



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبي بكر بلكايد - تلمسان

Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen –

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine : SNV

Filière : science biologiques

Spécialité : Biochimie

Par :

CHERIF Ghizlene

AMMOUR Roumaissa

Etude des propriétés antidiabétique et antioxydante d'un ligand base de Schiff et de quelques complexes: étude *in vitro*

Soutenu publiquement, le 24/06 /2026, devant le jury composé de :

Président:	Mr. AZZI Rachid	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur :	Mme MEDJDOUB Houria	MCA	Université de Tlemcen
Co-encadreur:	Mme CHIBOUB FELLAH	Professeur	Université de Tlemcen
	Fatima Zohra		
Examinatrice:	Mme BELKACEM Nacéra	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2025-2026

RESUME

Les bases de Schiff, composés organiques reconnus pour leurs propriétés biologiques, voient souvent leur efficacité renforcée par la formation de complexes avec des ions métalliques. Dans cette optique la présente étude se concentre sur l'évaluation de l'activité antioxydante et antidiabétique d'un ligand base de Schiff ainsi que de ses complexes métalliques de zinc (Zn) et de cuivre (Cu).

L'objectif principal est d'explorer le potentiel biologique de ces composés via l'évaluation de leur activité antioxydante par la technique du pouvoir réducteur du fer (FRP) et l'étude de leur capacité à inhiber l'enzyme l'alpha-amylase, impliquée dans le diabète.

Les résultats ont révélé que les complexes métalliques présentent une activité antioxydante supérieure à celle du ligand seul. Les EC_{50} de l'ordre de $6,43 \pm 0,57$ mg/mL, $2,53 \pm 0,22$ mg/mL et $0,34 \pm 0,03$ mg/mL pour le ligand, le complexe de Cu et le complexe de Zn. De plus, les tests d'inhibition de l'alpha-amylase ont montré une activité inhibitrice notable, avec des valeurs EC_{50} de $0,04 \pm 0,0006$ mg/mL pour le ligand, $0,173 \pm 0,005$ mg/mL pour le complexe de cuivre et $0,51 \pm 0,052$ mg/mL pour le complexe de zinc, comparées à $0,007 \pm 0,00$ mg/mL pour l'acarbose. Ces données confirment que le ligand possède la meilleure activité inhibitrice parmi les composés synthétisés.

En résumé, les bases de Schiff et leurs complexes métalliques représentent des candidats prometteurs pour le développement de nouvelles molécules antioxydantes et antidiabétiques. Cependant, des études complémentaires *in vivo* et toxicologiques sont nécessaires pour valider leur potentiel thérapeutique.

Mots-clés : Bases de Schiff, complexes métalliques, activité antioxydante, activité antidiabétique

ملخص

تُعد قواعد شيف (Bases de Schiff) من المركبات العضوية التي تتميز بخصائص بيولوجية واعدة، وتزداد فعاليتها عند تكوين معقدات مع الأيونات المعدنية. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد لداء السكري للربيطة (Ligand) المشتقة من قاعدة شيف، بالإضافة إلى معقداتها المعدنية مع الزنك (Zn) والنحاس (Cu).

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستعمال اختبار القدرة الاختزالية للحديد (FRAP)، كما تم تقييم النشاط المضاد لداء السكري من خلال دراسة تثبيط إنزيم α -amylase، وهو أحد الإنزيمات المستهدفة في علاج داء السكري.

أظهرت النتائج أن المعقدات المعدنية تمتلك نشاطاً مضاداً للأكسدة أعلى من الربيطة الحرة، حيث بلغت قيم EC_{50} لاختبار FRAP 0.57 ± 6.43 ، و 0.22 ± 2.53 ، و 0.03 ± 0.34 مل/مل لكل من الربيطة، ومعقد النحاس، ومعقد الزنك، على التوالي.

وفي المقابل، أظهرت نتائج اختبار تثبيط إنزيم α -amylase أن الربيطة تمتلك أفضل نشاط تثبيطي مقارنةً بمعقداتها المعدنية، حيث بلغت قيمة IC_{50} 0.04 ± 0.0006 مل/مل، في حين بلغت 0.005 ± 0.173 مل/مل لمعقد النحاس، و 0.052 ± 0.51 مل/مل لمعقد الزنك، بينما سجل الدواء المرجعي أكاربوز (Acarbose) قيمة IC_{50} قدرها 0.00 ± 0.007 مل/مل.

تؤكد هذه النتائج أن قواعد شيف ومعقداتها المعدنية تُعد مركبات واعدة لتطوير عوامل جديدة مضادة للأكسدة ومضادة لداء السكري. ومع ذلك، تبقى هناك حاجة إلى إجراء دراسات إضافية داخل الكائن الحي (in vivo)، إلى جانب تقييم السمية، للتحقق من فعاليتها وسلامتها وإمكانية استخدامها في التطبيقات العلاجية مستقبلاً.

الكلمات المفتاحية: قواعد شيف، الربيطة، المعقدات المعدنية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد لداء السكري

Abstract

Schiff bases, organic compounds recognized for their biological properties, often see their efficacy enhanced through the formation of complexes with metal ions. With this in mind, the present study focuses on the evaluation of the antioxidant and antidiabetic activity of a Schiff base ligand, as well as its zinc (Zn) and copper (Cu) metal complexes.

The main objective is to explore the biological potential of these compounds by evaluating their antioxidant activity using the Ferric Reducing Power (FRP) technique, and by studying their ability to inhibit the alpha-amylase enzyme, which is involved in diabetes.

The results revealed that the metal complexes exhibit superior antioxidant activity compared to the ligand alone. The EC₅₀ values are around 6,43±0,57 mg/mL mg/mL, 2,53±0,22 mg/mL, and 0,34±0,03 mg/mL for the ligand, the Cu complex, and the Zinc complex, respectively. Furthermore, alpha-amylase inhibition tests showed a notable inhibitory activity, with IC₅₀ values of 0,04 ± 0,0006 mg/mL for the ligand, 0,173± 0,005 mg/mL for the copper complex, and 0,51± 0,052 mg/mL for the zinc complex, compared to 0,007±0,00 mg/mL for acarbose. These data confirm that the ligand possesses the best inhibitory activity among the synthesized compounds.

In summary, Schiff bases and their metal complexes represent promising candidates for the development of new antioxidant and antidiabetic molecules. However, additional *in vivo* and toxicological studies are necessary to validate their therapeutic potential.

Keywords: Schiff bases, metal complexes, antioxidant activity, antidiabetic activity.

Remerciements

Nous remercions avant tout Dieu, le Tout-Puissant, notre Créateur, de nous avoir donné la force, la volonté et le courage nécessaires pour mener à bien ce modeste travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme MEDJDOUB Houria, Professeure à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté d'encadrer ce mémoire. Nous lui sommes reconnaissantes pour ses orientations, ses remarques pertinentes et l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Mme CHIBOUB FELLAH Fatima Zohra, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, pour son co-encadrement, sa disponibilité, ses précieux conseils, son soutien moral ainsi que ses encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous adressons aussi nos sincères remerciements à Monsieur AZZI Rachid, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen, pour avoir accepté de présider le jury de cette soutenance. Nous lui sommes très reconnaissantes pour l'honneur qu'il nous fait en consacrant son temps à l'évaluation de ce travail. Nous le remercions également pour l'intérêt qu'il a porté à notre étude ainsi que pour ses remarques et observations qui contribueront à l'amélioration de ce mémoire.

Nous exprimons également notre profonde gratitude à Madame BELKACEM Nacéra, pour avoir accepté d'examiner ce travail en qualité de deuxième examinatrice. Nous la remercions sincèrement pour le temps consacré à l'évaluation de ce mémoire, ainsi que pour ses remarques pertinentes, ses conseils et ses précieuses recommandations.

Nous exprimons également notre profonde gratitude à Madame ABBOU Faiza, Maître de Conférences B, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Nous la remercions chaleureusement pour le temps qu'elle a consacré à son évaluation, ainsi que pour ses conseils, ses critiques constructives et ses précieuses recommandations, qui ont grandement enrichi ce mémoire.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à nos parents ainsi qu'à toute notre famille pour leur amour, leurs sacrifices, leurs encouragements et leur soutien indéfectible. Leur confiance a toujours été une source de motivation et de détermination.

Nous remercions également les membres du laboratoire ainsi que toutes les personnes qui nous ont aidées, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, nous adressons notre sincère reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à notre parcours académique et qui ont contribué, chacune à sa manière, à l'aboutissement de ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de nos plus sincères remerciements.

Dédicace

Grace à dieu tout puissant, nous dédions ce modeste travail à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire plus particulièrement : A mes très chers parents.

A mon très cher papa : je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, tes conseils, tes sacrifices illimités.

A ma chère maman : je te remercie pour ton encouragement, tes conseils, tes sacrifices je suis l'aujourd'hui grâce à toi.

A mon cher frère unique Farhadinne : qui n'a mis aucun refus à me porter aide et assistance je te remercie pour ton appui et ton encouragement

A mes chères sœurs djazia, Loubna : pour leur soutien et amour.

A mes chères amies ghizlane, djazia, wafaa, qui ont partagé avec moi des moments inoubliables de joie et de bonheur.

Ghizlane

Hamdoullah,

Pour tout ,pour la force dans la faiblesse, pour la patience dans l'épreuve et pour la lumière qui a guidé mes pas jusqu' à l'aboutissement de ce travail.

A moi-même

Je dédie ce mémoire à moi-même, pour tous les efforts que j'ai fournis tout au long de mes études.

Ce parcours n'a pas toujours été facile, mais j'ai fait preuve de patience, de motivation et de persévérance pour continuer et ne pas abandonner.

Il y a eu des moments de doute et de fatigue, mais j'ai toujours essayé de rester forte et de croire en mes capacités.

Aujourd'hui, je suis fière du chemin que j'ai parcouru et des expériences que j'ai vécues.

Ce travail représente une étape importante de ma vie et le résultat de tout mon engagement.

A ma chère mère

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma mère, Malika, la personne la plus chère à mon cœur. Merci pour ton amour inconditionnel, ta tendresse et ta présence constante à mes côtés. Tu as toujours cru en moi, même dans les moments de doute, et tu m'as donné la force de poursuivre mon chemin sans jamais abandonner.

Tes sacrifices, ta patience, ton soutien indéfectible et tes prières ont été une source inestimable de courage et de motivation tout au long de ce parcours. Grâce à toi, j'ai appris la persévérance, la confiance en soi et la valeur du travail. Aucun mot ne saurait exprimer pleinement toute ma reconnaissance et mon amour pour tout ce que tu as fait pour moi.

A mon cher père

Je remercie mon père Nour eddine, qui est la personne qui m'a le plus encouragée et qui m'a donné la force de continuer.

Je le remercie pour tous ses efforts et son soutien.

Merci pour les sacrifices qu'il a faits afin de me permettre d'étudier dans de bonnes conditions.

*Je lui suis également reconnaissante pour sa confiance en moi et pour son encouragement
tout au long de mes études.*

*Malgré toutes les difficultés et les moments difficiles que nous avons traversés, il est
toujours resté présent à mes côtés et m'a donné la force de continuer.*

À mes sœurs et frères

Rachida, Asma, fatima, kenza, Hanen, wafae, Ahmed, et kader

*Merci pour votre présence, votre affection et vos encouragements qui m'ont accompagnée
tout au long de ce parcours.*

À mon chère Midou

*Tu as été bien plus qu'un simple soutien durant cette aventure : tu as été mon réconfort
dans les moments difficiles, ma motivation lorsque la fatigue se faisait sentir et mon
bonheur au quotidien. Ton amour, ta douceur et ta présence ont illuminé chaque étape de
ce parcours.*

*Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir encouragée sans jamais faiblir et d'avoir transformé
mes inquiétudes en confiance. Cette réussite est aussi la tienne, car ton cœur a
accompagné chacun de mes pas.*

Roumaissa

Liste des abréviations

AA : acide ascorbique

DPPH : Radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl.

EC50 : La concentration qui correspond à une absorbance de 0.5

ERO : Espèce réactive de l'oxygène.

ED : Eau Distillée

Fe³⁺: Ion ferrique.

FRP: Ferric Reducing Power

FeCl₃: Chlorure ferrique

Fe²⁺ : Fer ferreux

G : gramme

IC50 : Concentration d'inhibition pour 50

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium

Mg : milligramme

ml : millilitre

mg AA/g : milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par Gramme d'extrait

PH : potentiel hydronium

RL : radical libre

TCA : Acide trichloracétique

SOD : peroxyde de dismutase

Tr/mn : tour par minute

UV-VIS : Ultraviolet-Visible

Liste des tableau

<i>Tableau 1 : Valeurs d'EC50 enregistrées pour les trois extrait et l'acide ascorbique</i>	37
<i>Tableau 2 : Evaluation des valeurs des IC50 de différents complexes et les fractions de l'Acarbose.</i>	41

Liste des figures

<i>Figure 1: Mécanisme provoquant un stress oxydant au sein d'une cellule</i>	5
<i>Figure 2 : Principaux étapes de production des espèces réactives de l'oxygène</i>	10
<i>Figure 3 : Structure de la vitamine E</i>	11
<i>Figure 4 : Structure de la vitamine C</i>	12
<i>Figure 5 : Structure chimique de la beta carotène.</i>	13
<i>Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'alpha-amylase</i>	17
<i>Figure 7 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques</i>	18
<i>Figure 8 : Structure générale d'une base de Schiff</i>	22
<i>Figure 9 : Mécanisme d'obtention d'une base de Schiff</i>	23
<i>Figure 10 : Structure générale de la sulfonylhydrazone, où R et R' représentent des groupes alkyles ou aryles</i>	23
<i>Figure 11: solutions préparées</i>	32
<i>Figure 12 : Protocole d'évaluation du pouvoir réducteur du fer</i>	33
<i>Figure 13: Représentation graphique du pouvoir réducteur de fer du ligand</i>	35
<i>Figure 14 : Représentation graphique de pouvoir réducteur de fer du complexe de zinc</i>	36
<i>Figure 15 : Représentation graphique de pouvoir réducteur de fer de l'extrait du cuivre</i>	36
<i>Figure 16 : Représentation graphique du pouvoir réducteur de l'acide ascorbique</i>	37
<i>Figure 17 : Effet inhibiteur du complexe de ligand sur l'alpha amylase</i>	39
<i>Figure 18 : Effet inhibiteur du complexe de cuivre sur l'alpha amylase</i>	40
<i>Figure 19 : Effet inhibiteur du complexe de zinc sur l'alpha amylase</i>	40
<i>Figure 20 : Effet inhibiteur d'acarbose sur l'alpha amylase</i>	41

Table des matières

<i>Introduction Générale</i>	1
<i>Synthèse Bibliographique</i>	3
<i>Chapitre I : Stress oxydatif</i>	4
1 Stress oxydatif:	5
2 Origine du stress oxydatif:	5
2.1 Origine exogène	5
2.2 Origine endogène	6
3 Radicaux libres:	6
3.1 Types des radicaux libres:	6
3.1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	6
3.1.2 Espèces réactives de l'azote (ERN)	7
➤ Monoxyde d'azote (NO)	7
4 Les cibles biologiques des ERO:	7
4.1 Les lipides:	7
4.2 Les protéines:	7
4.3 L'ADN:	8
5 Antioxydante:	8
5.1 Antioxydante de synthèse:	8
5.2 Antioxydants naturels:	9
6 Antioxydants endogènes:	9
6.1 Antioxydants enzymatique :	9
➤ Superoxyde dismutase (SOD)	9
➤ La catalase (CAT)	9
➤ Les glutathion peroxydases (GPX):	10
➤ Thiorédoxine:	10
6.2 Antioxydants exogènes:	11
6.2.1 Antioxydants non enzymatiques:	11
➤ La vitamine E :	11
➤ La vitamine C:	11
➤ Polyphénols:	12
➤ Le β-carotène:	12
➤ Oligoéléments:	13
• Sélénium:	13
• Zinc:	14
• Cuivre:	14
• Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> :	14
<i>Chapitre II : l'alpha amylase</i>	15
1 Définition:	16
2 Structure de l'alpha amylase:	16
3 Mécanisme d'action:	17
4 Nomenclature de l'alpha amylase:	18

5 Les activateurs de l'alpha amylase:	18
6 Mode d'action:	19
➤ Poids moléculaire:	19
➤ Température optimum:	19
➤ pH optimal:	19
7 Différentes origines:	20
7.1 Origine animale:	20
7.2 Origine végétale:	20
7.3 Origine microbienne:	20
Chapitre III: Généralité sur les bases de Schiff	21
1 Généralité:	22
2 Définition:	22
3 Structure générale d'une base de Schiff :	22
4 Mécanisme réactionnelle:	23
5 Classification et des bases de Schiff :	23
6 Propriété des bases de Schiff :	24
6.1 Caractéristiques de complexation (composés métalliques) :	24
6.2 Caractéristiques catalytiques:	24
6.3 Propriétés inhibitrices de corrosion:	24
6.4 Modalité d'adsorption et interaction avec les métaux:	25
7 Effet biologique des bases de Schiff :	25
8 Activité cytotoxique des complexes de bases de Schiff :	25
9 Complexe métallique de base de Schiff :	26
9.1 Formation de complexes durables:	26
9.2 Techniques de préparation des complexes métalliques :	27
10 Utilisation des bases de Schiff et leurs complexes métalliques :	27
Partie Expérimentale	28
Matériel et Méthodes	29
1 Objectif :	30
2 Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité de l'alpha amylase:	30
➤ Préparation du réactif DNSA:	30
➤ Préparation de la solution enzymatique :	30
➤ Préparation de la solution d'amidon :	30
3 Solutions des composés de synthèse:	30
➤ Solution de D-carbose:	31
➤ Mode opératoire:	31

4	<i>Evalution de l'activité antioxydante:</i>	32
•	Principe:	32
•	Solutions préparées:	32
•	Mode opératoire:	32
	<i>Résultats et Discussion</i>	34
1	<i>Évaluation de l'activité antioxydent par la méthode de FRP :</i>	35
1.1	Effet du ligand:	35
1.2	Effet du complexe de zinc:	35
1.3	Effet du complexe de cuivre :	36
1.4	Effet de l'acide ascorbique:	37
2	<i>Effet inhibiteur des extraits sur l'alpha amylase :</i>	39
2.1	Le ligand:	39
2.2	Le complexe de cuivre:	39
2.3	Le complexe de zinc :	40
2.4	Extrait d'Acarbose :	41
	<i>Conclusion Générale</i>	44
	<i>Références Bibliographiques</i>	46

Introduction

Générale

Introduction générale

Le stress oxydatif s'est imposé comme un concept prépondérant dans les sciences biologiques et médicales depuis de nombreuses années. Cela représente un déséquilibre entre l'excès de production d'espèces réactives de l'oxygène et les systèmes de défense antioxydants de la cellule, ce qui conduit à une défaillance du contrôle cellulaire face à ces radicaux nocifs. Le stress oxydatif, bien qu'il ne soit pas classé comme une maladie autonome, joue un rôle crucial dans l'apparition et l'évolution de diverses affections, y compris le diabète, les troubles cardiovasculaires, les cancers, ainsi que certaines affections neurodégénératives (Tebani & Bouchahed, 2024).

Le diabète sucré est une affection métabolique chronique qui se caractérise par une hyperglycémie constante, due à une anomalie de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline. Il est considéré comme un problème de santé publique important qui affecte des millions d'individus à travers le globe. Diverses complications graves sont fréquemment liées à cette maladie, augmentant graduellement les risques de morbidité et de mortalité (DeFronzo et al., 2015).

Bien qu'il existe de nombreux traitements contre le diabète, comme l'insuline et les médicaments antidiabétiques oraux, leur efficacité peut ne pas être optimale pour certains patients. En outre, ces thérapies peuvent engendrer différents effets secondaires, dont l'hypoglycémie, les problèmes gastro-intestinaux et l'augmentation du poids. Ainsi, la quête de nouvelles molécules ayant une plus grande efficacité thérapeutique et moins d'effets indésirables représente un enjeu crucial dans les domaines de la chimie médicinale et de la pharmacologie.

L'élaboration de nouveaux complexes de Schiff associés à des ions métalliques tels que le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) est actuellement très prisée dans le secteur de la chimie médicale. Effectivement, ces complexes métalliques ont généralement des attributs biologiques améliorés comparativement aux ligands, y compris des actions antioxydantes et antidiabétiques (Vanco et al., 2008).

De nombreuses études ont été dédiées à la synthèse et à l'évaluation biologique de ces composés dans le but d'examiner leur potentiel en tant que traitement.

Dans ce cadre, notre recherche se concentre sur la synthèse, la caractérisation et l'appréciation de l'activité biologique de complexes de bases de Schiff impliquant le cuivre et le zinc. Nous avons examiné deux activités clés, à savoir l'activité antioxydante et l'activité antidiabétique (l'inhibition de l' α -amylase), pour évaluer d'éventuel pouvoir thérapeutique de ces nouveaux composés.

Introduction générale

Ce mémoire est organisé en trois sections majeures:

- La première section est dédiée à la récapitulation bibliographique. Elle se compose de trois chapitres:
 - * le premier traite les aspects généraux des bases de Schiff et des complexes métalliques, en particulier ceux du cuivre (Cu) et du zinc (Zn).
 - * le chapitre deux examine le stress oxydatif et l'activité antioxydante, tandis que le chapitre trois discute du diabète sucré et du concept d'inhibition enzymatique de l' α -amylase en tant qu'objectif de l'effet antidiabétique.
 - * le troisième chapitre présente des généralités sur les bases de Schiff et ses complexes métalliques.
- La seconde partie est de nature expérimentale. Elle traite l'évaluation des activités biologiques *in vitro* des complexes de bases de Schiff contenant du cuivre et du zinc, en plus du ligand. On utilise des méthodes adéquates, comme le pouvoir réducteur de fer FRP, pour évaluer l'activité antioxydante, tandis que l'activité antidiabétique est examinée via le test d'inhibition de l' α -amylase.
 - La troisième section est dédiée à la mise en avant des résultats obtenus à travers des tableaux et des graphiques, et leur analyse. Elle se conclut par une synthèse globale et des orientations pour les recherches futures

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Stress oxydatif

1 Stress oxydatif:

Le dioxygène, indispensable à de nombreuses fonctions vitales, possède un fort pouvoir oxydant pouvant engendrer des altérations biologiques souvent irréversibles au sein de l'organisme (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Dans certaines conditions physiologiques, les cellules mettent en place des systèmes de défense antioxydants, enzymatiques et non enzymatiques, capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène et de maintenir l'équilibre entre les agents prooxydants et antioxydants (Beaudeau et al., 2006).

Cependant, lorsque la production de ces espèces réactives dépasse les capacités du système antioxydant, un état de stress oxydatif s'installe (figure 01). Ce déséquilibre entraîne des lésions cellulaires et tissulaires et favorise le développement de nombreuses pathologies associées notamment au vieillissement, telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le cancer et le diabète (Haleng et al., 2007).

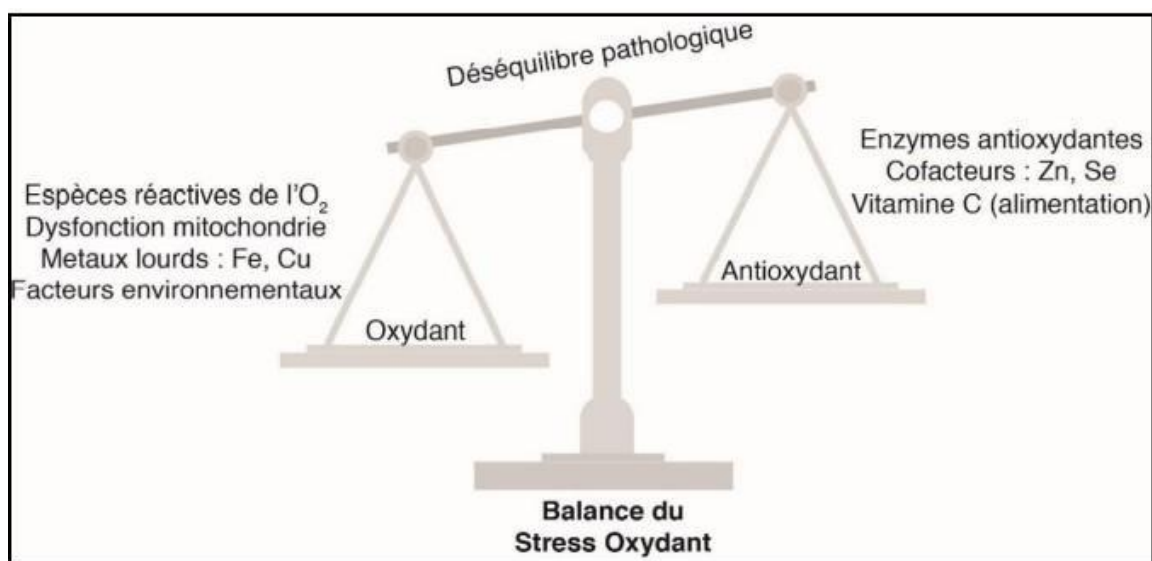


Figure 1: Mécanisme provoquant un stress oxydant au sein d'une cellule (Burg, 2017)

2 Origine du stress oxydatif:

2.1 Origine exogène

Dans la vie quotidienne, l'arbre respiratoire est continuellement exposé aux polluants atmosphériques gazeux. Ces derniers exercent leurs effets toxiques sur les cellules en générant une grande quantité d'oxydants. Les principales sources incluent le tabac, l'alcool, les rayonnements ultraviolets (UV), l'ozone et le dioxyde d'azote (NO) .

2.2 Origine endogène

Les oxydants peuvent également provenir de diverses cellules épithéliales et endothéliales. Toutefois, l'augmentation de leur concentration est principalement liée à l'activité des cellules inflammatoires, notamment les macrophages et les polynucléaires neutrophiles.

3 Radicaux libres:

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, qu'il s'agisse d'atomes, d'ions ou de molécules, caractérisées par la présence d'un électron célibataire (non apparié) sur leur couche périphérique, au niveau de leur orbitale externe (Goto et al., 2008 ; Belot, 2015).

Ces espèces instables réagissent spontanément avec d'autres atomes ou molécules, entraînant la formation de nouveaux radicaux et déclenchant ainsi des réactions en chaîne. Ces réactions ne peuvent être stoppées que par la combinaison de deux radicaux libres. En raison de leur forte réactivité in vivo, elles interagissent avec différentes composantes cellulaires telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques. L'exemple le plus connu de ces réactions en chaîne est la peroxydation lipidique (Durand et al., 2013).

3.1 Types des radicaux libres:

Dans les systèmes biologiques, les radicaux libres les plus significatifs sont principalement les espèces réactives de l'oxygène (ROS, « Reactive Oxygen Species ») et les espèces réactives de l'azote (RNS, « Reactive Nitrogen Species ») (Ré et al., 2005).

3.1.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Bien que l'oxygène soit indispensable à la vie, il peut également exercer des effets néfastes sur l'organisme en raison de la formation de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Haleng et al., 2007).

Le terme ERO désigne l'ensemble des espèces dérivées de l'oxygène, qu'elles soient radicalaires ou non radicalaires, caractérisées par une réactivité énergétique supérieure à celle de l'oxygène moléculaire. Leur formation peut résulter de divers facteurs, notamment des facteurs endogènes tels que les réactions enzymatiques, ainsi que des facteurs exogènes comme les rayonnements ultraviolets et la présence de traces métalliques.

Les ERO ne se limitent pas uniquement aux radicaux libres issus de l'oxygène, parmi lesquels figurent principalement le radical superoxyde ($O^{\cdot-}$) et sa forme protonée ($HO^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), le radical peroxyde ($ROO^{\cdot}$) et le radical alkoxyde ($RO^{\cdot}$). Elles comprennent également des dérivés oxygénés non radicalaires présentant une toxicité

importante, tels que l'oxygène singulet (^1O), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion peroxynitrite (ONOO^-), qui peuvent agir comme précurseurs de radicaux sans être eux-mêmes des radicaux libres (Pincemail et Defraigne, 2003).

3.1.2 Espèces réactives de l'azote (ERN)

➤ Monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote est un radical libre ubiquitaire, de nature gazeuse et caractérisé par une forte capacité de diffusion. Il est produit à partir de la L-arginine sous l'action des NO synthases (NOS), en présence de plusieurs cofacteurs, notamment le NADPH, le FAD, la calmoduline et la tétrahydrobioptérine (BH_4) (Gardès-Albert, 2006).

4 Les cibles biologiques des ERO:

La production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est un processus continu dans l'organisme. Les biomolécules contenant des doubles liaisons sont particulièrement vulnérables à l'action des radicaux libres, ce qui confère à ces espèces une forte réactivité vis-à-vis de l'ADN, des lipides et des protéines (Favier, 2003). Ces trois constituants représentent les principales cibles des ERO, dont l'action peut entraîner des altérations irréversibles telles que l'oxydation de l'ADN, la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines (Mougeolle, 2015).

4.1 Les lipides:

Les acides gras polyinsaturés ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) présentent une grande sensibilité à l'action des ERO. Leur oxydation est connue sous le terme de peroxydation lipidique ou lipoperoxydation (Bensakhria, 2018).

L'attaque des radicaux libres sur les liaisons lipidiques des membranes déclenche une réaction en chaîne de peroxydation, entraînant une désorganisation importante de la structure membranaire (Davies, 2000).

Quelques conséquences de la peroxydation lipidique: Altération du fonctionnement cellulaire.

Modification de la structure des lipoprotéines. Augmentation et propagation des dommages cellulaires.

4.2 Les protéines:

Les acides aminés soufrés et aromatiques constituent des cibles privilégiées des ERO.

Leur forte sensibilité est liée notamment à la présence abondante de groupements sulfhydryles (SH), particulièrement exposés aux attaques oxydatives.

Quelques conséquences:

Diminution ou perte de l'activité enzymatique. Perturbations des processus métaboliques.

Altération de la spécificité des interactions ligand-récepteur.

4.3 L'ADN:

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, représente également une cible majeure des ERO.

Quelques conséquences:

Apparition de cassures chromosomiques. Induction de mutations.

Altération du fonctionnement mitochondrial.

5 Antioxydante:

Selon Halliwell, les antioxydants sont définis comme « toute substance capable, à faible concentration par rapport au substrat oxydable, de retarder ou d'inhiber son oxydation ». Ces composés jouent un rôle essentiel dans la protection des cellules contre les dommages induits par les radicaux libres (Halliwell, 2019).

Certains antioxydants sont produits naturellement par l'organisme, notamment les enzymes antioxydantes, tandis que d'autres, tels que les minéraux, les vitamines et les composés phénoliques, doivent être fournis par l'alimentation.

5.1 Antioxydante de synthèse:

Les principaux antioxydants synthétiques comprennent le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Ces composés se caractérisent par leur grande stabilité dans les conditions de traitement industriel, leur coût relativement faible et leur efficacité élevée comparativement aux antioxydants naturels. D'autres substances, telles que le tertibutylhydroquinone (TBHQ) ainsi que les gallates de propyle, d'octyle et de dodécyle, font également partie des antioxydants

synthétiques (Karray, 2013).

Cependant, l'utilisation de ces antioxydants est aujourd'hui remise en question. Plusieurs études ont mis en évidence leurs potentiels effets toxicologiques et leur risque cancérigène à fortes doses, ce qui a conduit à une diminution progressive de leur utilisation (Karray, 2013).

5.2 Antioxydants naturels:

L'organisme dispose de mécanismes de défense très performants contre le stress oxydatif. Ces systèmes se répartissent en deux grandes catégories : les antioxydants enzymatiques, comprenant principalement les superoxydes dismutases, la catalase et les glutathion peroxydases, et les antioxydants non enzymatiques, tels que la vitamine E, la vitamine C, entre autres

6 Antioxydants endogènes:

6.1 Antioxydants enzymatique :

➤ Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD) a été isolée pour la première fois par Mann et Keilin en 1938. Cette enzyme, également connue comme une protéine contenant du cuivre, a été identifiée sous différentes appellations telles que l'érythrocuprine, l'indophénol oxydase et la tétrazolium oxydase. Elle agit comme un catalyseur de la dismutation des anions superoxydes, conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'oxygène moléculaire (O_2) (Leroy, 2016).

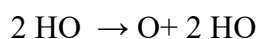
Cette enzyme est naturellement présente dans l'organisme, mais son activité dépend de la disponibilité de certains cofacteurs minéraux, notamment le manganèse (Mn), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu). L'activité de la SOD joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défense cellulaire, en particulier dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène responsables du stress oxydatif.

Selon la nature du métal cofacteur présent au niveau du site actif, la SOD est classée en trois types principaux: Fe-SOD, Cu/Zn-SOD et Mn-SOD (Zulaikhah, 2017).

➤ La catalase (CAT)

La catalase est une enzyme intracellulaire localisée principalement dans les hématies et les peroxysomes du foie. Elle intervient dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène, sans toutefois assurer son élimination complète.

Réaction catalysée par la CAT :



Néanmoins, les catalases présentent une efficacité inférieure à celle des glutathion peroxydases (Goudable, 1997).

➤ Les glutathion peroxydases (GPX):

Les glutathion peroxydases sont des sélénoprotéines capables de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que des hydroperoxydes lipidiques. Cette réaction s'effectue grâce à l'oxydation du glutathion réduit (GSH), qui agit comme cofacteur en facilitant le transfert d'oxygène.

Le stress oxydatif peut également entraîner une altération de la synthèse des glutathion peroxydases ou provoquer une inactivation de ces enzymes, selon sa nature et son intensité (Goudable, 1997).

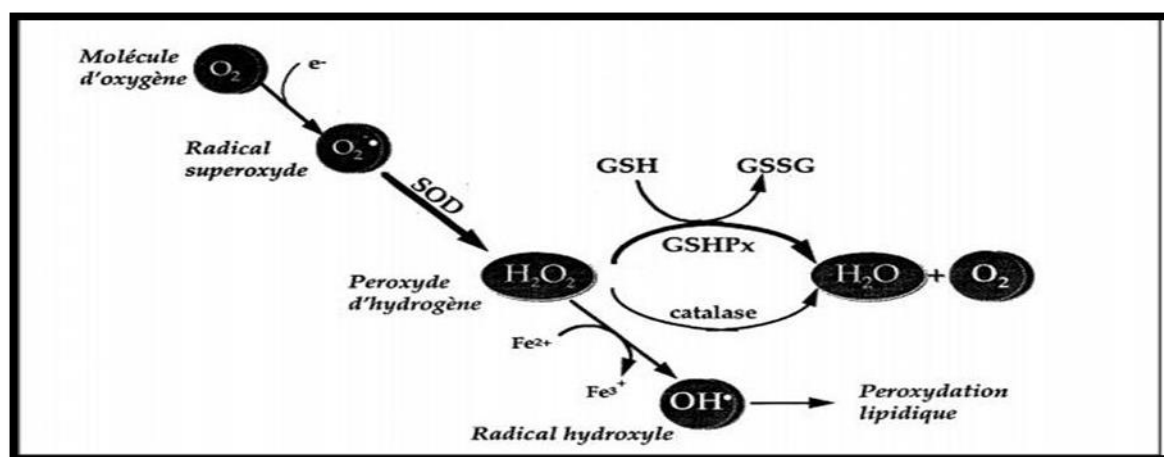


Figure 2 : Principaux étapes de production des espèces réactives de l'oxygène (Goudable, 1997)
GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; GSHPX : glutathion peroxydases

➤ Thiorédoxine:

Le système thiorédoxine (Trx) constitue l'un des principaux systèmes antioxydants des cellules de mammifères, assurant le maintien d'un environnement intracellulaire réducteur grâce au transfert d'électrons provenant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH).

La thiorédoxine est une enzyme oxydoréductase d'environ 12 kDa possédant un site actif de type dithiol-disulfure. La cascade redox du système Trx est initiée par le $\text{NADPH} + \text{H}^+$,

produit notamment par la voie des pentoses phosphates. Ce dernier réduit la thiorédoxine réductase oxydée (TrxR), permettant ainsi la régénération de la thiorédoxine sous sa forme réduite. La thiorédoxine réduite contribue ensuite au maintien de l'état réducteur de nombreuses protéines cellulaires (Eddaikra and Eddaikra, 2020).

6.2 Antioxydants exogènes:

6.2.1 Antioxydants non enzymatiques:

➤ La vitamine E :

La vitamine E, ou α -tocophérol, représente le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Sa structure moléculaire se caractérise par la présence d'un noyau chromanol constituant la partie hydrophile et d'une chaîne phytyle correspondant à la partie hydrophobe (figure 15).

La vitamine E joue un rôle essentiel dans la réduction de la peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires ainsi que des lipoprotéines de basse densité (LDL). Lors d'une attaque radicalaire induisant une peroxydation lipidique, l' α -tocophérol agit en cédant un atome d'hydrogène issu de son noyau phénolique, ce qui permet de neutraliser le radical peroxyde (RO•) (Bourguerne, 2012 ; Do et al., 2015).

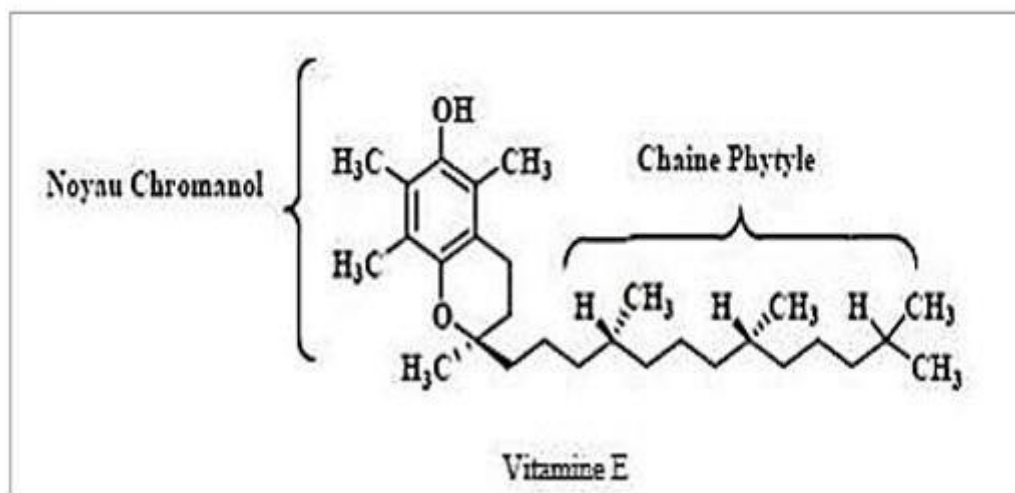


Figure 3 : Structure de la vitamine E (López et al. 2005)

➤ La vitamine C:

La vitamine C correspond chimiquement à l'acide ascorbique et à sa forme ionisée, l'ascorbate. Il s'agit d'une vitamine hydrosoluble qui agit principalement comme un piègeur direct des espèces réactives de l'oxygène, notamment l'anion superoxyde (O₂⁻).

L'acide ascorbique joue également un rôle essentiel en tant que cofacteur enzymatique,

intervenant comme agent réducteur dans plusieurs réactions biologiques (Chen et al., 2015).

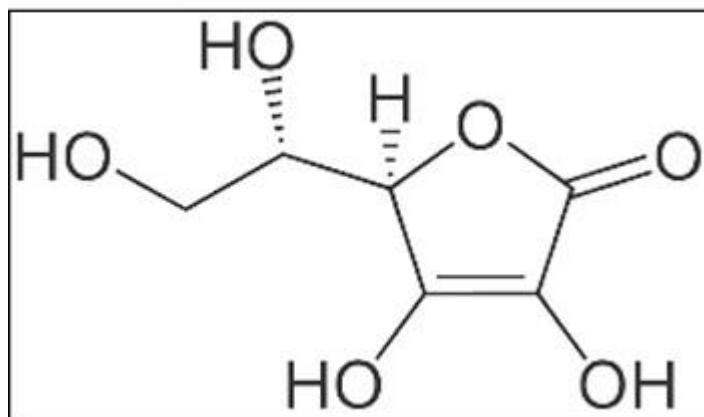


Figure 4 : Structure de la vitamine C

➤ Polyphénols:

Les polyphénols représentent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation apporte environ 1 g de polyphénols par jour, principalement à travers la consommation de fruits, et dans une moindre mesure, de légumes et de céréales.

Ils se présentent sous différentes formes : les anthocyanines dans les fruits rouges et le vin rouge, les flavonoïdes dans les agrumes et l'huile de lin, et l'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons ainsi que certaines algues brunes.

Ces composés sont de puissants piègeurs d'espèces oxygénées actives (EOA) et exercent également une excellente activité de chélation des métaux de transition tels que le fer et le cuivre (Haleng et al., 2007).

➤ Le β -carotène:

Le β -carotène est un précurseur de la vitamine A et est fourni par l'alimentation. Sa structure moléculaire est composée d'une chaîne de huit unités isopréniques et comporte onze doubles liaisons conjuguées (figure 17). Cette configuration lui permet de piéger efficacement l'oxygène singulet, même à faible pression d'oxygène (Goudable, 1997).

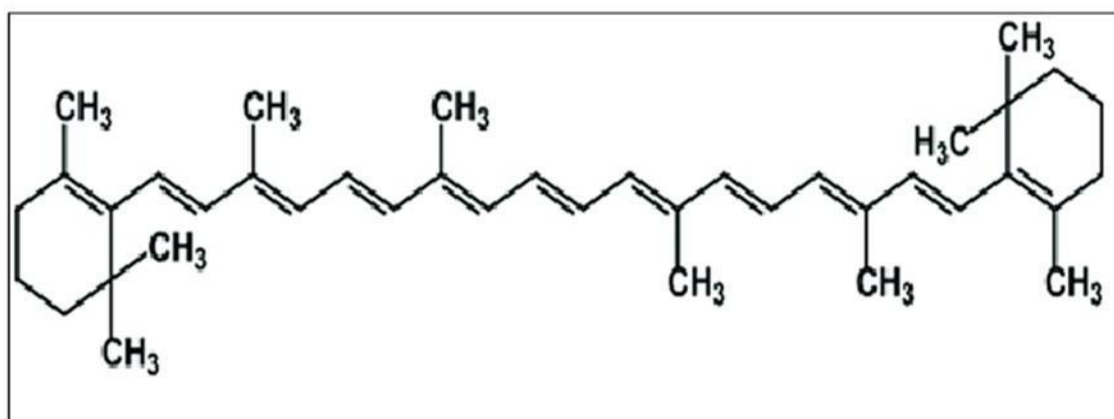


Figure 5 : Structure chimique de la beta carotène.

➤ Oligoéléments:

Les oligoéléments, tels que le zinc, le magnésium ou le sélénium, existent sous diverses formes dans la nature et sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Ils jouent un rôle fondamental dans les fonctions cellulaires à différents niveaux : biologique, chimique et moléculaire.

Ces éléments interviennent dans de nombreuses réactions biochimiques vitales, en agissant notamment comme cofacteurs pour plusieurs enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les glutathion peroxydases (GPX). Ils contribuent également à la stabilisation de la structure des enzymes et des protéines (Prashanth, 2015).

Bien qu'ils soient présents en quantités très faibles dans l'organisme, les oligoéléments sont indispensables à son bon fonctionnement. Certains participent directement aux réactions enzymatiques, d'autres modulent l'action hormonale ou renforcent les défenses de l'organisme contre le stress oxydatif (Balleydier, 2019).

• Sélénium:

Le sélénium exerce un effet protecteur sur les cellules et leurs constituants face aux agressions oxydatives. Cette action est liée à sa présence dans le site actif des glutathion peroxydases sélénodépendantes ainsi qu'à l'activité antiradicalaire des sélénoprotéines. Il contribue ainsi au maintien du pool intracellulaire de glutathion réduit au niveau des lymphocytes, assurant notamment la protection des membranes cellulaires.

Par ailleurs, le sélénium remplit d'autres fonctions essentielles, notamment la détoxification des métaux lourds tels que le cadmium, le mercure et le plomb, qui s'accumulent dans les tissus avec l'âge. Il participe également à l'activation du métabolisme des xénobiotiques organiques (Roussel et Ferry, 2002).

- **Zinc:**

À l'instar du sélénium, le zinc contribue à la protection des membranes cellulaires, notamment en préservant les groupements thiols des protéines. Il participe également à l'inhibition des réactions de formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) induites par certains métaux de transition tels que le fer et le cuivre.

Par ailleurs, le zinc joue un rôle essentiel en tant que cofacteur de la superoxyde dismutase (SOD). Il intervient ainsi dans diverses fonctions biologiques importantes, notamment le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines et le fonctionnement de l'anhydrase carbonique (Haleng et al., 2007).

- **Cuivre:**

À des concentrations physiologiques, le cuivre agit comme cofacteur de nombreuses enzymes, notamment la superoxyde dismutase (SOD), la cytochrome c oxydase et la dopamine β -hydroxylase. Toutefois, en raison de sa nature de métal de transition, il peut également favoriser la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le biais des réactions de Fenton. Ainsi, à des concentrations élevées, le cuivre peut exercer un effet pro-oxydant (Haleng et al., 2007).

- **Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* :**

Il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer l'activité antioxydante. Parmi les plus couramment utilisées, on peut citer :

La méthode FRAP, qui mesure le pouvoir réducteur du fer ; la méthode basée sur le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ; la méthode ABTS (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)), également appelée TEAC (capacité antioxydante équivalente au Trolox) ; la méthode du blanchiment du β -carotène ; la méthode TRAP (Total Radical Trapping Parameter) ; la méthode TOSC (Total Oxy-Radical Scavenging Capacity) ; la méthode DMPD, basée sur le piégeage du radical cation N,N-diméthyl-p-phénylènediamine

Chapitre II : *l'alpha amylase*

1 Définition:

L' α -amylase est l'enzyme prédominante participant à la décomposition de l'amidon. D'après la commission des enzymes (EC), l'alpha-amylase est une enzyme omniprésente, produite dans les divers genres de vie (Janecek 1994, 1997). L' α -amylase appartient à la troisième classe, qui concerne les hydrolases [α -(1,4)]. L'hydrolase du D-glucane (E.C.3.2.1.1) Elle dégrade les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène ainsi que d'autres polysaccharides comportant plus de trois liaisons α (1,4) D-Glucose (Keating et al, 1998 ; Dauter et al, 1999 ; Franco et al, 2000). Effectivement, s'attaque aux chaînes de l'amylose en rompant les liaisons α (1,4) tous les six glucoses, produisant du maltose et principalement des dextrines α (Franco et al, 2000).

2 Structure de l'alpha amylase:

L' α -amylase hydrolyse l'amidon via des liaisons glycosidiques internes α -1,4 et produit du maltotriose et du maltose (à partir de l'amylose) ou du glucose, du maltose et des dextrines limites (à partir de l'amylopectine). Le poids moléculaire de la plupart des alpha-amylases est d'environ 45–60 kDa.

Les alpha-amylases appartiennent principalement à la famille GH13 ; l'enzyme est également classée dans les familles GH57, GH119 et GH126. Les alpha-amylases de la famille GH13 possèdent une machinerie catalytique, un mécanisme de réaction avec rétention, 4 à 7 régions de séquences conservées (CSRs), et un domaine catalytique de type tonneau (β/α)₈. Les alpha-amylases classées dans la famille GH57, ainsi que GH13, utilisent le même mécanisme de rétention. De plus, elles possèdent une machinerie catalytique spécifique, cinq CSRs, et un repliement en tonneau (β/α)₇.

Les alpha-amylases GH13 possèdent généralement trois domaines : le domaine A (qui contient le domaine catalytique (β/α)₈), le domaine B situé entre le brin β 3 et l'hélice α 3 du domaine (β/α)₈, et le domaine C qui a une structure en feuillet β attachée au domaine B via une boucle simple. Le site actif de l' α -amylase est situé dans une fente entre les domaines A et B, et il est constitué de trois résidus d'acides aminés : un glutamate (Glu) et deux résidus aspartate (Asp).

Dans l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (TAA), Glu230 agit comme catalyseur acide/base général, en donnant un proton au groupe oxygène glycosidique partant et en fournissant une espèce nucléophile pour la rupture de la liaison glycosidique. Asp206 (comme nucléophile

catalytique) et Asp297 participent respectivement à la formation d'un intermédiaire covalent et à la stabilisation de l'état de transition. La figure montre la structure 3D de l'alpha-amylase d'*A. oryzae* (code PDB : 2TAA) (Mafakher, et al.)

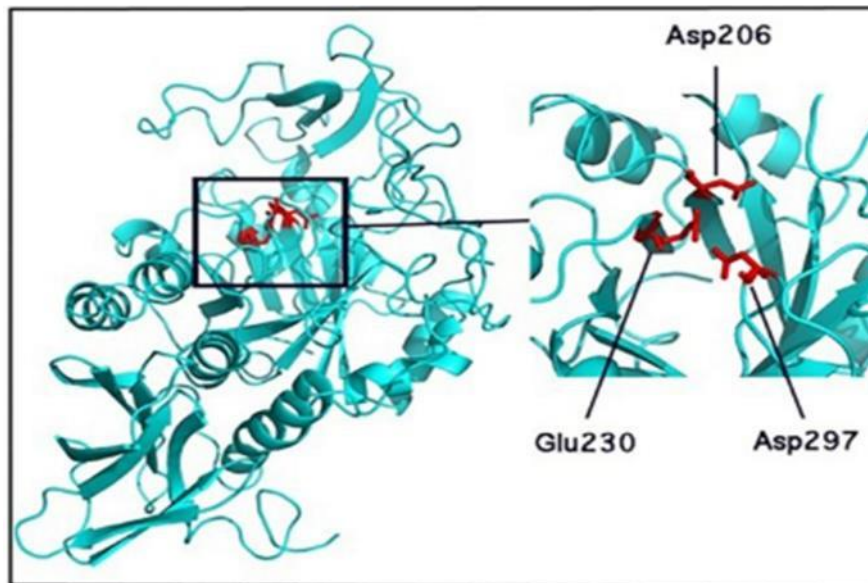


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'alpha-amylase provenant de *A. oryzae* (TAA).

Le site actif est représenté en rouge et comprend les résidus Asp206, Glu230 et Asp297. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont indiquées respectivement en bleu et en rouge

3 Mécanisme d'action:

Trois acides aminés du site participent à l'activité catalytique de l'enzyme, Asp 231 (catalyseur nucléophile), Glu 261 (source catalytique de l'hydrogène) et Asp 328 (le soutien de catalyse) (Mc Carther et Withers, 1996; Uitdehaag et al., 1999).

La réaction catalytique se déroule en trois phases (Figure 6):

- La première étape est la protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de protons Glu 261 suivie d'une L'interaction nucléophile sur le C1 du résidu de sucre en position 1 par Asp 231 et la dissociation de la partie réductrice du substrat.
- Activation d'une molécule d'eau, probablement grâce à la conservation du Glu 261.

- Rétablissement de l'état initial et libération de l'autre portion du substrat par hydrolyse du Bond covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 231 et le C1 du sucre en position 1 (Davies et al., 1999; Nielson et al., 2001).

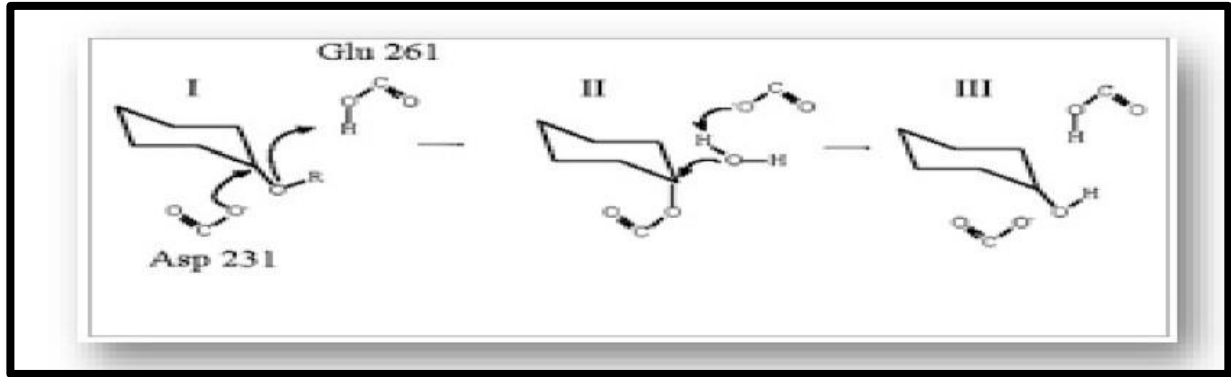


Figure 7 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (Nielsen et al., 2001)

4 Nomenclature de l'alpha amylase:

Le nom systématique est (1→4)- α -D-glucane glucanohydrolase.

Le code enzymatique est EC 3.2.1.1.

Le terme « alpha-amylase »

Le nom recommandé.

Les synonymes incluent la glycogénase, l'endoamylase, le maxilase, la taka-amylase A, le takatherm, la thermolase, l'amylotherm, la clarase, l'amylopsine, la spitase, CP1, G995, keistase L1. THC 250. maxamv et la ptvaline (Graber. 1989).

5 Les activateurs de l'alpha amylase:

Puisque cette enzyme est cruciale pour la régulation du taux de sucre dans le sang, plusieurs recherches ont été menées sur les composés qui affectent son fonctionnement. Cette enzyme est bien connue pour être activée allostériquement par les ions chlorure (Cl⁻). D'autres anions ont également un impact sur l'enzyme humaine du pancréas. Pour illustration, le nitrate (NO₃), le chlorate (ClO₃) et le formate (HCOO) sont des activateurs de l'enzyme, de la même manière que le chlorure, où des ions acides se sont révélés être des amplificateurs de l'effet auparavant restreint du chlorure (Kashani-Amin et al., 2013).

6 Mode d'action:

➤ Poids moléculaire:

La masse moléculaire des α -amylases varie selon l'origine de l'enzyme (microbienne, végétale ou animale) ainsi que selon l'espèce productrice. Cette variabilité est principalement liée aux différences de séquence en acides aminés, aux modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, ainsi qu'à la structure tridimensionnelle de l'enzyme. En général, la masse moléculaire des α -amylases est comprise entre 40 000 et 90 000 Da (Schomburg et al., 1991). Chez les levures, elle varie généralement de 40 000 à 70 000 Da (Panchal, 1990). Ces différences structurales peuvent influencer la stabilité, les propriétés catalytiques et les applications industrielles de l'enzyme.

➤ Température optimum:

En fonction de leur origine et fongique des espèces, les α -amylases présentent des températures idéales variant de 40°C à 90°C (Schamburg, 1991). Effectivement, l'alpha amylase bactérienne est connue pour sa forte thermo-stabilité, avec celle de *Bacillus amyloliquefaciens* ayant un optimum de température qui, en fonction des applications, varie entre 70°C et 90°C.) En revanche, l'alpha-amylase fongique possède une thermostabilité relativement faible, son optimum se retrouvant généralement entre 50°C et 60°C (Sicard P., 1982). L'alpha amylase levurienne possède des points optimaux de température, variant de 40°C à 60°C et dans certains cas, atteignant même 70°C pour certaines espèces telles que *Lipomyces starkeyi* (Panchal, 1990).

➤ pH optimal:

L' α -amylase réagit de manière très sensible au pH. Ainsi, la sélection du pH idéal est cruciale pour son activité catalytique de cette enzyme. D'après Kindle (1983), une activité optimale pourrait être atteinte à des pH variant entre 4 et 8. Selon (Larpent G). et ses collaborateurs (1992), les α -amylases bactériennes fonctionnent de manière optimale à un pH supérieur à la neutralité, tandis que les α -amylases fongiques se distinguent par une plage de pH optimum allant de 4 à

5. Selon les espèces de levures, l'enzyme nécessite un pH variant de 4 à 6 (Panchal, 1990).

7 Différentes origines:

Les α -amylases, qui sont présentes en quantité dans tous les règnes, ont été extraites des tissus végétaux et animaux ou obtenues par fermentation de cellules microbiennes (Haq et al., 2003 ; Srinivasa Rao et al., 2004).

7.1 Origine animale:

les amylases animaux sont généralement extraites de la salive et du pancréas des mammifères (French D. et al., 1975). Dans leur fonctionnement, les -amylases animales ne parviennent pas à hydrolyser le lien (1 $\rightarrow$ 6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides. En décomposant complètement l'amylose et l'amylopectine, les -amylases animales produisent du maltose et du D-glucose à partir de l'amylose, tandis que l'amylopectine se dégrade en glucose, maltose et dextrines à un stade avancé (Coolbear et al., 1992). Toutefois, l'approvisionnement en matière première pose un défi. (organe difficile à recueillir) et le coût de son extraction (Bertheau et al., 1985). Chez l'être humain, l'amylase est abondamment présente dans les sécrétions de la salive (amylase S) et du pancréas (amylase P). Les gènes qui codent les amylases S et P chez l'homme, à savoir Amy 1 et Amy 2A, se trouvent sur le chromosome 1 (Nishide et al., 1986 ; Horii et al., 1987 ; Tricoli et Shows, 1984). Selon Sakai et al. (2004), l'amylase chez les insectes est produite dans le tube digestif moyen. Selon Dall et Moriarty (1983), ainsi que Gibson et Barker (1979), c'est dans l'hépatopancréas que les crustacés synthétisent l'amylase.

7.2 Origine végétale:

Les α -amylases végétales jouent un rôle crucial dans le métabolisme des glucides, contribuant à la transformation de l'amidon en sucres réducteurs qui fournissent l'énergie indispensable à la germination. En général, elles ne sont pas en mesure d'hydrolyser le maltose (Octávio et al., 2000). Ces enzymes végétales sont produites par un processus cellulaire complexe durant la germination des graines, qui nécessite une activité enzymatique significative pour la mobilisation des réserves et la croissance de l'embryon (Bradford, 1995).

7.3 Origine microbienne:

Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Aspergillus oryzae et Rhizopus sp. (Mafakher et al., 2023)

Chapitre III:
Généralité sur
les bases de
Schiff

1 Généralité:

Les bases de Schiff constituent un groupe diversifié de composés organiques présentant une grande importance pharmaceutique en raison de la présence de doubles liaisons carbone-azote (C=N). Ces composés sont synthétisés par une réaction de condensation entre une amine primaire et un aldéhyde ou une cétone dans un solvant approprié tel que le méthanol. Les bases de Schiff ont montré diverses activités biologiques, notamment des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, anti-inflammatoires et antioxydantes, ce qui a suscité un intérêt croissant pour leur synthèse et leurs applications thérapeutiques. La découverte des bases de Schiff remonte au XIX^e siècle, lorsque le chimiste Hugo Schiff a décrit pour la première fois, en 1864, leur synthèse par une réaction de condensation entre une amine primaire et des composés carbonyles. Il a ainsi mis en évidence une réaction impliquant la condensation entre des amines et des groupes fonctionnels carbonyles. (Mushtaq et al., 2024).

2 Définition:

Les bases de Schiff sont des composés organiques caractérisés par la présence d'une fonction imine ou a z o m é t h i n e (>C=N-), résultant généralement de la condensation d'une amine primaire avec un composé carbonyle tel qu'un aldéhyde ou une cétone. Ces composés constituent une classe importante en chimie organique et en chimie de coordination en raison de leur facilité de synthèse, de leur stabilité structurale et de leur capacité à former des complexes avec de nombreux ions métalliques. Certaines molécules apparentées, telles que les hydrazones et les dérivés hydrazidiques, sont également considérées comme des bases de Schiff lorsqu'elles possèdent un groupement imine ou une structure tautomère équivalente (Raczuk et al., 2024).

3 Structure générale d'une base de Schiff :

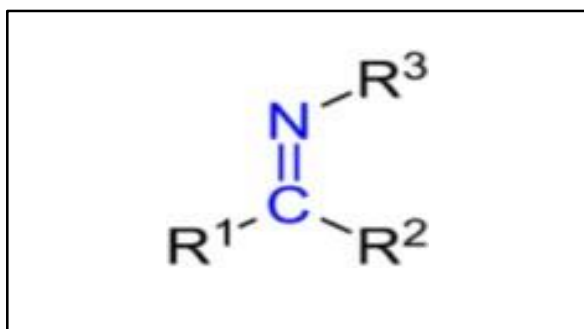


Figure 8 : Structure générale d'une base de Schiff

4 Mécanisme réactionnelle:

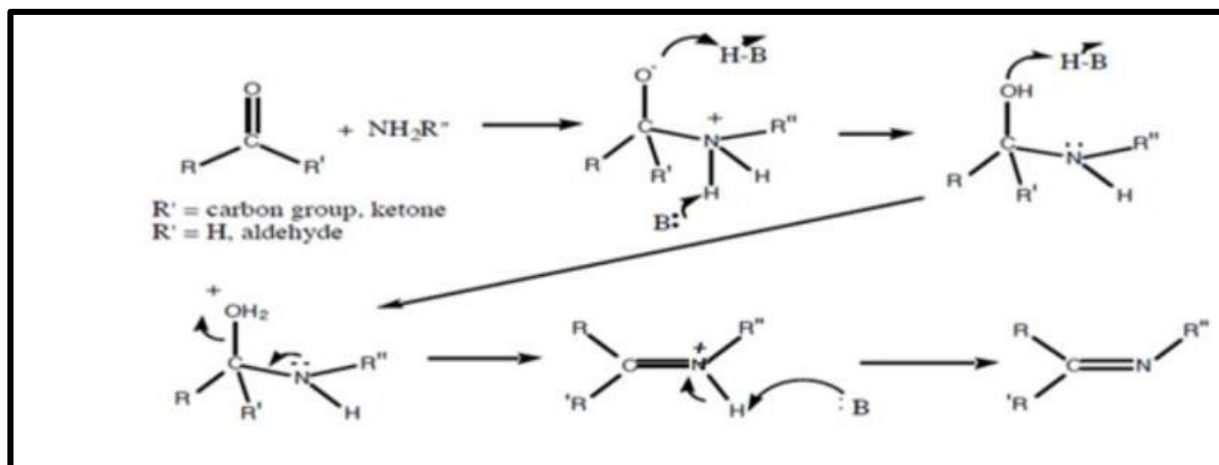


Figure 9 : Mécanisme d'obtention d'une base de Schiff

La synthèse des bases de Schiff est fréquemment marquée par la présence de molécules d'eau pouvant mener à une réaction réversible par hydrolyse. Cette réaction se déroule généralement dans un environnement alcoolisé ou parfois à ébullition.

5 Classification et des bases de Schiff :

les sulfonylhydrazones constituent une classe les hydrazones et les hydrazides, en plus du crarbonyle. Toutefois, le groupe sulfonyle ne substitue pas le lien azote-carbone caractéristique des hydrazones, mais est lié au groupe amino, qui occupe une position terminle dans les hydrazones traditionnelles

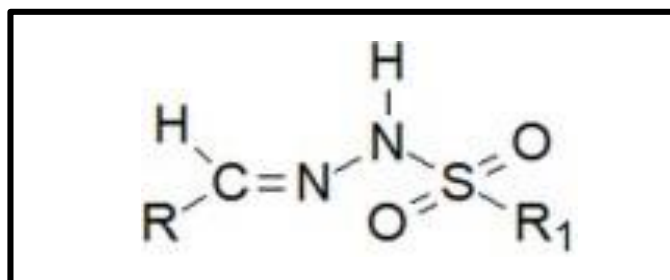


Figure 10 : Structure générale de la sulfonylhydrazone, où R et R^1 représentent des groupes alkyles ou ayles

L'acide sulfonique est produit par l'oxydation du thiol, qui peut ensuite, lorsqu'il est traité avec des agents de chloration (SOCl_2 , POCl_3 , PCl_5 et chlorure d'acide cyanurique), être transféré en chlorure d'acide sulfonique. Ce dernier peut ensuite réagir avec l'hydrazine et soit un aldéhyde, soit une cétone pour former une sulfonylhydrazone. La 4-toluènesulfonylhydrazone est un exemple spécifique de sulfonylhydrazone, qui se forme par la réaction d'un aldéhyde ou d'une cétone avec la tosylhydrazide. Cette dernière est le résultat de la réaction entre le chlorure de tosyle et l'hydrazine (Raczuk et al., 2024). La formation des sulfonylhydrazones repose sur une réaction de condensation entre une sulfonylhydrazide et un composé carbonyle (aldéhyde ou cétone). La présence du groupement sulfonyle augmente la stabilité de la molécule et peut modifier ses propriétés physicochimiques et biologiques, ce qui explique l'intérêt des sulfonylhydrazones en synthèse organique et en chimie médicinale.

6 Propriété des bases de Schiff :

6.1 Caractéristiques de complexation (composés métalliques) :

Les complexes stables avec des ions métalliques de transition tels que Hg(II) , Cu(II) , Co(II) , Ni(II) , Zn(II) , Ag(I) , Al(III) , etc. peuvent être formés facilement grâce aux Schiff. Cette caractéristique est attribuée à la présence d'atomes donneurs tels que l'azote et l'oxygène qui ont la capacité de se rattacher aux centres métalliques par coordination.

6.2 Caractéristiques catalytiques:

Les bases de Schiff, ayant des propriétés catalytiques significatives, sont mises à profit dans diverses réactions chimiques, y compris l'hydrogénation des oléfines. Elles ont aussi une participation dans les processus catalytiques biomimétiques.

6.3 Propriétés inhibitrices de corrosion:

Les bases de Schiff sont connues comme de très bons inhibiteurs de corrosion. Elles forment spontanément une monocouche protectrice sur la surface métallique, empêchant ainsi sa dégradation. Cette efficacité est attribuée à la présence du groupement imine (C=N) et à leur capacité d'adsorption sur les surfaces métalliques.

6.4 Modalité d'adsorption et interaction avec les métaux:

La chimisorption est le mode principal d'interaction. Les molécules inhibitrices établissent une interaction avec la surface métallique par le biais d'un transfert électronique. Le métal agit en tant qu'électrophile et la base de Schiff assume le rôle d'une base de Lewis. Les doublets non liants des atomes d'azote et d'oxygène favorisent l'établissement de liaisons solides. (Mushta et al., 2024).

7 Effet biologique des bases de Schiff :

Le cancer est une pathologie sérieuse et pouvant être fatale, marquée par la multiplication et la dissémination sans contrôle de cellules anormales aptes à envahir et anéantir les tissus sains. Ces cellules constituent une accumulation nommée tumeur, qui peut être bénigne ou maligne. Les tumeurs bénignes, qui ne représentent souvent pas un danger, demeurent confinées et sont habituellement réductibles par voie chirurgicale sans apparition de récurrence. En revanche, les tumeurs malignes, qui sont cancéreuses, ont un caractère invasif et peuvent se propager à d'autres régions du corps via le système sanguin ou lymphatique. L'expansion débridée des cellules cancéreuses déstabilise les mécanismes normaux de l'organisme et compromet le système immunitaire.

Bien que la chimiothérapie, l'hormonothérapie et l'immunothérapie aient progressé, ces thérapies provoquent fréquemment des effets indésirables importants. Ainsi, l'élaboration d'approches plus sûres et efficaces, par exemple la médecine personnalisée, attire de plus en plus l'attention.

Au cours des dernières années, les complexes métalliques et les fondements Schiff ont suscité un intérêt notable grâce à leurs propriétés anticancéreuses encourageantes. Les Schiff bases, caractéristiques d'une condensation entre des amines primaires et des composés carbonylés, intègrent un groupe azométhine ($C=N$) qui contribue significativement à leur action biologique. Décrits initialement par Hugo Schiff en 1864, ces composés sont appréciés comme des ligands de choix dans la chimie de coordination. Ils démontrent une diversité d'activités biologiques, en particulier dans les domaines anticancéreux, antibactériens, antifongiques et anti-inflammatoires (Matela, 2020).

8 Activité cytotoxique des complexes de bases de Schiff :

Plusieurs recherches *in vitro* ont démontré que les complexes métalliques issus des bases de

Schiff présentent une remarquable toxicité cellulaire sur diverses lignées cellulaires. On évalue généralement la toxicité cellulaire à l'aide de tests biologiques tels que le test MTT, en utilisant la valeur EC_{50} mesure de l'efficacité des composés. Les résultats montrent que la nature du ligand, le métal central et la concentration utilisée ont un fort impact sur la cytotoxicité.

Dans quelques situations, l'association avec des ions métalliques comme le zinc ou le cuivre peut renforcer l'activité des composés, tout en altérant leur profil toxique. Donc, l'évaluation de la cytotoxicité représente une étape cruciale pour établir un équilibre entre l'efficacité du traitement et la sécurité des composés (Kumar et al., 2023).

9 Complexe métallique de base de Schiff :

En chimie de coordination, les bases de Schiff sont fréquemment employées en tant que ligands. Ces dernières jouent le rôle de fournisseurs d'électrons à l'élément central et créent des complexes lorsqu'elles sont en association avec différents métaux de transition. Dans la base de Schiff, le groupe azométhine, qui renferme un atome d'azote attaché par une liaison double, représente le site de liaison dominant. Il possède des rôles à la fois de σ -donneur et de π -accepteur, conférant ainsi une stabilité aux complexes métalliques qui se forment (Tebani & Bouchahed, 2024).

9.1 Formation de complexes durables:

Pour qu'un complexe soit stable en tant que ligand, il est nécessaire qu'un groupe fonctionnel similaire au groupe azométhine soit présent, favorisant de ce fait le retrait aisé de l'atome d'hydrogène. Des complexes stables sont formés lorsqu'ils sont associés à des ligands contenant des groupes comme OH et SH, situés près de la liaison azométhine.

- Les caractéristiques des complexes sont influencées par les ligands et les ions métalliques employés.

Dans la structure des ligands, les substituants peuvent altérer leur basicité, ce qui peut, à son tour, affecter la stabilité des complexes métalliques (Tebani & Bouchahed, 2024).

9.2 Techniques de préparation des complexes métalliques :

Trois techniques principales sont employées pour la synthèse des complexes métalliques à base de Schiff, à savoir :

- Interaction directe du sel métallique avec la base de Schiff.
- Condensat d'un aldéhyde, d'une amine et d'un sel métallique.
- Concaténation de complexes d'aldéhydes et d'amines (Tebani & Bouchahed, 2024).

10 Utilisation des bases de schiff et leurs complexes métalliques :

Les complexes métalliques et les fondamentaux de Schiff offrent une variété d'applications dans le secteur de la chimie pharmaceutique et médicinale. La présence de sites donneurs d'électrons permet à ces composés de les interagir aisément avec diverses biomolécules, ce qui rend compte de la variété considérable de leurs activités biologiques. Ils sont couramment employés en tant qu'agents antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires et analgésiques. En outre, leur association avec des ions métalliques comme le cuivre, le zinc, le cobalt ou le nickel contribue à optimiser leurs caractéristiques biologiques et leur efficacité thérapeutique. On étudie également ces complexes pour leur éventuelle contribution au développement de nouveaux agents de chimiothérapie et leur utilisation en chimie bio-inorganique (Chaudhary et al., 2021)

Partie *Expérimentale*

Matériel
et
Méthodes

1 Objectif :

Les composés étudiés dans ce travail sont des bases de Schiff, un ligand et ses complexes métalliques du zinc et du cuivre. Les bases de Schiff sont des molécules organiques caractérisées par la présence du groupement imine ($C=N$), capables de former des complexes stables avec différents ions métalliques de transition. Dans cette étude, le ligand de base de Schiff et ses complexes de Zn(II) et Cu(II) ont été synthétisés par Pr CHIBOUB FELLAH FZ, et utilisés pour évaluer leur activité inhibitrice de l' α -amylase et leur activité antioxydante par la méthode de FRP (Ferric Reducing Power). Ces composés sont préparés sous forme solide puis dissous dans avant leur utilisation dans les tests biologiques.

2 Evaluation de l'effet des extraits sur l'activité de l'alpha amylase:

➤ Préparation du réactif DNSA:

Le réactif DNSA a été préparé en dissolvant 1 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique dans 40 ml d'eau distillée sous agitation pendant 10 minutes. Ensuite, 30 g de tartrate double de sodium et de potassium ont été ajoutés au mélange sous agitation continue durant 10 minutes supplémentaires. Après dissolution complète, 20 ml de solution de NaOH 2N ont été incorporés progressivement, provoquant un changement de couleur vers l'orange. Le volume final a été ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu a été conservé à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

➤ Préparation de la solution enzymatique :

La solution enzymatique d' α -amylase a été préparée en dissolvant 1,4 mg d'enzyme dans 10 ml de solution tampon phosphate (pH 6, 0,02 M) appropriée afin d'obtenir une solution homogène.

➤ Préparation de la solution d'amidon :

La solution de substrat a été préparée en dissolvant 0,035 g de NaCl dans 100 mL de solution tampon phosphate. Ensuite, 0,5 g d'amidon soluble ont été ajoutés au mélange sous agitation jusqu'à dissolution complète.

3 Solutions des composés de synthèse:

Les solutions des composés étudiés ont été préparées en dissolvant 60 mg de chaque composé (ligand, complexe de zinc et complexe de cuivre) dans 2,5 mL d'une solution tampon

phosphate de pH 6. Les solutions obtenues ont été soigneusement homogénéisées avant leur utilisation dans le test d'inhibition de l'activité α -amylase.

➤ Solution de d'acarbose:

L'acarbose est utilisé dans cette expérience comme molécule de référence afin de comparer son activité vis-à-vis de l'alpha amylase par rapport à celle des molécules de synthèse.

La solution d'acarbose a été préparée en dissolvant un comprimé d'acarbose (50 mg) dans 20 mL de solution tampon phosphate (pH 6). La solution obtenue a été homogénéisée avant son utilisation dans le test d'inhibition de l'activité α -amylase.

➤ Mode opératoire:

- ❖ On prépare une gamme de concentration (dilution en cascade) et on teste l'effet de chaque concentration de l'extrait sur l'activité de l'alpha-amylase.
 - Tube blanc (pour le contrôle) : 1ml solution de tampon + 0,5ml d'amidon.
 - Tube blanc (pour l'échantillon testé): 0,5ml solution de tampon+ 0,5ml d'amidon +0,5 ml de solution enzymatique
 - Tube contrôle: 0,5 ml amidon + 0,5 ml tampon + 0,5 ml enzyme
 - Tube d'essai: 0,5 ml d'amidon + 0,5 ml enzyme + 0,5 ml de solution enzymatique
- ❖ On agite les tubes et on incub pendant 15 min à 25°C
- ❖ On ajoute 1 ml de DNSA après l'incubation et on place les tubes dans un bain marie bouillant pendant 8 min à 100°C
- ❖ Afin de stopper la réaction entre maltose et DNSA, on procédé à un choc thermique en déposant les tubes dans un bain d'eau glacée.
- ❖ On mesure les densités optiques au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540nm
- ❖ Le calcul du pourcentage d'inhibition de chaque concentration du ligand, des complexes métalliques ou de l'acarbose par rapport au contrôle (sans inhibiteur) a été effectué selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de l}'\alpha\text{-amylase} = [(A \text{ Contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ Contrôle}] \times 100$$

- A contrôle: Absorbance de contrôle ; A échantillon : Absorbance échantillon

IC50: la concentration inhibant 50% de l'activité enzymatique. Elle est calculée graphiquement

4 Evaluation de l'activité antioxydante:

L'activité antioxydante a été déterminée par la méthode du pouvoir réducteur du fer (FRP: Ferric Reducing Power).

- **Principe:**

La méthode FRP est une technique simple permettant d'évaluer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^3) du complexe ferricyanure de potassium en $\text{KFe}(\text{CN})$ fer ferreux (Fe^2) (Oyaizu, 1986).

- **Solutions préparées:**

Solution tampon phosphate 0,2 M à pH 6,6

Solution de ferricyanure de potassium à 1 % $\text{KFe}(\text{CN})$ d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 %

Solution aqueuse de chlorure ferrique (FeCl_3) à 0,1 %

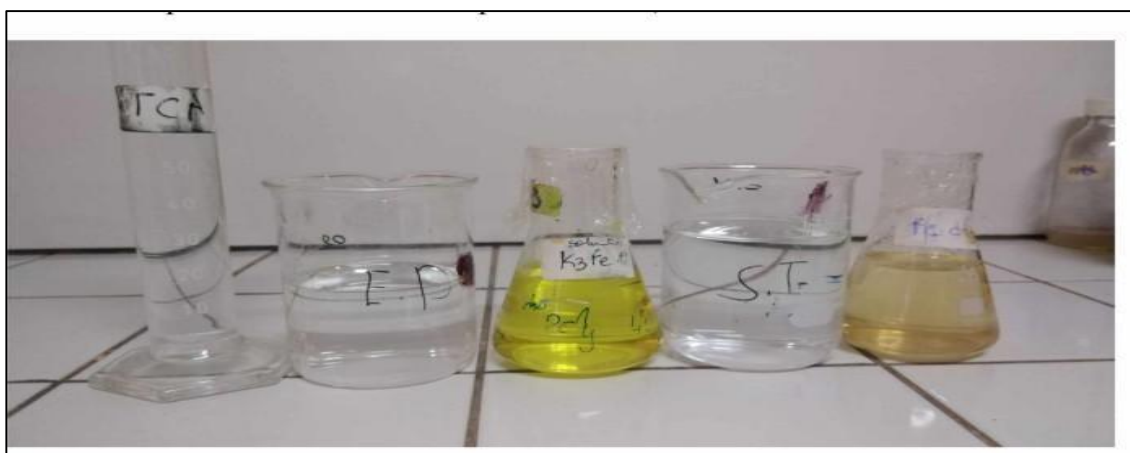


Figure 11: solutions préparées

- **Mode opératoire:**

Un volume de 0,2 ml de l'extrait, préparé à différentes concentrations, est mélangé avec 0,5 ml de solution tampon phosphate (0,2 M; pH = 6,6) et 0,5 ml de ferricyanure de potassium à 1 %. Le mélange est ensuite incubé à 50 °C pendant 20 minutes dans une étuve.

Après incubation, 0,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % est ajouté au mélange réactionnel. Ensuite, 0,5 ml du surnageant est prélevé puis mélangé avec 0,5 ml d'eau distillée et 0,1 ml de solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 0,1 %.

L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.

Matériel et méthodes

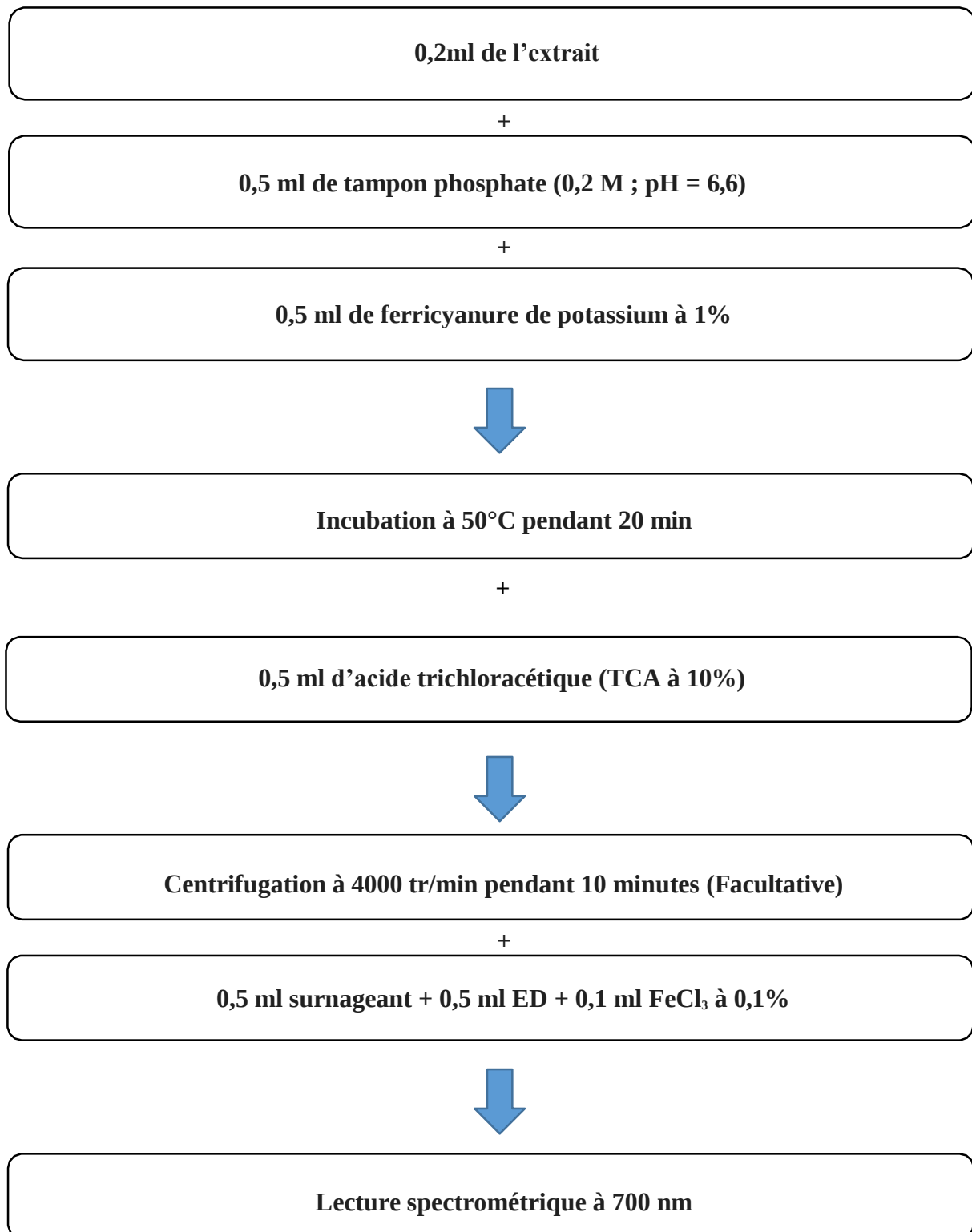


Figure 12 : Protocole d'évaluation du pouvoir réducteur du fer

Résultats et Discussion

1 Évaluation de l'activité antioxydant par la méthode de FRP :

1.1 Effet du ligand:

L'effet du ligand est montré sur la figure 14. Nous observons que les absorbances mesurées varient linéairement et proportionnellement en fonction des différentes concentrations du ligand et nous remarquons qu'à la concentration de 0,66 mg/ml, le ligand est capable de réduire le fer en donnant une absorbance égale à 0,098.

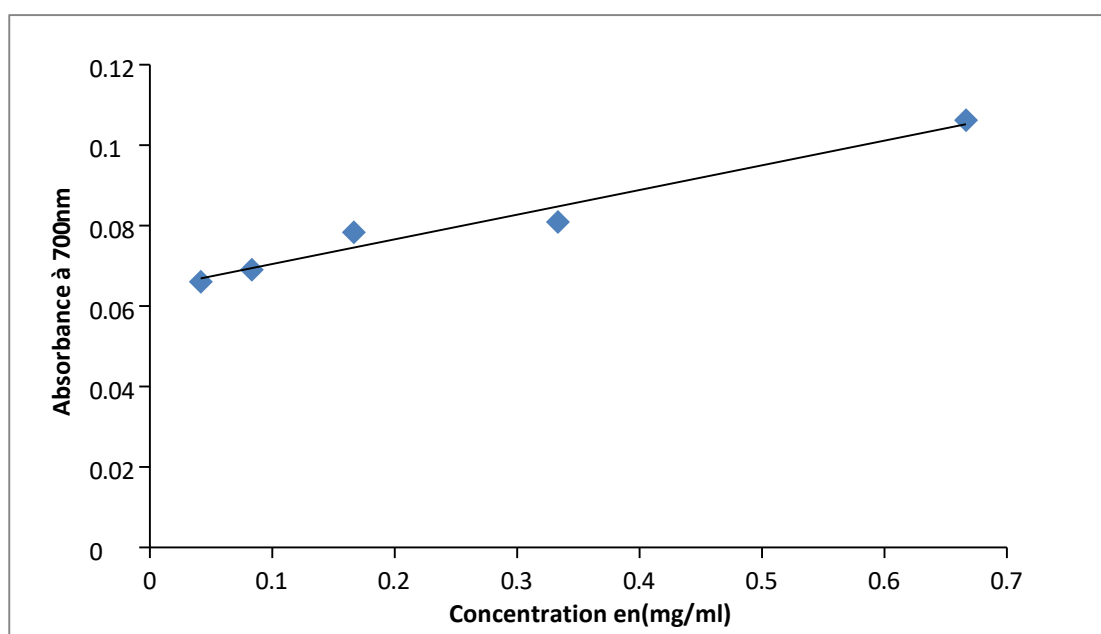


Figure 13 : Représentation graphique du pouvoir réducteur de fer du ligand

1.2 Effet du complexe de zinc:

L'effet du complexe de zinc est montré sur la figure 15. Nous observons que les absorbances mesurées varient linéairement et proportionnellement en fonction des différentes concentrations du complexe de zinc et nous remarquons qu'à la concentration de 0,125 mg/ml, le complexe de zinc est capable de réduire le fer en donnant une absorbance égale à 0,201.

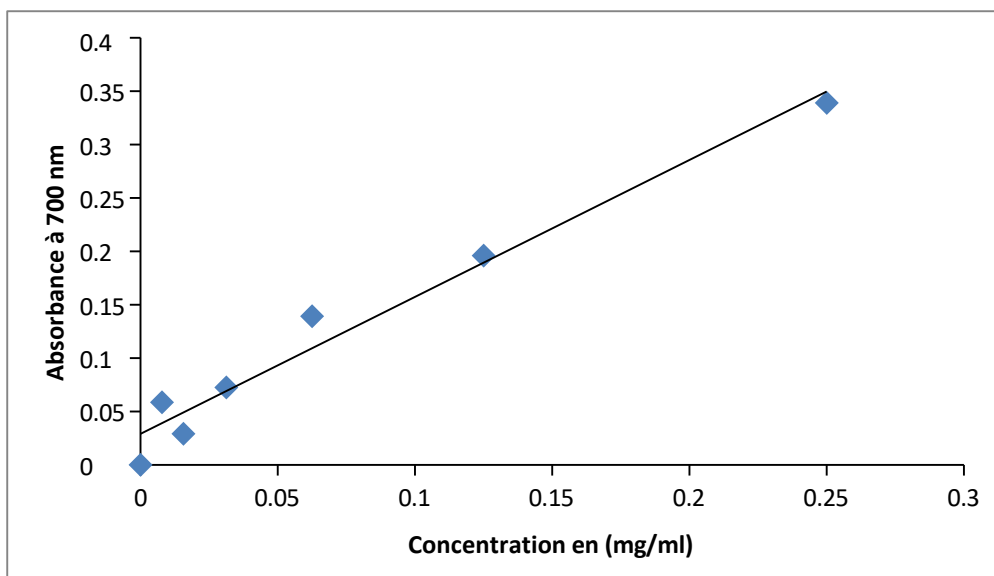


Figure 14 : Représentation graphique de pouvoir réducteur de fer du complexe de zinc

1.3 Effet du complexe de cuivre :

L'effet du complexe de cuivre est montré sur la figure 16. Nous observons que les absorbances mesurées varient linéairement et proportionnellement en fonction des différentes concentrations du complexe de cuivre et nous remarquons qu'à la concentration de 0.062 mg/ml, le complexe de cuivre est capable de réduire le fer en donnant une absorbance égale à 0,066.

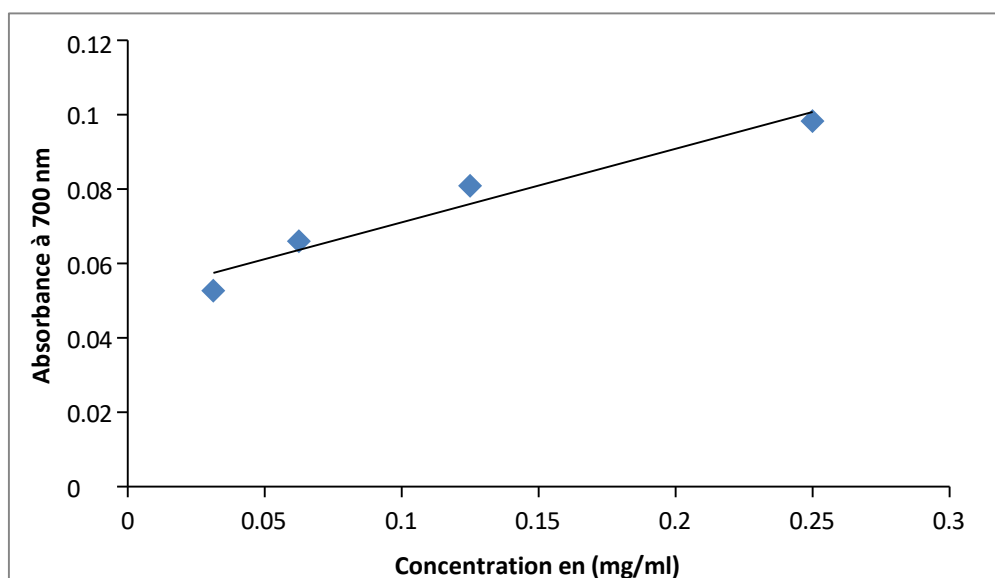


Figure 15 : Représentation graphique de pouvoir réducteur de fer de l'extrait du cuivre

Résultats et discussion

1.4 Effet de l'acide ascorbique:

En observant la figure 17 nous remarquons que l'acide ascorbique est plus puissant sur la réduction de fer que les molécules testées.

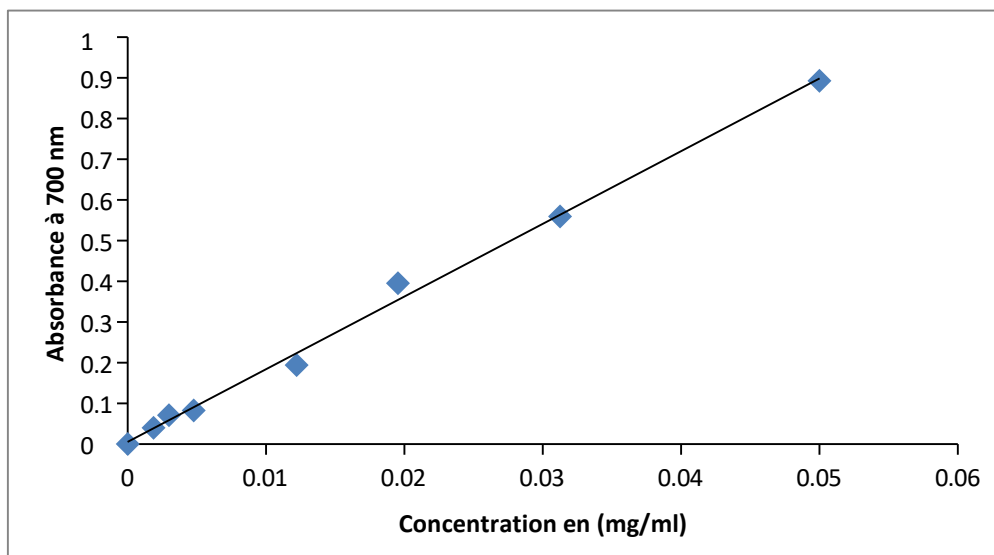


Figure 16 : Représentation graphique du pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

A partir des figures précédentes, nous avons calculé les valeurs d' EC_{50} , la concentration efficace ou concentration requise pour obtenir une absorbance de 0,5.

Le tableau 1 présente les valeurs d' EC_{50} des extraits et d'acide ascorbique qui sont calculées à partir de l'équation de chaque droite.

Tableau 1 : Valeurs d' EC_{50} enregistrées pour les trois extraits et l'acide ascorbique

Extraits	Ligand	Cuivre	Zinc	Acide ascorbique
EC_{50} (mg/ml)	$6,43\pm 0,57$	$2,53\pm 0,22$	$0,34\pm 0,03$	$0,02\pm 0,0001$

À partir de ce tableau, nous pouvons remarquer que le complexe de zinc présente une activité réductrice du fer significativement meilleure que celle du complexe de cuivre et du ligand. L'acide ascorbique reste le plus efficace. Les valeurs d' EC_{50} obtenues montrent que l'activité antioxydante augmente lorsque la valeur d' EC_{50} diminue. Ainsi, le complexe de zinc possède le pouvoir réducteur le plus important parmi les composés synthétisés, tandis que le ligand présente l'activité la plus faible. Ces résultats indiquent que la complexation du ligand avec les ions métalliques, notamment le zinc, améliore considérablement son activité antioxydante.

Résultats et discussion

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Al Zoubi et al. (2016), qui ont montré que la complexation des bases de Schiff avec des ions métalliques améliore leur activité antioxydante grâce à une meilleure délocalisation électronique, favorisant ainsi la stabilisation des espèces radicalaires.

Des observations similaires ont été rapportées par Kumar et al. (2017), qui ont attribué cette amélioration à l'augmentation de la lipophilie des complexes métalliques, facilitant leur interaction avec les radicaux libres.

Dans notre étude, le complexe de zinc a présenté la meilleure activité antioxydante. Cette supériorité peut être expliquée par le caractère redox-inerte du zinc, qui ne participe pas aux réactions de Fenton génératrices de radicaux hydroxyles. Selon Powell (2000), le zinc protège les membranes cellulaires, stabilise les protéines et limite la peroxydation lipidique. De plus, Prasad (2014) a montré que le zinc renforce les systèmes de défense antioxydants et réduit la production des espèces réactives de l'oxygène, ce qui contribue à son effet protecteur contre le stress oxydatif.

Par ailleurs, **Maret (2013)** rapporte que le zinc constitue un cofacteur indispensable de nombreuses enzymes impliquées dans les mécanismes de défense antioxydante, notamment la superoxyde dismutase Cu/Zn (Cu/Zn-SOD), responsable de la transformation de l'anion superoxyde en espèces moins toxiques. Cette implication biologique contribue largement aux propriétés antioxydantes observées pour les complexes contenant du zinc.

Les travaux de **Flora et al. (2008)** montrent également que le zinc exerce une action protectrice contre le stress oxydatif en réduisant les dommages provoqués par les métaux pro-oxydants et en limitant la peroxydation lipidique. Selon ces auteurs, cette propriété explique pourquoi les complexes de zinc présentent souvent une activité antioxydante supérieure à celle de nombreux autres complexes métalliques.

Nos résultats sont également cohérents avec ceux de **Bukhari et al. (2015)**, qui ont observé que plusieurs complexes de zinc dérivés de bases de Schiff possèdent une excellente activité antioxydante, supérieure à celle des ligands correspondants.

Ainsi, la forte activité antioxydante observée pour le complexe de zinc dans notre étude peut être attribuée à plusieurs mécanismes complémentaires :

- la délocalisation électronique induite par la complexation ;
- l'amélioration du transfert d'électrons ;
- la stabilité structurale du complexe ;
- la nature redox-inerte du Zn^{2+} ;
- l'implication du zinc dans les systèmes enzymatiques antioxydants.

Résultats et discussion

L'ensemble de ces facteurs explique la faible valeur d' EC_{50} obtenue pour ce complexe et confirme que le zinc constitue un excellent métal pour la conception de nouveaux composés antioxydants.

2 Effet inhibiteur des extraits sur l'alpha amylase :

2.1 Le ligand:

La figure 18 montre l'effet du ligand sur l'inhibition de l'alpha amylase. Pour 0.06 mg/ml nous avons enregistré une inhibition d'environ 23 %.

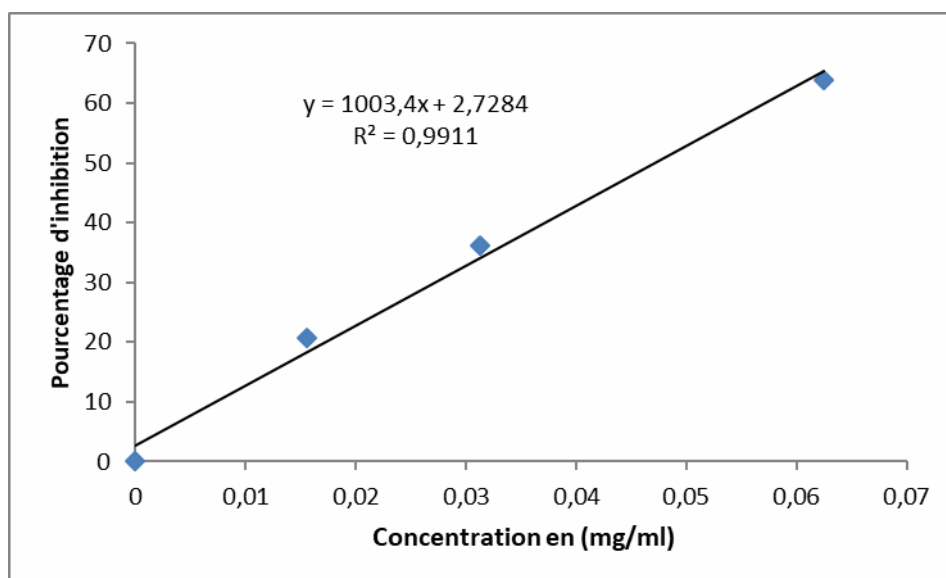


Figure 17 : Effet inhibiteur du complexe de ligand sur l'alpha amylase

2.2 Le complexe de cuivre:

La figure 19 montre l'effet du cuivre sur l'inhibition de l'alpha amylase. Pour 0,125 mg/ml nous avons enregistré une inhibition d'environ 33%.

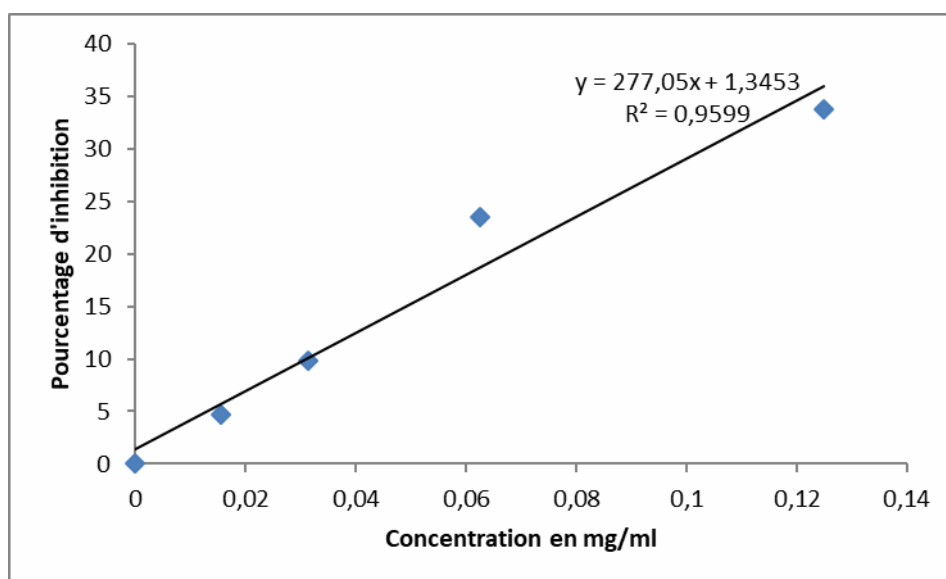


Figure 18 : Effet inhibiteur du complexe de cuivre sur l'alpha amylase

2.3 Le complexe de zinc :

La figure 20 illustre l'effet inhibiteur du complexe de zinc sur l'activité de l'alpha amylase.

Pour 0,25 mg/ml nous avons enregistré une inhibition d'environ 25%.

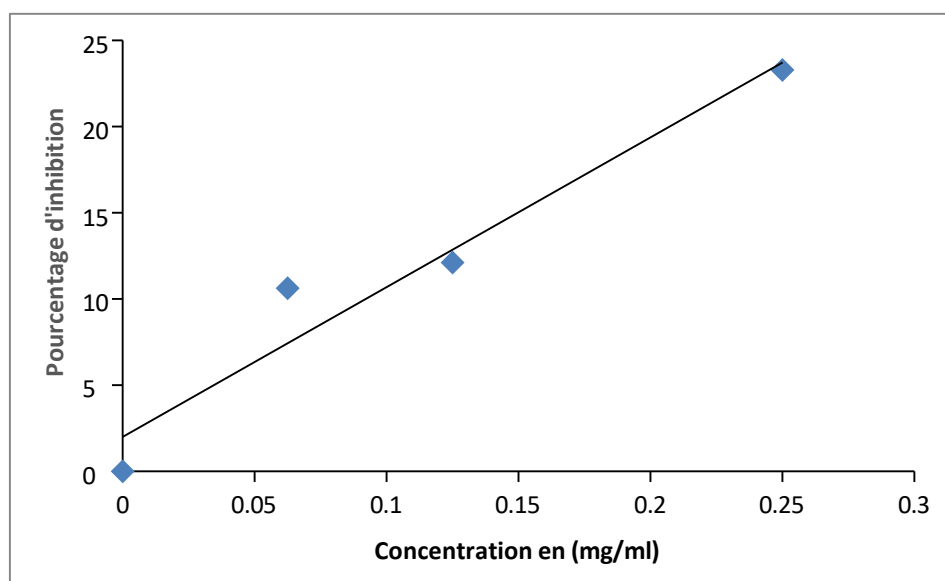


Figure 19 : Effet inhibiteur du complexe de zinc sur l'alpha amylase

2.4 Extrait d'Acarbose :

L'Acarbose est utilisé comme molécule de référence pour contrôler l'inhibition de l' α amylase. Les pourcentages obtenus sont schématisés sur la figure 21. Cette molécule est efficace et elle présente des pourcentages élevés pour de très faibles concentrations.

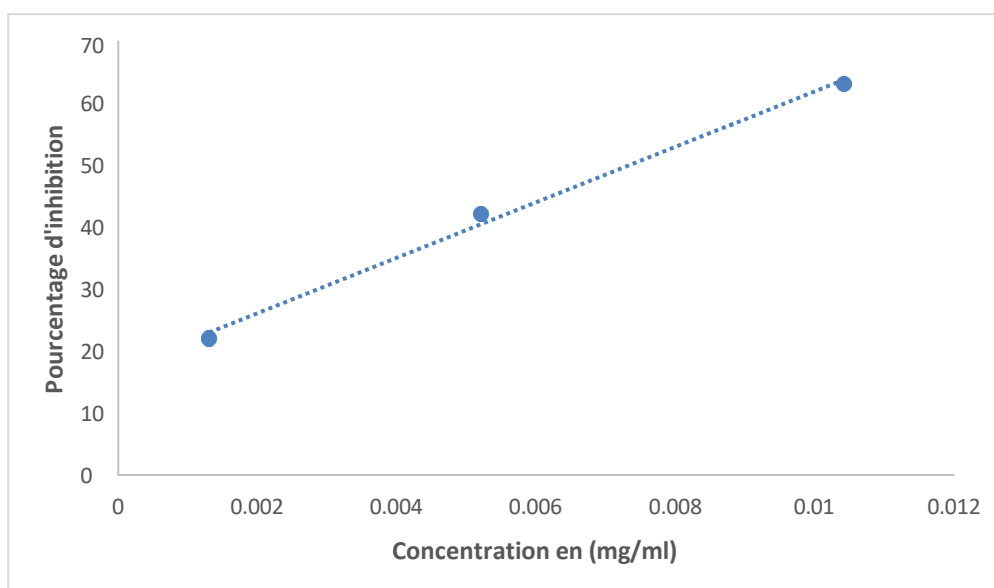


Figure 20 : Effet inhibiteur d'acarbose sur l' α amylase

Tableau 2 : Evaluation des valeurs des IC_{50} de différents complexes et les fractions de l'Acarbose.

Complexes	Ligand	Cuivre	Zinc	Acarbose
IC_{50} (mg/ml)	$0,04 \pm 0,0006$	$0,173 \pm 0,005$	$0,51 \pm 0,052$	$0,007 \pm 5,773$

Les valeurs de l' IC_{50} obtenues pour l'activité inhibitrice de l' α -amylase montrent des différences significatives entre les complexes étudiés. L'acarbose, utilisé comme contrôle positif, présente la plus faible valeur d' IC_{50} (0,007 mg/ml), indiquant ainsi la meilleure activité inhibitrice. Parmi les complexes synthétisés, le ligand affiche une valeur d' IC_{50} de 0,04 mg/ml, ce qui traduit une activité inhibitrice importante. En revanche, le complexe de cuivre présente une activité modérée avec une IC_{50} de 0,173 mg/ml, tandis que le complexe de zinc montre l'activité la plus faible avec une IC_{50} de 0,51 mg/ml. Étant donné que l'activité inhibitrice est inversement proportionnelle à la valeur de l' IC_{50} , l'ordre d'efficacité est le

suivant : Acarbose > Ligand > Complexe de cuivre > Complexe de zinc.

Ces résultats suggèrent que le ligand possède un potentiel inhibiteur intéressant vis-à-vis de l' α -amylase, alors que la complexation avec le cuivre et surtout avec le zinc entraîne une diminution de cette activité. Ces résultats peuvent être expliqués par l'influence de la complexation sur la structure électronique et stérique du ligand. En effet, le ligand libre possède probablement une meilleure accessibilité aux sites actifs de l'enzyme α -amylase, ce qui favorise son interaction avec celle-ci et améliore son pouvoir inhibiteur.

Après complexation, la coordination avec les ions métalliques peut modifier la distribution électronique du ligand ainsi que sa géométrie spatiale, ce qui peut réduire son affinité pour le site actif de l'enzyme. Par ailleurs, la différence observée entre les complexes de cuivre et de zinc pourrait être liée à la nature du métal central et à son mode de coordination. Le complexe de cuivre conserve une activité inhibitrice plus importante que celui du zinc, suggérant une interaction plus favorable avec l'enzyme. Des observations similaires ont été rapportées dans plusieurs études portant sur les complexes métalliques de bases de Schiff, où la complexation peut soit améliorer soit diminuer l'activité biologique selon la nature du métal et la structure du ligand.

Ces résultats sont en accord avec **Okoli et Modise (2018)**, qui ont montré que l'activité inhibitrice des bases de Schiff vis-à-vis de l' α -amylase dépend fortement de la structure du ligand ainsi que de la nature du métal complexé. Les auteurs soulignent que la complexation n'entraîne pas systématiquement une amélioration de l'activité biologique.

Des observations similaires ont été rapportées par **Bhat et al. (2016)**, qui ont montré que certaines bases de Schiff non complexées présentent une meilleure inhibition enzymatique que leurs complexes métalliques, en raison d'une meilleure complémentarité structurale avec le site actif de l'enzyme.

Selon **Kumar et al. (2019)**, l'activité inhibitrice dépend principalement des interactions hydrogène, des interactions hydrophobes et des interactions électrostatiques établies entre le composé et les acides aminés du site catalytique. Toute modification de la géométrie moléculaire provoquée par la complexation peut diminuer ces interactions et réduire l'affinité envers l'enzyme.

Par ailleurs, **Patel et al. (2018)** rapportent que la taille du complexe métallique et son encombrement stérique peuvent limiter son accès au site actif de l' α -amylase, expliquant ainsi la diminution observée de l'activité inhibitrice.

Dans notre étude, le ligand conserve donc une meilleure capacité d'interaction avec l' α -

Résultats et discussion

amylase que les complexes métalliques, ce qui explique sa valeur d'IC₅₀ plus faible. Ces résultats démontrent que, contrairement à l'activité antioxydante, la complexation n'améliore pas nécessairement l'activité antidiabétique et que cette dernière dépend fortement de la nature du métal, de la géométrie du complexe ainsi que de son mode d'interaction avec l'enzyme

Conclusion

Générale

Dans ce travail, nous avons évalué *in vitro* les activités antioxydante et antidiabétique d'un ligand base de Schiff ainsi que de ses complexes métalliques de cuivre (Cu) et de zinc (Zn).

L'analyse du pouvoir réducteur du fer (FRP) a démontré que ces trois composés peuvent réduire le fer ferrique, en fer ferreux, ce qui confirme leur potentiel antioxydant. Les EC₅₀ sont de l'ordre de 6,43±0,57 mg/ml, 2,53±0,22 mg/ml et 0,34±0,03 mg/ml pour le ligand, le complexe de Cu et le complexe de Zinc respectivement. Les complexes métalliques ont montré une activité supérieure à celle du ligand, indiquant que la complexation avec les ions métalliques renforce les propriétés antioxydantes des bases de Schiff.

Concernant l'activité antidiabétique, mesurée par l'inhibition de l'enzyme l'alpha-amylase, les résultats ont révélé des effets inhibiteurs variés selon les composés. Les valeurs d'IC₅₀ étaient de 0,04± 0,0006 mg/mL pour le ligand, 0,173± 0,005 mg/mL pour le complexe de cuivre et 0,51± 0,052 mg/mL pour le complexe de zinc, alors que l'acarbose, utilisé comme référence, affichait une IC₅₀ de 0,007 mg/mL. Ces données montrent que le ligand possède la meilleure activité inhibitrice parmi les composés synthétisés, bien que moins efficace que l'acarbose.

Ces résultats soulignent l'intérêt biologique des bases de Schiff et de leurs complexes métalliques, qui combinent des propriétés antioxydantes et antidiabétiques prometteuses. Ils pourraient représenter des candidats intéressants pour le développement de nouvelles molécules bioactives dédiées à la prévention ou à la gestion des maladies liées au stress oxydatif et au diabète.

Cependant, des investigations complémentaires, notamment des études *in vivo*, toxicologiques et pharmacologiques, sont indispensables pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action et confirmer leur potentiel thérapeutique.

Enfin, l'optimisation structurale de ces composés ainsi que l'exploration d'autres complexes métalliques pourraient permettre d'améliorer leurs activités biologiques et d'élargir leurs applications en biomédecine.

En perspective, il serait pertinent d'approfondir l'étude de ces complexes par d'autres tests antioxydants (comme DPPH et ABTS) ainsi que par des essais biologiques plus poussés, afin de mieux élucider leurs mécanismes d'action et leur potentiel pharmacologique

Références Bibliographiques

Références bibliographique

- Bensakhria, Ayoub. Toxicologie Générale - Le Stress Oxydatif. 2018.
- Betheau Y., Kotoujansky A., Colenoa A. (1985). Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation.
- Chaudhary, N. K., Guragain, B., Chaudhary, S. K., & Mishra, P. (2021). Schiff base metal complex as a potential therapeutic drug in medical science: A critical review. *BIBECHANA*, 18(1), 214–230.
- Coolbear T., Daniel R., MORGAN H. (1992). The enzymes from extreme thermophils: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Advanced Biochemistry and Engineering Biotechnology*. vol. (45) : 57–97p.
- Dall W., Moriarty D. (1983). Functional aspects of nutrition and digestion, In : *The Biology of Crustacea*. Ed. Academic Press, New York. 215-262p.
- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1999). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(2), 557-559.
- Davies, K.J. Oxidative stress, antioxydants defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBM Life*, 50, 279-89. 2000
- Defronzo R.A., Ferrannini E., Alberti K.G.M.M., Zimmet P. et Alberti G., 2015. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 2 volume Set. John Wiley et Sons. P.1228
- Durand, D., Damon, M et Gobert, M. (2013) .Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5): p. 218-224.
- Eddaikra A., Eddaikra N. Endogenous enzymatic antioxidant defense and pathologies. *Intechopen*, 2020. DOI: 10.57772/intechopen.95504.
- French D., Enas N., Danial M. (1975). Chemistry and biochemistry. *MTP International review of science biochemistry of carbohydrates serie 1,5 Butterworth Park Press*. vol. (12) : 309-321p.
- Gibson R., Barker P. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography and Marine Biology. An annual review*. vol. (17) : 285-346p.
- Goto, M., Ueda, K. et Hashimoto,T.(2008). « A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine* ». 45(9): p. 1318-1325.
- Goudable,J, Favier,A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants .*Nutrition Clinique et Métabolisme* pp.115-120.1997.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 2007, 62 (10): 631-636.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier C et Chapelle J.-P.(2007). "Le

- Halliwell, B., How characterize a biological antioxidant, *Free. Rad Res. Comm.*,9,1 32.1999.
- Horii A., Emi M., Tomita N., Nishide T., Ogawa M., Mori T., Matsubara K. (1987). Primary structure of human pancreatic α -amylase gene : its comparison with human salivary α -amylase gene. *Gene*. vol. (60) : 57-64p.
- In Mouranche A., Coste C. (Ed) :Hydrolyses et dépolymérase enzymes. d'intérêt industriel. Ed. Ghautier-Villard. 306-356p. Cité par Saci A. (2012)
- Karumi, Y. (2004). Identification of Active Principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) Leaf Extract. Y. Karumi, P.A. Onyeyili and V.O. Ogugbuaja. *Journal of Medical Sciences*, 4(3), 179–182
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et supplementations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires.
- Kumar, B., Devi, J., & Manuja, A. (2023). Synthesis, structure elucidation, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and molecular docking studies of transition metal(II) complexes... *Research on Chemical Intermediates*, 49(6), 2455–2493. <https://doi.org/10.1007/s11164-023-04991-y> .
- Larpent G., Sauglier J. (1992). *Biotechnologie : principes et méthodes*. Biosciences et Techniques. Ed. Doin, Paris. 574-587p. Cité par Dendouga W. (2006).
- Leroy P. Les composants du stress oxydant et les radicaux libres. *Carn.Info*, 2016, 2(2): 218 -219.
- Mafakher L, Ahmadi Y, Khalili Fard J, Yazdansetad S, Rezaei Gomari S, Elyasi Far B. Alpha-Amylase Immobilization: Methods and Challenges. *Pharmaceutical Sciences*. 2023;29(2):144–155. Doi:10.34172/PS.2022.37.
- Matela, G. (2020). Schiff bases and complexes: A review on anti-cancer activity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 20(16), 1908–1917.
- McCarter, L., & Withers, S. G. (1996). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(5), 757-765.
- Mushtaq, I., Ahmad, M., Saleem, M., & Ahmed, A. (2024). Pharmaceutical significance of Schiff bases: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 16.
- Nielson, J. E., & Borchert, T. V. (2001). Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(2), 253-274.
- Nishide T., Nakamura Y., Emi M., Yamamoto T., Ogawa M., Mori T., Matsubara K. (1986). Primary structure of human salivary alpha-amylase gene. *Gene*. vol. (41) : 299-304p.
- Nutrition clinique et métabolisme, 20(4), 165-177 Beaudeux, J. L., Delattre, J.,
- Panchal, C. J. (1990). Production, purification and properties of alpha-amylase from *Schwanniomyces castellii* (Hansei). *Journal of Industrial Microbiology*, 6(4), 279-283.
- Pincemail, J. et Defraigne, J.-O. (2003). "Le Coenzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier," *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, vol. 8, pp. 55-60.
- Prashanth L., Kattapagari KK., Chitturi RV., Reddy Baddam VR., Prasad LK. A review on

- role of essential trace elements in health and disease. *J Health Scien*, 2015, 4(2): 75-
- Raczuk, E., Dmochowska, B., Samaszko-Fiartek, J., & Madaj, J. (2022). Different Schiff Bases—Structure, Importance and Classification. *Molecules*, 27, 787.
 - Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian, L. et Had-Aissouni, L. (2005). Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24, 502–509.
 - Roussel, A. M., & Ferry, M. (2002). Stress oxydant et vieillissement. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 285-291.
 - Sakai T., Satake H., Minakata H., Takeda M. (2004). Characterization of crustacean cardioactive peptide as a novel insect midgut factor : isolation, localization, and stimulation of α -amylase activity and gut contraction. *Endocrinology*. vol. (145) : 5671-5678p.
 - Schaumburg, I., & Slzmann, R. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 87-93.
 - Srinivasa, R., Mathur, P. M., & Desai, S. (2004). Production of fungal α -amylase on wheat bran. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, 847-851.
 - Tebani, R., & Bouchahed, Z. (2024). Synthèse, caractérisation et étude du pouvoir antioxydant des ligands à base de salicylaldimine (Mémoire de master non publié). Université du 8 Mai 1945, Guelma, Algérie.
 - Tebani, R., & Bouchahed, Z. (2024). Synthèse, caractérisation et étude du pouvoir antioxydant des ligands à base de salicylaldimine (Mémoire de Master, Université de Tlemcen). Université de Tlemcen
- Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., & Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21(3), 144-150.
- Tricoli J., Shows T. (1984). Regional assignment of human amylase to p22-p21 of chromosome 1. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. vol. (10) : 205-210p.
 - Vanco et al. (2008), les complexes de Schiff du cuivre et du zinc présentent des activités biologiques intéressantes, notamment antioxydantes et antidiabétiques.
 - Zulaikhah ST. The Role of antioxidant to prevent free radicals in the body. *Sains Medika J*, 2017, 8 (1):39-45.