puis agité vigoureusement. Après l'incubation à l'obscurité pendant 30 min, la densité optique est mesurée à 515 nm. Le méthanol est utilisé comme un blanc (Afshari *et al.*, 2015).

- Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$I\% = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$ (Schaich *et al.*, 2015).

II.5.2.2.2.-Test d'ABTS

II.5.2.2.2.1.-Principe

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{°+} de coloration bleue verte en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. Une comparaison est faite avec la

capacité de l'acide ascorbique à capturer $ABTS^{\circ+}$. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre (Pellegrini et al., 2003). Les résultats sont exprimés en mg équivalent vitamine C par g de matière sèche (EVC/gM) (Muanda, 2010).

II.5.2.2.2.- Mode opératoire

Le test de balayage ABTS est réalisé en trois expériences

a /La solution d'ABTS 7M est préparée par l'ajout de 0,383g d'ABTS dans un erlenmeyer à 100ml d'eau distillée. La solution de persulfate de potassium aqueux 2,45mM est préparée par l'ajout de 66,2mg de $K_2S_2O_8$ à 100ml d'eau distillée. Le mélange des solutions d'ABTS et de persulfate de potassium est incubé à 1°C pendant 16h à l'obscurité.

b/Après 16 h d'incubation, la solution est diluée par éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,70 à 734nm. La dilution est préparée juste avant le dosage.

c/Un volume de 0,1ml d'extrait ou de standard est ajouté à 3,9 ml de solution ABTS préparée et incubé à température ambiante pendant 10 min. l'absorbance est mesurée à 734 nm (Yuan et al., 2015).

II.5.2.2.3. - Méthode de FRAP

II.5.2.2.3.1.-Principe

La méthode FRAP, un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, évalue la réduction du fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) en présence d'un antioxydant (Pellegrini et al., 2003; Cao, 1998; Cao et Prior, 1998). Une molécule change de couleur une fois qu'elle est réduite, ce qui permet la quantification par spectrophotométrie. Les avantages de cette méthode sont qu'elle est simple, rapide, peu coûteuse et robuste (Phipps et al., 2007; Prior et al., 2005)

II.5.2.2.3.2.- Mode opératoire

Le pouvoir de réduction ferrique est déterminé en utilisant un dosage de FRAP.

- Une solution de 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) est préparée par l'ajout de 0,312g de TPTZ à 100ml HCl 40mM.
- Une solution de $FeCl_3$ est préparée par l'ajout de 0.54g dans un erlenmeyer à 100ml d'eau distillée.

- Un tampon d'acétate de sodium est préparé par l'ajout de 2.46g d'acétate de sodium à 3.6ml d'acide acétique dans un erlenmeyer puis le volume est complété jusqu'à 100ml par l'eau distillé. Ajustement de pH par l'acide acétique (CH₃COOH), PH=3,6.

La solution de FRAP est préparée en mélangeant 10 volumes de tampon acétate 300Mm leur pH est 3,6 avec 1 volume de TPTZ et 1 volume de chlorure ferrique 20mM, puis chauffé à 30°C pendant 10 min avant l'utilisation (Amparo *et al.*, 2015).

Dans des tubes à essai un volume de 0,15ml des extraits des polysaccharides ou de standard est mélangé avec 2.85ml de la solution de FRAP, à l'obscurité et à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 595 nm (Amparo *et al.* , 2015).

II.5.3.- Activité phagocytaire

Une des actions potentielles majeures des immunostimulants est d'entraîner une augmentation ou une restauration des défenses immunitaires de l'homme ou des animaux vis à vis d'infections bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires. En général, la plupart des immunostimulants testés, lorsqu'ils étaient actifs, ont démontré leurs capacités d'augmenter la résistance anti-infectieuse non spécifique (Lagrange et Hurtrel, 1986).

II.5.3.1.- Principe du test

Le test de phagocytose est basé sur l'activation des cellules phagocytaires par les polysaccharides. Cette expérience est utilisée pour déterminer l'augmentation de la capacité de leucocytes à phagocyter les particules après opsonisation par des extraits polysaccharidiques de noyau de datte (Harun *et al.*, 2015).

II.5.3.2.- Prélèvement de sang

Le sang humain est obtenue par une ponction veineuse aseptique réalisée sur des volontaires sains, de sexe masculin, âgé de 25 à 38 ans (Koko *et al.*, 2008) le même jour de son utilisation. Le sang total est recueilli dans un tube contenant le sodium héparine comme anticoagulant (Maqbool *et al.*, 2011).

II.5.3.3.-Préparation de *Candida albicans*

Candida albicans est inoculé dans un milieu liquide de Sabouraud à partir d'une culture mère maintenue sur la gélose inclinée de Sabouraud. Puis, elle est laissée pendant une nuit à 30°C. Cette technique permet d'obtenir le *C. albicans* sous forme de blastoconidies. La culture est centrifugée à 400xg pendant 10mn (Ghoneum et Gollapudi, 2004).

Le culot est lavé deux fois avec 1ml de tampon PBS stérile (Tavanti *et al.*, 2006) et centrifugé à 460xg à 4°C pendant 10mn, puis incubé pendant 1h à 90°C pour tuer les *C.albicans* (Ghoneum et Gollapudi, 2004). Les levures mortes sont lavées deux fois dans 1ml de PBS et centrifugé (Ragsdale et Grasso, 1989).

La concentration de cellules dans le PBS est estimée par mesure de la densité optique à 540nm. La densité optique est ajustée à 1,0 qui correspond approximativement à 1×10^7 blastoconidies de *C. albicans*/ml (Ghoneum et Gollapudi, 2004; Tavanti *et al.*, 2006).

II.5.3.4.- Préparation des solutions tampons

II.5.3.4.1.- Tampon phosphate saline (PBS)

Tableau VI.- Composition de PBS selon Burnat *et al.* (2013)

Composants	Quantité (g.l ⁻¹)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,9
KH ₂ PO ₄	0,2

II.5.3.4.1.2.-Mode opératoire

Les composants sont ajoutés à l'eau distillée et le volume est amené jusqu'à 1000 ml. Après une bonne agitation, le pH est ajusté à 7,4. Le tampon est stérilisé à l'autoclave pendant 15 mn à une pression de 1 bar, à une température de 121°C et conservé à 25°C (Atlas, 2010).

II.5.3.4.2.- Solution de Hanks

La solution de Hanks est préparée à pH 7,4 dans 1000ml d'eau distillée (Xie *et al.*, 2014)

Tableau VII.- Composition de solution Hanks selon Hanks (1975)

Composants	Quantité (g.l ⁻¹)
CaCl ₂	1,4
NaCl	80
KCl	4,0
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0
KH ₂ PO ₄	0,6
Glucose	10,0
Rouge de phénol 0,2%	0,4
NaHCO ₃	3,5

- Dissoudre 1,4g de CaCl₂ dans 200ml d'eau distillée froide.
- Dans un deuxième bécher (1,000ml de capacité) contenant 800ml d'eau distillée froide ajouter ce qui suit et remuer jusqu'à dissolution:
 - Glucose 10g
 - NaCl 80g
 - KCl 4g
 - MgSO₄, 7H₂O 2g
 - KH₂ PO₄ 0.6g
 - Na₂HPO₄.2H₂O 0.6g
 - Phénol rouge 0.2% 100ml préparé par dissolution de 0,4g de rouge de phénol dans 200ml d'eau distillée froide. Puis on fait un autoclavage.
- Mélanger les deux solutions pour avoir le BSS (Balenced Salt Solution).
- Ajouter de l'eau pour rendre le volume total de 1100ml pour fournir 10% d'excès d'eau pour éviter les pertes de vapeur d'eau au cours de l'autoclavage et pendant chaque manœuvre ultérieure.
- Préparer une solution isotonique de 1,4% de NaHCO₃ par dissolution de 3,5g de NaHCO₃ dans 250ml d'eau distillée. Après l'autoclavage de 1ml à 5ml par tube, la solution est utilisée pour l'ajustement de pH.

❖ Remarque :

Stocker la solution A dans des bouteilles en verre pyrex bouché. Préserver avec 3 ml à 4 ml de chloroforme/litre (un léger excès doit toujours être visible). Après dilution, les légères traces de chloroforme ne posent aucun problème de stérilisation en volumes de moins de 50ml. De plus grands volumes de solutions de chloroforme préservés doivent d'abord être chauffés à l'air libre de conduire-vapeurs, sinon l'acidification se produit.

Tous les solutions salines équilibrées peuvent être stérilisés par autoclavage pour fournir le rapport de phosphates alcalins et les acides réglé de manière à obtenir un pH qui ne dépasse pas 6,8, et à condition que le bicarbonate de sodium est stérilisé séparément et ajouté après refroidissement.

Il ne faut pas stériliser le glucose à un pH supérieur à 7 (BSS = pH 6,8) ou en présence d'acides aminés (par exemple, cystine) ou d'autres substances qui réagissent avec des groupes aldéhyde.

Pour que les solutions soient équilibrés à pH 7,6 par réfrigération, ajouter 0,25ml de NaHCO_3 stérile pour chaque 10ml BSS stérile ($\text{NaHCO}_3 = 0,35 \text{ g/l}$). Si le BSS doit être utilisé immédiatement, expirez la bulle d'air alvéolaire et agiter brièvement dans un tube bouché à transformer le carbonate en bicarbonate et d'atteindre le pH souhaité.

II.5.3.6.-Préparation de polysaccharides

Les fractions suivantes des polysaccharides : PNDA 0,5 et PNDA 4, PNDH sont testées pour leurs capacités d'activer la phagocytose de *C. albicans* par les leucocytes humaines (Popov *et al.*, 1999).

Une concentration de 1 mg/ml de différents extraits polysaccharidiques sont préparées dans la solution de Hanks (Nergard *et al.*, 2005).

II.5.3.7.-Préparation de zymosan

Le zymosan est un dérivé de la membrane des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, il s'agit d'un complexe de protéines et de glucides notamment du β -D glucane. Un β -glucane est constitué de résidus glucose liés par des liaisons osidiques β -1,3 (Sato *et al.*, 2005).

Freire-Garabal *et al.* (1993) ont utilisé le test au zymosan pour mesurer la phagocytose *in vitro* et une concentration de 1 mg.ml⁻¹ est préparée comme contrôle positive (Edvard *et al.*, 1978).

II.5.3.8.-Exploration de la phagocytose et récupération des cellules phagocytaires (protocole modifié)

Les différents extraits polysaccharidiques (40µl) sont mélangés avec 200µl du sang hépariné et incubés dans un incubateur avec agitation (60rpm) à 37°C pendant 30mn. Puis, les tubes sont mis sur la glace pour arrêter la réaction (Harun *et al.*, 2015). Les cellules stimulées sont lavées deux fois par 1ml de PBS (Chen *et al.*, 2015) froide (4°C), puis centrifugé à 250xg pendant 5min à 4°C (Rossi *et al.*, 2013).

Au mélange des échantillons, 40µl de solution de *Candida albicans* est ajoutée à 0°C. Les échantillons sont incubés dans un incubateur avec agitation à 37°C pendant 10min. Tandis que, pour le contrôle négatif les échantillons sont placés sur la glace (Harun *et al.*, 2015).

Après incubation, la phagocytose est arrêtée par l'addition de 2ml de PBS froide, et les cellules sont ensuite lavées trois fois par 1ml de PBS froide (Chen *et al.*, 2014) puis centrifugées à 100 x g pendant 5mn à 4°C, trois fois (Czuprynski *et al.*, 1991).

II.5.3.9.-Lyse des érythrocytes

Maqbool *et al.* (2011) ont lysé les érythrocytes par 2ml d'une solution de lyse pour obtenir une population pure de granulocytes.

La lyse des hématies est effectuée une fois pendant 20s (le temps est strictement contrôlé en utilisant un chronomètre) par la solution HSi d'hémolyse et de lavage (Réf: 018431L, TOSOH EUROPE, Belgique). Le processus de lyse est arrêté en utilisant 2ml d'un tampon HBSS suivi d'une centrifugation à 400xg pendant 10mn et les échantillons sont ensuite lavés par 3ml de PBS, deux fois (Harun *et al.*, 2015).

II.5.3.10.-Préparation de frottis sur lame

- La préparation des frottis se fait selon la méthode de Rouësse (2002)

- Prélever 5µl de chaque culot cellulaire à l'aide du compte-goutte;
- Déposer la goutte à l'extrémité d'une lame en verre propre;
- Etaler à l'aide d'une autre lame, immédiatement et régulièrement;
- Sécher le frottis à l'air libre (Moinfar *et al.*, 2012).

II.5.3.11.-Fixation par le méthanol

La fixation des cellules étalées est faite en versant quelques gouttes de méthanol sur la lame pour une durée de 2mn (Norum *et al.*, 2005; Ponte *et al.*, 2012).

II.5.3.12.- Coloration de MGG

La coloration de May-Grünwald-Giemsa repose sur un mélange de colorants (éosine, bleu de méthylène et azur). Il s'agit en fait d'une coloration en deux temps, en milieu alcoolique puis aqueux (Sebahoun, 2005).

Tableau VIII.- Test de phagocytose

	Concentration	1 mg.ml ⁻¹
Contrôle positif	Sang total (µl)	200
	Zymosan (µl)	40
	<i>Candida albicans</i> (µl)	40
Noyaux des dates	Sang total (µl)	200
	Polysaccharides (µl)	40
	<i>Candida albicans</i> (µl)	40
Contrôle négative	Sang total (µl)	200
	Solution de Hanks (µl)	40
	<i>Candida albicans</i> (µl)	40

II.5.3.12.1.-Principe de la coloration

Une coloration standard utilise la méthode de May-Grünwald-Giemsa repose sur l'interaction entre l'éosine G et un complexe ADN azur B. Les deux colorants forment un complexe (Merck, 2008).

Les noyaux apparaissent en différents degrés de coloration mauve et le cytoplasme en différents degrés en bleu, ce qui permet de différencier les structures individuelles.

L'intensité de la coloration dépend de la teneur en azur B et du rapport azur B-éosine G. Le résultat de la coloration peut être influencé par divers facteurs comme le pH de la solution et de la solution tampon, les substances tampons, le temps de coloration et de fixation (Merck, 2008).

II.5.3.12.2.-Préparation de colorant MGG (Merck, 2008)

1. Solution d'éosine-bleu de méthylène à partir de colorant selon May-Grünwald

Dans 100ml de méthanol, 0,25g d'éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald est dissous suivi d'un léger chauffage dans un bain Marie à 60°C. Après agitation durant 1h, la solution est laissée reposer 24h puis filtrer.

La dilution de la solution de May-Grünwald est effectuée pour la coloration manuelle, en mixant 30ml de solution éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald avec 150ml d'eau distillée et 20ml de solution tampon.

2. Solution de Giemsa diluée pour la coloration manuelle

Une dilution de 10ml de solution azur-éosine-bleu de méthylène de Giemsa se fait dans 190ml de solution tampon. Après mélange, la solution est laissée reposer 10mn et filtrée si nécessaire.

II.5.4.3.12.3.- Procédure de la coloration May-Grünwald-Giemsa

Sécher la préparation cellulaire à l'air :

- Couvrir le frottis pendant 3min par une solution de May-Grünwald-Giemsa (éosine + bleu de méthylène).
- Éliminer l'excès de colorant en rinçant avec l'eau du robinet.
- Couvrir le frottis de 15 à 20min avec une solution fraîche de Giemsa filtré (la solution standard diluée à 1:10 avec l'eau du robinet).
- Laver rapidement avec l'eau du robinet.
- Sécher le frottis à l'air.

II.5.3.13.- Lecture du frottis sous microscope

Après séchage, les lamelles sont inversées sur les lames en verre (Giamis *et al.*, 1992) et sont examinés par immersion dans l'huile (Ghoneum et Gollapudi, 2004) au microscope optique par un grossissement de 1000 fois (Giamis *et al.*, 1992).

II.5.3.14.- Calcul de la capacité phagocytaire

Une centaine de cellules adhérentes sont comptés pour déterminer le pourcentage de la phagocytose à l'aide d'un microscope optique. Les valeurs de phagocytoses représentent le pourcentage de cellules qui contiennent des levures intériorisées. (Popov *et al.*, 1999).

La capacité phagocytaire est représentée comme suit:

$$\text{CP}\% = (\text{Nombre de cellules ingérées}/\text{Nombre totale}) \times 100\%$$

- **CP:** Capacité de phagocytose.
- **Nombre de cellules ingérées:** les leucocytes phagocytaires de levures ou zymozaan.
- **Nombre totale:** les leucocytes balayées.

II.5.3.15.- Calcul de l'activité phagocytaire

Après calcul du degré de phagocytose du contrôle positive, des polysaccharides et du contrôle négatif. L'activité phagocytaire des polysaccharides et celle de contrôle positive est calculé selon Steven *et al.* (1984) comme suit:

$$\text{PA}\% = \text{CP}_{\text{test}}\% - \text{CP}_{\text{blanc}}\%$$

- **PA%:** activité phagocytaire catalysé par les polysaccharides et du contrôle positive.
- **CP_{test}%:** capacité de phagocytose en présence des polysaccharides ou bien le contrôle positive.
- **CP_{blanc}% :** capacité de phagocytose en absence des polysaccharides ou bien le contrôle positive.

II.5.5.-Activité antibactérienne

II.5.5.1.-Principe du test

Les bactéries en culture sont mises en présence d'un ou plusieurs antibiotiques. Les conséquences de la présence d'une molécule active sur le développement bactérien sont directement observables via la formation d'halos d'inhibition autour du dépôt de l'échantillon testé. Ces halos indiquent la présence de molécules actives dans l'extrait étudié, parfois grâce à la présence d'une molécule antibiotique. Un antibiotique est une substance organique ayant pour action spécifique de détruire (activité bactéricide) ou fortement inhiber la croissance de micro-organismes (activité bactériostatique). Ces molécules sont soit d'origine naturelle (spécifiquement élaborées par des microorganismes ou présentes dans des organismes végétaux), soit synthétisées ou hémisynthétisées (la majorité des antibiotiques actuels) (Pierre, 2010).

II.5.5.2.-Mode Opérateur

On utilise le Mueller–Hinton comme un milieu de culture des souches bactériennes. (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853).

- Couler dans une boîte de Pétri un milieu de MH 3,8 %. Laisser sécher.
- Préparer une suspension bactérienne dans du tampon phosphate à une DO comprise entre 0,10 et 0,12 ($\lambda=600$ nm) à partir d'une culture d'environ 24 h (en phase stationnaire).
- Inonder le milieu MH 3,8 % par la suspension bactérienne diluée (2-3 ml) et retirer l'excédent. Laisser sécher 30 min (Pierre, 2010).
- Placer les disques en papier de Wattman N° 3 dans lesquels seront inoculées les différentes solutions : 30 μ L de l'eau distillé (témoin négatif), à tester un échantillon de concentration 1 mg/ml. Les diamètres des halos d'inhibition (mm) sont mesurés après 24 h d'incubation à 37°C (Krichen *et al.*, 2014).

Extraits des polysaccharides / contrôle positif (40µl) + Sang total (200µl)

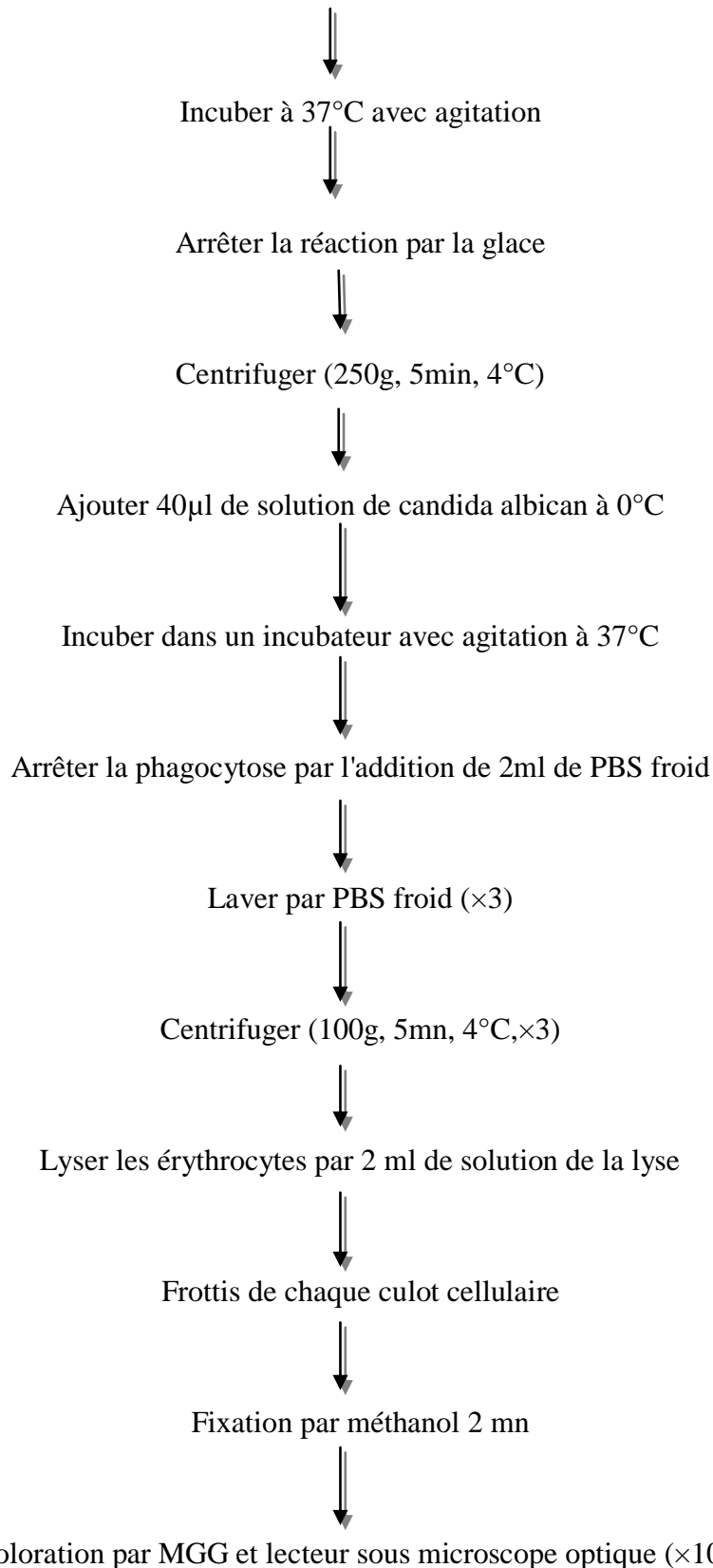


Figure 11.- Les étapes de tests de phagocytose *in vitro* Czuprynski *et al.* (1991); Ehlers *et al.* (1992); Giaimis *et al.* (1992); Rouësse (2002); Norum *et al.* (2005); Sebahoun (2005); Maqbool *et al.* (2011); Ponte *et al.* (2012); Rossi *et al.* (2013); Chena *et al.* (2014); Harun *et al.* (2015); Chen *et al.* (2015).

II.6.- Etude statistique

L'analyse statistique des dosages et des différents tests biologiques est réalisée par les logiciels statistiques Excel et le R et toutes les représentations graphiques sont dessinées par l'Excel.

La corrélation de Pearson au seuil 5% s'applique aux nos résultats, et se réalise à l'aide du logiciel R.

CHAPITRE III

Résultats et discussions

III.1.- Contenu des noyaux de dattes en polysaccharides

III.1.1.- Rendement d'extraction

Le rendement total de la masse lipidique de noyaux des dattes de cultivars Ghars est de 6,67% \pm 0,01. Ce rendement lipidique est plus grand que les trois cultivars Omanais suivants: Mebseeli 5,02%, Um sellah 5,90% , Shahal 5,09% (Al farsi et *al.*, 2007). Mais par contre il est plus faible que les cultivars tunisien Deglet nour 10,19% et Allig 12,67% (Besbes et *al.*, 2004).

Le tableau IX montre les rendements des extraits de polysaccharides hydrosolubles et alcalisolubles des noyaux de dattes. Les rendements massiques des extraits de polysaccharides par rapport à la matière sèche sont de 0,87%, dans la fraction hydrosolubles (PNDH). Tandis que, les fractions de polysaccharides alcalisolubles sont plus importantes, soit de 6,43% pour l'extrait des polysaccharides alcalisoluble à 0,5M (PNDA 0,5) et 8,5% pour l'extrait des polysaccharides alcalisoluble à 4M (PNDA 4).

Tableau IX.- Rendements massiques d'extraction de lipides et de polysaccharides des noyaux de dattes Ghars.

	Fraction	Rendement (%)
Les lipides	/	6,67
Les polysaccharides	PNDH	0,87
	PNDA 0,5	6,43
	PNDA 4	8,5

III.1.2.1.- Oses totaux

D'après les résultats consignés dans le tableau X, les oses totaux sont plus élevés dans la fraction alcalisoluble PNDA 4 soit 34,825% et la fraction hydrosoluble PNDH (27,79%), alors qu'elle représente de faibles teneurs dans les fractions alcalisolubles PNDA 0,5 (21%).

Tableau X. – Contenu des extraits de polysaccharides hydro et alcali solubles

	PNDH	PNDA 0,5	PNDA 4
Oses totaux (%)	51,6	45,4	71,7
Oses neutres (%)	46,823	37,36	67,65
Oses acides (%)	3,44	7,28	7,28
Protéines (%) (BRADFORD)	0,6	1,07	0,038

Le contenu osidique de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble des noyaux de dattes (PNDH) est de 51,6%, cette valeur est comprise entre celles des extraits polysaccharidiques alcalisolubles variant entre 45,4 % pour l'extrait de polysaccharides alcalisolubles 0,5M (PNDA 0,5) et 71,7 % pour les polysaccharides alcalisolubles 4M (PNDA 4).

Les oses neutres sont les constituants majeurs des trois extraits, mais il y a une variation entre les extraits. En effet, leurs teneurs dans PNDA 0,5, PNDH et PNDA 4 sont de 37,36%, 46,823% et 67,65 % respectivement.

Les teneurs en oses acides sont de 3,44% pour PNDH et 7,28% pour PNDA 0,5 et PNDA 4.

Les teneurs en protéines des extraits des polysaccharides hydrosolubles et alcalisolubles obtenus par la méthode de BRADFORD (1976), sont de 0,6% pour PNDH ; de 1,07% pour PNDA 0,5 et 0,038 % pour PNDA 4, il apparaît que la teneur en protéines est plus élevée dans PNDA 0,5 par rapport à PNDH et PNDA 4.

D'après l'étude statistique, nous notons que les oses neutres ont une corrélation positive aux oses totaux selon le tableau de corrélation statistique, se qui peut dire la majorité de oses sont des oses neutres.

III.1.3.- Caractérisation qualitative des oses par CCM

L'hydrolyse acide des extraits polysaccharidiques par le TFA permet d'observer des taches ayant différents Rf. Le premier système a montré l'apparition de 11 taches pour l'ensemble des extraits, le deuxième système a montré 12 taches pour tous les extraits.

Le tableau XI montre les Rf des oses étalons et le tableau XII illustre les Rf des taches observées après l'hydrolyse acide des fractions.

Tableau XI.- Rapport frontal (Rf) des étalons des oses dans les deux systèmes de CCM

Type d'ose	Système 01	Système 02
Arabinose	0,52	0,46
Galactose	0,45	0,30
Glucose	0,49	0,38
Mannose	0,51	0,43
Xylose	0,59	0,57
Acide glucuronique	0,17	0,028

Tableau XII.- Rapport frontal (Rf) des oses après l'hydrolyse acide des polysaccharides dans les deux systèmes de CCM

Type d'extrait	Système 01	Système 02
PNDH	0,17- 0,45- 0,51 - 0,52 -0,59	0,3 - 0,43 - 0,46 - 0,57
PNDA 0,5	0,18 - 0,52 - 0,59	0,35 - 0,43 - 0,46 - 0,57
PNDA 4	0,17 - 0,52- 0,59	0,34 - 0,43 - 0,46 - 0,57

La composition glucidique des hydrolysats des polysaccharides hydrosolubles montre la présence de galactose, de mannose, de xylose, de l'arabinose et de l'acide glucuronique. Ishurd et *al.* (2001) signalent l'existence des galactomananes dans les noyaux de dattes de cultivar Aple de la Lybie.

Pour l'hydrolysat alcalisoluble nous remarquons la présence de xylose, de l'arabinose, de mannose, et de l'acide glucuronique. Mais selon Ishurd et *al.*(2003), après l'analyse des fractions alcalisolubles de cultivar Aple de la Lybie ont montré la présence de xylose, de l'arabinose, de mannose et de l'acide glucuronique et aussi du glucose et de galactose à des concentration variables.

Nous avons pu observer d'autres taches dont les Rf ne correspondent pas aux oses étalons, il s'agit alors d'autres types d'oses.

Tableau XIII - Les oses constitutifs de chaque fraction glucidique

Type d'extrait	Système 01	Système 02
PNDH	Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose, A.glucuronique	Xylose, Arabinose, Mannose, Galactose.
PNDA 0,5	Xylose, Arabinose, Mannose.	Xylose, Arabinose, A.glucuronique.
PNDA 4	Xylose, Arabinose, A.glucuronique.	Xylose, Arabinose, Mannose.

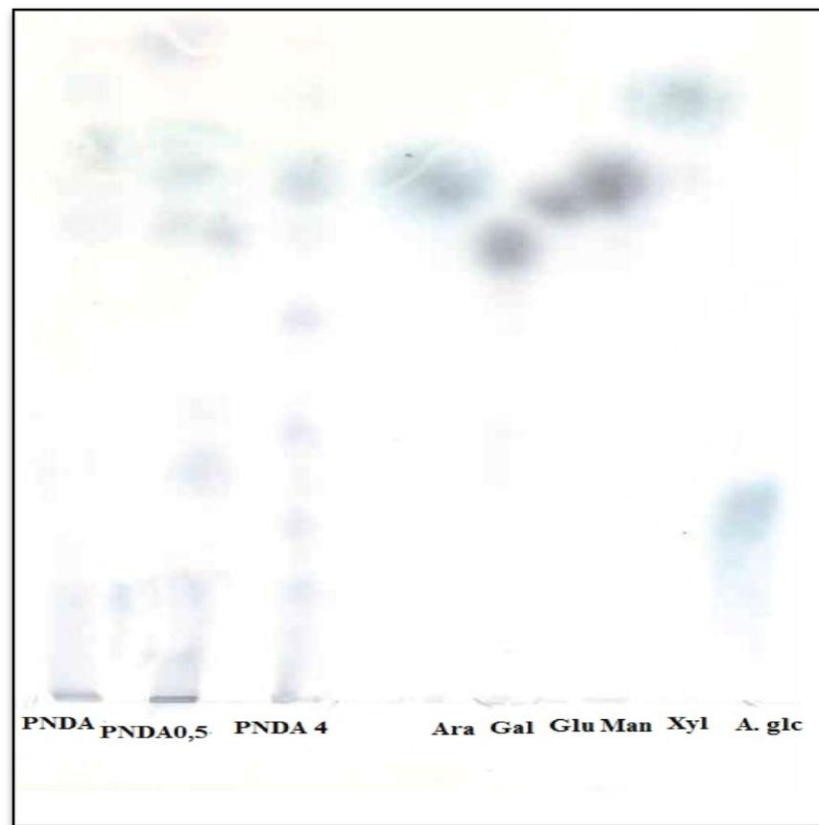


Figure 17.- Chromatogramme des extraits polysaccharidiques des hydrolysats hydrosoluble PNDH et alcalisolubles PNDA 0,4 et PNDA 4 des noyaux de dattes par l'acide trifluoroacétique à 2 M durant 4 heures à 100°C (système 1)



Figure 18.- Chromatogramme des extraits polysaccharidiques des hydrolysats hydrosoluble PNDH et alcalisolubles PNDA 0,5 et PNDA 4 des noyaux de dattes par l'acide trifluoroacétique à 2 M durant 4 heures à 100°C (système 2)

III.2. Activités biologiques

III.2.1.- Activité anticoagulante

La figure 9 présente l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits polysaccharidiques des noyaux de dattes Ghars comparée au contrôle positif (héparine) avec le test de temps de céphaline activée (TCA).

On remarque que les trois extraits polysaccharidiques à $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ possèdent un temps de céphaline activée supérieur à celui du contrôle positif qui est de 30,9s, pour les polysaccharides hydrosolubles et alcalisolubles de 4M ce temps est de 31,5s, alors que l'extrait de polysaccharides alcalisolubles 0,5M montre un temps de céphaline activée de 300s.

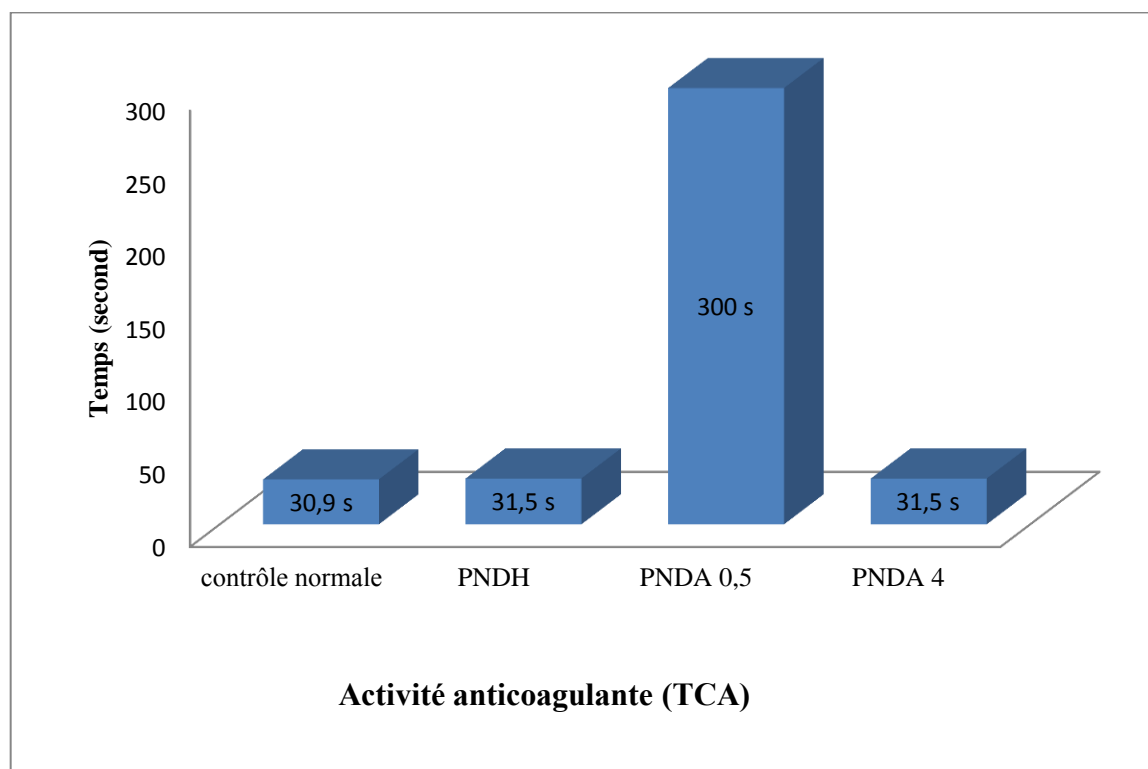


Figure19 – Temps de céphaline activée (TCA) de trois extraits polysaccharidiques de noyaux des dattes de cultivars Ghars à une concentration de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Pour l'extrait brut de polysaccharide alcalisoluble à 0,5M (PNDA 0,5M) qui à une activité anticoagulante la plus remarquée, et dans le but de déterminer la concentration minimale

d'activité nous avons préparé des concentrations différentes à partir de PNDA 0,5M : 1, 2,5, 5, 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et nous avons mesuré ainsi le temps de céphaline activée, le temps de Quick, et le taux de thrombine.

La figure 20 porte les valeurs des trois tests. Pour TCA, il est remarqué que les temps enregistrés sont 58,1 s, et 245 s pour les deux premières concentrations ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et $2,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$), mais pour les deux autres concentrations, il est resté stable à 300s. Pour le TT, on observe que toutes les concentrations présentent des temps de thrombine de 100s.

Pour le temps de Quick (TQ), le TP des différentes concentrations sont respectivement de 13,9s, 14,5s, 19,3s, 29,6s, et ces valeurs sont plus importantes que la valeur normale de 12,5s, et les valeurs de TQ sont convertis aussi en pourcentage et INR (International Normalised Ratio) comme la présente le tableau XIV.

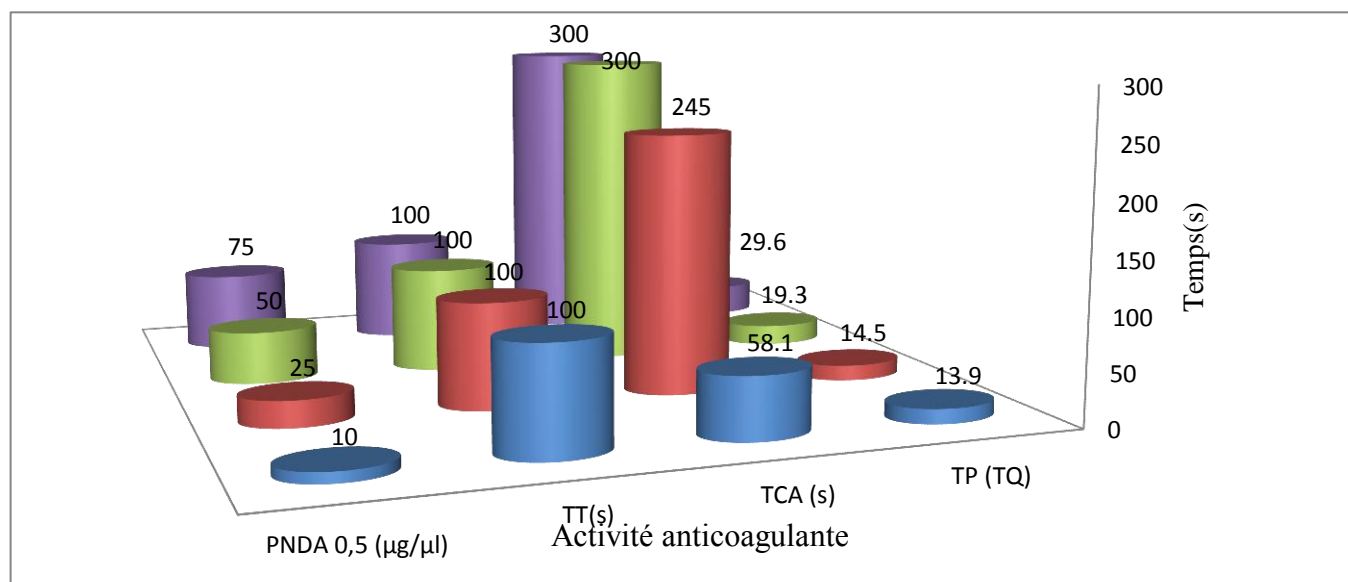


Figure 20 - Activité anticoagulante de l'extrait brut des polysaccharides alcaliolubles des noyaux de dattes à 0,5M (PNDA 0,5).

Tableau XIV.- Résultats de test TP pour l'activité anticoagulante à différentes concentrations de l'extrait brut des polysaccharides alcaliolubles des noyaux de dattes à 0,5M (PNDA 0,5)

Concentration d'échantillon	%	INR	TQ
Control normal 0 %	100	1,00	12,5
10 %	85,8	1,12	13,9
25 %	77,9	1,20	14,5
50 %	44,8	1,96	19,3
75 %	23,4	4,05	29,6
100 %		Incoagulable	

Le TT est un indicateur clé de ce processus de transformer fibrinogène en fibrine est connue pour être la dernière étape de la coagulation. Par conséquent, nous avons conclu que la fraction PNDA 0,5 pourrait exercer leur activité anticoagulante en inhibant la conversion de fibrinogène en fibrine. Cette constatation a été confirmée par notre analyse TCA montrant l'interférence des facteurs de coagulation (IX, XI, XII) pendant le processus de coagulation intrinsèque. Cependant, l'analyse a montré que le TP de PNDA 0,5 pourrait aussi interférer avec le facteur de coagulation extrinsèque (Dong et *al.*, 2014).

D'après Souza et *al.* (2015), les polysaccharides des écorces de *Geoffroea spinosa* à une activité anti-thrombique très importante, surtout pour la fraction FIII qui constitué principalement par l'arabinose et le rhamnose avec une faible quantité de galactose, et pour les polysaccharides de *Camellia sinensis* (thé vert) à une fraction de pouvoir anticoagulantes (TPS-4) et riche en rhamnose, arabinose, galactose, glucose (Cai et *al.*, 2013). Les trois fractions testées contiennent un ose commun avec les études citées est ce de l'arabinose, mais la puissance de cette activité diffère semble due à la quantité de l'arabinose ou au type de liaison.

III.2.2.- Activité antioxydante

Trois méthodes différentes sont utilisées pour étudier l'activité antioxydante, puisque, les résultats d'une seule méthode ne peuvent donner qu'une suggestion réduite de l'activité antioxydante. Les résultats obtenus à partir de ces méthodes sont regroupés dans la Figure 21. Les valeurs de l'activité antioxydante sont exprimées en % qui indique le pourcentage d'inhibition de radical libre.

La figure 21 présente les résultats d'activité antioxydante des trois extraits. On remarque que toutes les fractions ont un pouvoir d'inhibition des radicaux libres variables. Pour le DPPH, les extraits ont des pouvoirs d'inhibition variant entre 21% pour PNDH et 40% pour l'extrait de polysaccharides alcalisolubles de 0,5M, mais l'extrait de polysaccharides alcalisolubles de 4M, un pouvoir d'inhibition de 34% a été noté.

Pour l'ABTS, les pourcentages d'inhibition varient entre 15% pour PNDA 4 et 56% pour PNDA 0,5, tandis que l'extrait de polysaccharides hydrosolubles montre un pouvoir d'inhibition de 35% (Figure 21).

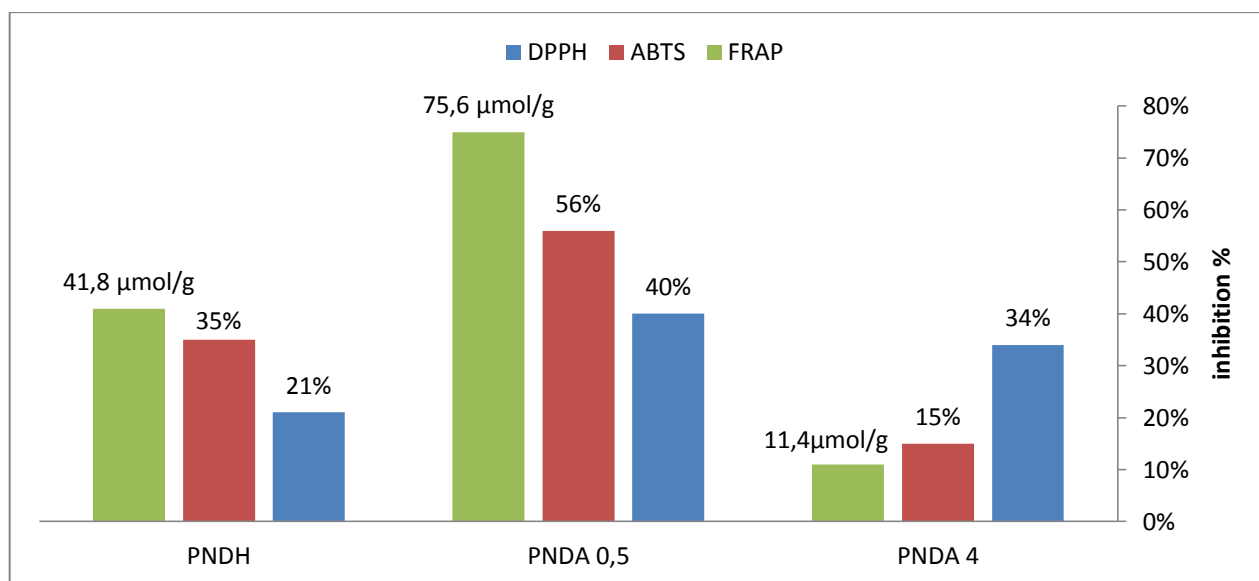


Figure 21 .- Activité antioxydante des différentes fractions à la concentration 100 µg/ml par trois tests : DPPH, ABTS et FRAP

Le test de FRAP a permis de relever les valeurs de 11,4 µmol/g, 41,8 µmol/g, 75,6 µmol/g, pour les extraits PNDA 4, PNDH, PNDA 0,5 respectivement. Ces valeurs sont les plus élevées parmi les tests de l'activité antioxydante effectués.

Selon Lecheb (2008), les huiles des noyaux des dattes de variété Mech-Deglat à une activité antiradicalaire (DPPH) et avec un taux d'inhibition de 93%, par contre cette activité moins de 40% pour les trois extraits bruts polysaccharidiques de noyaux des dattes, et selon Cao (2013), les extrait polysaccharidique de thé verte à une forte activité à cause de présence de une

quantité importante de protéines pour fixer les radicaux des DPPH, mais à nos extraits il ya les protéines à faible dose et varié entre 0,038 à 1,07%.

Selon l'étude statistique, l'activité antioxydante DPPH présente une corrélation positive avec les oses acides. On peut ainsi dire que cette activité antioxydante justifie la teneur ou la qualité des oses acides qui existent dans les noyaux de dattes Ghars. Les autres paramètres d'activité antioxydante (ABTS et FRAP) présentent une corrélation positive avec l'activité anticoagulante de temps de céphaline activée (TCA), ce qui signifie que cette activité résulterait des antioxydants qui existent dans les extraits polysaccharidiques préparés à partir des noyaux des dattes Ghars.

III.2.3.- activité phagocytaire

Il est remarqué que l'activité phagocytaire de l'extrait brut des polysaccharides alcalisolubles 0,5M est proche du contrôle positif (Zymozaan) et plus importante que celles des deux autres extraits. La capacité phagocytaire du contrôle normale est de 46 %. Celles des trois extraits PNDA 0,5 et PNDH et PNDA 4 sont respectivement de 41%, 33 % et 28% (Figure 22).

Les polysaccharides des plantes de genre *Astragalus* parmi les famille les plus étudiés aux activités phagocytaire (Sun et *al.*, 2008 ; Chu et *al.*, 2016). Pour *Astragalus membranaceus*, après le mesure de la capacité phagocytaire de polysaccharides de cette plante sur *Apostichopus japonicus* in vitro, à une concentration de polysaccharide de 40 µg/ml dans des trois degré de température différents (18°C, 22°C, 25°C), et les résultats sont respectivement 41%, 29,06% et 15,32% (Sun et *al.*, 2008).

Statistiquement, l'activité phagocytaire à une corrélation positive avec les deux tests antioxydants (ABTS et FRAP).

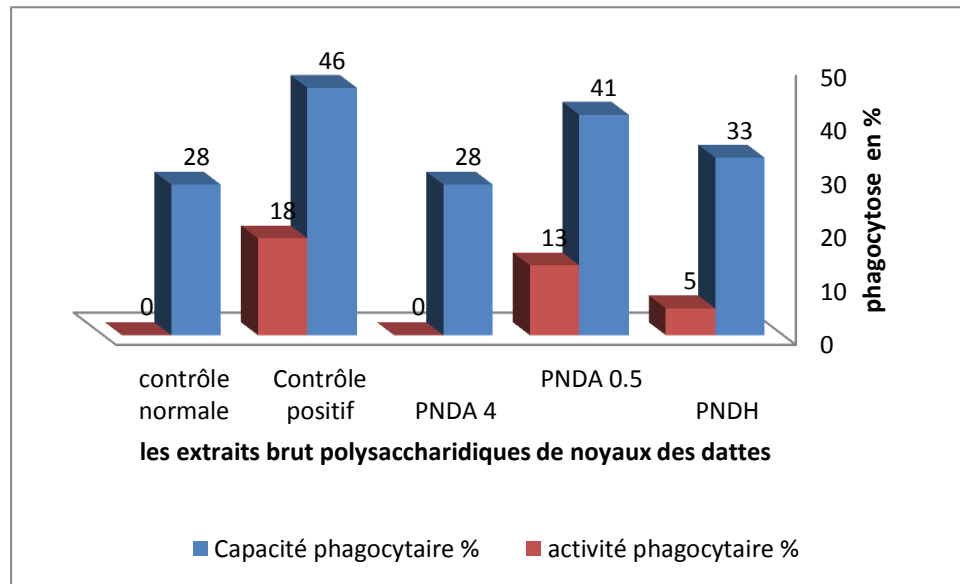


Figure 22.-Activité phagocytaire des extraits polysaccharidiques de noyaux de dattes Ghars

III.2.4.- activité antibactérienne

La figure 23 présente l'activité antibactérienne des extraits bruts polysaccharidiques des noyaux de dattes Ghars. Les faibles diamètres des zones d'inhibition relevées autour des disques imbibés des extraits au contact des trois souches étudiées : *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa* laisse déduire que nos extraits ne présentent que des faibles activités contre ces microorganismes. En effet, la zone d'inhibition de *Staphylococcus aureus* n'est que de 1 mm en présence de PNDH et de 6,5 mm en présence de PNDA 4, et les zones d'inhibition dans ce dernier extrait sont très proches pour *Escherichia coli* et *P.aeruginosa* sont respectivement de 3,5 et 3 mm. Mais à l'extrait PNDH, les zones d'inhibition pour *Escherichia coli* et *P.aeruginosa* sont plus que *S.aureus* et les résultats sont respectivement 5 et 4,5 mm.

Selon Xie et al. (2012), l'extrait polysaccharidique des feuilles de *Cyclocarya paliurus* à une même activité d'inhibition des souches *Staphylococcus aureus* (6,57 mm) comme là observé pour l'extrait de PNDH, mais par contre l'autre extrait (PNDA 4) à une bonne activité pourport aux autres.

La différence qui nous remarquons dans les résultats de l'activité antibactérienne on peut de justifier par la relation entre le type de gram de bactérie et le type de l'extraits polysaccharidique de noyaux des dattes de Ghars.

La structure de la paroi bactérienne à gram négatif (*E.coli* et *P.aeruginosa*) à une spécificité de plus résistant que les bactéries de gram positif à cause de double membranes avec des lipopolysaccharides (LPS) et des canaux à base protéique qui permet la pénétration des molécules hydrophiles s'appellent porines (Gupta, 2011), ils ont à une faible perméabilité et ne permet pas la diffusion de tels agents hydrophobes (Nakaido *et al.*, 1985).

L'activité de l'extrait de PNDH pour *E.coli* et *P.aeruginosa* est bien observé que dans la deuxième extrait, beaucoup des bactéries de gram négatif montrent une bonne sensibilité surtout à aminoglycosides et B-lactamines, le chloramphénicol, les tétracyclines, quinolones, etc., sont plutôt hydrophile, et sont donc attendus à diffuser assez rapidement à travers des canaux porines (Nakaido, 1989), et la différence entre les deux souche de gram négatif puisque la perméabilité de *P.aeruginosa* inférieur à celui de *E.coli* au agents hydrophiles (Nakaido *et al.*, 1986), mais par contre pour *S.aureus* à faible activité, et de nombreuses souches de *S.aureus* deviennent de plus en plus résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques (Eisenstein, 2008), Les souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline sont de fréquentes aux hôpitaux (Collins *et al.*, 1999), et la méthicilline antibiotique du genre B-lactamines qui est à une activité pour *E.coli* et *P.aeruginosa*.

L'extrait de PNDA 4 comme un milieu alcalin pour les souche bactériennes à un effet surtout pour *S.aureus* qui est favorisé de vivre au pH 5,5 à pH 6,0 (Korting *et al.*, 1992), et aussi peut croître à un pH de 9,3 , mais les milieu plus en plus alcalin, le *S.aureus* sera plus fragile au niveau du paroi peut être facilite du pénétration de l'extrait PNDA 4 et crée déstabilisation de cette souche qui donne une grande zone d'inhibition pourport aux autres souche (Le Loir *et al.*,2003), et l'extrait de PNDA 4 traversé les paroi de souche de gram négatif (*E.coli* et *P.aeruginosa*) et les lipoprotéines et la bicouche lipidique facilité l'entrée de l'extrait mais les bactéries de gram négatif reste plus résistance que les autres.

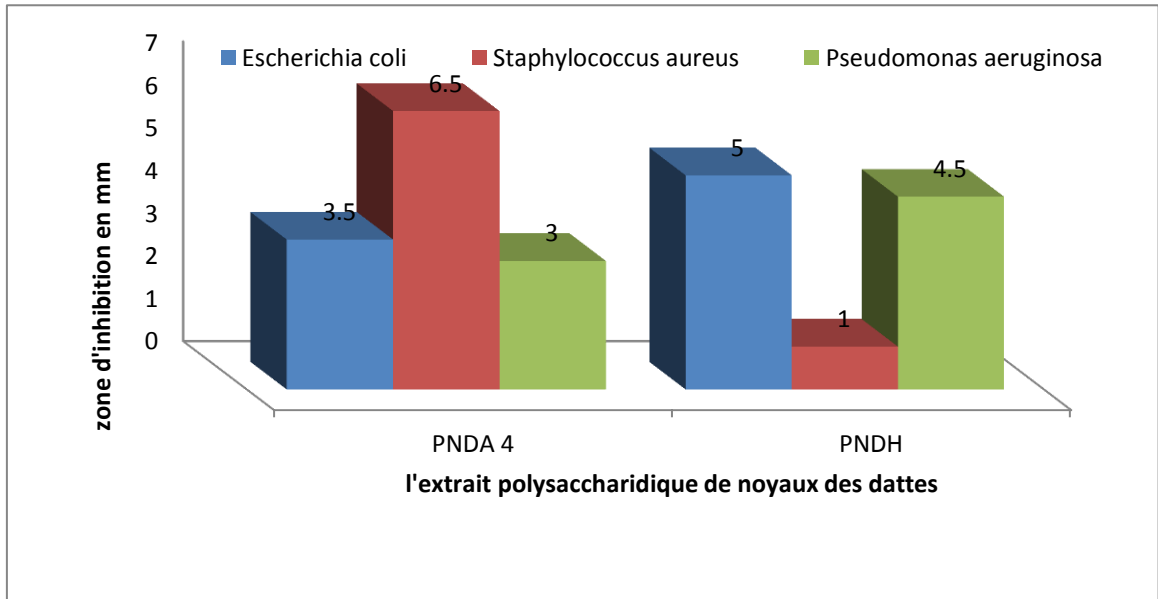


Figure 23.-Activité antibactérienne des extraits polysaccharidiques alcalisolubles 4M et hydrosolubles des noyaux des dattes sur les souches : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

Conclusion et Perspectives

Conclusion

L'étude de la composition des extraits bruts hydrosoluble et alcalisolubles après la lyophilisation, donne des valeurs d'oses totaux de 71,7% pour PNDA 4, 51,6% pour PNDH et 45,4% pour PNDA 0,5. Parmi les oses, 67,65% PNDA 4, 46,823% pour PNDH et 37,36% pour PNDA 0,5, sont des oses neutres, 7,28% pour PNDA 0,5 et PNDA 4, 3,44% pour PNDAH, sont des oses acides. Les protéines comme un deuxième constituant majeure des extraits brut des polysaccharides et à un taux inférieure de 2%.

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) pour les oses des trois extraits hydrolysés par l'acide trifluoroacétique 2M pendant 4h à la température 100°C, montre que l'extrait hydrosoluble (PNDH) à une hétérogénéité et diversité d'oses neutres et acides, de pentoses et hexoses mais moins que les deux extraits alcalisolubles (PNDA 0,5 et PNDA 4) qui sont constitués principalement de glucose, de xylose, d'arabinose et d'acide glucuronique.

L'activité anticoagulante mesurée par le test de temps de céphaline activée (TCA) de PNDA 0,5 est de 300s, alors que les deux autres extraits ne montrent pas d'activité significative par rapport au contrôle négatif. Le test de temps de thrombine est stable pour les différentes concentrations de PNDA 0,5 de 100s, mais le test de taux de prothrombine montre un temps supérieur de 29s à 7,5µg/µl de PNDA 0,5.

L'activité antioxydante des trois extraits testés par les trois méthodes DPPH, ABTS, FRAP à une concentration de 10µg/µl montre un pouvoir antioxydant allant jusqu'à 75,6 µmol/g pour l'extrait de PNDA 0,5.

L'activité phagocytaire est généralement inférieure à celle de contrôle positif soit 46% de Zymosan. La plus importante est celle de PNDA 0,5 soit 41%. L'action antibactérienne des extraits polysaccharidiques est faible, avec des zones d'inhibition qui ne dépasse pas 6,75 mm.

Perspectives

Pour une meilleure rendement d'extraction des polysaccharides de noyaux de dattes, il faut chercher les bonnes conditions d'extraction (la température, le temps d'extraction, les solvants), et l'utilisation des techniques de haute performance après la purification des extraits comme : infrarouge, La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et chromatographie échangeuse

d'anions, de haute performance pour milieu identifié les molécules composantes nos extraits.

Aussi, on peut d'appliqué des autres activités biologiques comme : l'activité antitumorale, l'activité antifongique, l'activité anti-inflammatoires, l'activité antivirales ...etc.

Référence bibliographique

1. Al-Farsi M.A., Lee C. Y., 2008. - Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, Volume 108, Issue 3, Pages 977-985
2. Ardekani M R S., Khanavi M., Hajimahmoodi M., Jahangiri M., Hadjiakhoondi A., 2010.- Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenol Contents of some Date Seed Varieties from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* volu;r 9 , Pages141-146
3. Athukorala Y., Jung W K., Vasanthan T., Jeon Y. J., 2006.- An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, vol. 66: 184-191.
4. Baliga M.S., Baliga B. R.V., Kandathil S. M., Bhat H.P., Vayalil P. K., 2011.- A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.) *Food Research International*. *Food Research International*, Volume 44, Issue 7, Pages 1812-1822
5. Ben abdallah A., 1990.-La phoeniculture. Ed CIHEAM- options méditerranéennes.PDF
6. Besbes S., Blecker C., Deroanne C.,Drira N E., Attia H., 2004. - Date seeds: chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food Chemistry*, volume84 pages 577–584
7. Blumenkrantz N. And Asboehansen G., 1973- New Method for Quantitative Determination of Uranic Acid. *Analytical biochemistry*, vol. 54: 484-489.
8. Bouchemal N., Merzougui Z., Addoun F., 2011. - Adsorption en milieux aqueux de deux colorants sur charbons actifs a base de noyaux de datte.*Journal de la Société Algérienne de Chimie*. 21(1), 1-14.
9. Boudechiche, L., Araba, A., Tahar, A., Ouzrout, R., 2009.- Etude de la composition chimique des noyaux de dattes en vue d'une incorporation en alimentation animale. Institut d'Agronomie, Centre Universitaire d'El Tarf.

10. 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*, vol. 72: 248-254.
11. Brudieux V., 2007.- Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. A l'occasion de la relation structure/activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, 220p.
12. Bruneton J., 2009.- Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ième} Ed. Lavoisier, 1268p
13. Burnat B., Walkowiak-Przybyło M., Błaszczak T., Klimek L., 2013.- Corrosion behaviour of polished and sandblasted titanium alloys in PBS solution. vol. 15: 87-95.
14. Cai W., Xu H., Xie L., Sun J., Sun T., Wu X., Fu Q., 2016. - Purification, characterization and in vitro anticoagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots. *Carbohydrate Polymers*, Volume 140, Pages 308-313
15. Caquet R., 2004.-250 examens de laboratoire. 11^{ème} Ed Masson. Paris 380 p
16. Chaira N., Ferchichi A., Mrabet A., Sghairoun M., 2007. - Chemical Composition of the Flesh and the Pit of Date Palm Fruit and Radical Scavenging Activity of Their Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2202.2207p
17. Chen Y., Song M., Wang Y., XIONG W., ZENG L., ZHANG S., XU M., DU H., LIU J., WANG D., WU Y., HU Y., 2015.- The anti-DHAV activities of Astragalus polysaccharide and its sulfate compared with those of BSRPS and its sulfate. *Carbohydrate Polymers*, vol. 117: 339–345.
18. Chen Z. G., Zhang D. N., Zhu Q., Yang Q. H., Han Y. B., 2014.- Purification, preliminary characterization and in vitro immunomodulatory

activity of tiger lily polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, vol. 106: 217-222.

19. Ding H. H., Cui S. W., Goff H. D., Wang Q., Chen J., Han N. F., 2014.- Soluble polysaccharides from flaxseed kernel as a new source of dietary fibres: Extraction and physicochemical characterization. *Food Research International*, vol. 56: 166-173.

20. Djerbi M., 1994.- *Le précis de phoeniculture*. Ed. FAO, Rome, 192p.

21. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. D., Rebers P. A., Smith F., 1956.- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, vol. 28: 350-356.

22. El- Nemr A., Abdelwahab O., El-Sikaily A., 2007. - Treatment of waste water containing toxic chromium using new activated carbon developed from date palm seed. *J.Hazard. Mater.*

23. Espiard E., 2002.- *Introduction à la transformation industrielle des fruits*. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, 360 p.

24. Gazengel J M., Orecchioni A M., 2013.- *Le préparateur en pharmacie* (Coll. Guide Théorique et Pratique), Ed LAVOISIER 2^{ème} Éd. Paris, 1761 p.

25. Ghebregzabeier M., Rufini S., Monaldi B., Lato M., 1976.- Thin-layer chromatography of carbohydrates. *Journal of Chromatography*, vol. 127: 133-162.

26. Ghoneum M., Gollapudi S., 2004.- Phagocytosis of *Candida albicans* by metastatic and non metastatic human breast cancer cell lines in vitro. *Cancer Detection and Prevention*, vol.28: 17–26.

27. Gupta R S., 2011.- Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*.100.171–182.

28. HANKS J H., 1975.- Hanks' Balanced Salt Solution And PH Control. Johns Hopkins School of Hygiene. 2p.
29. Harun N H., Septama A W., Jantan I., 2015.- Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagocytosis activities of leukocytes. *Asian Pac J Trop Biomed*, vol. 5(1): 48-53.
30. Hazourli S., Ziati M., Hazourli A., Cherifi M., 2007.- Valorisation d'un résidu naturel ligno-cellulosique en charbon actif- exemple des noyaux de dattes. *Revue des Energies Renouvelables*, 187-192.
31. Hu H., Liang H., Wu Y., 2015. - Isolation, purification and structural characterization of polysaccharides from *Acanthopanax brachyopus*. *Carbohydrate Polymers*, Volume 127, Pages 94-100
32. Hu J, Jia X., Fang X., Li P., He C., Chen M., 2016. - Ultrasonic extraction, antioxidant and anticancer activities of novel polysaccharides from *Chuanxiong* rhizome *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 85, Pages 277-284
33. Huang S.Q., Ning Z X., 2010. - Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 47, Issue 3, Pages 336-341
34. Ishrud O., Zahid M., Zhou H., Pan Y., 2001. - A water-soluble galactomannan from the seeds of *Phoenix dactylifera* L. *Carbohydrate Research*, Volume 335, Issue 4, Pages 297-301
35. Ishurd O., Ali Y., Wei W., Bashir. F., Ali A., Ashour A., Pan Y., 2003. - An alkali-soluble heteroxylyan from seeds of *Phoenix dactylifera* L. *Carbohydrate Research*, Volume 338, Issue 15, Pages 1609-1612
36. Koko W S., Mesaik M A., Yousaf S., Galal M., Choudhary M I., 2008.- In vitro immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 118: 26–34.

37. 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. Thèse Magister, Université M'HAMED BOUGARA, Boumerdès. 114 p.

38. Lee J.B., Takeshita A., Hayashi K., Hayashi T., 2011. - Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*. *Carbohydrate Polymers*, Volume 86, Issue 2, Pages 995-999

39. Maqbool M., Vidyadaran S., George E., Ramasamy R., 2011.- Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. *Med J Malaysia*, vol. 66 (4): 296-299.

40. Mei Y., Zhu H., Hu Q., Liu Y., Zhao S., Peng N., Liang Y., 2015.- A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, vol. 124: 90-97.

41. Meng X, Liang H, Luo L., 2016. - Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, Volume 424, Pages 30-41

42. Monsigny M., Petit C., Roche A.C., 1988.- Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acids micromethod. *Analytical biochemistry*, vol. 175: 525-530.

43. Morrison I. M. And Stewart D., 1998- Plant Cell Wall Fragments Released On Solubilisation In Trifluoroacetic Acid. *Phytochemistry*, Vol. 49: 1555-1563.

44. Munier P., 1973.- Le palmier dattier, techniques agricoles et productions tropicales. Ed maison neuve et la rosse, Paris, 221 p.

45. Nergard C S., Diallo D., Inngjerdingen K., Michaelsen T E., Matsumoto T., Kiyohara H., Yamada H., Paulsen B S., 2005.- Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali Anti-ulcer, radical scavenging-

and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. *Journal of ethnopharmacology*, vol. 96: 255-269.

46. Nikaido H., 1985.- Role of permeability barriers in resistance to β -lactam antibiotics. *Pharmacol. Ther.* 27:197-231.

47. Nikaido H., 1989.- Outer Membrane Barrier as a Mechanism of Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, Vol. 33, No. 11, p. 1831-1836

48. Nikaido, H., Hancock R E W., 1986.- Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*, p. 145-193. In J. R.

49. Paulsen B. S., Olafsdottir E. S., Ingolfsdottir K., 2002.- Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. *Journal of chromatography*, vol. 967: 163-171.

50. Pereira J G., Mesquita J X., Aragão K S., Franco Á X., Souza M H L P ., Brito TV., Dias J M., Silva R O., Medeiros J V R., Oliveira J S., Abreu C M W S., De Paula R C., Barbosa A L., Freitas A L P., 2014.- Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses *Carbohydrate Polymers*, Volume 108, Pages 17-25

51. Pinto M., Coelho E., Nunes A., Brandão T., Coimbra M. A., 2015.- Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. *Carbohydrate Polymers*, vol. 116: 215-222

52. Popov S V., Popova C Y., Ovodova R G., Bushneva O A., Ovodov Y S., 1999.-Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 21: 617-624.

53. Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009.- Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre D H. *Revue de génie industriel*, vol.4: 25-39.

54. Ragsdale R L., Grasso R J., 1989.- An improved spectrofluorometric assay for quantitating yeast phagocytosis in cultures of murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunological Methods*, vol. 123: 259-267.
55. Rahman M.S., Kasapis S., Al-Kharusi N.S.Z., Al-Marhubi I.M., Khan A.J., 2008. -Composition characterisation and thermal transition of date pits powders. *Journal of Food Engineering*, Volume 80, Issue 1, Pages 1-10
56. Ruiz G., 2005.- Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat, 'université de Limoges, 230p.
57. Sato M., H Sano., Iwaki D., 2003.-Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF-secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J. Immunol.*, vol. 171:417-425.
58. Tavanti A., Campa D., Bertozzi A., Pardini G., Naglik J R., Barale R., Senesi S., 2006.- *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. *Microbes and Infection*, vol. 8: 791-800.
59. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Hawkins Byrne D., 2006.- Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19: 669-675.
60. Ueno Y., Okamoto Y., Yamauchi R., Kato K., 1982. - An antitumor activity of the alkali-soluble polysaccharides (and its derivatives) obtained from the sclerotia of *Grifora umbellata*(Fr.) Pilát, *Carbohydrate Research*, Volume 101, Issue 1, Pages 160-167
61. Voet D. et Voet J G., 2005. - *Biochimie*. Ed De boeck 2eme édition , Paris 1600 p
62. Weil J H., 2001. - *Biochimie générale*. Ed. Dunod, Paris 197 – 199.

63. Weinman S., Méhul P., 2004.- Toute la biochimie. ed Dunod. Paris 452p
64. Xia Y., Kuang H., Yang B., Wang Q., Liang J., Sun Y., Wang Y., 2011.- Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box–Behnken statistical design and its anti-complement activity. *Carbohydrate Polymers*, Volume 84, Issue 1, Pages 282-291
65. Yang C., Guan J., Zhang J S. And Li S P., 2010.- Use of HPTLC to Differentiate Among the Crude Polysaccharides in Six Traditional Chinese Medicines. *Journal of Planar Chromatography*, vol. 23: 46-49.
66. Yuan Q., Xie Y., Wang W., Yan Y., Ye H., Jabbar S., Zeng X., 2015.- Extraction optimization, characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Carbohydrate Polymers*, vol.128: 52-62.
67. Zhang W., Xu P., Zhang H., 2015.- Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science & Technology*. Article in press, 1-14.
68. Zhang Y W., Wu C Y., Cheng J T., 2007.- Merit of *Astragalus* polysaccharide in the improvement of early diabetic nephropathy with an effect on mRNA expressions of NF- κ B and I κ B in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 114: 387-392.
69. Zhao B., Zhang J., Guo X., Wang J., 2014.- Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation. *Food Hydrocolloids*, vol. 31: 346-356.

Annexes

Annexe 1

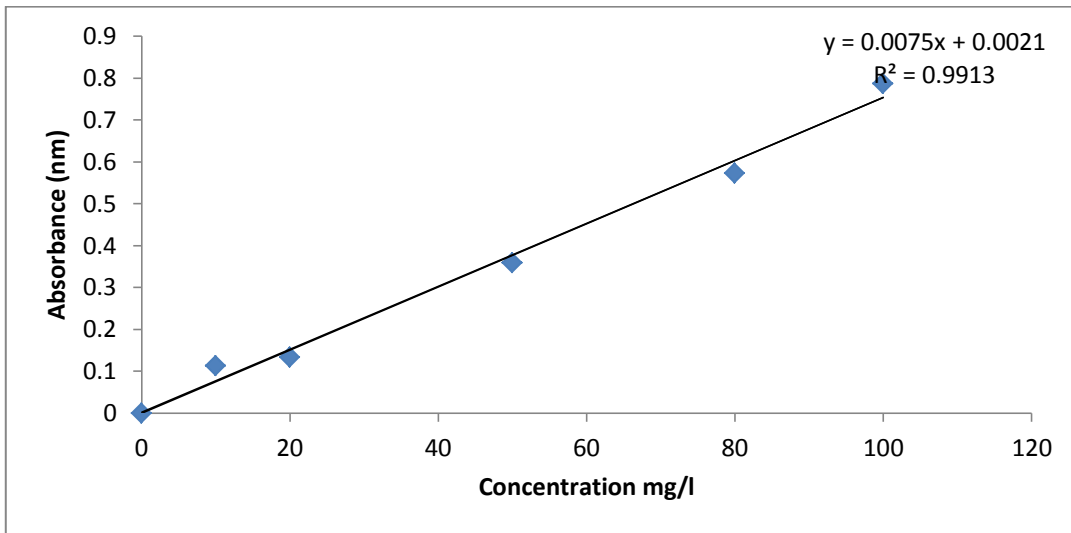


Figure24:-Courbe d'étalonnage des oses totaux (glucose)

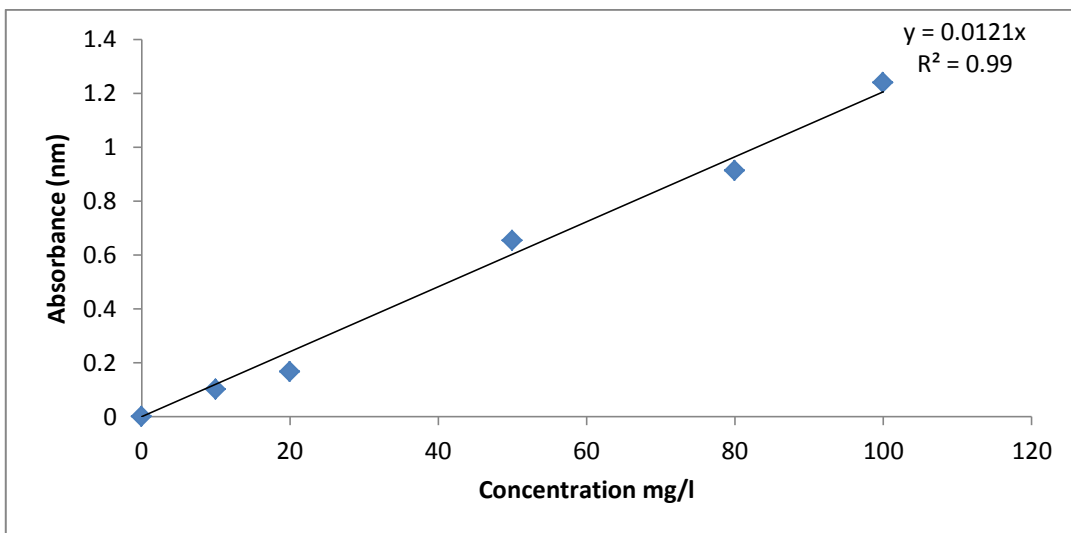


Figure25:- Courbe d'étalonnage des oses neutres (glucose)

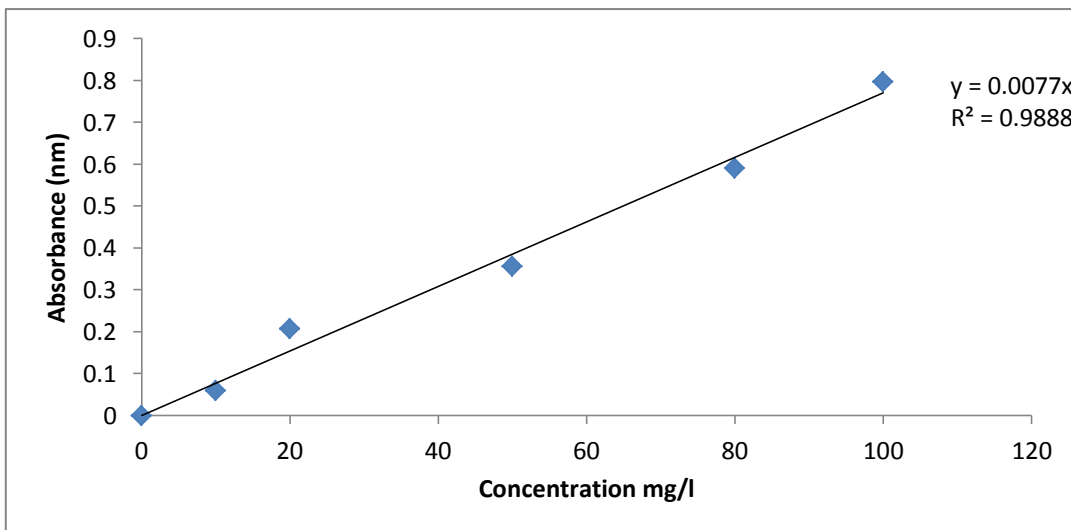


Figure26:- Courbe d'étalonnage des oses acides (acide glucuronique)

Annexe 2

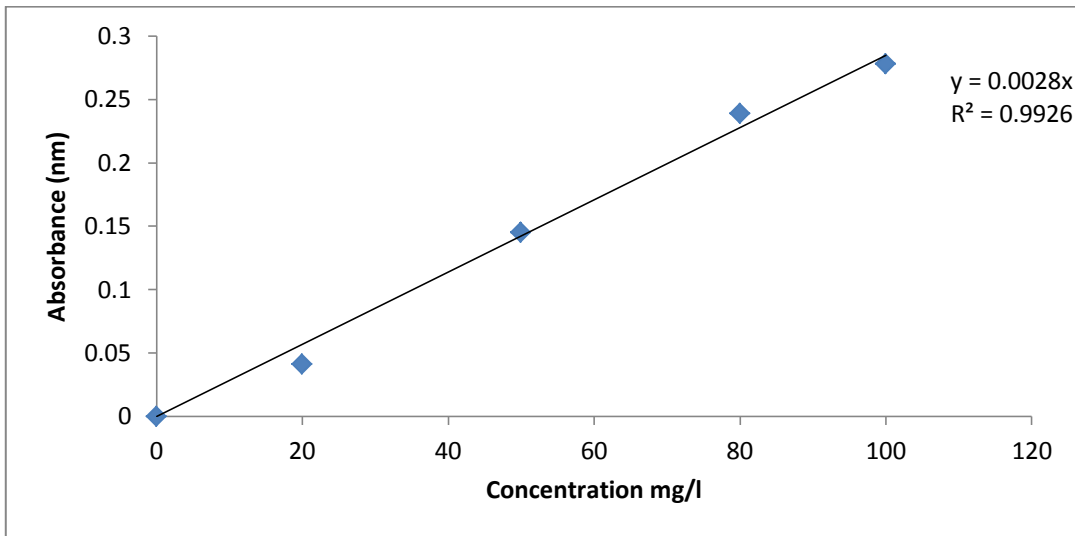


Figure27:- Courbe d'étalonnage des protéines (BSA) la méthode de BRADFORD

Annexe 3

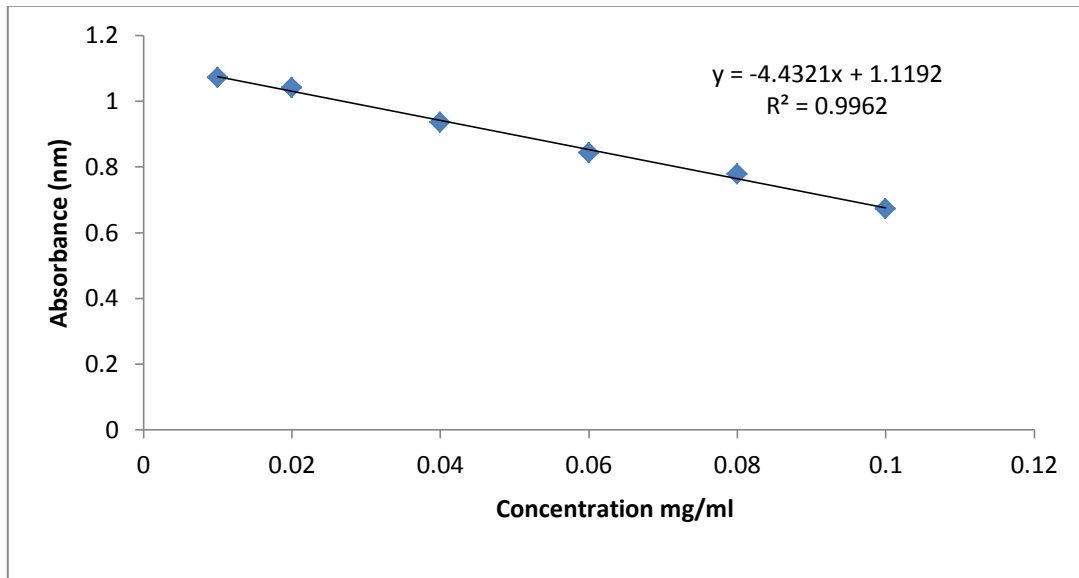


Figure28:- Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique pour le test de DPPH.

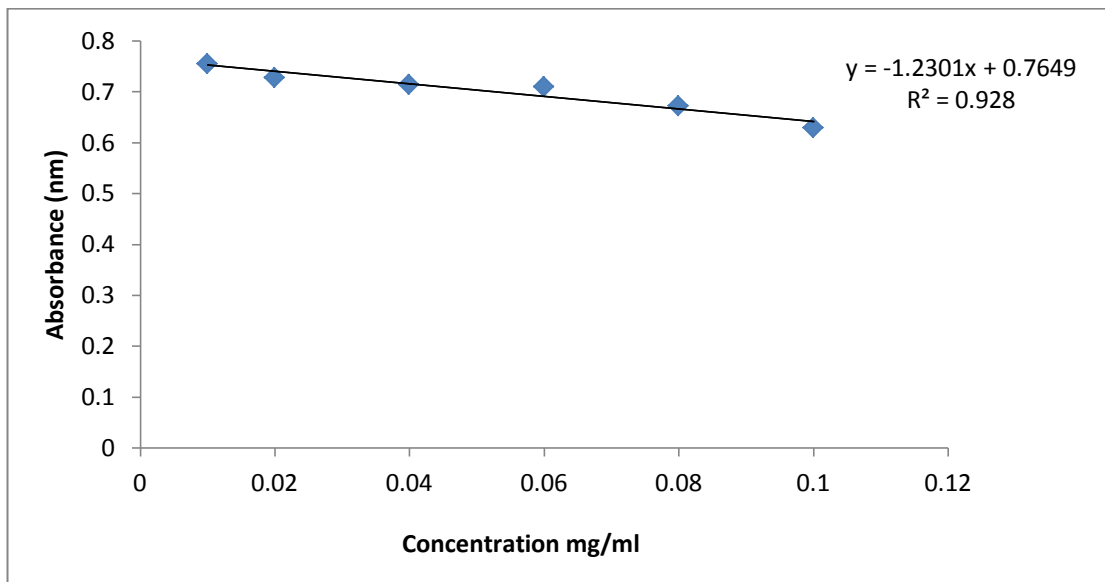


Figure29:- Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique pour le test d'ABTS.

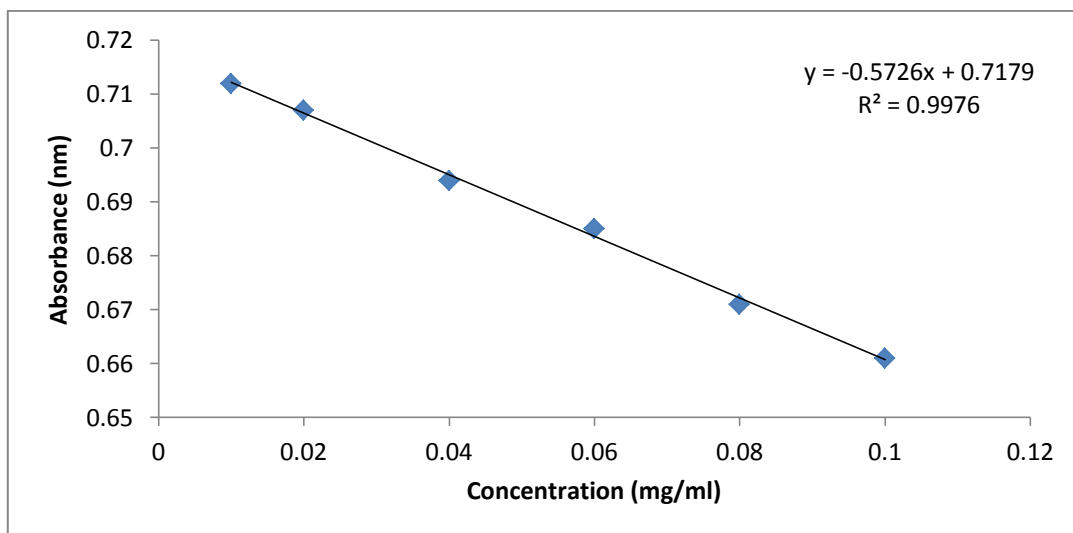


Figure30:- Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique pour le test de FRAP.

REACTIFS BIOLABO
www.bioblabo.fr

AGENCIANT :
BIO-CK
21260, Mulcay, France

Reactif pour la détermination du temps de coagulation activée (TCA) des plasmas humains.

BIO-CK (TCA)

Temps de Thromboplastine Partielle active

REF 13960	R1	6 x 3 mL
REF 13970	R1	6 x 10 mL
REF 13965	CaCl ₂ 0,025 M	1 x 60 mL



USAGE IN VITRO

BIQUE (1)

Le BIQUE est un test de coagulation simple qui explore l'activité de la coagulation de la voie intrinsèque (facteurs V, VIII et IX) à l'exception des plaquettes. CA est utilisée principalement pour la surveillance des Héparine.

Il permet la neutralisation du plasma en présence d'antidote de coagulation (substitut des plaquettes) et du facteur XIII (Kaoalin). Le Kaoalin présente le double avantage d'être un produit de lecture plus court.

EPHALINE KAOALIN

45

Les EPHALO sont destinés à du personnel qualifié, pour un usage de réactifs avant leur utilisation. Les jugements de protection (gousses, gants, lunettes), ainsi que la bouche.

Il est recommandé de travailler avec une concentration de 0,1% (1 mg/ml) de réactif dans le cuivre ou le plomb. Les flacons doivent être conservés à l'abri de la lumière. Les données de sécurité peuvent être obtenues sur simple demande. Respecter la législation en vigueur.

JH DES REACTIFS

Le JH (lyophilisé) est un produit (poillette de spatule) pour soulever la matière et la décliner. Il est contenu dans la quantité de 20 mg. Mélanger doucement et additionner complètement (environ 2 min) avant d'utiliser le produit.

Calcium 0,025 M : Période à Température.

STABILITE ET CONSERVATION

- Stocker dans le flacon d'origine bien bouché à 2-8 °C.
- Le réactif lyophilisé est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret, si est utilisé et conservé dans les conditions préconisées.
- Le réactif de travail (dilution R1) est stable 21 jours dans le flacon d'origine bien bouché à 2-8 °C.
- REF 13965 : transporter la quantité nécessaire, bien rebouché et stocker dans le flacon d'origine.
- REF 13967 : transporter la quantité nécessaire, bien rebouché et stocker dans le flacon d'origine.
- Ne pas utiliser le réactif si les valeurs des plasmas de contrôle sont trouvées en dehors des limites de confiance.
- Ne pas utiliser le réactif de travail après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN

- Prélever la ponction veineuse française.
- 4,5 mL de sang (0,5 mL de citrate trisodique 21% 0,109 M et 4,0 mL de sang).
- Éviter les prétraitements à la seringue qui favorisent la formation de micro-caillots, rejeter tout prélevement suspect.
- Centrifuger 15 minutes à 2500 G le plus tôt possible et réaliser le test dans les 3 h qui suivent le prélèvement.
- Utiliser des tubes, plastiques pour conserver les prélevements réfrigérés avant le test.
- Surveillance du traitement à l'héparine : la centrifugation et les tests doivent être faits dans l'heure qui suit.
- Préparer simultanément, un pool d'eau moins 2 plasmas frais normaux qui servent de témoin.

INTERFERENCES (2) (3) (4)

- L'héparine inhibe différemment sur la sensibilité du réactif selon son origine et sa nature (calcique ou sodique).
- Maltraité, et si proposez une méthode simple pour que chaque laboratoire détermine la sensibilité de sa méthodologie et en informe le clinicien qui dispose ainsi d'une base pour ajuster au mieux sa posologie.

Résultats : les tests d'interférence réalisées sur plasmas (TCA 0,025 M) sur BIO SOLEA 4 :

Interférence	Résultat
Hémoglobine	Pas d'interférence jusqu'à 327 µmol/L
Turbidité	Interférence négative à partir de 0,2 %
Bilirubine	Interférence positive à partir de 60 µmol/L

Young D.S. a publié une liste des substances interférant avec le dosage.

REACTIF ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES

1. Matériel à base du laboratoire d'analyses médicales.
2. Eau déminéralisée pour la reconstitution du réactif.
3. REF 13970 et 13971 : Chlorure de Calcium 0,025 M non fourni (à commander REF 13965).
4. Plasma de contrôle normal et pathologique.

CALIBRATION (4)

Les résultats dépendent de la méthode utilisée. La validité des résultats dépend du type de matériel utilisé, du type de rapport volume réactif / volume spécimen et du contrôle de la température.

CONTROL E DE QUALITE

REF 13961	Plasma de Contrôle Taux 1	6 x 1 mL
REF 13962	Plasma de Contrôle Taux 2	6 x 1 mL
REF 13963	Plasma de Contrôle Taux 3	6 x 1 mL

(ou tout autre plasma de contrôle titre pour cette méthode)

- Programme externe de contrôle de la qualité.
- Il est recommandé de contrôler dans les cas suivants :
 - Au moins un contrôle par série.
 - Au moins un contrôle par 24 heures.
 - Changement de flacon de réactif.
 - Après opération de maintenance sur l'analyseur.
- Lors d'une valeur de contrôle se trouve des limites de confiance, appliquer les actions correctives suivantes :
 1. Repérer l'opération en utilisant le même plasma de contrôle.
 2. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, préparer un plasma témoin.
 3. Utiliser un autre flacon de réactif et répéter le test.
 4. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, contacter le service technique BIOLABO ou le revendeur local.

INTERVALLES DE REFERENCE (1) (6)

Les valeurs de référence varient en fonction du couple réactif - instrument et doivent donc être déterminées par chaque laboratoire. Chaque laboratoire doit également déterminer le temps témoin normal à partir d'un pool de plasmas de patients sains normaux. Le temps témoin normal est généralement inférieur à 35 secondes. Le TCA est normalement allongé chez le nouveau-né. Il réagit graduellement pour atteindre les valeurs de l'adulte vers 6 mois.

Traitements anticoagulants

Antithrombotiques K
Il est conseillé d'associer les résultats du TP à ceux du TCA. Sous traitement au long cours, les TCA obtenus sont de 45 à 80 secondes avec un rapport patient/témoin de 1,3 à 1,7.

Héparine
Héparinant un traitement correct donne des TCA compris entre 50 et 80 secondes avec un rapport patient/témoin de 1,5 à 2,5. Les conditions de la réalisation du test doivent être scrupuleusement respectées, notamment en raison des risques de contamination par les plaquettes. Le mode d'administration ainsi que la nature de l'héparine peuvent donner lieu à des variations.

PERFORMANCES

Etudes réalisées sur plasmas de contrôle (Coagulation BIO SOLEA)

Pré-étude	Taux	Précision	Taux	Précision	Taux	Précision	
N	Normal	Patholo	N	Normal	Patholo	Patholo B	
Moyenne	28,2	47,3	55,7	Moyenne	34,3	49,9	53,4
S.D. sec	0,17	0,53	1,22	S.D. sec	1,27	1,92	1,46
C.V. %	0,59	1,33	2,19	C.V. %	3,7	3,9	2,73

Comparaison avec réactif du commerce (méthode silica) :
46 plasmas sains entre 27 sec et 110 sec ont été testés avec les 2 réactifs sur BIO SOLEA :

y = 0,9528x + 2,1229 r = 0,9905

MODE OPERATOIRE

Technique manuelle ou semi automatique
Faire la moyenne de 3 tests par plasma de patient.
Procéder de même pour le pool de plasmas normaux (Témoin).
Prélever le Chlorure de Calcium 0,025 M REF 13965 (ou bien marie à 37°C). Distribuer dans des tubes suivant les indications du libéau. Homogénéiser fréquemment le réactif BIO CK pendant la durée de l'utilisation.

BIO-CK homogénéisé.	0,1 mL
Plasma	0,1 mL
Agiter, incliner exactement 3 minutes à 37°C.	
CaCl ₂ 0,025 M à 37°C.	0,1 mL
Déclencher le chronomètre simultanément et noter le temps de coagulation.	

Technique pour appareil automatique

Homogénéiser le réactif BIO CK avant utilisation et fréquemment pendant la durée de l'utilisation. Se reporter aux instructions du fabricant de l'instrument.

CALCUL (6)

Le résultat peut être exprimé :

- En secondes (temps du patient, temps du témoin)
- Par le rapport temps du patient/temps du témoin.

REFERENCES

- (1) - Clinical Guide to Laboratory Test, 4th Ed. N.W. THIEZ (2003) p.46-47
- (2) - YOUNG D.S., Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 4^e Ed. (1995) p.3-47 à 3-48
- (3) - 6th W.N. Alton H.G., Nature, 1954, 724, 807-807
- (4) - 6th W.N. Alton H.G., Nature, 1952, 702, 38-43-401
- (5) - Meyer N., Kmetz L., Conrad J., Samraoui M., Act. Pharm. 50k. Clin. 1981, 1, 61-65

Annexe5

1.01424.0100
1.01352.0025

Microscope

May-Grünwald en solution d'éosine-bleu de méthylène Eosine-bleu de méthylène selon May-Grünwald

Coloration de frottis sanguins et de moelle osseuse et matériel clinico-cytologique



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Principe

La couleur typique des noyaux, principalement rouge violet, repose sur l'interaction entre l'éosine G et un complexe ADN azur B. Les deux colorants forment un complexe. L'intensité de la coloration dépend de la teneur en azur B et du rapport azur B- éosine G. Le résultat de la coloration peut être influencé par divers facteurs comme le pH de la solution et de la solution tampon, les substances tampons, le temps de coloration et de fixation.

Matériel

Frottis sanguins et de moelle osseuse séchés à l'air mais aussi matériel clinique de cytologie comme sédiments urinaux, crachats, ponctions-biopsies à l'aiguille fine, empreintes, liquides de lavage.

Réactifs

Art. n° 1.01424 May-Grünwald en solution d'éosine-bleu de méthylène	100 ml,
	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. n° 1.06009 Méthanol p.a.	1 l, 2,5 l
Art. n° 1.09466 Comprimés tampon selon Weise pH 7,2 (100 comp.)	1 emballage
Art. n° 1.11374 Comprimés tampon selon Weise pH 6,6 (100 comp.)	1 emballage
Art. n° 1.01352 Eosine-bleu de méthylène selon May-Grünwald	25 g, 100 g
Art. n° 1.09204 Azur éosine-bleu de méthylène selon Giemsa en solution	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l

Préparation

1. Solution tampon

Dissoudre 1 comprimé tampon* dans 1 l d'eau distillée.
*1.11374 ou 1.09466 selon le résultat souhaité de la coloration

2. Solution de May-Grünwald diluée pour la coloration manuelle

Diluer 30 ml de solution éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald avec 150 ml d'eau distillée et ajouter 20 ml de solution tampon.

3. Solution de May-Grünwald diluée pour la coloration dans le MIRASTAINER®

Ajouter lentement 30 ml de solution tampon et 220 ml d'eau distillée à 50 ml de solution d'éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald, mélanger et laisser reposer 10 min.

4. Solution d'éosine-bleu de méthylène selon May-Grünwald à partir de colorant

Dissoudre 0,25 g d'éosine-bleu de méthylène de May-Grünwald dans 100 ml de méthanol en chauffant légèrement dans un bain-marie à 60 °C, agiter pendant 1 h, laisser reposer 24 h et filtrer.

5. Solution de Giemsa diluée pour la coloration manuelle

Diluer 10 ml de solution azur-éosine-bleu de méthylène de Giemsa avec 190 ml de solution tampon, bien mélanger, laisser reposer 10 min et filtrer si nécessaire.

Mode opératoire

Frottis séchés à l'air

Banc de coloration

Solution-mère de May-Grünwald	3 min
Ajouter la solution tampon (1 ml), mélanger, coloration	6 min
Rincer avec une solution tampon	
Sécher	

Cuve à coloration

Solution-mère de May-Grünwald	3 min
-------------------------------	-------

Solution de May-Grünwald diluée	6 min
Laver avec une solution tampon	2 x 1 min
Sécher	

Coloration dans le MIRASTAINER®

Réactifs	Durée	Station	Dip
Solution-mère de May-Grünwald	3 min	2	on
Solution de May-Grünwald diluée	6 min	3	on
Solution tampon	1 min	4	on
Eau courante (laver)	2 min	5	on
Sécher	3 min	6	-

Coloration de Pappenheim

Coloration avec la solution de May-Grünwald et la solution de Giemsa

Banc de coloration

Recouvrir le frottis avec 1 ml de solution de May-Grünwald	3 min
mélanger avec 1 ml de solution tampon et colorer	3 à 5 min
recouvrir avec la solution de Giemsa diluée, colorer	15 à 20 min
Rincer avec une solution tampon	
Sécher	

Cuve à coloration

Solution de May-Grünwald	3-5 min
Solution de coloration de Giemsa diluée	15 à 20 min
Rincer avec une solution tampon	2 x 1 min
Sécher	

Résultat avec un tampon phosphate selon Weise pH 6,8

Type de cellule	Solution de May-Grünwald	Coloration de Pappenheim
Noyaux cellulaires	rouges à violets	pourpres à violets
Lymphocytes	plasma bleu	plasma bleu
Monocytes	plasma bleu pigeon	plasma bleu pigeon
Granulocytes neutrophiles	granules violet clair	granules violet clair
Granulocytes éosinophiles	granules rouges tulle à brun rouge	granules rouge tulle à violet foncé
Granulocytes basophiles	granules violet foncé à noirs	granules violet foncé à noirs
Thrombocytes	violet	violet
Erythrocytes	rougeâtres	rougeâtres

Remarque

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux. Pour la filtration de la solution utiliser un papier filtre de type « passage rapide ».

Préparation des échantillons

Tous les échantillons doivent être traités conformément aux règles de l'art. Tous les échantillons doivent être clairement identifiés. Utiliser des instruments appropriés pour le prélèvement d'échantillons et la préparation, respecter les instructions du fabricant pour l'emploi/l'utilisation.

Diagnostic

Les diagnostics ne doivent être effectués que par des personnes autorisées et entraînées. Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées. Chaque étape doit être effectuée sous contrôle, afin d'exclure toute possibilité de résultat erroné. Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes reconnues.

Stockage

Stocker le colorant entre + 5 °C et + 30 °C, la solution de coloration entre + 15 °C et + 25 °C. Utiliser la solution et le colorant jusqu'à la date de péremption indiquée.

Stabilité

Après la première ouverture du flacon, conserver entre + 5 °C et + 30 °C ou entre + 15 °C et + 25 °C, utiliser jusqu'à la date de péremption. Tenir les flacons toujours bien fermés.

Remarques sur l'utilisation

Réservé à une utilisation professionnelle.

Pour éviter les erreurs, la coloration doit être effectuée par un personnel qualifié. Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à l'assurance de la qualité. Utiliser des microscopes équipés conformément au standard.

Protection contre les infections

Veiller impérativement à une protection efficace conformément aux directives des laboratoires.

Consignes d'élimination

Les solutions usagées et celles dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets spéciaux, en respectant les directives locales relatives à l'élimination des déchets.

Outre la reprise de produits usagés ou périmés par l'intermédiaire de son service de « rétrologistique », Merck propose également une assistance technique pour des solutions d'éliminations locales.

Réactifs auxiliaires

Art. n° 1.04689	Huile d'immersion	100 ml, 500 ml
Art. n° 1.15577	Huile d'immersion selon ISO 6036 modifiée	100 ml
Art. n° 1.07961	néo-Entellan®	100 ml, 500 ml
Art. n° 1.00974	Ethanol dénaturé avec 1 % d'éthylméthylcétone pour analyse	1l, 2,5l
Art. n° 1.00963	Ethanol absolu p.a. ACS, ISO	1l, 2,5 l
Art. n° 1.06661	Xylène p.a. ACS, ISO	1l, 2,5 l

Classification des matières dangereuses

Art. n° 1.01424,
Art. n° 1.01352

Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité.
La fiche de données de sécurité de Merck est disponible sur Internet et sur demande.

Composants principaux des produits

Art. n° 1.01424		
C.I. 52015		0,7 g/l
C.I. 45380		0,5 g/l
contient du CH ₃ OH		
1l =		0,79 kg
Art. n° 1.01352		
C.I. 52015 + Azur		51,6 %
C.I. 45380		48,4 %

Status: Février 2006

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Allemagne, Tél. : +49 6151 72 0,
www.merck.de

Annexe6

Tableau.- Matrice de corrélation (R: rendement massique, Ot: oses totaux, On: oses neutres, Oa : oses acides, TCA: test de céphaline activée, Ca ph: activité hagocytaire, , Ac B : activité anti bactérienne ,DPPH: test 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle, ABTS: test à l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique, FRAP: test de Test de Ferric Reducing Antioxydant Power).

	R	Ot	On	Oa	TCA	Ca ph	Ac B	DPPH	ABTS	FRAP
R	1.000	0.550	0.478	0.959	0.236	-0.153	-0.073	0.826	-0.268	-0.220
Ot	0.550	1.000	0.997	0.292	-0.682	-0.910	-0.873	-0.018	-0.952	-0.936
On	0.478	0.997	1.000	0.212	-0.741	-0.941	-0.911	-0.101	-0.974	-0.962
Oa	0.959	0.292	0.212	1.000	0.500	0.132	0.211	0.951	0.014	0.064
Tc	0.236	-0.682	-0.741	0.500	1.000	0.924	0.952	0.743	0.873	0.896
Ca ph	-0.153	-0.910	-0.941	0.132	0.924	1.000	0.997	0.432	0.993	0.998
Ac ph	-0.073	-0.873	-0.911	0.211	0.952	0.997	1.000	0.503	0.980	0.989
DPPH	0.826	-0.018	-0.101	0.951	0.743	0.432	0.503	1.000	0.322	0.369
ABTS	-0.268	-0.952	-0.974	0.014	0.873	0.993	0.980	0.322	1.000	0.999
FRAP	-0.220	-0.936	-0.962	0.064	0.896	0.998	0.989	0.369	0.999	1.000

Résumé

L'objectif de notre étude est d'extraire et évaluer les activités biologiques des polysaccharides des noyaux de dattes Ghars après avoir effectué l'analyse des différentes fractions polysaccharidiques hydrosolubles (PNDH) et alcalisolubles à 0,5M (PNDA 0,5) et à 4M (PNDA 4). Les rendements massiques des extraits des polysaccharides sont de 0,87% pour PNDH, 6,43% pour PNDA 0,5 et 8,5% pour PNDA 4. Les teneurs en oses totaux sont de 51,6% pour PNDH, 45,4% pour PNDA 0,5, et 71,7% pour PNDA 4. Les oses neutres représentent les constituants majeurs, varient de 37,36% à 67,65% pour PNDA 0,5 et PNDA 4 respectivement. Les protéines représentent les plus faibles teneurs se situant entre 0,038% et 1,07%. L'analyse des hydrolysats des trois extraits à l'aide de la chromatographie sur couche mince a montré que PNDH est constitué de galactose, de mannose, de xylose, de l'arabinose, et de l'acide glucuronique. Les polysaccharides alcalisolubles (PNDA 4 et PNDA 0,5) sont constitués de xylose, de l'arabinose de mannose et d'acide glucuronique. L'activité anticoagulante a montré des temps de coagulation de 31,5s pour PNDA 4 et PNDH, tandis que, le PNDA 0,5 à une forte activité anticoagulante, il montre un temps de coagulation plus allongé soit 300s. Le suivi des tests d'activité anticoagulante de PNDA 0,5 montre un TT de 100s pour toutes les concentrations et un TP de 29,6s pour une concentration de 75% de l'extrait. Les activités antioxydants testées pour les trois extraits sont 41,8 $\mu\text{mol/g}$ (PNDH), 11,4 $\mu\text{mol/g}$ (PNDA 4), 75,6 $\mu\text{mol/g}$ (PNDA 0,5) pour une concentration de 1 mg/ml. Les capacités phagocytaires des leucocytes incubées avec les extraits polysaccharidiques sont entre 28 % à 41% pour PNDA 4 et PNDA 0,5 respectivement. L'activité antibactérienne des extraits PNDH et PNDA 4 vis-à-vis des souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* montre des zones d'inhibition allant de sont entre 1 mm jusqu'à et 6,5 mm pour *Staphylococcus aureus* dans les extraits PNDH et PNDA 4.

Mots clés : Noyaux de dattes, polysaccharides, hydrosolubles, alcalisolubles, activités biologiques.

summary

The objective of our study is to extract and evaluate biological activities of polysaccharides Ghars date seeds have made after analyzing various water-soluble polysaccharide fractions (PNDH) and alkali-soluble 0.5M (PNDA 0.5) and 4M (PNDA 4). The mass yields extracts polysaccharides are 0.87% for PNDH, 6.43% for PNDA 0.5 and 8.5% for PNDA 4. The contents of total sugars are 51.6% for PNDH, 45, PNDA 0.5 4%, and 71.7% for PNDA 4. The neutral sugars are the major components, ranging from 37.36% to 67.65% for PNDA 0.5 and PNDA 4 respectively. Proteins represent the lowest levels of between 0.038% and 1.07%. Analysis of hydrolysates of the three extracts using the thin layer chromatography showed that PNDH consists of galactose, mannose, xylose, arabinose, and glucuronic acid. The alkali-soluble polysaccharides (PNDA 4 and PNDA 0.5) consist of xylose, arabinose mannose and glucuronic acid. The anticoagulant activity showed 31,5s clotting time for PNDA 4 and PNDH, while the PNDA 0.5 to a strong anticoagulant activity, it shows a more elongated clotting time is 300s. The monitoring of anticoagulant activity tests of PNDA 0.5 shows a TT 100s for all concentrations and a TP of 29,6s to a concentration of 75% of the extract. Antioxidant activities tested for the three extracts were 41.8 $\mu\text{mol/g}$ (PNDH) 11,4 $\mu\text{mol/g}$ (PNDA 4), 75.6 $\mu\text{mol/g}$ (PNDA 0.5) to a concentration of 1 mg / ml. Phagocytic capacity of leukocytes incubated with polysaccharide extracts are between 28% to 41% for PNDA 4 and PNDA 0.5 respectively. The antibacterial activity of extracts PNDH and PNDA 4 for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* showing inhibition zones are from between 1 mm to 6.5 mm for *Staphylococcus aureus* in PNDH extracts and PNDA 4.

Keywords: dates seeds, polysaccharides, water-soluble, alkali-soluble, biological activities.

الملخص

إن الهدف من دراستنا هذه هو استخلاص وتثمين النشاطات الحيوية الناتجة عن مستخلصات مختلف أنواع متعدد السكريات لنوى التمر من فصيلة الغرس وذلك بعد تحليل مختلف قطع متعدد السكريات منها القابل للذوبان في الماء (PNDH) والقابلة للذوبان في الوسط القاعدي ذات 0,5 مول (PNDA 0,5) وكذلك ذات 4 مول (PNDA 4). المرود الكتلي للمستخلصات السكرية كان 0,87% لـ PNDH و 6,43% لـ PNDA 0,5 و 8,5% لـ PNDA 4. ولقد كانت قيمة السكريات الكلية في كل مستخلص 51,6% بالنسبة لـ PNDH، و 45,4% لـ PNDA 0,5، و 71,7% لـ PNDA 4. أما السكريات المعتدلة فقد شكلت المكون الأساسي، ولقد تراوحت بين 37,36% و 67,65% لكل من PNDA 0,5 و PNDA 4 على الترتيب. البروتينات مثلت اقل النسب حيث تراوحت بين 0,038% و 1,07%. التحليل الكيميائي للمركبات السكرية البسيطة بعد الاماهة للمستخلصات الثلاث باستعمال طريقة الكروماتوغرافي على شرائح ورقية أظهرت أن PNDH يتكون من الغلوكوز والمانوز والاكسيلوز والارابينوز و حمض الغليكورونيك. أما متعددات السكريات ذات القابلية للذوبان في الوسط القاعدي (PNDA 0,5 و PNDA 4) فقد تشكلت أساسا من الاكسيلوز والارابينوز والمانوز والحمض الغليكورونيك. النشاط المضاد للتخثر للدم أعطى زمنا للتخثر قدر بـ 31,5 ثانية لـ PNDA 4 و PNDH، بالمقابل فإن PNDA 0,5 فقد كان النشاط المضاد للتخثر عالي، وكان وقت أكثر من سابقه حيث قدر بـ 300 ثانية، وفي إطار النشاط المضاد للتخثر قمنا باختبار المستخلص PNDA 0,5 بقياس TT حيث أعطى 100 ثانية لكل التركيز المستعملة و أعطى 29,6 ثانية بالنسبة لـ TP ذات التركيز 75% من المستخلص. أما فيما يخص النشاط المضاد للأكسدة من اجل تركيز ذو 1 mg/ml من كل مستخلص فقد أنت كما يلي:

41,8 μmol/g (PNDH)، 11,4 μmol/g (PNDA 4)، 75,6 μmol/g (PNDA 0,5). التحفيز البلعمي للخلايا المناعية من خلال المستخلصات المحضرة فقد تراوح بين 28% و 41% لكل من PNDA 4 و PNDA 0,5 على التوالي. أما النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصين PNDH و PNDA 4 لكل من الأنواع *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* فقد أعطت مناطق عزل بين 1mm و 6,5mm لـ *S.aureus* لكل من المستخلصين PNDH و PNDA 4 على التوالي.

الكلمات المفتاحية: نوى التمر، متعدد السكريات، قابلية الذوبان في الماء، قابلية الذوبان في الوسط القاعدي، النشاط البيولوجي.