

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieure et de la recherché scientifique

Université



Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

## *Mémoire*

*En vue d'obtention du diplôme Master en Biochimie*

*Option: Analyse Protéomique et Santé*

## *Thème*

**L'effet de l'activité inhibitrice des extraits  
polyphénoliques des algues marines sur l' $\alpha$  –amylase  
salivaire *in vitro***

*Réalisé par*

*BENKHELLAF Amina*

*et*

*BIAD Ibtissem*

*Date de soutenance: 25/06/2014*

*Devant le jury*

***Président : NECIB Y.***

Professeur Université Constantine 1.

***Rapporteur : NOUADRI T.***

M. C. A. Université Constantine 1.

***Examinatrice : BENNAMOUN L.***

M. A. A. Université Constantine 1.

Année Universitaire: 2013/2014

# Remerciement

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.*

*En second lieu, nous tenons à remercier sincèrement et infiniment notre honorable encadreur **NOUADRI. T.** d'avoir accepté d'encadrer ce travail également pour ses orientations, sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'elle nous a accordée tout au long de cette étude. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.*

*Nos vifs remerciements également tous les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail: le Président de jury **Pr. NECIB. Y**, l'examinatrice **BENNAMOUN. L** de l'Université Constantine 1.*

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

***Ibtissem et Amina***

## *Dédicaces*

*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour*

*A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus durs et  
ceux à qui j'ai tant*

*A mes parents: Maman "que Dieu la garde dans son vaste paradis, Incha-  
allah" et mon père.*

A

*Mes chères Soeurs, mes bougies: Dalel, Asma et Afef.*

*Cher frère Housseem-Eddin.*

*Sofiane, ma grande mère, mon grand père.*

A

*toutes les personnes qui sont très chers à mon Cœur: tante cherifa, Assil,  
Djawad, Firas, laïla et mes amies pour leurs encouragements et leur soutien.*

*IBTISSEM*

# *Dédicaces*

*A mon défunt père,*

*A ma mère, source de mon bonheur,  
qui m'a toujours aidé et guidé vers le chemin  
de la réussite*

*A toute ma famille et mes amis,*

*Je dédie ce mémoire.*

*Amina*

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 : les algues</b>	
1. Définition.....	2
2. Caractères généraux des algues.....	2
3. Classification des algues.....	3
3.1. Les <i>Chlorophycées</i> .....	3
3.2. Les <i>Phéophycées</i> .....	4
3.3. Les <i>Rhodophycées</i> .....	6
4. Composition des algues.....	8
5. L'intérêt des algues.....	8
5.1. Alimentation .....	8
5.2. Cosmétologie.....	9
5.3. Agriculture et élevage.....	9
5.4. Santé.....	9
5.5. Pharmaceutique.....	10
<b>Chapitre 2: Les composés phénoliques</b>	
1. Définition.....	11
2. Classification.....	12
2.1. Les flavonoïdes .....	13
2.1.1. Localisation et distribution.....	13
2.1.2. Structure chimique et classification.....	13
2.2. Les tanins.....	14
2.2.1. Localisation et distribution .....	14
2.2.2. Structure chimique et classification.....	14
3. Importance biologique et biochimique.....	16
<b>Chapitre 3: <math>\alpha</math>-amylase</b>	
1. Les alphas amylases.....	18

1.1. Nomenclature.....	18
1.2. La structure de l'alpha amylase.....	18
1.3. Composition des oses.....	20
1.4. La composition des acides amines.....	20
1.5. Les différentes sources de l'alpha-amylase.....	21
1.5.1. L'origine animale.....	21
1.5.2. L'origine végétale.....	22
1.5.3. L'origine microbienne.....	23
1.5.4. L'origine levurienne.....	23
1.6. Caractéristique de l'alpha amylase.....	25
1.6.1. Poids moléculaire.....	25
1.6.2. Température optimal .....	25
1.6.3. pH optimum.....	25
1.7. Activateurs et inhibiteurs de l'alpha-amylase .....	26
1.7.1. Activateurs et inhibiteurs inorganiques .....	26
1.7.2. Activateur et inhibiteur organiques .....	28

#### **Chapitre 4: L'intérêt de l'inhibition alpha-amylase**

1. Les inhibiteurs.....	29
2. Différents types cinétiques d'inhibiteurs d'enzymes.....	29
2.1. Inhibiteur compétitive.....	29
2.2. Inhibiteur incompétitif .....	30
2.3. Inhibiteur non compétitif .....	32
3. Intérêt de l'inhibition de l'alpha amylase.....	34

#### **Matériel et méthode :**

1. Le matériel biologique.....	35
1.1. Echantillonnage.....	35
1.2. Préparation des extraits d'algues.....	35
1.3. Dosages des polyphénols totaux par colorimétrie.....	36
1.3.1. Le principe du dosage Folin-Ciocalteu.....	36

1.3.2. La méthode de Folin – Ciocalteu.....	37
1.4. Préparation des extraits enzymatiques.....	37
1.4.1. Préparation de la salive.....	37
1.4.2. Dosage de l'activité $\alpha$ -amylase salivaire.....	38
1.5. Dosage de l'activité amylasique en présence et en absence de l'inhibiteur.....	38
1.5.1. Méthode.....	39
1.5.2. Protocole.....	39
1.6. Dosage de l'activité d'enzyme $\alpha$ -Amylase en présence de <i>Padina pavonica</i> et <i>Ulva lactuca</i> .....	39
<b>Résultats et discussion:</b>	
1. Rendement d'extraction des polyphénols .....	40
1.1. Phase aqueuse .....	40
1.2.Phase Ethanolique .....	41
1.3. Phase Acétonique.....	42
2. L'activité inhibitrice des extraits d'algues.....	44
3. Type d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits de <i>Padina pavonica</i> , <i>Ulva</i> <i>lactuca</i> .....	45
Conclusion.....	49
ملخص.....	50
Abstract.....	51
Référence.....	52
Annexe	

<b>Figure 1:</b> Touffe d' <i>Ulva lactuca</i> en place (originale).....	7
<b>Figure 2:</b> Touffe <i>Dictyota dichotoma</i> en place (originale).....	7
<b>Figure 3:</b> Touffes d' <i>Enteromorpha linza</i> en place (originale).....	7
<b>Figure 4:</b> Touffe <i>Jania rubens</i> en place (originale).....	7
<b>Figure 5:</b> Aspect général de <i>Padina pavonica</i> .....	7
<b>Figure 6:</b> Quelques structures des composants phénoliques.....	11
<b>Figure 7:</b> Squelette de base des flavonoïdes .....	13
<b>Figure 8:</b> Structure des tanins condensés et leur monomère .....	15
<b>Figure 9:</b> Structure des tanins hydrolysables et les acides associés .....	15
<b>Figure 10:</b> Structure tridimensionnelle de $\alpha$ -amylase d'après Payan, 2004.....	19
<b>Figure 11:</b> Graphique Michaelis-Menten d'inhibition compétitive.....	30
<b>Figure 12:</b> Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition compétitive.....	30
<b>Figure 13:</b> Graphique Michaelis-Menten d'inhibition incompétitive.....	31
<b>Figure 14:</b> Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition incompétitive.....	32
<b>Figure 15:</b> Graphique Michaelis-Menten d'inhibition non compétitive.....	33
<b>Figure 16:</b> Graphique Lineweaver –Burk d'inhibition noncompétitive.....	33
<b>Figure 17:</b> Echantillonnage .....	35
<b>Figure 18:</b> Les extraits aqueux bruts.....	36
<b>Figure 19:</b> Les extraits acétoniques bruts.....	36
<b>Figure 20:</b> Les extraits éthanoliques bruts.....	36
<b>Figure 21:</b> Courbe étalonnage de phenol.....	37
<b>Figure 22:</b> Courbe étalon pour le dosage du maltose.....	38
<b>Figure 23:</b> Rendement d'extraction des polyphénols (phase aqueuse).....	41
<b>Figure 24:</b> Rendement d'extraction des polyphénols (phase éthanolique).....	42
<b>Figure 25:</b> Rendement d'extraction des polyphénols (phase acétonique).....	43
<b>Figure 26:</b> Histogramme représentant le pourcentage d'activité amylasique observé en présence de 0.05 $\mu$ l d'extrait.....	45
<b>Figure 27:</b> La cinétique enzymatique de l' $\alpha$ -amylase.....	45
<b>Figure 28:</b> Représentation de Lineweaver-Burk de l'enzyme $\alpha$ - amylase.....	46
<b>Figure 29a:</b> Représentation de Lineweaver-Burk de l'enzyme $\alpha$ -amylase.....	47
<b>Figure 29b:</b> Représentation graphiques $1/V = f([S])$ des deux espèces.....	48



<b>Tableau 1:</b> Les principales classes de composés phénoliques.....	12
<b>Tableau 2:</b> Représente la composition des oses de l' $\alpha$ amylase.....	20
<b>Tableau 3:</b> Représente les acides aminés N et C terminal de quelques alphas amylases...	20
<b>Tableau 4:</b> Les différentes origines de l' $\alpha$ amylase.....	24
<b>Tableau 5:</b> Activateurs et Inhibiteurs l' $\alpha$ -amylase.....	27
<b>Tableau 6:</b> Activateurs et inhibiteurs l' $\alpha$ -amylase salivaire.....	28
<b>Tableau 7:</b> Echantillonnage.....	35
<b>Tableau 8:</b> Extraction des polyphénols (phase aqueuse).....	40
<b>Tableau 09:</b> Extraction des polyphénols (phase éthanolique).....	41
<b>Tableau 10:</b> Extraction des polyphénols (phase acétonique).....	42
<b>Tableau 11:</b> Activité amylasique en absence et en présence de l'inhibiteur [0.05 $\mu$ l].....	46
<b>Tableau 12:</b> Type d'inhibition des deux espèces d'algues <i>Padina pavonica</i> , <i>Ulva lactuca</i> ..	48

<b>μl :</b>	micro-litre.
<b>C° :</b>	Degré Celsius.
<b>DNSA :</b>	L'acide 3,5 dinitrosalicylique.
<b>h :</b>	heure.
<b>KDa :</b>	kilo Dalton.
<b>pH :</b>	potentiel d'Hydrogène.
<b>Sp :</b>	Espèce.
<b>p/v :</b>	poind par volume.
<b>N :</b>	Normalité.
<b>min :</b>	Minute.
<b>g :</b>	gramme.
<b>μg :</b>	micro-gramme.
<b>A1 :</b>	<i>Dictyota dichotoma</i> (algue brune)
<b>A2 :</b>	<i>Padina pavonica</i> (algue brune)
<b>A3 :</b>	<i>Jania rubens</i> (algue rouge)
<b>A4 :</b>	<i>Enteromorpha linza</i> (algue verte)
<b>A5 :</b>	<i>Ulva lactuca</i> (algue verte)
<b>Vmax :</b>	vitesse maximal.
<b>I :</b>	inhibiteur.
<b>ml :</b>	millilitre.
<b>m :</b>	mètre.
<b>cm :</b>	centimètre.
<b>mm :</b>	millimètre.
<b>Km :</b>	constante de Michaelis.
<b>AP :</b>	acide phénolique.
<b>Ki :</b>	constante d'inhibition

## Introduction :

Les algues d'origine marine occupent une place importante en pharmacologie et en médecine (Mohamed et Hashim, 2012). Elles sont considérées comme une source d'application potentielle dans de nombreux secteurs industriels: cosmétologie, agriculture, élevage (Kornprobst, 2005).

Les algues sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, (principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) (King et Young, 1999). Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, antimicrobiens. Ils sont utiles dans la formulation de compléments nutritionnels ou médicamenteux, le traitement de l'obésité et de diabète (Bahorun, 1997; Cetkovic *et al*, 2008). Avec un environnement délétère qui favorise l'obésité et le diabète, un milliard des personnes sont actuellement en surpoids (Falchi, Takousis, 2014). L'inhibition des enzymes digestives, en particulier des enzymes hydrolysant les polysaccharides tel que l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase est l'une des activités biologiques les plus importantes des polyphénols (Gao *et al* 2008).

Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase sont capables de réduire la digestion des glucides, provoquant ainsi une réduction de la vitesse d'absorption du glucose. Plusieurs recherches ont montré que les substances polyphénoliques d'origines d'algues sont des inhibiteurs efficaces pour ces enzymes digestives provenant des ressources naturelles (Gao *et al*, 2008). Ainsi ces inhibiteurs sont utilisés dans l'équilibre et le contrôle de l'hyperglycémie chez les diabétiques et les obèses (Franco *et al*, 2002).

Dans ce présent travail, l'objectif essentiel est d'évaluer l'activité inhibitrice des extraits d'algues (*Ulva lactuca*, *Enteromorpha linza*, *Padina pavonica*, *Jania rubens*, *Dichtyiota dichotoma*) dans les différentes phases: aqueuse, acétonique et éthanolique sur l' $\alpha$ -amylase salivaire. Pour cela nous avons testé l'activité inhibitrice des cinq espèces d'algues sur l'activité amylasique. Et aussi nous avons déterminé le type et la constante d'inhibition ( $K_i$ ) des deux espèces *Padina pavonica* (algue brune) et *Ulva lactuca* (algue verte).

# Chapitre 1 : Les algues

D'origine très ancienne, les algues marines existent depuis des millions d'années. Très diversifiées (*Cyanophycées*, *Rhodophycées*, *Chromophycées* et *Chlorophycées*), les algues comptent plus de 130.000 espèces dans le monde (Perez, 1997). Les algues d'origine marine occupent une place importante en industrie, pharmacologie et médecine dans ce domaine, plusieurs algues marines possèdent des activités inhibitrices de plusieurs enzymes et des actions vermifuge (*Alsidium helminthocorton*, *Digenea simplex*), hypoglycémiant (*Corallina*, *Cystoseira*, *Pterocladia*, etc...), Hypotensive (*Chondrus*, *Laminaria*, etc...), anticoagulante (*Chondrus*, *Corallina*, *Delessaria*, *Laminaria*, etc...), cardiotonique (*Undria pinnatifida*), anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique et antivirale (*Chondrus*, *Cladophora*, *Ulva*, *Fucus*) (Nakajima, 2009).

## 1. Définition

Les algues regroupent un ensemble de végétaux photosynthétiques très divers et dont l'appareil végétatif relativement simple est appelé « thalle », elles ont des formes et des dimensions très variables. Certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de longueur, mais elles ont toutes des caractères communs. Elles sont essentiellement aquatiques dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres au contraire supportent dans les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles) (Kornprobst, 2005).

## 2. Caractères généraux des algues

Les algues sont des végétaux, ne possédant ni feuilles, ni tiges, ni racines. Leur corps est un thalle, d'où leur nom de thallophyte. Elles se reproduisent sans jamais donner des fruits, graines ou fleurs d'où le terme de cryptogames. On connaît actuellement des milliers d'espèces, vivant principalement dans les eaux salées et douces et exceptionnellement en milieu terrestre. Les algues réalisent toutes la photosynthèse et contiennent donc de la chlorophylle, cependant la couleur du thalle n'est pas toujours verte, car un pigment spécifique lié à la division de l'algue. Ainsi une première classification pourra être faite selon la couleur de l'algue (Morris, Lewin 1967-1974).

-Absence de pigments surnuméraires --- >>>Algues vertes ou *Chlorophycées*

--->>>Bleu : Algues bleues ou *Cyanophycées*

- Présence de pigments surnuméraire --- >>>Brune: Algues brunes ou *Phéophycées*

--- >>>Rouge : Algues rouges ou *Rhodophycées*

### 3. Classification des algues

La classification des algues est réalisée d'après leurs caractères d'ordre cytologiques et biochimiques ainsi que par leurs différences de structure et de mode de reproduction (Škaloud, 2006). La nature et la localisation des pigments permettent de définir plusieurs grands groupes d'algues (Lamouroux, 1813 ; Kützing, 1843 ; de Reviers, 2002). Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, la couleur des plastes des algues permet de distinguer les algues rouges (*Rhodophytes*), brunes (*Chromophytes*), vertes (*Chlorophytes*) et des bleues.

#### 3.1. Les *chlorophycées*

Les *Chlorophycées* ou algues vertes constituent la classe la plus importante par le nombre. Environ 7.000 espèces sont actuellement recensées dont un millier qui vit en milieu marin. En raison de leur équipement photosynthétique, plusieurs espèces de *Chlorophycées* vivent à une profondeur inférieure à 5 mètres. Les *Chlorophycées* ou algues vertes, jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux. Elles sont de formes très variées, uni ou pluricellulaires. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre (Pérez, 1997). Parmi les espèces étudiés :

##### ➤ *Ulva lactuca*

*Ulva lactuca* est une algue verte foliacée d'un vert brillant ou jaune clair, qui vit fixée par un très petit disque de fixation, surmonté d'un stipe très court. Elle est formée d'un thalle mince et aplati, souvent lobé, ne comportant que deux couches de cellules, possédant chacune un seul chloroplaste. Elle peut atteindre 1 mètre de longueur dans les eaux riches en matières organiques (Gayral, 1975).

On la rencontre en Arctique, dans l'Océan Atlantique de l'Arctique aux côtes sud-américaines, en passant par les îles Caraïbes, en Méditerranée et en mer Noire, mais aussi dans l'Océan Pacifique depuis les côtes américaines, sur les côtes australiennes et néo-zélandaises, cette algue verte est pourtant consommable...! Riches en fer, les laitues de mer peuvent entrer dans la composition de salades crues ou cuites, purées, cocktail. (Jean-Claude Julien, 2010-2014) (**Figure 1**).

### Classification d'*Ulva lactuca* (Linné, 1753)

Embranchement	<i>Chlorophyta</i>
Classe	<i>Ulvophyceae</i>
Ordre	<i>Ulvales</i>
Famille	<i>Ulvaceae</i>
Genre	<i>Ulva</i>
Espèce	<i>lactuca</i>

#### ➤ L'*Enteromorphe*, *Enteromorpha linza*

Les *Enteromorphes* sont des algues annuelles très communes qui se développent généralement en quantité très importantes, surtout au printemps, sur les rochers, et dans les cuvettes au niveau des étages médio. Elles sont fixées au substrat par un simili stipe étroit. Ce sont des algues à structure palissadique, ayant la forme d'un tube dont le diamètre est assez constant chez un même individu, mais variable selon les espèces (Julien, 2007).

On les rencontre également échouées sur les plages mélangées aux laisses de mer. Espèces cosmopolites, certaines espèces supportent l'eau douce, et peuvent remonter très haut dans les rivières. Comestible, riche en fer, les *Entéromorphes* peuvent entrer dans la composition de potages ou bien de cocktails, comme un jus de carottes par exemple (Jean-Claude Julien, 2007-2014) (**Figure 3**).

### Classification d'*Enteromorpha linza* (Linné, 1883)

Embranchement	<i>Chlorophyta</i>
Classe	<i>Chlorophyceae</i>
Ordre	<i>Ulothricales</i>
Famille	<i>Ulvaceae</i>
Genre	<i>Enteromorpha</i>
Espèce	<i>linza</i>

### 3.2. Les *phéophycées*

Les *Phaéophycées* ou algues brunes sont essentiellement marines et regroupent environ 1.500 espèces (Morris et Lewin, 1967-1974). De structure généralement pluricellulaire et de dimensions très variables, la majorité de ces algues vivent en milieu marin et présentent une couleur brunâtre résultant de l'association de pigments dominants (Pérez, 1997).

➤ *Padina pavonica*

*Padina pavonica* est une Algue brune de la famille de Pheophyceae. Dont le thalle haut de 5 à 10 cm, est une lame en éventail zoné, à marge ciliée, blanche et brune, incrustée de calcaire, munie d'un court pédoncule. La lame est souvent enroulée en cornet avec des stries concentriques. La surface du thalle est ornée de fines rangées concentriques de poils. Il pousse en abondance dans la Méditerranée. Cette algue est abondante de Juin à Septembre, sur la côte de la surface jusqu'à 60m sous le niveau de la mer (Bergbauer, Humberg, 2000, Mojetta, 1995) (**Figure 5**).

**Classification :** (Weinberg, 2007, Cabioc'h, 2006)

Embranchement	<i>Ochrophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Heterokontae</i>
Super-classe	<i>Phaeophyta</i>
Classe	<i>Phaeophyceae</i>
Ordre	<i>Dictyotales</i>
Famille	<i>Dictyotaceae</i>
Genre	<i>Padina</i>
Espèce	<i>pavonica</i>

➤ *Dictyota dichotoma*

*D. dichotoma* présente un thalle aplati en lanières avec une ramification dichotome et des rameaux de même longueur à l'extrémité arrondie qui mesurent entre 5 et 10 mm de large, Elle se fixe au substrat par des rhizoïdes qui se terminent par des disques adhésifs. Elle mesure généralement entre 10 et 25 cm de long, mais elle peut parfois atteindre 50 cm en été. Elle épiphyte souvent d'autres organismes tels que les algues ou les gorgones, Elle est très commune en Europe, que ce soit en mer Méditerranée (Cabioc'h et al 2006) (**Figure 2**).

**Classification:** (De Reviere, 2002)

Embranchement	<i>Ochrophyta</i>
Classe	<i>Phaeophyceae</i>
Ordre	<i>Dictyotales</i>
Famille	<i>Dictyotaceae</i>
Genre	<i>Dictyota</i>
Espèce	<i>dichotoma</i>

### 3.3. Les *Rhodophycées*

Les *Rhodophycées* ou algues rouges. L'association de la phycoérythrine à d'autres pigments chlorophylliens est à l'origine de la coloration rosâtre des plastides de ces algues. (Pérez, 1997). Les *Rhodophycées* sont essentiellement marines et sont des organismes macroscopiques et pluricellulaires. Les *Rhodophycées* regroupent environ 4 000 espèces réparties entre deux groupes:

a) les *Bangiophycidées* qui sont des formes primitives, microscopiques et unicellulaires avec comme exception le genre *Porphyra*, algue macroscopique.

b) les *Floridéophycidées* qui sont des formes macroscopiques et pluricellulaires donc plus évoluées (Morris et Lewin, 1967-1974).

#### ➤ *Jania rubens*

C'est une algue calcaire dressée, ramifiée de façon dichotome. Le thalle est formé de branches articulées, cylindriques très fines (0,2 mm de diamètre) (Humberg, 2000). Elle vit dans les eaux calmes proches de la surface jusqu'à 20 m. On la trouve notamment dans les cuvettes sableuses et dans les herbiers de zostères. Elle est épiphyte sur d'autres algues, on trouve cette algue dans l'océan Atlantique tempéré à tropical, Méditerranée, mer Noire, mer de Chine, océan Indien et Pacifique Ouest (Verlaque, 2006).

Dans l'industrie cosmétique, *Jania rubens* est souvent dénommée comme « corail végétal » utilisée dans la fabrication de crèmes dont le but est d'assouplir la peau, et l'hydrater. En fait, l'action du *Jania* est probablement dûe à la présence de carbonate de calcium qui agit sur la peau comme un abrasif doux. L'utilisation du calcaire dans les dentifrices au même but (Cabioc'h, 2006 ; Weinberg, 2004) (**Figure 4**).

**Classification :** (Weinberg, 1996 ; Cabioc'h, 2006).

Embranchement	<i>Rhodobionta / Rhodophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Eurhodophytina</i>
Classe	<i>Florideophyceae</i>
Sous-classe	<i>Corallinophycidae</i>
Ordre	<i>Corallinales</i>
Famille	<i>Corallinaceae</i>
Genre	<i>Jania</i>
Espèce	<i>rubens</i>





**Figure 1** : Touffe d'*Ulva lactuca*



**Figure 2**: Touffe *Dictyota dichotoma*



**Figure 3**: Touffes d'*Enteromorpha linza*



**Figure 4**: Touffe *Jania rubens*



**Figure 5**:Aspect général de *Padina pavonica*

#### 4. Compositions des algues marines

Les algues marines ont des propriétés pour adsorber des micropolluants dus à leur concentration en polysaccharides présentes dans leurs parois. (Fiset *et al*, 2007 in Cayla, 1995). Les algues constituent des sources importantes de fibres (de 33 à 61 %) ayant des structures variées et originales, différentes des fibres des végétaux terrestres (Lahaye, 1991). Les algues, d'une manière générale, se composent de 80% d'eau. Séchées elles n'en contiennent plus que 10 à 20% et se composent de 80 à 90% d'hydrate de carbone, protéine, minéraux, vitamine et très peu de graisse, soit environ 1 à 2% (Cayla, 1995).

- **Les protéines** : le contenu en protéines est variable (de 4 à 44% environ) selon les espèces, la saison et d'autres facteurs. On parle de variétés riches en protéines telles que certaines *Porphyra*, *Enteromorpha*, *Ulva* et *Spirulina* (Cayla, 1995).
- **Les lipides** : la teneur en graisse des algues est très faible. Les acides gras insaturés sont les plus nombreux. Le principal acide gras est l'acide oléique (Cayla, 1995).
- **Les glucides** : les principaux sucres dans les algues sont le mannitol dans les *Fucophcées* et le sorbitol dans les *Rhodobiontes*. On trouve le mannitol sous forme de poudre blanche à la surface des espèces exemple chez *Laminaria*. C'est un stimulant hépatique, légèrement laxatif. Le sorbitol, sucre très doux, est utilisé dans les régimes et spécialement pour les diabétiques (Cayla, 1995).
- **Minéraux et Oligo-éléments** en abondance : argon, aluminium, chlore, iode, phosphore, plomb,...etc.
- **Vitamines** : on retrouve les vitamines : B1, B2, B3, B6, C, E, F, K, ainsi la vitamine B12 (dont les algues sont les seules végétaux à le contenir puisque c'est une vitamine d'origine animale) (Cayla, 1995).
- **Polysaccharides** : ce sont des glucides du type amidon, cellulose (Cayla, 1995).

#### 5. L'intérêt des algues

Les algues d'origine marine occupent une place importante en pharmacologie et en médecine et, de ce fait, font l'objet d'une exploitation industrielle importante : (Alimentation, Cosmétologie, Agriculture et Elevage...ect) (Kornprobst, 2005).

##### 5.1. Alimentation

Etant la principale utilisation dans le monde, les algues utilisées dans l'alimentation se répartissent entre les trois groupes : *Chlorobiontes* (vertes), *Rhodobiontes* (rouges) et *Chromobiontes* (brunes) mais il ne s'agit pas toujours d'espèces uniques. La prépondérance asiatique dans ce domaine apparaît dans la terminologie des spécialités

alimentaires, essentiellement japonaises. Vu leurs propriétés ; pauvres en calories par manque de sucres assimilables et de matières grasses et riches en fibres non digestibles, protéines, sels minéraux et vitamines ; les algues alimentaires sont utilisées surtout dans les régimes diététiques (Provasoli et Carlucci, 1974 in Kornprobst, 2005), Les algues sont également utilisées dans l'alimentation du bétail. Elles sont désormais commercialisées sous forme de farines pour l'alimentation animale (Hugh, 2003).

## **5.2. Cosmétologie**

L'utilisation d'algues et des extraits d'algues, dans les cosmétiques est apparue surtout dans les pays développés, depuis le dernier quart du XX<sup>e</sup> siècle. Les extraits d'algues sont régulièrement utilisés dans des crèmes cosmétologiques (Spolaore, 2006).

Pour des raisons de formulation, on note que l'utilisation de poudres d'extraits d'algues est plus fréquente que l'utilisation des végétaux entiers. Certaines molécules d'origine algale sont même utilisées en tant qu'excipient dans l'élaboration de produits dermatologiques (alginates). De nombreuses recherches tendent à valoriser l'utilisation des algues, notamment à la vue des enjeux économiques considérables liées aux produits cosmétologiques d'appellation biologique (Dabouineau, 2004). La fabrication de microbilles d'alginate, capables d'encapsuler des principes actifs et des colorants cosmétiques est un exemple flagrant du potentiel écosociétal des substances polymériques d'origine algale.

## **5.3. Agriculture et élevage**

Trois grands secteurs de l'agriculture utilisent les algues marines :

- L'emploi du maërl pour l'amendement des sols acides.
- Emploi des algues comme fertilisant et engrais (par exemple, Varech ou goémon)
- Utilisation des phycocolloïdes pour la rétention de l'humidité des sols.

Quelques revues présentent tous les aspects de l'utilisation des algues en agriculture et contiennent une abondante bibliographie détaillée, en particulier (Metting *et al*, 1988, 1990 ; Blunden, 1991). C'est surtout sous forme de farines, de poudres ou de tourteaux qu'elles sont le plus utilisées en Bretagne et en Normandie.

## **5.4. Santé**

Les algues représentent une source de substances polymériques actives, mise en évidence par de nombreux travaux de recherche. Les potentiels thérapeutiques de certaines de ces substances sont extrêmement prometteurs notamment comme agents antimicrobiens, agents antiviraux ou pour leurs activités envers certaines pathologies. (Nakajima, 2009) ont ainsi mis en évidence un composé extrait d'une algue verte marine, le diméthylsulfoniopropionate, qui présente des potentialités anticancéreuses. Certains

hétéropolysaccharides sulfatés matriciaux, comme les fucoïdanes, sont également appropriés pour lutter contre les processus de formation et de croissance de tumeurs malignes (Boisson-Vidal, 2007).

### **5. 5. Pharmaceutique**

Il existe très peu de médicaments qui contiennent les principes actifs d'origine marine. Parmi les « grands classiques » de la médication par les Algues, rappelons l'emploi des *Porphyra* (Nori) comme antiscorbutique par sa teneur en vitamine C, et les effets bénéfiques des *Laminaria* (Kombu) sur les ulcères d'estomac et sur le goitre, dus principalement à la présence d'alginate et l'iode. De plus, les algues possèdent :

- Propriétés anticoagulantes et anti thrombotiques des Fucanes.
- Polysaccharides sulfatés antiviraux des algues rouges (Matsuda, 1999, 2003).
- Propriétés antitumorales et immunodulatrices des Fucanes (Coombe, 1987).

# Chapitre 2 : les composés phénoliques

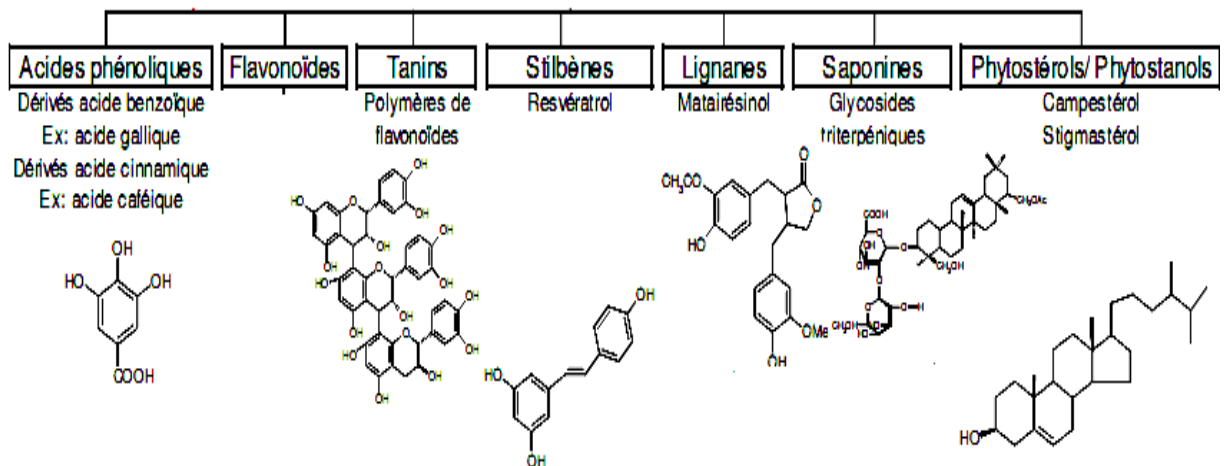
## 1. Définition

Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal (plante vasculaire et chez les algues), se sont des métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Boizot et Charpentier, 2006).

Les composés phénoliques algaux sont pour l'essentiel des polymères du phloroglucinol, dont les teneurs sont significativement plus importantes chez les algues brunes (*Phéophycées*) que chez les algues rouges ou vertes (Oshima, 2002).

Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement active (King et Young, 1999), ils sont largement utilisé en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, antimicrobiens (Baharun, 1997 ; Cetkovic et al, 2008) (**Figure 6**).



**Figure 6** : Quelques structures des composants phénoliques (Gervaise, 2004).

## 2. Classification

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (Laraoui, 2007). Les différentes classes principales de ces composés phénoliques isolées des plantes sont illustrées dans le tableau 1.

**Tableau 1 :** Les principales classes de composés phénoliques (Macheix Jean-jacques *et al*, 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simples	Cathécol	Epices, fraise
C6 - C1	Acides hydroxybenzoïques	P - hydroxybenzoïque	Pomme de terre, pomme
C6 - C3	Acides hydroxycinamiques	Acides caféïque, férulique	Citrus
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Noix
C6 - C4	Napthoquinones		Vigne
C6 - C2- C6	Stilbènes	Juglone	Fruits, légumes, fleurs
C6 - C3- C6	Flavonoides	Resvératrol	Fleurs, fruits rouges
	Flavonols	Kaemférol, quercétine	
	Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine	Pomme, raisin
	Flavonols		Citrus
	Flavonones	Catéchine, épicatechine	Soja, pois
	Isoflavonoides	Narigénine	Pin
(C6 - C3)2	Lignanes	Daidzéine	Bois, noyau des fruits
(C6 - C3)n	Lignines	pinorésinol	Raisin rouge, kaki
(C15)n	Tannins		

Deux principales classes sont largement répandues

- Les flavonoïdes.
- Les tanins.

## 2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Marfak, 2003). Ces molécules sont considérées comme des pigments quasiment universels des végétaux ; ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bruneton, 1999). Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (Ghestem, 2001).

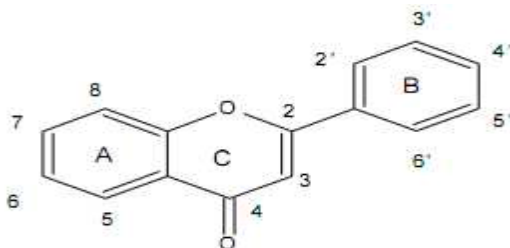
### 2.1.1. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont abondamment répandus dans le règne végétal (graines, fleurs, fruits, feuilles) (Dacosta, 2003). On les trouve aussi chez les Psylotales, les Fougères, Angiospermes, Asteraceae ...etc.

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes hydrosolubles s'accumulent dans les vacuoles, et selon les espèces se concentrent dans l'épiderme des feuilles, ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs, ils sont concentrés dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1999).

### 2.1.2. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- $\gamma$ -pyran (Skerget, 2004). Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone ( $C_6-C_3-C_6$ ), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Dacosta, 2003) (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).

La classe des flavonoïdes comporte à elle seule plus de 4000 substances qui ont été isolées et identifiées à partir des milliers de plantes (Forkmann et Martens, 2001), qu'on divise en plusieurs catégories : Les flavones, les flavonols et les dihydroflavonols, les isoflavonoïdes, les biflavonoïdes, les flavanones, les flavanols, les flavanediols

(leucocyanidines), les anthocyanidines, les chalcones et les dihydrochalcones, les aurones (Dacosta, 2003).

## **2.2. Les tanins**

Les tanins sont des métabolites secondaires polyphénoliques (Khanbabaee et Ree, 2001), hydrosolubles de masse molaire entre 500-2000D. Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Bruneton, 1999). Parmi les caractéristiques des tanins le goût astringent qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (Peronny, 2005).

Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les infections, les insectes et les animaux herbivores (Khanbabaee et Ree, 2001), en plus de la protection contre les attaques fongiques et bactériennes (Peronny, 2005).

### **2.2.1. Localisation et distribution**

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, ils sont particulièrement abondants chez les Conifères, les Fagacées, les Rosacées (Ghestem, 2001). Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits, les racines, les graines) (Khanbabaee et Ree, 2001).

### **2.2.2. Structure chimique et classification**

A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en 2 groupes :

- Tanins condensés (proanthocyanidines).
- Tanins hydrolysables.

#### **a) Tanins condensés (proanthocyanidines)**

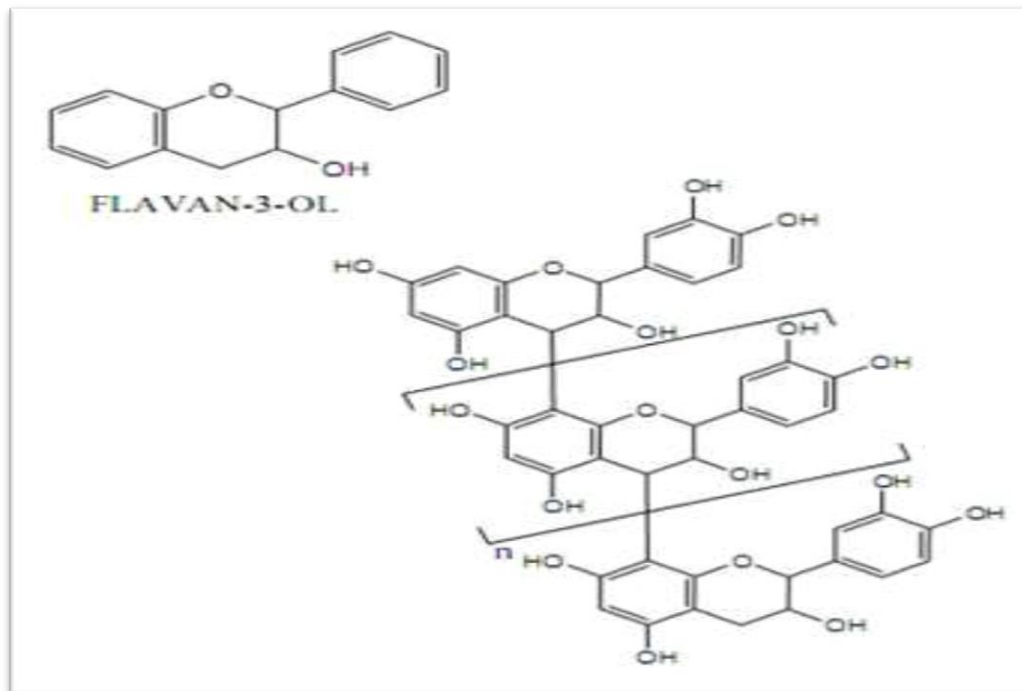
Ce sont des polymères ou oligomères flavaniques, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités (Khanbabaee et Ree, 2001). Ces unités liées entre elles par une seule liaison carbone-carbone C4-C8 ou C4-C6 dans le type B des proanthocyanidines ; ou par une liaison interflavanique double (C4-C8 ou C4-C6) et (C2-O-C7) dans le type A (**Figure 8**) (Bruneton, 1999 ; Xie et Dixon, 2005 ; Vivas, 2006).

#### **b) Tanins hydrolysables**

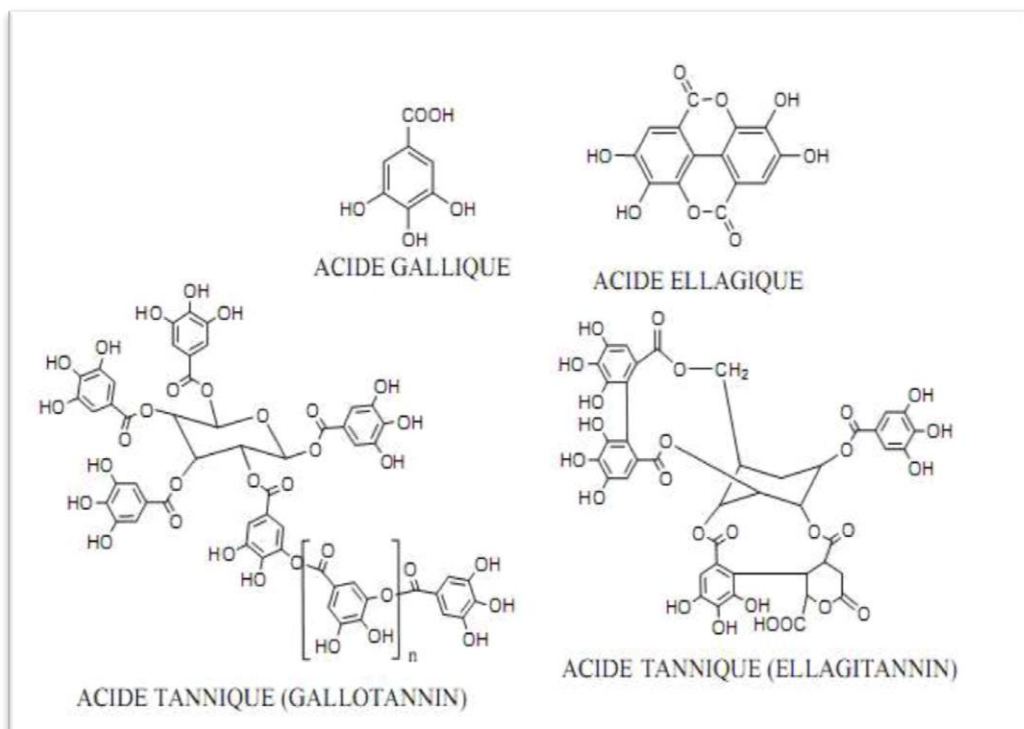
Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques



(Bruneton, 1999) (Figure 9).



**Figure 8 :** Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).



**Figure 9 :** Structure des tanins hydrolysables et les acides associés (Peronny, 2005)

### 3. Importance biologique et biochimique

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux (Bahorun, 1997) qui prennent une importance croissante notamment, à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé, dans la protection de l'homme vis à - vis de certaines maladies, en raison de leur action possible avec de nombreuses enzymes (Macheix Jean – Jacques, 2005).

Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antiradicaux et antioxydants (Bahorun. T, 1997). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Bahorun, 1997). Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Conférence internationale sur l'application des polyphénols, 2006). En particulier les flavonoïdes et les proanthocyanidines (Bahorun, 1997).

#### ➤ Inhibition enzymatique

Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, dans le cas de :

- Flavonoïdes

L'inhibition d'une grande variété d'enzymes, (Berset, 2006) (Natalia, 2008) modulation du fonctionnement de divers récepteurs ainsi que du processus de transcription de certains gènes (par interaction du cytosol avec les facteurs de transcription ou certains précurseurs). Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques, ils inhibent plusieurs enzymes intervenant dans divers mécanismes biologiques.

Il inhibent l'histidine décarboxylase, l'élastase, la hyaluronidase ce qui permettrait de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire ; ils inhibent aussi d'une manière non spécifique la catéchol-O-méthyltransferase ,ce qui augmenterait la quantité de la catécholamine disponible et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire. En plus, les flavonoïdes inhibent la phosphodiesterase de l'AMPc ce qui pourrait expliquer leur activité anti-agrégante plaquettaire ; aussi, ils inhibent l'aldose réductase qu'est impliquée dans la pathogénie de la cataracte (Bruneton, 1999).

Par ailleurs, les flavonoïdes peuvent inhiber la promotion de tumeur à travers un effet inhibiteur sur la phosphoxylase C et la protéine kinase (Formica et Regelson, 1995).

- Tanins

La fixation des tanins avec les protéines peut être engendrée l'inhibition de plusieurs enzymes (De Bruyne, 1999). Le blocage de la 5-lipoxygénase par géraniine, corilagine, inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine de l'activation de la hyaluronidase des glucosyltransferases des microorganismes impliqués dans la cariogénèse, inhibition des topoisomérases par la sanguinine H6 ou l'acide chébulagique, inhibition de la protéines kinase C par les tanins éllagiques et les tanins complexes (Bruneton, 1999 ), inhibition de  $\alpha$ -amylase salivaire humaine qui joue un rôle dans la formation des caries dentaires (Kandra et al, 2004). D'ailleurs, les dimères procyanidoliques ont une activité inhibitrice sur l'histidine décarboxylase et l'élastase (Bruneton, 1999).

## Chapitre 3 : l'alpha amylase

Les enzymes sont les outils-clés des biotechnologies car elles offrent de nombreuses possibilités d'applications dans différents domaines en: industries agroalimentaires (industries laitières, biscuiteries, charcuterie, pâtisserie...), en industries chimiques (détergents et textiles), en clinique (enzymes réactifs, enzymothérapie par des protéines recombinantes) en recherches (Protéomique et en Génomique) et autres. Parmi ces enzymes qui ont une grande importance dans différents domaines :

### 1. Les alpha- amylases

Les amylases sont des enzymes ubiquitaires de différentes sources : animales, végétales et microbiennes (bactérienne et fongiques) (Gupta, 2003).

Les alpha amylases sont des endoglucanases très largement réponde chez les animaux, les plantes et micro organismes, elles catalysent la dépolymérisation de l'amidon et les poly ou oligosaccharides apparents par hydrolyse sélectives des liaisons alpha 1-4glycosidique ; le site actif de ces enzymes est constitué par un ensemble des sous sites chacun interagissant avec un résidu glycosyl du substrat ; les structures tridimensionnelles de plusieurs alpha amylases ont été établies grâce à des études par cristallographie de diffraction des rayon-X a haute résolution (Qian, 1993).

L'activité de l' $\alpha$ -amylase varie ; cette variabilité s'explique selon les souches utilisées par leur patrimoine génétique (Demain, 2000), par la nature du substrat utilisé (synthétique ou naturel) et aussi par les conditions expérimentales de mesure (Robyt, 1968).

#### 1.1. Nomenclature

- **Nom systématique** :  $\alpha$ -(1-4) D-glucane glucanohydrolase.
- **Nom codifié** : E.C 3.2.1.1
- **Nom recommandé** : Alpha amylase
- **Synonymes** : glycogenase ,endoamylase ,masilase ,taka-amylase A , takatherm, thermolase, amylotherm, clarase , amylopsin, spitase,CPI , G995, kleistase L1, THC250, maxamy, ptyalin (Graber et combes, 1989).

#### 1.2. La structure de l'alpha amylase

Les  $\alpha$ -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 qui varient d'une souche à une autre (Fogarty, 1980).



**Figure 10 :** Structure de l'alpha amylase humaine. Les trois domaines sont montres : le domaine A est rouge; le domaine B est jaune ; le domaine C est noir. L'ion de calcium (sphère bleue) et l'ion de chlorure (sphère jaune) (Payan, 2004).

Structurellement, les  $\alpha$ -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. La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, 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'  $\alpha$ -amylase est formée de 8 feuillets  $\beta$  plissés et de 8 hélices  $\alpha$  (Chiba, 1988 et Burhan, 2003) (**Figure 10**).

### 1.3. Composition des oses

La présence des résidus d'hydrate de carbone dans quelques préparations est signalée dans plusieurs travaux (Hanrahan et al., 1994; Bji Aghara et al., 1954). Cependant, il a été démontré que ces résidus font partie des molécules d'enzyme (Tsugita et al., 1959; Balli, 1963). Le D glucose, D mannose, D galactose, D glucosamine sont arrivés à être chimiquement reliés à la chaîne polypeptidique de certains carboxyhydrates (Pazur, 1965). La partie glucidique joue un rôle protecteur vis-à-vis de la dénaturation et de la protéolyse (Kanno, 1986) (**Tableau 2**).

**Tableau 2 :** représente la composition des oses de l'  $\alpha$  amylase (Beaupoh, 1973)

Oses	Les molécules d'oses/mole d'enzyme			
	D.galactose	D.mannoses	D.fructoses	D.aminodesoxyglucose
Forme 1	0.45	0.52	0.75	1.2
Forme 2	0.45	0.52	0.75	0.8

### 1.4. La composition des acides aminés

Dans les  $\alpha$  amylase, les AA portant la fonction thiol, sont particulièrement faibles tandis que ceux portant des groupes hydroxyle et bicarboxylique sont relativement élevés. (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** Représente les acides aminés N et C terminal de quelques alpha amylases

Source d' $\alpha$ amylase	N-terminal	C-terminal	Références
Fongique	Alanine	Serine Glucine Alanine	(Pazur, 1965)
Bactérienne	Phénylalanine	Alanine	(Hustumer, 1976)
Pancréatique	Phénylalanine Glucide alanine	Leucine	(Pazur, 1965)
Salivaire	Phénylalanine	Leucine	(Pazur, 1965)

Les modalités d'action des  $\alpha$  amylases dépendent de l'origine de l'enzyme, elles hydrolysent les liaisons glucosidiques  $\alpha$  (1-4) des chaînes latérales du glycogène de l'amylopectine, amylose et de l'amidon à l'exclusion des liaisons terminal de ces chaînes (Christain, 1982). En général, les alphas amylases peuvent agir par différents modes d'action selon des conditions (Température, pH, masse moléculaire et structure de substrat).

L'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes (Mazur et Nakatani, 1993 ; Nielson, 2001)

- **Attaque aléatoire ou au hasard** : n'importe quelle liaison  $\alpha$  (1-4) peut être hydrolysée à partir de l'extrémité réductrice, elle provoque la formation de glucose, maltose et surtout d' $\alpha$  dextrine.
- **Attaque préférée** : l' $\alpha$  amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le Substrat.
- **Attaque répétitive ou multiple** : elle implique de déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glucosidique sans se dissocier de substrat (Berry et Pateson, 1990).

### 1.5. Les différentes sources de l' $\alpha$ -amylase

Les  $\alpha$ -amylases peuvent avoir plusieurs sources : animale, végétale ou microbienne:

#### 1.5.1. L'origine animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (French, 1975). Les  $\alpha$ -amylase animales sont incapables d'hydrolyser la liaison  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides, l'hydrolyse complète de l'amylose et de l'amylopectine par les  $\alpha$ -amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrines limitent pour l'amylopectine (Coolbear, 1992). Ainsi il existe deux types d'amylases : Une alpha-amylase appelée la ptyaline est produite par les glandes salivaires, tandis que l'amylase pancréatique est secrète par le pancréas dans le petit intestin (Encyclopaedia et Britannica, 2007). La Ptyaline commence la digestion du polysaccharide dans la bouche ; le processus est complète dans le petit intestin par l'amylase pancréatique, parfois appelée l'amylopsine (The Columbia Encyclopedia, 2006) (**Tableau 4**).

##### a) $\alpha$ -amylase salivaire

Est l'une des enzymes les plus importantes dans la salive. Ce qui représente 10-20% de la teneur totale en protéines (Baum, 1993), L'enzyme a été décrite pour la première fois dans la salive par Leuchs en 1831 (Zakowski et Bruns, 1985). Il se

compose de deux familles d'isoenzymes, dont une série est glycosylée et l'autre ne contient pas d'hydrate de carbone.

Le poids moléculaire de la forme glycosylée est d'environ 57 000 Dalton, alors que le poids moléculaire de la forme non glycosylée est d'environ 54000 Dalton.

La majeure partie de l'enzyme est synthétisée dans la glande parotide (80% du total) (Zakowski et Bruns, 1985; Makinen, 1989). Il s'agit d'un métalloenzyme contenant du calcium qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$  (1-4) de l'amidon en glucose et maltose.

Il est connu pour être principalement impliquée dans l'initiation de la digestion de l'amidon dans la cavité buccale. Cependant, la SAA a également été montrée pour avoir une fonction interactive bactérienne importante (Scannapieco, 1993).

Alpha-amylase salivaire, l'un des éléments les plus abondants dans la salive humaine, a au moins trois fonctions biologiques distinctes. L'activité enzymatique de l'alpha-amylase joue sans doute un rôle dans la digestion des glucides. Amylase en solution se lie avec une grande affinité à un groupe sélectionné de streptocoques oraux, une fonction qui pourrait contribuer à la clairance bactérienne et de la nutrition. La liaison de l'alpha-amylase à des bactéries et des dents peut avoir des implications importantes pour la plaque dentaire et la formation de caries. alpha-amylase liée à des bactéries dans la plaque dentaire peut faciliter l'hydrolyse de l'amidon alimentaire pour fournir le glucose supplémentaire pour le métabolisme des micro-organismes de la plaque à proximité de la surface de la dent (Scannapieco, 1993).

#### **b) $\alpha$ -amylase pancréatique**

L' $\alpha$ -amylase pancréatique humaine (APH) catalyse l'hydrolyse de la liaison glycosidique  $\alpha$  (1-4) en polymères de glucose tels que l'amidon. L'APH est composé de 496 acides aminés en une seule chaîne de polypeptide liée aux ions essentiels de chlorure et de calcium. L'hydrolyse de l'amidon ou les substrats se produisent avec la conservation nette de la configuration au centre anomérique de sucre. (Anjuman Begum, 2007).

#### **1.5.2. L'origine végétale**

Les  $\alpha$ -amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapables d'hydrolyser le maltose (Octávio, 2000). Parmi les  $\alpha$ -amylases végétales, les plus étudiées sont celles provenant de céréales telles que blé, seigle triticale, orge et riz (Mercier, 1972) Elle joue un rôle dans le métabolisme glucidique des plantes par hydrolyse de l'amidon en sources réducteurs (glucose et maltose) directement assimilable (**Tableau 4**).



### 1.5.3. L'origine microbienne

- **L'  $\alpha$ -amylase fongique**

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques, parmi les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps du fait que la première production d' $\alpha$ -amylase a été réussie par Takamine en 1894. L' $\alpha$ -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50°C et 55°C (Fogarty, 1994) (**Tableau 3**).

- **L'  $\alpha$ -amylase bactérienne**

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de Bacillacées (Milner, 1997). Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* (Bousseboua, 2002) ou *B. subtilis* fermentant en surface (Mctigue, 1995).

De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons  $\alpha$  (1→4) (Nadirman, 2006) (**Tableau 4**).

### 1.5.4. Origine levurienne

Les levures sont des micro-organismes les plus employées dans la production de biomasse à valeur nutritive élevée (Merabti, 2006) leur capacité à assimiler une grande variété de substrats (les hexoses, les pentoses et les polysaccharides) est à l'origine de plusieurs investigations menées sur elles dans le but de production des acides organiques, des enzymes et en particulier l' $\alpha$  amylase (**Tableau 4**).

**Tableau 4 :** Les différentes origines de l' $\alpha$  amylase.

L'origine	Référence
<b>Animale :</b> -salive humaine -pancréas de porc -pancréas de veau	French 1975
<b>Végétale :</b> -blé -malt d'orge -seigle -riz	Mercier 1985
<b>Fongique :</b> <i>-Aspergillus awamori</i> <i>-Aspergillus oryzae</i> <i>-Aspergillus niger</i> <i>-Aspergillus sojae</i> <i>-Aspergillus terricola</i> <i>-Rhizopus Sp</i>	Pazur john 1965
<b>Bacterienne :</b> <i>-Bacillus coagulans</i> <i>-Altermonas halopantis</i> <i>-Stréptococcus bovis</i>	Pazur john 1965

## **1.6. Caractéristique de l' $\alpha$ amylase**

### **1.6.1 Poids moléculaire**

Le poids moléculaire de la majorité des  $\alpha$  amylases apparaît être l'ordre de 50 kDa (Berry et Paterson., 1990) chaque molécule contient un ion calcium. Grâce au gel de filtration sephadex deux fractions peuvent être obtenues, le composant le plus rapide à un pM de 50 kDa et le plus lent à un pM de 100 kDa (Mercier, 1982), il apparaît que la fraction de PM= 50 kDa est le monomère de l' $\alpha$  amylase (Fogarty, 1983).

Selon une étude réalisée sur l' $\alpha$  amylase d'origine bactérienne par la même méthode montre que l'enzyme est un tétramère et possédant un PM= 96 kDa (Kim, 1995).

### **1.6.2. Température optimale**

Il existe une zone de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale et pour laquelle la totalité de la structure de l' $\alpha$ -amylase est maintenue. Mais en dehors de cette zone il va y avoir une dénaturation de l'enzyme traduisant une perte d'activité enzymatique (Argos, 1979).

Les  $\alpha$ -amylase ont une température optimale comprise entre 40°C et 70°C, en effet les  $\alpha$ -amylases bactériennes ont une plus grande stabilité thermique par rapport aux amylases fongiques (Larpen-Gourgand et Sanglier, 1992). La température optimale de l' $\alpha$ -amylase bactérienne varie de 50°C à 95°C.

Certaines souches hyperthermophiles peuvent résister à des températures supérieures à 100 °C (Vertriani, 1998) alors que celle des  $\alpha$ -amylases fongiques varie entre 40 °C et 60°C avec un optimum de 50°C à 56°C pour *Aspergillus niger* (French, 1975).

### **1.6.3. pH optimum**

L' $\alpha$ -amylase est très sensible au pH par conséquent, le choix de pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme. L'optimum d'activité d'enzyme peut être obtenu à un pH pratiquement acide entre (4.8-6.5) (Larpen, 1992). Cet intervalle varie selon l'origine de l'enzyme. Les  $\alpha$  amylases salivaires ont des pH optimaux neutres.

## 1.7. Activateurs et Inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase

Les amylases sont classées en trois type selon leurs susceptibilités ; partielle susceptibilité ou leur résistance à l'inhibition. (Kenned, 1977)  
Il existe 2 types d'inhibiteurs et activateurs des  $\alpha$ -amylases : les inhibiteurs et activateurs organiques et inorganiques (**Tableau 5**).

### 1.7.1 Activateurs et inhibiteurs inorganiques

- **Calcium**

Le calcium qui est vrai semblablement un activateur allostérique. En présence du calcium, les  $\alpha$ -amylases sont résistante à la dénaturation au pH, à la température extrême, au traitement à l'urée ainsi qu'à l'action de la plupart des protéases (Fogarty, 1983).

- **Carbonate**

Les carbonates, lorsque elles sont sous forme de carbonates de calcium augmentent la thermostabilité des  $\alpha$ -amylases (knight, 1967).

- **Ion chlorure**

L'ion chlorure présente un maximum d'action positive à 0.01M/L néanmoins des concentrations plus faible ( $10^{-4}$  M/L) ont un effet activateur appréciable (Mercier, 1985).

Le CO<sub>2</sub> stimule la production de l' $\alpha$ -amylase dans les cultures en batch (Kennedy, 1997).

- **Ion phosphate**

Les tampons à base de phosphate sont contre indiqués pour mesurer l'activité de l' $\alpha$ -amylase du malt d'orge car cet ion déplace le calcium.

L'influence des autres anions minéraux : le traitement de l' $\alpha$ -amylase pancréatique du porc par les anions tel que les bromures iodures, nitrate, perchlorate et les cyanates, n'aboutis pas à l'activité enzymatique mais ils modifient le K de la réaction catalysé par l'enzyme. Aussi, il a été remarqué que cette constante diminue lorsque la taille PM de l'amidon diminue (Kenned, 1977).

**Tableau 5** : Activateurs et Inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase : (Schamburg et Col 1991)

(Mercier, 1985), (Whelan et Col 1964)

	Nom du composé	Activateur	inhibiteur
<b>Activateurs et inhibiteurs inorganiques</b>	Chlorures	+	
	Bromures	+	
	Nitrates	+	
	Iodures	+	
	Phosphates	+	
	Calcium		
	Mercure		-
	Fer		-
	Argent		-
	Cuivre		-
<b>Activateurs et inhibiteurs organiques</b>	D-glucose,D-xylose		-
	2-deoxy-D-glucose,		
	methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl		
	N-Bromosuccirnimide		-
	(NBS)		-
	Maltose		-
	H4EDTA		-
	4Chloromer curibenzoate,		
	isodoacétamide		-
	Citrate		-
	Oxalate		-
	Iodoacetate		
	Pancréozymin	+	
	Acetyl choline	+	
	Albumine	+	-
Aoliposine(pseudo-oligosaccharides)		-	
Amylostatine(pseudo-oligosaccharides)			

### 1.7.2 Activateurs et Inhibiteurs organiques

Il semble que les substrats comportant des unités de glucoses liés par des liaisons  $\alpha$  (1-4) sont favorables à la production de l'amylase comparé à des monosaccharides ou à des composés où le glucose est liée par de liaisons différentes cette production est augmentée par un excès d'ions ammonium (Meyrath et Col, 1980). L'influence de la succinylation sur l'amylase est variable selon l'origine de l'enzyme (Kennedy, 1977).

Le maltose est un inhibiteur des  $\alpha$ -amylases en particulier de l'enzyme de *Bacillus subtilis* et du malt d'orge et du pancréas de porc (Whelan et Col, 1964). Le résultat s'explique par le fait que le maltose est le produit de dégradation de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase et qui provoque une rétro inhibition de l'enzyme (Elô et Col, 1972) (**Tableau 5**).

La vitesse de l'alpha amylase salivaire est modifiée en présence des activateurs et inhibiteurs

**Tableau 6 :** Activateurs et inhibiteurs l' $\alpha$ -amylase salivaire

Le nom du composé	Activateur	Inhibiteur
Chlorure de cuivre (CC)		-
Nitrate de sodium (NS)		-
Chlorure de magnésium (CM)		-
Nitrate de magnésium (NM)		-
Sulfate d'ammonium (SA)		-
Phosphate d'ammonium (PA)		-
Nitrate d'ammonium (NA)		-
Sulfate de magnésium (SM)		-
Phosphate de sodium (PS)		-
Nitrate de potassium (NP)		-
	+	

Les CC, AS, SN, MC, MN (tous à des concentrations de 1 mM et 3 mM) et AP (1mM) ont inhibé de manière significative l'activité de l' $\alpha$  amylase salivaire, alors que le AN et MS (1Mm) et SP (3mM) ont la réduite. Quant au nitrate de potassium NP, NA et PA exercent un effet d'activation sur l'activité amylyasique d'une manière significative a faible concentration (Valizadeh, 2007).

## Chapitre 4 : l'intérêt de l'inhibition de l'alpha amylase

### 1. Les inhibiteurs

De nombreuses substances modifient l'activité enzymatique en se combinant à elle, ce qui altère la liaison de substrat et/ou son turnover. Les substances qui diminuent l'activité enzymatique de la sorte sont appelées des **inhibiteurs**.

Beaucoup d'inhibiteurs sont des molécules de structure voisine du substrat de leur enzyme, mais qui soit ne réagissent pas, soient elles réagissent très lentement. De telle substance sont fréquemment utilisées pour élucider la nature chimique ou conformationnelle d'un site de liaison du substrat, afin de déterminer le mécanisme catalytique de l'enzyme. De plus, beaucoup d'inhibiteurs d'enzymes sont des agents chimiothérapeutiques efficaces car un analogue de substrat "non naturel" peut bloquer l'action d'un enzyme.

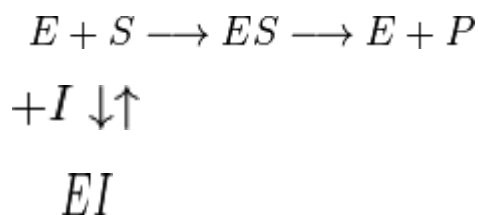
Les inhibiteurs d'enzyme peuvent agir selon des mécanismes variés. Dans cette section, nous allons étudier plusieurs de ces mécanismes parmi les plus simples, et leurs influences sur le comportement cinétique des enzymes qui suivent le modèle de Michaelis-Menten (Donald Voet et Judith, 1998).

### 2. Différents types cinétiques d'inhibiteurs d'enzymes

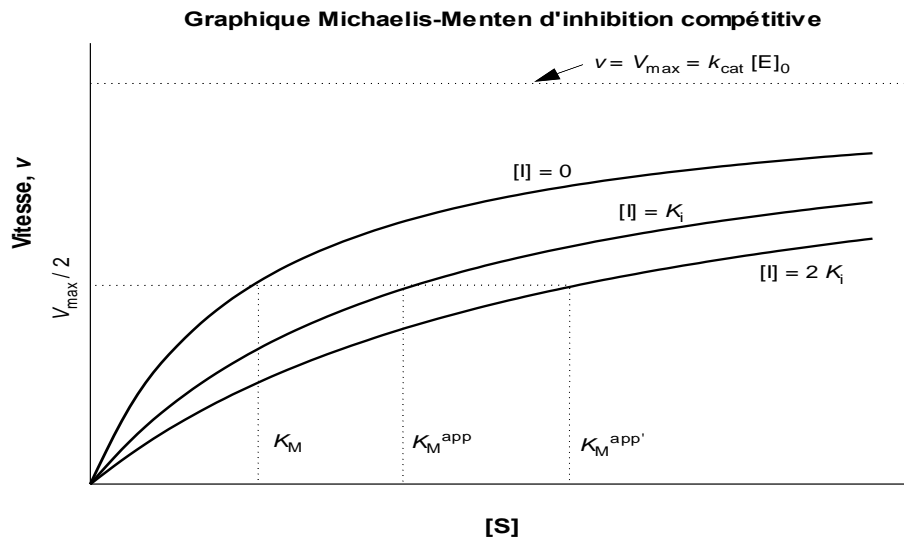
#### 2.1. Inhibiteur compétitif

Un inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique (=effet isostérique). La réaction enzymatique est bloquée, soit parce que l'inhibiteur ne possède pas le groupement chimique transformé par l'enzyme, soit parce que la position de groupement chimique sur l'inhibiteur rend impossible sa reconnaissance par le site actif (Wiley, 2005).

➤ **Equation de Michaelis-Menten** dans le cas d'une inhibition compétitive

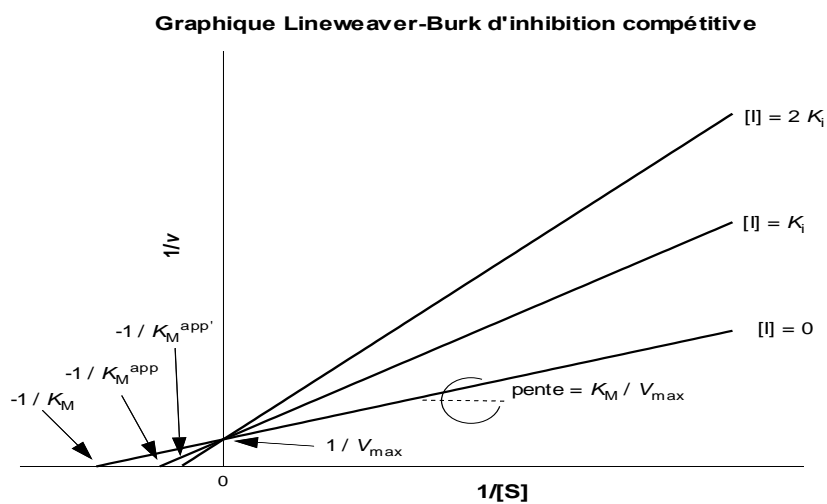


$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$



**Figure 11:** Graphique Michaelis-Menten d'inhibition compétitive

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



**Figure 12:** Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition compétitive (Hienerwadel, 2013)

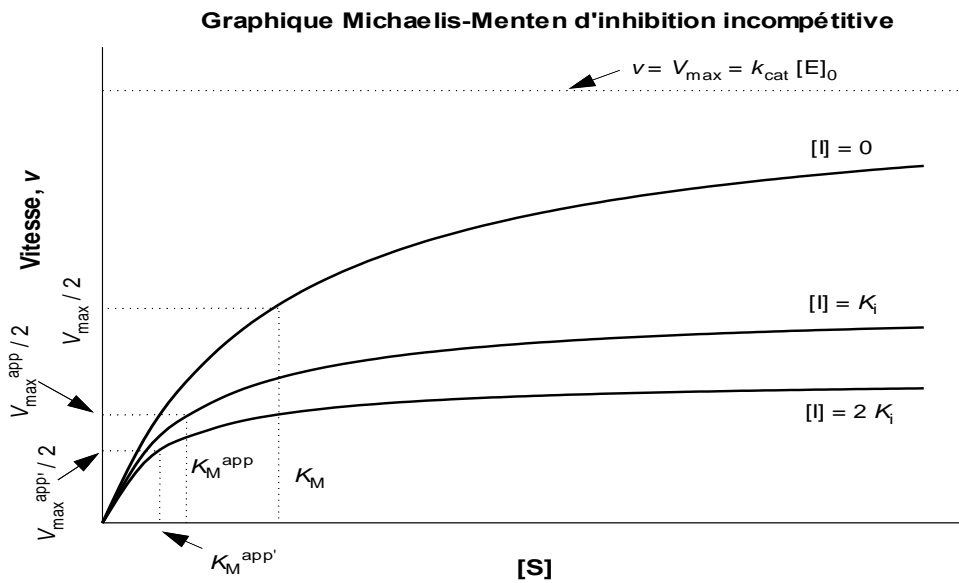
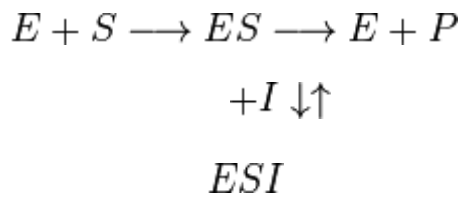
## 2.2. Inhibiteur incompétitif



Un inhibiteur **incompétitif** ne se fixe jamais à l'enzyme libre mais seulement à l'enzyme complexée avec le substrat ES et empêche la formation des produits.

Généralement, la liaison du substrat sur l'enzyme entraîne une modification de la conformation de l'enzyme, révélant ainsi un site de fixation pour l'inhibiteur. L'inhibiteur, en retour, modifie la conformation du site actif de l'enzyme, et empêche la réaction.  
Équation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition incompétitive (Wiley, 2005)

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + \frac{K_m}{(1 + \frac{[I]}{K_I})}}$$



**Figure 13:** Graphique Michaelis-Menten d'inhibition incompétitive

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

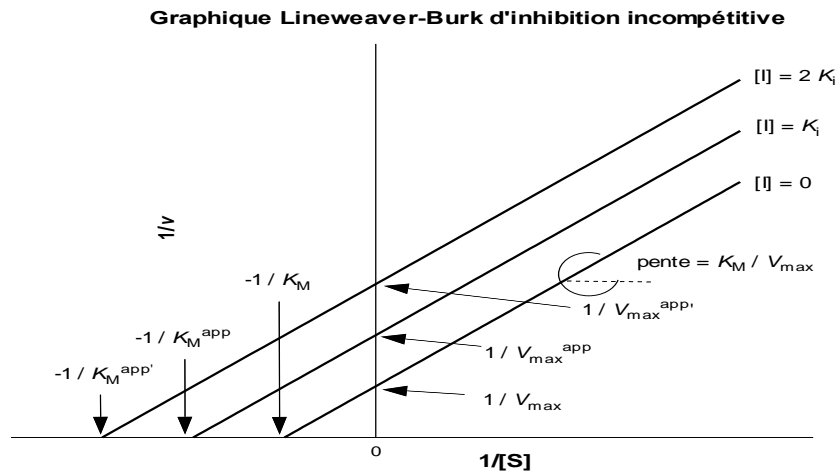
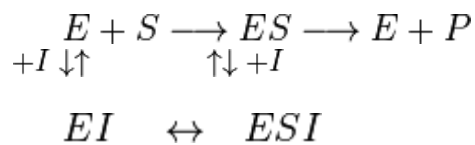


Figure 14: Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition incompétitive (Hienerwadel, 2013)

### 2.3. Inhibiteur non compétitif

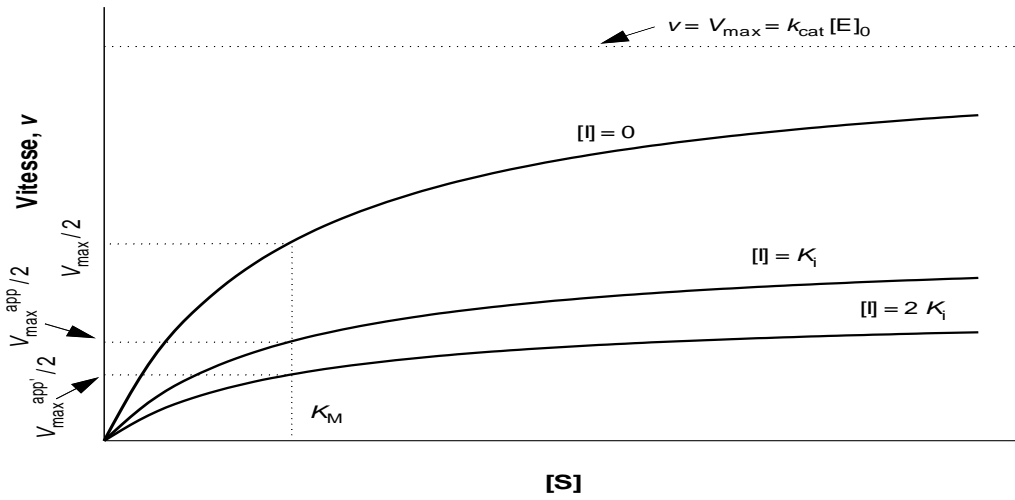
Un inhibiteur **non compétitif** peut se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'enzyme libre et sur l'enzyme liée au substrat. Cependant, l'inhibiteur et le substrat n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au site actif, et l'inhibiteur à un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat (Wiley, 2005).

Equation de Michaelis-Menten dans le cas d'une inhibition non compétitive



$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

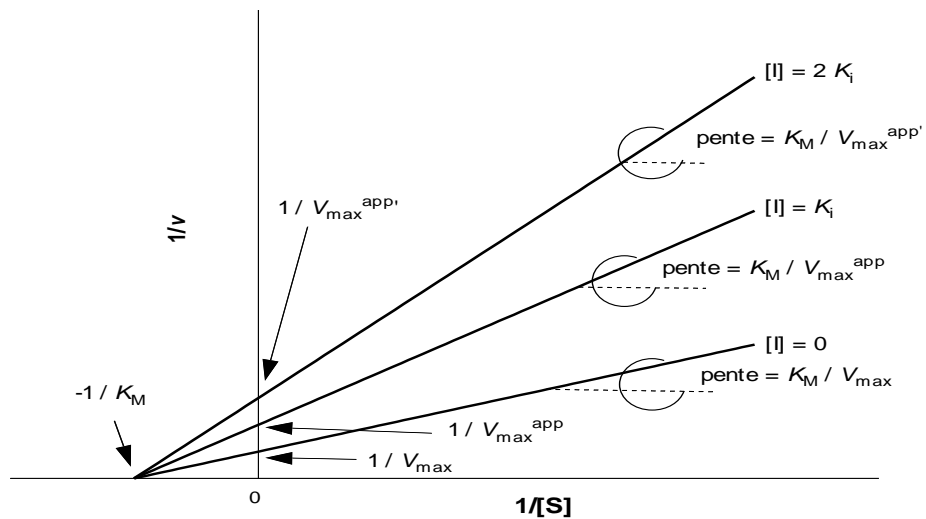
**Graphique Michaelis-Menten d'inhibition non compétitive simple**



**Figure 15:** Graphique Michaelis-Menten d'inhibition non compétitive

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\frac{V_{\max}}{\left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}}$$

**Graphique Lineweaver-Burk d'inhibition non compétitive simple**



**Figure 16 :** Graphique Lineweaver –Burk d'inhibition non compétitive (Hienerwadel, 2013).

## ➤ L'intérêt de l'inhibition de l'alpha amylase

Les extraits polyphénoliques des algues sont utiles dans la formulation de compléments nutritionnels ou médicamenteux, le traitement de l'obésité et de diabète (Cetkovic *et al*, 2008). l'alpha amylase salivaire reste un régulateur métabolique et associée à l'obésité (Falchi, Takousis, 2014) et le diabète (Juliet, Gerrard et al, 2000).

Où l'obésité est définie comme un trouble métabolique caractérisé par une masse corporelle supérieure à la normale, généralement due à une accumulation de masse adipeuse résultant d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétiques (Park et Jung, 2011).

Alors que le diabète est défini comme une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique avec des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique et protidique. Cette maladie est associée à l'incapacité de l'organisme à produire et/ou utiliser correctement l'insuline (American Diabetes Association, 2004).

Les inhibiteurs de cette enzyme ont déjà montre leur utilité en aidant les diabétiques et les obèses (Franco, 2002), (Cengiz, 2010). Où les niveaux de glucose des diabétiques peuvent être contrôlés après des repas par l'administration d'un inhibiteur d'amylase tel que l'acarbose (Machius, 1996).

Par ailleurs et afin d'évaluer le rôle des algues sur le diabète, les chercheurs scientifique ont testé l'effet des polyphénols extraits de quatre espèces d'algues marines, ils ont trouvé que les extraits d'algues ont la capacité de bloquer l'activité de l'alpha-amylase et de l'alpha-glucosidase à des doses qui sont facilement assimilables par l'intestin (Nwosu, Morris, 2010 ; Sindhu, 2013).

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 obèses par leur composé fucoïdane qui bloque la maturation des adipocytes (cellules qui stockent les graisses) (Juan Peng, 2011).

Ainsi, en plus du rôle actif de l'algue sur le cancer du sein et les maladies cardiovasculaires, ils auraient également des effets anti diabète et anti obésité (Nwosu, Morris, 2010).

Et donc L'inhibition amylosique est considérée comme une stratégie pour le traitement des troubles dans l'absorption des glucides, tels que le diabète (non-insuline) et l'obésité, ainsi que, les caries dentaires et les maladies parodontales (Octivio, Rigden, 2000 ; Heidari, 2005).

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Echantillonnage

Les algues sont récoltées le 30 Mars de l'année 2014 au niveau de la plage « grand phare » la wilaya de Jijel sur un site rocheux comme c'est indiqué dans la Figure 17.



**Figure 17** : Site des algues étudiées

Nous avons choisi le site de grand phare pour sa richesse en algues et aussi pour sa grande diversité en espèce d'algue marine de différente couleur (Tableau7).

**Tableau 7** : Les récoltes des échantillons

Echantillon récolté	<i>Dictyota dichotoma</i>	<i>Padina pavonica</i>	<i>Jania rubens</i>	<i>Enteromorpha linza</i>	<i>Ulva lactuca</i>
Couleur d'échantillon récolté	brune	brune	rouge	verte	verte

### 1.2. Préparation des extraits d'algues

#### ➤ Extraction

Le matériel végétal humide est pesé par une balance (20 g de chaque espèce) puis broyé à l'aide d'un ultra turax. Les composés phénoliques sont extraits du matériel végétal après l'ajout de 125 ml d'une solution du solvant Eau ou Ethanol ou Acétone. Après filtration sur un tissu mousseline, et puis sur papier filtre, les filtrats sont centrifugés pendant 15 min à 6000 t/min à température ambiante, et conservés à 4 °C jusqu'à l'utilisation. L'extraction des polyphénols se fait selon le protocole de (Romani *et al*, 2006) avec quelques modifications.



**Figure 18 :** Les extraits aqueux bruts



**Figure 19 :** les extraits acétoniques bruts



**Figure 20 :** les extraits éthanoliques bruts

### 1. 3. Dosages des polyphénols totaux par colorimétrie

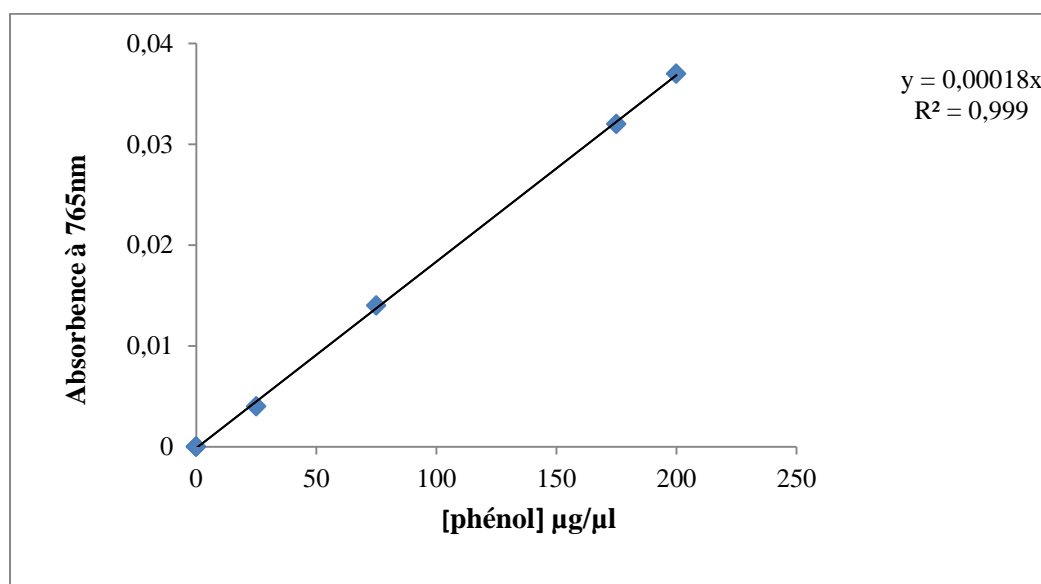
#### 1.3.1. Le principe du dosage Folin-Ciocalteu

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi (Ragae et al, 2006). ce dosage non spécifique s'effectue à partir des extraits aqueux. Le réactif de Folin-Ciocalteu voit ces propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction-OH des phénols (Catalano, 1999). Cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée, qui passe une absorption maximale aux environs des 765 nm permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues. Plusieurs procédures d'extraction et de dosage ont été testés à partir des techniques générales décrites dans les ouvrages spécialisés (Nassif, 2004 ; Bouton, 2005 ; Bonoli *et al* 2004 ; Georgé *et al*, 2005).

### 1.3.2. La méthode de Folin – Ciocalteu

Dans des tubes à essai, un volume de 200  $\mu\text{l}$  de chaque extrait (dissous dans l'éthanol, l'acétone et l'eau distillée) est ajouté à 1 ml du réactif folin-ciocalteu (1N) et 800  $\mu\text{l}$  de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 g/l). Un témoin est préparé dans les mêmes conditions.

Le mélange est laissé à une température ambiante pendant 2 heures, les absorbances sont déterminées à 765nm. Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec l'acide phénolique (0-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et sont exprimées en gramme d'équivalent d'acide phénolique (acide gallique) par milligramme d'extrait (AP eq/ mg).



**Figure 21** : courbe étalonnage de phénol

## 1.4. Préparation des extraits enzymatiques

### 1.4.1. Préparation de la salive

La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner (environ 10 heures du matin) après que le volontaire se soit brossé les dents avec une brosse à dent dépourvu de dentifrice. A fin de favoriser la salivation, le volontaire doit boire un verre d'eau 15 minute avant le prélèvement, et mâcher un petit bout de parafilm (environ 3  $\text{cm}^2$ ) pendant quelque minute. 10ml de salive totale sont prélevés dans des tubes stériles. Les échantillons salivaires sont ensuite centrifugés à 3000 t/min pendant 15 minutes afin de supprimer les mucines et les débris cellulaires et alimentaire encore présent dans la salive. Une fois prélevé, le surnageant est immédiatement congelé.

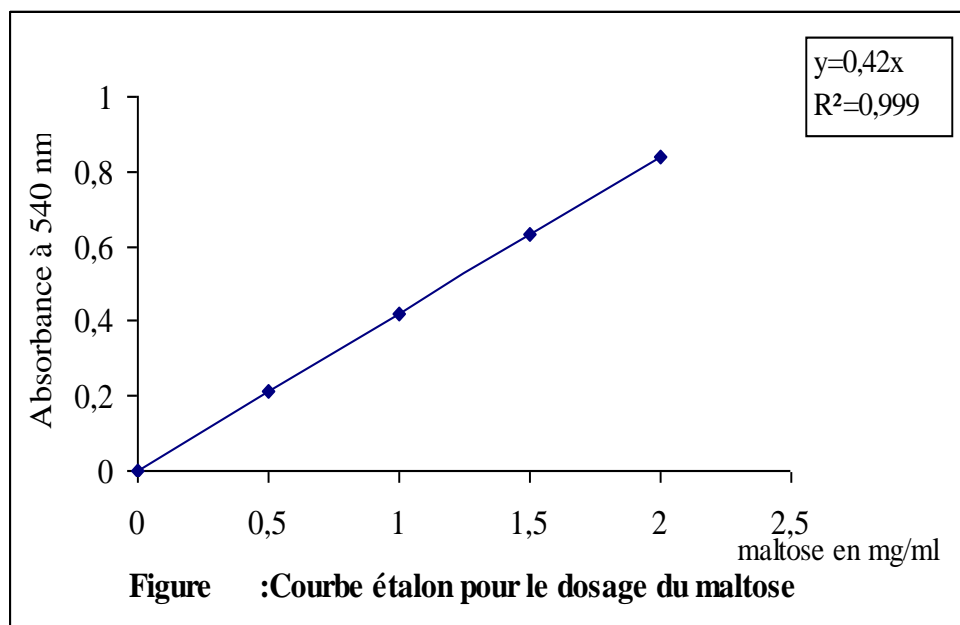
### 1.4.2. Dosage de l'activité $\alpha$ -amylase salivaire

#### ➤ Principe du dosage

L'activité de l'  $\alpha$ -amylase est mesurée selon la méthode de Benfield, (1955), le principe de cette méthode repose sur le dosage des sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse de l'amidon par l'  $\alpha$ -amylase salivaire. La réaction est arrêtée par l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNSA) (Miller, 1959). L'absorbance est déterminée à 540nm par rapport à une gamme d'étalon de 0 à 2mg/ml de maltose.

#### ➤ L'unité de l'enzyme (U)

L'unité de l'activité amylasique est exprimée par la quantité de maltose libérée en  $\mu$ mole par minute par ml de milieu d'après une courbe d'étalonnage figure22 (annexe).



**Figure 22** : Courbe étalon pour le dosage du maltose

### 1.5. Dosage de l'activité amylasique en présence et en absence de l'inhibiteur (extraits algues) *in vitro*

Dans le but d'étudier l'activité inhibitrice *in vitro* des composés phénoliques des cinq échantillons utilisés, nous avons ajouté des concentrations des extraits polyphénoliques à l'alpha amylase salivaire et l'amidon. Une diminution de l'activité amylasique, mesurée à 540nm, reflète la présence de substances inhibitrice dans le milieu. Le pourcentage d'activité amylasique est calculé d'après la formule suivante :

$$\text{L'activité relative} = \frac{(\text{Activité sans I}) - (\text{Activité avec I})}{(\text{Activité T})} \times 100$$



### 1.5.1 Méthode

L'inhibition de l'alpha amylase est effectuée en présence de 0.05 µl d'extraits d'algues. L'activité inhibitrice relative de l'enzyme est exprimée en pourcentage par rapport à l'activité totale en absence d'inhibiteur. La méthode de dosage suivie est celle de (Bernfeld, 1955), elle est basée sur l'acide dinitrosalicylique DNS qui stoppe la réaction enzymatique et forme un complexe avec le maltose donnant une coloration rouge dont l'absorbance est mesurée à 540 nm.

### 1.5.2. Protocole

Dans chaque tube à essai, un volume de 0.5ml de substrat d'amidon (1% w/v) est ajouté à 0.5ml d'extrait salivaire. Pour l'inhibition de l'activité enzymatique des concentrations d'extraits d'algues: 0.05 µl sont ajoutés au milieu réactionnel. Ce mélange est incubé pendant 30 min à 37 C°. La réaction est arrêtée par 1ml de DNSA (Miller, 1959), suivie d'une incubation à 100 C° pendant 10mn. Après refroidissement dans un bain de glace, 10ml d'eau distillée sont ajoutés et l'absorbance est déterminée à 540nm par rapport à une gamme d'étalon de 0 à 2mg/ml de maltose.

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

## 1.6. Dosage de l'activité d'enzyme α-Amylase salivaire en présence des extraits

### **polyphénoliques des algues *Padina pavonica* et *Ulva lactuca***

Pour déterminer le type d'inhibition, Une série de dilution de substrat est préparée à base d'amidon, avec de différentes concentrations allant de (2.5% jusqu'à 20%). Le milieu réactionnel est composé de : 0.5ml de la solution d'amidon, 0.5ml solution salivaire (diluée 3 fois) et 0.05ml d'extrait d'algue acétonique. Après 30 min d'incubation à température 37 C°, la réaction est stoppée par l'ajout d'un 1 ml du réactif de DNSA, ensuite le mélange est incubé à 100 °C pendant 10 min. Après refroidissement, on ajoute 10 ml d'eau distillée. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Vis janway) à une longueur d'onde de 540 nm contre un blanc ce qui nous permet d'étudier les cinétiques enzymatique de l'α-amylase et déterminer le type d'inhibition des deux extraits étudiés.

## • Résultat et discussion

L'extraction des polyphénols à partir des cinq espèces d'algues marines étudiée, selon leur solubilité et leur nature chimique. Cette diversité structurale est responsable de l'extraction, pour cela trois solvants ont été utilisés pour déterminer les meilleurs rendements.

### 1. Rendement d'extraction des polyphénols

A travers l'observation des résultats des rendements d'extraction (Figures 23-24-25 et Tableau 8-9-10). Le solvant organique acétone donne un meilleur rendement d'extraction  $22.7 \pm 1.06\%$  sur les cinq échantillons étudiés alors que l'éthanol enregistre une moyenne  $14.42\%$ , par contre l'extraction par la phase aqueuse donne le plus faible rendement  $10.83 \pm 0.02\%$ .

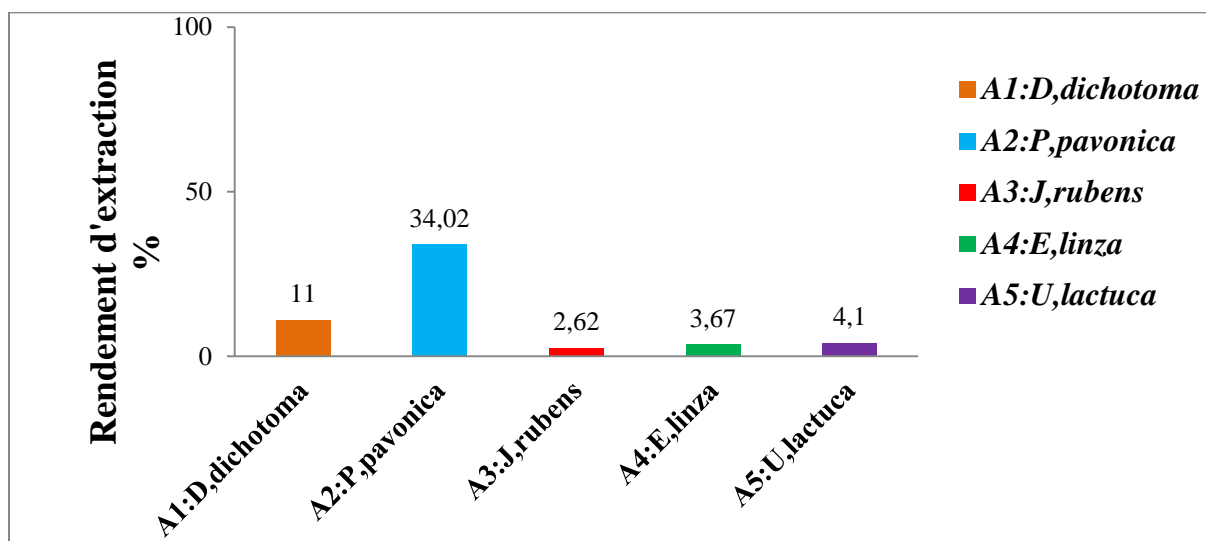
#### 1.1. Phase aqueuse

Les rendements d'extraction dans cette phase, varie d'une espèce à l'autre. Les résultats obtenus et présentés dans la Figure 23 montrent que les espèces brunes *Dictyota dichotoma* et *Padina pavonica* sont riches en polyphénols et enregistrent une moyenne plus élevée à savoir  $11\%$  et  $34.02\%$  respectivement. Suivie par les algues vertes *Enteromorpha linza* et *Ulva lactuca* avec une moyenne  $3.67\%$  et  $4.1\%$  respectivement. Enfin une faible teneur a été enregistré avec l'espèce rouge *Jania rubens* soit  $1.38\%$ . Ce résultat correspond avec celle trouver par (Oshima, 2002).

**Tableau 8** : Extraction des polyphénols (phase aqueuse)

Code	Espèce (algue)	Quantité phénolique (mg éq/AP)	% (w/w)*
A1	<i>Dictyota dichotoma</i>	2,2	11
A2	<i>Padina pavonica</i>	7,7	34,02
A3	<i>Jania rubens</i>	0,52	1,38
A4	<i>Enteromorpha Linza</i>	1,13	3,67
A5	<i>Ulva lactuca</i>	0,82	4,1

\*: quantité de polyphénols en mg /équivalent AP pour 100gr d'algue



**Figure 23:** Rendement d'extraction des polyphénols (phase aqueuse)

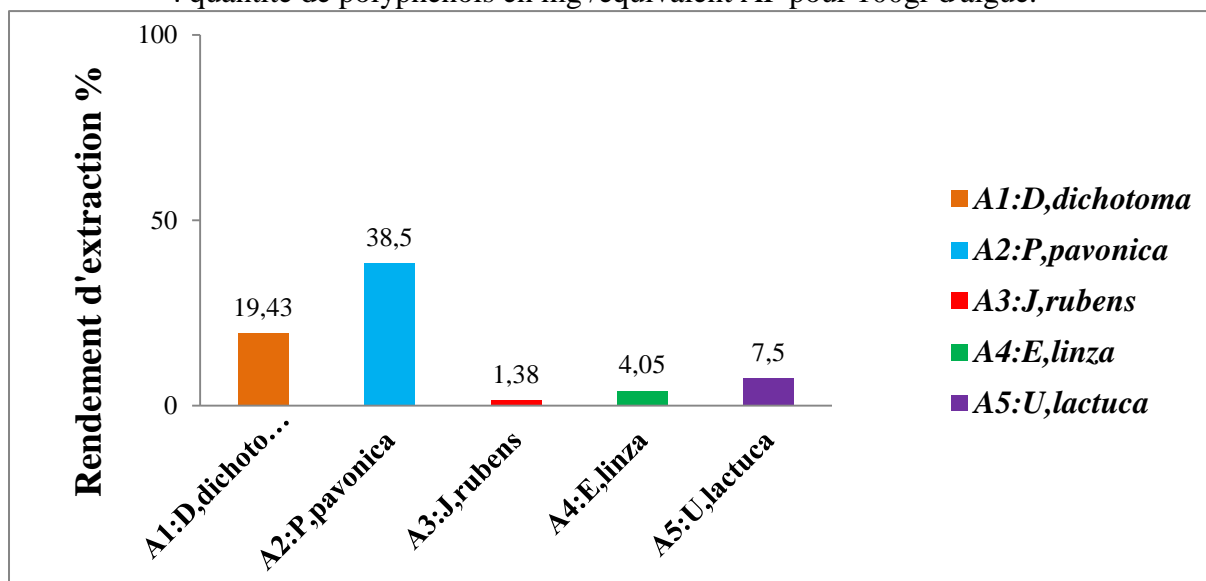
## 1.2. Phase Ethanolique

Par ailleurs, les extraits éthanoliques enregistrent des teneurs en polyphénols totaux plus élevées par rapport à celle enregistré dans la phase précédente. Les résultats obtenus et présentés dans la Figure 24 montrent que l'espèce brunes *Dictyota dichotoma* et *Padina pavonica* sont riches en polyphénols et enregistrent une moyenne plus élevée à savoir 19,43% et 38,5% respectivement. Suivie par les algues vertes *Enteromorpha linza* et *Ulva lactuca* avec une moyenne 4,05% et 7,5% respectivement. Enfin une faible teneur a été enregistré avec l'espèce rouge *Jania rubens* soit 2.62%. Les travaux conduits par (Mustapha et al, 2012) confirment nos résultats en indiquant que le solvant éthanolique permet une meilleure extraction des polyphénols totaux est cela due à la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique. Cette augmentation est due aussi l'affaiblissement des liaisons hydrogène dans les solutions aqueuses.

**Tableau 09 :** Extraction des polyphénols (phase éthanolique)

Code	Espèce (algue)	Quantité phénolique (mg éq / AP)	% (w/v) *
A1	<i>Dictyota dichotoma</i>	3,88	19,43
A2	<i>Padina pavonica</i>	6,8	38,5
A3	<i>Jania rubens</i>	0,27	2,62
A4	<i>Enteromorpha Linza</i>	0,81	4,05
A5	<i>Ulva lactuca</i>	1,5	7,5

\*: quantité de polyphénols en mg /équivalent AP pour 100gr d'algue.



**Figure 24** : Rendement d'extraction des polyphénols (phase éthanolique)

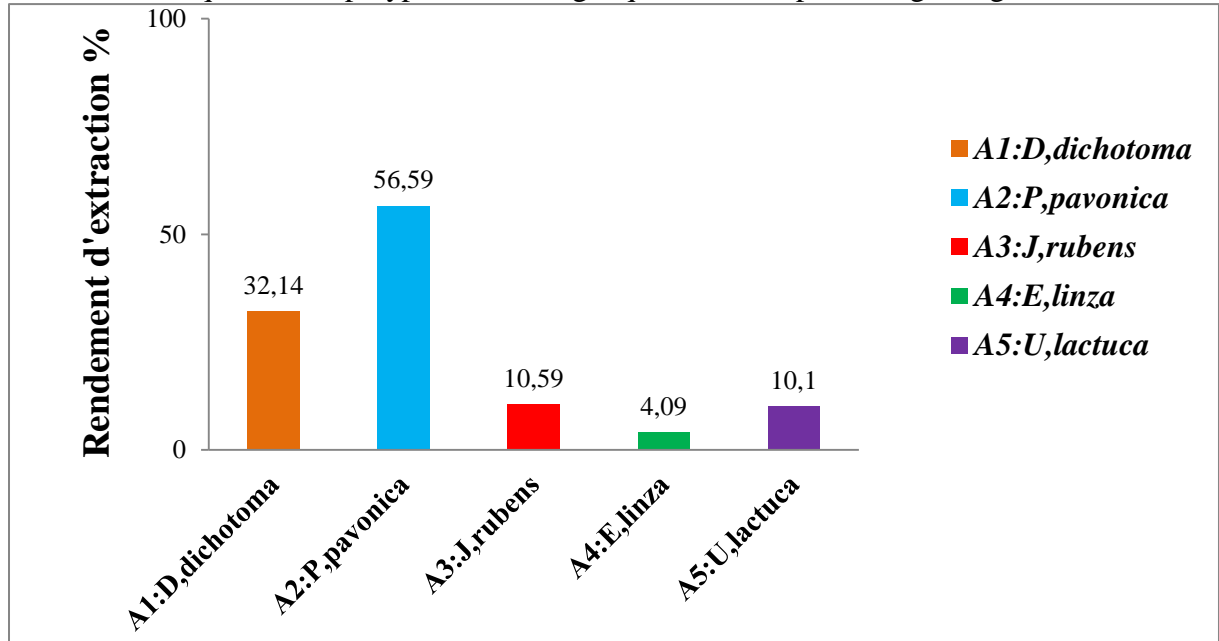
### 1.3. Phase Acétonique

Le solvant d'extraction acétone reste le meilleur extracteur des polyphénols totaux. Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction à phase acétonique, de la figure 25 et tableau 10 que ces rendements sont plus élevés par rapport aux résultats obtenus par l'éthanol et l'eau. Parmi les espèces étudiées, les algues brunes enregistrent un taux plus élevé *Padina pavonica* 56,59% et *Dictyota dichotoma* 32,14% respectivement. Suivie par l'algue rouge *Jania rubens* soit 10,59%. En revanche, les rendements des algues vertes *Enteromorpha linza* et *Ulva lactuca* sont très proches à savoir 4,09% et 10,1% respectivement (Mustapha et al, 2012).

**Tableau 10** : Extraction des polyphénols (phase acétonique)

Code	Espèce (algue)	Quantité phénolique (mg éq/AP)	% (w/v) *
A1	<i>Dictyota dichotoma</i>	6,42	32,14
A2	<i>Padina pavonica</i>	11,31	56,59
A3	<i>Jania rubens</i>	2,11	10,59
A4	<i>Enteromorpha Linza</i>	0,81	4,09
A5	<i>Ulva lactuca</i>	2,02	10,1

\*: quantité de polyphénols en mg /équivalent AP pour 100gr d'algue.



**Figure 25:** Rendement d'extraction des polyphénols (phase acétonique)

La variation de la teneur en polyphénols totaux en fonction de l'espèce d'algue est significative dont les deux algues brunes (*D.dichotoma* et *P.pavonica*) donnent les teneurs les plus élevées. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par (Oshima, 2002) qui constate que la teneur en polyphénols est significativement plus importante chez les algues brunes que chez les algues rouges ou vertes.

### **Conclusion :**

L'extraction des composés polyphénoliques est une étape importante pour la production et la valorisation des principes actifs car elle dépend de la méthode et du solvant choisi afin de préserver leur propriété biologique. L'extraction par broyage et par acétone sont les meilleures techniques d'extraction des polyphénols taux. Cette étude révèle la teneur des espèces d'algue des quantités importantes des polyphénols qui peuvent être exploités à plusieurs échelles: pharmaceutique et médicale (Mustapha *et al*, 2012).

## 2. L'activité inhibitrice des extraits d'algues

Les composés phénoliques des cinq espèces d'algues étudiés ont montré des différentes variations des résultats de l'activité amylasique *in vitro*. L'incubation de l'extrait enzymatique de l'amylase salivaire avec un substrat naturel (amidon) en présence des différentes concentrations des extraits polyphénoliques utilisés comme inhibiteurs a enregistré une diminution relative de l'activité amylasique. Plusieurs études ont démontré l'habileté des substances polyphénoliques à interagir avec les enzymes digestives en les inhibant (Nguélé *et al* 2012) Ce qui confirme nos résultats.

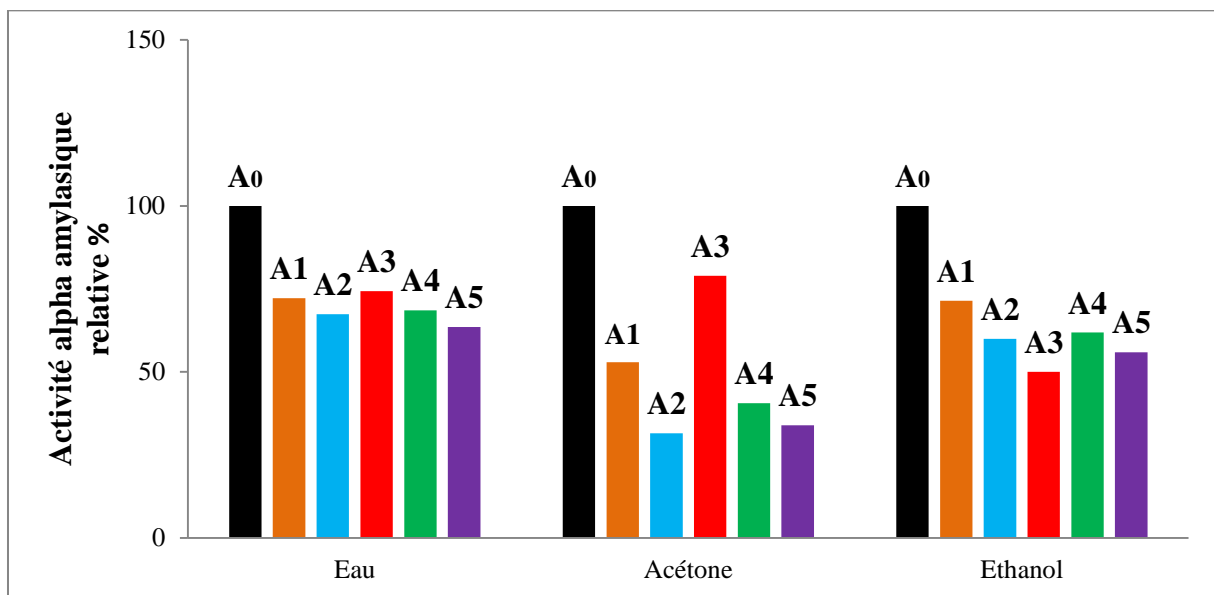
La présence de 0.1, 0.075 µl d'extrait d'algues pour les différentes phases enregistré dans le tableau récapitulatif (annexe), a montré une forte influence inhibitrice de l'activité enzymatique avec des valeurs très élevées par rapport avec celles enregistré par le blanc, dans ce cas nous nous sommes obligés d'utiliser des concentrations plus faibles c'est-à-dire 0.05 µl d'extrait.

D'après nos résultats enregistrés dans la figure 26, l'évaluation de cette inhibition relative en présence de 0.05 µl d'algue *Dictyota dichotoma* ont montré que l'extrait de la phase acétone a un effet positif sur l'activité amylasique salivaire avec une diminution de 47.06% par rapport à celle enregistrée en absence de cet inhibiteur, cette perte d'activité est due probablement à la forte teneur des polyphénols et aussi à la nature chimique de ces composés. Les valeurs de cette inhibition restent supérieures avec celle calculée avec l'extrait de la même espèce dans les deux autres phases : aqueuse, éthanolique 27.79%, 28.58% respectivement. Les travaux conduits par (Nguélé *et al* 2012) confirment nos résultats.

L'amidon est incubé avec l'amylase salivaire humaine en présence de 0.05 µl d'extrait d'algue *Padina pavonica* cette incubation conduit à une réaction enzymatique inhibée de 68.43% suivie par les taux 32.59% et 40% enregistrés en présence des deux extraits à phase aqueuse et éthanolique respectivement. Cette espèce marque un niveau d'inhibition de l'enzyme alpha amylase salivaire *in vitro* avec l'extrait préparé de la phase acétonique (Cengiz, 2010), comme nous avons déjà signalé la teneur en polyphénol et leur nature chimique ont influencé l'action enzymatique soit par modification du site actif de l'enzyme ou par sa compétition avec le substrat naturel qui est l'amidon (Seong *et al*, 2014).

Les résultats obtenus présentent également des activités inhibitrices des deux extraits d'algues verts *Ulva lactuca*, *Enteromorpha linza* montrent que les extraits de la phase acétonique ont un effet positif sur l'activité amylasique salivaire avec une diminution de 66.06%, 49.53% respectivement par rapport à celle enregistrée en absence de ces inhibiteurs, Les valeurs de cette inhibition restent supérieures à celle calculée avec l'extrait des mêmes espèces dans les deux autres phases éthanolique, aqueuse (Cengiz, 2010).

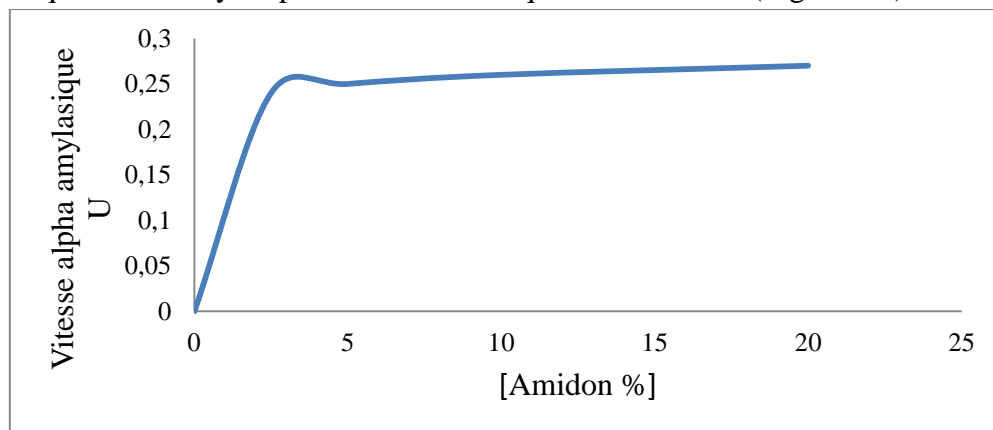
Les résultats détaillés dans la même figure présentent également des activités inhibitrices de l'extrait d'algue rouge *Jania rubens*, et montrent que l'hydrolyse de l'amidon et la production de maltose ont diminué pour atteindre un taux de 50% pour les extraits éthanoliques et 21.06% 25.72% aqueux et acétonique respectivement cette activité inhibitrice *in vitro* reste faible par rapport a celle enregistré avec les extraits algues précédents ces résultats marque une fiabilité significative vis-à-vis à leur teneur en polyphénols. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par (Muhamad, *et al* 2014) qui constatent que activité inhibitrice de  $\alpha$ -amylase augmente avec une augmentation de la teneur en composés polyphénoliques totaux.



**Figure 26 :** Histogramme représentant le pourcentage d'activité amylasique observé en présence de 0.05 $\mu$ l d'extrait.

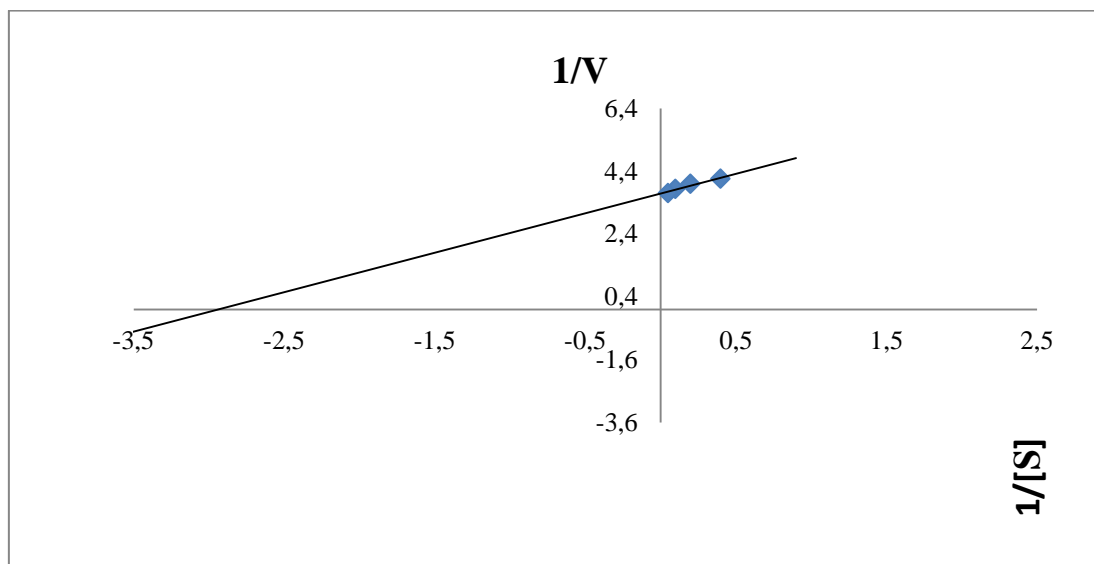
### 3. type d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par les extraits de *Padina pavonica*, *Ulva lactuca*

D'après les mesures spectrophotométriques réalisées sur l'activité enzymatique de l' $\alpha$  amylase et comparativement à la représentation graphique de Michaelis-Menten, on aperçoit que cette enzyme présente une cinétique michaelienne (Figure 27).



**Figure 27:** La cinétique enzymatique de l' $\alpha$ -amylase

Les différents paramètres cinétiques de l'enzyme ( $V_m$ ,  $K_m$ ) sont déterminées selon l'équation en double inverse de Lineweaver Burk [ $1/V = f(1/S)$ ] (Figure 28).



**Figure 28 :** Représentation de Lineweaver-Burk de l'enzyme  $\alpha$ -amylase

A partir de la représentation de Lineweaver-Burk de l' $\alpha$ -amylase, la vitesse maximale  $V_m$  est de  $0.29 \text{ U}^{-1}/\text{ml}/\text{min}$  et la constante de Michaelis  $K_m$  est de  $0.34 \text{ Mm}$ .

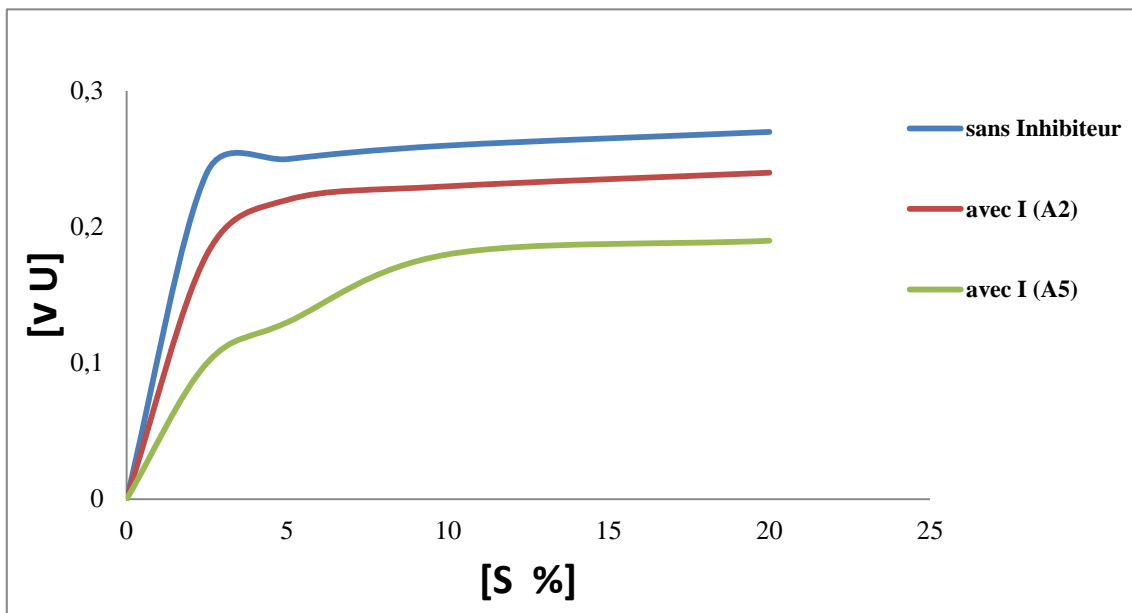
L'étude de l'effet des extraits polyphénoliques sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase est effectuée en mesurant la concentration de maltose libéré qui exprime une vitesse en U.

**Tableau 11 :** Activité amyliasique en absence et en présence de l'inhibiteur [0.05 $\mu$ l]

Activité Amylasique (U)	[Amidon] %							
	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Sans I	0,24	0,25	0,24	0,26	0,21	0,24	0,21	0,27
Avec I A2 [0.05]	0,15	0,22	0,11	0,23	0,07	0,21	0,07	0,25
Avec I A5 [0.05]	0,08	0,13	0,11	0,18	0,04	0,12	0,06	0,19

D'après les tracés de la figure 29a et 29b, La constante d'inhibition ( $K_i$ ) et Le type d'inhibition des deux espèces *Padina pavonica* (algue brune) et *Ulva lactuca* (algue verte). Sont déterminés par les représentations graphiques  $1/V = f$  de chaque extrait phénolique





**Figure 29a :** Représentation de Michaelis-Menten de l'enzyme  $\alpha$ - amylase en présence et en absence de l'inhibiteur

La constante d'inhibition ( $K_i$ ) est calculée à partir de ce graphe par la projection du point d'intersection des droites sur l'axe Z, tandis que le type d'inhibition est déduit à partir du point de rencontre de ces tracés (**Figure 29b**).

$$1) \frac{1}{V_{\max \text{ app}}} = \frac{1}{V_m \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$2) \frac{1}{K_m \text{ app}} = \frac{1}{K_m \cdot K_i} \cdot [I] + \frac{1}{K_m}$$

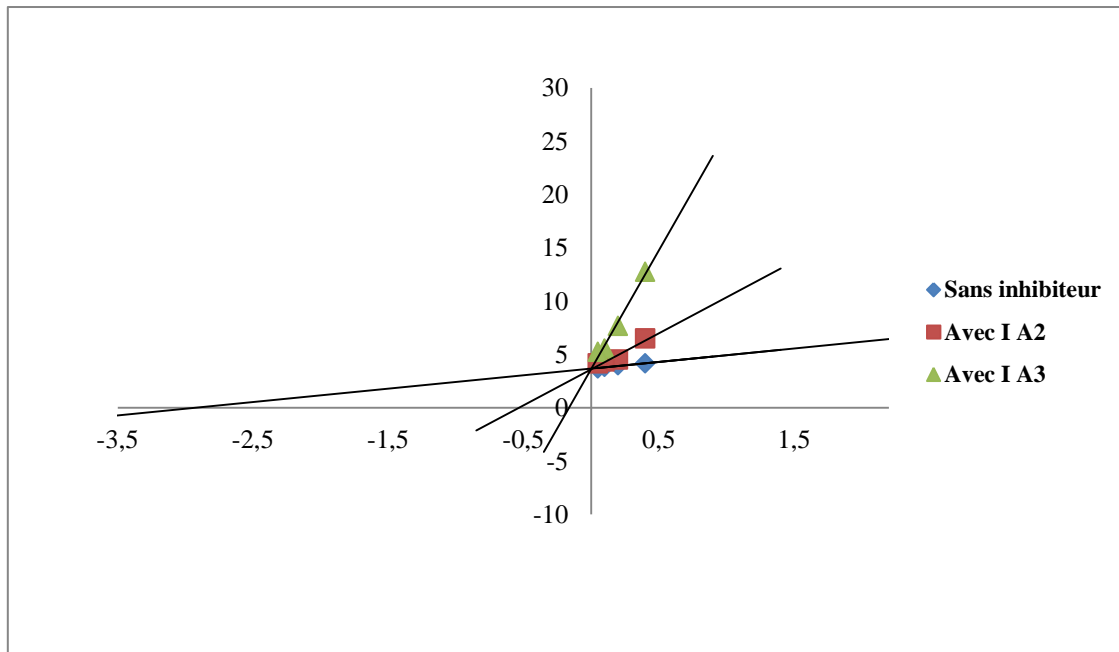
Où :

$V_{\max \text{ app}}$  : vitesse maximale apparente (déterminée à partir de la droite d'inhibition)

$V_{\max}$  : vitesse maximale (déterminée à partir de la droite sans inhibition)

[I] : concentration de l'inhibiteur

$K_i$  : constante d'inhibition.



**Figure 29b** : Représentations graphiques  $1/V = f([S])$  des deux espèces

**Le tableau 12** : Type d'inhibition des deux espèces d'algues *Padina pavonica*, *Ulva lactuca*

Espèce d'algue	Type d'inhibition	Ki (µg/ml)
<i>Padina pavonica</i>	Compétitif	11.01
<i>Ulva linza</i>	Compétitif	2

Les résultats obtenus montrent que les deux espèces d'algues ont un pouvoir inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase de type compétitif dont la meilleure inhibition a été enregistrée avec l'algue *Padina pavonica*.

## **Conclusion :**

L'extraction des cinq espèces d'algues à différentes phases (aqueuse, acétonique et éthanolique) a montré clairement des teneurs considérables en composés phénoliques dans les algues brunes. Dont le meilleur solvant d'extraction a été enregistré avec l'acétone.

Le test d'activité de l'enzyme  $\alpha$ -amylase salivaire montre que les extraits polyphénoliques ont des effets inhibiteurs sur l'enzyme  $\alpha$  amylase salivaire. dont la meilleure inhibition a été enregistrée par l'extrait de l'espèce *Padina pavonica*.

L'étude cinétique des réactions enzymatiques en présence des extraits polyphénoliques d'espèces *Padina pavonica* et *Ulva lactuca* montre que ces extraits présentent un pouvoir d'inhibition compétitive. Avec deux différentes valeurs de  $K_i$  **11.01**  $\mu\text{g/ml}$  et **2**  $\mu\text{g/ml}$  respectivement, dont le meilleur type d'inhibition a été enregistrée par l'extrait de l'espèce *Padina pavonica*.

On conclut que les algues marines sont une source importante de constituants chimiques (polyphénols totaux) ayant un potentiel d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase salivaire et peuvent être utilisés aussi comme source d'aliment fonctionnel ou thérapeutiques.

L'inhibition de l' $\alpha$ -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 et les maladies parodontales. Pour mieux développer ce domaine des études approfondies sont nécessaires à l'échelle protéomique et physiologique.

## **Perspectives**

Les extraits polyphénoliques des deux algues *Padina pavonica* et *Ulva lactuca* révèlent partiellement des activités inhibitrices compétitives très intéressantes, ce qui nous encourage d'investir dans ce domaine afin de caractériser les molécules responsables de cette activité inhibitrice.

## الملخص

يندرج عملنا في اطار دراسة النشاط التبيطي لمستخلصات الطحالب البوليفينولية على نشاط الانزيم اللعابي  $\alpha$ -amylase. الخطوة الاولى في هذه الدراسة تكمن في استخراج و تحديد كمية البوليفينول في كل نوع، اما الخطوة الثانية تمت فيها دراسة اثار البوليفينول على حركية نشاط الانزيم اللعابي  $\alpha$ -amylase المسؤول على هدم السكريات المعقدة.

التحليل لمستخلصات الطحالب البحرية: *U.lactuca*, *E.linza*, *J.rubens*, *D.dichotoma*, *P.pavonica*: يتبين من خلال نتائج الفحص اللوني المواد الفعالة (polyphénol)

النتائج المتحصل عليها اظهرت بوضوح ان الطحالب البنية (*D.dichotoma*, *P.pavonica*) تحتوي على نسبة عالية من مادة البوليفينول في حين ان المستخلص الاسيتوني للطحلب البني سجل اكبر قيمة لكمية البوليفينول (56.59% و 32.14%) تليها مستخلصات الايثانول (38.5% و 19.43%) أما استخلاص المركبات الفينولية تكون منخفضة في الوسط المائي (34.02% و 11%). بينما مستخلصات الطحالب الخضراء (*E.linza*, *U.lactuca*) و الحمراء (*J.rubens*) تحتوي على نسب منخفضة من مادة البوليفينول (3.67% , 4.01%)

نتائج دراسة حركية التفاعلات الانزيمية بينت ان مستخلصات البوليفينول لها تاثيرات مثبطة على الانزيم اللعابي  $\alpha$ -amylase وجود كمية البوليفينول لكل من الطحلب (*D.dichotoma*, *P.pavonica*) ادى الى خفض حركية نشاط الانزيم  $\alpha$ -amylase بنسبة (68.43% و 47.06%) لمستخلص الاسيتون تليها (32.59%, 27%) و (40%, 28.58%) لمستخلص الايثانول و المائي على التوالي. كما تغيرت حركية نشاط الانزيم اللعابي  $\alpha$ -amylase مع مستخلصات الطحالب الحمراء و الخضراء

نتائج دراسة حركية التفاعلات الإنزيمية مع الطحلبين *P.pavonica*, *D.dichotoma* أثبتت ان مستخلصات البوليفينول لها تاثيرات مثبطة على هذا الانزيم حيث سجلنا قيمتين مختلفتين ل  $K_i$   $11.02\mu\text{g/ml}$  و  $2\text{m/gul}$  و بذلك تم تسجيل افضل تثبيط مع الطحلب *P.pavonica*.

## الكلمات المفتاحية :

تثبيط انزيمي polyphénols مستخلصات الطحالب البحرية  $\alpha$  اللعابي  $\alpha$ -amylase-انزيم

## Abstract

Our research is elaborated within the framework of a study to highlight the inhibitory activity of polyphenolic extracts of seaweed onto the  $\alpha$ -amylase Human saliva. The first step within this study consists of extracting and quantifying the phenol compound. As a second step, we have contributed in the study of these extracts and their effect on the kinetics of the  $\alpha$ -amylase enzyme accountable for the degradation of starch. Quantitative analysis of seaweed extracts: *D. dichotoma*, *P. pavonica*, *J. rubens*, *E. linza* and *U. lactuca* is shown by the results of colorimetric dosage of bioactive substances (polyphenols).

The results of analyzes of extracts clearly show considerable contents of polyphenolic compound for types of brown seaweed (acetone, aqueous and ethanolic). Acetone extract has displayed a maximum value marked with a poly-phenol content expressed as equivalent to the types *D. dichotoma*, *P. pavonica* and is between (32.14% and 56.59%). Followed by ethanolic extracts (19.43% and 38.5%), in the end the extraction of phenolic compounds would be still low within the aqueous milieu (11% and 34.02%); while extracts of green algae (*U. lactuca* and *E. linza*) and red (*J. rubens*) are extracts with low poly-phenol content, respectively (4.01%, 3.67% and 2.062%).

The results of the kinetic study of enzymatic reactions have shown that the poly-phenol extracts have an inhibitory effect on salivary  $\alpha$ -amylase enzyme. The presence of poly-phenolic extracts *P. pavonica* and *D. dichotoma* decreased the activity of the salivary  $\alpha$ -amylase and display rates of (68.43% and 47.06%) for the acetone extract followed by (32.59%, 27.79%) and (40%, 28.58%) in the presence of the two extracts at aqueous and ethanol stages respectively.

Our polyphenolic extracts of the enteromorpha linza, U. lactuca and J. rubens types have also modified the production yield of maltose (49.53%, 66.06% and 50%) respectively. With the presence of extracts of both types *P.pavonica* and *U. lactuca*, the demonstrated competitive inhibitory effect is therefore taken as a reference with respect to the measured activity in the absence of the inhibitor. Maximum inhibition is recorded by the extract of the types *P. pavonica* with a  $K_i$  of 11.01 $\mu$ g/ml followed by 2  $\mu$ g/ml recorded with *U. lactuca*. This study has shown that our polyphenolic extracts display very interesting competitive inhibitory activities, which enhances us to go with deeper study so as to highlight the molecules accountable for such an activity.

**Keywords:** Salivary  $\alpha$ -amylase, Seaweed, polyphenolic extracts, Inhibition

## Les références:

- 1- **Ansés. (2010).** Évaluation des risques liés aux pratiques alimentaires d'amaigrissement. Argos P., Rossmann M. G., Grau U. M., Zuber G. F., Tratschi J. D. (1979). Thermal stability and protein structure. *Biochem.*, n°18, pp: 5698-5703.
- 2- **Bahorum T. (1997).** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle Food and Agricultural Research council Mauritias pp: 83-94.
- 3- **Bergbauer M., Humberg B. (2000).** La vie sous-marine en mediterranee, Guide Vigot, ed. Vigot, pp: 318.
- 4- **Berry D. R., paterson A. (1990).** Enzymes In food industry. In Suckling C. J. Enzymes chemistry impact and application. Ed. chapman H. london. PP: 306-351.
- 5- **Berset C. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Edit Lavoisier, 264-293.  
Natalia Fagali N., Catalá A. (2008). *Biophys. Chem.*, 137, 56-62.
- 6- **Blunden G. (1991).** Agricultural uses of seaweeds and seaweed extracts. In: Guiry MD, Blunden G (eds) *Seaweed resources in Europe: uses and potential.* Wiley, Chicester, pp: 65-81.
- 7- **Boisson Vidal, C., Chaubet F., Chevolot L., Sinquin C., Theveniaux J., Millet J., Sternberg C. (2007).** Mulloy, B; Fischer, A.M: Drug Development Research, 51, 216.
- 8- **Boizot N., Charpentier J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra.* p: 79-82.
- 9- **Bousseboua H. (2002).** Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Editions de l'Université Mentouri. Constantine Algerie pp: 230-231.
- 10- **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3ème éd). Tec et Doc (Ed), Paris , pp: 1120.
- 11- **Cabioc'h J., Floch J. Y., Le Toquin A., Boudouresque C. F., Meinesz A., Verlaque M. (2006).** Guide des algues des mers d'europe, manche, atlantique, mediterranee, Les guides du naturaliste, ed. Delachaux & Niestle, pp: 272.
- 12- **Cappuccio F. P., Taggart F. M., Kandala N. B., Currie A., Peile E., Stranges S., Miller MA. (2008).** Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *31(5): 619-26.*

- 13- **Cayla M. (1995).** Decouvrez des algues propriétés applications recettes. Editions Chiron.
- 14- **Cengiz S. L., Cavas K., Yurdakoc. (2010).** Alpha-amylase inhibition kinetics by caulerpenyne.
- 15- **Chaput J. P. (2008).** The Association Between Sleep Duration and Weight Gain in Adults: A 6-Year Prospective Study from the Quebec Family Study. *Sleep*.1; 31(4): 517–523.
- 16- **Chiba S. (1988).** Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.). Pergamum Press, Oxford, U.K. pp: 104-116.
- 17- **Christian M. (1982).** L'amidon et les enzymes en sucrochimie industrie alimentaires et agricole. N°10, pp: 21-25.
- 18- **Compre. (1974).** Cyanophytes de la région du lac Tchad ; taxons, combinaisons et noms nouveaux. *bull. jard. bot. nat. belg.*, 44 : 17-21.
- 19- **Coolbear T., Daniel R. M., Morgan H. W. (1992).** The enzymes from extreme *thermophiles*: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology*. (45): 57–97.
- 20- **Coombe D. R., Parish C. R., Ramshaw I. E., Snowden J. M., (1987).** Analysis of the inhibition of tumor metastasis by sulfate polysaccharides. *Int J Cancer* 39: 82-88.
- 21- **Dabouineau L. (2004).** Un autre regard sur les algues marines. Le rôle d'eau. Vol. 118: 1–4.
- 22- **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris.p: 317.
- 23- **Demain A. L. (2000).** Microbial Biotechnology(feature). *Trends in biotechnology* pp: 26- 31.
- 24- **De Bruyne T., Pieters ., Deelstra H ., Vlietink A. (1999).** Condensed vegetable tannins Biodiversity and biological activities .*Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 445-459.
- 25- **De Reviere B. (2002).** Biologie et phylogénie des algues, Tome 1: BIOLOGIE, ed. Belin Sup., pp: 352.
- 26- **De Reviere B. (2002).** Biologie et phylogénie des algues, tome 2: embranchements, ed. Belin Sup., pp: 255.
- 27- **Donald Voet Judith G., Voet. (1998).** Biochimie ; édition De Boeck Université. PP: 355-356, 358.
- 28- **Falchi M., Johanna C., et al. (2014).** Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity.

- 29- Fogarty W. M. (1983).** Microbial amylase, in: microbial enzymatique and biotechnology. Appelled science publishers London.PP: 1-92.
- 30- Fogarty W.M., Kelly C.T. (1980).** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London: Academic Press.5, pp: 115-170. 268.
- 31- Fogarty W. M., Kelly C. T. (1994).** Microbial Enzymes and Biotechnology .Applied Science, London, New York. (43): 71-132.
- 32- Forkmann G., Martens S. (2001).** Metabolic engineering and applications of flavonoids. Current opinion in biotechnology, 12: 155-160.
- 33- Formica J. V., Regelson W. (1995).** Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids.*Fd Chem.Toxic*, 33:1061-1080.
- 34- Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch J. R. C., Silva C. P., Grossi De Sá M. F. (2000).** Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitorstowards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities.European Journal of Biochemistry, 267(8), 2166-2173.
- 35- French D. (1975).** Chmistry and biochemistry of starch, in International reviw of scione 13-biochemystry of carbohydrates, serie 1,5 Uni. Park press, ch.6: 309-321.
- 36- French D., Enas N., Danial M. (1975).** Chemistry and biochemistry of starch In MTP International review of science biochemistry of carbohydrates serie 1,5 Butterworth Park Press. PP: 309-321.
- 37- Frost G. M., Col. (1987). PP: 125-126.**
- 38- Gao H., Huang Y. N., Gao B., Xu P. Y., Inagaki C., Kawabata J. (2008).**  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. Food Chemistry, 106, 1195-1201.
- 39- Gayral P. (1975).** Les algues: morphologie, cytologie, reproduction, ecologie. Ed Doin p : 41.
- 40-Gervaise Y. (2004).** Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. Polyphénols. Paris.PP: 33.
- 41- Ghestem A ., Seguin E ., Paris M., Orecchioni A. M. (2001).** Le préparateur en pharmacie. Dossier 2.Editions TEC & DOC Paris. PP: 275.
- 42-Girotti C. C. (2006).** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sousl'effet de la cirsimarine , flavone extraite de miirotea de bilis .thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. PP: 136.



- 43- Graber M., Comes D. (1989).** Microbial  $\alpha$  -amylases: Enzyme and Microbiol Technology. (2) PP: 663-687.
- 44- Graber M. D., Combes. (1989).** Effect of polyols on fungal alpha-amylase thermostability. Enzy Microb Technol., 11: 673-677.
- 45- Green Woods T. (1970).** Starch and glycogen, volume 2B Second edition .Academic press. New-York and london pp: 495-496.
- 46- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V. K., Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective: A review. Process biochemistry.38(1): 599-616.
- 47- Hanrahan., Col. (1953). Bji Aaghara et Col. (1954).** La production de l' $\alpha$  amylase à intérêt chimique et enzymatique. Mémoire 2005-2006. Réalisé par bourbia ahmed.
- 48- Heidari R., Zareae S., Heida rizadeh M., (2005).** Extraction, Purification, and Inhibitory Effect of Alpha-Amylase Inhibitor from Wheat (*Triticum aestivum* var. Zarrin). Pakistan Journal of Nutrition, 4 (2): 101-105.
- 49- Hienerwadel R. (2013).** Inhibition de l'activité enzymatique (Cinétique enzymatique : *Cornish-Bowden et al.* Biochimie : Stryer, chap. 8).
- 50- Hopkins W. G. (2003).** Physiologie végétale. In: Hopkins, W.G. (Eds.). Belgique, Bruxelles, De BoeckUniversité, pp: 512.
- 51- Jean Claude Julien. (2007-2014).** (*Ulva (Enteromorpha) sp.*, Entéromorphe. Pointe du Castelli, Loire-Atlantique, Ouest de la France. Profondeur en surface.
- 52- Julien J. C. (2007).** Description d'*Ulva (Enteromorpha)*.
- 53- Juan P., Jian P. Y., ChouFei W., JiangHai W. (2011).** "Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health," *Marine Drugs*, 9: 1806-1828.
- 54- Kandra L., Guémant G., Zajacz A., Batta G. (2004).** Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **319**: 1265-1271.
- 55- Kenned J. F. (1977).** Enzymes. In: Specialist periodical reposts. Carbohydrate chemistry by: Brima Combe. J. s. Volume 9. The chemical society. Burlington house. London. PP: 359-361.
- 56- Kennedy J. F. (1979).** La production d' $\alpha$  amylase à partir de déchets de datte. Réalisé par: Harbi Rima (2005-2006) (1994-1995). Réalisé par Ouchatati Meriem.
- 57- Khanbaba K., Ree T. R. (2001).** Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, 18: 641-649.

**58- Kim O. R. (1995).** Purification and characterisation of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium* Sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(6): 374-382.

**59- King A et Young G. (1999).** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 99:213-218.

**60- Knight J. W. (1967).**

**61- Kornprobst J. M. (2005).** Substances naturelles d'origine marine. Chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie. Editions Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp: 1830.

**62- Kützing F. T. (1843).** Phycologia generalis oder anatomie, physiologie und systemkunde der tange. *In: Brockhaus F. A. (Eds.).* Germany, Leipzig, F. A. Brockhaus, p: 457.

**63- Lahaye. (1991).** Marine algae as source of fibres: determination of soluble and insoluble dietary fibre content in some "sea-vegetables". *Journal Sciences Food Agricole* 54: 587-94.

**64- Lamouroux J. V. F. (1813).** Essai sur les genres de la famille des Thalassiphytes non articulées. *In: Dufour, C.(Eds.).* France, Paris, Annales du Muséum d'Histoire naturelle, p: 84.

**65- Larpent G. M., Sauglier J. J. (1992).** Biotechnologie: principes et methodes. Biosciences et techniques, Ed. Doin, paris. P: 142-67.

**66- Larpant G. K., Sanglier J. J. (1992).** Biotechnologies.principes et méthodes. Biosciences et techniques,doin éditeurs , Paris: 72-93 ;97-101,142-155,316-323.

**67- Lewin R. A. (1974).** "Algal Physiology and Biochemistry", Botanical Monograph., Edit. W. D. P. Stewart, University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

**68- Machius M., Vertesy L., Huber R., Wiegand G. (1996).** Carbohydrate and Protein-based Inhibitors of Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase: Structure Analysis and Comparison of Their Binding Characteristics" *Journal of Molecular Biology*, 260: 409-421.

**69-Makene K. K. (1989).** Salivary enzymes. In: Tenovuo, J. O. (Ed), Human, Boca R oton, P: 93-119.

**70-Marfak A. (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les

Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. PP: 187.

**71- Mazur A. K., Nakatani H. (1993).** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. Arch. Bioch. Biophysics. 306(1): 29-38.

**72- Mercier (1972).** Les enzymes amylolytiques hydrolase et dépolymérase by: Mourachie, A et Coses ; c. éditeur Gauchier.Villarsbordas.Paris,PP: 144 -116-128-1302-132-133.

**73- Mercier C. (1985).** Les enzymes amylolytiques. In: hydrolases et polymérases. Mauranche. A et Costes. Costes. C. Ed. Gauthier-Villars. PP: 113-116, 123 -130, 132-133.

**74- Mercier C. (1985).** Les enzymes amylolytiques. In Mauranche A. et Costes. Costes. C. hydrolases et dépolymérases. Edition Gauthier-Villars. PP: 110-140.

**75- Metting B., Rayburn W. R., Reynaud P. A. (1988).** Algae and agriculture.In: Lembi CA, Waaland JR (eds) Algae and human affairs.Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 335–370.

**76- Miller G. L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*.1959; 31(3): 426–428.

**77- Mohamed S., Hashim S. N., Rahman H. A. (2012).** Seaweeds : a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. Trends in Food Science & Technology, 23, (2), 83-96.

**78- Mojetta A., Ghisotti A. (1995).** Flore et faune de la mediterranee, Guide Vert, ed. Solar, France, p: 318.

**79- Morris I. (1967).** "An Introduction to the Algae", Ed. Hutchinson and Co, London, pp: 5.

**80- Muhamad F., Asep A. P. (2014).**  *$\alpha$ -amylase and  $\alpha$  glucosidase inhibition by brown seaweed (*Sargassum sp*) extracts.*

**81- Nadirman H., Yoshiyuki O. (2006).** Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from *Penicillium brunneum*, Journal Starch Starke, (7): 25-28.

**82- Nguélé L. R., Fokunang C. N., Etoundi C. B., Chakokam R. M., Ngondi J. L., Oben JE. (2012).** Controle de quelques composantes du syndrome metabolique par des extraits hydroethanoliques d'*afmomum aulacocorpus*, *a.citratum* et *a.daniellii* (hook.f) k.schum, Vol 12 (3).

**83- Nwosu F. J., Morris V. A., Lund D., Stewart H. A., Ross G. J., McDougall. (2010).** Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. Food Chemistry, published online ahead of print, doi: 10.1016/j.foodchem. 11. 111.

**84- Oberlin P., Mouquet M. C., (2002).** Les interventions de chirurgie fonctionnelle: une activité programmée importante mais hétérogène, Etudes et résultats, n°194, DREES.

**85- Octivio L., Rigden D., (2000).** Activity of wheat  $\beta$ -amylase inhibitors towards bruchid-amylase and structural explanation of observed specificities. European Journal of Biochemistry, 267(8): 2166-2173.

**86- Octávio L. F., Daniel J. R., Francislete R. M., Carlos Bloch J. R., Carlos P. S., Maria F. G. (2000).** Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards birched  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. Eur. J. Biochem. 2(67): 66-73.

**87- Oshima Y. (2002).** (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Chemistry - Sendai, Japon), Pr J-L. NICOLAS (Ifremer, Brest).

**88- Payan F. (2004).** Structural basis for the inhibition of mammalian and insect alpha-amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1696, 171-180.

**89- Pazur H., John. (1965).** Enzymes in synthesis and hydrolysis, in: starch chemistry and technology volume1. Fundamental aspect. BY: Roy. L. whistler et Eugene.F. Apachall.Academie press.New york and London. PP: 132-141, 155-165-170.

**90- Peronny S. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie. PP: 151.

**91- Pérez R. (1997).** Ces algues qui nous entourent. In: Arbault, S., Barbaroux, O., Phliponeau, P., Rouxel, C. (Eds.). France, Plouzané, Editions IFREMER, pp: 272.

**92- Poitou Bernert C. (2007).** Nutritional deficiency after gastric bypass: diagnosis, prevention, treatment; Diabetes Metab. 2007; 33(1): 13-24.

**93- Qian M., Haser R., Rayan F. (1993).** In moléculaire biologie. P: 231-785- 799.

**94- Qian M., Haser R., Rayan F. (1995).** Protéine science PP: 4, 747- 755.

**95- Radmer R. J., Parker B. C. (1994).** Commercial application of algae: opportunities and constraints. Journal of Applied Phycology. 6, 93-98.

**96- Reviere B. (2002).** Biologie et phylogénie des algues, tome 1: cours. In: Belin (Eds.). France, Paris, Belin Sup. Sciences, PP: 351.

**97- Romani A. P., Pinelli C., Cantini A., Cimato D., Heimler. (2006).** Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). J. Food Chem. Vol. 95. PP: 221-225.

- 98- Scannapieco F. A., Torres G., Levine M. J. (1993).** Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation.
- 99-Scannapieco F. A., torres G., Levine M. J. (1993).** Salivary alpha amylases: role in dental plaque and caries formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 301-307.
- 100- Schamburg D., Col. (1991).** Cité par: Schamburg D., Salzmann M. G. B. F. (1991). Alpha amylase. In: *Enzyme handbook*, volume 4 spring-verlag. Berin. PP: 1-3.
- 101- Sindhu S., Nair V. K., Anshu M. (2013).** *In vitro* studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. 3(1): 128-132.
- 102- Škaloud P. (2006).** Variation and taxonomic significance of some morphological features in european strains of *Klebsormidium* (*Klebsormidiophyceae*, *Streptophyta*). *Nova Hedwigia*, 83, 533-550.
- 103- Seong W. M., Ji Sook Han. (2014).** *Polyopes lancifolia* Extract, a Potent  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor, Alleviates Postprandial Hyperglycemia in Diabetic Mice. 19(1): 5–9.
- 104- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A. R., Simonic M., Knez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89: 191-198.
- 105- Spolaore P., Joannis Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006).** Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience et Bioengineering* 101: 87-96.
- 106- Tigue M. C., Kelly C. T., Doyle E. M., Fogarty W. M. (1995).** The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology.* (17): 570-573.
- 107- Valisadeh M., Sa'adati M., et al (2007)** Effects of some mineral compounds on the salivary  $\alpha$ -amylase activity of the sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Put.) (Heteroptera: Scutelleridae). 31 (3): 163-173.
- 108- Vivas N., Nonier M. F., Pianet I., Vivas de Gaulejac N., Fouquet E. (2006).** Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* heartwood: quantification and structures. *Comptes rendus chimie*, 9:120-126.
- 109- Weinberg S. (1994).** Decouvrir l'atlantique, la manche et la mer du nord, ed. Nathan nature, p: 384.
- 110- Weinberg S. (1996).** Decouvrir la mediterranee, ed. Nathan nature, pp: 352.
- 111- Weinberg S. (2007).** Decouvrir la mediterranee, ed. Nathan nature, pp: 352.

**112- Weinberg S. (1996).** Decouvrir la mer rouge et l’ocean indien, ed. Nathan nature, France, pp: 415.

**113- Weinberg S. (2004).** Decouvrir l’atlantique, la manche et la mer du nord, ed. Nathan nature, p: 384.

**114- Weinberg S. (2007).** Decouvrir la mediterranee, ed. Nathan nature, pp: 352.

**115- Wiley. (2005).** RA Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, IBSN: 0471686964.

**116- Whelan., Col. (1964).** Cité par: Wlieland W. J. (1964). Hydrolysis whith alpha-amylase (section V: starch degradation); in: starch, volume IV. Methods in carbohydrates chemistry.

**117- Xie D. Y., Dixon R. A. (2005).** Proanthocyanidins biosynthesis-still more question than answers *.Phytochemistry* ,66: 2127-2144.

**118- Zakowski J. J., Bruns D. E. (1985).** Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 21, 283-322.

**119- Zimmer N et Cordesse R. (1996).** Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants Ed INRA Prod Anim, 9: 167-179.



<b>Incubation 2heurs à température ambiante</b>
<b>Lire l'absorbance à 765nm</b>

➤ **Dosage de l'activité**

**Préparation des solutions réactives :**

- **DNSA** : dissoudre 1 g de 3.5 dinitrosalicylique acide dans 20ml de NaOH (2N) et 50ml d'eau distillée, ajouter 30g de tartrate double de sodium et potassium, compléter à 100ml avec de l'eau distillée, filtrer et conserver à l'abri de la lumière (dans un flacon fumé).
- **SUBSTRAT** : dissoudre 1g d'amidon soluble dans 100ml de tampon 0.1 N pH6.9
- **Tampon phosphate 0.1N** :  
-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 PH 6.9, Na HPO<sub>4</sub> PH6.9
- **Protocole courbe étalonnage :**

<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>0</b>	<b>0.04</b>	<b>0.08</b>	<b>1.2</b>	<b>1.6</b>	<b>2</b>
<b>Solution mère Maltose 2mg/ml(ml)</b>	<b>0</b>	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>	<b>0.6</b>	<b>0.08</b>	<b>1</b>
<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>1</b>	<b>0.08</b>	<b>0.06</b>	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>	<b>0</b>
<b>DNSA</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Incubation 10min à 100°C</b>						
<b>Refroidissement dans l'eau froide ou bain de glace</b>						
<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Lire l'absorbance à 540nm</b>						

➤ **Activité amylasique en présence et en absence d'inhibiteur [0.05µl]**

- **En présence d'inhibiteur**

<b>[substrat]</b>	<b>2.5</b>	<b>5</b>	<b>7.5</b>	<b>10</b>	<b>12.5</b>	<b>15</b>	<b>17.5</b>	<b>20</b>
<b>Salive diluée (3fois)(ml)</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>Extrait d'algue (ml)</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>
<b>Incubation 30mn à température ambiante</b>								
<b>DNSA (ml)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Incubation 10mn à 100°C</b>								
<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Lire l'absorbance à 540nm</b>								



- En absence d'inhibiteur

[substrat]	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
Salive diluée (3fois)(ml)	5	5	5	5	5	5	5	5
Eau distillée (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<b>Incubation 30mn à température ambiante</b>								
DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Incubation 10mn à 100°C</b>								
Eau distillée (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Lire l'absorbance à 540nm</b>								

Etude des différents paramètres cinétiques de l'enzyme (Vm, Km) et détermination de type d'inhibition des deux espèces *P.pavonica* et *U lactuca* :

[Amidon ] %	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5
Activité amylasique sans I	0	0,24	0,25	0,24	0,26	0,21	0,24	0,21
Activité amylasique avec I A2 [0.05]	0	0,18	0,22	0,18	0,23	0,09	0,21	0,17
Activité amylasique avec I A5 [0.05]	0	0,1	0,13	0,11	0,18	0,12	0,16	0,15

Tableau Récapitulatif d'extraction des polyphénols

		présence I [0.1]	présence I [0.075]	Présence I [0.05]
A1	Eau	57,14	52,77	72,21
	Acétone	60	142	52.94
	Ethanol e	119	77	71.42
A2	Eau	42,85	25	67.41
	Acétone	120	157	31.57
	Ethanol e	83,33	88,88	60
A3	Eau	57,14	75	74,28
	Acétone	100	171	78.94
	Ethanol e	133	66,66	50
A4	Eau	71,42	41,66	68,57
	Acétone	130	100	40,57
	Ethanol e	66,66	44,44	61.88
A5	Eau	71,42	16,66	63,57
	Acétone	80	57,14	33,94
	Ethanol e	100	77,77	55.88

**Nom : BEN KHELLAF**

**Prénom : Amina**

**Nom : BIAD**

**Prénom : Ibtissem**

**Université Constantine 1**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

*Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire*

**Thème : L'effet de l'activité inhibitrice des extraits phénoliques des algues marines sur l' $\alpha$ -amylase salivaire *in vitro***

Mémoire Présentée pour l'obtention du diplôme de master

**Option: Analyse Protéomique et Santé**

Directeur de thèse Dr NOUADRI T.

## RÉSUMÉ :

Notre travail rentre dans le cadre d'une étude de la mise en évidence de l'activité inhibitrice des extraits polyphénoliques des algues marines, sur l' $\alpha$ -amylase salivaire Humaine. La première démarche dans cette étude, consiste à une extraction et une quantification des composés phénoliques. Dans un second temps, nous avons contribué à l'étude de ces extraits et leur effet sur les cinétiques de l'enzyme  $\alpha$ -amylase salivaire responsable de la dégradation de l'amidon. L'analyse quantitative des extraits d'algues : *D. dichotoma*, *P. pavonica*, *J. rubens*, *E. linza* et *U. lactuca* est représenté par les résultats de dosage colorimétrique des substances bioactives (les polyphénols). Les résultats d'analyses des extraits montrent clairement des teneurs considérables en composés polyphénoliques pour les espèces d'algues brunes (acétonique, aqueux et éthanolique). l'extrait acétonique a marqué une valeur maximale avec un contenu en polyphénols exprimé en équivalent pour les espèces *D. dichotoma*, *P. pavonica* est compris entre (32.14% et 56.59%). Suivie par les extraits éthanoliques (19.43% et 38.5%), enfin l'extraction des composés phénoliques reste faible avec le milieu aqueux (11% et 34.02%); tandis que les extraits d'algues vertes (*U. lactuca* et *E. linza*) et rouge (*J. rubens*) sont des extraits d'une faible teneur en polyphénols (4.01%, 3.67% et 2.62 %) respectivement. Les résultats de l'étude cinétique des réactions enzymatiques ont montré que les extraits polyphénoliques exercent un effet inhibiteur sur l'enzyme  $\alpha$ -amylase salivaire. la présence des extraits polyphénoliques *P. pavonica* et *D. dichotoma* a diminué l'activité de l' $\alpha$ -amylase salivaire et marque des taux de (68.43% et 47.06%) pour l'extrait acétonique suivie par (32.59%, 27.79%), et (40%, 28.58%) en présence des deux extraits à phase aqueuse et éthanolique respectivement. Nos extraits polyphénoliques de l'espèce *Enteromorpha linza*, *U. lactuca* et *J. rubens* ont modifié aussi le rendement de la production de maltose (49.53%, 66.06% et 50%) respectivement. En présence des extraits des deux espèces *P. pavonica* et *U. lactuca*, le pouvoir d'inhibition compétitive démontré et ainsi pris comme référence par rapport à l'activité calculée en absence de l'inhibiteur. Une inhibition maximale est enregistrée par l'extrait de l'espèce *P. pavonica* avec un  $K_i$  de 11.01 $\mu$ g/ml suivie par 2  $\mu$ g/ml enregistré avec *U. lactuca*. Cette étude a montré que nos extraits polyphénoliques prouvent des activités inhibitrices compétitives très intéressantes, ce qui nous encourage approfondir afin de caractériser les molécules responsables de cette activité.

**Mots clés:**  $\alpha$ -amylase salivaire, Algues marines, Extraits polyphénoliques, Inhibition.

### Devant le jury

<b>Président</b>	: NECIB Y.	Professeur, Université Constantine 1.
<b>Rapporteur</b>	: NOUADRI T.	M. C. A., Université Constantine 1.
<b>Examinatrice</b>	: BENNAOUN L.	M. A. A., Université Constantine 1.

*Année Universitaire 2013/2014*