République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Aboubekr BELKAID –TLEMCEN–
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire : Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

En vue de l'obtention d'un **diplôme Master**

Domaine : **SNV** Filière : **Sciences biologiques**

Spécialité : **Biochimie Appliquée**

Présenté par :

DAHMANI Fayssal

BERDANE Houaria

Thème :

D'une enzyme à un complément : production/purification et inhibition de l'α-amylase par *Schinus molle*

Soutenu le **22-06-2026** devant le jury composé de :

Présidente :	BENARIBA Nabila	Pr	Univ. Tlemcen
Encadreur :	AZZI Rachid	Pr	Univ. Tlemcen
Co-encadreur :	BELYAGOUBI Larbi	Pr	Univ. Tlemcen
Co-encadreur :	AZZOUZ Marwa	Doctorant	Univ. Tlemcen
Co-encadreur :	MAROUF Mouna	Master	Univ. Tlemcen
Examinateur :	MEZOUAR Dounia	MCA	Univ. Tlemcen
Experte CATI :	STAMBOULI -MEZIANE Haciba	Pr	Univ. Tlemcen

Année Universitaire : 2025/2026

Remerciements

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude :

Monsieur **AZZI Rachid**, Professeur au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAID Tlemcen, pour la confiance qu'il nous a accordée et pour avoir assuré l'encadrement de ce travail de recherche.

Monsieur **BELYAGOUBI Larbi**, Professeur au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAID Tlemcen, pour son accompagnement scientifique et son soutien tout au long de ce travail.

Madame **BENARIBA Nabila**, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAID Tlemcen, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Madame **MEZOUAR Dounia**, maitre des conférences classe A, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAID Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Madame **STAMBOULI -MEZIANE Haciba**, Professeur au département Ecologie et Environnement, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAID Tlemcen, experte de centre la CATI Tlemcen, pour son engagement et ses démarches continues afin de faire reconnaître ce travail comme un brevet.

Mademoiselle **AZZOUZ Marwa**, doctorante, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAID Tlemcen, pour son soutien constant, ses conseils avisés et son accompagnement tout au long de la phase de expérimentale.

Mademoiselle **MAROUF Mouna**, master, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAID Tlemcen, pour son aide précieuse, son soutien moral et sa présence bienveillante durant la réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer molles reconnaissances à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation et à l'acquisition de nos connaissances tout au long de mon parcours universitaire.

Dédicaces

À mon très cher père,

Ton courage, tes sacrifices et ton soutien constant ont toujours été pour moi une source d'inspiration. Je te remercie pour tous les efforts que tu as consentis afin de me permettre d'atteindre mes objectifs. Que Dieu te protège et te récompense abondamment.

À ma très chère mère,

Aucun mot ne saurait exprimer toute ma gratitude pour ton amour inconditionnel, ta patience et tes sacrifices. Tu as toujours été présente dans les moments les plus difficiles comme dans les plus heureux de ma vie. Ton soutien, tes encouragements et tes prières ont constitué ma plus grande force tout au long de mon parcours. Que Dieu te garde en bonne santé et te récompense pour tout ce que tu as fait pour moi.

À Mouna,

Merci pour ton soutien moral, ta présence et tes encouragements. Ta confiance en moi m'a permis d'avancer avec détermination et sérénité.

À ma sœur et à mon frère,

Je vous remercie pour votre affection, votre soutien et les précieux moments partagés. Votre présence à mes côtés a toujours été une source de réconfort et de motivation.

À toute ma famille Dahmani,

Pour leur affection, leurs encouragements et leur bienveillance tout au long de ce parcours.

À tous mes amis sincères,

Pour leur soutien moral, leur amitié et les moments de partage qui m'ont permis de garder le cap.

Aux membres du laboratoire de recherche,

Pour leur professionnalisme, leur disponibilité et leur esprit d'équipe ayant contribué à l'aboutissement de ce travail.

Fayssal

À mes très chers parents,

Que Dieu vous protège et vous accorde santé, longévité et bonheur. Aucun terme ne saurait exprimer ma profonde gratitude pour votre dévouement, votre patience et les sacrifices consentis pour mon éducation et ma réussite.

À ma grand-mère,

En témoignage de mon profond attachement et de ma sincère reconnaissance, pour ses invocations qui m'ont toujours accompagnée et encouragée tout au long de mon parcours.

À mes chères sœurs, Fatima et Farah,

Pour leur affection, leur présence constante et leur soutien moral.

À toute ma famille Berdane,

Pour leur soutien, leurs encouragements et leur attachement indéfectible.

À mes amis,

Pour leur amitié sincère, leur bienveillance et leur aide précieuse.

Aux membres du laboratoire de recherche,

Pour leur accompagnement, leur disponibilité et leur contribution précieuse à la réalisation de ce travail.

Houaria

الملخص

يُعد إنزيم الألفا-أميلاز من الإنزيمات التحلّلية المائية المشاركة في تفكيك النشاء إلى سكريات بسيطة. ونظرًا لتعدد تطبيقاته في المجالات الغذائية والبيوتكنولوجية والصيدلانية، يحظى هذا الإنزيم باهتمام علمي كبير. في هذه الدراسة، تم إنتاج إنزيم الألفا-أميلاز انطلاقًا من فطر الرشاشية السوداء (*Aspergillus niger*) المزروع في وسط سائل، ثم تم ترسيب البروتين بواسطة كبريتات الأمونيوم. تم تحديد المعايير الحركية للإنزيم المستخلص ومقارنتها بإنزيم ألفا-أميلاز تجاري.

من جهة أخرى، تم تحضير مستخلصات مائية من ثمار الفلفل الكاذب (*Schinus molle*) الناضجة وغير الناضجة باستعمال طريقتي الغليان والنقع. وقد خضعت هذه المستخلصات لتحاليل كيميائية نباتية نوعية وكمية. بعد ذلك، تم تقييم نشاطها التثبيطي تجاه إنزيم الألفا-أميلاز، إلى جانب دراسة تأثيرها على انحلال كريات الدم الحمراء

وقد أظهرت النتائج أن الإنزيم المستخلص يمتلك نشاطًا نوعيًا مرتفعًا (4464.46 وحدة/ملغ)، مع قيمة ثابت ميكاليس-منتن تساوي 0.0393 مليمول/لتر وقيمة السرعة القصوى للتفاعل الانزيمي تساوي 0.20704 مليمول/دقيقة، مما يدل على انجذاب عال للركيزة وكفاءة تحفيزية عالية.

أظهرت التحاليل الكيميائية النباتية النوعية أن المستخلصات غنية بالفلافونويدات والعفصيات والقلويدات والكومارينات. كما أظهر قياس الفلافونويدات والتانينات وجود تراكيز مرتفعة، خاصة في المستخلص الخام الناتج عن النقع لثمار غير الناضجة، حيث بلغت القيم 88,9 ± 0,04 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/ملغ من المستخلص الجاف بالنسبة للفلافونويدات، و240,3 ± 0,007 ميكروغرام مكافئ كاتشين/ملغ من المستخلص الجاف بالنسبة للتانينات.

وقد أظهر المستخلص المتحصل عليه بطريقة الغلي للثمار الناضجة أفضل نشاط تثبيطي، بقيمة IC50 بلغت(0.58ملغ/مل) كما بينت اختبارات انحلال كريات الدم الحمراء تأثيرًا انحلاليًا ضعيفًا عند التراكيز المدروسة، مما يشير إلى انخفاض سمية هذه المستخلصات.

إضافة إلى ذلك، أُجريت دراسة الالتحام الجزيئي (Docking moléculaire) للتنبؤ بالتفاعلات بين بعض المركبات الحيوية الفعالة الموجودة في ثمار الفلفل الكاذب والموقع الفعال لإنزيم الألفا-أميلاز. ومن بين المركبات المدروسة، أظهر مركب الكيرسيتين أفضل ألفة ارتباط، مما يؤكد قدرته التثبيطية.

تُبرز هذه الدراسة الإمكانات البيوتكنولوجية لإنزيم الألفا-أميلاز المنتج بواسطة فطر الرشاشية السوداء، كما تؤكد أهمية ثمار الفلفل الكاذب كمصدر طبيعي للمركبات الحيوية الفعالة ذات النشاط المثبط لإنزيم الألفا-أميلاز.

الكلمات المفتاحية: الألفا-أميلاز؛ الرشاشية السوداء ؛ الفلفل الكاذب ؛ النشاط الإنزيمي ; التحليل الكيميائي النباتي ; النشاط الانحلالي الدموي ; الالتحام الجزيئي

Résumé

L'α-amylase est une enzyme hydrolytique impliquée dans la dégradation de l'amidon en sucres simples. Elle suscite un intérêt scientifique important en raison de ses nombreuses applications dans les domaines agroalimentaire, biotechnologique et pharmaceutique.

Dans cette étude, l'α-amylase a été produite à partir d*'Aspergillus niger* cultivé en milieu liquide (Potato Dextrose Broth), puis purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium, et ses paramètres cinétiques ont été déterminés et comparés à ceux d'une α-amylase commerciale. Par ailleurs, des extraits aqueux des fruits mûrs et immatures de *Schinus molle* ont été préparés par décoction et macération, suivis d'une caractérisation phytochimique qualitative et quantitative, ainsi qu' une évaluation de leur activité inhibitrice sur l'α-amylase et de leur effet hémolytique.

Les résultats ont montré que l'enzyme extraite présente une activité spécifique remarquable (4464,46 U/mg), avec un Km de 0,0393 mmol/L et une Vmax de 0,20704 mmol/min, indiquant une forte affinité pour le substrat et une efficacité catalytique importante. Les analyses phytochimiques ont révélé la richesse des extraits en flavonoïdes, tanins, alcaloïdes et coumarines, avec des teneurs élevées notamment dans l'extrait brut préparé macération des fruits immatures (88,9 ± 0,04 µg EAG/mg ES pour les flavonoïdes et 240,3 ± 0,007 µg EC/mg ES pour les tanins), tandis que l'extrait obtenu par décoction des fruits mûrs a présenté la meilleure activité inhibitrice avec une CI50 de l'ordre de 0,58 mg/mL. Les tests d'hémolyse ont montré un faible effet hémolytique, suggérant une faible toxicité des extraits. En complément, le docking moléculaire a mis en évidence que la quercétine possède la meilleure affinité de liaison avec le site actif de l'α-amylase, confirmant son potentiel inhibiteur.

Cette étude met en évidence le potentiel biotechnologique de l'α-amylase produite par *Aspergillus niger* ainsi que l'intérêt des fruits de *Schinus molle* comme source naturelle de composés bioactifs inhibiteurs de l'α-amylase.

Mots clés : α-amylase ; *Aspergillus niger* ; *Schinus molle* ; activité enzymatique ; analyses phytochimiques ; activité hémolytique ; docking moléculaire.

Abstract

α-Amylase is a hydrolytic enzyme involved in the breakdown of starch into simple sugars and is of significant scientific interest due to its numerous applications in the food, biotechnology, and pharmaceutical industries. In this study, α-amylase was produced from *Aspergillus niger* grown in a liquid medium (Potato Dextrose Broth), then purified by ammonium sulphate precipitation, and its kinetic parameters were determined and compared with those of a commercial α-amylase. Furthermore, aqueous extracts from ripe and unripe fruits of *Schinus molle* were prepared by decoction and maceration, followed by qualitative and quantitative phytochemical characterisation, as well as an assessment of their inhibitory activity against α-amylase and haemolytic activity.

The results showed that the extracted enzyme exhibited high specific activity (4464.46 U/mg), with a Km value of 0.0393 mmol/L and a Vmax of 0.20704 mmol/min, indicating a strong affinity for the substrate and high catalytic efficiency. Phytochemical analyses revealed that the extracts were rich in flavonoids, tannins, alkaloids, and coumarins, with particularly high contents in the crude maceration extract of immature fruits (88.9 ± 0.04 µg GAE/mg extract for total flavonoids and 240.3 ± 0.007 µg CE/mg extract for tannins), whereas the decoction extract of ripe fruits showed the highest inhibitory activity with an IC50 of 0.58 mg/mL. Hemolysis tests indicated a low hemolytic effect, suggesting low toxicity of the extracts. In addition, molecular docking revealed that quercetin exhibited the strongest binding affinity to the active site of α-amylase, confirming its inhibitory potential.

This study highlights the biotechnological potential of α-amylase produced by *Aspergillus niger*, as well as the interest of *Schinus molle* fruits as a natural source of bioactive compounds with α-amylase inhibitory activity.

Keywords: α-amylase; *Aspergillus niger*; *Schinus molle*; enzymatic activity; phytochemical analyses; hemolytic activity; molecular docking.

Table des matières

Résumés : ……..

Liste des figures : …….

Liste des tableaux : ……..

Partie I : Synthèse bibliographique 13

Partie II : Matériel et méthodes 18

1. Origine de la souche fongique 20

1.1. *Aspergillus niger* 20

1.2. Ensemencement 20

1.3. Identification de l'isolat fongique sélectionné 21

1.4. Observation microscopique 21

2. Production de l'α-amylase d'origine fongique : Extrait d'*Aspergillus niger* 21

2.1. Préparation du milieu de culture liquide 21

2.2. Précipitation et purification de l'enzyme 23

3. Evaluation de l'activité enzymatiques 24

3.1. Préparation des solutions 24

3.1.1. α-amylase commercialisé *Aspergillus niger* 24

3.1.2. α-amylase extraite d'*Aspergillus niger* 24

3.1.3. Préparation du substrat (amidon soluble) 24

3.1.4 Préparation du 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) 24

3.2. La cinétique enzymatique 25

3.2.1. Dosage du maltose, produit de la réaction enzymatique 26

3.2.2 Dosage des protéines par la réaction du biuret 27

3.3. Détermination de l'activité de l'α-amylase (Km et Vmax) 29

4. Extraction de la plante *Schinus molle* 29

4.1. Matériel végétal 29

4.2. Extraction et préparation des extraits 30

4.2.1. Macération 30

4.2.2. Décoction 30

4.2.3. Calcul des rendements 31

5. Tests phytochimiques 31

5.1. Composés azotés 31

5.2. Les composés phénoliques 32

5.3. Composés terpéniques 32

5.4. Les composés réducteurs 33

6. Dosage des composés phénoliques 33
6.1. Dosage des polyphénols totaux 33
6.2. Dosage des flavonoïdes 35
6.3. Dosage des tanins condensés 36
7. Recherche d'effet inhibiteur vis-à-vis l'enzyme l'α-amylase 38
7.1. Préparation des solutions 38
7.2. Evaluation de l'effet inhibiteur vis-à-vis l'α-amylase 39
8. Evaluation de l'effet hémolytique 40
9. Docking moléculaire 41
- **La protéine (l'α-amylase)** 41
- **Les ligands** 42

10. Analyse statistique 45
Partie IV : Conclusion et perspectives 79
Partie V : Références 81

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'α-amylase..... 3
Figure 2 : Deux types de polymères de glucose sont présents dans l'amidon : l'amylose (A), et l'amylopectine (B)..... 4
Figure 3 : Les différentes parties de Schinus molle 13
Figure 4 : Région de Ghardaïa (Zone de prélèvement de la souche fongique Aspergillus niger)..... 20
Figure 5 : Méthode de scotch 21
Figure 6 : Croissance d'Aspergillus niger après 7 jours d'incubation sur un milieu fermentaire à base de la pomme de terre (PDBac.) 22
Figure 7 : Filtration de la suspension après incubation 23
Figure 8 : L'extrait enzymatique issu de la centrifugation..... 23
Figure 9 : La courbe d'étalonnage du maltose 27
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de gélatine pour le dosage des protéines. 28
Figure 11 : Les fruits de Schinus molle récoltés dans la région de Maghnia (wilaya de Tlemcen) 29
Figure 12 : Extraction par sous reflux 34
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols. 34
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des Flavonoïdes. 36
Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés..... 38
Figure 16 : Structures cristallographiques 3D de l'α-amylase pancréatique humaine sous forme libre et complexée à l'acarbose **(RCSB PDB)** 44
Figure 17 : Étapes de préparation, de docking moléculaire et d'analyse des interactions α-amylase–ligands. 44

Liste des tableaux

Tableau 1 : liste de quelques plantes antidiabétiques et leurs métabolites actifs 10

Tableau 2 : Plantes utilisées dans le traitement du diabète en Algérie, citées dans des études ethnobotaniques**).** 11

Tableau 3 : Gamme d'étalonnage pour le dosage du maltose produit par les réactions enzymatiques. 27

Tableau 4 : Gamme d'étalonnage pour la détermination de la concentration des protéines 28

Tableau 5 : Méthode de dosage des polyphénols totaux 34

Tableau 6: Méthodes de dosage des flavonoïdes. 35

Tableau 7 : Méthodes de dosage des tanins condensés 37

Tableau 8 : Codes et noms des ligands utilisés pour l'amarrage moléculaire 43

Liste des abréviations

PDA : Potato Dextrose Agar.

PDB : Potato Dextrose Broth.

PDBac : Potato Dextrose Broth acidifié par l'acide lactique.

DNSA : Acide 3,5-dinitrosalicylique**.**

UV : Ultra-violet.

EBM FR : Extrait brut macération fruits mûrs.

EBM FV : Extrait brut macération fruits immatures.

EBD FR : Extrait brut décoction fruits mûrs.

EBD FV : Extrait brut décoction fruits immatures.

µg EAG/mg ES : Microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec.

µg EC/mg ES : Microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait sec.

CI_{50} : Concentration inhibitrice à 50%.

Vi : Vitesse initiale.

Km : Constante de Michaelis-Menten.

Vmax : Vitesse maximale.

CID : Compound identifier.

Partie I :
Synthèse bibliographique

Les enzymes sont définies comme des catalyseurs biologiques qui accélèrent les réactions biochimiques chez les organismes vivants à de très faibles concentrations, sans être consommées. Elles peuvent également être extraites des cellules et utilisées dans de nombreux procédés industriels d'intérêt commercial **(Robinson, 2015).** Leur activité catalytique dépend de l'intégrité de leur conformation protéique native (structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire) **(Nelson et al., 2021),** et elles présentent une grande spécificité vis-à-vis de leurs substrats grâce à la présence d'un site actif où se déroulent la fixation du substrat et la catalyse **(Robinson, 2015).** Certaines enzymes nécessitent la présence de cofacteurs, tels que des ions métalliques ou des coenzymes. Elles sont classées selon le système de la Commission des Enzymes (EC) en sept classes principales, en fonction du type de réaction catalysée : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases et translocases **(Nelson et al., 2021).**

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les molécules d'amidon en divers produits, notamment le maltose, les dextrines et des polymères de plus courts composés d'unités de glucose **(Rani et al., 2015).** L'une de ces enzymes, l'α-amylase est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques internes α-(1→4) de l'amidon pour produire des composés tels que le glucose et le maltose. C'est une métalloenzyme calcique, c'est-à-dire qu'elle dépend de la présence d'un cofacteur métallique pour son activité.

Il existe deux types d'hydrolases : les endo-hydrolases et les exo-hydrolases. Les endo-hydrolases agissent à l'intérieur de la molécule du substrat, tandis que les exo-hydrolases agissent sur les extrémités non réductrices. Par conséquent, les résidus terminaux de glucose et les liaisons α-(1→6) ne peuvent pas être clivés par l'α-amylase. **(Sundarram et Murthy, 2014).**

Conformément à la nomenclature enzymatique internationale, cette enzyme porte le code E.C. 3.2.1.1. Elle est connue sous le nom commun d'α-amylase, et son nom systématique est 1,4-α-D-glucane-4-glucanohydrolase **(Schumburg & Salzmann, 1991).**

Sur le plan structural, l'α-amylase est constituée de chaînes polypeptidiques uniques repliées en trois domaines distincts : A, B et C. Un grand domaine structural central, « A », est constitué d'un tonneau (β/α) typique à l'extrémité N-terminale. Le domaine B fait saillie entre le troisième feuillet β et l'hélice α suivante du tonneau TIM. Il est lié au domaine central « A » par un pont disulfure. Le domaine « B », associé au domaine « A », forme la fente de liaison du substrat. Le domaine « C » est constitué de brins β à l'extrémité C-terminale, et les domaines

« B » et « C » sont situés du côté opposé du domaine principal A **(Kumari et al., 2012).** Par ailleurs, les ions calcium et chlorure se lient au domaine A et peuvent stabiliser le site actif **(Figure 1).**

Le centre actif contient cinq sous-sites qui lient les différents résidus de glucose du substrat **(Williams, 2017).**



Figure 1 : Structure de l'α-amylase.

Le domaine A est représenté en rouge, le domaine B en jaune et le domaine C en violet. Dans le centre catalytique, l'ion calcium est représenté par la sphère bleue et l'ion chlorure par la sphère jaune. Les structures vertes sont liées au site actif et aux sites de liaison de surface **(Souza & Magalhães, 2010).**

Cette enzyme est caractérisée par un poids moléculaire qui varie selon l'origine et l'espèce. Il est compris entre 40 000 et 90 000 daltons **(Schomburg et Salzmann, 1991).** Celui des α-amylases levuriennes s'échelonne entre 40 000 et 70 000 daltons **(Panchal, 1990).**

La valeur optimale du pH des α-amylases varie considérablement, de 2 à 11, ce qui montre leur adaptabilité à différentes conditions environnementales. Parallèlement, la température optimale pour l'activité enzymatique varie de 25 °C à 100 °C. La présence de calcium, la formation d'un complexe enzyme-substrat stable et l'ajout de stabilisateurs affectent la thermostabilité des α-amylases **(Kumari et al., 2012).**

L'amidon est le principal substrat de l'α-amylase. Dans l'alimentation humaine, il constitue un composant majeur. L'amidon, traité chimiquement et enzymatiquement, est utilisé pour obtenir divers produits tels que les sirops de glucose et de fructose, les cyclodextrines et les hydrolysats d'amidon.

L'amidon contient deux types de polymères : l'amylose et l'amylopectine **(Figure 2).**

L'amylose est constituée d'environ 6 000 sous-unités de glucose reliées par des liaisons glycosidiques α-(1→4) , formant ainsi un polymère linéaire. Elle représente environ 20 à 25 % de l'amidon.

L'amylopectine est un polymère ramifié qui constitue environ 75 à 80 % de l'amidon. Les chaînes linéaires et ramifiées sont composées respectivement de 10 à 60 et de 15 à 45 sous-unités de glucose, reliées par des liaisons glycosidiques α-(1→4) et α-(1→6).

L'α-amylase hydrolyse uniquement les liaisons glycosidiques α-(1→4) de l'amidon **(Farooq et al., 2021).**

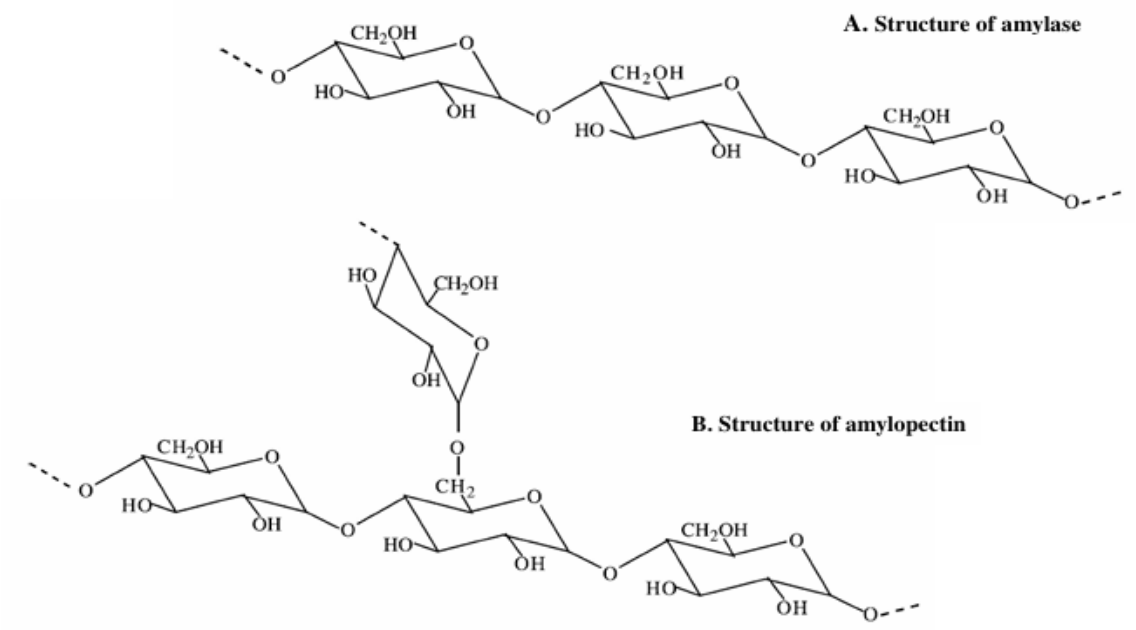


Figure 2 : Deux types de polymères de glucose sont présents dans l'amidon : l'amylose (A), et l'amylopectine (B) **(Souza & Magalhães, 2010)**

l'α-amylase, fonctionne via un mécanisme de rétention, impliquant un double déplacement nucléophile (appelé mécanisme de rétention α). Dans ce mécanisme, le premier acide aminé agit comme un nucléophile, attaquant le centre anomérique du substrat, tandis que le second résidu donne un proton à l'oxygène glycosidique, facilitant le départ de l'aglycone (ROH). Un état de transition de type ion oxocarbenium se forme pendant la glycosylation, suivi de l'entrée d'une molécule d'eau. Le second résidu agit alors comme une base générale, catalysant l'étape de déglycosylation de l'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Les deux étapes impliquent un état de transition de type ion oxocarbenium **(Ramos Neyra et al., 2025).**

Un large éventail d'organismes, y compris des micro-organismes tels que les bactéries aquatiques, les champignons, les actinomycètes, les plantes et les animaux, peut produire de l'α-amylase **(Elyasi Far et al., 2020).**

L'α-amylase (EC 3.2.1.1) joue un rôle clé dans le métabolisme des plantes en hydrolysant l'amidon au cours de la germination des graines ainsi que dans d'autres tissus végétaux. Cette activité enzymatique est principalement assurée par le clivage endoglycosidique des liaisons α-(1→4) de l'amylose et de l'amylopectine, qui constituent les principaux composants des granules d'amidon présents dans les cellules **(Huang et al., 1992).** En raison de cette fonction essentielle, les α-amylases sont largement répandues dans le règne végétal et peuvent être extraites de différentes sources telles que l'orge, le millet, le blé, le sorgho et le maïs **(Rao et al., 2004).**

En raison de leur taux élevé de prolifération et de croissance, les micro-organismes sont la principale source d'alpha-amylase, produisant un volume important de cette enzyme. **(Elyasi Far et al., 2020).**

Les α-amylases d'origine microbienne sont produites principalement par les champignons et les bactéries. Ces enzymes sont largement utilisées dans les domaines de la recherche scientifique ainsi que dans plusieurs secteurs industriels.

Les α-amylases fongiques sont produites par plusieurs espèces de champignons, notamment celles appartenant au genre *Aspergillus* (*A. oryzae, A. awamori, A. fumigatus, A. kawachii, A. niger et A. flavus).* D'autres espèces productrices appartiennent au *genre Penicillium*, telles que *P. brunneum, P. expansum, P. chrysogenum, P. fellutanum, P. roqueforti, P. camemberti, P. janthinellum et P. olsonii.* Des micro-organismes tels que *Pycnoporus sanguineus, Streptomyces rimosus, Thermomyces lanuginosus, Thermomonospora curvata, Cryptococcus flavus et Mucor sp*. sont également connus pour leur capacité à produire l'α-amylase.

Les α-amylases bactériennes présentent l'avantage d'être produites rapidement et à moindre coût par rapport à celles issues d'autres micro-organismes. De nombreuses espèces bactériennes sont capables de sécréter ces enzymes, en particulier celles du genre *Bacillus,* telles que *B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. coagulans, B. stearothermophilus, B. licheniformis, B. polymyxa, B. halodurans, B. megaterium et B. cereus.*

D'autres bactéries, telles que *Rhodothermus marinus, Caldimonas taiwanensis, Corynebacterium gigantea, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus manihotivorans, Geobacillus thermoleovorans* et *Pseudomonas stutzeri,* sont également capables de produire

des α-amylases. Par ailleurs, certaines bactéries halophiles, notamment *Halobacillus sp., Haloarcula hispanica, Bacillus dipsosauri et Halomonas meridiana*, sont reconnues pour leur production d'amylases **(Farooq et al., 2021).**

En plus de son activité salivaire, l'α-amylase joue un rôle essentiel dans la digestion pré-cæcale de l'amidon au niveau du tube digestif. Elle est principalement sécrétée par le pancréas sous une forme active, en réponse à l'ingestion d'aliments **(Böswald et al., 2023).**

Les α-amylases occupent une place essentielle dans de nombreux secteurs industriels tels que l'agroalimentaire, le textile, le papier et les détergents, représentant environ 30 % de la production mondiale d'enzymes. Avec les avancées récentes en biotechnologie, le champ d'application des amylases s'est élargi vers d'autres domaines, notamment les secteurs clinique, médical et de la chimie analytique **(Mobini-Dehkordi & Afzal Javan, 2012).**

Les industries textiles utilisent largement les alpha-amylases pour hydrolyser et solubiliser l'amidon, qui est ensuite éliminé du tissu par lavage afin d'augmenter la rigidité des produits finis. Elle est utilisée comme agent de désencollage pour éliminer l'amidon du tissu brut avant son traitement ultérieur de blanchiment et de teinture. De nombreux vêtements, en particulier les jeans, sont désencollés après le foulage. Les tissus souhaités sont finalement lavés et rincés **(Tiwari et al., 2015).**

Dans l'industrie des détergents, l'enzyme alpha-amylase joue un rôle essentiel. Elle est largement utilisée pour améliorer le pouvoir détergent des compositions de blanchiment du linge et blanchir sans foncer les couleurs. L'ajout d'enzyme stabilise l'agent de blanchiment et préserve son efficacité dans la composition des savons de lessive. L'amidon modifié est utilisé dans la fabrication des plaques de plâtre pour la construction de cloisons sèches. De nombreux ingrédients riches en amidon sont présents dans l'alimentation animale. Ainsi, l'ajout d'α-amylase permet d'améliorer la digestibilité de l'amidon, ce qui augmente la valeur nutritionnelle des aliments **(Saini et al., 2017).**

Dans l'industrie papetière, l'α-amylase est utilisée pour l'hydrolyse de l'amidon de haut poids moléculaire présent dans le papier couché. Elle sert à réduire la viscosité. Le couchage du papier est utilisé pour améliorer diverses propriétés, telles que sa douceur et sa résistance. La qualité d'écriture est également améliorée par ce procédé. L'amidon a une viscosité assez élevée, qui peut être réduite en utilisant l'α-amylase pour la dégradation du polymère d'amidon dans un processus de fermentation discontinu ou continu. L'amidon est non seulement un bon agent de

couchage du papier, mais aussi un bon agent d'encollage. Cela favorise la qualité, et contribue également à sa rigidité et à sa résistance **(Farooq et al., 2021).**

L'éthanol est principalement utilisé comme biocarburant liquide. L'amidon est utilisé comme substrat dans la production d'éthanol, car il est économique et relativement plus facilement disponible que d'autres substrats utilisés dans la production de biocarburants. La bioconversion de l'amidon en sucres fermentescibles se déroule en trois étapes. Premièrement, la liquéfaction de l'amidon forme une suspension visqueuse d'amidon. La deuxième étape est le processus de saccharification, où l'α-amylase hydrolyse l'amidon pour produire des sucres fermentescibles. Cette étape est suivie d'une fermentation à l'aide d'un micro-organisme comme *Saccharomyces cerevisiae*, qui convertit ces sucres en éthanol **(Farooq et al., 2021).**

Les amylases sont largement employées dans l'industrie des aliments transformés, notamment pour la boulangerie, le brassage, la préparation de compléments digestifs, la production de gâteaux, de jus de fruits et de sirops d'amidon. Ces enzymes peuvent être ajoutées à la pâte à pain pour dégrader l'amidon de la farine en dextrines plus petites, qui sont ensuite fermentées par la levure. L'ajout d'α-amylase à la pâte entraîne une augmentation du taux de fermentation et de réduire sa viscosité, améliorant ainsi le volume et la texture du produit. De plus, il génère du sucre supplémentaire dans la pâte, ce qui améliore le goût, la couleur de la croûte et les qualités de toastage du pain. Outre la production de composés fermentescibles, les α-amylases ont également un effet anti-rassissement dans la panification, et elles améliorent la rétention de la douceur des produits de boulangerie, augmentant ainsi leur durée de conservation **(Mobini-Dehkordi & Afzal Javan, 2012).**

L'amidon est un polysaccharide largement répandu dans la nature, servant de réserve d'énergie stockée chez de nombreuses espèces végétales. On le trouve également en grande quantité dans les déchets issus de la transformation des matières premières végétales. Les déchets de transformation de l'amidon sont produits en grandes quantités et causent des problèmes de pollution. Pour purifier les matériaux polluants à base d'amidon, on peut utiliser une enzyme amylolytique microbienne ou des micro-organismes produisant une enzyme amylolytique **(Mobini-Dehkordi & Afzal Javan, 2012).**

Les tests de gènes rapporteurs sont devenus essentiels pour l'étude des éléments régulateurs et de l'expression des gènes. En biologie moléculaire, la présence d'amylase peut servir de méthode supplémentaire de sélection pour l'intégration réussie d'une construction rapportrice, en plus de la résistance aux antibiotiques. L'insertion d'ADN étranger dans ce gène entraîne une

perte d'activité amylolytique dans la cellule hôte, qui peut être mesurée à l'aide d'une procédure de coloration à l'iode simple et peu coûteuse **(Mobini-Dehkordi & Afzal Javan, 2012).**

L'alpha-amylase pourrait être bénéfique dans les industries pharmaceutiques et de la chimie fine si des enzymes aux caractéristiques appropriées pouvaient être fabriquées. Dans ce contexte, les chercheurs pharmaceutiques s'intéressent particulièrement aux polymères biodégradables, naturels et synthétiques, et les systèmes d'administration par voie parentérale régulent la vitesse de libération du médicament à l'aide de polymères biodégradables **(Hussain & Jabbar, 2021).**

Dans la continuité de ces applications, l'ajout d'α-amylase aux comprimés d'amylose réticulée (CLA) peut moduler la cinétique de libération des médicaments **(Mobini-Dehkordi & Afzal Javan, 2012).**

Par ailleurs, l'industrie pharmaceutique utilise des formes pures d'alpha-amylase dans ses produits, qui traitent principalement les troubles digestifs grâce à leurs propriétés digestives efficaces, facilitant ainsi la digestion des aliments dans l'organisme **(Gayathri & Preetha, 2025).**

Les enzymes digestives sont des catalyseurs biologiques qui hydrolysent les macromolécules alimentaires (protéines, glucides, lipides) en formes absorbables. Elles fonctionnent de manière optimale selon des conditions spécifiques de pH et de température **(James, 2024).**

Parmi ces enzymes, certaines sont spécifiques aux disaccharides et comprennent la sucrase, la tréhalase et la lactase, qui hydrolysent respectivement le saccharose, le tréhalose et le lactose en monosaccharides **(Borowitz, 2025).**

Les polysaccharides, tels que l'amidon, sont dégradés par les amylases, appartenant aux glycosides hydrolases, qui catalysent l'hydrolyse des glucides complexes **(Tiwari et al., 2015).** Les amylases se divisent en trois classes principales : α, β et γ **(Azzopardi et al., 2016).**

L'α-amylase (1,4-α-D-glucan-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) est la principale enzyme digestive des glucides complexes, présente chez les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons. Elle hydrolyse l'amidon en produisant du maltose, du maltotriose et des dextrines, ceux-ci sont ensuite dégradés en monosaccharides par la maltase et l'isomaltase intestinales. L'hydrolyse enzymatique constitue l'étape limitante dans l'absorption des glucides complexes chez l'homme **(Williams, 2017).**

Chez les animaux, l'α-amylase se trouve dans le pancréas, la parotide, le sérum, l'urine et parfois en petites quantités dans d'autres tissus ou tumeurs ; les principales protéines amylases salivaires et pancréatiques sont très similaires. L'amylase salivaire initie la digestion des glucides dans la bouche, tandis que l'amylase pancréatique est l'enzyme principale pour la digestion luminale des glucides dans l'intestin grêle **(Williams, 2017).**

Les molécules telles que l'amidon sont volumineuses, ce qui explique qu'elles ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ainsi, l'enzyme α-amylase convertit la molécule complexe et volumineuse de l'amidon en petits fragments de sucre afin de les rendre capables de traverser la BHE. Lorsque l'excès d'amidon commence à se convertir en fragments de sucre plus simples, cela augmente le taux de glucose dans le sang. Les niveaux de glucose postprandial sont également augmentés par l'α-amylase. Cette augmentation répétée de la glycémie postprandiale contribue au développement du diabète de type 2.

Par conséquent, des inhibiteurs de l'α-amylase sont utilisés comme agents antidiabétiques afin de réduire l'activité de cette enzyme. Ces inhibiteurs constituent de bonnes cibles pour le traitement de troubles tels que le diabète et l'obésité. Ils créent un environnement dans l'organisme qui retarde la dégradation des glucides et réduit les niveaux de glucose postprandial **(Kaur et al., 2021).**

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales sont largement utilisées dans les systèmes de médecine traditionnelle à travers le monde pour le traitement du diabète. De nombreuses études ont recensé des espèces végétales possédant une activité hypoglycémiante, Il a été rapporté que plus de 1 200 espèces, appartenant à 183 familles et 725 genres, sont utilisées pour traiter les symptômes liés au diabète, les familles les plus représentées étant les Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Liliaceae et Poaceae. Parmi les espèces les plus couramment utilisées figurent *Momordica charantia, Allium cepa, Aloe vera, Allium sativum, Catharanthus roseus, Syzygium cumini et Trigonella foenum-graecum* **(Jugran et al., 2021).**

De nombreuses revues ont également documenté l'usage des plantes antidiabétiques dans différentes régions du monde. Dans la médecine traditionnelle chinoise, 86 remèdes naturels sont utilisés contre le diabète. Les études ethnopharmacologiques menées en Amérique centrale, en Afrique du Nord, en Asie et en Afrique de l'Ouest ont confirmé l'usage local de nombreuses espèces végétales pour la prise en charge du diabète **(Tableau 1) (Jugran et al., 2021).**

Tableau 1 : liste de quelques plantes antidiabétiques et leurs métabolites actifs (**Rani et al., 2017)**

Famille	Nom botanique	Nom commun	Partie utilisée	Métabolites actifs
Apiaceae	*Coriandrum sativum*	*Coriander*	Feuille	Alanine
	Cuminum cyminum	*Cumin*	Graine	Aldéhyde
Cactaceae	*Opuntia dillenii*	*Prickly pear*	Fruit	Polysaccharide
Araliaceae	*Panax ginseng*	*Ginseng fruit*	Extrait de baie	Saponine
Rutaceae	*Citrus reticulate*	*Mandarin*	Fruit	Huille essentielle
Fabaceae	*Acacia arabica*	*Indian gum arabic*	Graine, écorce	Polyphénol, tannin
Luraceae	*Persea americana*	*Avocado*	Fruit	Matières grasses, protéines, vitamines, minéraux

En Algérie, de nombreux patients utilisent des plantes médicinales pour traiter divers maux et maladies graves, tels que le diabète et l'hypertension artérielle **(Azzi et al., 2012).** Dans ce contexte, les investigations ethanobotaniques menées par **Hamza et al. (2019)** révélent une riche diversité phytothérapeutique, avec 171 espéces médicinales utilisées dans le traitement du diabétes à l'échelle nationale, couvrant l'Ouest, le Centre-Nord, le Nord-Ouest, l'Est ainsi que le Sahara central**.**

Le tableau suivant présente les plantes médicinales employées dans la prise en charge du diabète en Algérie, telles que rapportées par différentes études ethnobotaniques.

Tableau 2 : Plantes utilisées dans le traitement du diabète en Algérie, citées dans des études ethnobotaniques **(Hamza et al., 2019).**

Famille	Nom de la plante	Nom local algérien	Partie utilisée	Méthode de préparation traditionnelle	Références
Amaranthaceae	*Arthrophytum scoparium*	Remt	Tiges	Infusion	**Allali et al. (2008)**
Fabaceae	*Trigonella foenum-graecum L.*	Halba	Graines	Décoction, Macération, poudre	**Azzi et al. (2012)**
Myrtaceae	*Eucalyptus globulus* labill	Kalitous	Feuilles	Décoction	**Telli et all. (2016)**
Oleaceae	*Olea europeae* L.	Zitoune	Feuilles	Décoction	**Boudjelal et al. (2013)**
Malvaceae	*Hibiscus sabdariffa L.*	Kerkodia, gerga	Tiges	Macération	**Kemassi et al. (2014)**
Zingiberaceae	*Zingiber officinalle Roscoe*	Zinjabil, skinjebir	Rhizome	Infusion	**Telli et al. (2016)**

Notre étude est consacrée à l'espèce *Schinus molle*, de la famille des Anacardiacées, aussi appelé faux-poivrier, fréquemment cultivé comme arbre ornemental dans la région méditerranéenne **(Salem et al., 2016)**

Sa classification taxonomique est la suivante **(Kasimala & Kasimala, 2012) :**

- **Règne :** Plantae
- **Sous-règne :** Tracheobionta
- **Super-division :** Spermatophyta
- **Division :** Magnoliophyta
- **Classe :** Magnoliopsida
- **Sous-classe :** Rosidae
- **Ordre :** Sapindales
- **Famille :** Anacardiaceae
- **Genre :** *Schinus*
- **Espèce :** *Schinus molle L.*

Cette espèce végétale, est originaire d'Amérique du Sud (du Pérou, du nord du Chili et du sud du Brésil jusqu'au nord-est de l'Argentine) **(Fonseca & Huerta-Reyes, 2025)**, mais elle se retrouve également dans les régions subtropicales et tropicales des États-Unis et d'Afrique **(Belhoussaine et al., 2024).** Elle est connue sous plusieurs noms : En arabe, elle est désignée par felfel kazib et filfil rafi‘, tandis qu'en anglais, elle est appelée pepper tree, California pepper tree, Chilean pepper tree, mastic tree, molle, pepper berry tree ou weeping pepper **(Ibrahim & Al-Naser, 2014).**

Schinus molle est un arbre qui peut atteindre jusqu’à 10 m de hauteur et se reconnaît à ses branches fines et pendantes, avec des feuilles persistantes et retombantes. Son tronc est court, avec une écorce brun foncé, profondément fissurée et qui s’écaille ; lorsqu’elle est endommagée, elle exsude un latex collant **(Figure 03) (Kasimala & Kasimala, 2012).**

Les feuilles sont composées, pennées, de 15 à 30 cm de long, avec 15 à 41 folioles. Les folioles sont jaune-vert, de 2 à 5 cm de long, lancéolées, à bords entiers ou dentés. Elle dégagent une odeur poivrée lorsqu’elles sont froissées **(Figure 3) (Kasimala & Kasimala, 2012).**

Les fleurs sont unisexuées, petites et jaune pâle, disposées en panicules de 10 à 15 cm de long. Les fleurs mâles et femelles poussent normalement sur des arbres différents. Dans l’aire de répartition naturelle, la floraison a lieu de septembre à décembre et les fruits mûrissent en décembre–janvier. En Afrique de l’Est, les fruits sont récoltés en mars. Tous les fruits ne mûrissent pas en même temps et, au sein d’une même grappe, ils sont souvent à différents stades de maturité **(Kasimala & Kasimala, 2012).**

Les fruits sont de petites drupes rondes, de 5 à 9 mm de diamètre, rouge vif à maturité, puis noirs. La pulpe est fine et coriace, a un goût sucré et contient des huiles aromatiques. Chaque fruit contient une ou deux graines, rondes, brun-noir, sillonnées lorsqu’elles sont sèches, mesurant 2 à 4 mm de diamètre **(Figure 3) (Kasimala & Kasimala, 2012).**

Cette espèce peut s’adapter à des conditions climatiques extrêmes, à la sécheresse et au gel. Elle pousse dans différents types de sols, y compris salins et alcalins **(AL-Andal & Moustafa, 2018).**



L'arbre *Schinus molle*



Ecorce de *S. molle*



Feuilles pennées *S. molle*



Fruits de *S. molle*

Figure 3 : Les différentes parties de *Schinus molle* **(Kasimala & Kasimala, 2012)**

Le Schinus molle renferme plusieurs groupes de métabolites importants. Les flavonoïdes sont principalement représentés par la catéchine et la quercétine 3-O-glucuronide **(Bvenura & Kambizi, 2022).** Les acides phénoliques sont dominés par l'ester féruloyltartrique A **(Bvenura & Kambizi, 2022).** Les tanins comprennent surtout l'acide digalloylshikimique B et l'acide digalloylquinique **(Bvenura & Kambizi, 2022).**

L'huile essentielle extraite des fruits est très riche en α-phellandrène, le β-phellandrène, le β-pinène, le p-cymène et l'α-pinène **(Al-Andal & Moustafa, 2019).**

Les métabolites primaires du *Schinus molle* sont constitués de cendres (17,13 %), de protéines (12,13 %), de matières grasses (22,11 %) et de glucides (37,12 %) **(Belhoussaine et al., 2022).**

Schinus molle est aujourd'hui largement répandu dans le monde en tant qu'arbre ornemental et a été traditionnellement utilisée à des fins médicinales. En cuisine traditionnelle, les graines de *S. molle* sont utilisées comme substitut au poivre noir **(Shehata et al., 2025).**

Elle est largement utilisée comme arbre urbain en raison de sa résistance à la pollution, de sa propagation facile et économique, ainsi que de ses faibles besoins en irrigation **(Kasimala & Kasimala, 2012).**

Schinus molle présente divers effets biologiques, notamment des propriétés antitumorales, anti-inflammatoires et antispasmodiques.

Sur le plan ethnopharmacologique, cette plante est largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter de nombreuses affections, telles que le rhume, l'asthme, la toux, la diarrhée, la dysenterie, les hémorragies, la laryngite, les maux de gorge, les spasmes et les troubles de la trachée. Elle est également employée comme vermifuge. Dans la médecine populaire brésilienne, différentes parties de *S. molle* sont utilisées pour traiter les ulcères, les problèmes respiratoires, les plaies, les rhumatismes, la goutte, les maladies de peau et les maux de dents **(Salem et al., 2016).**

Les extraits de la plante, appliqués localement, ont démontré des activités antiviral, antifongique, anti-inflammatoire, antioxydante, antitumorale, astringente, antispasmodique, stimulante digestive, tonique, cicatrisante, diurétique, analgésique, stimulante et antidépresseur **(Salem et al., 2016).**

L'huile extraite des graines de *S. molle* possède des propriétés physiques et chimiques qui la rendent adaptée à des applications industrielles dans les domaines alimentaire, cosmétique et pharmaceutique**(Calderon et al., 2025)**. En raison de ses effets antibactériens et antiseptiques, la plante a également été utilisée pour le traitement des plaies et des infections, y compris l'ophtalmie.

Enfin, malgré sa saveur douce, *S. molle* est parfois consommée comme boisson au Pérou **(İlgün et al., 2023).**

Les études sur *Schinus molle* sont étroitement liées à ses diverses activités biologiques :

L'activité antioxydante de *Schinus molle* a été évaluée dans plusieurs études *in vitro* utilisant les tests DPPH, ABTS et FRAP. Les extraits méthanoliques des graines et des feuilles ont montré une capacité significative de piégeage des radicaux libres, dépendante de la concentration. Bien que l'acide ascorbique ait présenté l'activité antioxydante la plus élevée, les extraits de graines et de feuilles ont également révélé des niveaux élevés d'activité antioxydante. D'autres travaux ont montré que l'extrait aqueux des racines présente une forte activité antioxydante selon les méthodes DPPH et FRAP. Les valeurs d'CI_{50} obtenues confirment l'efficacité antioxydante des différents extraits de *Schinus molle*. Ces résultats indiquent que cette plante constitue une source naturelle importante de composés antioxydants capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène **(Shehata et al., 2025).**

L'activité antimicrobienne des extraits de graines et de feuilles de *Schinus molle* a été évaluée contre plusieurs souches cliniques et souches standard de bactéries et de champignons. Les extraits méthanoliques des graines ont montré une forte activité contre les micro-organismes testés, incluant les bactéries Gram-positives et Gram-négatives ainsi que les champignons. Les huiles essentielles des feuilles et des fruits ont également présenté une activité antibactérienne, notamment contre des souches résistantes aux antibiotiques **(Shehata et al., 2025).**

Schinus molle a fait l'objet de plusieurs études mettant en évidence ses propriétés anticancéreuses. Des extraits méthanoliques ainsi que des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles, des fruits et de la résine de cette plante ont montré une activité contre différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, notamment les cancers du foie, du sein, du côlon, ainsi que certaines lignées leucémiques. Ces résultats confirment le potentiel anticancéreux de *Schinus molle* et soulignent son intérêt en tant que source de composés bioactifs **(AL-Andal & Moustafa, 2018).**

Les études réalisées par **Machado et al**. **(2007)** ont montré que les extraits hexaniques et éthanoliques des feuilles de *Schinus molle* présentaient une activité antidépresseur lors du test de suspension par la queue chez les souris**.**

Selon **Zahed et al. (2010),** les huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Schinus molle* exercent une activité allélopathique, dose-dépendante, sur la germination des graines de blé et la croissance des racines.

Les études réalisées sur *Schinus molle* ont clairement mis en évidence son potentiel anti-inflammatoire. Les extraits et fractions obtenus à partir des fruits, des graines et des feuilles ont montré une activité anti-inflammatoire notable, caractérisée par des effets dose-dépendants et des inhibitions significatives de l'inflammation. Certaines fractions ont présenté une efficacité comparable, voire supérieure, à celle des médicaments anti-inflammatoires de référence, confirmant ainsi l'intérêt de *Schinus molle* comme source naturelle d'agents anti-inflammatoires **(Fonseca & Huerta-Reyes, 2025).**

Les extraits hydroalcooliques des feuilles et des fruits de *S. molle* ont montré d'importantes propriétés hépatoprotectrices et antidiarrhéiques. Ces effets pourraient être attribués à la présence de composés phytochimiques, notamment des glycosides, des énorphines, des pyrènes, des phénols, des tanins, des alcaloïdes, des saponines et des phytostérols, agissant individuellement ou en synergie. Ces résultats apportent un soutien scientifique à l'usage traditionnel des feuilles et des fruits de *S. molle* comme remède contre les maladies hépatiques et diarrhéiques **(Belayneh et al., 2024).**

Les extraits des feuilles et des fruits de *Schinus molle* ont montré des propriétés répulsives et insecticides contre plusieurs espèces d'insectes. Différents types d'extraits, notamment les huiles essentielles et les extraits hexaniques, aqueux ou éthanoliques, ont démontré leur efficacité pour repousser les insectes ou réduire leur alimentation. **(Al-Andal & Moustafa, 2018).**

La plante *S. molle* a montré des propriétés d'inhibition enzymatique sur l'α-amylase, ce qui en fait un candidat potentiel comme alternative future dans le traitement du diabète, avec l'avantage de posséder des effets antidiabétiques à cibles multiples **(Fonseca & Huerta-Reyes, 2025).**

Les études réalisées sur *Schinus molle* montrent que l'huile essentielle des feuilles entraîne une activation du système immunitaire. Cette activation repose sur la cascade oxyde nitrique–interleukine-10–facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α) **(Duarte et al., 2018).**

Les grappes pendantes de petites baies roses de cet arbre ornemental attrayant sont réputées modérément toxiques, en particulier les graines. Le pollen, par contact ou inhalation, peut provoquer des dermatites et des réactions asthmatiques. L'arbre possède également des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, piscicides et virucides **(Kasimala & Kasimala, 2012).**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la production et à la purification de l'α-amylase, ainsi qu'à l'évaluation de son inhibition par les extraits aqueux des fruits de *Schinus molle*, afin d'explorer leur potentiel antidiabétique et leur valorisation en tant que complément d'origine naturelle.

À cet égard, notre travail de recherche avait pour objectifs de :

- Extraire l'α-amylase à partir d'une source microbienne, *Aspergillus niger*.
- Étudier l'activité enzymatique de l'α-amylase extraite d'*Aspergillus niger*, la comparer à celle d'une α-amylase commerciale, et déterminer leurs paramètres cinétiques (Km et Vmax), ainsi que leurs activités catalytique et spécifique.
- Préparer des extraits aqueux bruts des fruits de *Schinus molle* par macération et décoction.
- Réaliser des analyses phytochimiques ainsi que le dosage quantitatif des composés phénoliques des extraits aqueux obtenus.
- Évaluer l'effet inhibiteur des extraits aqueux des fruits de *Schinus molle* sur l'activité de l'α-amylase.
- Étudier l'effet hémolytique des extraits aqueux des fruits de *Schinus molle*.
- Réaliser une étude de docking moléculaire afin d'analyser les interactions entre les composés bioactifs identifiés dans les fruits de *Schinus molle* et l'α-amylase.

Partie II :

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche : « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique », et le laboratoire « Produits naturels » faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

Cette étude a pour objectif d'évaluer la cinétique et l'activité enzymatique de l'α-amylase extraite d*'Aspergillus niger*, en la comparant à une α-amylase commerciale. Elle vise également à étudier la composition phytochimique des extraits bruts obtenus par macération et décoction des fruits de *Schinus molle*, à évaluer leurs activités inhibitrices vis-à-vis l'α-amylase, à analyser leurs effets hémolytiques et à réaliser une étude de docking moléculaire.

Le protocole expérimental est structuré en trois parties :

• **Partie *in vitro* :**

- Extraction de l'α-amylase à partir d'*Aspergillus niger ;*
- Étude de la cinétique enzymatique des enzymes α-amylase (extraite d*'Aspergillus niger* et commercialisée) et comparaison de leurs activités enzymatiques ;
- Préparation des extraits aqueux à partir des fruits de *Schinus molle ;*
- Analyse phytochimique qualitative et quantitative des extraits préparés ;
- Évaluation de l'activité inhibitrice de l'α-amylase,

• **Partie *ex vivo* :**

- Évaluation de l'effet hémolytique des extraits aqueux.

• **Partie *in silico* :**

- Réalisation d'une étude de docking moléculaire afin d'évaluer les interactions entre les composés bioactifs identifiés dans les fruits de *Schinus molle* et l'α-amylase.

1. Origine de la souche fongique

1.1. *Aspergillus niger*

La souche fongique *Aspergillus niger* a été isolée à partir d'un échantillon de sol. Dans le cadre de cette étude, les prélèvements ont été réalisés dans une région aride de Ghardaïa, située à environ 600 km au sud d'Alger, caractérisée par un climat désertique chaud **(Figure 4)**.

Le sol a été prélevé à une profondeur d'environ 10 cm à l'aide d'une spatule stérile, puis transféré dans un sac stérile pour être acheminé au laboratoire.

Le prélèvement et l'isolement de la souche ont été effectués par le Pr. BELYAGOUBI Larbi, au Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.



Figure 4 : Région de Ghardaïa (Zone de prélèvement de la souche fongique *Aspergillus niger*).

1.2. Ensemencement

La souche a été ensemencée à la surface du milieu de culture gélosé PDA (Potato Dextrose Agar), par la méthode de touche, à l'aide d'une anse de platine. L'ensemencement a été réalisé en quatre points uniformément répartis, afin d'assurer une distribution homogène.

Les boîtes ont ensuite été incubées à 25 °C pendant 5 jours, jusqu'à l'apparition de colonies fongiques bien développées et pures.

1.3. Identification de l'isolat fongique sélectionné

L'identification de l'isolat fongique a été réalisée par un examen morphologique, visant à observer ses caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

1.4. Observation microscopique

L'identification microscopique de la moisissure repose sur la méthode du scotch (test du drapeau), utilisée pour les cultures filamenteuses et poudreuses, ainsi que sur la coloration au lactophénol-bleu de coton.

Un petit fragment de scotch est appliqué, par sa face adhésive, sur la surface de la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte-objet. Une goutte de colorant (bleu de coton) est ensuite ajoutée. L'ensemble est recouvert d'une lamelle couvre-objet, permettant d'écraser légèrement la préparation et d'assurer une bonne observation microscopique (**Chabasse *et al.*, 2002**) (**Figure 5**).

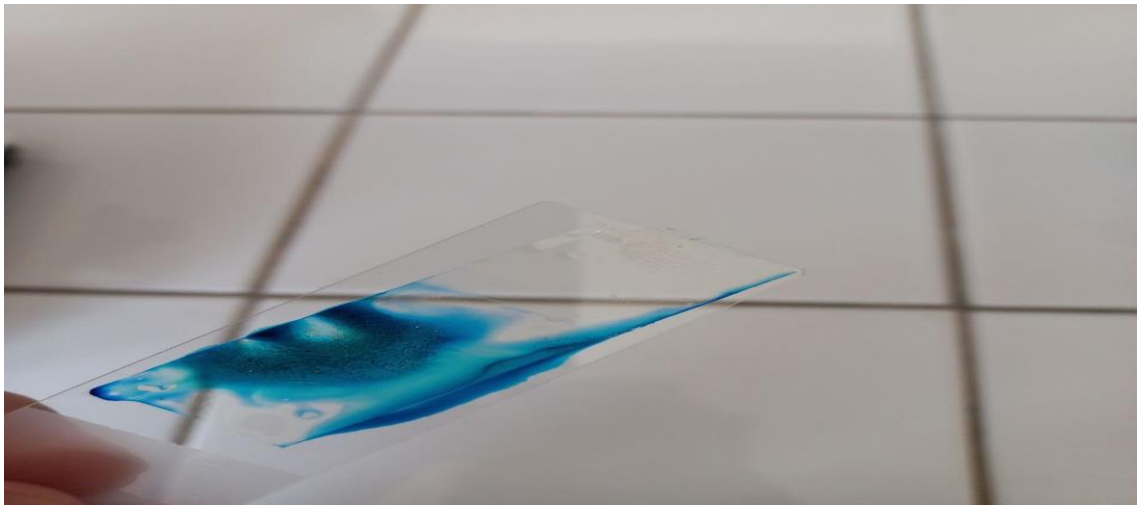


Figure 5 : Méthode de scotch **(LAPSAB, 2026)**

2. Production de l'α-amylase d'origine fongique : Extrait d'*Aspergillus niger* (fermentation en milieu liquide)

2.1. Préparation du milieu de culture liquide

Un milieu de culture liquide a été préparé à partir de PDB (Potato Dextrose Broth) : Des morceaux de pomme de terre ont été introduits dans de l'eau distillée, puis portés à ébullition afin d'extraire les nutriments solubles et d'obtenir un extrait de pomme de terre.

Ensuite, 40 g de saccharose ont été ajoutés comme source de carbone, et 1,5 ml de l'acide lactique dilué à 25 % a été incorporé afin de limiter les contaminations bactériennes. Le mélange

a été soigneusement agité pour assurer une homogénéisation complète des constituants puis stérilisé à 120°C pendant 20min.

L'extrait de pomme de terre constitue une source riche en hydrates de carbone, tandis que les autres nutriments ajoutés créent un environnement favorable au développement d'*Aspergillus niger*.

➢ **Inoculation de la souche**

Après incubation, les boîtes de Pétri présentant une croissance active d'*Aspergillus niger* ont été utilisées comme source d'inoculum. Un disque de 5 mm de diamètre a été prélevé à partir de la colonie, puis introduit dans chaque erlenmeyer contenant le milieu liquide stérile PDBac. Cette étape permet d'ensemencer le milieu de fermentation à partir d'une culture pure préexistante.

➢ **Incubation**

Les erlenmeyers contenant les cultures inoculées ont été placés dans un incubateur réglé à 25±2°C, température optimale de croissance pour *Aspergillus niger*. La fermentation a été conduite pendant 7 jours afin de permettre le développement de la souche et la production d'α-amylase (**Figure 6**).

Durant cette phase, un suivi régulier a été assuré, incluant l'observation visuelle de l'aspect du milieu de culture afin de détecter tout changement significatif, ainsi que l'évaluation de sa turbidité



Figure 6 : Croissance *d'Aspergillus niger* après 7 jours d'incubation sur un milieu fermentaire à base de la pomme de terre (PDBac.) **(LAPSAB, 2026)**

2.2. Précipitation et purification de l'enzyme

Après la période d'incubation, la suspension obtenue est filtrée **(Figure 7).**



Figure 7 : Filtration de la suspension après incubation **(LAPSAB, 2026)**

La précipitation des protéines est réalisée, en ajoutant progressivement le sulfate d'ammonium, jusqu'à 35 %. Après incubation à 4°C pendant 2 heures, le mélange est centrifugé à une vitesse de 4000 tr/min pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est recueilli (extrait protéique) pour l'étude de la cinétique enzymatique de l'alpha amylase. **(Figure 8).**

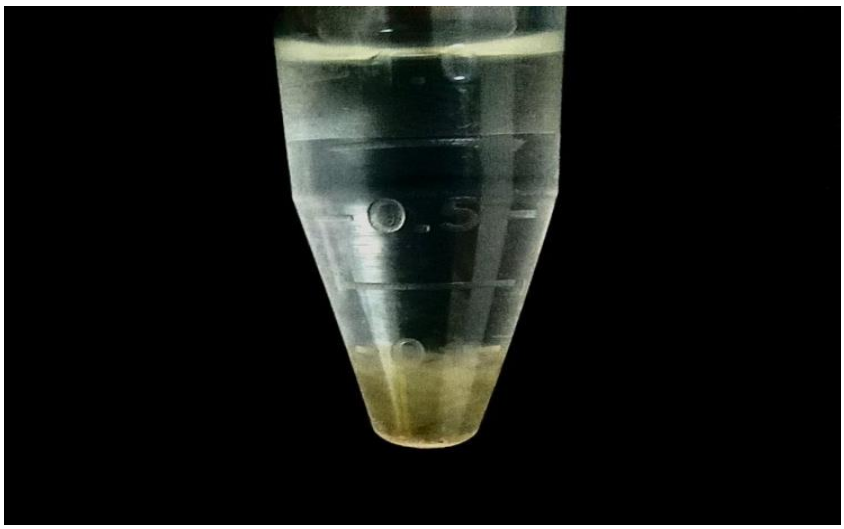


Figure 8 : L'extrait enzymatique issu de la centrifugation **(LAPSAB, 2026).**

3. Evaluation de l'activité enzymatiques

Deux enzymes d'α- amylase ont été utilisées dans cette partie : α -amylase extraite d'origine fongique d'*Aspergillus niger*, et α -amylase commercialisée d'origine fongique, purifiée à partir d'*Aspergillus niger*.

3.1. Préparation des solutions

3.1.1. α-amylase commercialisé *Aspergillus niger*

L'α-amylase commercialisé utilisée comme référence est d'origine fongique *Aspergillus niger* (E.C.3.2.1.1). Elle a été solubilisée dans une solution tampon PBS (0,02M, pH 6,9).

3.1.2. α-amylase extraite d'*Aspergillus niger*

L'extrait enzymatique récupéré sous forme de poudre a été solubilisé dans une solution tampon PBS (0,02M, pH 6,9).

3.1.3. Préparation du substrat (amidon soluble)

Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre. 2,5 g d'amidon soluble a été dissout dans 100 ml de solution tampon phosphate (0,02M, pH 6,9). L'ensemble a été chauffé à une température de 50-70°C, sous agitation.

3.1.4 Préparation du 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)

Une solution chromogène a été préparée en utilisant le 3,5-dinitrosalicylique (DNSA), le NaOH (2N) et le tartrate double de sodium et de potassium suivant le protocole décrit par Sigma Aldrich :

- 1g de DNSA est dispersé dans 40 ml d'eau distillée. La solution obtenue est de couleur jaune opaque ;
- En parallèle, une solution de NaOH (2N) a été préparée dans 20 ml d'eau distillée nous avons ensuite dissous 30 g de tartrate double de sodium de potassium sous agitation ;
- Une fois les deux solutions sont mélangées, le réactif devient limpide avec une couleur orange ;
- Le volume final est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C.

3.2. La cinétique enzymatique

- **Principe**

Le principe fondamental de ce mode opératoire réside dans la création de diverses concentrations de substrat dans un environnement expérimental contrôlé.

En ajustant les proportions d'enzyme et de substrat dans chaque tube, nous visons à observer comment la variation de la concentration de substrat affecte la réaction enzymatique. Cette approche permet d'évaluer la cinétique de la réaction et d'analyser les tendances observées.

Cette méthode consiste à évaluer l'activité enzymatique des enzymes α-amylases d'origine fongique.

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

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel **(Thalapaneni et al., 2008).**

- **Protocole**

Nous avons testé les deux enzymes d'origine fongique et commercialisée d'origine *Aspergillus niger.*

Pour chaque enzyme, quatre tubes de différentes concentrations sont préparés à partir de la solution d'amidon soluble (2,5%) afin d'évaluer la réaction enzymatique.

Dans le premier tube, de concentration de 1% est obtenue en mélangeant 0,5 ml d'enzyme α- amylase avec 1 ml d'amidon (2,5%) et 1ml tampon (PBS).

Le deuxième tube, de concentration 0,75%, est constitué en ajoutant 0,5 ml d'enzyme α-amylase à un mélange de 1,25 ml de solution tampon phosphate salin (PBS) et 0,75ml d'amidon (2,5%).

Le troisième tube, de concentration 0,5 %, est réalisés par l'introduction de 0,5 ml d'enzyme, de 1,5 ml de solution tampon PBS et 0,5 ml d'amidon (2,5%).

Le quatrième tube, de concentration 0,25 %, est préparé en ajoutant 0,5 ml d'enzyme α-amylase à un mélange de 1,75 ml de solution tampon phosphate salin (PBS) et 0,25 ml d'amidon (2,5%).

Chaque tube est incubé à une température de 37°C pendant 15 minutes avec agitation.

Un prélèvement de 500 µl du milieu réactionnel, pour chaque concentration, a été réalisé en quatre temps (4,8,12,16 min). 1 ml de DNSA a été ajouté à chaque tube,

Les tubes sont introduits dans un bain marie bouillant pendant 5 min et déposé après dans un bain glaçant ce qui provoque un choc thermique conduisant à l'arrêt de la réaction et au dosage des sucres réducteurs (dont le maltose) par le DNSA**.**

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm, contre un blanc de la réaction, pour chaque concentration, contenant 0,5 ml de PBS au lieu de 0,5 ml d'extrait enzymatique.

La réaction enzymatique est répétée 3 fois pour chaque enzyme.

- **Expression des résultats**

3.2.1. Dosage du maltose, produit de la réaction enzymatique

Le maltose est le sucre produit de la réaction enzymatique de substrat (Amidon soluble) et leur enzyme α-amylase :

• A partir d'une solution mère aqueuse du maltose à 0,2%, des solutions filles sont ainsi préparées à des concentrations allant de 0,025 g/l jusqu'à 0,2 g/l ;

• 1 ml du réactif DNSA est ajouté à chaque tube ;

• L'ensemble est porté à l'ébullition (100°C) durant 5min ;

• Après refroidissement, le mélange est complet en ajoutant 3 ml par l'eau distillée ;

• La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm contre un blanc **(Tableau 3).**

L'équation de régression linéaire (y=11,744x, R^2 0.997) est utilisée pour déterminer les concentrations des produits obtenus dans chaque tube des réactions enzymatiques étudiée **(Figure 9).**

Tableau 3 : Gamme d'étalonnage pour le dosage du maltose produit par les réactions enzymatiques.

Tubes	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Concentration de maltose (g/l)	0	0,025	0,05	0,075	0,1	0,15	0,2
Volume de maltose (ml)	0	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2
Volume d'eau distillée (ml)	2	1,75	1,5	1,25	1	0,5	0
DNSA (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Agiter et incubé à 100°C pendant 5 min							
Eau distillée (ml)	3	3	3	3	3	3	3
Agiter et mesurer l'absorbance à 540nm							

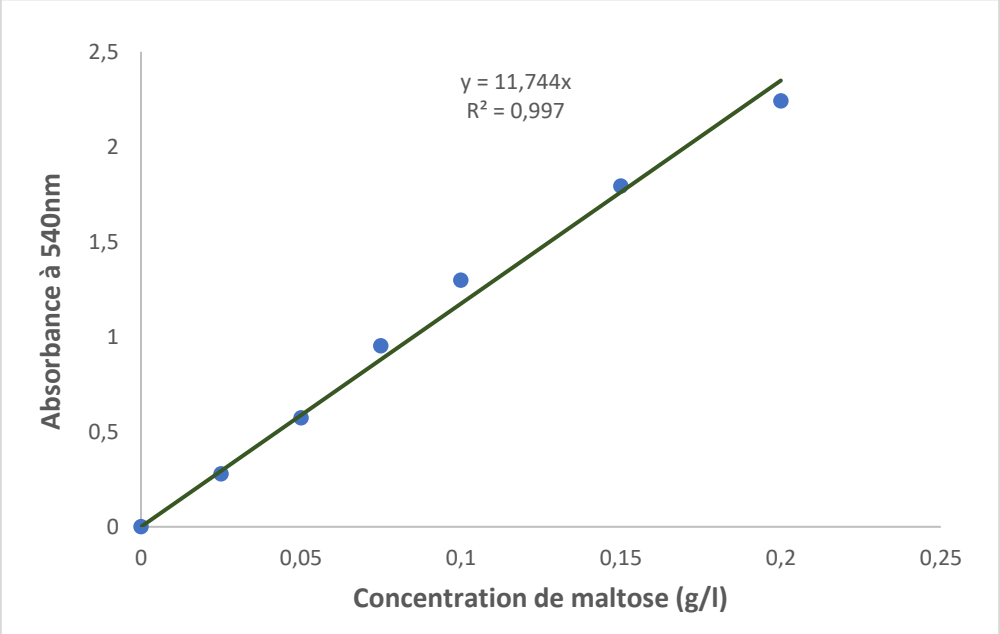


Figure 9 : La courbe d'étalonnage du maltose

3.2.2 Dosage des protéines par la réaction du biuret

La réaction du biuret est caractéristique de la liaison peptidique, c'est une réaction très générale des protéines. Elle consiste en la formation d'un complexe coloré bleu-violet par les protéines et le sulfate de cuivre en milieu alcalin. L'intensité de la coloration de ce complexe est proportionnelle à la concentration en protéines.

Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir de la gélatine (10g/l) :

- 4 ml du réactif Biuret est ajouté à 1ml de chaque concentration de la gélatine préparée ;
- L'ensemble est incubé à température ambiante, pendant 20 min ;
- L'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un colorimètre contre un blanc contenant l'eau distillée **(Tableau 4).**

La concentration des protéines dans l'extraits enzymatiques préparés est calculée à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage (y=0,085x, R^2 0.9927) des concentrations de la gélatine en fonction des absorbances mesurés **(Figure 10).**

Tableau 4 : Gamme d'étalonnage pour la détermination de la concentration des protéines

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6
Concentration protéines (g/l)	0	2	4	6	8	10
Volume de solution mère (ml)	0	2	4	6	8	10
Volume d'eau distillée (ml)	10	8	6	4	2	0
Réactif Biuret (ml)	4	4	4	4	4	4
	Incubation à température ambiante durant 20 min					
	Lecture des absorbances à 540nm					

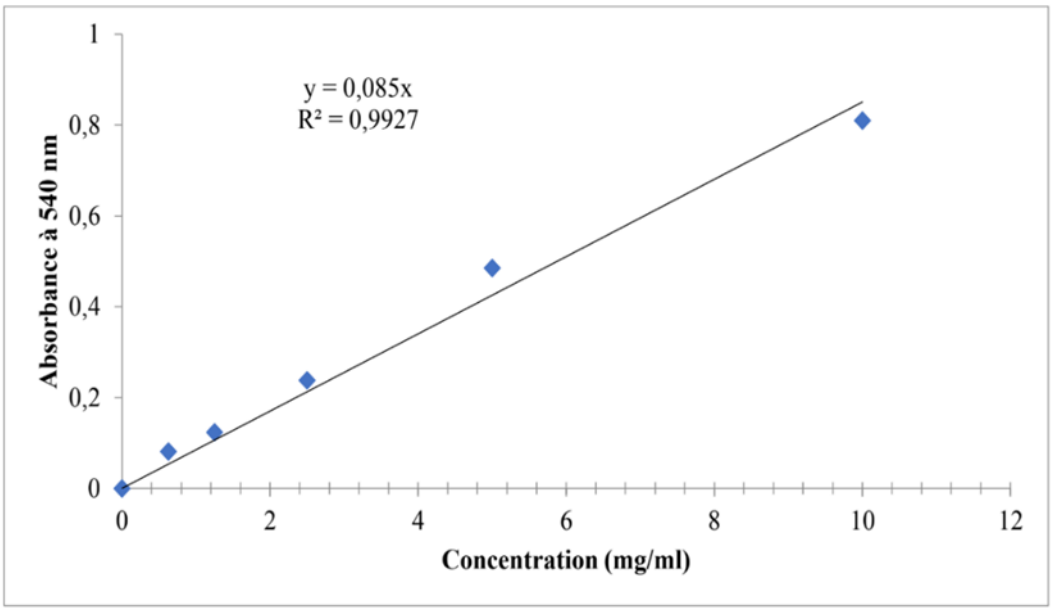


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de gélatine pour le dosage des protéines.

3.3. Détermination de l'activité de l'α-amylase (Km et Vmax)

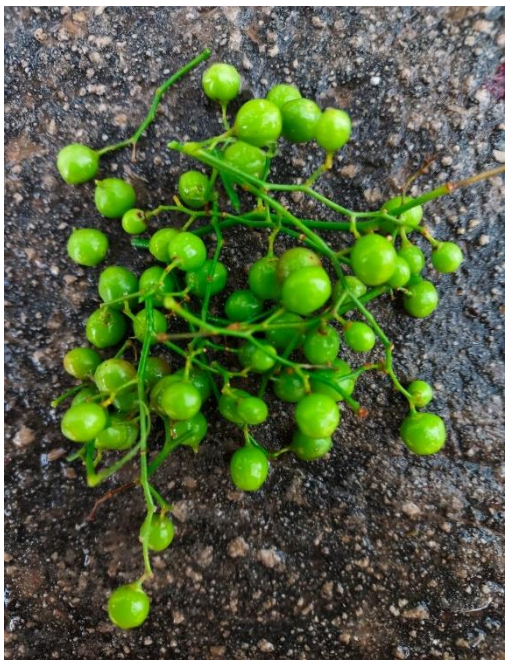
Pour la détermination des paramètres cinétiques (Km et Vmax) de chaque enzyme étudiée, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Tracer les courbes cinétiques, concentrations du produit en fonction du temps, de chaque dilution d'amidon ;
- Déterminer la vitesse initiale (Vi) pour chaque courbe à partir des équations de régression linéaire de chaque enzyme et chaque concentration substrat ;
- Représenter graphiquement 1/Vi= f (1/ [S]) (Présentation de Lineweaver-Burk).
- Déterminer graphiquement les paramètres cinétique Km et Vmax.
- Déterminer l'activité catalytique et spécifique.

4. Extraction de la plante *Schinus molle*

4.1. Matériel végétal

Les fruits immatures **(Figure 11 (a))** et mûrs (**Figure 11 (b))** du faux poivrier (*Schinus molle*) ont été récoltés dans la région de Maghnia (wilaya de Tlemcen) au mois de mars 2026. Ils ont ensuite été broyés manuellement à l'aide d'un mortier.



Figure(a): les fruits immatures

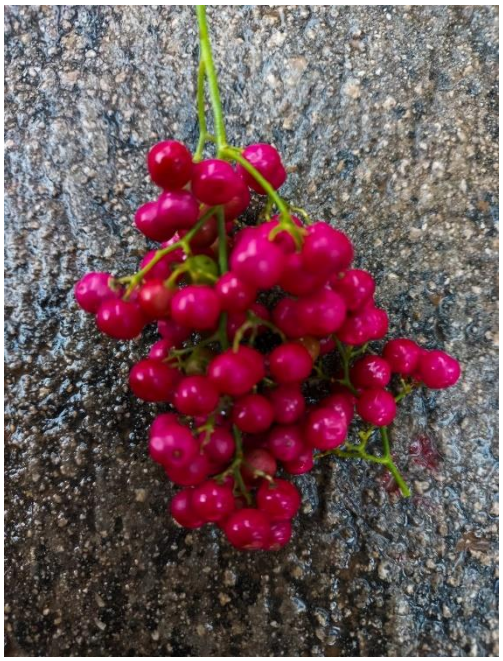


Figure (b) : les fruits mûrs

Figure 11 : Les fruits de *Schinus molle* récoltés dans la région de Maghnia (wilaya de Tlemcen)

4.2. Extraction et préparation des extraits

4.2.1. Macération

- Dans un Erlenmeyer, mélanger 10 g des fruits mûrs et immature broyés avec 200 ml d'eau distillée ;
- Laisser le mélange macéré à température ambiante pendant 48 heures ;
- Filtrer le mélange à l'aide d'un papier filtre et récupérer le filtrat ;
- Les extraits obtenus (EBM FR, EBM FV) sont ensuite mis dans une étuve jusqu'à séchage à 37°C pour obtenir un extrait sec.

Ils sont conservés à 4°C dans des tubes Eppendorf jusqu'à leur utilisation pour les tests phytochimiques et biologiques.

4.2.2. Décoction

- Dans un ballon rodé surmonté dans réfrigérant, mélanger 10 g des fruits mûrs et immature broyés avec 200 ml d'eau distillée.
- Placer l'ensemble sous reflux dans un chauffe ballon pendant 45 min ;
- Filtrer le mélange à l'aide d'un papier filtre et récupérer le filtrat ;
- Les extraits obtenus (EBD-m FR, EBD-m FV) sont ensuite mis dans une étuve jusqu'à séchage à 37°C pour obtenir un extrait sec.

Ils sont conservés à 4°C dans des tubes Eppendorf jusqu'à leur utilisation pour les tests phytochimiques et biologiques, dosage des polyphénols totaux, des tanins et des flavonoïdes **(Figure 12).**



Figure 12 : Extraction par sous reflux **(LAPSAB, 2026)**

4.2.3. Calcul des rendements

Le rendement des extraits bruts obtenus à partir des fruits du faux poivrier préparés par macération et décoction est exprimé en pourcentage en calculant le rapport de la masse de l'extrait sec obtenue sur la masse de la matière végétale initiale.

Rendement des extraits (%) = (M1 / M0) × 100

M1 : masse en gramme « g » de l'extrait sec obtenu après séchage.

M0 : masse en gramme « g » du matériel végétal initiale.

5. Tests phytochimiques

Dans le but de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires dans les extraits des fruits mûrs et immatures du faux poivrier (*Schinus molle*), nous avons effectué une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration, de précipitation et d'observation sous lumière ultra-violette. Cette analyse été réalisée selon les techniques décrites par **Bruneton, (1999) Harbone (1998).**

5.1. Composés azotés

- **Les alcaloïdes :**

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5 ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl (1%) et ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et

0,5ml de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.

5.2. Les composés phénoliques

- **Les tanins :**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (1%). Le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

- **Les flavonoïdes :**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes.

- **Les quinones libres :**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres**.**

- **Anthraquinones**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1ml de NH_4OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

- **Les coumarines : Fluorescence UV**

Dans deux tubes à essai, introduire 1ml de l'extrait à analyser, prendre le premier comme témoin et ajouter à l'autre 0,1 ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

5.3. Composés terpéniques

- **Les saponines : test de mousse**

Dans un tube à essai, introduire 10 ml de l'extrait à analyser, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm de mousse indique la présence de saponines.

- **Terpénoïdes :**

Test de Slakowski : Dans un tube à essai, introduire 1 ml de l'extrait à analyser, ajouter 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marronne à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

Test de Librman-Burchard : dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,1 ml d'anhydre acétique et 0,1 ml d'acide sulfurique. Le mélange est incubé pendant 15 min. L'apparition d'une coloration allant du violet au bleu ou au bleu verdâtre indique la présence des terpénoïdes.

5.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5 ml réactif A et 0,5 ml réactif B) à 1 ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs**.**

6. Dosage des composés phénoliques

6.1. Dosage des polyphénols totaux

Afin de doser les polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée, nous avons suivis la méthode de dosage décrite par **Vermerius et Nicholson en 2006**. Le principe de cette méthode est basé sur une réaction de coloration par le réactif « Folin-Ciocalteu », de couleur jaune, composé de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_4$), Ce réactif induit l'oxydation des composés phénoliques et la formation d'un complexe bleu « tungstène (W_8O_{23}) - molybdènes (Mo_8O_{23}) ». L'absorbance est mesurée à 700nm.

Mode opératoire

- Mélanger 0,1 ml d'extrait (1mg/ml) avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2%) ;
- Agiter et incuber pendant 5 minutes ;
- Ajouter 0,1 ml de réactif Folin-Ciocalteu (1N) et incuber pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
- Mesurer l'absorbance à 700 nm contre un blanc **(Tableau 5)** ;
- Chaque essai est répété 3 fois.

En parallèle nous avons préparé une gamme d'étalonnage dans les mêmes conditions à partir d'acide gallique à différentes concentrations de 50 à 500 µg/ml.

Tableau 5 : Méthode de dosage des polyphénols totaux

	La gamme d'étalon (acide gallique)										**Extrait**
[*Acide gallique*] µg/ml	B	50	100	150	200	250	300	350	450	500	-
Acide gallique (ml)	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
Eau distillé (ml)	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrait (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Na_2CO_3 2% (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Agitation et incubation pendant 5 min											
Folin-Ciocalteau (1N) (1ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min											
Mesure de l'absorbance à 700 nm											

Expression des résultats

Les teneurs en polyphénols totaux sont déterminées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage obtenus. Elles sont exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg EAG/ mg ES) **(Figure 13).**

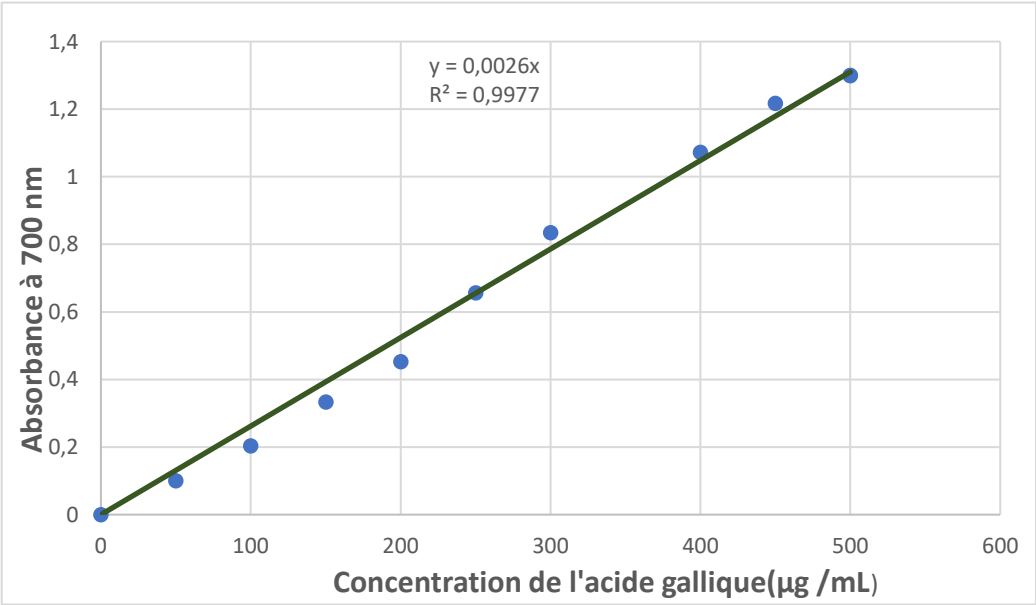


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

6.2. Dosage des flavonoïdes

Pour quantifier les flavonoïdes contenus dans les extraits de la plante étudiée nous avons réalisé une méthode de dosage colorimétrique selon **Zhishen et al., (1999).** Le principe de cette méthode se repose sur l'oxydation des flavonoïdes en milieu alcalin par le nitrite de sodium ($NaNO_2$) et le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) en composant un complexe de couleur rose absorbant à 510 nm.

Mode opératoire

- Mélanger 250 µl de l'extrait (1mg/ml) est mélangée avec 1 ml d'eau distillée et 75µl du réactif $NaNO_2$ à 15 % ;
- Laisser incuber pendant 6 min à température ambiante puis ajouter 75µl du réactif chlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 10% ;
- Après 6 min, 1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (4%) est ajouté. Le volume total est complété à 2,5 ml d'eau distillée ;
- Agiter le mélange et laisser incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min ;
- Mesurer l'absorbance à 510 nm **(tableau 6).**
- Chaque essai est répété 3 fois.

Une gamme d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions avec la catéchine à différentes concentrations de 50 à 500µg/ml (**Tableau 6)**.

Tableau 6: Méthodes de dosage des flavonoïdes.

	La gamme d'étalon (catéchine)										**Extrait**
Catéchine µg/mL	B	50	100	150	200	250	300	350	450	500	-
Catéchine (µL)	-	250	250	250	250	250	250	250	250	250	-
Extrait (µL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250
Eau distillée (µL)	1250	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Na NO_2 15 % (µL)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Incubation pendant 6 min à température ambiante											
$Alcl_3$ 10 % (µL)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Incubation pendant 6 min à température ambiante											
NaOH (4%) (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Eau distillée (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Incubation pendant 30 min à température ambiante											
Mesure de l'absorbance à 510 nm											

Expression des résultats

Les teneurs en flavonoïdes sont déterminées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage obtenue. Elles sont exprimées en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec (µg EC /mg ES) **(Figure 14).**

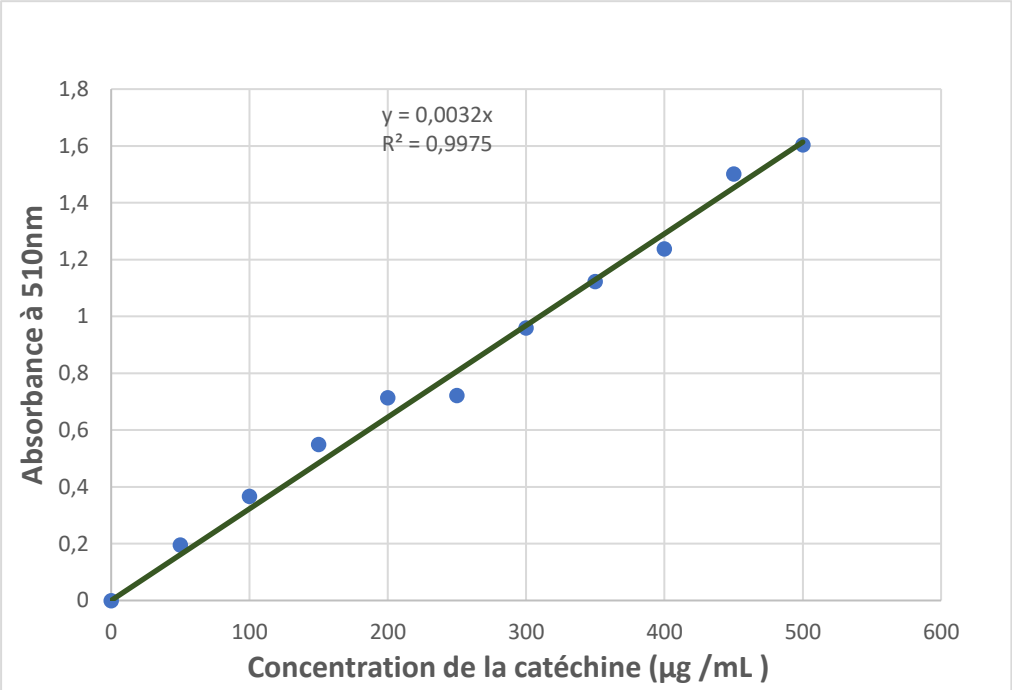


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des Flavonoïdes.

6.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés est réalisé par le réactif de la vanilline, selon la méthode décrite par **Sun et al, (1998).**

Les tanins condensés se dépolymérisent en milieu acide et se transforment en réaction avec la vanilline en anthocyanidols de couleur rouge qui absorbe à 550nm. Cette couleur est proportionnelle à la quantité des tanins condensés présente dans les extraits.

Mode opératoire

- Mélanger 50 µl de chaque extrait (1mg/ml) avec 1500µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) ;
- Agiter les tubes au vortex et ajouter 750µl du HCl (35%) ;
- Laisser le mélange incubé pendant 20min à température ambiante ;
- Mesurer l'absorbance à 550 nm.

Une gamme d'étalonnage de la catéchine (50 à 500µg /ml) a été préparée dans les mêmes conditions expérimentales (**Tableau 7)**.

Tableau 7 : Méthodes de dosage des tanins condensés

	La gamme d'étalon (catéchine)										**Extrait**
[*Catéchine*] µg/ml	B	50	100	150	200	250	300	350	450	500	-
Catéchine (µl)	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50	-
Extrait (µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
Vanilline/ méthanol (4%) (µL)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
HCL (35%) (µL)	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Incubation pendant 20 min à température ambiante											
Mesure de l'absorbance à 550 nm											

Expression des résultats

Les teneurs en tanins condensés sont déterminées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage obtenue. Elles sont exprimées en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait sec (µg EC/mg ES) **(Figure 15).**

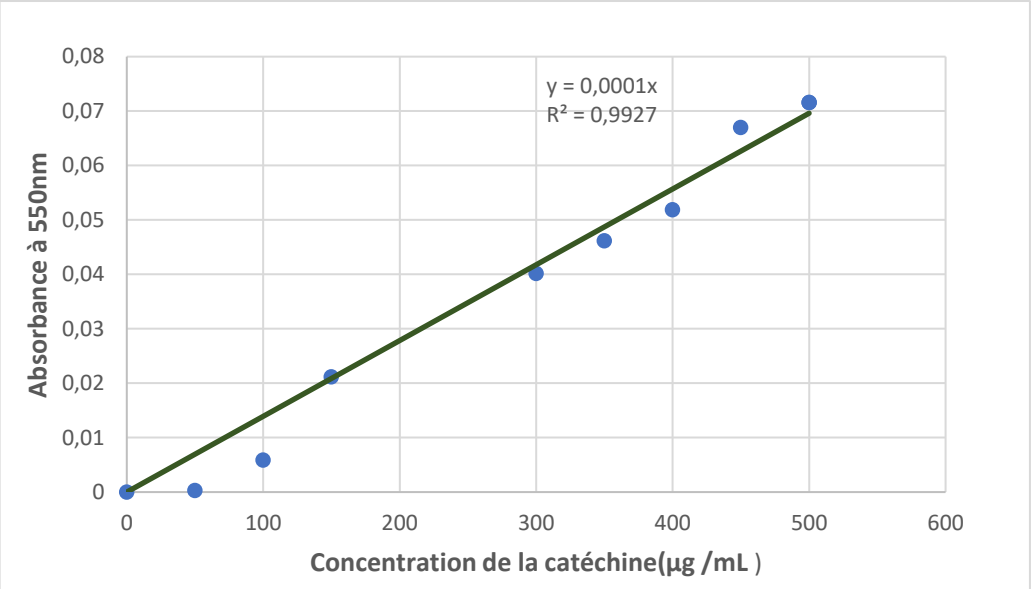


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

7. Recherche d'effet inhibiteur vis-à-vis l'enzyme l'α-amylase

7.1. Préparation des solutions

- **Solution de l'α-amylase**

L'α-amylase utilisée dans notre étude est produite par *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.1). Elle se présente sous forme lyophilisée, avec une activité optimale à pH 6,9 et à 37 °C, et est conservée à +4 °C.

- **Solution de substrat**

Comme substrat, nous avons utilisé l'amidon soluble de pomme de terre. 0,3 g d'amidon est dissous dans 30 ml de solution tampon phosphate (0,02 M, pH 6,9) en chauffant à une température de 50-70°C sous agitation.

- **Solution d'extrait**

Les extraits secs de la plante étudiée sont dissous dans la solution tampon phosphate. Une gamme de concentration croissante a été préparée variante de 0,1 à 5,5 mg/ml.

- **Solution d'acarbose**

Une solution d'acarbose commercialisé **(Glucobay 50 g)** à différentes concentration variantes de 50 à 300 µg /ml est préparée dans le tampon phosphate (0,02 M, pH6,9).

- **Principe**

Cette méthode consiste à évaluer l'effet inhibiteur des extraits de la plante étudiée sur l'activité de l'α-amylase pancréatique. Le substrat utilisé est l'amidon. L'acarbose, molécule de référence dans l'inhibition de cette enzyme, va servir comme témoin positif. En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel **(Worthington, 1988)**.

7.2. Evaluation de l'effet inhibiteur vis-à-vis l'α-amylase

Différents extraits ont été testés afin d'évaluer leur activité inhibitrice vis-à-vis de l'α-amylase. Les extraits aqueux, obtenus par macération et décoction à partir de fruits mûrs et immatures de *Schinus molle*, ont été évalués. À l'issue de ce criblage préliminaires, l'extrait ayant présenté l'activité inhibitrice la plus élevée a été sélectionné pour une étude plus approfondie de son effet inhibiteur à différentes concentrations.

- **Mode opératoire**

Pour chaque concentration obtenue à partir de l'extrait, nous avons testé l'effet sur l'activité de l'α-amylase.

- 200 µl de solution enzymatique sont ajoutés à 200 µl de solution d'extrait ;
- Les mélanges sont agités et incubés pendant 10 min à 37°C ;
- 200 µl de la solution d'amidon sont, ensuite, ajoutés et les tube sont incubés pendant 15 min à 37°C ;
- 400 µl de DNSA sont, ensuite, ajoutés ;
- Les tubes sont introduits dans un bain marie bouillant pendant 5 min et déposé, après, dans un bain glaçant ce qui provoque un choc thermique conduisant à l'arrêt de la réaction entre le maltose et le DNSA ;
- La réaction d'inhibition a été répétée 3 fois.

Dans les mêmes conditions, nous avons préparé :

- ✓ Un tube blanc (pour le control négatif) : 400 µl de solution tampon + 200 µl d'amidon;

- ✓ Un tube control négatif : 200 µl de solution tampon + 200 µl d'amidon + 200 µl de solution enzymatique ;
- ✓ Un tube blanc (pour l'extrait) : 200 µl de solution tampon +200 µl de solution d'extrait +200 µl d'amidon + 400 µl DNSA.

- L'acarbose est utilisé comme témoin positif ;
- L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

Le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé par l'équation suivante :

$$\mathbf{I\% = (AA - AB /AA) *100}$$

AA : l'absorbance de control négatif.

AB : l'absorbance d'échantillon. Les CI50 (concentration inhibitrice de 50%) pour chaque extrait sont calculées à partir des courbes de régressions logarithmiques d'inhibition.

8. Evaluation de l'effet hémolytique

Le test de l'effet hémolytique de l'extrait aqueux des fruits mûrs préparé par décoction a été réalisé sur une suspension érythrocytaire de sang humain incubée dans un tampon phosphate salin (PBS) à PH 7,4.

- **Protocole**

- Prélever du sang d'un sujet sain et le centrifuger dans des tubes héparines à 3000 tours 10 min ;
- Le surnagent est éliminé, puis le culot est lavé trois fois avec une solution tampon phosphate saline PBS (0,01M) à pH 7,4 ;
- Préparer des concentrations différentes de l'extrait diluée dans le PBS (10 mg/ml ; 7,5 mg/ml ; 5 mg/ml ; 2.5 mg /ml ; 0,5mg/ml) ;
- Ajouter 1,6µl de l'extrait à 0,4 µl de solution érythrocytaire à 10% ;
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 60 minutes à l'aide d'un incubateur-agitateur ;
- Après une nouvelle centrifugation à 3000 tours/10 min, utiliser le surnagent pour mesurer la libération d'hémoglobine intracellulaire à 540 nm ;

- Préparer un contrôle positif (hémolyse totale) en suspendant les globules rouges dans de l'eau distillée selon les mêmes conditions expérimentales ;
- Utiliser le PBS avec la solution érythrocytaire comme contrôle négatif ;
- La réaction hémolytique a été répétée 3 fois. Dans les mêmes conditions.

Le taux d'hémolyse a été déterminé pour chaque concentration de l'extrait selon l'équation suivante : **(Sæbø et al., 2023).**

Taux d'hémolyse (%) = ((A Extrait - A Contrôle négatif) / A Contrôle positif – A Contrôle négatif) x 100.

9. Docking moléculaire

Dans cette partie, l'amarrage moléculaire a été réalisé à l'aide de SwissDock 2024 **(Bugnon et al., 2024)**, un logiciel dédié à la simulation des interactions protiéne-ligand. Les calculs ont été effectués sur un ordinateur équipé d'un processeur Intel® Core™ i5-6300U à 2,40 GHz.

La figure 17 illustre les différentes étapes suivies, depuis la préparation des structures moléculaires jusqu'à l'exécution des simulations de docking moléculaire. Sept ligands issus des molécules identifiées dans les fruits de *Schinus molle* ont été étudiés, comprenant trois composés polyphénoliques issus d'extraits aqueux préparé par décoction **(Ranilla et al., 2010)**, trois composés identifiés dans l'extrait méthanolique obtenus par macération **(Shehata et al., 2025)**, ainsi qu'un ligand de référence l'acarbose. Ces structures moléculaires ont été soumises à des algorithmes de docking sous forme flexible au niveau du site actif de l'α-amylase, considéré comme une structure rigide, correspondant au site de fixation d'un ligand co-cristallisé présent dans la structure cristallographique de l'enzyme.

- **La protéine (l'α-amylase)**

La structure tridimensionnelle de l'α-amylase pancréatique humaine (PDB code : 1HNY) a été obtenue à partir de la base de données Protein Data Bank **(RCSB PDB)**. Lors de la préparation de la protéine, les molécules d'eau ont été supprimées à l'aide du logiciel UCSF Chimera afin d'obtenir une structure propre pour l'étude de docking moléculaire. Afin d'identifier le site actif de l'enzyme, cette structure a été comparée à la structure 1B2Y, correspondant à l'α-amylase humaine en complexe avec l'inhibiteur glucidique acarbose. Cette comparaison a permis de localiser les cavités et le site actif de l'enzyme.



Figure a : Structure de l'α-amylase pancréatique humaine complexée à l'acarbose (PDB : 1B2Y) **(RCSB PDB)**



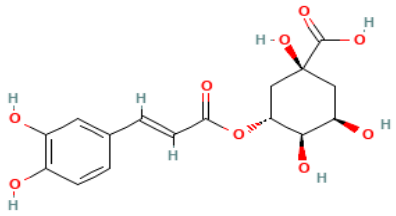
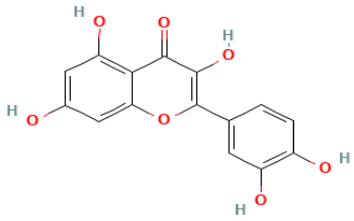
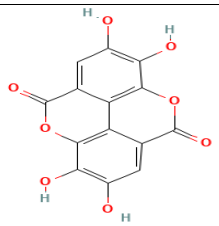
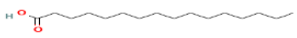
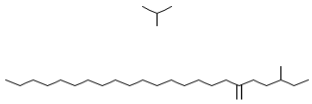
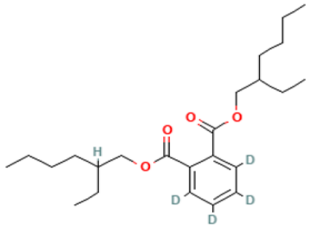
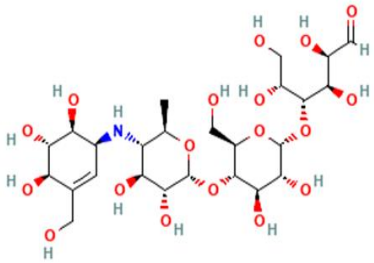
Figure b : Structure de l'α-amylase pancréatique humaine libre sans ligand (PDB : 1HNY) **(RCSB PDB)**

Figure 16 : Structures cristallographiques 3D de l'α-amylase pancréatique humaine sous forme libre et complexée à l'acarbose **(RCSB PDB)**

Les ligands

Le ligand, obtenu à partir de la base de données PubChem au format SDF, a été préparé pour l'étude de docking moléculaire à l'aide du logiciel UCSF Chimera. Cette étape comprend l'ajout des atomes d'hydrogène, l'attribution des charges, la minimisation d'énergie pour l'optimisation géométrique, la définition des liaisons rotatives, ainsi que la conversion et l'enregistrement final au format MOL2 adapté au docking **(Tableau 8)**.

Tableau 8 : Codes et noms des ligands utilisés pour l'amarrage moléculaire

Ligand (Nom + CID)	**Poids moléculaire**	**Formule brute**	**Classe**	**Structure chimique**
- Acide chlorogénique -1794427	354,31g/mol	$C_{16}H_{18}O_9$	Polyphénols	
- Quercétine -5280343	302.23 g/mol	$C_{15}H_{10}O_7$	Polyphénols	
- Acide ellagique - 5281855	302.19 g/mol	$C_{14}H_6O_8$	Polyphénols	
- Acide palmitique -985	256.42 g/mol	$C_{16}H_{32}O_2$	Acide gras	
- ester 2,3-dihydroxypropyle de l'acide octadécanoïque -154734731	408.8 g/mol	$C_{29}H_{60}$	Lipides	
- phtalate de bis(2-éthylhexyle) -16213881	394.6 g/mol	$C_{24}H_{38}O_4$	Phthalates	
-Acarbose -9811704	645.6 g/mol	$C_{25}H_{43}NO_{18}$	Oligosaccharide	

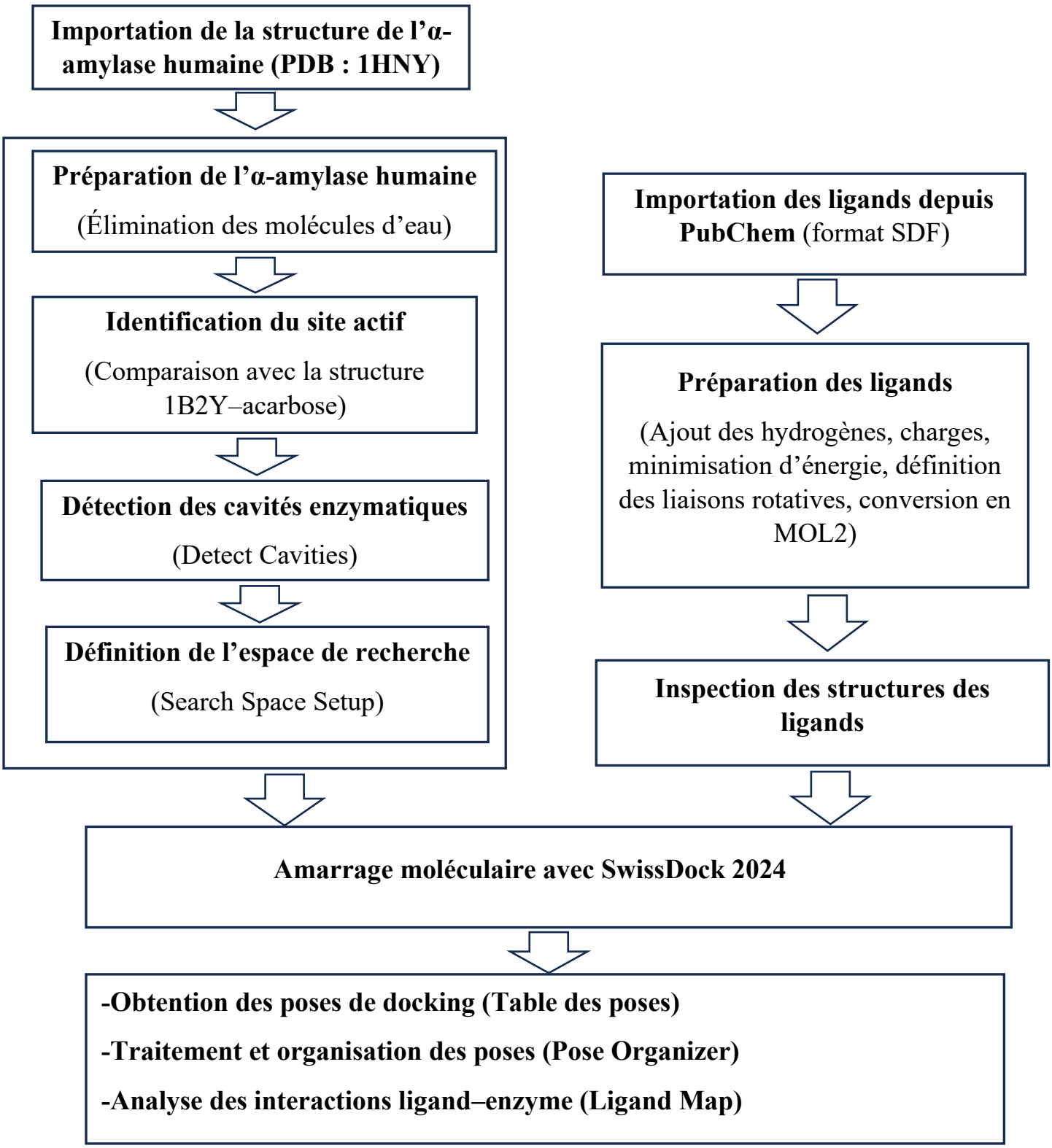


Figure 17 : Étapes de préparation, de docking moléculaire et d'analyse des interactions α-amylase–ligands.

10. Analyse statistique

Pour assurer la fiabilité et la signification des résultats obtenus lors des différentes répétitions expérimentales, les analyses statistiques suivantes, réalisées sous Excel, sont prises en considération :

-Moyenne (x) : mesure de la tendance centrale des données.

-Écart-type (S) : permet d'évaluer la dispersion des valeurs autour de la moyenne.

Partie IV :

Conclusion et perspectives

Les enzymes microbiennes occupent une place essentielle dans plusieurs domaines biotechnologiques, pharmaceutiques et agroalimentaires. Parmi elles, l'α-amylase représente l'une des enzymes les plus exploitées en raison de son rôle fondamental dans l'hydrolyse de l'amidon en sucres simples. Les microorganismes, notamment *Aspergillus niger*, constituent une source importante pour la production de cette enzyme grâce à leur capacité de synthèse élevée, leur facilité de culture et leur rendement intéressant en milieu liquide tel que le Potato Dextrose Broth (PDB). Cette méthode de production est largement utilisée en raison de son faible coût, de sa simplicité et de sa rapidité d'exécution.

Dans ce contexte, la présente étude avait pour objectif principal l'extraction et la caractérisation de l'α-amylase produite par *Aspergillus niger*, ainsi que l'évaluation de son activité enzymatique en comparaison avec une α-amylase commerciale. Ce travail visait également l'étude des extraits aqueux des fruits mûrs et immatures de *Schinus molle* afin d'identifier leurs principaux composés phytochimiques et d'évaluer leurs propriétés biologiques, notamment leur activité inhibitrice vis-à-vis de l'α-amylase et leur potentiel hémolytique. Enfin, une approche de docking moléculaire a été réalisée afin d'étudier les interactions entre certains composés bioactifs de *Schinus molle* et le site actif de l'α-amylase.

Les résultats obtenus ont montré que l'α-amylase extraite d*'Aspergillus niger* possède une activité enzymatique importante et relativement proche de celle de l'α-amylase commerciale, traduisant une capacité catalytique comparable entre les deux enzymes. L'étude cinétique a également révélé que l'enzyme extraite présente une activité spécifique élevée, ce qui pourrait être associé à une meilleure pureté enzymatique et à une concentration plus importante en protéines actives.

Par ailleurs, l'analyse phytochimique des extraits aqueux des fruits de *Schinus molle*, préparés par décoction et macération, a mis en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires d'intérêt biologique, notamment les flavonoïdes, les tanins, les composés phénoliques et les alcaloïdes. Les essais d'inhibition ont démontré que l'extrait aqueux des fruits mûrs obtenu par décoction présente une activité inhibitrice élevée vis-à-vis de l'α-amylase, suggérant ainsi un potentiel intéressant dans la régulation de l'hydrolyse de l'amidon.

En outre, les tests d'hémolyse ont montré une faible activité hémolytique de l'extrait aqueux des fruits mûrs obtenu par décoction aux concentrations utilisées, indiquant une toxicité limitée dans les conditions expérimentales appliquées. Ces résultats renforcent l'intérêt potentiel de

Schinus molle comme source naturelle de composés bioactifs pouvant être utilisés dans des applications pharmacologiques ou nutraceutiques.

Enfin, l'étude de docking moléculaire a permis de mettre en évidence des interactions favorables entre certains composés bioactifs rapportés dans la littérature chez les fruits de *Schinus molle* et l'α-amylase. Parmi ces composés, la quercétine a présenté la plus forte affinité de liaison avec l'enzyme, suggérant une capacité inhibitrice importante. Ces interactions moléculaires confirment les résultats expérimentaux obtenus lors des essais d'inhibition enzymatique et soutiennent l'hypothèse selon laquelle les composés phénoliques de *Schinus molle* pourraient agir comme inhibiteurs naturels de l'α-amylase.

En conclusion, cette étude met en évidence l'intérêt biotechnologique de l'α-amylase produite par *Aspergillus niger* ainsi que le potentiel biologique des extraits aqueux de *Schinus molle.* Les résultats obtenus ouvrent des perspectives prometteuses pour de futures recherches, notamment l'optimisation des procédés d'extraction par le test de différents solvants et méthodes d'extraction afin d'augmenter le rendement et les activités biologiques des extraits. Il serait également intéressant d'améliorer les procédés de purification enzymatique, notamment grâce à des techniques de chromatographie échangeuse d'ions, ainsi que les conditions de conservation de l'enzyme par lyophilisation. En outre, l'isolement et la caractérisation des molécules bioactives responsables de l'activité inhibitrice observée ainsi que leur valorisation dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et thérapeutique.

Partie V :

Références Bibliographiques

A.K. Lawal, A.M. Banjoko, S.O. Olatope, F.A. Alebiosu, F.A. Orji, Y.L. Suberu, E.E. Itoandon, K.A. Shittu, O.D. Adelaja, E. Ojo, E.N. Dike, & G.N. Elemo. (2014). Production and Partial Purification of Amylase By *Aspergillus niger* Isolated from Cassava Peel. *Journal of Basic & Applied Sciences*, *10*, 287-291. https://doi.org/10.6000/1927-5129.2014.10.37

Abo-Zed, A., & Phan, T. (2020). Tympanic membrane perforation secondary to *Aspergillus niger* otomycosis. *IDCases*, *22*, e00944. https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00944

Adebare, B. S., Johnson, A. A., Olanrewaju, T. M., Titilope, A. O., Femi, B. P., Bankole, S. A., Joseph, I. O., & Joshua, A. A. (2021). Production and optimization of alpha amylase from *Aspergillus niger* using TME 419 cassava peel as substrate. *African Journal of Biological Sciences*, *3*(4), 50. https://doi.org/10.33472/AFJBS.3.4.2021.50-59

Aisien, E. T., & Igbinosa, I. H. (2020). Production, purification, and characterization of α-amylase from *Aspergillus niger*, Aspergillus flavus and Penicillium expansum using cassava peels as substrate. *Nigerian Journal of Biotechnology*, *36*(2), 114-126. https://doi.org/10.4314/njb.v36i2.12

AL-Andal, A., & Moustafa, M. (2018). *A Review of Phytochemicals and Biological Studies of Schinus Molle Plants*.

Allali, H., Benmahdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S., Benabadji, N., 2008. Phytotherapy of diabetes in West Algeria. Asian J. Chem. 20, 2701–2710.

Atiq-ur-Rehman, Sana Ullah Umair, & Fatima Aslam. (2024). Alpha-Amylase and Glucoamylase Inhibitory Assessment of Methanol Extract of Fagonia Indica and its GC-MS analysis. Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN 1683 - 3597 E-ISSN 2521 - 3512), 33(2), 121–137. https://doi.org/10.31351/vol33iss2pp121-137

Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F.Z., Benmehdi, H., Belkacem, N. (2012). *Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria*.

Azzopardi, E., Lloyd, C., Teixeira, S. R., Conlan, R. S., & Whitaker, I. S. (2016). Clinical applications of amylase : Novel perspectives. *Surgery*, *160*(1), 26-37. https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.01.005

Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S. K. S., Muniraj, I., & Uthandi, S. (2021). Optimization and scale-up of α-amylase production by Aspergillus oryzae using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, *21*(1), 33. https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7

Bekele, T., & Yimam, B. B. (2023). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Stem Bark Extracts of Schinus molle linens. *Scholars International Journal of Chemistry and Material Sciences*, *6*(05), 108-114. https://doi.org/10.36348/sijcms.2023.v06i05.002

Belayneh, Y. M., Mengistu, G., & Hailay, K. (2024). Evaluation of hepatoprotective and antidiarrheal activities of the hydromethanol crude extract and solvent fractions of Schinus molle L. (Anacardiaceae) leaf and fruit in mice. *Metabolism Open*, *21*, 100272. https://doi.org/10.1016/j.metop.2024.100272

Belhoussaine, O., El Kourchi, C., Harhar, H., El Moudden, H., El Yadini, A., Ullah, R., Iqbal, Z., Goh, K. W., Goh, B. H., Bouyahya, A., & Tabyaoui, M. (2024). Phytochemical characterization and nutritional value of vegetable oils from ripe berries of Schinus terebinthifolia raddi and Schinus molle L., through extraction methods. *Food Chemistry: X*, *23*, 101580. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101580

Ben Hmed, M., Rigane, GH., Ben salem, R., Zouari, N., Cherif, S. (2020). Phytohemical and antioxydant activities of *Schinus molle* L. extract. Revue Roumanie de chimie, 65(2): 173-178.

Boehlke, C., Zierau, O., & Hannig, C. (2015). Salivary amylase – The enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Archives of Oral Biology*, *60*(8), 1162-1176. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.008

Borowitz, D. (2025). Non-Pancreatic Digestive Enzymes. *Biomolecules*, *15*(9), 1259. https://doi.org/10.3390/biom15091259

Böswald, L. F., Kienzle, E., Matzek, D., Schmitz, M., & Popper, B. A. (2023). Comparative analysis of pancreatic amylase activity in laboratory rodents. *Scientific Reports*, *13*(1), 17299. https://doi.org/10.1038/s41598-023-44532-6

Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): an ethno-pharmacology survey. J. Ethnopharmacol. 148, 395–402.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Plantes médicinales, Ed. Lavoisier, Techniques et documentation, Paris.

Bugnon, M., Röhrig, U. F., Goullieux, M., Perez, M. A. S., Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2024). SwissDock 2024: Major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. Nucleic Acids Research, 52(W1), W324–W332. https://doi.org/10.1093/nar/gkae300

Bvenura, C., & Kambizi, L. (2024). Geographic based phenolic compound variations in South African Schinus molle L. peppercorns. *Biochemical Systematics and Ecology*, *117*, 104905. https://doi.org/10.1016/j.bse.2024.104905

Calderon, G. R. L., Yapias, R. J. M., Cangalaya, N. R., Poma, W. A. C., Rodríguez, A. R., Encinas, S. H., Gamarra, F. B. L., Flores, D. D. C., & Areche, F. O. (2025). Industrial Applications of Schinus molle L. Seed Oil : From Agriculture to Consumer Products. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, *13*(3), 1159-1172. https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.13.3.9

Chabasse, D. (2002). Les phaeohyphomycètes, agents de phaeohyphomycoses : des champignons émergents. Journal de Mycologie Médicale, 12(1), 65–85.

Chakraborty, M. B., Patgiri, S. R., Rahman, A. S., Dasgupta, A., Pegu, G., & Saikia, U. (2018). Production, assay and optimisation of amylase by submerged fermentation using *Aspergillus niger*. Annals of Plant Sciences, 7(6), 2357–2360. https://doi.org/10.21746/aps.2018.7.6.11

Duarte, J. A., Zambrano, L. A. D. B., Quintana, L. D., Rocha, M. B., Schmitt, E. G., Boligon, A. A., Anraku De Campos, M. M., Oliveira, L. F. S. D., & Machado, M. M. (2018).

Immunotoxicological Evaluation of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) Essential Oil in Lymphocytes and Macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2018*(1), 6541583. https://doi.org/10.1155/2018/6541583

Dubey, V. D. (2024).Biotechnological advances in amylase production from aspergillus niger for potential industrial applications. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 654-666. https://doi.org/10.53555/dttegp55

El Mannoubi, I. (2023). Impact of different solvents on extraction yield, phenolic composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities of deseeded Opuntia stricta fruit. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, *9*(2), 176-184. https://doi.org/10.1007/s43994-023-00031-y

Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial Alpha-Amylase Production : Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *10*(3), 350-358. https://doi.org/10.34172/apb.2020.043

Ezez, D., Belew, M., Tekle, H., Birhanu, H., Lema, N. K., Dikamu, M., & Syraji, Y. (2025). Phytochemical and bioactivity characterization of Schinus molle L. leaf extracts. *International Journal of Food Properties*, *28*(1), 2553617. https://doi.org/10.1080/10942912.2025.2553617

Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α-amylase : A review. *Archives of Microbiology*, *203*(4), 1281-1292. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y

Feriani, A., Tir, M., Mufti, A., Caravaca, A. M. G., Contreras, M. D. M., Taamalli, A., Carretero, A. S., Aldawood, N., Nahdi, S., Alwasel, S., Harrath, A. H., & Tlili, N. (2021). HPLC–ESI–QTOF–MS/MS profiling and therapeutic effects of Schinus terebinthifolius and Schinus molle fruits : Investigation of their antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and antinociceptive properties. *Inflammopharmacology*, *29*(2), 467-481. https://doi.org/10.1007/s10787-021-00791-1

Ferrero, A.A., Sánchez Chopa, C., Werdin González, J.O., Alzogaray, R.A. (2007). Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on Blattella germanica. Fitoterapia, 78 : 311–314.

Fonseca, R. M., & Huerta-Reyes, M. (2025). Antidiabetic Properties of the Tropical Tree Schinus molle L. (pirul) : A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals*, *18*(11), 1661. https://doi.org/10.3390/ph18111661

Gayathri, V. M., & Preetha, S. (2025). Review on Scaling up α-Amylase Production by Bacterial Strains through Solid State Fermentation. *International Journal on Science and Technology*, *16*(1), 1877. https://doi.org/10.71097/IJSAT.v16.i1.1877

Günal-Köroğlu, D., Catalkaya, G., Yusufoğlu, B., Kezer, G., Esatbeyoglu, T., Abd El-Aty, A. M., & Capanoglu, E. (2025). Quercetin: Potential antidiabetic effects through enzyme inhibition and starch digestibility. Food Safety and Health, 3(1), 9–22. https://doi.org/10.1002/fsh3.12066

Habte, G., Nedi, T., & Assefa, S. (2020). Antimalarial Activity of Aqueous and 80% Methanol Crude Seed Extracts and Solvent Fractions of *Schinus molle* Linnaeus (*Anacardiaceae*) in

Plasmodium berghei -Infected Mice. *Journal of Tropical Medicine*, *2020*, 1-9. https://doi.org/10.1155/2020/9473250

Hamza, N., Berke, B., Umar, A., Cheze, C., Gin, H., & Moore, N. (2019). A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, *238*, 111841. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111841

Harbone J B. (1998). Phytochimical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis, 3 éme Ed, Chapman and Hill.

Huang, N., Stebbins, G. L., & Rodriguez, R. L. (1992). Classification and evolution of alpha-amylase genes in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(16), 7526-7530. https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7526

Hussain, M., & Jabbar, B. (2021). *Applications of Alpha (α)-Amylase in Biotechnology : A Review*.

Ibrahim, B., & Al, Z. (2014). *Analysis of fruits Schinusmolleextractions and the efficacy in inhibition of growth the fungi in laboratory*. International Journal of ChemTech Research, 6(5), 2799–2806.

İlgün, S., Şeker Karatoprak, G., Çiçek Polat, D., Köngül Şafak, E., Yücel, Ç., İnce, U., Uvat, H. Ö., & Küpeli Akkol, E. (2023). Assessment of Phenolic Composition, Antioxidant Potential, Antimicrobial Properties, and Antidiabetic Activity in Extracts Obtained from Schinus molle L. Leaves and Fruits. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *28*(12), 353. https://doi.org/10.31083/j.fbl2812353

James, H. (2024). *Understanding Enzyme Deficiencies and their Impact on Digestion*.

Jugran, A. K., Rawat, S., Devkota, H. P., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2021). Diabetes and plant-derived natural products : From ethnopharmacological approaches to their potential for modern drug discovery and development. *Phytotherapy Research*, *35*(1), 223-245. https://doi.org/10.1002/ptr.6821

Kasimala, M. B., & Kasimala, B. B. (2012). *A REVIEW ON BRAZILIAN PEPPER PLANT: SCHINUS MOLLE*.

Kaur, N., Kumar, V., Nayak, S. K., Wadhwa, P., Kaur, P., & Sahu, S. K. (2021). Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus : A comprehensive review. *Chemical Biology & Drug Design*, *98*(4), 539-560. https://doi.org/10.1111/cbdd.13909

Kemassi, A., Darem, S., Cherif, R., Boual, Z., Sadine, E., Aggoune, M., Ould El Hadj-Khelil, A., Ould elhadj, M., 2014. Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'zab (Sahara septentrional Est Algérien). J. Adv. Res.Sci. Technol. 1, 1–5.

Ku, A., So, E., Pc, O., Tc, E., Al, E., & Fc, C. (2017). Extraction, Purification and Characterization of Sprouting Pearl Millet Alpha-Amylase for Biotechnological Applications. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, *05*(01). https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000174

Kumari, A., Singh, K., & Kayastha, A. M. (2012). *-Amylase : General Properties, Mechanism and Biotechnological Applications – A Review*.

Li, H., Zhang, Y., Liu, Z., Guo, C., Battino, M., Cai, S., & Yi, J. (2024). Exploring antioxidant activities and inhibitory effects against α-amylase and α-glucosidase of Elaeocarpus braceanus fruits: Insights into mechanisms by molecular docking and molecular dynamics. International Journal of Food Science & Technology, 59(1), 343–355. https://doi.org/10.1111/ijfs.16815

Machado, D. G., Kaster, M. P., Binfaré, R. W., Dias, M., Santos, A. R. S., Pizzolatti, M. G., Brighente, I. M. C., & Rodrigues, A. L. S. (2007). Antidepressant-like effect of the extract from leaves of Schinus molle L. in mice : Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *31*(2), 421-428. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.11.004

Mahmood, S., Shahid, M. G., Nadeem, M., Irfan, M., & Syed, Q. (2016). Production and optimization of α-amylase from aspergillus niger using potato peel as substrate. 13(2), 101–109.

Mekuria, A. B., Geta, M., Birru, E. M., & Gelayee, D. A. (2021). Antimalarial Activity of Seed Extracts of *Schinus molle* Against *Plasmodium berghei* in Mice. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, *26*, 2515690X20984287. https://doi.org/10.1177/2515690X20984287

Mobini-Dehkordi, M., & Afzal Javan, F. (2012). Application of alpha-amylase in biotechnology. *Journal of Biology and Today's World*, *1*(1). https://doi.org/10.15412/J.JBTW.01010104

Mukherjee, R., Paul, T., Halder, S. K., Soren, J. P., Banerjee, A., Mondal, K. C., Pati, B. R., & Mohapatra, P. K. D. (2018). Characterization of an acidophilic α-amylase from Aspergillus niger RBP7 and study of catalytic potential in response to nutritionally important heterogeneous compound. *Acta Biologica Szegediensis*, *62*(1), 75-82. https://doi.org/10.14232/abs.2018.1.75-82

Nelson, Cavid L.; Cox, Michael M. & Hoskins, Aaron A. (2021). Lehninger principles of biochemistry. 8th ed. New York : Macmillan Learning

Panchal C.J., (1990). Yeats strainselection. Marcel Dekker (ed) USA, p : 189

Paucarchuco-Soto, J., Padilla Pacahuala, G., Cuadrado Campó, W. J., Chagua-Rodríguez, P., Maceda Santivañez, J. C., Santana, Á. L., Meireles, M. A. A., & Chañi-Paucar, L. O. (2025). Supercritical Fluid Extraction of Peruvian Schinus molle Leaves : Yield, Kinetics, Mathematical Modeling, and Chemical Composition. *Processes*, *13*(7), 2191. https://doi.org/10.3390/pr13072191

Peiris, D. S. H. S., Fernando, D. T. K., Senadeera, S. P. N. N., & Ranaweera, C. B. (2023). Phytochemical Screening for Medicinal Plants : Guide for Extraction Methods. *Asian Plant Research Journal*, *11*(4), 13-34. https://doi.org/10.9734/aprj/2023/v11i4216

Rahardhian, M. R. R., Aryanti, N., Susilawati, Y., Sumiwi, S. A., Putri, C. N., Ramonah, D., & Suharsanti, R. (2025). Exploring the α-Amylase Inhibitory Potential of Peronema canescens Jack: An In Vitro and In Silico Study. HAYATI Journal of Biosciences, 32(3), 712–726. https://doi.org/10.4308/hjb.32.3.712-726

Ramos Neyra, L. C., Porto De Souza Vandenberghe, L., Valladares-Diestra, K. K., Gruening De Mattos, P. B., Sinelnikov, I., Bittencourt, G. A., Murawski De Mello, A. F., Rojkova, A., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2025). Emerging Biorefinery Approaches to Produce Microbial Amylases and their Formulations and Applications in the Food Industry. *Waste and Biomass Valorization*. https://doi.org/10.1007/s12649-025-03192-5

Ramzi, S., & Hosseininaveh, V. (2010). Biochemical characterization of digestive α-amylase, α-glucosidase and β-glucosidase in pistachio green stink bug, Brachynema germari Kolenati (Hemiptera : Pentatomidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *13*(3), 215-219. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.03.009

Rani, A., Arora, S., & Goyal, A. (2017). Antidiabetic plants in traditional medicines: A review. International Research Journal of Pharmacy, 8(6), 17–24.

Rani, K., Rana, R., & Datt, S. (2015). *Review on characteristics and application of amylases*. *5*.

Ranilla, L. G., Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. Bioresource Technology, 101(12), 4676–4689. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.093

Rao, M. S., Reddy, N. S., & Rao, G. V. (2004). *Studies on the extraction and characterization of thermostable α-amylase from pericarp of*.

Raut, B. K., Upadhyaya, S. R., Bashyal, J., & Parajuli, N. (2023). In Silico and In Vitro Analyses to Repurpose Quercetin as a Human Pancreatic α-Amylase Inhibitor. ACS Omega, 8(46), 43617–43631. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05082

Robinson, P. K. (2015). Enzymes : Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, *59*, 1-41. https://doi.org/10.1042/bse0590001

Rodríguez-Garza, N. E., Quintanilla-Licea, R., Gomez-Flores, R., Galaviz-Silva, L., & Molina-Garza, Z. J. (2024). In Vitro Antiprotozoal Activity of Schinus molle Extract, Partitions, and Fractions against Trypanosoma cruzi. *Plants*, *13*(16), 2177. https://doi.org/10.3390/plants13162177

Sæbø, I., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E., & Booth, J. (2023). Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2914. https://doi.org/10.3390/ijms24032914

Saini, R., Saini, H. S., & Dahiya, A. (2017). *Amylases : Characteristics and industrial applications*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(4), 1865–1871.

Salem, M. Z. M., Zayed, M. Z., Ali, H. M., & Abd El-Kareem, M. S. M. (2016). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of extracts from Schinus molle wood branch growing in Egypt. *Journal of Wood Science*, *62*(6), 548-561. https://doi.org/10.1007/s10086-016-1583-2

Schomburg D and Salzmann M., (1991). Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases. Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.

Sharma, P., Joshi, T., Joshi, T., Chandra, S., & Tamta, S. (2021). Molecular dynamics simulation for screening phytochemicals as α-amylase inhibitors from medicinal plants. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 39(17), 6524–6538. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1801507

Shehata, M. E., El-Sherbiny, G. M., Sharaf, M.H., Kalaba, M.H., Shaban, A.S. (2025). Phytochemical analysis, antimicrobial, antioxidant, and cytotoxicity activities of Schinus molle (L.) extracts. Biomass Conversion and Biorefinery, 15 : 3753 3770.

Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(54), 81112-81129. https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6

Smruthi G, Mahadevan V, Vadivel V, Brindha P. Docking studies on antidiabetic molecular targets of phytochemical compounds of Syzygium cumini (L.) Skeels. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2016;9(Suppl 3):287-293. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s3.14920.

Souza, P. M., & Magalhães, P. O. (2010). Application of microbial α-amylase in industry – A review. Brazilian Journal of Microbiology, 41(4), 850–861.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M. & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for Catechins and Proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4267-4274.

Sun, S., Yu, Y., Jo, Y., Han, J. H., Xue, Y., Cho, M., Bae, S.-J., Ryu, D., Park, W., Ha, K.-T., & Zhuang, S. (2025). Impact of extraction techniques on phytochemical composition and bioactivity of natural product mixtures. *Frontiers in Pharmacology*, *16*, 1615338. https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1615338

Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014). *α-Amylase Production and Applications : A Review*.

Sutradhar, P., Saha, I., & Chakravarty, A. (2020). Evaluation of pomegranate peel as a substrate for citric acid production by aspergillus niger. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 61-65. https://doi.org/10.22159/ijcpr.2020v12i3.38307

Tan, D. C., Kassim, N. K., Ismail, I. S., Hamid, M., & Ahamad Bustamam, M. S. (2019). Identification of Antidiabetic Metabolites from Paederia foetida L. Twigs by Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Molecular Docking Study. BioMed Research International, 2019, 1–14. https://doi.org/10.1155/2019/7603125

Telli, A., Esnault, M.A., Ould el Hadj khelil, A., 2016. An ethnopharmaclogical survey of plants used in traditional diabetes treatment in South-eastern Algeria (Ouargla pro-vince). J. Arid Environ. 127.

Tiwari, S., Srivastava, R., Singh, C., Shukla, K., Singh, R., Singh, P., Singh, R., Singh, N., & Sharma, R. (2015). Amylases: An overview with special reference to alpha amylase. Journal of Global Biosciences, 4(1), 1886–1901.

Vermerius, W., & Nicholson, R. (2006). Isolation and Identification of Phenolic Compounds. In : Phenolic Compound Biochemistry. Springer, Dordrecht : 35-191.

Wang, S., Lin, C., Liu, Y., Shen, Z., Jeyaseelan, J., & Qin, W. (2016). Characterization of a starch-hydrolyzing α-amylase produced by Aspergillus niger WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 7(1), 1–10

Williams, J. A. (2017). Amylase. The Exocrine Pancreas Knowledge Base, 1.0.

Worthington C. C. (1988). Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals. Worthington Biochemical Corporation.

Zahed, N., Hosni, K., Ben Brahim, N., Kallel, M., & Sebei, H. (2010). Allelopathic effect of Schinus molle essential oils on wheat germination. *Acta Physiologiae Plantarum*, *32*(6), 1221-1227. https://doi.org/10.1007/s11738-010-0492-z

Zheng, Y., Yang, W., Sun, W., Chen, S., Liu, D., Kong, X., Tian, J., & Ye, X. (2020). Inhibition of porcine pancreatic α-amylase activity by chlorogenic acid. Journal of Functional Foods, 64, 103587. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103587

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, 64 : 555-559.