

UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire

MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Biochimie Appliquée

Présenté par: **BERRIHA Asma et BOUKHRIS Amel**

Thème

**Effet des extraits de polysaccharides sur l'inhibition
de l' α -glucosidase et de l' α -amylase**

Soutenu publiquement Le: 04 /07/ 2019

Devant le jury:

M.	OULD EL HADJ M.D	Professeur	Univ. Ouargla	Président
M.	BOUAL Zakaria	MCA	Univ. Ouargla	Promoteur
M^{elle}.	BENAOUN Fatima	MCB	Univ. Ouargla	Examinatrice

Année Universitaire 2018/2019



Remerciement

On remercie Dieu le Tout Puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et terminer ce mémoire

*Nous tenons à remercier tout d'abord notre encadreur **Dr. BOUAL Zakaria**, maître de conférences A au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla d'avoir proposé ce thème, pour sa patience, et surtout pour sa confiance, ses remarques, ses conseils, sa disponibilité et sa bienveillance.*

*Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait **Pr. OUELD ELHADJ Mohamed Didi**, Professeur au Département des Sciences de la Nature et de la Vie à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de L'Univers de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla en étant président du jury et **M^{elle}. BENAOUN Fatima** maître de conférences B au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nous tenons également remercier tous les enseignants ayant assurés nos cours pendant nos années d'études en particulier tous les enseignants du département de Biologie de l'Université KASDI
MERBAH-OUARGLA*

C'est avec un grand plaisir que nous réservons ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

À celle qui m'a amené à la vie, m'a appris le sens de la vie,

Et qui est le paradis sous ses pieds;

cette source de tendresse, de patience et de générosité,

*À **ma mère !***

*À l'homme de ma vie, mon exemplaire éternel, mon soutien moral et
source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir*

réussir,

*À **mon père !***

Que dieu les bénisses et leurs assure une bonne santé et longue vie.

*À mes chers frères **Abdel kader, Ahmed ben Nouh et le petit Yahia***

*À mes chères sœurs **Zineb et Siham** et leurs enfants **Halima Nour, Hasna,***

Djinan, Mohamed Taha et Abdeldjalil

*À mon cher fiançai **Abdellah***

À tous mes professeurs du primaire jusqu'au universitaire

*particulièrement **Mr BOUAL Zakaria***

*À mes chères amies de l'université, **Asma, Amira et Madjda***

*À mes chères amies **Halima, Fetoum, Aicha, Samia, Marwa,***

Ikrem, Saliha.

A mes chères Sadjia et Soumia

À tous ceux qui utilisent la science pour le bonheur et la

prospérité de l'humanité. Je dédie cet humble travail

Amel

Dédicace

*À celle qui m'a amené à la vie, m'a appris le sens de la vie,
Et qui est le paradis sous ses pieds;
cette source de tendresse, de patience et de générosité,*

À ma mère !

*À l'homme de ma vie, mon exemplaire éternel, mon soutien moral et
source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir
réussir,*

À mon père !

Que dieu les bénisses et leurs assure une bonne santé et longue vie.

*À mes chers frères **Amine, Abdel Ouahab, belkacem et Abdel hak***

*À mes chères sœurs **Rim et Nour** et ma cousine **Aya***

*À ma sœur que ma mère n'a pas accouché **Radia***

*À tous mes professeurs du primaire jusqu'au universitaire
particulièrement **Mr BOUAL Zakaria***

*À mes chères amies **Amel, Amira, Madjeda, Aida, Maroua,
Imene, Mebarka, Khouloud et Roumaissa.***

*À tous ceux qui utilisent la science pour le bonheur et la prospérité de
l'humanité.*

Je dédie cet humble travail

Asma

Liste des tableaux

Tableau 01.- Différentes nomenclatures d' α -amylase.....	06
Tableau 02.- Quelques propriétés des α -amylases	10
Tableau 03.- Activateurs et inhibiteurs inorganiques et organiques de l' α -amylase salivaire	11
Tableau 04.- Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation.....	18
Tableau 05.- Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation.....	18
Tableau 06.- Préparation de la gamme de dilution des hydrolysats.....	21
Tableau 07.- Préparation de la gamme de dilution de l'acarbose.....	21
Tableau 08.- Test de l'inhibition de l' α -amylase.....	22
Tableau 09.- Préparation de la gamme de dilution des hydrolysats.....	23
Tableau 10.- Préparation de la gamme de dilution de l'acarbose.....	24
Tableau 11.- Test de l'activité antidiabétique de l' α -glucosidase.....	24

Liste des figures

Figure 01.- Structure tridimensionnelle de l' α -amylase.....	06
Figure 02.- les trois étapes de la réaction catalytique de l' α amylase.....	08
Figure 03.- Structure de la molécule de l'acarbose.....	13
Figure 04.- Activité inhibitrice de l'acarbose et des hydrolysats polysaccharidiques de <i>plantago albicans</i> et <i>plantago notata</i> sur l'enzyme α -amylase.....	27
Figure 05.- Activité inhibitrice de l'acarbose et les hydrolysats polysaccharidiques de <i>plantago albicans</i> et <i>plantago notata</i> sur l'enzyme α -glucosidase.....	29

Liste d'abréviation

A	: Absorbance
Asp	: Acide aspartique
B	: Bacillus
CNPG3	: 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltotrioside
CNPG2	: 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltoside
CI ₅₀	: Concentration inhibitrice médiane
°C	: Degré Celsius
DO	: Densité optique
G	: Glucose
G3	: Maltotriose
Glu	: Acide glutamique
HPAEC-PAD	: Chromatography à haute performance d'échange d'anion avec détecteur par ampèrométrie pulsée
IUBMB	: Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire
L	: Litre
min	: Minute
mL	: Millilitre
mM	: Millimolaire
MNT	: Maladies non transmissibles
mol	: Mole
nm	: Nanomètre
PBS	: Phosphate buffer saline (tampon phosphate saline)
PSPC	: Polysaccharide hydro-soluble des graines de <i>Plantago albicans</i>
PSPN	: Polysaccharide hydro-soluble des graines de <i>Plantago notata</i>
TFA	: Acide trifluoroacétique
U	: Unité enzymatique

UV	: Ultra violet
VHC	: Virus de l'hépatite
VIH	: Virus d'immuno déficience humain
α -amylase S	: α -amylase salivaire
α -amylase P	: α -amylase pancréatique
%	: Pourcent
μ L	: Microlitre

Table des matières

Remerciement	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste d'abréviation	
Introduction.....	02

Chapitre I.- Synthèse bibliographique

I.1.- Généralités sur l' α -amylase et l' α -glucosidase.....	05
I.1.1.- Les α -amylases.....	05
I.1.1.1.- Définition et nomenclature.....	05
I.1.1.2.- Structure et mode d'action.....	06
I.1.1.3.- Différentes origines d' α -amylase.....	08
I.1.1.3.1.- Origine végétale.....	08
I.1.1.3.2.- Origine animale.....	08
I.1.1.3.3.- Origine microbienne.....	09
I.1.1.4.- Caractéristiques générales.....	09
I.1.1.4.1.- Température optimale.....	09
I.1.1.4.2.- pH optimal.....	09
I.1.1.5.- Activateurs et inhibiteurs de l' α amylase.....	10
I.1.2.- Les α -glucosidases.....	11
I.1.2.1.- Généralités.....	11
I.1.2.2.- Inhibiteurs de l' α -glucosidase.....	12
I.1.2.2.1.- Structure.....	12
I.1.2.2.2.- Mécanisme d'action.....	13
I.1.2.2.3.- Effets indésirables et événements cliniques associés.....	13
I.2.- Polysaccharides à activité antidiabétique.....	14

Chapitre II.- Méthodologie de travail

II.1.- Principe de l'étude.....	17
II.2.- Matériel de l'étude.....	17
II.2.1.- Matériel biologique.....	17
II.2.2.- Produits et appareillage.....	17

II.3.- Hydrolyse acide partielle des liaisons glycosidiques.....	18
II.3.1.- Principe.....	18
II.3.2.- Préparation de la solution de l'acide trifluoroacétique (0,5M).....	19
II.3.3.- Mode opératoire.....	19
II.4.- Effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques.....	20
II.4.1.- Effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques sur l' α -amylase.....	20
II.4.1.1.- Principe.....	20
II.4.1.2.- Préparation des solutions et des réactifs.....	20
II.4.1.2.1.- Préparation des dilutions des hydrolysats polysaccharidiques et de l'acarbose.....	20
II.4.1.2.2.- Préparation de la solution d' α -amylase de 5U/l.....	21
II.4.1.2.3.- Préparation du substrat 2-Chloro-4-Nitrophenyl- α -Maltotrioside (CNPG) dilué au 1/2.....	21
II.4.1.2.4.- Préparation de la solution de l'acarbose.....	21
II.4.1.3.- Mode opératoire.....	22
II.4.2.- Effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques sur l' α -glucosidase.....	22
II.4.2.1.- Principe.....	22
II.4.2.2.- Préparation des solutions et des réactifs.....	23
II.4.2.2.1.- Préparation des dilutions des hydrolysats polysaccharidiques.....	23
II.4.2.2.2.- Préparation de la solution de l'acarbose.....	23
II.4.2.2.3.- Préparation de l'enzyme α -glucosidase.....	24
II.4.2.3.- Mode opératoire.....	24
II.5.- Expression des résultats.....	25

Chapitre III.- Résultats et discussion

III.1.- Activité anti hypoglycémiante.....	27
III.1.1.- Effet des hydrolysats polysaccharidiques de <i>Plantago albicans</i> et de <i>Plantago notata</i> sur l' α -amylase.....	27
III.1.2 Effet des hydrolysats polysaccharidiques de <i>Plantago albicans</i> et de <i>Plantago notata</i> sur l' α -glucosidase.....	29
Conclusion.....	33
Références bibliographiques.....	35

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction

Les carbohydrates tels que le saccharose et l'amidon représentent la majorité des constituants dans le régime alimentaire de l'être humain. L'action de l'enzyme α -amylase salivaire (EC 3.2.1.1) sur l'amidon libère de nouvelles grosses molécules non absorbées par le corps, connues sous le nom "oligosaccharides". Ces derniers réagissent au niveau de l'intestin grêle avec une autre enzyme appelée α -glucosidase (EC 3.2.1.20) en libérant du glucose, molécule de plus petite taille, capable d'être absorbée par le corps humain (Saihi, 2015).

Selon l'OMS le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit.

Aujourd'hui le diabète représente un véritable problème de santé publique, le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer et les maladies respiratoires chroniques sont les quatre maladies non transmissibles (MNT) prioritaires identifiées par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS, 2011).

Le diabète de type II, également appelé diabète non insulino-dépendant, est la forme la plus répandue de diabète: 85 à 90 % des diabétiques en sont atteints. Cette maladie résulte d'une mauvaise réponse des cellules à l'insuline. Ainsi le glucose reste dans le sang en quantité élevée, ce qui entraîne une altération des artères. De plus, les cellules ne reçoivent plus suffisamment d'énergie pour fonctionner normalement. Cette maladie entraîne alors fatigue et nausées, mais surtout de nombreuses complications à long terme comme des problèmes cardiaques et des maladies des yeux, des reins, des jambes et des nerfs résultant de l'altération des petites artères (Gallienne, 2005).

L'utilisation des produits de santé naturels dans le monde a commencé depuis des centaines, voir des milliers d'années. Les informations ethnobotaniques recueillies dans plusieurs régions du monde estiment que plus de 1123 espèces végétales, soit plus de 725 genres appartenant à 183 familles, sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et anti hyperglycémiantes (Bailey, 1989; Marles, 1995).

De nombreux principes actifs des plantes appartenant aux différentes classes des métabolites (composés phénoliques, alcaloïdes, polysaccharides, terpenoïdes, peptides,....etc.), ont démontré bioactives contre l'hyperglycémie. Récemment, une attention particulière et croissante est réservée aux polysaccharides provenant de sources

naturelles. Ils sont utilisés comme complément alimentaire pour les aliments de santé et thérapeutique pour le diabète (Zy *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2015).

L'une des approches thérapeutiques consiste à diminuer l'hyperglycémie postprandiale en retardant l'absorption du glucose par l'inhibition des enzymes qui hydrolysent les carbohydrates dans l'intestin, à savoir l' α -amylase et l' α -glucosidase (Wang *et al.*, 2016). Celles-ci sont des cibles importantes pour découvrir de nouveaux agents pour le traitement du diabète type II (Abd El-mohsen *et al.*, 2014).

Les médicaments comme l'acarbose et le miglitol sont des inhibiteurs des α -amylases et des α -glucosidases. Cette inhibition diminue la quantité de glucose absorbée par l'intestin et aide à diminuer les concentrations de glucose postprandiales. Quelques problèmes d'intolérance gastro-intestinale sont considérés comme des effets indésirables de ces agents hypoglycémisants et limitent considérablement leur utilisation (Krentz et Bailey, 2005).

L'objectif de ce travail est de tester de nouveaux extraits d'une nature polysaccharidique et d'évaluer leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de l' α -amylase et l' α -glucosidase afin de tester leur activité antidiabétique.

Ce travail est structuré en trois chapitres, le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique, décrivant dans un premier temps des généralités sur l' α -amylase et l' α -glucosidase et rappelant dans un second temps les polysaccharides à activité antidiabétique.

Le second chapitre repose essentiellement sur une explication détaillée des principaux matériels et méthodes utilisés dans l'exploration de l'activité antidiabétique qui permettent une expérimentation facile et reproductible à fin de déterminer l'effet inhibiteur des extraits polysaccharidiques sur l' α -amylase et l' α -glucosidase. Le troisième chapitre présente les principaux résultats obtenus, suivi de discussions comportant des réponses aux interrogations que porte ce sujet et des interprétations argumentant ces résultats.

Une conclusion générale et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achevant ce travail.

Chapitre I.-

Synthèse bibliographique

I.1.- Généralités sur l' α -amylase et l' α -glucosidase

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, enzymothérapies par des protéines recombinantes), dans la recherche (protéomique et en génomique) et autres. Parmi ces enzymes qui ont une grande importance dans différents domaines on trouve les α -amylases et les α -glucosidases (Gupta, 2003).

I.1.1.- Les α -amylases

Les α -amylases sont des enzymes ubiquitaires de différentes sources animales, végétales et microbiennes de sources bactériennes et/ou fongiques.

Le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (Morvan, 2010). Les α -amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004)

I.1.1.1.- Définition et nomenclature

L' α -amylase (1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) est une enzyme clé du système digestif sécrétée par les glandes pancréatiques et salivaires chez les mammifères. C'est une macromolécule appartenant à la classe des hydrolases qui catalyse l'étape initiale d'hydrolyse des liaisons α -1,4-glycosidiques dans l'amidon, le glycogène, et d'autres oligo et polysaccharides (Kato *et al.*, 2017). Les α -amylases pouvant être divisées en deux catégories endomylases et exomylases. Les endomylases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cet action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de divers longueurs de chaîne. Les exomylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts (Gupta *et al.*, 2003).

Tableau 01.- Différentes nomenclatures d' α -amylase (Kato *et al.*, 2017).

Nom systématique	α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase
Nom codifié	EC 3.2.1.1
Nom recommandé	α - amylase
Autres noms	endoamylase, thermolase, amylotherm, amylopsin, ptyalin.

I.1.1.2.- Structure et mode d'action

Les α -amylases sont des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés forment huit feuilletts β plissés et huit hélices α (Chiba, 1988; Burhan, 2003) répartis en deux domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) forme un tonneau (β / α)₈ et B (381-478 résidus) forme une boucle à partir du milieu du domaine A. Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement par des résidus hydrophobes. Il existe d'autre domaine C lié au domaine A par une chaîne polypeptidique simple et semble être un domaine indépendant avec une fonction inconnue. Les résidus constituant le site de fixation du substrat, ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A, dont la partie glucidique est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose, et D-glucosamine (Stefanofa et Emanuilova, 1992).

Les α -amylases sont des métallo enzymes à calcium (un ion calcium par molécule) (Chiba *et al.*,1988). Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de l'enzyme (Fogarty *et al.*, 1980).

**Figure01.-** Structure tridimensionnelle de l' α - amylase (Payan, 2004)

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

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

La réaction catalytique est réalisée en trois étapes avec participation d'un nombre important de groupements chargés, dont trois acides aminés essentiels à l'activité catalytique de l' α -amylase : Asp 231, Glu 261 et Asp 328.

1- Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur de proton (Glu 261). Celle-ci, est suivie d'une attaque nucléophile, sur le C1 du résidu du sucre en position 1 par l'Asp 231 et départ de la pièce d'aglycone (Davies *et al.*, 1997).

2- Activation d'une molécule d'eau, vraisemblablement par le maintien du Glu 261 déprotonné (Nielsen *et al.*, 2001).

3 - Hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 du résidu du sucre en position 1, permettant l'accomplissement du cycle catalytique (Nielsen *et al.*, 2001).

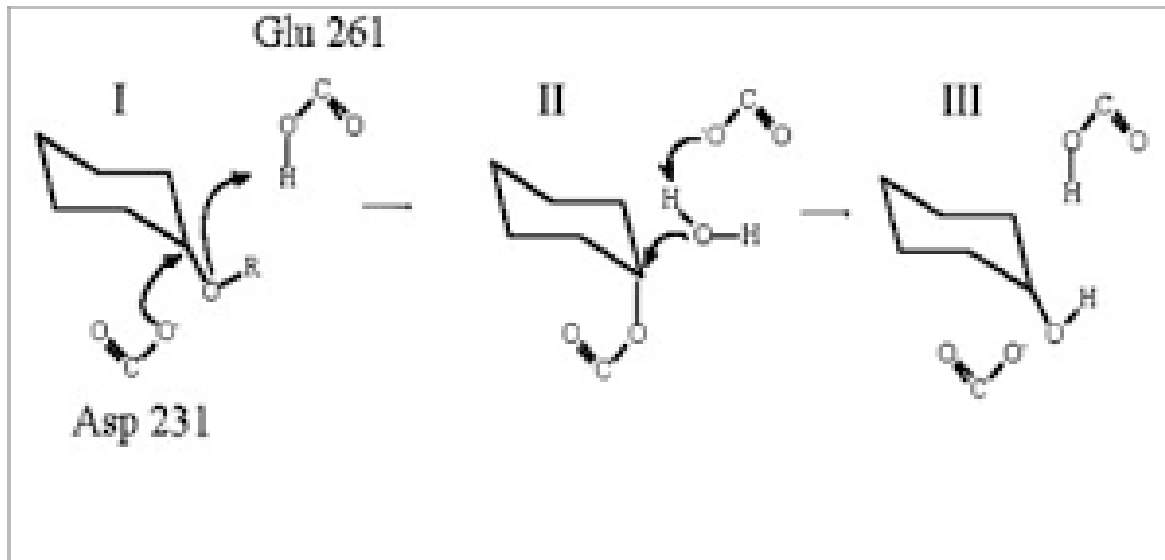


Figure 2.- Les trois étapes de la réaction catalytique de l' α amylase (Nielsen *et al.*, 2001)

I.1.1.3.- Différentes origines d' α -amylase

Les α -amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation avec des cellules microbiennes (Haq *et al.*, 2003 et Srinivasa Rao *et al.*, 2004).

I.1.1.3.1.- Origine végétale

Les α -amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique ou elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination (Octavio *et al.*, 2000). Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué, au cours de la germination des graines qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Brawn *et al.*, 1993).

I.1.1.3.2.- Origine animale

L' α -amylase animale est généralement extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères tels que les porcs et les veaux (Chatterton *et al.*, 1996). Chez l'homme, l' α -amylase est largement présente dans les sécrétions salivaires (α -amylase S) et pancréatiques (α -amylase P) (Coolbear *et al.*, 1992). Les α -amylases 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 α -amylases animales donne respectivement

du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrans limités pour l'amylopectine (Coolbear *et al.*, 1992).

I.1.1.3.3.- Origine microbienne

Les α -amylases microbiennes ont été largement utilisées pour la production industrielle, à savoir les α -amylases fongiques et bactériennes (Burhan *et al.*, 2008). Parmi les bactéries amylolytiques on trouve celles du genre *Bacillus*; à savoir *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* sont connus pour être de bons producteurs d'une α -amylase et ceux-ci ont été largement utilisés à des fins commerciales. De même, les champignons filamenteux ont été largement utilisés pour la production des α -amylases depuis des siècles. Étant donné que ces espèces sont connues pour être des producteurs de protéines extracellulaires, ils sont largement exploités pour la production des enzymes différentes, y compris l' α -amylase (Pandey *et al.*, 2003).

I.1.1.4.- Caractéristiques générales

Pour qu'une enzyme réponde aux exigences potentielles en vue d'une production industrielle, il est nécessaire de déterminer les propriétés de cette enzyme.

I.1.1.4.1.- Température optimale

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

I.1.1.4.2.- pH optimal

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 9, avec un optimum variant de 4 à 5 pour les α -amylases fongiques, et un optimum supérieur à la neutralité, soit 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes (Larparent-Gourgaud et Sanglier, 1992). Le pH optimal pour l'amylase pancréatique et salivaire varie selon les auteurs, mais une majorité convient qu'il se situe autour de 6,9 avec une variation pouvant s'échelonner de 6,5 et 7,2 (Ishkawa *et al.*, 1993).

Tableau 02.- Quelques propriétés des α -amylases (Khacheba, 2008)

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

I.1.1.5.- Activateurs et inhibiteurs de l' α -amylase

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

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

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

Tableau 03.- Activateurs et inhibiteurs inorganiques et organiques de l' α -amylase salivaire (Whelan, 1964); (Mercier, 1985); (Schamburg et Col, 1991).

		Nom du composé	Activateur	Inhibiteur
Activateurs et inhibiteurs inorganiques		Chlorures	+	
		Bromures	+	
		Nitrates	+	
		Iodures	+	
		Phosphates	+	
		Calcium	+	
		Magnésium	+	–
		Mercure		–
		Fer		–
		Argent		–
	Cuivre			
Activateurs et inhibiteurs organiques		Maltose		–
		D-glucose, D-xylose		–
		Citrate		–
		Oxalate		–
		Acétyl choline	+	
		Albumine	+	
		Acarbose		–
		Miglitol		–
	Voglibose		–	

I.1.2.- Les α -glucosidases

I.1.2.1.- Généralités

Les glycosidases ou glycoside-hydrolases sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse sélective des liaisons glycosidiques dans les polysaccharides et les glycoconjugués. Elles permettent la libération de molécules non saccharidiques, de monosaccharides ou d'oligosaccharides de plus faible poids moléculaire. Par exemple, la maltase catalyse

l'hydrolyse de la liaison entre les deux unités du maltose pour donner deux molécules de glucose. Selon la nomenclature établie par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) est basée sur la spécificité de substrat, les glycosidases font partie de la famille EC 3.2.1., dans laquelle le chiffre 3 correspond aux hydrolases, le chiffre 2 aux glycosylases et le chiffre 1 aux O- et S-glycosidases (David, 1995).

Les glucosides hydrolases sont classifiées dans le groupe EC 3.2.1.x correspondant aux enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons O-ou S-glucosidiques. La rétention ou l'inversion de la configuration absolue du carbone anomérique au cours de l'hydrolyse permet de séparer les enzymes en fonction de leur mécanisme (Ouairy, 2016).

Les α -glucosidases (EC 3.2.1.20, α -D-glucoside glucohydrolase) sont définies comme des exo-glycosidases catalysant majoritairement l'hydrolyse des liaisons α -1,4-glucosidiques d'un substrat (comme chez les maltooligosaccharides ou le glycogène par exemple) pour libérer un α -D-glucose. Elles peuvent également catalyser des réactions de transglycosylation pour synthétiser des composés α -D-glucosylés (Dejob, 2013). Le rôle principal de ces enzymes qui sont présentes dans la bordure en brosse de l'intestin grêle est la digestion des oligosaccharides en monosaccharides (Wu *et al.*, 2016). Ces enzymes sont retrouvées dans six familles différentes de glycoside à savoir glucoside hydrolase 4, 13, 31, 63, 97 et 122 (Dejob, 2013).

I.1.2.2.- Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase

I.1.2.2.1.- Structure

L'acarbose est constitué d'un cyclitol en C7 renfermant une double liaison éthylénique avec trois hydroxyles en 4,5 et 6 et une fonction alcool primaire en position allylique sur le carbone 3. Ce cyclitol est relié par son carbone 1 à l'azote d'un amino-sucré : le 4,6-désoxy-4 aminoglucose. L'ensemble cyclitol et viosamine est appelé : acarviosine. Cette dernière est liée par son C-1 hémiacétalique au C-4 d'un maltose.

Le miglitol est un inhibiteur de l'alpha-glucosidase dérivé de la nojirimycine et de sa forme réduite, la 1 désoxynojirimycine (DCEM3, 2013).

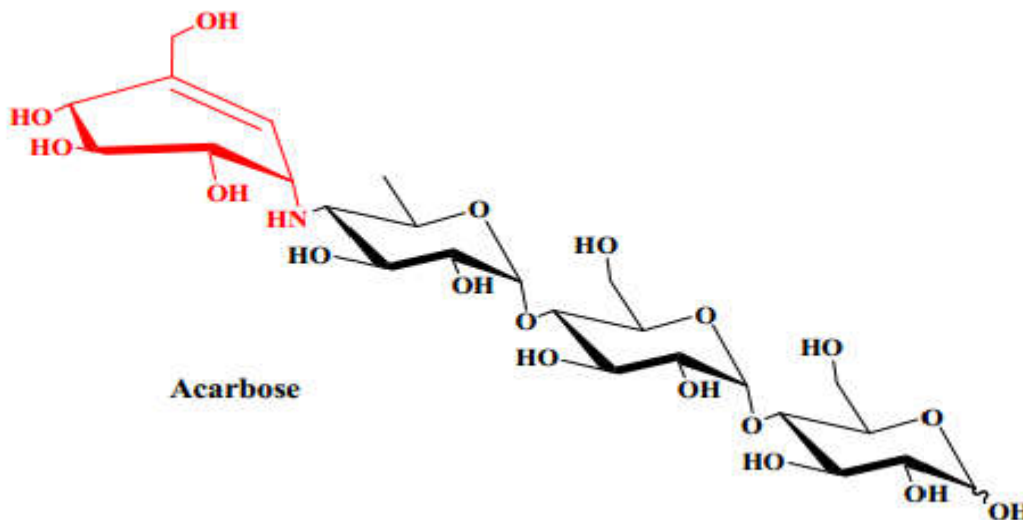


Figure 03.- Structure de la molécule de l'acarbose(Dcem., 2013)

I.1.2.2.2.- Mécanisme d'action

L'acarbose est un pseudotétrasaccharide d'origine bactérienne qui agit par inhibition compétitive et réversible des α -glucosidases intestinales (enzymes de la bordure en brosse des entérocytes qui hydrolysent les poly-, oligo-, et disaccharides en monosaccharides absorbables tels le glucose et le fructose) et diminuent ainsi la dégradation des carbohydrates en monosaccharides absorbables. L'acarbose agit donc en diminuant l'hyperglycémie postprandiale n'entraîne pas d'hyperinsulinisme. Le miglitol est un pseudo-monosaccharide qui présente le même mécanisme d'action et réduit également la glycémie à jeun (DCEM3, 2013).

I.1.2.2.3.- Effets indésirables et événements cliniques associés

Les principaux effets indésirables sont: flatulences, météorisme, diarrhées et douleurs abdominales. Ces symptômes apparaissent au début de traitement et dépendent du régime alimentaire et de la posologie. Ils sont principalement dus à la fermentation bactérienne des hydrates de carbone dans le colon. Quelques rares cas d'atteintes hépatiques, d'occlusions intestinales et des réactions cutanées ont été observé avec l'acarbose (DCEM3, 2013).

I.2.- Polysaccharides à activité antidiabétique

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

L'objectif principal dans la prise en charge du diabète est consisté à réguler la concentrations de glucose de sang, afin de prévenir les maladies chroniques et les complications diabétiques. La pharmacothérapie impliquent des agents antidiabétiques synthétiques tels que l'acarbose administrés pour le traitement du diabète exerçant leur effets de réduction de la glycémie par l'inhibition des enzymes hydrolysantes les glucides gastro-intestinaux telles que l' α -amylase salivaire et pancréatique, ainsi que l'enzyme α -glucosidase de bordure en brosse intestinale (Gy *et al.*, 2008; Kazeem *et al.*, 2013; Poongunran *et al.*, 2015). On croit actuellement que le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale est une approche thérapeutique efficace pour gérer le diabète, ce processus est généralement réalisé en retardant deux enzymes clés dans le système digestif liées à l'adsorption du glucose (α -amylase et α -glucosidase) (Gao *et al.*, 2013).

Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été faits pour identifier des inhibiteurs efficaces de ces enzymes à partir des ressources naturelles afin d'éviter les effets secondaires des agents antidiabétiques synthétiques administrés. Heureusement, divers polysaccharides naturels ont une activité antidiabétique et leur utilisation en complément des thérapies conventionnelles (Wu *et al.*, 2016).

Les polysaccharides sont des polymères d'oses de très hautes masses molaires. Ils sont issus de différentes sources et ont été largement étudiés et utilisés pour leurs propriétés technofonctionnelles dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, de l'industrie papetière, agroalimentaire, et dans l'extraction pétrolière (Liu *et al.*, 2015). Plus récemment, l'utilisation de polysaccharides comme agents bioactifs, a suscité un intérêt accru pour de nouvelles applications en raison de leur biocompatibilité, de leur biodégradabilité et de leur non toxicité toutes associées à l'identification d'activités biologiques portées par ces composés (Yang *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2016).

Pour la période 2011-2015 au total, 114 types de polysaccharides provenant de 78 types de ces sources, à savoir des plantes, des champignons, des algues, des animaux et des bactéries, ont montré des propriétés antidiabétiques. *In vivo* et des expériences *in vitro* ont montré que l'administration de ces polysaccharides ont des effets hypoglycémiques et atténue le dysfonctionnement cellulaire en plus de déclencher d'autres activités antidiabétiques qui sont également bénéfiques et encore plus efficace que ceux des agents antidiabétiques synthétiques (Wu *et al.*,2016).

Un polysaccharide neutre (APPS1-2) a été isolé de la pulpe d'abricot (*Armeniaca sibirica* L. Lam.). APPS1-2 (PM = 25,93 kDa) est composé de rhamnose, de glucose, de mannose et de galactose, présentait une inhibition importante de la glucosidase avec une IC50 de 6,06 mg / ml *in vitro* (Wu *et al.*,2016).

Un polysaccharide homogène (PLP) de poids moléculaire de 1894 kDa a été séparé des graines de *Plantago asiatica* L. PLP comprend le rhamnose, l'arabinose, le xylose, le mannose, le glucose et le galactose. Le PLP a eu une influence notable sur l'inhibition de l'activité de l'amylase *in vitro* avec le ralentissement de la diffusion du glucose dans le sang (Wu *et al.*,2016).

Le fucoïdane est un polysaccharide sulfaté dérivé du brun algues et certains invertébrés marins, comme, l'oursin et le concombre de mer. Le fucoïdane est principalement composé de groupes l-fucose et esters de sulfate, en plus d'autres monosaccharides, les acides uronique et acétyle. L'effet inhibiteur du fucoïdane sur l'amylase et la glucosidase *in vivo* et *in vitro* ont été signalés fréquemment au cours des 5 dernières années. Fucoïdane extrait de *Sargassum wightii* (SWF) contient du fucose et du sulfate des teneurs respectives de $53 \pm 0,52\%$ et $36 \pm 0,60\%$. SWF exposé un effet inhibiteur significatif de la glucosidase, dépendant de la concentration, et une activité inhibitrice plus puissante que celle d'acarbose (1 mg), avec une valeur IC50 de 132,9 ug (Wu *et al.*, 2016).

Le fucoïdane extrait de *Turbinaria ornata* (TOF) a teneurs en fucose et en sulfate de $59 \pm 0,69\%$ et $33 \pm 0,42\%$, respectivement. TOF a montré un effet inhibiteur sur l'amylase avec une valeur CI50 de 33.6 ug, ce qui est inférieur à celui de l'acarbose (125ug) (Wu *et al.*, 2016).

Chapitre II.-

Méthodologie de travail

II.1.- Principe de l'étude

Des recherches se sont concentrées sur les effets physiologiques des polysaccharides qui ont clairement démontré des effets bénéfiques pour la santé (Bruneton, 2009; Angone, 2010). Ils ont divers fonctions biologiques telles qu'antioxydante, immunomodulation, antitumoral, de plus ils présentent des effets antidiabétiques (Wu *et al.*, 2016). Cette étude vise à étudier l'activité anti-diabétique de quelques extraits polysaccharidiques.

L'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'effet de deux extraits polysaccharidiques qui correspondent aux PSPC et PSPN issus des graines de *Plantago albicans* et *Plantago notata* respectivement, sur l'inhibition des enzymes digestives, α -amylase et α -glucosidase à fin d'évaluer le degré d'inhibition de l'activité enzymatique par ces extraits.

II.2.- Matériel de l'étude

Le matériel d'étude regroupe les produits, l'appareillage et le matériel biologique.

II.2.1.- Matériel biologique

Le matériel biologique regroupe les lyophilisats des polysaccharides hydrosolubles, PSPC et PSPN issus des graines de *Plantago albicans* et *Plantago notata* et les enzymes digestives, α -amylase et α -glucosidase.

L'enzyme α -amylase d'origine humaine issue du sérum d'un patient touché d'une pancréatite de sexe masculin, âgé de 37 ans au laboratoire IBN ROCHD de Ghardaïa (Algérie). L'absence d'hépatite B, d'anticorps anti-VIH et d'anticorps anti-VHC, sont aussi vérifiées.

II.2.2.- Produits et appareillage

Les caractéristiques physicochimiques et l'origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation sont indiqués dans le tableau 04, et l'origine et type des appareils utilisés au cours de l'expérimentation sont indiqués dans le tableau 05.

Tableau 04.- Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés au cours de l'expérimentation.

Produit	Fournisseur	Caractéristiques				
		Forme	Formule chimique	M. molaire g/m	Densité g/cm ³	Pureté %
Acide trifluoroacétique	SIGMA-ALDRICH	Liquide	CF ₃ COOH	114.02	1.49	99.8
Carbonate de sodium anhydre	BIOCHEM CHEMOPHARMA	Solide	Na ₂ CO ₃	105.99	/	99.9
Méthanol	SCHARLAU	Liquide	CH ₃ OH	32.04	0.79	99.9

Tableau 05.- Origine et type des appareils utilisées au cours de l'expérimentation.

Appareil	Fournisseur	Type	Lieu de fabrication
Agitateur magnétique	VELP CSIENTIFICA	F20520162	EUROPE
Bain marie	MEMMERT	MEMMERTGMBH. WB 7.	GERMANY
Balance	OHAUS	NENNTEMP ; 100 °C DISCOVERY DV 215CD OHAUS.	USA
Etuve	MELAG	MELAG815.220V, 50 HZ, 12.3A, 2700 w.	TURQUIE
Hotte	TEL STAR	TELSTAR AV-100.	GERMANY
Incubateur	TEGIMENTA	CORAS EIA, N° série 27- 4135 MODELE50/60 HZ, 0.6 KW.	SWISS
Micropipette	SOCOREX	ACURA 821. 200 1000 ML	SWISS
Spectrophotomètre	SHIMADZU	UV mini-1240, N° série A109345	JAPAN

II.3.- Hydrolyse acide partielle des liaisons glycosidiques

II.3.1.- Principe

Afin de solubiliser les extraits polysaccharidiques, une hydrolyse partielle des polymères est provoquée par l'ajout d'acide dilué. Le temps et la température d'hydrolyse sont bien maîtrisés pour éviter la libération des monosaccharides. La méthode d'hydrolyse en milieu acide est basée sur la rupture des liaisons glycosidiques afin de permettre la libération partielle ou complète des monomères constitutifs tout en les préservant d'éventuelles dégradations secondaires (Delattre *et al.*, 2016).

Parmi les acides employés à chaud pour l'étude, il y'a l'acide sulfurique, l'acide trifluoroacétique et ainsi l'acide chlorhydrique. L'acide de choix pour la plupart des analyses des glucides est l'acide trifluoroacétique (TFA) (Wang *et al.*, 2004).

Le TFA est devenu l'acide de choix pour la plupart des analyses des glucides en raison de son efficacité à hydrolyser des liaisons glycosidiques sans causer des destructions massives des composants de monosaccharides résultants et en raison de sa volatilité, ce qui minimise son interférence avec les procédures ultérieures comme l'analyse par HPAEC-PAD (Ruiz, 2005; Johansson *et al.*, 2006).

II.3.2.- Préparation de la solution de l'acide trifluoroacétique (0,5M)

La concentration de l'acide trifluoroacétique est calculée selon la formule suivante:

$$C = \frac{P \times D \times 10}{M}$$

Sachant que:

C: Concentration molaire, M: Masse molaire de TFA= 114.02 g/mol, P: Pureté= 99%,
D: Densité= 1,5351

Donc selon la formule précédente $C = 12,92 \text{ mol/l}$

En utilisant la formule $C_1V_1 = C_2V_2$ pour obtenir le volume V_1 à prendre de TFA pur sachant que:

C_1 : Concentration de TFA pur = 12,92 mol/l, C_2 : Concentration à préparer de TFA = 0,5M,
 V_2 : Volume de TFA à préparer= 20ml

Donc:

$$V_1 = (0,5) (20) / 12,92 = 0,77 \text{ ml}$$

Donc la solution est préparée par l'ajout de 0,77ml de TFA pur sur 19,23ml d'eau distillée pour compléter le volume jusqu'à 20ml.

II.3.3.- Mode opératoire (Niu *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2015)

Des échantillons de 10 mg de chaque lyophilisat de PSPC et PSPN ont été dissous dans 1ml de TFA (0,5M) et sont chauffés à 60°C pendant 60 min dans un bain Marie. Les échantillons sont agités manuellement au rotor au fur et à mesure de l'hydrolyse. Ils sont refroidis au bain de glace puis quelques gouttes de méthanol sont ajoutées. L'acide résiduel a

été éliminé par évaporation dans l'étuve. Après séchage et évaporation totale, 1ml d'eau distillée est additionnée pour solubiliser les hydrolysats, puis ces hydrolysats sont récupérés dans des eppendorfs .

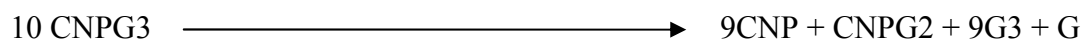
II.4.- Effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques

II.4.1.- Effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques sur l' α -amylase

II.4.1.1.- Principe

Afin de déterminer Effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques extraits à partir des graines de *Plantago albicans* et *Plantago notata*, il est nécessaire de mesurer le taux d'inhibition de l'enzyme α -amylase.

Le présent procédé repose sur l'utilisation d'un substrat chromogène qui est le 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltotrioside (CNPG3), la réaction de l' α -amylase avec ce substrat entraîne la formation de 2-chloro-nitrophénol (CNP), 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltoside (CNPG2), maltotriose (G3) et le glucose (G). Le 2-chloro-nitrophénol (CNP) peut être mesurer par spectrophotomètre UV-visible à 405 nm.



Le taux d'augmentation de l'absorbance est proportionnel à l'activité de l' α -amylase dans l'échantillon.

Cette expérience est utilisée pour déterminer la diminution de la capacité de l'enzyme à hydrolyser son substrat en présence de l'hydrolysat polysaccharidique de *Plantago albicans* et celle de *Plantago notata*. L'acarbose est utilisé comme un contrôle positif, alors que l'eau distillée est utilisée comme un contrôle négatif.

II.4.1.2.- Préparation des solutions et des réactifs

II.4.1.2.1.- Préparation des dilutions des hydrolysats polysaccharidiques et de l'acarbose

Une gamme de dilution est préparée à partir de la solution mère de l'hydrolysat.

Tableau 06.- Préparation de la gamme de dilution des hydrolysats

	Blanc	10%	25%	50%	75%	100%
Solution mère (µl)	0	18	45	90	135	180
Eau distillée (µl)	180	162	135	90	45	0
Concentration (mg.ml ⁻¹)	0	1	2,5	5	7,5	10

II.4.1.2.2.- Préparation de la solution d'α-amylase de 5U/l

- Ajouter 10µl d'α-amylase 1000U/l à 990µl d'eau distillée;
- Ajouter 500µl de cette solution préparée à 500µl d'eau distillée à fin d'obtenir une solution d'α- amylase à 5U/l.

II.4.1.2.3.- Préparation du substrat 2-Chloro-4-Nitrophenyl-α-Maltotrioside (CNPG) dilué au 1/2

- Ajouter 2ml d'eau distillée sur 2ml de la solution du substrat pur

II.4.1.2.4.- Préparation de la solution de l'acarbose

Pour préparer une solution de l'acarbose de 100mM, 50 mg de l'acarbose est dissout dans 774 µl d'eau distillée. Une gamme de dilution allant de 1 à 10mg/ml est préparée pour le test d'α-amylase.

Tableau 07.- Préparation de la gamme de dilution de l'acarbose

	10%	25%	50%	75%	100%
Solution mère (µl)	18	45	90	135	180
Eau distillée (µl)	162	135	90	45	0

II.4.1.3.- Mode opératoire(Kajaria *et al.*, 2018; Ashok Kumar *et al.*,2010)

Dans un tube sec, mettre un volume de 180µl de différentes concentrations de chaque hydrolysats polysaccharidique qui correspond aux PSPC et PSPN pour le test , de l'acarbose pour le contrôle positif et de l'eau distillée pour le contrôle négatif dans des eppendorfs;

-Ajouter un volume de 90µl de la solution de l' α -amylase 5U/l dans chaque eppendorf;

-Pré-incuber le mélange pendant 15 min à 37°C;

-Ajouter un volume de 500µl de la solution du substrat CNPG;

-Faire agiter bien le mélange, puis incubé pendant 10 min à 37°C;

-Lire l'Absorbance à 405nm par un spectrophotomètre UV- visible.

Tableau 08.- Test de l'inhibition de l' α -amylase.

Tube	Réactifs	Volume (µl)
Contrôle positif	α -amylase	90
	Acarbose	180
	CNPG	500
Test	α -amylase	90
	Polysaccharide	180
	CNPG	500
Contrôle négatif	α -amylase	90
	eau distillée	180
	CNPG	500

II.4.2.- Effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques sur l' α -glucosidase

L'effet inhibiteur des hydrolysats polysaccharidiques de *Plantago albicans* et *Plantago notata* est déterminée en utilisant une méthode de l'inhibition de l'enzyme α -glucosidase tel qu'est décrite par Oki *et al.* (1999), Bisht *et al.* (2013) et Qian *et al.* (2015) avec une légère modification.

II.4.2.1.- Principe

L'étude de l'effet inhibiteur des polysaccharides porte sur la détermination de son pouvoir inhibiteur sur l'enzyme α -glucosidase. Le test de détermination du pouvoir inhibiteur sur l'enzyme α -glucosidase est basé sur la mesure de la libération de *p*-nitrophénol (*p*-NP) dont l'enzyme catalyse la dégradation du *p*-nitrophényl- α -D glucopyranoside (*p*-NPG)

en α -D-glucopyranoside et en *p*-nitrophénol (*p*-NP). Ce dernier absorbe à 405 nm, qui permet d'évaluer l'activité enzymatique de l' α -glucosidase (Ha et al., 2012). En présence d'inhibiteur, l'activité enzymatique de l' α -glucosidase diminue ou est inhibée. Cela est exprimé par diminution de la dégradation du substrat *p*-NPG (Mosihuzzman et al., 2013). L'activité inhibitrice de l'enzyme α -glucosidase a été déterminée selon une méthode adaptée par Bisht et al. (2013) et de Qian et al. (2015). L'acarbose est utilisé comme un contrôle positif, alors que le milieu réactionnel dépourvu d'inhibiteur représente le contrôle négatif.

Cette méthode est utilisée pour déterminer la diminution de la capacité d' α -glucosidase à hydrolyser son substrat en présence des extraits polysaccharidiques de *Plantago albicans* et de *Plantago notata*.

II.4.2.2.- Préparation des solutions et des réactifs

II.4.2.2.1.- Préparation des dilutions des hydrolysats polysaccharidiques

Les hydrolysats d'une concentration de 10 mg/ml sont dilués au 1/10. A partir de cette solution diluée, une gamme de dilution est préparée.

Tableau 09.- Préparation de la gamme de dilution des hydrolysats

	10%	25%	50%	75%	100%
Eau distillée (μ l)	90	75	50	25	0
Solution mère (μ l)	10	25	50	75	100
Concentration (mg/ml)	0,1	0,25	0,5	0,75	1

II.4.2.2.2.- Préparation de la solution de l'acarbose

Pour préparer une solution de l'acarbose de 100mM, 50 mg de l'acarbose est dissout dans 774 μ l d'eau distillée, la solution préparée est diluée au 1/10. A partir de cette dernière, une gamme de dilution est préparée allant de 0,1 à 1mg/ml.

Tableau 10.- Préparation de la gamme de dilution de l'acarbose

	10%	25%	50%	75%	100%
Eau distillée (µl)	90	75	50	25	0
Solution mère (µl)	10	25	50	75	100

II.4.2.2.3.- Préparation de l'enzyme α -glucosidase

La solution de l'enzyme α -glucosidase 2000 U/l est diluée au 1/1000 dans le tampon PBS.

II.4.2.3.-Mode opératoire (BISHT et al., 2013; QIAN et al., 2015)

- Dans un tube sec, ajouter un volume de 500µl de la solution de l' α -D glucosidase;
- Ajouter 100µl de l'acarbose pour le contrôle positif, de l'hydrolysate polysaccharidique (100µg/ml à 1mg/ml) pour le test et de tampon pour le contrôle négatif;
 - Incuber le mélange pendant 15 min à 37°C;
 - Ajouter un volume de 100µl de la solution du substrat (*p*-NPG);
 - Faire agiter bien les tubes;
 - Pré-incuber pendant 20 min à 37°C ;
 - Ajouter 1mL de Na₂CO₃ (0,2 mol /L);
 - Lire l'Absorbance à 405 nm.

Tableau 11.- Test d'inhibition de l' α -glucosidase

		Volume (µl)
Contrôle positif	α -glucosidase	500
	Acarbose	100
	<i>p</i> -NPG	100
Test	α -glucosidase	500
	Polysaccharide	100
	<i>p</i> -NPG	100
Contrôle négatif	α -glucosidase	500
	PBS	100
	<i>p</i> -NPG	100

II.5.- Expression des résultats

L'activité inhibitrice des hydrolysats de polysaccharides ou de l'acarbose est déterminée en pourcentage d'inhibition, qui est exprimée en utilisant la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = (\Delta A_{\text{Contrôle négatif}} - \Delta A_{\text{échantillon}} / \Delta A_{\text{Contrôle négatif}}) \times 100$$

$\Delta A_{\text{Contrôle négatif}}$: La pente de la tangente de l'Absorbance de contrôle négatif.

$\Delta A_{\text{échantillon}}$: La pente de la tangente de l'absorbance de l'échantillon.

(Kazeem *et al.*, 2013; Telagari et Hulltti, 2015; Sulistiyani *et al.*, 2016).

Chapitre III.-

Résultats et discussion

III.1.- Activité anti hypoglycémiante

Plusieurs études ont montré que les extraits des plantes médicinales et en particulier les extraits aqueux peuvent améliorer le taux de la glycémie chez les diabétiques. Un des mécanismes possibles est l'inhibition de l' α -amylase et l' α -glucosidase par différents métabolites (Abeysekera et al., 2007; Bhutkar et Bhise, 2012; El Beshbishy et Bahashwan, 2012).

Dans ce travail, nous avons étudié l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase et de l' α -amylase par les polysaccharides extraits des graines de *Plantago albicans* et de *Plantago notata*, afin d'évaluer l'activité antidiabétique *in vitro* des extraits des espèces étudiées, en considérant l'acarbose comme un contrôle positif.

III.1.1.- Effet des hydrolysats polysaccharidiques de *Plantago albicans* et de *Plantago notata* sur l' α -amylase

Les capacités inhibitrices des différents hydrolysats polysaccharidiques étudiés sur l' α -amylase ont été évaluées. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l' α -amylase. Différentes concentrations d'acarbose et des hydrolysats polysaccharidiques ont été testées. Les résultats sont consignés dans la figure 04.

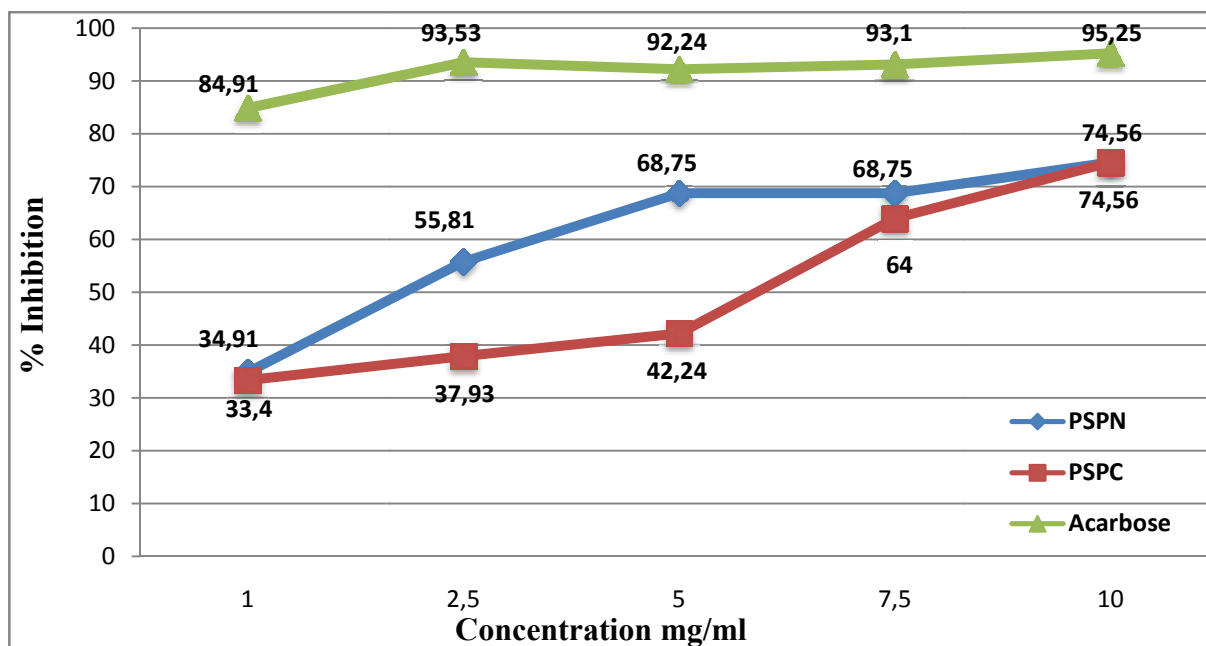


Figure 04.- Activité inhibitrice de l'acarbose et des hydrolysats polysaccharidiques de *plantago albicans* et *plantago notata* sur l'enzyme α -amylase

Il ressort des résultats présentés dans la figure 04, que le taux d'inhibition des hydrolysats polysaccharidiques étudiés et de l'acarbose augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de ceux-ci. A faible concentration de 1mg/ml des hydrolysats de PSPC et de PSPN montrent des pourcentages d'inhibitions de $33,4\pm 0,001\%$ et $34,91\pm 0,001\%$, respectivement. En effet, l'hydrolysat de PSPC suit une faible inhibition jusqu'à 5mg/ml, puis on remarque une amélioration brusque d'inhibition et atteint son maximum de $74,56\pm 0,01\%$ à 10mg/ml. Alors que, l'hydrolysat de PSPN montre une inhibition progressive avec l'augmentation de la concentration et atteint son maximum de $74,56\pm 0,0007\%$ à 10mg/ml. Les deux hydrolysats présentent une grande similitude pour les valeurs minimales que maximales. Il est remarqué que pour l'acarbose, la concentration minimale soit 1mg/ml, montre un taux d'inhibition égale à 84,91%. Tandis que, la concentration maximale 10mg/ml présente un taux d'inhibition égale à 95,25%.

Ashok Kumar *et al.* (2010) ont démontré que l'extrait aqueux d'*Amaranthus spinosus* présente un pourcentage d'inhibition sur l' α -amylase de $63,14\pm 0,1\%$ à une concentration de 100 μ g/ml.

Kajaria *et al.* (2018) signalent 76% d'inhibition pour l'extrait éthanolique de *Shirishadi* sur l' α -amylase à une concentration de 1mg/ml, semble plus fort que celles de PSPC et PSPN qui montrent des pourcentages d'inhibition de $33,4\pm 0,001\%$ et de $34,91\pm 0,001\%$, respectivement à la même concentration.

Hadj Moussa (2012) a travaillé sur les extraits organique, aqueux et méthanolique de feuilles de *Retama raetam*. Pour une concentration de 2,4mg/ml, il a trouvé des pourcentages d'inhibition allant de 0,23%, 24,81%, et 30,75%, respectivement. Ces résultats semblent plus faible que ceux des hydrolysats de PSPC et PSPN qui montrent des pourcentages d'inhibition soit $37,93\pm 0,001\%$ et $55,81\pm 0,001\%$, respectivement à 2,5mg/ml.

Wu *et al.* (2016) ont trouvé qu'un polysaccharide (NEPS) extrait de *Shaddock Citruspa radisi* présente un pourcentage d'inhibition de $74.63\pm 4.71\%$ à une concentration de 5mg/ml. En comparant avec notre étude, il semble plus élevé que ceux de PSPC et de PSPN, à la même concentration, soit $42,24\pm 0,009\%$ et $68,75\pm 0,004\%$, respectivement.

Selon ces travaux, on peut déduire que les hydrolysats de PSPN et PSPC montrent une inhibition notable sur l' α -amylase.

III.1.2 Effet des hydrolysats polysaccharidiques de *Plantago albicans* et de *Plantago notata* sur l' α -glucosidase

L' α -glucosidase (EC 3.2.1.20), présente dans la bordure des microvillosités de l'intestin grêle, elle est essentielle pour digérer les oligosaccharides en monosaccharides. Par conséquent, l'inhibition des activités de l'enzyme α -glucosidase peut clairement retarder la conversion du glucose en glycémie, réduire l'augmentation postprandiale de la glycémie et donc être une approche efficace pour gérer le taux de glycémie dans le diabète sucré.

Les pourcentages d'inhibition (%) de l'activité enzymatique de l' α -glucosidase en présence de l'acarbose ou les hydrolysats polysaccharidiques étudiés sont consignés dans la figure 05.

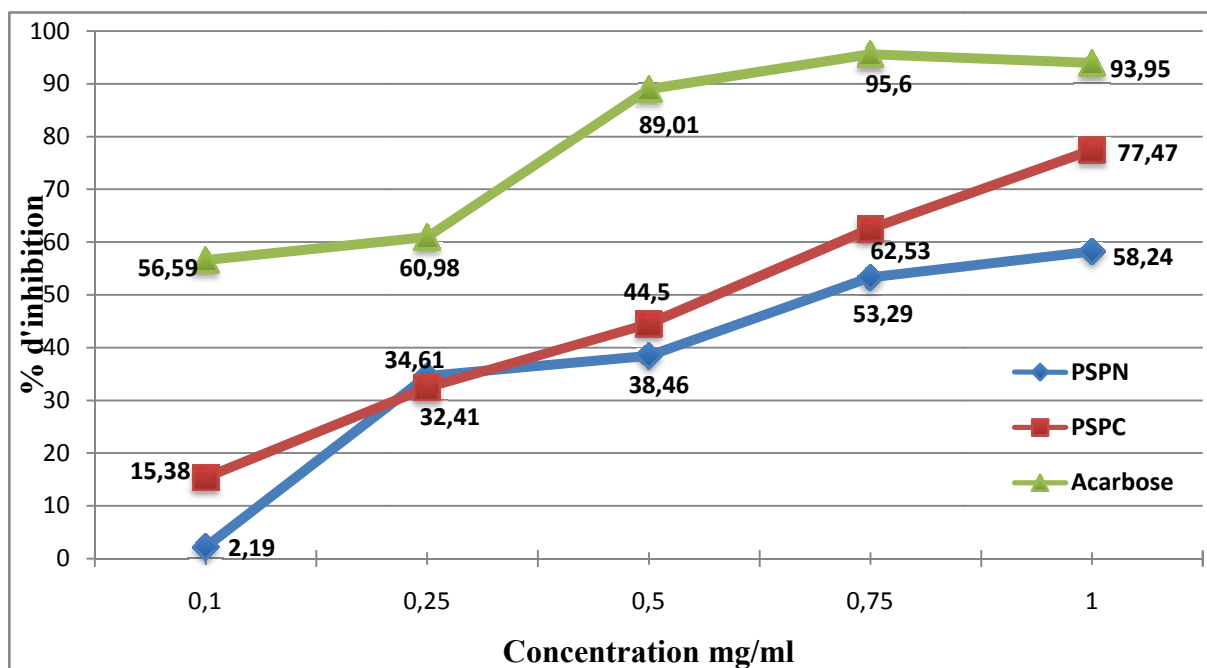


Figure 05.- Activité inhibitrice de l'acarbose et les hydrolysats polysaccharidiques de *Plantago albicans* et *Plantago notata* sur l'enzyme α -glucosidase

Au vu des résultats obtenus, le taux d'inhibition des hydrolysats polysaccharidiques de PSPN et PSPC augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de ceux-ci. A faible concentration de 0,1mg/ml, l'hydrolysat de PSPN montre une inhibition plus faible que celle de l'hydrolysat de PSPC soit $2,19 \pm 0,45\%$ et $15,38 \pm 0,01\%$, respectivement. Une amélioration progressive du taux d'inhibition à une concentration de 0,25 mg/ml des deux

hydrolysats PSPN et PSPC soit $32,41 \pm 0,01\%$ et $34,61 \pm 0,02\%$, respectivement. Une légère augmentation du pourcentage d'inhibition est remarquée à $0,5\text{mg/ml}$, soit $38,46 \pm 0,01\%$ pour l'hydrolysat de PSPN et $44,5 \pm 0,008\%$ pour PSPC. Au delà de $0,5\text{mg/ml}$, on remarque une augmentation du taux d'inhibition jusqu'à atteint le maximum soit $58,24 \pm 0,01\%$ et $77,47 \pm 0,01\%$, pour les hydrolysats PSPN et PSPC respectivement. En revanche, l'amélioration est plus claire et importante chez PSPC. Pour l'acarbose, à une faible concentration de $0,1$ on a trouvé un taux d'inhibition de $56,59\%$. Une légère augmentation est marqué soit $60,98\%$ à $0,25\text{mg/ml}$. A partir de $0,25$ une augmentation brusque du taux d'inhibition est montrée jusqu'à atteint le maximum soit $95,6\%$.

Benaoun, (2017) a trouvé que l'extrait polysaccharidique de *Plantago notata* *Lagasca* a un fort pouvoir inhibiteur sur l'enzyme α -glucosidase, qui a montré une inhibition de l' α -glucosidase de 90% à une concentration de $50\mu\text{g/ml}$.

Boual *et al.* (2017), L'extrait polysaccharidique des feuilles d'*Oudneya africana* présente un pourcentage d'inhibition des polysaccharides de $51,33\%$ pour une concentration de 10 mg/ml . Par rapport à notre travail, on a marqué un pourcentage d'inhibition égale à $58,24 \pm 0,01\%$ et $77,47 \pm 0,01\%$ pour les hydrolysats de PSPN et PSPC, respectivement à la même concentration.

Boual *et al.* (2018) ont trouvé que l'extrait polysaccharidique issu de *Plantago albicans* a un taux d'inhibition de $39,66\%$ à une concentration de 50mg/ml , semble être plus faible que celui de l'hydrolysat PSPC soit $77,47 \pm 0,01\%$ à 1mg/ml .

L'acarbose est un inhibiteur de l' α -glucosidase commercialement connu, BISHT *et al.* (2013) notent que l'acarbose a un potentiel d'inhibition de l' α -glucosidase de $81,9\%$ à une concentration de 4 mg/ml . Cependant, WANG *et al.* (2010) rapportent une activité maximale de 100% à une concentration de 5mg/ml .

Par conséquent, on déduit que les hydrolysats polysaccharidiques de PSPN et PSPC ont un effet inhibiteur important sur l'activité enzymatique de l' α -glucosidase. le fort pourcentage d'inhibition semble être du à l'hydrolyse appliquée sur les polymères, qui engendre la formation des oligosaccharides de haute compétitivité.

HSU *et al.* (2013) ont montré qu'il n'y a aucune relation entre les composants chimiques des polysaccharides et l'activité inhibitrice d' α -glucosidase. Cette observation a

conduit que l'effet inhibiteur de l'enzyme peut être dépend à la structure du polysaccharide.

L'importance des activités de ces extraits polysaccharidiques par rapport aux autres études signalées précédemment semble être justifié par la pureté des polysaccharides, ainsi on peut prendre en considération que l'activité enzymatique est finement influencée par les conditions et les paramètres expérimentaux tels que la durée d'incubation, la température, le pH ...etc.

En effet, les inhibiteurs d'enzyme peuvent agir selon des mécanismes varies, en se combinant soit avec l'enzyme (compétitive avec le substrat ou incompétitive), soit avec le complexe enzyme-substrat (non compétitive), soit avec le substrat lui-même (Weinman *et al.*, 2004). L'activité enzymatique peut être affectée de façon spécifique par de nombreux agents chimiques et les drogues tels que l'acarbose qu'a une forme proche de celle des oligosaccharides issus de la digestion des glucides, Il peut ainsi se lier aux sites de l' α -amylase ou de l' α -glucosidase, en les inhibant puissamment de façon compétitive et dose-dépendante (Scheen *et al.*, 2002).

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont révélé un effet inhibiteur intéressant des extraits polysaccharidiques purs issus des graines de *plantago albicans* et *plantago notata* sur l'activité de l' α -amylase et de l' α -glucosidase. Cette inhibition est proportionnelle à la concentration de l'extrait, plus on augmente la concentration plus le pourcentage d'inhibition est important.

A la lumière de ces résultats cette étude nécessite d'éventuelles études qui s'intéressent à :

- Tester l'effet de ces extraits *in vivo* sur l'hyperglycémie postprandiale chez des rats.
- Déterminer le type d'inhibition exercé par ces extraits sur l' α -amylase et l' α -glucosidase.

Au terme de ce travail il doit être validée l'effet hypoglycémiant de polysaccharides inhibiteurs naturelles de l' α -glucosidase et de l' α -amylase, et évaluée leurs bénéfices à long terme sur l'évolution des complications de la maladie du diabète. et avoir contribué à mettre en disponibilité des médicaments à base de plantes médicinaux efficaces et accessibles pour les traitements.

*Référence
bibliographique*

ASHOK KUMAR B.S., LAKSHMAN K., NANDEESH R., ARUN KUMAR P.A., MANOJE B., VINOD KUMAR., SHESHADRI SHEKAR D., *In vitro* alpha-amylase inhibition and *in vivo* antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats, Saudi Journal of Biological Sciences, 18: 1-5.

BEN AOUN F., 2017. Caractérisation Structurale et Potentiel Biologique des Polysaccharides issus de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora* Batt. et Trab. (Liliaceae), thèse de doctorat, université de Ouargla, Algérie: 209.

BERRY, D. R., PATERSON, A., 1990. Enzymes in food industry, Enzyme chemistry impact and application, (2): 306-351.

BISHT S., KANT R et KUMAR V., 2013. α -d-Glucosidase inhibitory activity of polysaccharide isolated from *Acacia tortilis* gum exudate. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 59: 214–220.

BOUAL Z., CHOUANA T., KEMASSI A., HAMID OUDJANA A., DADDI BOUHOUN M., MICHAUD P., OULD EL HADJ M.D., 2015. Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). Phytothérapie, vol. 13: 396-402.

BRAWN S.H. et KELLY R.M., 1993. Characterization of amylolytic enzymes having both (alpha)-1,4 and (alpha)-1,6 hydrolytic activity from the thermophilic archea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis* Applied and Environmental Microbiology, 59 (8): 2614–2621.

BURHAN, A., UNALDI, N., CORAL, G., COLAK, O., AYGAN, A., GULNAZ, O., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an *alkaliphilic Bacillus* sp, Isolate ANT-6, Process Biochemistry, (38): 1397-1403.

CHIBA S., 1988. Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.), Pergamum Press, Oxford, U.K: 104-116.

- COOLBEAR T., DANIEL R M et MORGAN H W., 1992. The enzymes from extreme thermophils: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology*. (45): 57–97.
- DAVID J. H., et HAZEL P., 1998. *Analytical biochemistry*, 3ème Edition. Ed. Prentice Hall, Angleterre: 336.
- DEJOB M., 2013. Etudes structurales et fonctionnelles d' α -glucosidases bactériennes, l'université clude bernard lyon 1: 231.
- DELATTRE C., 2005. Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse doctorat de l'université de Picardie Jules Verne, Amiens: 52-83.
- 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: 115-170-268.
- GALLIENNE E., 2005. Synthèse et évaluation d'inhibiteurs potentiels de glycosidases, analogues du salacinol, université blaise pascal: 233.
- GARRETT R. H., GRISHAM C. M., 2000, *Biochimie*: 1292.
- HADJ MOUSSA A ., 2012 Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de *Retama raetam* sur l'activité de l' α -amylase, université de Tlemcen, Algérie: 40.
- HSU W. K., HSU T. H., LIN F. Y., CHENG Y. K et YANG J. P., 2013. -Separation, purification, and α -glucosidase inhibition of polysaccharides from *Coriolus versicolor* LH1 mycelia. *Carbohydrate Polymers*, vol. 92: 297–306.
- ISHIKAWA K., MATSUI S., KOBAYASHI H., NAKATANI, K., HONDA., 1993. Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic alpha-amylases. *Biochemistry*(32): 259-265.
- JACQUES Q., ALEXANDRE S., ABE, F., 2007. *Dictionnaire médical de poche*, Elsevier Masson:153.

- KAJARIA D, RANJANA, TRIPATHI J, TRIPATHI Y B, TIWARI S., 2018. In-vitro α amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug — Shirishadi, Journal of Advanced Pharmaceutical Technologie and Research, 4(4): 206–209.
- KANDRA, L., GUEMANT G., ZAJACZ, A., BATTA, G., 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase, Biochemical and Biophysical Research Communication. (319):1265- 1271.
- KATO C., GONCALVES G., PERALTA R., SEIXAS F., SA-NAKANISHI A., BRACHT L., COMAR J., BRACHT A., 2017. Inhibition of α -Amylases by Condensed and Hydrolysable Tannins: Focus on Kinetics and Hypoglycemic Actions, Brazil: 12.
- KHACHEBA I., BENAMAR H., 2008. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales - sur l'alpha - amylase. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie, Université Amar Telidji - Laghouat.
- KAZEEM M- I., OGUNBIYI J- V., ASHAF A- O., 2013. *In vitro* Studies on the Inhibition of α -Amylase and α - Glucosidase by Leaf Extracts of *Picralima nitida* (Stapf), Tropical Journal of Pharmaceutical Research October , vol. 12 (5): 719-725.
- KRAULIS P J., 1991. J. Appl. Cryst. 24, p : 946-950.
- KUMAR S., NARWAL S., KUMAR V., PRAKASH O., 2011. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes, Pharmacognosy Reviews, 5(9): 19-29.
- LARPENT-GOURGAUD, M. et SANGLIER, J.J., 1992. Inhibitors of α -Amylase. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters: 1575-6000.
- LIU M., ZHANG W., JIANTENG W., XIUKUN L., 2011. Synthesis and α -Glucosidase Inhibitory Mechanisms of Bis (2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) Ether, a Potential Marine Bromophenol α -Glucosidase Inhibitor, Mar. Drugs, vol. 9: 1554-1565.
- MAÏGA M A A., 2014. Etude de la chimie et des activités biologiques des six (6) plantes utilisées dans le traitement traditionnel du diabète : *Allium cepa*; *Allium sativum*; *Daucus carota*; *Eucalyptus globulus*; *Psidium guajava* et *Solanum melongena*, thèse de doctorat de l'université de Mali: 135.

MEHELLOU Z., BOUAL Z., ADDOUN N., CHAKOU F., MICHAUD P., OULD EL HADJ M D., 2017. Activité antidiabétique des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Oudneya africana* r. br. récoltée au Sahara septentrional Est algérien, Séminaire International, Polysaccharides de plantes de milieux arides (POLYSAC 2017).

MEHELLOU Z., 2015. Caractérisation partielle et activités biologiques des polysaccharides hydrosolubles issus de deux plantes spontanées récoltées au Sahara septentrional Est algérien. Thèse en vue d'obtention de grade Magister: 170.

MERCIER C., 1985. Les enzymes amylolytiques, Hydrolases et dépolymérase: 110-140.

MOSIHUZZMAN M., NAHEED S., HAREEM S., TALIB S., ABBAS G., et ISRAR M., 2013. Studies on α -glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*. Life Sciences, vol. 92: 187–192

NIELSON J E., BORCHERT T V et VRIEND G., 2001. The determinant of α -amylase pH-activity profiles, Protein Engineering, Oxford University Press, 14(7), p: 505-512.

NIU Y., WANG H., XIE Z., WHEAT M., GAO X., ZHANG X., ZOU S., YAO W., YU L., 2011. Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. *Var. mongolicus* (Bge.) Hsiao. Food Chemistry, vol. 128: 620-626.

OCTAVEO L F., DANIAL J R., FRANCSLETE R M., CARLOS BLOCHI J R., CARLOS P S., et MARIA F G., 2000. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards birched α -amylases and structural explanation of observed specificities. Eur. J. Biochem. 2(67):66-73.

OKI T, MATSUMOTO K, MATSUI T, OSAJIMA Y. J., 1999. Agr Food Chem, vol. 47:550-3.

PANDEY A., NIGAM P., SOCCOL C.R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R., 2000. Advances In, Microbial amylases. Biotechnology, Appl, Biochem. (31): 135-152.

PATERSON A., 1990. Enzymes in food industry In: Sucking C.J. Enzyme chemistry impact and application. (2): p306-351.

PATTERSON C. A., PH D. et PAG., 2008. Polysaccharides Pour la santé de l'intestin. The Pathfinders Research & Management, Canada. N° 10710F : 1-4.

POONGUNRAN J., PERERA H-K- I. FERNANDO W- I-T., JAYASINGHE L., SIVAKANESAN R., 2015. α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activities of Nine Sri Lankan Antidiabetic Plants, British Journal of Pharmaceutical Research, vol. 7(5): 365-374, Article, BJPR. 118 ISSN: 2231-2919.

QIAN J-Y., BAI Y-Y., TANG J., CHEN W., 2015. Antioxidation and α -glucosidase inhibitory activities of barley polysaccharides modified with sulfation, LWT- Food Science and Technology, Vol. 64:104-111.

RUIZ G., 2005. Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges. Thèse de Doctorat de l'Université De Limoges, France : 38-189p.

SAIHI Y., 2015. Etude de la relation quantitative structure-activité inhibitrice des enzymes hydrolytiques : cas des α -glucosidases, université Badji Mokhtar - Annaba: 108.

SCHAMBURG D., COL., 1991. Cité par: Schamburg D., Salzmann M G B F. 1991. Alpha amylase. In: Enzyme handbook, volume 4 spring-verlag, Berlin, PP: 1-3.

SCRIBAN R., 1999. Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.). p : 401-409.

SULISTIYANI, MEGA S., YOANA P., 2016. Inhibition of α -glucosidase activity by ethanolic extract of *Melia azedarach* L. leaves, IOP Publishing, Series: Earth and Environmental Science, vol. 31,012025.

TELAGARI M., HULLATTI K., 2015. *in vitro* alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. And *Celosia argentea* Linn, Extracts and fractions, Journal List, Indian J. pharmacol, Vol. 47(4): 425-429.

TELLI A., 2017. Activités anti-oxydante, antimicrobienne et antidiabétique de deux espèces spontanées utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Ouargla: *Amodaucus leucotrichus* et *Anvillea radiata*, thèse de doctorat de l'université de Ouargla, 170.

WANG Q., FANG Y., 2004. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. Journal of Chromatography B, vol. 812: 309–324.

WANG Y., YANG Z et WEI X., 2010. Sugar compositions, α -glucosidase inhibitory and

amylase inhibitory activities of polysaccharides from leaves and flowers of *Camellia sinensis* obtained by different extraction methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 47: 534– 539.

WEINMAN S. And MEHUL P., 2004. *Toute la biochimie*. Ed. Dunod, Paris: 452.

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

WU J., SHI S., WANG H., WANG S., 2016. Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. *Carbohydrate Polymers*, Vol.144: 474-494.

WU Z., ZHANG M., XIE M., DAI M., WANG X., HU B., YE H. et ZENG X., 2016. Extraction, characterization and antioxidant activity of mycelia polysaccharides from *Paecilomyces hepiali* HN1, *Carbohydrate Polymers*, vol. 137: 541–548.

Résumé

Une nouvelle étude a pour objectif d'évaluer l'activité antidiabétique des hydrolysats polysaccharidiques issus de *Plantago albicans* et de *Plantago notata* a été effectuée. Au début, Nous avons réalisé une hydrolyse acide partielle afin de solubiliser les extraits polysaccharidiques par le TFA 0,5M à 60°C pendant une heure. L'activité antidiabétique des hydrolysats polysaccharidiques étudiés a été évaluée en utilisant la méthode d'inhibition de deux enzymes α -glucosidase et α -amylase, *in vitro*. L'acarbose, comme contrôle positif a montré un fort pouvoir inhibiteur d'environ 96%. Les hydrolysats polysaccharidiques de *Plantago notata* et de *Plantago albicans* exercent un effet inhibiteur sur l'enzyme α -amylase avec un pourcentage d'inhibition similaire et qui atteint $74,56 \pm 0,01\%$ à 10mg/ml de chaque hydrolysat. En outre, l' α -glucosidase a subi une inhibition par ces deux hydrolysats polysaccharidiques, les résultats obtenus révèlent un taux d'inhibition chez PSPN de $58,24 \pm 0,01\%$, plus faible que celui de PSPC de $77,47 \pm 0,01\%$. Les informations rapportées pourraient révéler des nouveaux polysaccharides à activité antidiabétique.

Mots clés: Activité antidiabétique, α -glucosidase, α -amylase, polysaccharide, *Plantago sp*

A new study aims to evaluate the anti diabetic activity of polysaccharide hydrolysates from *Plantago albicans* and *Plantago notata*. Partial acid hydrolysis was performed to solubilize the polysaccharide extracts with 0.5M TFA at 60°C for one hour. The anti diabetic activity of the polysaccharide hydrolysates studied was evaluated inhibition of α -glucosidase and α -amylase enzymes, *in vitro*. Acarbose as a positive control showed a strong inhibitory power of about 96%. The polysaccharide hydrolysates of *Plantago notata* and *Plantago albicans* exercise an inhibitory effect on the α -amylase enzyme with a similar percentage inhibition and reaches $74.56\pm 0,01\%$ at 10 mg / ml of each hydrolyzate. In addition, the α -glucosidase was inhibited by these two polysaccharide hydrolysates, the results obtained reveal an inhibition rate in PSPN of $58.24\pm 0,01\%$ lower than that of PSPC of $77.47\pm 0,01\%$. The reported information could reveal new polysaccharides with antidiabetic activity.

key words: anti diabetic activity, α -glucosidase, α -amylase, polysaccharides, *Plantago sp*

تهدف هذه الدراسة الجديدة إلى تقييم نشاط متعدد السكر المستخلص من نبتتي لقمة الناجي وأدان ضد مرض السكري. تم إجراء تحليل حمضي جزئي لمتعدد السكر من أجل إذابة المستخلصين باستخدام TFA تركيزه 0,5مول عند درجة حرارة 60° مئوية لمدة ساعة. تم تقييم نشاط متعدد السكر ضد مرض السكري المتحلل عن طريق تثبيط إنزيمين الأميلاز و الغلوكوزيداز في المختبر . استعمل الاكاربوز كشاهد ايجابي, أظهر قدرة تثبيط قوية نسبتها حوالي 96 % . متعددي السكر المتحللين لكل من لقمة الناجي وأدان مارسا تأثيرا مثبتا مماثلا على انزيم الأميلاز وصل إلى $74.56 \pm 0,01$ % عند تركيز 10 ملغ / مل . بالإضافة إلى ذلك, تم تثبيط انزيم بواسطة متعددي السكر هذين , بنسبة $58.24 \pm 0,01$ % عند PSPN وبمعدل أقل من PSPC الذي أظهر نسبة تثبيط قدرت ب $77.47 \pm 0,01$ % . المعلومات المتحصل عليها يمكن أن تساهم في اكتشاف سكريات جديدة لديها نشاط مضاد لمرض السكر.

كلمات مفتاحية : النشاط المضاد لمرض السكري, الأميلاز, الغلوكوزيداز, متعدد سكر , *Plantago sp* .

Une nouvelle étude a pour objectif d'évaluer l'activité antidiabétique des hydrolysats polysaccharidiques issus de *Plantago albicans* et de *Plantago notata* a été effectuée. Au début, Nous avons réalisé une hydrolyse acide partielle afin de solubiliser les extraits polysaccharidiques par le TFA 0,5M à 60°C pendant une heure. L'activité antidiabétique des hydrolysats polysaccharidiques étudiés a été évaluée en utilisant la méthode d'inhibition de deux enzymes α -glucosidase et α -amylase, *in vitro*. L'acarbose, comme contrôle positif a montré un fort pouvoir inhibiteur d'environ 96%. Les hydrolysats polysaccharidiques de *Plantago notata* et de *Plantago albicans* exercent un effet inhibiteur sur l'enzyme α -amylase avec un pourcentage d'inhibition similaire et qui atteint $74,56\pm 0,01\%$ à 10mg/ml de chaque hydrolysats. En outre, l' α -glucosidase a subit une inhibition par ces deux hydrolysats polysaccharidiques, les résultats obtenus révèlent un taux d'inhibition chez PSPN de $58,24\pm 0,01\%$, plus faible que celui de PSPC de $77,47\pm 0,01\%$. Les informations rapportées pourraient révéler des nouveaux polysaccharides à activité antidiabétique.

Mots clés: Activité antidiabétique, α -glucosidase, α -amylase, polysaccharide, *Plantago sp*

تهدف هذه الدراسة الجديدة إلى تقييم نشاط متعدد السكر المستخلص من نبتتي لقمة الناجي وأدان ضد مرض السكري. تم إجراء تحليل حمضي جزئي لمتعدد السكر من أجل إذابة المستخلصين باستخدام TFA تركيزه 0,5مول عند درجة حرارة 60°C لمدة ساعة. تم تقييم نشاط متعدد السكر ضد مرض السكري المتحلل عن طريق تثبيط إنزيمين الأميلاز و الغلوكوزيداز في المختبر. استعمل الاكاربوز كشاهد ايجابي, أظهر قدرة تثبيط قوية نسبتها حوالي 96%. متعدد السكر المتحللين لكل من لقمة الناجي وأدان مارسا تأثيرا مثبتا مماثلا على انزيم الأميلاز وصل إلى $74.56\pm 0,01\%$ عند تركيز 10 ملغ / مل. بالإضافة إلى ذلك, تم تثبيط انزيم بواسطة متعدد السكر هذين, بنسبة $58.24\pm 0,01\%$ عند PSPN وبمعدل أقل من PSPC الذي أظهر نسبة تثبيط قدرت ب $77.47\pm 0,01\%$. المعلومات المتحصل عليها يمكن أن تساهم في اكتشاف سكريات جديدة لديها نشاط مضاد لمرض السكر.

كلمات مفتاحية: النشاط المضاد لمرض السكري, الأميلاز, الغلوكوزيداز, متعدد سكر, *Plantago sp*.

A new study aims to evaluate the anti diabetic activity of polysaccharide hydrolysates from *Plantago albicans* and *Plantago notata*. Partial acid hydrolysis was performed to solubilize the polysaccharide extracts with 0.5M TFA at 60°C for one hour. The anti diabetic activity of the polysaccharide hydrolysates studied was evaluated inhibition of α -glucosidase and α -amylase enzymes, *in vitro*. Acarbose as a positive control showed a strong inhibitory power of about 96%. The polysaccharide hydrolysates of *Plantago notata* and *Plantago albicans* exercise an inhibitory effect on the α -amylase enzyme with a similar percentage inhibition and reaches $74.56\pm 0,01\%$ at 10 mg / ml of each hydrolyzate. In addition, the α -glucosidase was inhibited by these two polysaccharide hydrolysates, the results obtained reveal an inhibition rate in PSPN of $58.24\pm 0,01\%$ lower than that of PSPC of $77.47\pm 0,01\%$. The reported information could reveal new polysaccharides with antidiabetic activity.