



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

قسم : الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie.

Option : Analyse Protéique et Santé

Intitulé :

L'activité inhibitrice des composés phénoliques de *Dictyopteris polypodioides* sur l' α -amylase salivaire libre et immobilisée *in vitro*

Présenté et soutenu par :

➤ *BOUDJEDOUR Nour El Houda*

Le : 27/06/2016

➤ *BERTIL Aicha*

Jury d'évaluation :

Président du jury : *NECIB Y.*

Professeur - UFM Constantine.

Rapporteur : *NOUADRI T.*

M C A - UFM Constantine.

Examinatrice : *BENNAMOUN L.*

M A A - UFM Constantine.

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciement

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et nous vive connaissance à notre honorable encadreur NOUADRI. T pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous accordé pour réaliser ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur NECIB. Y professeur à l'université de Constantine qui nous fait l'honneur d'être le président de ce jury.

Nous remercions de même l'enseignante BENNAMOUN. L pour avoir accepté d'être un membre de jury.

En fin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents, qui peuvent être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte ses fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de vous.

Mon cher frère et ma chère sœur : Saïf et Taouba qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Toutes les personnes qui sont très chers à mon cœur :

Ma grand-mère et mon-grand père

Mes oncles : Kamel et Azzedine.

Toutes mes amies pour leurs encouragements et leurs soutiens.

BOUDJEDOUR Nour el Houda

اهداء

الى روعي ذاكرتي ومذكراتي
اليك انت والدتي صديقتي حبيبتي وحياتي
الى والدي سندي ومساندتي
الى قرت عيني صغري الذي لم أنجب بعد اخي العزيز
الى الطيبة و الاخلاص اختي
الى كل من ساندني وآمن بي
الى من حفرت اسمائهم وذكرياتهم في قلبي

برتييل عائشة

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : les algues	2
1-1-les algues verts (les Chlorophytes)	2
1-2-les algues rouges (les Rhodophytes).....	2
1-3-les algues brunes (Phéophycées).....	2
1-4-Les compositions chimiques des algues brunes.....	3
➤ Les polysaccharides.....	3
➤ Le mannitol	3
➤ Les phlorotanins	3
1-5 L'utilisation des algues brunes	4
1-6 <i>Dictyopteris polypodoïdie</i>	4
Chapitre II : les composés phénoliques.....	6
2-1 Définition.....	6
2-2 - Les principales classes de composés phénoliques.....	6
2-2-1 les flavonoïdes	7
2-2-2 Les tanins.....	8
➤ Les tanins condensés.....	8
➤ Les tanins hydrolysables.....	9
➤ Les phlorotanins	9
2-3- Rôle des composés phénoliques comme inhibiteurs enzymatiques	10
➤ 3-1- les flavonoïdes comme inhibiteurs enzymatiques	10
➤ 3-2- les tanins comme inhibiteurs enzymatiques	10
Chapitre III : α-amylase salivaire.....	11
3-1 Différente type de l' α -amylase	11
3-2 Généralités sur l' α -amylase.....	11
3-3 Nomenclature	12
3-4 Structure et mode d'action	12
3-5 Différentes origines d' α -amylase	13
3-6- Caractéristiques générales	13
➤ Température optimale.....	13
➤ pH optimal	14
3-7 Application industrielles	14
3-8 Activateurs et inhibiteurs de l' α -amylase	14
3-9 Cinétique enzymatique de l' α -amylase	16
3-10 Intérêt de l'inhibition de l' α -amylase	17

Chapitre VI : Immobilisation.....19

4-1- Définition d'immobilisation des enzymes	19
4-2- Méthodes d'immobilisation des enzymes	19
a. Méthodes de confinement (ou inclusion).....	19
b. Méthodes avec mise en jeu de liaisons.....	20
4-3-Intérêt des enzymes immobilisées	20
4-4- Inconvénients des enzymes immobilisées	21
4 -5-Caractéristiques et propriétés des alginates	21
4-6- Application de l'alginate de sodium	22
4-7- Quelques enzymes immobilisés par les billes d'alginate	23

Matériels et méthodes

1- Échantillonnage.....	24
2- Préparation des extraits des algues	25
2-1 Extraction.....	25
2-2 Dosage des polyphénols.....	26
3- Préparation des extraits enzymatiques.....	26
3-1 Préparation de la salive.....	26
3-2 Dosage de l'activité d' α - amylase salivaire	27
4- L'immobilisation.....	30

Résultats et discussion

1- Extraction des polyphénols.....	32
➤ 1-2 Teneur d'extraction des polyphénols.....	32
➤ 2-2 Rendement d'extraction.....	33
2- L'activité inhibitrice des extraits des algues	34
2-1 Dosage de l'activité enzymatique d' α -amylase en absence d'inhibiteur	
2-1 Dosage de l'activité enzymatique d' α -amylase en présence d'inhibiteur	
2-3 Détermination de type d'inhibition d' α -amylase salivaire par les deux inhibiteurs (I_1) et (I_2)	
3- L'immobilisation.....	40

Liste des figures

Figure 1: *Dictyopteris polypodioides*

Figure 2 : Classification des polyphénols

Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes

Figure 4 : La structure monomérique et dimérique des tanins condensés

Figure 5 : Acide gallique, acide éllagique et structures des gallotanins et des ellagitanins

Figure 6 : Structure des phlorotanins

Figure 7 : Structure de l' α -amylase humaine présente les trois domaines

Figure 8: La représentation de Lineweaver-Burk $1/V = 1/[S] + 3$ (les 3 types d'inhibition)

Figure 9 : Différentes méthodes d'immobilisation des enzymes

Figure 10 : Structures des monomères constitutifs des alginates

Figure 11: Structure chimique de la chaîne d'alginate de sodium

Figure 12: Site d'algue étudiées

Figure 13 : *Dictyopteris polypodioides*

Figure 14 : Protocole d'extraction des composés phénoliques par : a- Macération ; b- Broyage

Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Figure 16: Courbe d'étalonnage du maltose

Figure 17 : Protocole de dosage de l'activité amylasique en présence et en absence d'inhibiteur.

Figure 18: Protocole de dosage de l'activité enzymatique en présence des différentes concentrations de l'extrait poudre acétone /eau I₂.

Figure 19 : Protocole d'immobilisation a- d' α amylase salivaire et b- de l'extrait I₂ avec les billes d'alginates

Figure 20 : La préparation des billes d'alginate

Figure 21: Les billes d'alginate

Figure 22 : Rendement d'extraction des polyphénols avec différents solvants

Figure 23 : La cinétique de l' α -amylase

Figure 24 : Représentation de Lineweaver-Burk d' α -amylase

Figure 25 : Taux d'inhibition de l'activité d' α -amylase en présence des différentes concentrations de chaque extrait.

Figure 26 : Taux d'inhibition d' α -amylase en fonction de différentes concentrations de I₂

Figure 27 : L'activité enzymatique en présence et en absence d'inhibiteur.

Figure 28: Type d'inhibition d' α -amylase en présence des deux extraits I₁ et I₂

Figure 29 : L'activité enzymatique en présence et en absence d'inhibiteur (libre et immobilisé)

Liste des tableaux

Tableau 1: les principaux caractéristiques des algues brunes

Tableau 2 : Quelques exemples d'utilisation des algues dans les domaines de la santé

Tableau 3 : Classification de *Dictyopteris polypodioides*

Tableau 4: Les enzymes amylolytiques

Tableau 5: Différentes nomenclatures d' α -amylase.

Tableau 6 : Quelques propriétés des α -amylases

Tableau 7 : Différentes applications des α -amylases

Tableau 8: Activateurs organique d' α -amylase salivaire

Tableau 9 : Inhibiteurs organique d' α -amylase salivaire

Tableau 10 : Autre activateurs et les inhibiteurs organique et inorganique d' α -amylase

Tableau11: Répartition de la production mondiale des alginates (en tonnage) entre les différents secteurs industriels et exemples d'applications

Tableau 12: Les enzymes immobilisé par les billes d'alginate

Tableau 13 : Les quantités des polyphénols totaux dans les extraits de *Dictyopteris polyploïdies*

Tableau 14: Type d'inhibition et constante d'inhibition des 2 extraits I_1 et I_2

ABREVIATIONS

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

DNSA : Acide 3,5-dinitrosalicylique

EI : Complexe enzyme inhibiteur

EGCG : Epigallocatechine gallate

ESI : Complexe enzyme substrats inhibiteur

HbA1c : Hémoglobine glyquée

IFREMER : L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine

Ki: Constante d'inhibition

Km : Constante de Michaelis

p/v : Poids par volume

Vmax : Vitesse maximal

Introduction :

Les algues marines constituent une bio ressource importante, et grâce à leur richesse en substances : minéraux, polysaccharides, acides aminés dérivés, acides gras stérols, et polyphénols (ou composés phénoliques) elles sont utilisées dans l'alimentation et également, en médecine et en cosmétologie.

Les algues brunes possèdent des composés chimiques aromatiques (composés phénoliques) uniques dans le monde végétal, nommés phlorotanins. Du fait de leur rôle d'antioxydants naturels, ces composés suscitent beaucoup d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives, et aussi dans le traitement de certaines troubles métaboliques comme l'obésité et le diabète qui sont contrôlés par une régulation enzymatique, à savoir les lipases et les amylases salivaires et pancréatiques.

L'inhibition de l' α -amylase bloque le processus de la dégradation des oligosaccharides, stoppant la digestion des carbohydrates, et permettant ainsi de contrôler le niveau du glucose dans le sang chez les diabétiques. Cet effet des inhibiteurs d' α -amylases salivaires est bénéfique pour la santé qui attire l'attention de plusieurs chercheurs et des firmes pharmaceutiques pour développer et enrichir la classe thérapeutique des médicaments anti diabète type II à partir des polyphénols. Les molécules extraites à partir des algues brunes sont capables de favoriser une réduction dans le taux d'absorption du glucose et par conséquent une diminution des niveaux de glucose plasmatique et abaissement de l'hyperglycémie et de l'obésité.

Les objectifs de cette étude, est l'évaluation de :

- Méthodes d'extraction des composés polyphénoliques avec des différents solvants.
- L'activité inhibitrice de l'extrait phénolique d'algue *Dictyopteris polypodioides* sur l' α -amylase salivaire.
- L'immobilisation de l' α -amylase salivaire et de l'inhibiteur dans les billes d'alginate

I- Les algues

Les algues marines forment un monde à part. Premiers végétaux apparus sur la terre il y a environ 3,5 milliards d'années, elles sont à l'origine de tous les autres végétaux qui vont ensuite se développer et se diversifier ; leur capacité à produire de l'oxygène a permis le développement de la vie. Aujourd'hui l'IFREMER estime entre 200 000 et 1 million le nombre d'espèces d'algues existant dans le monde. Leur diversité, leur abondance fait la richesse des océans en procurant nourriture, habitat et protection à tout un ensemble de poissons, crustacés, larves etc (1).

Les trois grandes lignées d'algues pluricellulaires, brunes, rouges et vertes, sont majoritairement présentes en milieu marin, mais certaines familles ont aussi conquis les eaux douces (Creis, 2015).

1-1-Les algues vertes (les Chlorophytes)

Elles sont comme tous les groupes suivants des eucaryotes à noyau bien individualisé; elles possèdent des plastes d'un vert franc contenant de la chlorophylle a et b associée à de l' α et β carotène et des xanthophylles identiques à celles des plantes supérieures. Les réserves sont constituées d'amidon intraplastidial colorable en bleu par la solution iodo-iodurée.

Les formes nageuses possèdent en général deux ou quatre flagelles de même taille. Les Chlorophytes qui groupent environ six cents genres et plus de huit mille espèces dont les quatre cinquièmes environ vivent en eau douce (Feldmann, 1966).

1-2-Les algues rouges (les Rhodophytes)

Elles sont le plus souvent des algues marines et leur présence dans les eaux douces se limite à une trentaine de genres peu fréquents. Leurs pigments sont constitués par des chlorophylles a et d, des α et β carotènes, des xanthophylles et des biliprotéines (Phycoérythrine et Phycocyanine).

Les réserves sont constituées de rhodamylon ou (amidon floridéen), un polymère (glucane ramifié) de structure intermédiaire entre le glycogène et l'amylopectine et toujours extraplastidial prenant une teinte rougeâtre au contact de l'iode. En eau douce, la couleur des Rhodophytes est bleu-vert, rouge-violacé, très souvent vert sale ou vert noirâtre. Il n'existe pas de formes flagellées (Feldmann, 1966).

1-3-Les algues brunes (les Phéophycées)

Elles sont des organismes marins multicellulaires photosynthétiques évolutivement éloignés des plantes terrestres, avec une paroi cellulaire distinctive. Ils disposent d'hydrates de carbone partagés avec des plantes (cellulose), les animaux (polysaccharides sulfatés contenant du fucose , FCSPs) ou des bactéries (alginates) (Feldmann, 1966).

L'architecture de la paroi cellulaire chez les algues brunes, et contribuent à la compréhension des relations structure-fonction des principaux composants de la paroi cellulaire Enzymatique réticulation des alginates par des phénols peut régler le renforcement de la paroi, et des polysaccharides sulfatés peut jouer un rôle clé dans l'adaptation au stress osmotique. (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014)

Tableau 1: les principaux caractéristiques des algues brunes (Raven *et al.*, 2014)

Embranchement	Nombre	Pigments	Réserves glucidiques d'espèces photo-synthétique	Flagelles	Composition de la paroi cellulaire	Habitat
Algues brunes (phéophycées)	1500	Chlorophyles a et c ,caroténoïdes , surtout fucoxanthine	Laminarine, mannitol (transport)	2 : uniquement dans les cellules reproductrices ; latéraux ; plumeux à l'avant, lisse à l'arrière	Cellulose enrobée dans une matrice d'algine mucilagineuse ; par fois des plasmodesmes	Presque toutes marines

1-4-Les compositions chimiques des algues brunes

➤ Les polysaccharides

La paroi des algues brunes est principalement composée d'une partie cristalline, essentiellement de la cellulose et de polysaccharides anioniques : acide alginique, alginate (polysaccharides carboxylés, sels d'alginate) et fucanes, fucoïdanes (polysaccharides sulfatés) qui constituent plus de 40% du poids sec du thalle (Meslet-Cladière *et al.*, 2013).

➤ Le mannitol

La synthèse du mannitol est effectuée à partir de fructose-6-phosphate directement issu de la photosynthèse. Ce photosynthétat a été montré comme pouvant être impliqué dans l'osmorégulation et permettant ainsi une tolérance importante des algues brunes aux variations de salinité (Creis, 2015).

➤ Les phlorotannins

Polymères du phloroglucinol, sont des composés phénoliques (CP) uniquement retrouvés chez les algues brunes (Phéophycées). Ces métabolites présentant des activités anti-oxydantes, interviendraient dans la formation de la paroi (Meslet-Cladière *et al.*, 2013 ; Creis, 2015).

1-5-L'utilisation des algues brunes

La plupart des espèces d'algues brunes sont des alginophytes, mais pour constituer une matière première intéressante pour l'industrie, il faut que la teneur soit suffisamment importante (supérieure à 18% en masse sèche) (Belattmania *et al.*, 2015).

Les algues brunes son dans les domaines de la santé selon leur composition (tableau 2).

Tableau 2 : Quelques exemples d'utilisation des algues dans les domaines de la santé (Guezennec and Debitus, 2006)

Activités biologiques	Actifs
Antibiotique	Composées aromatiques, aliphatique phénoliques, terpènes polysaccharides Oligosaccharides
Anti-coagulant /Anti-thrombotique	Oligosaccharides sulfatés (fucanes)
Anti-inflammatoire	Polysaccharides, Oligosaccharides
Anti-tumorale	Polysaccharides, Oligosaccharides
Anti-ulcère	Polysaccharides, Oligosaccharides (alginate,carraghénanes)
Anti-viral (Herpés,HIV)	Polysaccharides (fucanes, carraghénanes , galactomannanes,agaranes)
Hypocholestérémiant	Iode, Polysaccharides
Traitement contre le goitre	Iode
Vermifuge	Acide Kainique

1-6-*Dictyopteris polypodioides*

Thalle plat et ressemblant à une feuille, à 300 mm de long et 20-30 mm de large; frondes d'olive à brun-jaune, translucide, et ±régulièrement dichotomique fourchue avec une nervure proéminente étendant aux sommets.

Les cellules périphériques ou assimilatrices de la talle ont été décrites comme 45 um de longueur et 30 nm de largeur. Les mesures des cellules de la nervure médiane ou médullaires ont été montrées comme 18 um de long et 25 um large et celles des cellules parenchymateux ou corticales que 45 mm de longueur et 40 um de largeur. (Abbas et Shameel, 2012).

LES ALGUES

Tableau 3 : Classification de *Dictyopteris polypodioides*

Selon (Lamouroux, 1809)

Classification
Empire : <i>Eucaryotes</i>
Uni : <i>Chromista</i>
Phylum : <i>ochrophyta</i>
classe : <i>Phaeophyceae</i>
Sous-Classe : <i>Dictyotophycidae</i>
Ordre : <i>Dictyotales</i>
Famille : <i>Dictyotaceae</i>
Tribe : <i>Zonarieae</i>
Genre : <i>Dictyopteris</i>



Figure 1: *Dictyopteris polypodioides*

II- Les composés phénoliques

2-1 - Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes, allant de molécules phénoliques simples de faible poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins. (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Ces composés montrent des activités anti-inflammatoires, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar Ali *et al.*, 2007), et antioxydants (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique comme inhibiteurs enzymatiques (Bahorun, 1997 ; Cetkovic *et al.* , 2008).

2 -2- Les principales classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (Herbert, 1989; Macheix *et al.*, 2005; Beta *et al.*, 2005). Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant de simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches.

Une classification de ces substances a été proposée par Harbone en 1980 (Fig. 2). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

- ✓ Les acides phénoliques
- ✓ Les flavonoïdes.
- ✓ Les tanins.

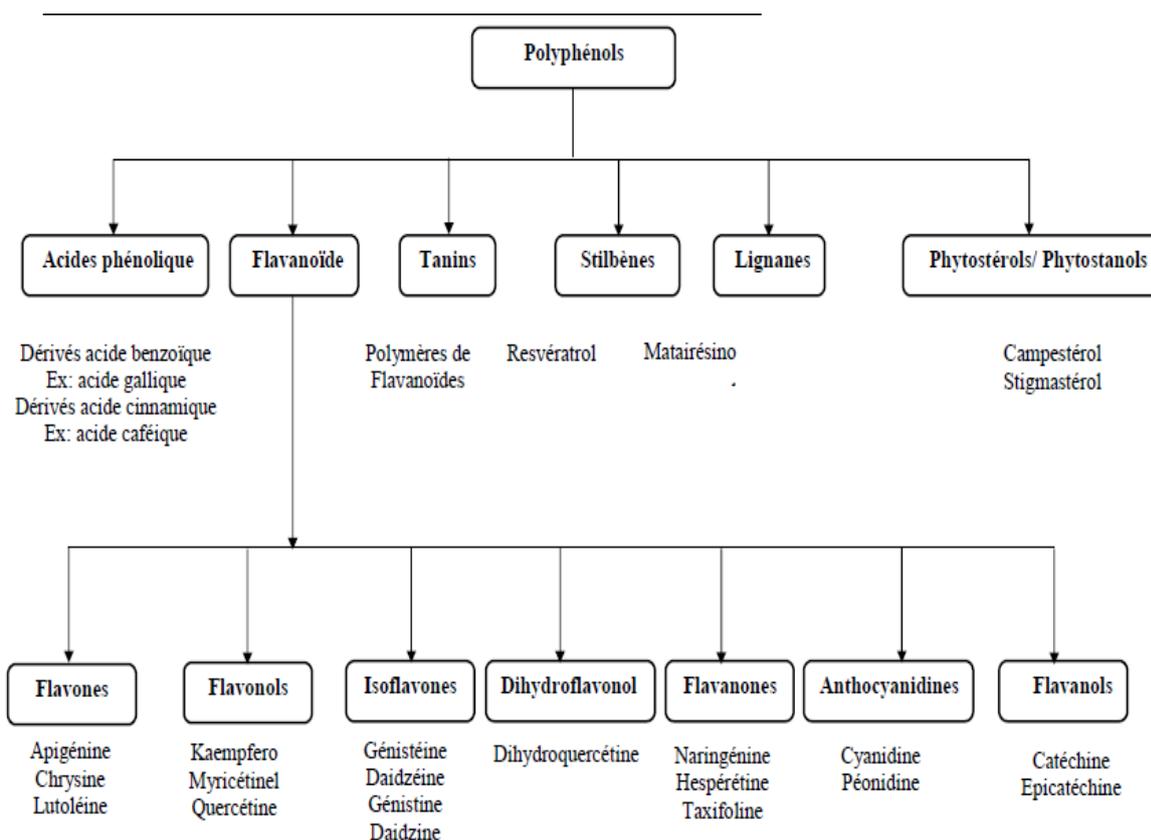


Figure 2 : Classification des polyphénols (Harbone, 1980)

2-2-1- les flavonoïdes :

Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois (Gabor, 1988).

➤ la structure chimique et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (Dacosta, 2003).

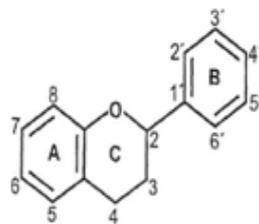


Figure 3 : structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003).

Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation et d'insaturation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3. Ces composés ont une très grande importance biologique et technologique: les anthocyanes pigments rouge ou bleu, les flavones et les flavonols de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (Macheix *et al.*, 2005; Medic-saric *et al.*, 2004).

2-2-2 -Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques de catéchine (Khababae *et al.*, 2001).

Ces composés, solubles dans l'eau, se caractérisent par leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, pour former avec eux des complexes stables. Ce sont des molécules assez volumineuses avec un poids moléculaire généralement compris entre 500 et 3000 Da (Khababae *et al.*, 2001).

➤ La structure chimique et classification

Du point de vue structural, les tanins constituent un groupe chimique hétérogène, avec des structures moléculaires variées. En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille de la molécule (Khababae *et al.*, 2001).

✓ Les tanins condensés

Nommés également proanthocyanidines, sont des oligomères et des polymères de flavonoïdes. Les plus connus sont les procyanidines qui sont des chaînes de ces composés, qui correspondent à des polymères de flavan-3ols, peuvent être répertoriés en différentes classes : les monomères, les dimères, les oligomères et les polymères (Fig. 4) (Haslam, 1975).

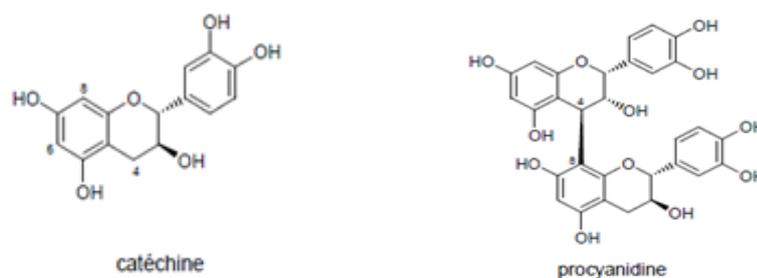


Figure 4 : la structure monomérique et dimérique des tanins condensés (Haslam, 1975).

✓ **Les tanins hydrolysables**

Ce sont des hétéropolymères possédant un noyau central constitué d'un polyol. Il s'agit souvent d'un D-glucose sur lequel les groupements hydroxyles sont, en partie ou en totalité, estérifiés avec l'acide gallique (cas des gallotannins) ou un dimère de l'acide gallique qui est l'acide hexahydroxydiphénique (cas des ellagitanins) (Haslam, 1975).

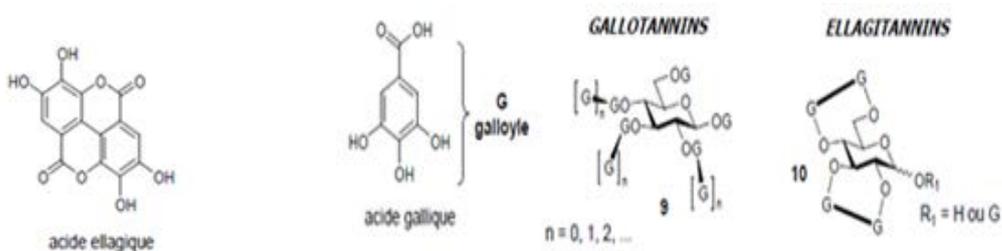
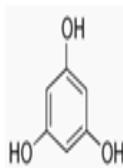


Figure 5 : Acide gallique, acide éllagique et structures des gallotannins et des ellagitanins.

Un troisième groupe de tanins nommé les phlorotannins, a été caractérisé chez diverses algues brunes. (Harborne , 1988).

✓ **Les phlorotannins**

Les phlorotannins sont isolés d'algues brunes, ils sont constitués d'oligomères et de polymères du phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) (Fig. 5)



unité monomérique de phloroglucinol

Figure 6 : Structure des phlorotannins (Jormalainen et al., 2004).

Les phlorotannins sont localisés au sein des cellules des algues brunes sous forme soluble et polaire, ainsi que dans la paroi cellulaire sous forme insoluble. La masse moléculaire des ces molécules varie entre 126 Da et 650 kDa. Il apparaît que la concentration en phlorotannins varie de façon considérable entre les espèces d'algues brunes (Phaeophyceae) de même qu'au sein d'une même espèce. (Jormalainen et al., 2004).

2-3- Rôle des composés phénoliques comme inhibiteurs enzymatiques

2-3-1- Les flavonoïdes comme inhibiteurs enzymatiques

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques, ils inhibent plusieurs enzymes intervenant dans divers mécanismes biologiques. Ils inhibent l'histidine décarboxylase, l'élastase, la hyaluronidase. En plus, les flavonoïdes inhibent la phosphodiesterase de l'AMPC. Ils peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhry *et al.*, 1995).

Quelques flavonoïdes sont des inhibiteurs efficaces de la biosynthèse des prostaglandines. Cet effet est dû à l'inhibition de certaines enzymes (lipoxigénase, phospholipase, cyclo-oxygénase) impliquées dans leur biosynthèse.

L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes est attribuée à leurs efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II (Formica et Regelson, 1995).

Beaucoup d'efforts ont été fait pour la recherche des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase, et les flavonoïdes ont un effet inhibiteur sur ses enzymes (Hodek *et al.*, 2002).

De nombreux agents sont susceptibles d'inhiber la réplication du rétrovirus du SIDA par une inhibition de la reverse transcriptase. Les flavonoïdes se sont montrés de bons inhibiteurs de cette enzyme (Spedding *et al.*, 1989).

2-3-2- Les tanins comme inhibiteurs enzymatiques

Les tanins sont des molécules biologiquement actives, douées d'activités pharmacologiques remarquables et des effets significatifs sur la santé humaine. La fixation des tanins avec les protéines engendrée l'inhibition de plusieurs enzymes (Okuda, 2005).

Le blocage de la 5-lipoxigénase, inhibition de l'enzyme de l'activation de la hyaluronidase, inhibition des topoisomérases, inhibition des protéines kinase C par les tanins éllagiques et les tanins complexes et inhibition de α amylase salivaire humaine. (Kandra *et al.*, 2004).

D'ailleurs, les dimères procyanidoliques ont une activité inhibitrice sur l'histidine décarboxylase et l'élastase (Bruneton, 1999). Les tanins ont un autre effet inhibiteur de la réplication virale, c'est l'inhibition de la transcriptase inverse des rétrovirus comme virus (HIV) (Bruyne *et al.*, 1999).

L'effet antinutritionnel des tanins dans la digestion des glucides est actuellement prouvé. La présence de ces substances réduit considérablement la digestibilité des fibres (cellulose, hémicelluloses et pectine) et de l'amidon. Cette faible digestibilité est due, en premier lieu, à l'interaction directe des tanins avec ces molécules ou/et à l'inhibition des enzymes digestives impliquées dans leur dégradation : cellulase, amylase et pectinase (McSweeney *et al.*, 2001).

III- α-amylase :

Les enzymes appartenant à la famille des hydrolases telles que, les -amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004).

3-1-Différents types d'amylase

L'amylase humaine est une alpha-amylase (EC 3.2.1.1) qui existe sous deux isoformes selon qu'elle est sécrétée par le pancréas, amylase pancréatique, ou par la glande parotide (Mayer et Laner, 1959).

Plusieurs types d'amylase existent, alpha (3.2.1.1), bêta (3.2.1.2) et gamma (3.2.1.3) (Yamamoto, 1995). La bêta-amylase et la gamma-amylase (glucoamylase) sont généralement d'origine végétale ou microbienne quoique la glucoamylase ait été retrouvée chez certains mammifères ou espèces aquatiques (Shetty, 2006).

Tableau 4 : Les enzymes amylolytiques (Vallier *et al.*, 1977 ; Scriban, 1993).

Le nom	Type	Liaison hydrolysée	Produits	Origine	Références
α-amylase	Endoamylase	α (1 → 4)	-Dextrine -Maltose - Isomaltose	-Animal : salive et suc pancréatique -Végétal -Microbienne	(Vallier <i>et al.</i> , 1977).
β - amylase	Exoamylase	α (1 → 4) par les extrémités non réductrices	-β-maltose -dextrine	-Végétal	(Vallier <i>et al.</i> , 1977).
γ- amylase	Exoamylase	α (1→4) par les extrémités non réductrices	-Maltose	-Végétal -Microbienne	(Scriban, 1993).

3-2 Généralités sur l'α-amylase

L'α amylase est considérée l'une des enzymes industrielles la plus importante et la plus ancienne. C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons α (1- 4) de l'amidon. Son action fournit dès le début un mélange de glucose, de maltose et de dextrans. En fin de réaction elle fournit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons α (1-6) situées aux points de ramification des chaînes (Alais *et al.*, 2008).

Elle est largement présente chez les animaux, les végétaux et les microorganismes, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires. Elles sont très importantes, tant par leurs applications industrielles et biotechnologiques que par leur implication dans certains troubles métaboliques (diabète, obésité, etc.) (Mercier, 1985).

3-3 Nomenclature

Le tableau 5 récapitule les différentes nomenclatures d' α -amylase.

Tableau 5 : Différentes nomenclatures d' α -amylase (Mercier, 1985).

Nom systématique	α (1-4) D-glucane glucanohydrolase
Nom codifié	E.C. 3.2.1.1
Nom recommandé	Alpha-amylase
Synonymes	Glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, ptyalin

3-4 Structure et mode d'action

Les α -amylases sont des métallo-enzymes à calcium (un ion calcium par molécule d'enzyme). Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés d'enzyme varient d'une souche à une autre (Fogarty *et al.*, 1980).

Structurellement, les α -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381 - 478 résidus). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes (Fig. 6). Les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l' α -amylase est formée de 8 feuillets β plissés et de 8 hélices α (Burhan, 2003).

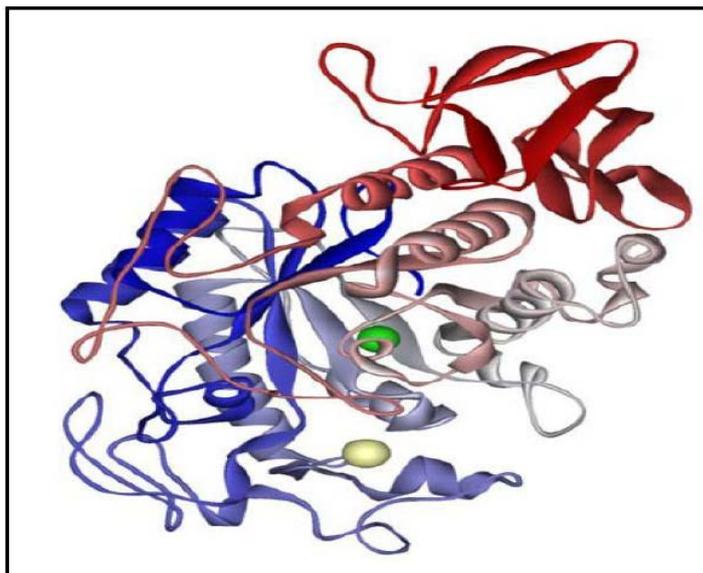


Figure 7 : structure de l' α -amylase humaine présente les trois domaines (PDB, 2006).

α -AMYLASE

L' α -amylase d'origine végétale, animale ou microbienne, agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène) et les oligosaccharides. Elle hydrolyse les liaisons glucosidiques α (1-4) de l'amidon et des substrats relatifs (Heslot, 1996). Son action peut se faire de différentes façons ;

- ✓ **Une attaque aléatoire**, en coupant les liaisons α (1-4) à partir de l'extrémité non réductrice. Il en résultera, la formation de glucose, de maltose et surtout d' α dextrines (Scriban, 1999).
- ✓ **Mécanisme uni-chaine** où l' α -amylase dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. (Berry et Paterson, 1990).
- ✓ **Mécanisme multi-chaine**, la dégradation des chaînes est simultanée (Kandra *et al.*, 1997).
- ✓ **Attaque multiple ou répétitive**, le déplacement de l'enzyme, fixée tout au long de la chaîne, conduit à plusieurs hydrolyses avant la dissociation du complexe enzyme-substrat (Kandra *et al.*, 1997).

3-5- Différentes origines d' α -amylase

L' α -amylase est une enzyme produite par des plantes, des animaux et des micro-organismes. Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle. Plusieurs α -amylases végétales, animales (mammifères) et microbienne (bactériennes, fongique ...) ont été purifiées et étudiées (Khacheba, 2008).

Tableau 6 : Quelques propriétés des α -amylases (Khacheba, 2008) :

Enzymes d'origine	Exemples	Poids moléculaire(Da)	pH optimal	Température optimale (°C)
Animal	Salive humaine	50 000	6,9	40
	Pancréas de porc	50 000	6,9	37
Végétale	Malt d'orge	59 500	4,7-5,4	50-55
	Blé	59 500	4,6	60-66
Microbienne	<i>Bacillus coagulans</i>	49 000	5,2	57
	<i>Aspergillus oryzae</i>	52 600	5,5-6,9	40

3-6 Caractéristiques générales

➤ Température optimale

En général, les α -amylases ont une température optimale comprise entre 25 °C et 70 °C, avec une grande stabilité thermique pour les α -amylases bactériennes (Larpen-gourgaud et Sanglier, 1992). Vertiani *et al.* (1998), signalent que la température optimale des α -amylases bactériennes, varie de 50 °C à 90 °C, Cependant la température optimale des α -amylases fongiques varie de 40 °C à 60 °C.

➤ **pH optimal**

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 9, avec un optimum variant de 4 à 5 pour les α -amylases fongiques, et un optimum supérieur à la neutralité, soit 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes (Larpen-gourgaud et Sanglier, 1992).

Le pH optimal pour l'amylase pancréatique et salivaire varie selon les auteurs, mais une majorité convient qu'il se situe autour de 6,9 avec une variation pouvant s'échelonner de 6,5 et 7,2 (Ishikawa *et al.*, 1993).

3-7 Application industrielles

Les α -amylases trouvent l'application dans tous les processus industriels, et également dans les industries pharmaceutiques chimiques et alimentaire (Pandey *et al.*, 2000).

Tableau 7 : Différentes applications des α -amylases (Chaudhry *et al.*, 1995).

Industries	Applications
Biscuiterie et Panification	Pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus, de fabrication. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie.
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon, pour préparer des sauces de couchage permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille.
Détergent	Dégradation des taches à base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique sont solubles, ce qui facilite le découpage physique de la tache.
Industrie Pharmaceutique	Traitement de diabète et de l'obésité. Comme agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement par des antibiotiques ou comme un aide digestif.

3-8 -Activateurs et inhibiteurs de l'alpha amylase

La régulation de l'activité enzymatique peut être assurée par des composés appelés effecteurs (activateurs ou inhibiteurs) qui agissent directement ou indirectement sur le site actif de l'enzyme (Garrett et Grisham, 2000).

Les inhibiteurs sont généralement des molécules de structure voisine du substrat, qui ne donnent pas de réaction ou réagissent beaucoup plus lentement que le substrat. L'étude de l'effet d'inhibiteur est utilisée pour déterminer le mécanisme catalytique d'une réaction enzymatique, de mieux connaître la spécificité d'une enzyme ainsi qu'obtenir des données physiques et chimiques concernant le site actif de l'enzyme (Garrett et Grisham, 2000).

Les ions Cu^{2+} , Fe^{2+} , et Hg^{2+} sont donc des inhibiteurs compétitifs (analogues structuraux aux activateurs). (Mercier, 1985). Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sont des activateurs de l'alpha amylase car ils font partie du site actif où ils participent à la stabilité structurale de l'enzyme (Mercier, 1985).

α -AMYLASE

Concernant les activateurs inorganiques on peut citer le calcium, carbonate et ion chlorure

Tableau 8 : Activateurs organique de l' α -amylase salivaire (Mercier, 1985 ; Knight, 1967).

Activateurs inorganiques	Caractéristique	Références
Calcium	un activateur allostérique permet une résistance à la dénaturation au pH, à la température extrême.	(Mercier, 1985).
Carbonate	Elle augmente la thermostabilité des α -amylases, lorsqu'elle est sous forme de carbonate de calcium.	(knight, 1967).
Ion chlorure	Ces ions ont un effet d'un activateur appréciable à forte concentration.	(Mercier, 1985).

Aussi quelques inhibiteurs organiques sont résumés dans le tableau

Tableau 9 : Inhibiteurs organique de l' α -amylase salivaire (Mercier, 1985 ; Romane *et al.*, 2012)

Inhibiteurs organique	Caractéristique	Références
maltose	Est le produit de dégradation de l'amidon par amylase ce qui est provoqué une rétro inhibition de l'enzyme	(Mercier, 1985).
l'acarbose	Est analogue du sucre. L'incapacité des enzymes digestives à hydrolyser ces molécules est due à la présence d'un pont amine, qui est considéré le facteur déterminant de son effet inhibiteur. il est le plus largement utilisé pour le traitement du diabète type 2.	(Kadema et al., 1984). (Romane <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 10 : Autre activateurs et les inhibiteurs organique et inorganique de l' α -amylase

Activateurs inorganiques	Activateurs organiques	Inhibiteurs inorganiques	Inhibiteurs organiques
Bromure Nitrate Iodure Phosphate	Acétylcholine Pancréozymine Albumine	Fer Mercure Argent Cuivre	D-glucose Citrate Oxalate

3-9 Cinétique enzymatique de l'alpha amylase

3-9-1 Définition

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques catalysées par les enzymes en étudiant leur vitesse. Elle permet de décrire les propriétés catalytiques des enzymes et les mécanismes mis en place pour leur régulation. En 1913, *Leonor Michaëlis* et *Maud Menten* ont proposé un modèle simple, dans lequel les enzymes, dites *Michaëlinnes* (Vignais, 2001).

3-9-2 Les différents types cinétiques de l'inhibiteur enzymatique

✓ Inhibiteur compétitifs

Les inhibiteurs compétitifs sont des analogues du substrat de l'enzyme. Ils peuvent ainsi entrer en compétition avec celui-ci pour se lier au site actif de l'enzyme ou se lier à un autre site qui va engendrer un changement de structure au niveau du site actif (Moussard, 2002).

✓ Inhibiteur non compétitifs

Les inhibiteurs non compétitifs peuvent se lier à l'enzyme seule autant qu'au complexe enzyme-substrat vu que leur site de liaison ne se retrouve pas dans le site actif de l'enzyme. Les deux complexes pouvant être formés, (EI) ou enzyme substrat-inhibiteur (ESI), inactivent la réaction enzymatique (Murray *el al.*, 2002).

✓ Les inhibiteurs incompetitifs

Les inhibiteurs incompetitifs ne peuvent se lier à l'enzyme seule, mais seulement au complexe (ES). Il y a donc création d'un complexe (ESI) qui empêche l'activité enzymatique (Murray *el al.*, 2002).

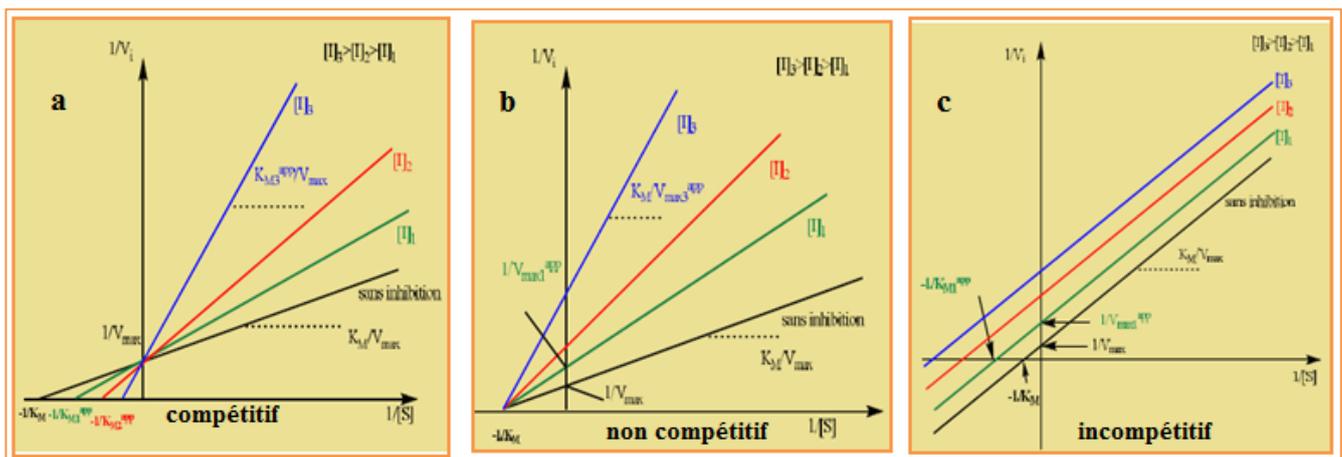


Figure 8 : La représentation de Lineweaver-burk (3type d'inhibition)

α -AMYLASE

Tableau 11 : Différentes paramètres cinétique enzymatique en présence et en absence d'inhibiteur

Inhibition :	V_i	V_m	K_m	K_i (constante d'inhibition)
Sans	$\frac{V_m \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]}$	V_m	K_m
Compétitive	$\frac{V_m \cdot [S_0]}{K_m(1 + \frac{[I_0]}{K_i}) + [S_0]}$	V_m	$K_m(1 + \frac{[I_0]}{K_i})$	$\frac{K_m \cdot [I_0]}{K_m^{app} - K_m}$
Non compétitive	$\frac{V_m}{(1 + \frac{[I_0]}{K_i})} \times \frac{[S_0]}{K_m + [S_0]}$	$\frac{V_m}{(1 + \frac{[I_0]}{K_i})}$	K_m	$\frac{V_m^{app} \cdot [I_0]}{V_m - V_m^{app}}$
Incompétitive	$\frac{V_m}{(1 + \frac{[I_0]}{K_i})} \times \frac{[S_0]}{\frac{K_m}{(1 + \frac{[I_0]}{K_i})} + [S_0]}$	$\frac{V_m}{(1 + \frac{[I_0]}{K_i})}$	$\frac{K_m}{(1 + \frac{[I_0]}{K_i})}$	$\frac{V_m^{app} \cdot [I_0]}{V_m - V_m^{app}}$

3-10 Intérêt de l'inhibition de l' α -amylase

Les algues brunes sont connues pour leur richesse des polyphénols de type flavonoïdes et aussi autre composés phénoliques uniques dans le monde végétale nommés phlorotannins. (Delage *et al.*, 2001).

Plusieurs composés phénoliques sont doués d'une activité inhibitrice de l' α -amylase (Sales *et al.*, 2012). Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été faits pour identifier des inhibiteurs efficaces de l' α -amylase à partir des ressources naturelles afin de développer de nouveaux composés antidiabétiques pour le traitement du diabète (Kumar *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2012).

Les inhibiteurs d' α -amylase ont ainsi un potentiel thérapeutique pour le traitement de l'obésité et du diabète (Gerrard *et al.*, 2000).

Le diabète est une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique avec des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique et protidique. Cette maladie est associée d'une sécrétion insuffisante d'insuline (diabète insulino-dépendant, ou type I) ou d'une carence ou mauvaise utilisation de l'insuline (diabète non insulino-dépendant, ou type II) (Jacques *et al.*, 2007).

Des études *in vitro* ont montré que les catéchines préviennent l'hyperglycémie en augmentant l'activité de l'insuline et en protégeant les cellules β du stress oxydant (Bolling *et al.*, 2009).

Plus récemment le rôle de ce type des polyphénols comme modulateur de la sensibilité à l'insuline et facteur de prévention du diabète et de l'obésité. (Kao *et al.*, 2006 ; Waltner-Lawer *et al.*, 2002) ont montré que l'EGCG mine l'insuline en diminuant l'expression des gènes contrôlant la néoglucogenèse et donc en diminuant la production de glucose hépatique ainsi qu'en augmentant la glycogénèse (Hanhineva *et al.*, 2010 ; Bahadoran *et al.*, 2013).

Aussi dans des travaux récents publiés, l'action des polyphénols, sur le métabolisme du glucose s'explique à trois niveaux, diminution de l'absorption intestinale du glucose, meilleure sensibilité des récepteurs du pancréas au glucose et meilleure absorption du glucose par les tissus périphériques (Kumar *et al.*, 2011)

D'autres études récentes ont montré que les polyphénols permettent de diminuer la glycation des protéines circulantes notamment l'hémoglobine glyquée ou glycosylée (HbA1c) marqueur de l'état glycémique sur le long terme du diabète de type 2 (Fukino *et al.*, 2007).

α -AMYLASE

L'obésité est définie comme un excès de masse grasse corporelle pouvant nuire à la santé. Dans l'organisme, c'est au niveau du tissu adipeux que le stockage de gras se localise, plus précisément dans les cellules adipeuses (adipocytes) provenant elles-mêmes de la maturation de cellule précurseur appelée préadipocytes (Meydani et Hasan, 2010)

De nombreuses études montrent les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des algues brunes riches en polyphénols et soulignent leur intérêt dans le cadre de stratégies innovantes vis-à-vis de l'obésité et de ses complications (Meydani et Hasan, 2010).

D'autres études ont montré que les algues brunes pourraient être utilisées pour lutter contre l'obésité en diminuant l'accumulation de la graisse chez les patients par blocage de la maturation des adipocytes (Hanhineva et *al.*, 2010).

Ensuite, il a été suggéré que les polyphénols pourraient induire une perte de poids par l'inhibition de la digestion et de l'absorption des glucides et des lipides, entraînant une digestion et une absorption réduite de ces macronutriments et un apport calorique diminué. Cette propriété attribuée à certains polyphénols a suscité beaucoup d'intérêt, étant donné l'épidémie d'obésité à laquelle la société fait face et son rôle dans le développement du diabète de type 2 (Hanhineva et *al.*, 2010).

Zamora-Ros et *al.* (2014) ont évalué l'effet de la consommation quotidienne des sources alimentaires riches en polyphénols chez des individus obèses et diabétiques et ont observé que ces molécules sont capable d'améliorer la sensibilité à l'insuline avec un taux de 22%.

Les études qui ont réalisé par Hokayem et *al.* (2013) ont démontré que la consommation régulière de polyphénols alimentaires chez des sujets obèses a neutralisé les effets négatifs d'une diète riche en glucose et en fructose, et a amélioré la sensibilité à l'insuline de 23%.

VI- L'immobilisation des enzymes

4-1- Définition d'immobilisation des enzymes

Les techniques d'immobilisation sont nombreuses. Elles consistent à rendre l'enzyme insoluble, par un traitement physique ou chimique convenable pour éviter la perte de l'activité biologique. Les principales techniques peuvent être rassemblées en 2 grands Groupes (Fig.9) (Alloué, 2008;Alnajjar, 2001).

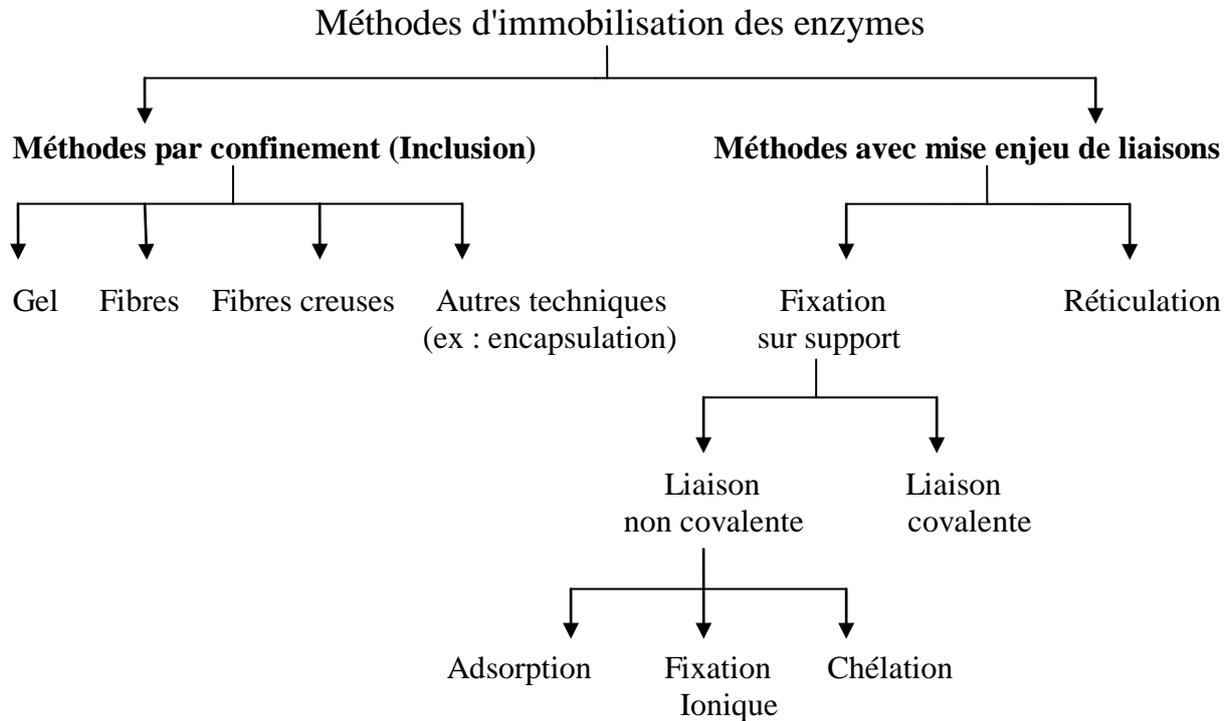


Figure 9 : Différentes méthodes d'immobilisation des enzymes (Coutoux, 1991)

4-2- Méthodes d'immobilisation des enzymes

a. Méthodes de confinement (ou inclusion)

Les molécules d'enzymes sont retenues à l'intérieur d'une trame solide (gel, fibres, microcapsules) que l'on fait précipiter autour d'elles. Les inconvénients majeurs sont habituellement le manque de réactivité avec les substrats de masses moléculaires élevées et la tendance du support à se solubiliser avec le temps. Les milieux généralement utilisés pour l'inclusion sont: le polystyrène, les matériaux cellulosiques, l'alcool—polyvinyl et les polydextranes . (Alnajjar ,2001). Les alginates et les carraghénanes extraits d'algues présentent de remarquables propriétés gélifiantes et conviennent également bien à l'inclusion des enzymes ou des cellules entières (Alnajjar, 2001 ; Nouadri, 2011)

b. Méthodes avec mise en jeu de liaisons

Les molécules d'enzymes sont :

- Soit retenues sur des supports solides par des liaisons non covalentes (adsorption, liaison ionique ...) ou covalentes; la mise en oeuvre d'une telle fixation est plus ou moins complexe. Les supports utilisés sont les polycarbohyd rates, les oxydes métalliques, le verre, les céramiques et le charbon actif.
- Soit réticulées par un pontage covalent de manière à former un réseau, le plus souvent de masse moléculaire élevée et insoluble, sans recours à un support. Les agents réticulants peuvent être des aldéhydes tels que le glutaraldéhyde ou le formaldéhyde ou d'autres réactifs tels que: l'hexaméthylène diamine, la benzidine, PO-dianisidine et les isocyanates bifonctionnels. (Alnajjar, 2001)

4-3-Intérêt des enzymes immobilisées

L'industrie actuelle montre un grand intérêt pour l'utilisation des enzymes insolubles. Les avantages des enzymes immobilisées sont variés.

Les avantages majeurs sont:

- Les enzymes immobilisées peuvent être séparées facilement du substrat et du produit de la réaction ce qui permet un meilleur contrôle du processus.
- Les enzymes immobilisées peuvent être réutilisées plusieurs fois, dans des réacteurs batch ou dans des processus continus, sans perte d'activité au cours d'une longue période.
- L'immobilisation permet de compenser le coût élevé de l'enzyme, surtout dans le domaine analytique.
- L'immobilisation provoque généralement une amélioration de la stabilité thermique de l'enzyme et confère à l'enzyme une résistance élevée à la dénaturation.
- L'immobilisation peut allonger la demi-vie des enzymes.
- Les systèmes à enzymes immobilisées sont de bons modèles pour l'étude des cinétiques enzymatiques *in vivo*.

L'inclusion des enzymes dans un gel offre un avantage à l'enzyme elle même qui ne participe pas directement dans la formation de la matrice insoluble dans l'eau et l'immobilisation se fait sans formation de ponts entre la matrice et l'enzyme.

L'inclusion dans l'alginate a donné de bons résultats avec plusieurs enzymes mais il est arrivé que des enzymes soient inactivées (Alnajjar, 2001).

4-4- Inconvénients des enzymes immobilisées

- La localisation de l'enzyme à l'intérieur du polymère pose des problèmes stériques (efficacité limitée par accès délicat du substrat vers l'enzyme et du produit en dehors du polymère).
- Les conditions de polymérisation (ex.: pH élevé) peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme
- Certaines polymérisations font appel à des agents dénaturant sou à des radicaux (Benslama, 2016).

4 -5- Caractéristiques et propriétés des alginates

4-5-1-Définition

L'alginate de sodium est un polysaccharide de structure linéaire d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique (Alnajjar, 2001), biopolymère anionique, extrait des algues brunes, et il peut être produit par voie bactérienne, couramment utilisé dans des applications biologiques notamment dans le domaine de l'encapsulation cellulaire et de la délivrance contrôlée de molécules à effet thérapeutique. (Mokrani, 2013)

4-5-2- Composition chimique

Les alginates sont des sels d'acide alginique, constitués de deux monomères saccharidiques de base : acide α - L - guluronique (G) et acide β - D - mannuronique (M), dont la séquence varie (Fig.10).

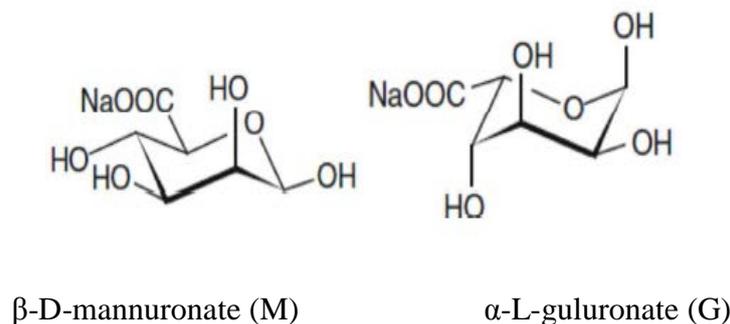


Figure 10 : Structures des monomères constitutifs des alginates (*Belattmania et al.*, 2015)

4-6- Application de l'alginate de sodium

L'alginate de sodium produit à grande échelle à travers des déifiantes applications résumé dans le tableau 11

Tableau11 : Répartition de la production mondiale des alginates (en tonnage) entre les différents secteurs industriels et exemples d'applications (Vauchel, 2007 ; Mokrani, 2013)

Application	Rôle de l'alginate
Industrie textile (50%)	Epaississant pour les pâtes d'impression, Epaississant et stabilisateur des teintures, Agent d'imperméabilisation, Agent plastifiant et filmogène.
Industrie agroalimentaire (30%) codes E401 à E405	Epaississant, texturant, conservateur, dans de nombreux produits : confitures, jus de fruits, sauces (moutarde, mayonnaise), potages, produits laitiers, stabilisateur dans les crèmes glacées (empêche la formation de cristaux).
Industrie du papier (5%)	Agglomérant pour les fibres, apprêt de surface, Epaississant et stabilisant dans les colles, Maintien des pigments en suspension.
Industrie pharmaceutique (5%)	Stabilisateur d'émulsions, agglomérant dans les comprimés, épaississant et hémostatique dans les pommades, pansements, mèches nasales, Gélifiant dans les pâtes a empreinte dentaire.

4-7- Quelques enzymes immobilisés par les billes d'alginate

Les alginates permettent d'encapsuler facilement des molécules fragiles comme les enzymes. Il faut toutefois porter une attention particulièrement au choix de l'alginate qui déterminera la structure et la stabilité des billes (Leclerc, 2012). Le tableau 12 représente quelques enzymes immobilisées.

Tableau 12: Les enzymes immobilisé par les billes d'alginate

Enzymes	Souches	Références
Lipases	levure de <i>Yarrowia lipolytica</i>	(Aoulle, 2008)
β -Fructosidase	Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Alnajjar, 2001)
L' α -amylase	<i>Penicillium camemberti</i>	(Nouadri, 2011)

II-Matériels et méthodes

L'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'effet de l'extrait algueux du *Dictyopteris polypodioides* sur l'activité de l'enzyme digestive α -amylase salivaire libre et immobilisée.

Le travail est effectué au niveau de laboratoire d'Enzymologie-Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire Université des Frères Mentouri – Constantine.

1-Matériel biologique

➤ Échantillonnage

L'espèce étudiée est une algue brune, il s'agit de *Dictyopteris polypodioides*, elle a été prélevée le 26 mars de l'année 2016 au niveau de la plage *Stora* la wilaya de Skikda sur un site rocheux (Fig. 12 et 13)



Figure 12 : site d'algue étudiées



Figure 13 : *Dictyopteris polypodioides*

2- Préparation des extraits des algues

2-1 Extraction

L'extraction des polyphénols se fait selon le protocole de (Romani et al., 2006) avec quelques modifications. L'extraction se fait grâce au solvant acétone 70% et solvant acétone - eau dont les proportions sont de 1/1(v/v) dans les deux cas frais et sec. (Fig.14).

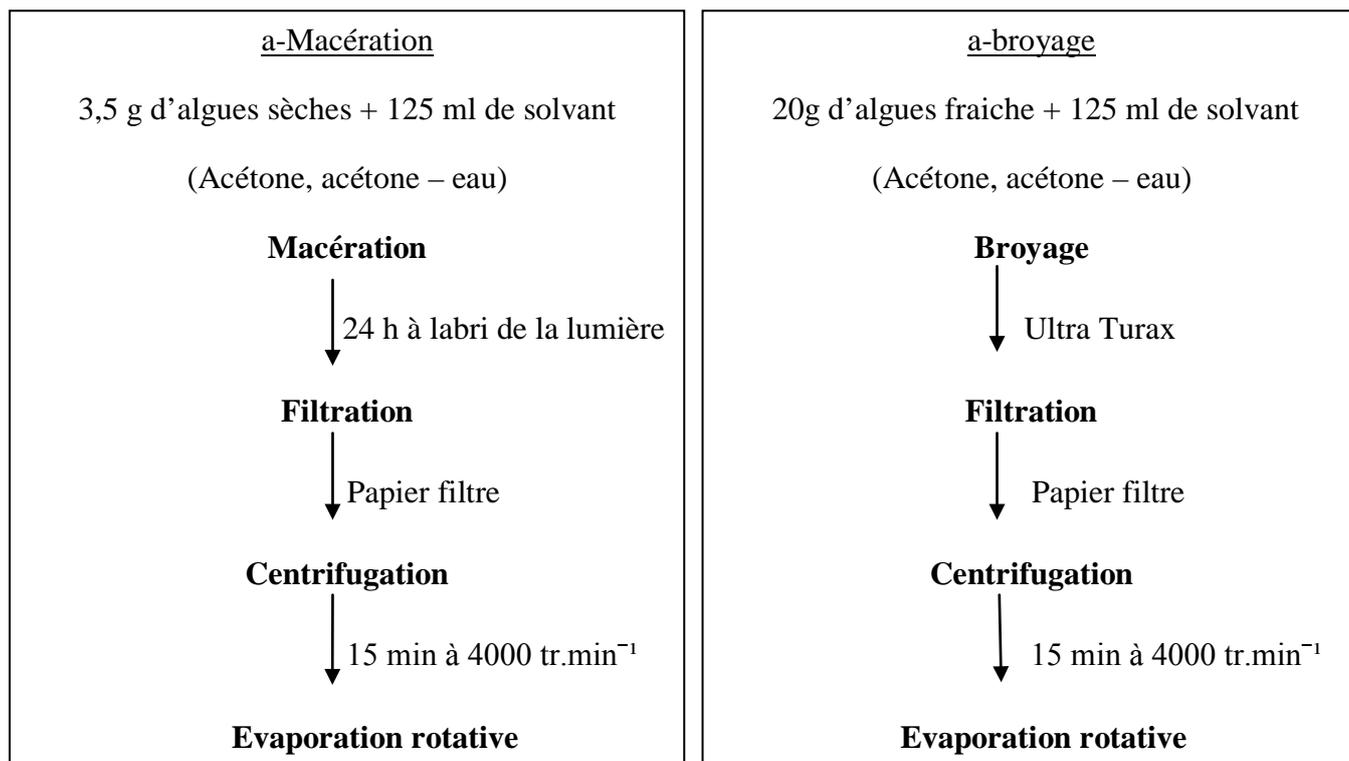


Figure 14 : Protocole d'extraction des composés phénoliques par : a- Macération ; b- Broyage

2-2 Dosage des polyphénols

Les polyphénols sont estimés dans les extraits algaux par une méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu (Wong et *al.*, 2006). Ce réactif qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il réagit avec la fonction –OH des phénols. Lors de l'oxydation des phénols, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène.

La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

Le milieu réactionnel est composé de 200 µl de chaque extrait (dissous dans l'acétone ou dans acétone eau) ajoutés à 1 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois, après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate du sodium (75g/l) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 2h d'incubation.

Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec l'acide gallique (0-200µg/ml) et sont exprimées en microgramme d'équivalent d'acide gallique.

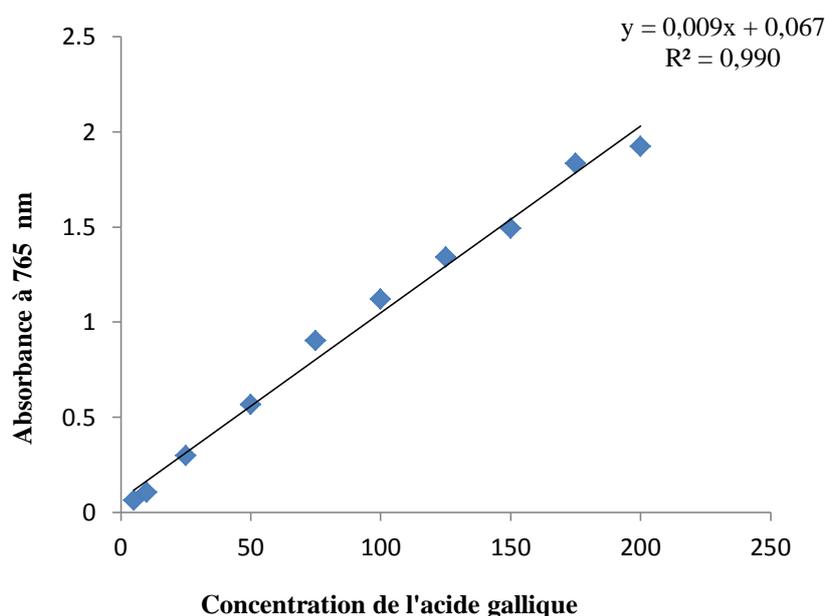


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

3- Préparation des extraits enzymatiques

3-1- Préparation de la salive

La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner après que le volontaire se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. Pour favoriser la salivation, le volontaire doit boire un verre d'eau 15 minute avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de parafilm pendant quelque minute.

20 ml de salive totale sont prélevés dans des tubes stériles. Ces échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 3000 t/min pendant 15 minutes afin d'éliminer les mucines et les débris cellulaire et alimentaire. Après centrifugation le surnageant sont congelés pour les Dosage de l'activité.

3-2- Dosage de l'activité α - amylase salivaire

❖ Principe de dosage

L'activité de l' α - amylase est mesurée selon la méthode de Benfeld (1955), le principe de cette méthode repose sur le dosage des groupements aldéhydes et cétones libre des sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse de l'amidon par l' α - amylase.

En milieu alcalin et a chaud, l'oxydation des ces fonctions provoque simultanément la réduction l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) de couleur jaune orange en acide 3-amino 5 nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm.

L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel. La concentration du maltose est déduite à partir de gamme d'étalonnage de 0 à 2mg/ml de maltose (Benfeld, 1955).

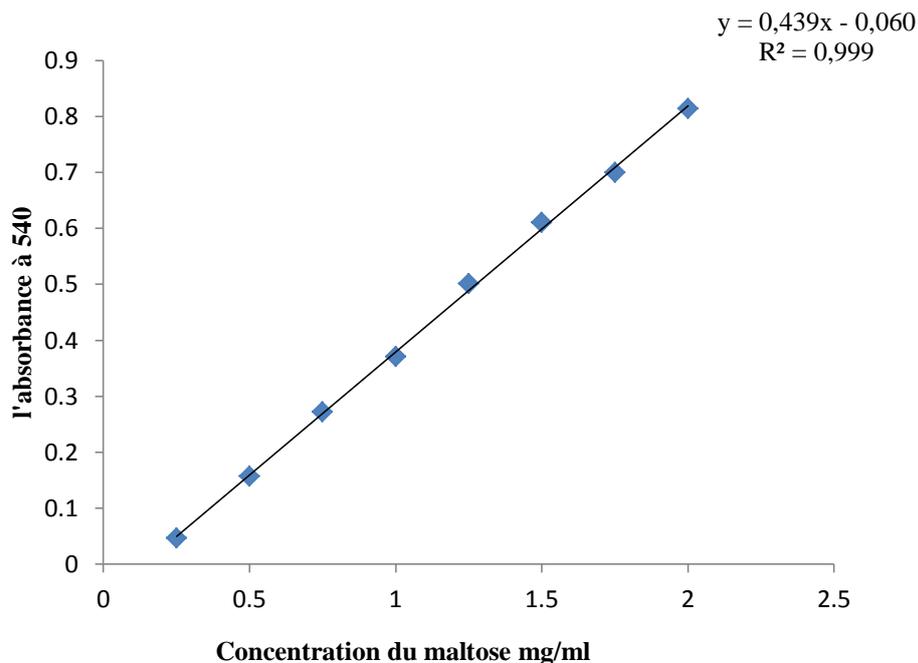


Figure 16: courbe d'étalonnage du maltose

❖ **L'unité enzymatique (U) :**

L'unité de l'enzyme est exprimée par la quantité de maltose libérée en μ mole par minute par ml de milieu.

3-2-1 Dosage de l'activité amylasique en présence et en absence d'inhibiteur

Afin d'évaluer l'activité inhibitrice des composés phénoliques *in vitro* des 4 extraits préparés et leur effet sur l'enzyme α -amylase salivaire, une concentration d'amidon de 1% (w/v) a été utilisé comme substrat en présence et en absence d'inhibiteur a différent concentration de chaque extraits I₁ I₂ I₃ I₄ : 0,56 μ g/ μ l 1,27 μ g/ μ l 0,25 μ g/ μ l et 0,39 μ g/ μ l respectivement. La concentration de chaque extrait est déduite à partir de volume final obtenue après extraction.

Et pour la détermination du type d'inhibition une série de dilution (2,5 jusqu'à 20 mg/ml) d'une solution d'amidon a été testé en absence et en présence d'inhibiteur. La méthode de dosage est décrite par Benfeld., 1955.

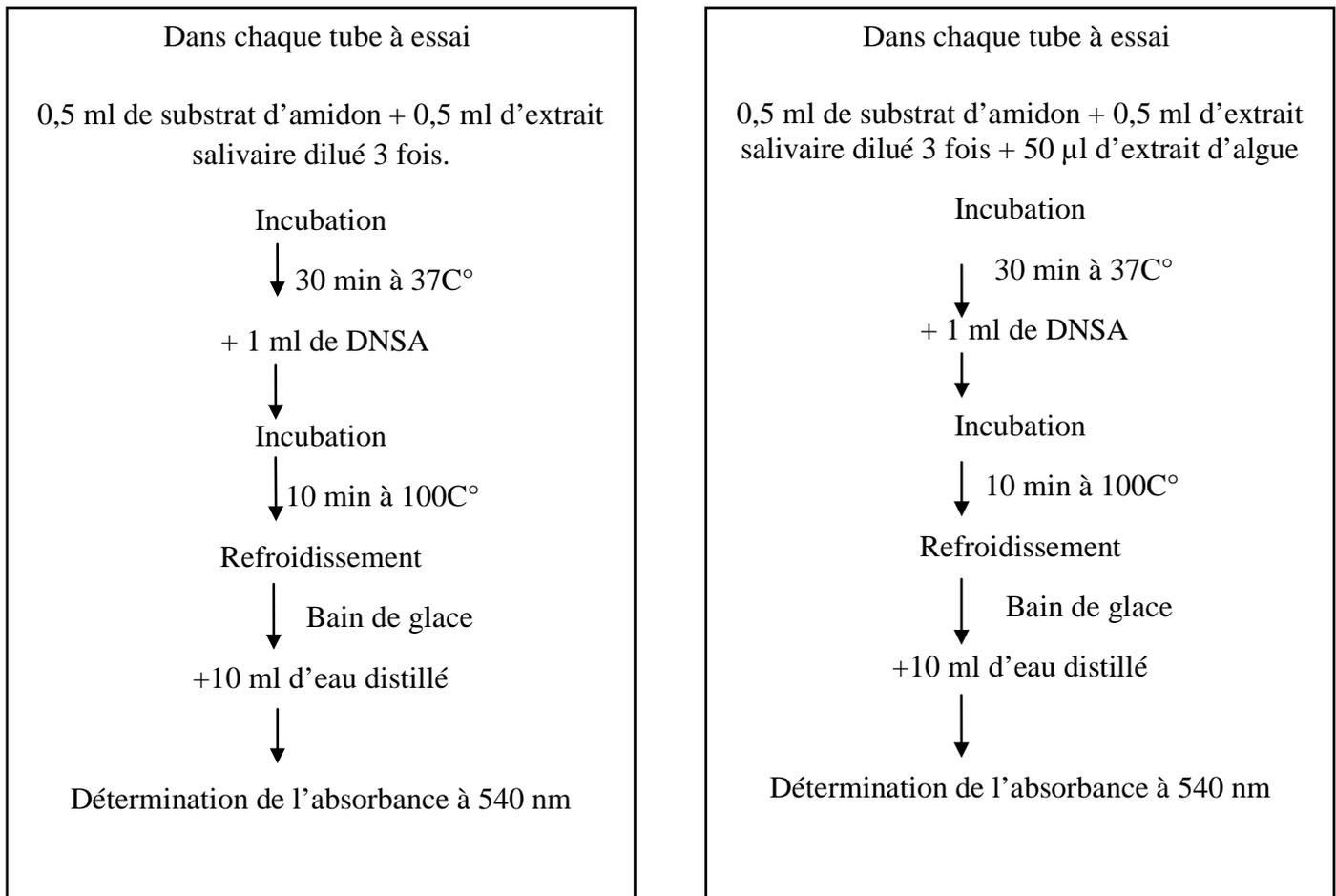


Figure 17 : Protocole de dosage de l'activité amylasique en présence et en absence d'inhibiteur

Une diminution de l'activité enzymatique prouve qu'il y a des molécules inhibitrices de l' α amylase, et le taux d'activité amylasique est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition} = \frac{(\text{activité sans I}) - (\text{activité avec I})}{(\text{activité sans I})} \times 100$$

$$\text{Activité relative} = 100 - \text{taux d'inhibition}$$

3-2-2 Dosage de l'activité d'enzyme d' α -amylase salivaire en présence des différentes concentrations (l'extrait phénolique acétone / eau : I₂)

Afin de déterminer l'effet de différentes concentrations de l'extrait phénolique acétone – eau (qui présente un grand pouvoir inhibiteur) sur l'activité d' α -amylase salivaire, une série des concentrations d'inhibiteur a été préparé, pour le dosage de l'activité amylasique selon le même protocole de Benfeld, 1955.

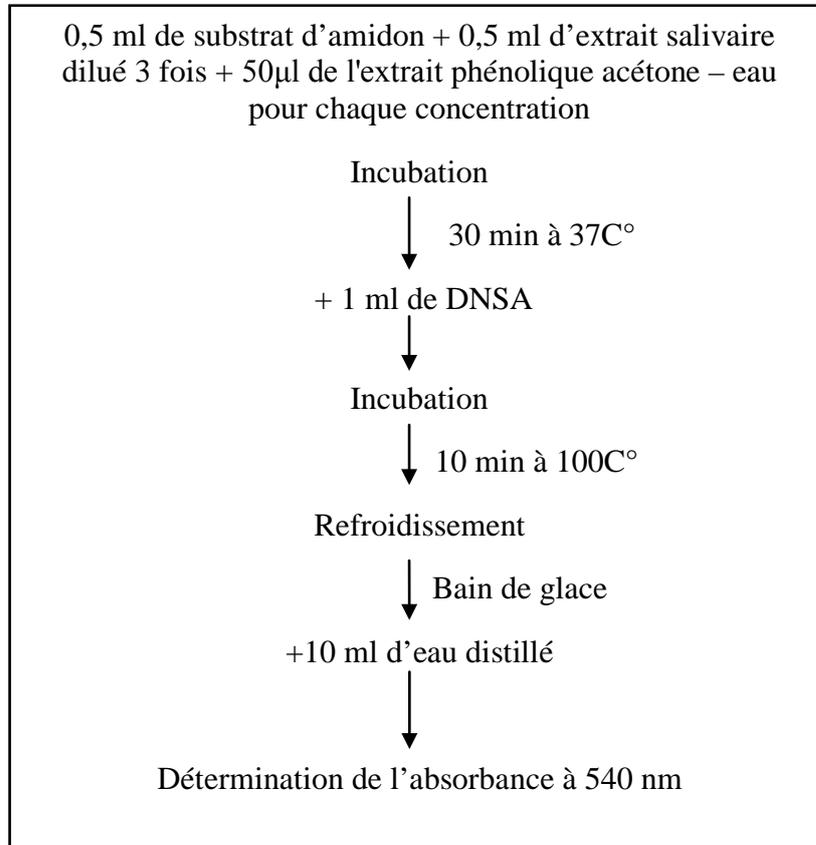


Figure 18 : Protocole de dosage de l'activité d'enzymatique en présence des différentes concentrations (l'extrait phénolique acétone / eau : I₂)

4- L'immobilisation

L'immobilisation se fait selon le protocole modifié par (Sader, *et al.*, 1998 ; Nouadri, 2011).

- Les solutions préparées :
 - ✓ Solution d'alginate de sodium préparé à 2% et dégazé.
 - ✓ Solution de chlorure de calcium 3%
 - ✓ un tampon phosphate 0.1M, pH 6.8
 - ✓ Solution d'amidon 1%
 - ✓ Solution d' α amylase salivaire dilué 3 fois

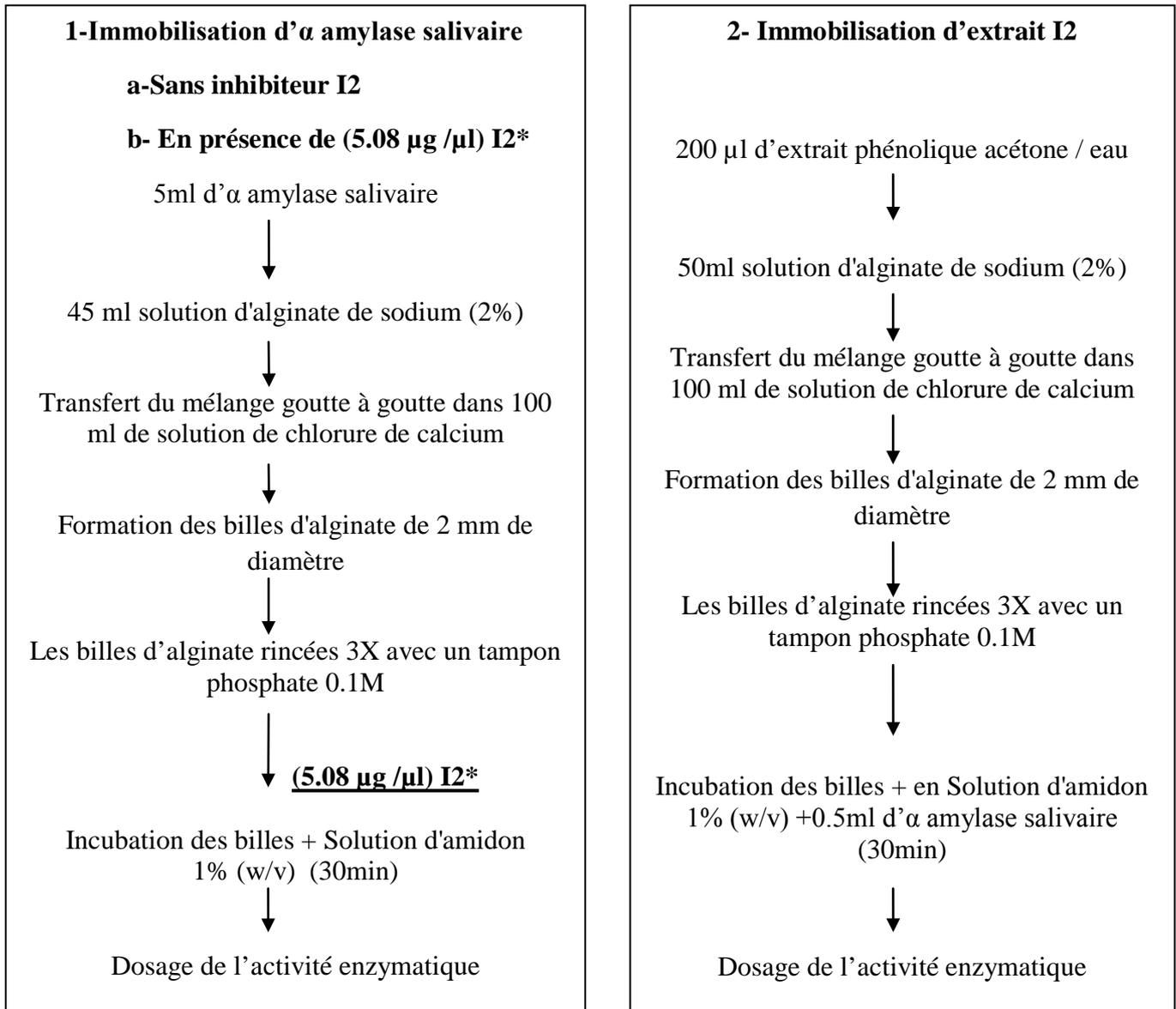


Figure 19 : Protocole d'immobilisation : **1-**d' α amylase salivaire et **2-** de l'extrait I₂ avec les billes d'alginate

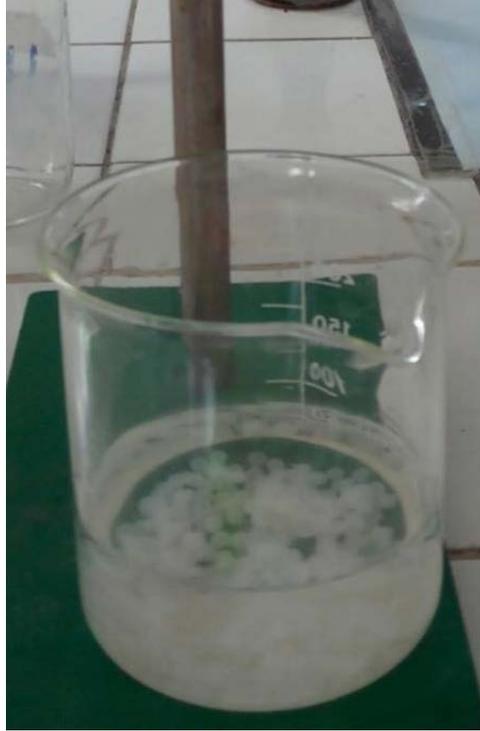


Figure 20 : les billes d'alginate

Résultats et discussion :

Les extraits des polyphénols préparés à partir de l'espèce *Dictyopteris polypodioides* sous les 4 formes mentionnés (voir matériel et méthode) par différentes méthodes d'extraction et différents solvants : poudre/acétone (I₁), poudre acétone/eau (I₂), fraiche acétone (I₃) et fraiche acétone/eau (I₄).

1- Extraction des polyphénols

1-2 : Quantité d'extraction des polyphénols

Les résultats du dosage de polyphénols totaux révèlent que les deux extraits (I₂) et (I₁) sont le plus riche en composés phénoliques avec un teneur de 15,05 et 8,13 µg. Eq acide gallique/mg de l'extrait respectivement, suivie par les deux extraits (I₄) et (I₃) avec une quantité de 5,60 et 3,61 µg. Eq acide gallique/mg de l'extrait respectivement. Les teneurs en polyphénols totaux dans nos extraits d'algue sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 13 : Les quantités de polyphénols totaux dans les extraits de *Dictyopteris polypodioides*

Méthode d'extraction	Extrait	acide gallique µg. Eq /mg d'extrait
Macération	Extrait phénolique acétone (I ₁)	8,13
	Extrait phénolique mélange acétone-eau (I ₂)	15,05
Broyage	Extrait phénolique brute acétone (I ₃)	3,61
	Extrait phénolique brute mélange acétone-eau (I ₄)	5,6

La macération semble être la meilleure méthode d'extraction des polyphénols totaux obtenus (tableau 11) .Nous constatons aussi, que cette technique connue comme méthode traditionnelle, a été couramment employée. Elle favorise d'une part la diffusion et la solubilité des polyphénols, et la rupture de liaisons entre les composés phénoliques et d'autres substances d'autre part (protéines, polysaccharides...) (Spigno et De Faveri 2007 ; Budic-Letoc *et al.*, 2005).

Aussi la macération a permis d'accéder aux phénols solubles en solution dans le milieu cellulaire et aux phénols liés à la paroi cellulaire. (Diabaté *et al.*, 1990). Donc Cette méthode nous a permis en effet d'extraire plus de phénols, que la méthode de broyage.

1-2 Rendement d'extraction

Selon les résultats de la fig. 21, on remarque que les taux de rendements d'extraction des composés phénoliques sont variables où les deux extraits (I₁) et (I₂) présentent les rendements les plus élevés de **75,25%** et 40,65% respectivement, suivi par l'extrait (I₄) avec un rendement de 28%, alors que l'extrait (I₃) présente un rendement de 18%.

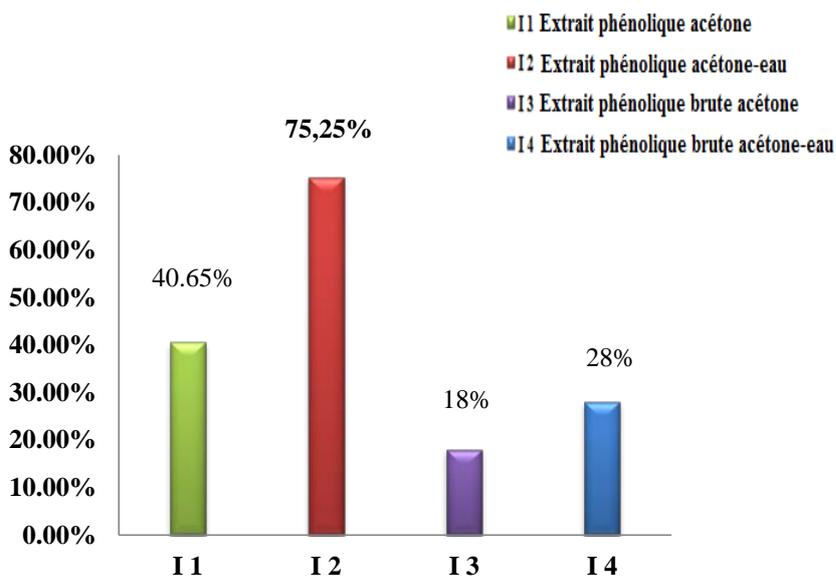


Figure 21 : Rendement d'extraction des polyphénols avec différents solvants.

Il ressort à travers l'observation des rendements obtenus par macération, de la figure 21 que le mélange acétone/eau 1:1(v/v) est le meilleur solvant d'extraction soit une moyenne de rendement de **75,25 %**, suivi par l'acétone avec une moyenne de 40,65%, par contre les rendements des polyphénols obtenus par broyage ont montrés que l'acétone-eau reste aussi le meilleur solvant d'extraction avec un taux de rendement de 28%, suivi par l'acétone avec un taux de 18%. Mulinacci *et al.*, 2004 et Koffi *et al.*, 2010 confirment nos résultats en indiquant que l'acétone en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux.

L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique. Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses.

La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire, de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base, de l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé. (Mohammedi et Atik, 2011).

Par conséquent, pour obtenir des fractions riches en polyphénols, il est préférable d'employer des mélanges du solvant organique approprié avec l'eau.

2- L'activité inhibitrice des extraits des algues

2-1 Dosage de l'activité enzymatique d' α -amylase en absence d'inhibiteur

En se basant sur la courbe d'étalonnage du maltose (Fig. 16) nous avons pu déterminer les concentrations du maltose libéré dans le milieu réactionnel pour des différentes concentrations d'amidon. Les valeurs obtenues des concentrations, nous ont permis de tracer la courbe de la cinétique de l'enzyme (Fig. 22).

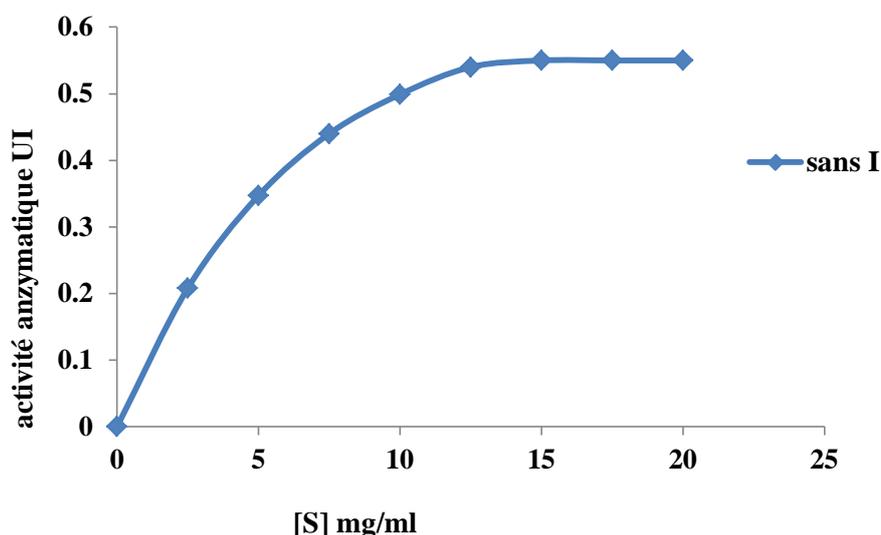


Figure 22 : La cinétique de l' α -amylase

La représentation graphique $V = f [S]$ (Fig. 22), montre que l'enzyme α -amylase suit une cinétique michaelienne. D'après ce graphe, on constate que la relation est proportionnelle entre la concentration et la vitesse enzymatique dans un domaine de linéarité qui s'arrête à une concentration de substrat de 10 mg/ml où la courbe dévie, montrant un plateau qui est expliqué par le fait que le site actif de l' α -amylase est saturé.

➤ Les paramètres cinétiques d' α -amylase

La représentation de Lineweaver-Burk $1/V = 1/[S]$ (Fig. 23) nous a permis de déterminer les différents paramètres cinétiques de l' α -amylase : la vitesse maximale V_{max} et la constante de Michaelis - Menten K_m .

$$K_m = 14,61 \text{ mM}$$

$$V_{max} = 0,56 \text{ U}^{-1}$$

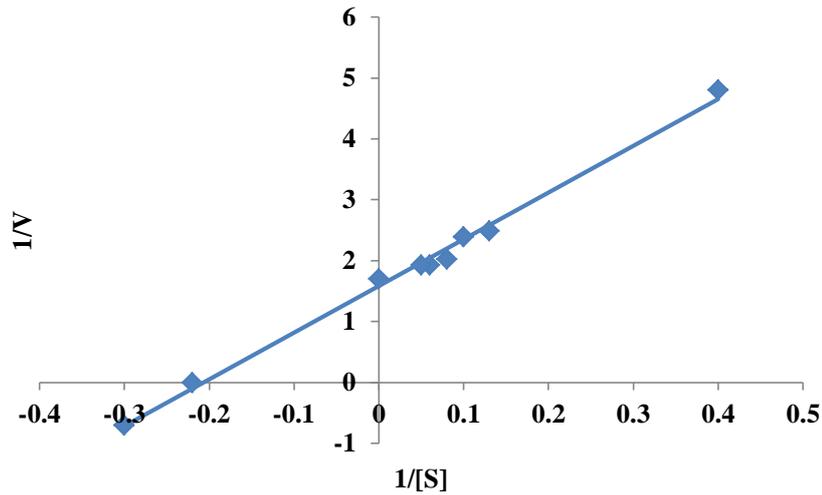


Figure 23 : Représentation de Lineweaver-Burk d'α-amylase

2-1 Dosage de l'activité enzymatique d'α-amylase en présence d'inhibiteur

Afin de déterminer l'effet des quatre extraits de l'espèce *Dictyopteris polypodioides* sur l'activité de l'α-amylase *in vitro*. Différentes concentrations pour testé le pouvoir inhibiteur de sur l'activité de l'enzyme 0,56 μg/μl 1,27 μg/μl 0,25 μg/μl et 0,39 μg/μl de chaque extrait phénolique acétone, acétone/eau, fraiche acétone et fraiche acétone/eau respectivement en présence d'une concentration constante (1%) d'amidon comme substrat ; et nos résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique.

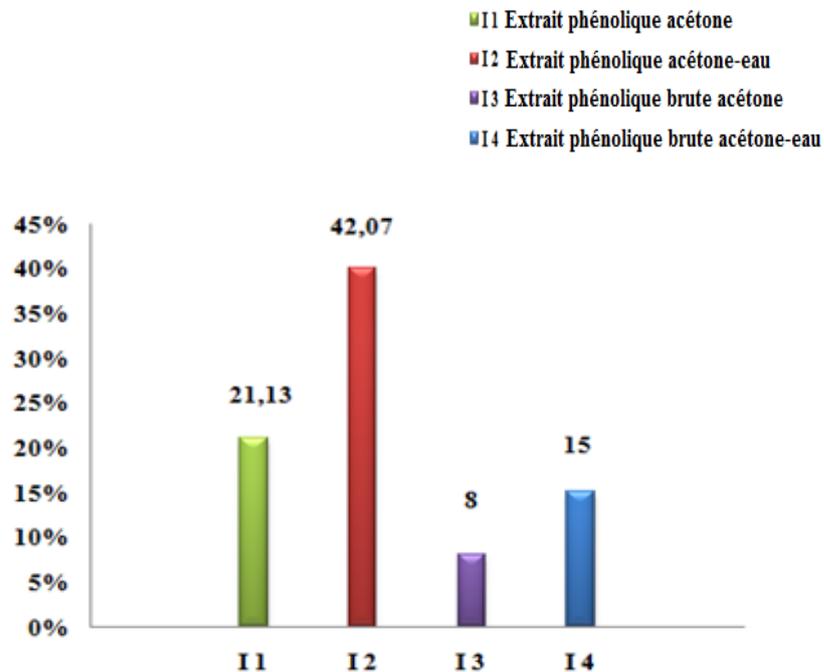


Figure 24 : Taux d'inhibition de l'activité d'α-amylase en présence des différentes concentrations de chaque extrait

La figure 24 montre que les deux extraits de poudre d'algues (I_2) et (I_1) ont un taux d'inhibition élevé avec des valeurs de 42.07 % et 21.13 % respectivement, par rapport aux inhibiteurs (I_3) et (I_4) provenant d'un extrait d'algues à l'état frais, et qui inhibent l' α -amylase à 15% et à 8% Cette différence d'inhibition est due peut être à la nature du solvant, aussi aux méthodes d'extraction et les teneurs des phénols totaux. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par (Mohammedi et Atik, 2011) qui constatent que l'activité inhibitrice d' α -amylase augmente avec une augmentation de la teneur en composés phénolique totaux.

Tundis *et al.*, 2010 indiquent que certains plantes ont une activité inhibitrice enzymatique varié inclue les composés polyphénoliques qui extraites par différentes méthodes d'extraction et aussi par l'utilisation de différents solvants.

Pour la détermination d'un effet inhibiteur optimum, des différentes concentrations de l'extrait phénolique (I_2) ont été utilisées pour influencer l'activité d' α -amylasique.

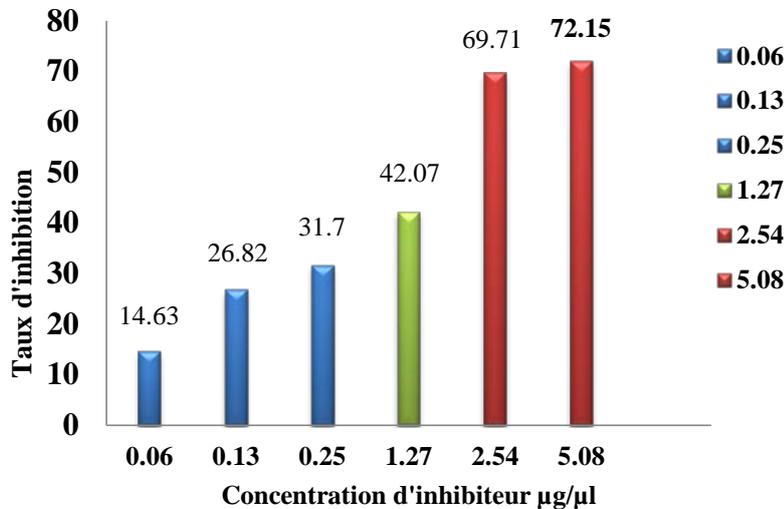


Figure 25 : Taux d'inhibition de l' α -amylase en fonction de différentes concentrations d' I_2

En fonction de ces résultats, l'extrait (I_2) présente un effet inhibiteur croissant en fonction de la concentration de l'extrait. Quant la concentration d'inhibiteur est augmentée, plus le taux d'inhibition est élevée, (14,63 %, 26,82 %, 31,70 %, 42,07 %, 69,71%) à forte concentration (5,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) il y a une forte inhibition de l' α -amylase 72.10 %. Donc le taux d'inhibition est proportionnel à la concentration de l'extrait.

Les études qui ont fait par Prashanth *et al.*, 2001 ont montré que l'extrait éthanolique de l'épicarpe de *Punica granatum* ont un potentiel inhibiteur sur α -amylase salivaire avec un taux d'inhibition de 68.2 %. Ainsi que les extraits aqueux et eau-méthanol des feuilles de *Retama raetam* ont une activité inhibitrice sur l' α -amylase salivaire avec au taux 72 % et 66.12 % respectivement (Hadj, 2012).

2-3 Détermination de type d'inhibition d' α -amylase salivaire par les deux inhibiteurs (I_1) et (I_2)

D'après nos résultats mentionnés dans la figure 26, on constate que les deux extraits phénoliques (I_1) et (I_2) ont une activité inhibitrice sur l' α -amylase salivaire, cette perte d'activité est due probablement à la forte teneur des polyphénols et aussi à la nature chimique de ces composés.

Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Mohammedi et Atik, 2011 qui constatent que l'activité inhibitrice d' α -amylase augmente avec une augmentation de la teneur en composés phénolique totaux. Aussi Alghazeer et al., 2012 indique que l'activité inhibitrice de enzymes digestives varie selon la nature chimique des composés phénolique

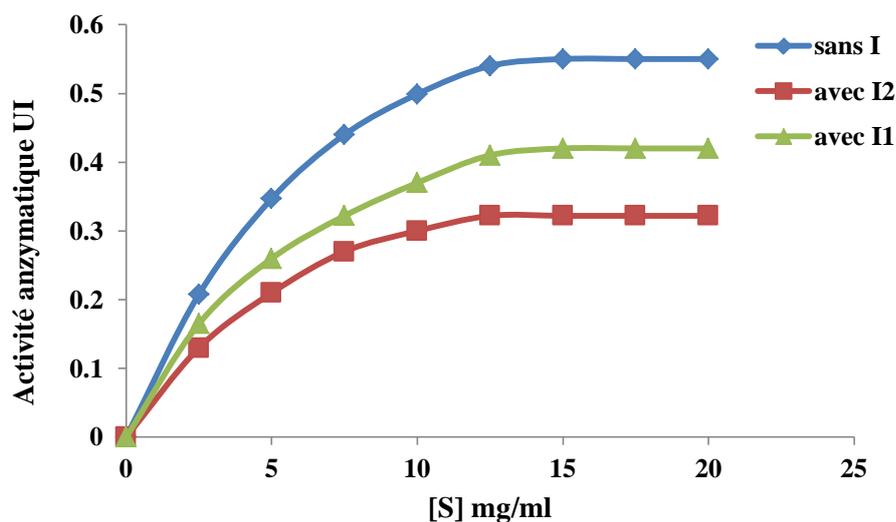


Figure 26 : l'activité enzymatique en présence et en absence d'inhibiteur

Pour mieux comprendre la nature de l'inhibition de l'extrait phénolique de poudre d'algues (I_2) et (I_1) ; nous nous sommes intéressés à l'étude cinétique de notre enzyme par la représentation de Lineweaver-burk (Fig. 27), ce qui nous a permis non seulement la détermination le type d'inhibition, mais aussi les autres paramètres cinétiques à savoir la vitesse maximale (V_{max}) et la constante d'inhibition (K_i) des deux extraits phénoliques.

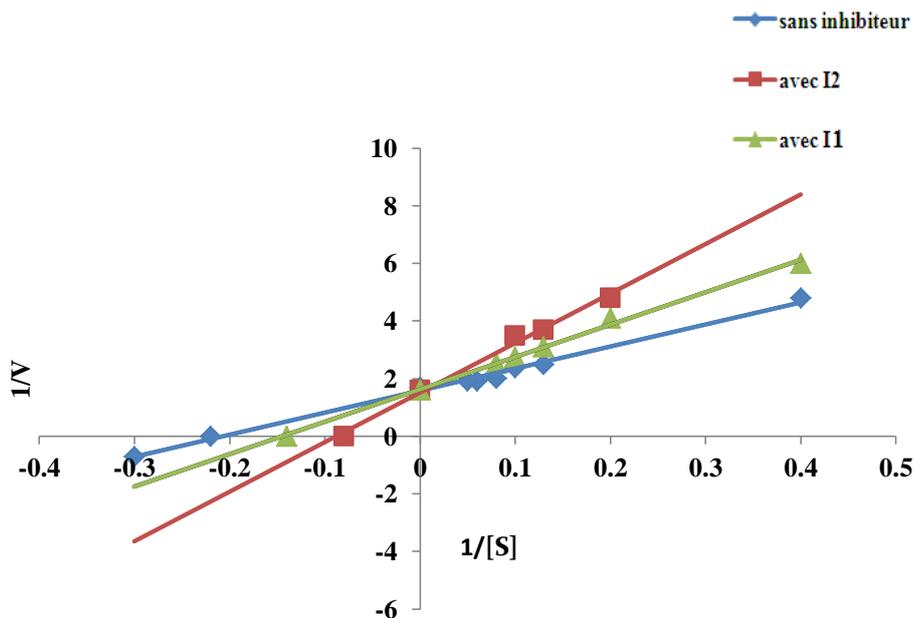


Figure 27: Type d'inhibition d' α -amylase en présence des deux extraits (I_1) et (I_2).

Les constantes d'inhibition (K_i) des deux extraits sont calculées à partir de ces graphes par la projection du point d'intersection des droites sur l'axe des abscisses selon l'équation 1, tandis que le type d'inhibition est déduit à partir du point de rencontre de ces traces (les droites : sans inhibiteur, avec (I_1) et avec (I_2) avec l'axe des ordonnées).

$$1- K_i = \frac{K_m \cdot [I_0]}{K_m^{app} - K_m}$$

Le tableau regroupe les différents résultats obtenus.

Tableau 14 : Type d'inhibition et constante d'inhibition des 2 extraits I_1 et I_2

Extrait	Type d'inhibition	K_i ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
(I_2)	Compétitif	0,85
(I_3)		2,94

Selon le graphe tracé, nous avons constaté qu'il s'agit d'une inhibition compétitive de d' α -amylase par nos extraits. Ce type d'inhibition peut être expliqué par le fait que, nos extraits possèdent des composés portant des groupements hydroxyles proches de ceux du substrat, ce qui l'a déplacé du site actif de l'enzyme. Donc ces inhibiteurs sont capables d'occuper le site actif de l' α -amylase.

Sales *et al.*, 2012 constate que le potentiel d'inhibition pour les flavonoïdes est corrélé avec le nombre de groupements hydroxyles dans leur cycle B. Ces composés inhibent l' α -amylase par la formation de liaisons hydrogènes entre ses groupements hydroxyles et les résidus du site actif de cette enzyme.

Les travaux conduits par Kanda, 2004 confirment nos résultats en indiquant que plusieurs polyphénols ont une action sur l' α -amylase tels que les tannins qui sont capables de se lier aux enzymes digestives et de les inhiber grâce à son richesse des groupements hydroxyles.

Les tanins se fixent aux α -amylases, la liaison peut avoir lieu sur le site actif de l'enzyme, ces liaisons engendrant des complexes du type enzyme-inhibiteur, puisque les tanins agissent comme inhibiteurs compétitifs des α -amylases (Kanda, 2004).

Les travaux faits par Hedqvist, 2004 ont indiqué que les tanins inhibent les glucosidases par la formation de complexes enzymatiques-tanins ou inhibent leur activité biologique par blocage du site actif.

Aussi les phlorotannins qui sont des composés phénoliques spécifiques pour les algues brunes, sont riches par des fonctions hydroxyles, ces dernières peuvent se lier au site actif de l'enzyme et empêcher la fixation de l'amidon.

En fonction de nos résultats obtenus sur l'inhibition de l' α -amylase, on suggère que *Dictyopteris polypodioides* peut présenter un effet bénéfique sur l'hyperglycémie des diabétiques et sur l'obésité.

4- L'immobilisation

L'activité d'enzyme immobilisée a été diminuée à (36.58%) et elle a enregistré à 1.8 U, par contre l'activité d'enzyme libre qui représente l'activité relative à (100%) avec une valeur de 4.92 U.

Cette perte de l'activité est due probablement à l'efficacité limitée par accès délicat du substrat (amidon) vers l'enzyme (α -amylase) à travers les billes d'alginate, et du produit (maltose) en dehors du polymère (alginate de sodium) (Benslma, 2016).

L'immobilisation de l' α -amylase telle que décrite ici, confère à l'enzyme un avantage non négligeable si l'on tient compte du fait que le support avec l'enzyme peut être réutilisé sur une longue période de temps (Noaddri T. 2011) malgré la perte de 63.42% d'activité.

L'activité relative d'enzyme libre en absence et en présence d'inhibiteur a été calculée à 4,94U (100%) et 1.8U (27.84%) respectivement. Cette perte d'activité est due à la présence d'inhibiteur compétitive qui entre en compétition avec le substrat (l'amidon) pour la liaison [E-S] (Moussard, 2002) ce qui présente une diminution d'activité.

L'activité inhibitrice de l'extrait phénolique acétone /eau (I_2) sur l' α -amylase libre a été évaluée à 27.84 %, et 28.46% sur l' α -amylase immobilisée. L'augmentation de l'activité est due probablement à la protection d'enzyme par les billes d'alginate ce qui ralentit le contact d'enzyme avec l'inhibiteur (I_2).

L'activité inhibitrice sur l'enzyme immobilisée a été déterminée selon la figure 30 à 28.45% par rapport à l'activité totale d'enzyme en absence d'inhibiteur.

L'activité inhibitrice (d'inhibiteur I_2 immobilisé) sur l'enzyme libre a été déterminée à 65.65% par rapport à l'activité totale d'enzyme en absence d'inhibiteur. Cette activité est due à la position d'inhibiteur à l'intérieure des billes d'alginate.

Ces derniers résultats permettent de contrôler le pouvoir d'inhibition des composés phénoliques sur l'enzyme α -amylase salivaire, grâce à leur immobilisation dans les billes d'alginate.

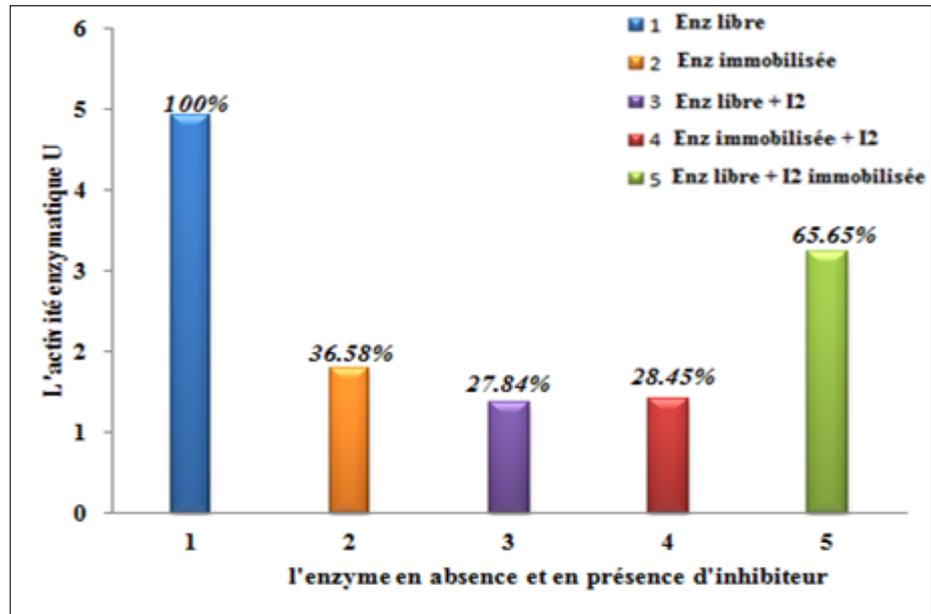


Figure 28: l'activité enzymatique en présence et en absence d'inhibiteur (libre et immobilisée)

Conclusion

L'extraction des composés phénoliques à partir de l'espèce d'algue brune *Dictyopteris polypodioides* a montré clairement des teneurs considérables de ces molécules bioactives par l'utilisation de technique de macération comme une méthode d'extraction, dont le meilleur solvant d'extraction a été enregistré avec le mélange acétone / eau.

Le test de l'activité de l'enzyme α -amylase salivaire montre que nos extraits phénoliques ont des effets d'inhibiteurs sur l'enzyme α -amylase salivaire, dont la meilleure inhibition a été enregistrée par l'extrait phénolique acétone/eau obtenue par macération.

L'étude cinétique de l'enzyme α -amylase salivaire et la représentation de Lineweaver-Burk nous a permis de déterminer: l'affinité de substrat **K_m** avec une valeur de **14,61 mM** et une vitesse maximale **V_m** de **0.55 U⁻¹**.

Aussi l'étude cinétique de cette enzyme en présence des deux extraits phénoliques acétone/eau montre que ces extraits présentent un pouvoir d'inhibition compétitive avec deux différentes valeurs de **K_i 0,85 μ g/ μ l** et **2,95 μ g/ μ l** respectivement.

L'immobilisation de l' α -amylase salivaire est effectuée par les billes d'alginate de calcium elle est caractérisée par l'amidon soluble comme substrat avec une perte d'activité **63.42 %** par rapport à l'enzyme libre. L'activité inhibitrice d'extrait phénolique acétone / eau I₂ sur α -amylase libre est de **27.84 %**, et **28.46%** sur l' α -amylase immobilisée. Par contre on a trouvé que l'activité d'inhibiteur immobilisé sur l'enzyme libre est de **65.65%**.

On conclut que les algues marines sont une source importante de constituants chimiques (phénols totaux) ayant un potentiel d'inhibition de l' α -amylase salivaire libre et immobilisée et peuvent être utilisés aussi comme source d'aliment fonctionnel ou thérapeutique.

L'inhibition de l' α -amylase salivaire reste une stratégie pour le traitement naturel des troubles de l'absorption des glucides, tels que le diabète et l'obésité, ainsi que les caries dentaires est les maladies parodontale. Pour mieux développer ce domaine des études profonde sont nécessaire a l'échelle protéomique et physiologique.

Perspectives

- A la lumière de ces résultats cette étude nécessite d'éventuelles études qui s'intéressent à :
- Tester l'effet de ces extraits *in vivo* sur l'hyperglycémie postprandiale dans les rats normaux.
 - Tester *in vitro* l'effet de ces extraits sur l'absorption intestinale des glucides.
 - Fractionner et identifier certains composants majoritaires dans cette espèce d'algue et tester leur effet *in vivo* et *in vitro*

✓ **Protocole courbe d'étalonnage d'acide gallique :**

concentration	175	150	125	100	75	50	25	10	5
Acide gallique (μl)	875	750	625	500	375	250	125	50	25
Eau distillé (μl)	125	250	375	500	625	750	875	950	975
Folin (ml)	1								

Incubation 4 min



Na Co ₃ (μl)	800	800	800	800	800	800	800	800	800
-------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Incubation 2 heures à température ambiante



Lire l'absorbance à 765 nm

✓ **Dosage de l'activité enzymatique :****Préparation des différentes solutions réactives :**➤ **Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) :**

Dans un Erlen Meyer, 1g de DNSA est solubilisé dans 40ml d'eau distillée. A cette solution 30g de tartrate double de sodium et potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 ml d'une solution de NaOH 2N rend le réactif limpide d'une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée et le réactif obtenu doit être conservé à l'abri de la lumière à +4C°.

➤ **Substrat :**

Dissoudre 1 g d'amidon soluble dans 100 ml de tampon phosphate préparé PH 6,9.

➤ **Protocole courbe d'étalonnage de maltose :**

Concentration mg / ml	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2
Solution maltose μ l	125	250	375	500	625	750	875	200
Eau distillé μ l	875	750	625	500	375	250	125	0
DNSA ml	1							

Incubation 10 min à 100°C

Refroidissement dans un bain de glace

Eau distillé ml	10	10	10	10	10	10	10	10
-----------------	----	----	----	----	----	----	----	----

Lire l'absorbance à 540 nm

➤ **Préparation de solution d'alginate de sodium préparé à 2% :**

Dissoudre 2 g d'alginate de sodium dans 100 ml de tampon phosphate préparé PH 6,9.



Figure 29 : la préparation des billes d'alginate

REFERENCES

- Abbas, A., Shameel, M., 2012.** Anatomical Studies On Dictyopteris Polypodioides (Phaeophycota) from the coast of Karachi, Pakistan. *Pak J Bot* 44, 1461–1465.
- Alais, C., Linden, G., Miclo, L., 2008.** Production and characterization of α -amylase. *Biochimie alimentaire*. (6): 67-71.
- Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A., Habail, F., 2012.** Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Science*. (4): 324-335.
- Alloué, W.A.M., 2008.** Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*.
- ALNAJJAR, A., 2014.** preparation et etudes cinetiques de la 9-fructosidase de levure (*saccharomyces cerevisiae*) soluble et immobilisee.
- Bahorun, T., 1997.** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritius*. 83-94.
- Belattmania, Z., Zrid, R., Reani, A., Elatouani, S., Sabbar, E.M., Mourtadi, A., El Moznine, R., Cherkaoui, O., Bentiss, F., Sabour, B., n.d.,2015.** Spectroscopic and rheological characterization of sodium alginate extracted from three Phaeophyceean seaweeds (*Dictyopteris polypodioides*, *Dilophus ligulatus* and *Halopteris scoparia*) from El Jadida shoreline–Morocco (Caractérisation spectroscopique et rhéologique des alginates de sodium extraits de trois algues marines Phaeophyceae (*Dictyopteris polypodioides*).
- Bennett, J.W., 1998.** Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.* (66): 101-107.
- Benslama, 2016.**genie enzymatique.
- Berry, D. R., Paterson, A., 1990.** Enzymes in food industry. *Enzyme chemistry impact and application*. (2): 306-351.
- Bolling, BW., Chen, CY., Blumberg, JB., 2009.**Tea and health:preventive and therapeutic usefulness in the elderly.*Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 12(1) : 42-8.
- Bruneton, J. (1999).**Pharmacognosie, plantes médicinales. *Phytochemistry*. (3): 1120.
- Bruyne, T., Pieters, Deelstra, H., Vlietink, A., 1999.**Condensed vegetable tannins :Biodiversity and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*. (27): 445-459.
- Budic-Letoc, I., Lovric, T., Pezo, I., Klujzuric, J.G., 2005.** Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced macération processes ofthe babcic grape variety. *Food Technology and Biotechnology*. 43 (1): 47-53.
- Burhan, A., Unaldi, N., Coral, G., Colak, O., Aygan, A., Gulnaz, O., 2003.** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic,alkaline and chelator resistant amylase from an *alkaliphilic Bacillus sp.*Isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. (38): 1397-1403.

REFERENCES

- Cetkovic, G., Canadanovic-Brunet, J., Djilas, S., Savatovic, S., Mandic, A., Tumbas, V. (2008).** Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*. (109): 340-347.
- Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D., 1983.** Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol*. (32): 995.
- Chiba, S., 1988.** Amyloglycosidase. *Handbook of Amylases and related enzymes*. 104-116.
- Coutouix, G., 1991.** Génie enzymatique. Paris, Masson et Dom. 116- 118 et 124- 127.
- Creis, E., 2015.** Etude de la voie de biosynthèse des phlorotannins chez les algues brunes, de la caractérisation biochimique d'enzymes recombinantes à l'étude des réponses écophysiological. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Dacosta, E., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. *Molecules*. 317.
- Delage, L., Meslet-Cladière, L., Potin, P., Goulitquer, S., 2011.** Utilisation de polyketide synthases de type III (PKS III) recombinantes d'algues brunes marines. Brevet N° 11 58728.
- Deniaud-Bouët, E., Kervarec, N., Michel, G., Tonon, T., Kloareg, B., Hervé, C., 2014.** Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann. Bot*. 114, 1203–1216.
- Diabaté, S., Taquet B., Renard, J.L., De Franqueville, H., Reiser P., 1990.** Analyse en CLHP des substances produites par le palmier à huile au cours de l'infection par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. *Perspective pour la sélection. Oléagineux*. 45 (2): 49-53.
- Feldmann, J., 1966.** Les types biologiques d'Algues marines benthiques. *Bull. Société Bot. Fr*. 113, 45–60.
- Formica, J-V., Regelson, W., 1995.** Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids. *Fd Chem.Toxic*. (33):1061-1080.
- Fogarty, W.M., Kelly, C.T., 1980.** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*. 115-170.
- Gàbor, M., Cody, V., Middleton, E J., Harborne, J B., Beretz, A., Liss, A R., 1988.** Plants Flavonoids in biology and Medecine II. Biochemical, *Cellular and Medecinal properties*. 1-15.
- Gallienne, E., 2005.** Synthèse et évaluation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues du salacinol. *Thèse de doctorat, UNIVERSITE BLAISE PASCAL, France*.
- Garrett, R. H., Grisham, C. M., 2000.** *Biochimie*.1292. **Guezennec, J., Debitus, C., 2006.** Les ressources marines de la Polynésie française: applications en matière de biotechnologie.
- Haborne, J.B., 1980.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de metabolites secondaire d'importance. phenolics in *Encyclopedia of plant physiology*. (8): 329-402.

REFERENCES

- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K., 2010.** Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.*11 (4):1365-1402.
- Haslam, E., 1998.** Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press, Cambridge (UK).
- Heller, R., Esnault, R., Delance, C., 1998.** Physiologie végétale 1-nutrition. *Dunod.* (6); 289-288.
- Hedqvist, H., 2004.** Metabolism of Soluble Proteins by Rumen Microorganisms and the Influence of Condensed Tannins on Nitrogen Solubility and Degradation. *Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala (Suweden).* 52-63.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., 2002.** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions.* (139): 1-21.
- Ishikawa, K., Matsui, S., Kobayashi, H., Nakatani, K., Honda., 1993.** Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic alpha-amylases. *Biochemistry.* (32): 259-265.
- Jacques, Q., Alexandre, S., Abe, F., 2007.** Dictionnaire médical de poche. *Elsevier Masson.*524: 153.
- Jormalainen, V., Honkanen, T., Koivikko, R., Eränen, J., 2003.** Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics. *Oikos.* (103): 640–650.
- Kameda, Y., Asano, N., Yoshikawa, M., Takeuchi, M., Yamaguchi, T, K., Matsui, S., Horii, H. J., 1984.** *Journal of the American Chemical Society.* (81): 188-193.
- Kanazawa, M., 1975.** The Production of Yeast from n Paraffins In/ S.R. *Tannenbaum and D.l.C. Wang, eds., Single-Cell Protein II .M IT Press.* 438-453.
- Kandra, L., Guémant G., Zajacz, A., Batta, G., 2004.** Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* (319): 1265-1271.
- Khacheba, I., Benamar, H., 2008.** Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales - sur l'alpha - amylase. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie. Université Amar Telidji - Laghouat.
- Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., Soro, S., 2010.** Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci.* (5): 550-558.
- Kao, YH., Chang, HH., Lee, MJ., Chen, CL., 2006.** Tea obesity, and diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* 50(2): 188-210.

REFERENCES

- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O., 2011.** α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*. 5(9): 19-29.
- Lamouroux, J.V.F., 1809.** Observations sur la physiologie des algues marines, et description de cinq nouveaux genres de cette famille. *Nouveau Bulletin des Sciences, par la Société Philomathique de Paris* 1: 330-333.
- Larpent-gourgaud, M. et Sanglier, J.J., 1992.** Inhibitors of α -Amylase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1575-6000.
- Leclerc N., 2012.** Amélioration de la technique d'enrobage de graines d'espèces endémiques avec des spores de champignons mycorhiziens pour la revégétalisation de site minier par hydroseeding.
- Macheix, J.J., Fleriet, A et Christian, A., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne. Mayer F. C. J., Lamer. (1959). Substrate cleavage point of the alpha-and beta-amylases. *Journal of the American Chemical Society*. (81): 188-193.
- Martins, J.C., Enassar, M., Willen, R., Wieruzeski, J.M., Lippens G., Wodak, S.J., 2001.** Solution structure of the main α -amylase inhibitor from amaranth seeds. *Eur. J. Biochem*. (268): 2379-2389.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R., 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. (51): 304-315.
- Mbaveng, A-T., Ngameni Kuete, V., Simo, I-K., Ambassi, P., Roy, R., Bezabih, M., Etoa, F-X., Ngadjui, B-T., Abegaz, B-M., Meyer, J-J-M., Lall, N., Beng, V P., 2008.** Antimicrobial activity of crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. (116): 483-489.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O., 2001.** Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. (91): 83-93.
- Melo, F.R., Sales, M.P., Silva, L.S., Franco, O.L., Bloch, C. Jr., Ary, M.B., 1999.** α -Amylase from cowpea seeds. *Prot. Pept.Lett.* (6): 387-392.
- Mercier, C., 1985.** Les enzymes amylolytiques. *Hydrolases et dépolymérasés*. 110-140.
- Meslet-Cladiere L, Delage L, J.-J. Leroux C, et al., 2013.** Structure/Function Analysis of a Type III Polyketide Synthase in the Brown Alga *Ectocarpus siliculosus* Reveals a Biochemical Pathway in Phlorotannin Monomer Biosynthesis. *Plant Cell* 25:3089–3103.
- Michaelis, L., Menten M. L., 1993.** *Biochem.* (49):333-369.
- Milner, J.A., Martin, D.J., Mith, A., 1997.** Two-stage inoculate for the production of alphaamylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and microbial technology*. 382 - 386.

REFERENCES

- Mohammedi, Z., Atik, F., 2011.** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter. J. Pharma. Bio. Sci.*(2): 609-615.
- Mokrani, N., 2013.** Préparation et étude du comportement de membranes biopolymères alginate de sodium/chitosane.
- Moussard, C., 2002.** *Biochimie structurale et métabolique: médecine, pharmacie, sciences.* Bruxelles: De Boeck Université.324.
- Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C., Vincieri, F.F., 2004.** Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compound content. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* (34): 349-357.
- Murray, R. K, D. K., Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell., 2002.** *Biochimie de Harpe.* (25): 933.
- Nouadri T., 2011.** L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Thèse de Doctorat, Université Mentouri – Constantine.
- Okuda, T., 2005 .** Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry.* (66): 2012-2031.
- Panchal, C. J., 1990.** Yeast strain selection. *Marcel Dekker.* 189.
- Paterson, A ., 1990 .** Enzymes in food industry *In: Sucking C.J. Enzyme chemistry impact and application.* (2): 306-351.
- Pandey, A., Nigam P., Soccol, C.R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R., 2000.** Advances *In. Microbial amylases. Biotechnology. Appl. Biochem.* (31): 135-152.
- PDB (protein data base) 2006.** Alpha-amylases.
- Potin, P., Bouarab, K., Salaun, J-P., et al., 2002 .** Biotic interactions of marine algae. *Curr Opin Plant Biol.* (5): 308–317.
- Ragan, CM., Glombitza, KW., 1986.** Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research.* (4): 129-241. **Raven, P., Evert, R., Eichhorn, S., Bouharmont, J., 2014.** *Biologie végétale, 3e édition.* ed. De Boeck, Bruxelles.
- Saha, S., Verma, R., 2012.** Inhibitory potential of traditional herbs on α -amylase activity. *Pharm Biol.* 50 (3): 326-33.
- Sales, P. M., Souza, P.M., Simioni, L. A., MagaJhes, P.D.O., Damaris, S., 2012.** α amylase Inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *Pharmaceut Sci.* 15(1): 142-183.
- Sardar m. M., Gupta n., 1998.** Alginate beads as an affinity material for alpha amylases; Chemistry Department, Indian Institute of Technology, Delhi, Hauz Khas, New Delhi-110016, India: *Bioseparation* (7):159-165.

REFERENCES

- Schuler, H.T., Poppy, M.G., Kerry, B.R., Denholm, L., 1998.** Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* (16): 168-174.
- Spedding, G., Ratty A., Middleton, E.J., 1989.** Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir.* 12 (2): 99-110.
- Takeuchi, T., Matsushima, T., Sugimura, T., 1975.** Separation of human alpha -amyase isozymes by electro-focusing and their immunological properties. *Clinica Chimica Acta.* (60): 207-213.
- Tundis, R., Loizzo MR, Menichini, F., 2010.** Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem,* 10:315-331.
- Vallier, P., Bata, J., Colabert, L., 1977.** Optimal conditions of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media. *Ann.Microbial.*128 (3):359-71.
- Van Der Maarel, MJ., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002.** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol.* (94):137-55.
- Vauchel, P., 2007.** Optimisation de procédés innovants pour l'obtention des Phycocolloïdes.
- Vertiani, C., Maeder, D-I., Yip, K-S., Stilman, T-J., Britten, K-L., Rice, D-H., Klump, H., Robb, F-T., 1998.** Protein thermostability above 100 °C a key role for ionic interaction. *Proc.Nat.Sci.* (95): 12300-12305.
- Vignais, P., 2001.** *La biologie, des origines à nos jours: une histoire des idées et des hommes.* Les Ullis: EDP sciences.478.
- Yamamoto, T., 1995.** Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes. *Boca Raton.* 206.
- Zamora-Ros R., Forouhi, NG., Woudenbergh, GJ., Langenberg, C., Riboli, E., Wareham, NJ., 2014.** Dietary intakes of individual flavanols and flavonols are inversely associated with incident type 2 diabetes in European populations. *J Nutr.* 144 (3): 335-343.

Site web :

- (1) Mer-veille.com Informations spécialisées et services pour les énergies marines renouvelables Les algues marines : une ressource à exploiter Daily News N°288 - 23/11/2012

الملخص :

المستخلصات الطبيعية الناتجة من الطحالب البنية تحتوي على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيا في هذا السياق ، فاننا نقوم بتقييم النشاط المثبط لهذه المستخلصات مخبريا للنوع *Dictyopteris polypodioidese* على نشاط α الاميلاز اللعابي الحر و المرتبط.

مهمتنا في المقام الاول تقوم على استخراج مادة البوليفينول باستخدام مذيبات مختلفة ، يليها البحث عن تأثير هذه المستخلصات البوليفينولية على α الاميلاز اللعابي الحر و المرتبط . وجود البوليفينول في مستخلصاتنا مؤكد من خلال تحليل كمي بناء على تحديد المركبات الفينولية، اين اكدت التقارير وجود كمية تقدر ب $15.05 \mu\text{g Eq AG} / \text{mg d'extract}$ من اجل المستخلص أسيتون / ماء و $\mu\text{g Eq AG} / \text{mg}$ ب 8.13 d'extract من اجل مستخلص الأسيتون . هذا يؤكد لنا ان النقع باستعمال الخليط أسيتون/ ماء هو الطريقة للامثل لاستخلاص البوليفينول من *Dictiopteris polypodioides* .

فيما يخص الجزا الثاني، فقد درسنا التأثير المثبط لهذه المستخلصات الفينولية على نشاط الانزيم اللعابي α الاميلاز ، وجدنا ان المستخلصين الفينولية للأسيتون / ماء و للأسيتون تملك نشاط تثبيطي على الاميلاز اللعابي بمعدل نشاط يقدر ب % 42.07 و 21.13 . في حين ان مستخلصي الطريقة الثانية (الطحن) سجلت نشاط تثبيطي اقل من 20% بنشاط يقدر ب 15% و 8% على التوالي

من خلال نتائجنا فان تأثير مختلف التراكيز للمستخلص أسيتون / ماء على النشاط الاميلازي يسجل تثبيط يتناسب طرديا مع تركيز المستخلص ، مع انخفاض في النشاط يقدر ب 72.15%

وفقا للدراسة الحركية لانزيم α اميلاز اللعابي بواسطة تمثيل Linewerver-Burk تمكنا من تحديد ما يلي : Km بقيمة تقدر ب 14.61 mM ، و Vm ب 0.56 U^{-1} . اذن نوع المثبيط هو تنافسي بالنسبة للمستخلصين البوليفينولية أسيتون / ماء و أسيتون مع ثابت التثبيط $\text{Ki} = 0,85 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ و $2,94 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ تسلسليا.

من اجل احسن استعمال للانزيم ، طبقنا تقنية الارتباط في حبيبات الالجيئات و قمنا بدراسة تأثيرها على نشاط الانزيم α اميلاز اللعابي. المرتبط فقد 63.42% من نشاطه بالنسبة للانزيم الحر . النشاط التثبيطي للمستخلص الفينولي أسيتون / ماء I2 على α الاميلاز الحر هي 27.84% ، و 28.45% على α الاميلاز المرتبط . على عكس ما وجدناه بالنسبة لنشاط المثبط المرتبط على الانزيم الحر 65.65% . الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو مراقبة القوة التثبيطية للمركبات الفينولية .

الكلمات المفتاحية : الانزيم α اميلاز اللعابي - *Dictyopteris polypodioides* - المستخلصات الفينولية - تثبيط - تقنية الارتباط في حبيبات الالجيئات

Abstract

The natural extracts of brown algae contain a variety of biologically active molecules. In this context, we evaluated *in vitro* inhibitory activity of various extracts of algae species *Dictyopteris polypodioides* on the activity of free salivary α -amylase and immobilized. Our study consist primarily the extraction of polyphenols with different solvents and method used, followed by the research of the effect of phenolic extracts on the free α amylase and immobilized.

The presence of polyphenols in our extracts is confirmed by a quantitative analysis based on the determination of phenolic compounds, wherein the content of these compounds is estimated at (15,05 μ g Eq gallic acid / mg extract) to extract acetone / water and (8,13 μ g Eq gallic acid / mg extract) for the acetone extract. This allowed us to demonstrate that the maceration with the solvent acetone / water is an optimum method of extracting polyphenols from *Dictyopteris polypodioides*.

Concerning the second part, we studied the inhibitory effect of these phenolic extracts on the activity of salivary α -amylase, we found that the two phenolic extracts of acetone / water and acetone have inhibitory activity on the salivary α -amylase with an inhibition rate of 42.07% and 21.13% respectively. Whereas the 2 other extracts of second extraction technique (grinding) showed a lower rate of inhibition to 20% that is to say with an inhibition rate of 15% and 8% respectively. Our results show the effect of different concentrations of acetone extract / water on the amylase activity, mark a series of dependent inhibition concentration of the extract, with a significant loss activity that reached a rate of 72.15%.

The kinetic study of the enzyme salivary α -amylase and Lineweaver-Burk allowed us to determine: the substrate Km affinity with a 14.61 mM and a maximum speed V m of 0.55 U⁻¹. As to the type of inhibition, it is a competitive inhibitor for both phenolic extracts of acetone / water and acetone, with the constant of inhibition (Ki) of 0,85and 2,94 μ g/ μ l respectively.

For the best use of the enzyme, we applied the immobilization in alginate beads and the study of its effect on the activity of salivary α -amylase. The enzyme immobilized lost 63.42% activity compared to the free enzyme. The inhibitory activity phenolic extracts of acetone / water I₂ on free α -amylase is 27.84%, and 28.46% of α -amylase immobilized.

On the other side it was found that the activity of the immobilized inhibitor on free enzyme is 65.65% and the main purpose of this study is to control the power of inhibition of phenolic compounds

Keywords: *Salivary α -amylase, Dictyopteris polypodioides, Phenolic extracts, immobilization in alginate beads.*

Résumé

Les extraits naturels issus des algues brunes contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons évalué *in vitro* l'activité inhibitrice des différents extraits d'une espèce d'algue *Dictyopteris polypodioides* sur l'activité d' α -amylase salivaire libre et immobilisé. Notre travail consiste en premier lieu l'extraction des polyphénols avec des différents solvants utilisés, suivi par la recherche de l'effet des extraits phénoliques sur l' α amylase salivaire libre et immobilisé.

La présence des polyphénols dans nos extraits, est confirmée par une analyse quantitative basée sur le dosage des composés phénoliques, où la teneur de ces composés est estimée à **(15,05 μ g Eq AG / mg d'extrait)** pour l'extrait acétone/eau, et **(8,13 μ g Eq AG / mg d'extrait)** pour l'extrait cétonique. Cela nous a permis de démontrer que la macération avec le solvant mélange acétone/eau reste une méthode optimale d'extraction des polyphénols à partir *Dictyopteris polypodioides*.

En ce qui concerne la seconde partie, nous avons étudié l'effet inhibiteur de ces extraits phénoliques sur l'activité d' α -amylase salivaire, nous avons trouvés que les deux extraits phénoliques de l'acétone/eau et de l'acétone ont une activité inhibitrice sur l' α -amylase salivaire avec un taux d'inhibition de **42,07% et 21,13%** respectivement. Alors que les 2 autres extraits de la deuxième technique d'extraction (broyage) ont enregistré un taux d'inhibition inférieure à **20%** c'est-à-dire avec un taux d'inhibition de **15%** et **8%** respectivement. D'après nos résultats l'effet des différentes concentrations de l'extrait acétone /eau sur l'activité amylasique, marque une série d'inhibition proportionnelle à la concentration de l'extrait, avec une perte d'activité importante qui atteint un taux de **72,15%**.

L'étude cinétique de l'enzyme α -amylase salivaire et la représentation de Lineweaver-burk nous a permis de déterminer: l'affinité de substrat **K_m** avec une valeur de **14,61 mM** et une vitesse maximale **V_m** de **0.55 U^{-1}** . Quant au type d'inhibition, il s'agit d'un inhibiteur compétitif pour les deux extraits phénoliques de l'acétone/eau et de l'acétone avec les constants d'inhibition (**K_i**) de **0,85 et 2,95 μ g/ μ l** respectivement.

Pour la meilleure utilisation de l'enzyme, nous avons appliqué l'immobilisation dans les billes d'alginate et l'étude de son effet sur l'activité de l' α -amylase salivaire. L'enzyme immobilisé a perdu **63.42 %** d'activité par rapport à l'enzyme libre.

L'activité inhibitrice d'extrait poudre acétone / eau I_2 sur α -amylase libre est de **27.84 %**, et **28.46%** sur l' α -amylase immobilisé. Par contre on a trouvé que l'activité d'inhibiteur immobilisé sur l'enzyme libre est de **65.65%**. Le but principal de cette étude est de contrôler le pouvoir d'inhibition des composés phénoliques.

Mots clés : *α -amylase salivaire, Dictyopteris polypodioides, Extraits phénoliques, Inhibition, Immobilisation dans les billes d'alginate*

Année universitaire : 2015/2016

Présenté par :

- BOUDJEDOUR Nour El Houda
- BERTIL Aicha

L'activité inhibitrice des composés phénoliques de *Dictyopteris polypodioides* sur l' α -amylase salivaire libre et immobilisée *in vitro*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en
Analyse Protéomique et Santé

Résumé :

Les extraits naturels issus des algues brunes contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons évalué *in vitro* l'activité inhibitrice des différents extraits d'une espèce d'algue *Dictyopteris polypodioides* sur l'activité d' α -amylase salivaire libre et immobilisée. Notre travail consiste en premier lieu l'extraction des polyphénols avec des différents solvants utilisés, suivi par la recherche de l'effet des extraits phénoliques sur l' α -amylase salivaire libre et immobilisée. La présence des polyphénols dans nos extraits, est confirmée par une analyse quantitative basée sur le dosage des composés phénoliques, où la teneur de ces composés est estimée à **(15,05 μ g Eq AG / mg d'extrait)** pour l'extrait acétone/eau, et **(8,13 μ g Eq AG / mg d'extrait)** pour l'extrait acétonique. Cela nous a permis de démontrer que la macération avec le solvant mélange acétone/eau reste une méthode optimum d'extraction des polyphénols à partir *Dictyopteris polypodioides*. En ce qui concerne la seconde partie, nous avons étudié l'effet inhibiteur de ces extraits phénoliques sur l'activité d' α -amylase salivaire, nous avons trouvés que les deux extraits phénoliques de l'acétone/eau et de l'acétone ont une activité inhibitrice sur l' α -amylase salivaire avec un taux d'inhibition de **42,07% et 21,13%** respectivement. Alors que les 2 autres extraits de la deuxième technique d'extraction (broyage) ont enregistré un taux d'inhibition inférieure à **20%** c'est-à-dire avec un taux d'inhibition de **15% et 8%** respectivement. D'après nos résultats l'effet des différentes concentrations de l'extrait acétone /eau sur l'activité amylasique, marque une série d'inhibition proportionnelle à la concentration de l'extrait, avec une perte d'activité importante qui atteint un taux de **72,15%**. L'étude cinétique de l'enzyme α -amylase salivaire et la représentation de Lineweaver-Burk nous a permis de déterminer: l'affinité de substrat **K_m** avec une valeur de **14,61 mM** et une vitesse maximale **V_m** de **0.55 U^l** . Quant au type d'inhibition, il s'agit d'un inhibiteur compétitif pour les deux extraits phénoliques de l'acétone/eau et de l'acétone avec les constants d'inhibition (**K_i**) de **0,85 et 2,95 μ g/ μ l** respectivement. Pour la meilleure utilisation de l'enzyme, nous avons appliqué l'immobilisation dans les billes d'alginate et l'étude de son effet sur l'activité de l' α -amylase salivaire. L'enzyme immobilisée a perdu **63.42 %** d'activité par rapport à l'enzyme libre. L'activité inhibitrice d'extrait poudre acétone / eau I_2 sur α -amylase libre est de **27.84 %**, et **28.46%** sur l' α -amylase immobilisée. Par contre on a trouvé que l'activité d'inhibiteur immobilisé sur l'enzyme libre est de **65.65%**. Le but principal de cette étude est de contrôler le pouvoir d'inhibition des composés phénoliques.

Mots clés : α -amylase salivaire, *Dictyopteris polypodioides*, Extraits phénoliques, Inhibition, Immobilisation dans les billes d'alginate

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'Enzymologie-Département de Biochimie Moléculaire et Cellulaire

Jury d'évaluation :

Président du jury :	NECIB Y	Professeur - UFM Constantine
Rapporteur :	NOUADRI T.	M C A - UFM Constantine
Examinatrice :	BENNAMOUN L.	M A A - UFM Constantine

Date de soutenance : Le 26/06/2016