

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Projet de fin d'étude présenté en vue de l'obtention du diplôme de

LICENCE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie

Thème

**Alpha amylase : Détermination des paramètres
Cinétiques et amarrage moléculaire**

Par :

BELMADANI Radhia
OUKADOU Khadidja

Jury :

Mr. BENBEKHTI Zineddine

Maître Assistant B

Univ. Ghardaïa

Encadreur

Mr. BELHACHEMI Mohamed Habib

Maître Assistant A

Univ. Ghardaïa

Examineur

Année universitaire 2013/2014

DEDICACES

Au nom de Dieu le Miséricordieux

Au nom de l'amour et de l'obéissance je dédie ce modeste travail :

A celui qui a fait de moi une femme : mon père.

A l'être le plus cher de ma vie : ma mère.

A mon chère frère : Mohamed.

A mes très chères sœurs: Hanane, Mabroka, Mebarka, Om Elkheir, Zohra, Saida, Aicha, Fatna.

A ma grande mère.

A mes tantes.

A toutes les familles : OUKADOU, BEIRI.

A tous mes amis.

A ceux que j'aime du fond de mon cœur.

OUKADOU Khadidja

DEDICACES

Au nom de Dieu le Miséricordieux

Au nom de l'amour et de l'obéissance je dédie ce modeste travail :

A mes très chères parents qui on fait beaucoup de sacrifices pour nous assures une vie paisible et des études réussit : Mon père Mustapha, Ma mère Fatima.

A mes très chère frère : Taha, Imad Eddin , Mahmoud Amine , Abderrahmane Karim.

A mes très chères sœurs: Douaa, Chaima, Mounira , Hasna, Hafsa, Samira.

A ma grande mère.

A ma tante.

A toutes les familles : BELMADANI, DOUIDA

A tous mes amis.

A ceux que j'aime du fond de mon cœur.

BELMADANIRadhia

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur de nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements, Mr BENBEKHTI Zineddin maître assistant à l'université de Ghardaïa, notre promoteur, pour ses conseils et l'aide qu'il nous a apporté

De même, nous vifs remerciements vont à Mr BELHACHEMI Mohamed Habib, maître assistant à l'université de Ghardaïa, pour avoir bien voulu examiner notre travail.

Nous remercions tous les cadres et les enseignants des modules qui nous ont accompagné tout au long de ce projet avec beaucoup de patience et de pédagogie ; ainsi que toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions .

Mes remerciements vont à Mr Kraïmate adjoint et responsable des laboratoires pédagogiques, pour nous avoir fourni tous les moyens et les matériels nécessaires. Au dammes les techniciennes de laboratoire pour leurs explications et collaborations. Mesdames: Meriem , Zineb

Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Résumés

ملخص:

يهدف هذا العمل ومن خلال دراسة تجريبية إلى تحديد المقاييس الحركية Km و Vmax المرتبطة بالنشاط الإنزيمي لألفا أميلاز المستخلص من *Aspergillus oryzae*، بحيث درجة الحموضة PH ودرجة الحرارة تبقى ثابتة في 6.9 و 40 درجة مئوية، على التوالي. ومن جهة أخرى إيجاد التكامل الجزيئي (ammarage) مع ألفا أميلاز (PDB code : 3XV1).

تبعاً للنتائج المحصل عليها في الشروط التجريبية المذكورة سابقاً. أظهر إنزيم ألفا أميلاز مقياس $K_m = 1,154 \text{ g/L}$ وسرعة $V_{max} = 2,222 \text{ mM/min}$ تجاه النشاء.

من خلال تحليل نتائج دراسة التكامل الجزيئي تبين أنه من بين كل الجزيئات المدروسة، جزيء quercitine هو الجزيء الأكثر ارتباطاً مع الأميلاز والأثبتاً قوياً.

الكلمات المفتاحية: المقاييس الحركية، درجة الحموضة PH، ودرجة الحرارة، التكامل الجزيئي، النشاء، كيرستين

Résumé :

Ce travail est effectué dans le but de déterminer, d'une part via une étude expérimentale, les paramètres cinétique Km et Vmax liés à l'activité enzymatique d'alpha amylase extraite a partir d'*Aspergillus oryzae*. Les conditions de pH et de température sont fixées a 6,9 et 40°C, respectivement . D'autre part de déterminée , la possibilité d'interaction entre certains métabolites secondaires des plantes est l'amylase par amarrage (docking) moléculaire avec l'amylase (PDB code 3XV1) .

Suite aux résultats obtenus dans les conditions expérimentales déjà citées , l'alpha amylase présente un Km de 1,154 g/L et une Vmax de 2,222 mM/min viv-à-vis l'amidon.

L'analyse des données d'amarrage moléculaire nous orientons vers le choix de quercitine comme un ligand. L'interaction avec l'amylase est la plus favorable et la plus stable énergétiquement.

Mots clés : paramètres cinétique d'alpha amylase, pH, température, amidon, ammarage moléculaire(docking) .

Abstract :

The aim of this work is to characterize in the first order, based on an experimental essay, the kinetic parameters Km and Vmax of the enzyme alpha amylase extracted from *Aspergillus oryzae*, where pH and temperature are fixed to 6,9 and 40°C respectively, In the second order we are interested to study one type of alpha amylase (PDB code 3XV1) molecular docking. Following the experimental results , alpha amylase show a Km 1,154 g/L and Vmax de 2,222mM/min vis-a-vis starch . Our molecular docking study show that between all the docked molecules quercitine is the most energetically the most stable attached metabolite to amylase .

Key words: kinetic parameters of alpha amylase, pH, temperature, starch , molecular docking, quercitine

Liste des figures

Figure 01 : Structure tridimensionnelle de l -amylase fongique	Page 6
Figure 02 :Représentation des domaines et des éléments de la structure secondaired' α -amylase	Page 7
Figure 03 :Mécanisme catalytique des hydrolases glycosydiques	Page 9
Figure 04 :Structure d'hélice d'amylose	Page 9
Figure 05 : Etapes de préparation, amarrage et analyse des résultats du dockingdes protéine-ligands	Page 18
Figure 06 :Courbe d'étalonnage du maltose ($\lambda=540\text{nm}$)	Page 22
Figure 07 : Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps [amidon]=0.066 g/L	Page 23
Figure 08 : Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps [amidon]=0.133 g/L	Page 23
Figure 09 : Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps [amidon]=0.200 g/L	Page 24
Figure 10 : Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps [amidon]= 0.266 g/L	Page 24
Figure 11 : Représentation de <i>Lineweaver et Burk</i> de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat	Page 25
Figure 12 : Structure secondaire d'alpha amylase (code pdb : 3XV1)	Page 26
Figure 13 : Interactions hydrogènes entre le quercitrin et l'alpha amylase	Page 28
Figure 14 : Interactions hydrogènes entre le Kaempferol et l'alpha amylase	Page 29
Figure 15 : Interactions hydrogènes entre le Daidzein et l'alpha amylase	Page 30
Figure 16 : Interactions hydrogènes entre le Apigenin et l'alpha amylase	Page 31

Liste des tableaux

Tableau 01: Propriétés d'alpha amylase (E.C.3.2.1.1)	Page 10
Tableau 02 : Gamme d'étalonnage du maltose	Page 15
Tableau 03 : Codes et noms des ligands utilisés pour l'amarrage moléculaire	Page 19
Tableau 04 : Vitesses initiales de la réaction enzymatique à différentes concentrations du substrat.	Page 22
Tableau 05 : Paramètres de docking des ligands dans le site de fixation d'alpha amylase	Page 27
Tableau 06 : Ensemble des groupements fonctionnels de la quercitrine dans l'établissement des liaisons hydrogènes	Page 28
Tableau 07 : Ensemble des groupements fonctionnels de la Kaempferol dans l'établissement des liaisons hydrogènes	Page 29
Tableau 08 : Ensemble des groupements fonctionnels de la daidzein dans l'établissement des liaisons hydrogènes	Page 30
Tableau 09 : Ensemble des groupements fonctionnels de la apigenin dans l'établissement des liaisons hydrogènes	Page 31

Table des matières

Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Introduction à l'alpha amylase.....	4
2. Nomenclature.....	4
3. Structure d'alpha amylase.....	5
4. Mécanisme d'action d'alpha amylase.....	8
5. Caractéristiques d'alpha amylase.....	10
6. Effecteurs d'alpha amylase	11
6.1. Activateurs.....	11
6.2. Inhibiteurs.....	11
Matériel et Méthodes.....	12
1. Partie in vitro	13
1.1. Préparation des solutions.....	13
1.2. Méthodes.....	15
2. Partie in silico(amarrage moléculaire)	17
Résultats et discussion.....	20
1. Cinétique enzymatique de l' α -amylase	21
1.1 Courbe d'étalonnage	21
1.2. Mesure des vitesses initiales	21
1.3. Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase.....	24

2. Amarrage moléculaire et étude des interactions enzyme –ligands.....	25
Conclusion.....	33
Références bibliographique.....	35

Introduction générale

L'étude des enzymes est effectuée par la branche de la biochimie qui s'appelle enzymologie. L'enzymologie est une discipline essentielle pour décrire et comprendre les réactions catalysées du monde vivant, cette branche étudie les propriétés structurales et fonctionnelles des enzymes et s'intéresse aussi à décrire la vitesse des réactions catalysées par les enzymes (**Chabraoui L et al.,2011**), par simple définition l'enzymologie étudie des enzymes qui transforment un substrat en produit.

Les enzymes constituent une voie pour protéger l'environnement et contribuer au développement durable. Comme biocatalyseurs, les enzymes permettent généralement d'aboutir à des produits de synthèse sans rejet de composés toxiques ou sans nécessiter d'agent agressifs ou de solvants organiques.

La haute spécificité des enzymes évite l'apparition de produits secondaires comme ceux obtenus dans les réactions chimiques. Ainsi les réactions enzymatiques possèdent souvent des rendements supérieurs.

L'emploi des enzymes contribue à améliorer la performance des procédés et/ou à remplacer les méthodes traditionnelles polluantes (tannerie, blanchiment du papier....) (**Jeane-Pierre SINE.,2010**).

Dans notre travail on a basé sur l'étude d'enzyme d'alpha amylase :

Les α -amylases appelées aussi 1,4- α -D-glucano hydrolase (Ec 3.2.1.1) font partie des additifs pour le régime à base de maïs destinés aux volailles. Associées à d'autres enzymes, Les α -amylases permettent d'améliorer la digestibilité de l'amidon. Ces enzymes sont commercialisées sous le nom Avizyme par la société Finnfeeds International. Les sources principales d' α -amylase sont constituées par (humaine, fongique et bactériennes). Ces enzymes peuvent dégrader l'amidon en hydrolysant les liens 1,4- α -D-glucosidiques pour donner des dextrines et des oses (**Jeane-Pierre SINE.,2010**).

Synthèse bibliographique

1. Introduction à l'alpha amylase:

L'alpha amylase a été purifiée en 1835 du malt par Anselme Payen et Jean Persoz (**Encyclopaedia Britannica, 2007**). Ce dernier est l'un des enzymes qui se trouvent dans tous les règnes (**Baronet *al.*, 1985**).

Elle est répandue dans tous les organismes vivants, dans les systèmes digestifs des humains et beaucoup d'autres mammifères, elle est aussi appelée « diastase » (**Encyclopaedia Britannica, 2007**). La ptyaline est une alpha amylase produite par les glandes salivaires, tandis que l'amylase pancréatique est sécrétée par le pancréas dans le petit intestin (**Encyclopaedia Britannica, 2007**).

L'alpha amylase est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires de type endo-glycanase, elle est capable d'hydrolyser l'amidon et le glycogène au niveau des liaisons osidiques α -(1-4) avec la formation de dextrine et d'oligosaccharides [(**Mercier, 1985**); (**Jean-Pierre, 2010**)]. et seulement l'alpha amylase d'origine microbienne (bactéries-moisissures-levures) est exocellulaire (**Moulin *et al.*, 1978**); (**Mantsala *et al.*, 1979**).

2. Nomenclature:

Les enzymes sont classées et nommées en fonction de la nature des réactions chimiques qu'elles catalysent. Chaque enzyme se voit assignée deux noms et une classification à quatre chiffres (**Voet et Voet, 1998**).

Nom codifié: EC 3.2.1.1

Nom commun: α -amylase

Nom systématique: 1-4 α D-glucane-4-glucano hydrolase

Synonymes: glycogénase, endoamylase, Taka-amylase, maxilase, glucanohydrolase.

[(**Schwimmer et Balls, 1949**); (**Fischer et Stein, 1960**); (**Manners, 1962**); (**Jean -Pierre, 2010**)]

3. Structure d'alpha amylase:

L'alpha amylase est une enzyme de nature glycoprotéines, stabilisée et activée à l'aide des ions de calcium (**Jean-Pierre,2010**), ces ions et les ions de chlorure sont montres à proximité immédiate du centre actif, le ligand d'acarbose est liée au site actif (**Minxiet al., 1997**), ce dernier comporte 3 domaines globulaires A, B et C associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes (Figure 01 et 02).

le domaine A: former à partir des hélices α et feuillets β , et la partie C-terminale des feuillets β porte le site actif [(**Matsuura et al., 1984**); (**Boelet al., 1990**)].

le domaine B: formé d'une boucle de 64 résidus d'acide aminé reliant A-3 avec A-3 et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif (**Kadziola et al., 1994**).

le domaine C : il constitue un ensemble de 8 feuillets β antiparallèles [(**Matsuura et al., 1984**) ; (**Boelet al., 1990**)]. Ces domaines comportent environ (471 à 483) d'acides aminés et 5 ponts disulfures (Heslot 1996). La partie glucidique formée essentiellement de :D-mannose, D-galactose D-xylose et D-glucosamine (**Stefanofaet al., 1992**).

Le site actif d'alpha amylase contient plusieurs sous-sites, chacun se lie à un résidu de glucose (**Jean-Pierre, 2010**), et trio des groupes acides : Asp 231, Glu 261 et Asp 328, ces acides scilicet la liaison entre deux sucres dans une chaîne d'amidon [(**McCarter et Withers, 1996**), (**Uitdehaaget al., 1999**)]. Cette structure contient une courte chaîne de cinq unités de sucre liées dans le site actif (**Wikipédia, 2014**).

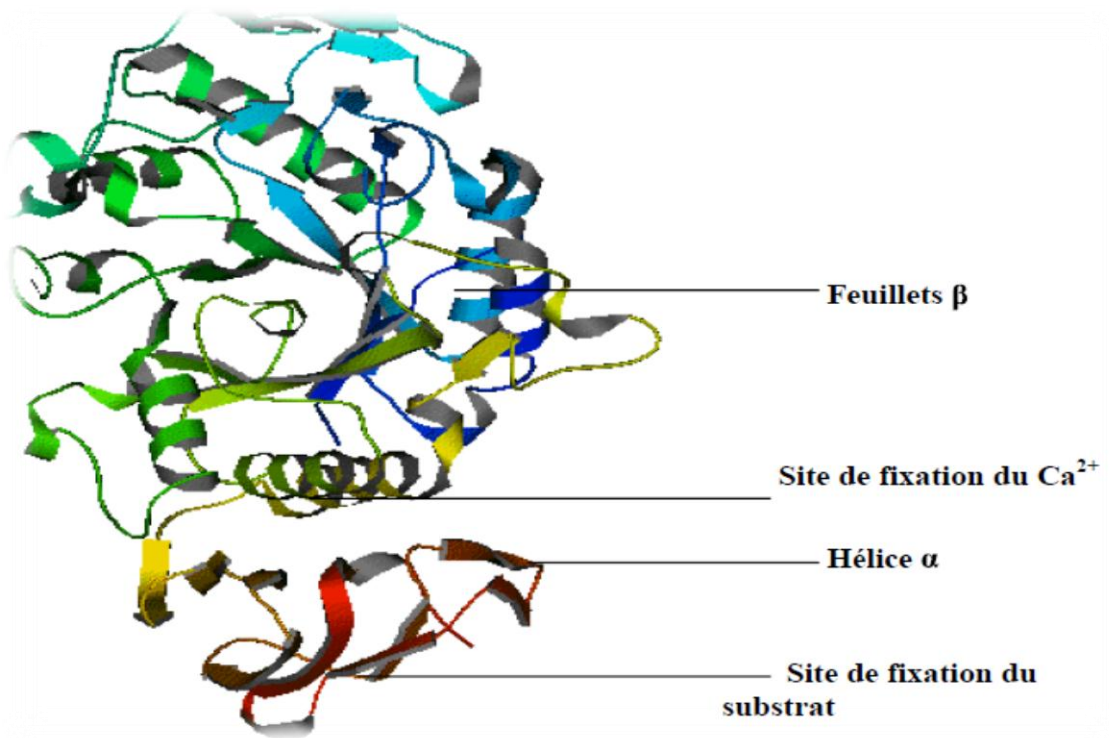


Figure 01 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase fongique(Priestle, 1988)

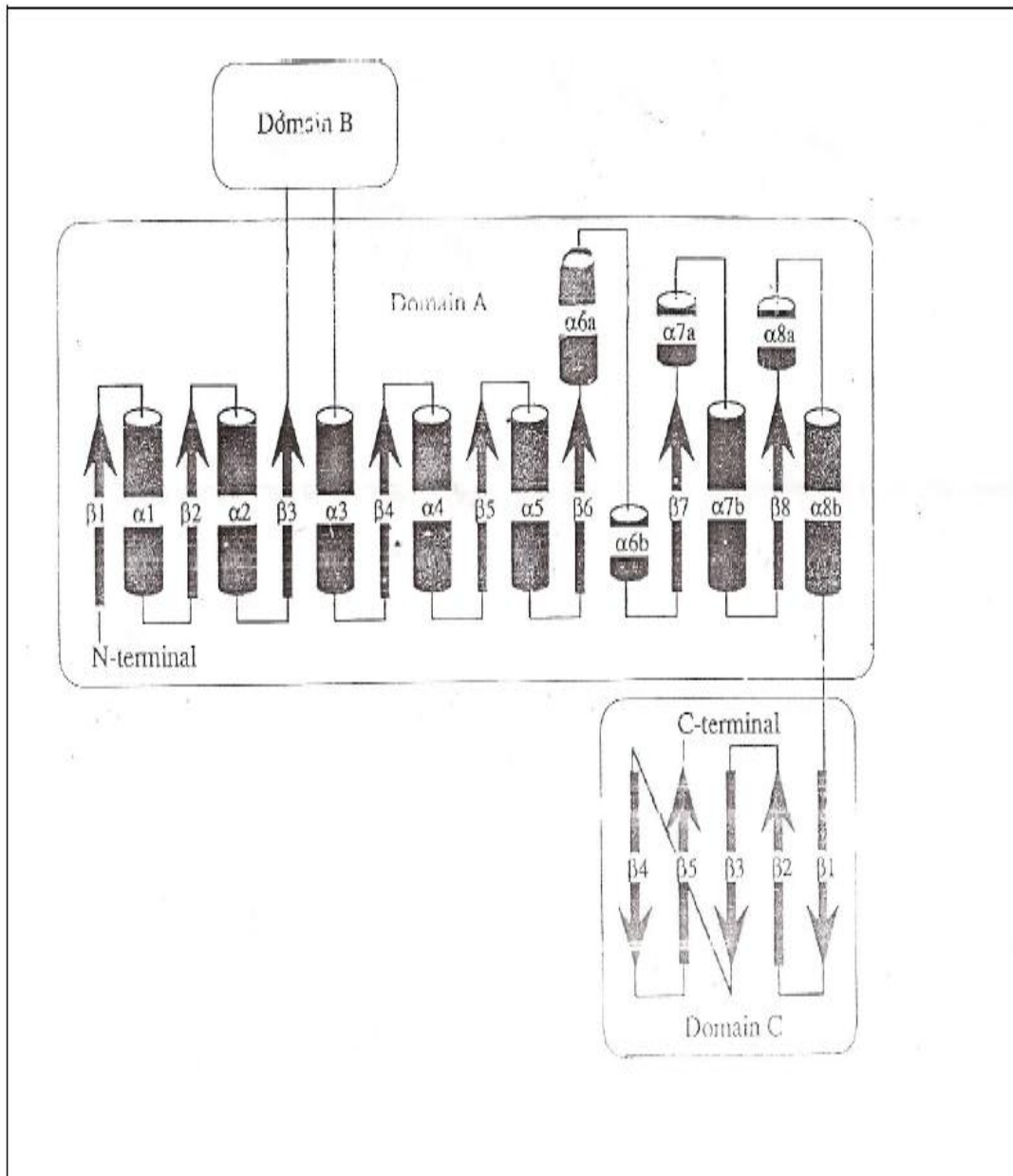


Figure 02 : Représentation des domaines et des éléments de la structure secondaire de α -amylase (Kadziola et al., 1994).

4. Mécanisme d'action d'alpha amylase:

Certains résidus du site actif des enzymes peuvent jouer le rôle de donneur ou d'accepteur de protons. Ainsi les chaînes latérales des résidus d'acide aspartique, et d'acides glutamiques (**Jean-Pierre, 2010**). La réaction catalytique d'alpha amylase est réalisée en trois étapes (**Nielsen et al., 2001**) (Figure 04).

- Protonation de l'oxygène glucidique par le donneur d'hydrogène Glu 233 et attaque sur le glucose (C₁) par le nucléophile (Asp 197) départ de la fin réductrice du substrat.
- L'activation d'une molécule d'eau, clivage de liaison covalente C₁ dans le résidu Asp 197.
- Régénération des états initiaux de protonation (**Nielsen et al., 2001**)

Le mode d'action d'alpha amylase peut se faire selon différentes façons, selon les conditions expérimentales telles que la température, pH et la taille et poids moléculaire (**Berry et Paterson, 1990**) :

- *Attaque aléatoire*: l'hydrolyse de n'importe quelle liaison glucosidique $\alpha(1-4)$ à partir de l'extrémité réductrice provoque la formation du glucose, maltose et α -dextrine (**Scriban, 1999**) ;
- *Attaque préférée*: la préférence de certaines liaisons glucosidiques dans le substrat par l' α -amylase (**Berry et Paterson, 1990**) ;
- *Attaque multiple ou répétitive*: l'enzyme déplace tout le long de la chaîne du substrat et hydrolyse les liaisons glucosidiques sans dissociation du substrat (**Kandra et al, 1997**) ;
- *Mécanisme Uni-chaîne*: l'enzyme dégrade chaîne par chaîne. L'enzyme forme un complexe actif avec un substrat, elle catalyse la réaction et ne renferme pas un autre complexe actif jusqu'à la dégradation totale de la première chaîne (**Berry et Paterson, 1990**) ;
- *Mécanisme multi-chaîne*: Dégradation des chaînes parallèlement (**Pazur et Marcheti, 1992**).

Généralement les modalités d'action des enzymes dépendent de leur origine, elles hydrolysent les liaisons $\alpha(1-4)$ de l'amylose et l'amylopectine de l'amidon (Figure 04), à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes (**Parkcet et al., 1997**).

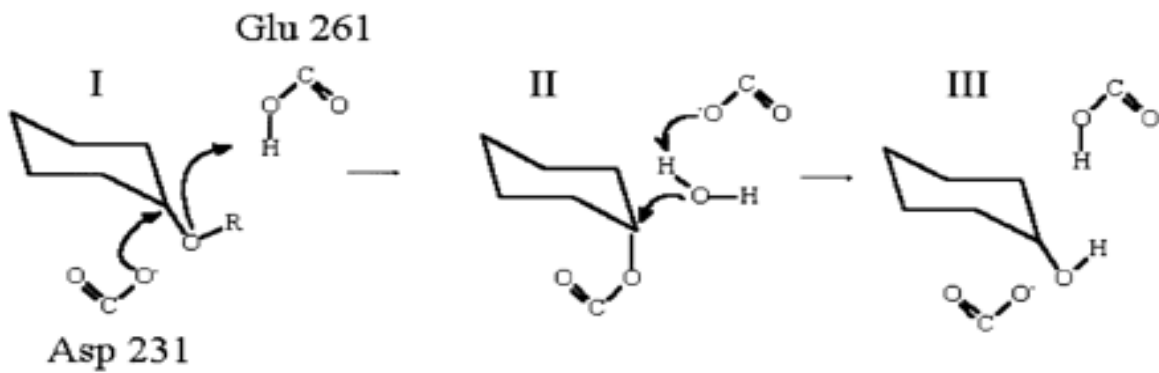


Figure 03 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosydiques

(Nielsen et al., 2001)

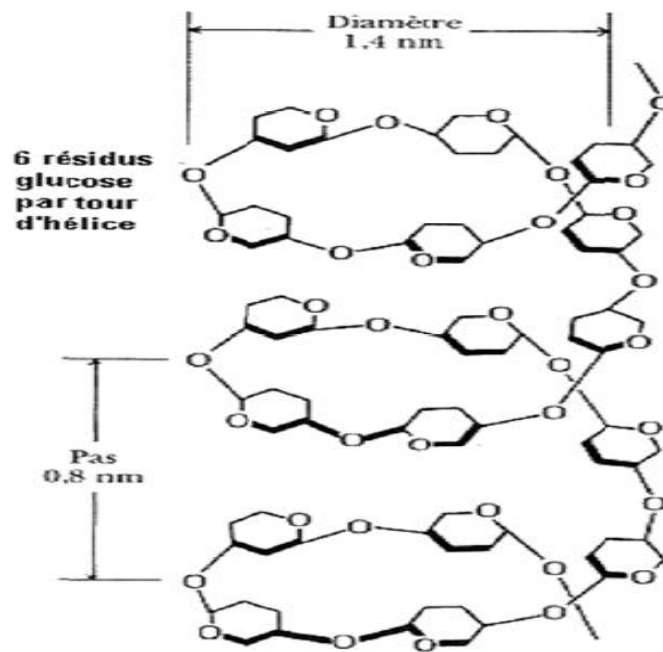


Figure 04: structure d'hélice d'amylose (Chiba, 1998)

5. Caractéristiques d'alpha amylase:

Les amylases sont une partie de la plus large classe des enzymes hydrolytiques appelées les glycosidases, clivent les liaisons glycosidiques de l'amidon donnant les fragments de disaccharide qui sont plus tard décomposés en glucose [(Nicola Pohl, 2005), (Benarous, 2000)] comme la majorité des enzymes, les conditions expérimentales comme la température et le pH sont capables d'influencer la vitesse de la réaction enzymatique d'alpha amylase (Jean-Pierre, 2010).

Tableau 01: propriétés d'alpha amylase (E.C.3.2.1.1)

[(Fogarty et Kelly, 1980) ; (Panchal, 1990)]

Enzyme d'origine	PM (KD)	pH optimum	T° optimale(°C)
Animale			
Salive humaine	50	6.9	40
Pancréas de porc	50	6.9	37
Végétale			
Malt d orge	59.5	4.7-5.4	50-55
Blé	-	4.6	60-66
Microbienne			
Bactéries			
<i>Bacillus</i>	49	5.9	65
<i>amyloliquefaciens</i>	22.5	5.0-9.0	76
Moisissurs			
<i>Aspergillus niger</i>	-	6.5	55
<i>Aspergillus oryzae</i>	52.6	5.5-6.9	40
Levures			
<i>Lipomyces starkey</i>	76	4	70
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	38	5.5	40

- **Le poids moléculaire:**le poids moléculaire des alpha amylases varie selon l'origine et selon l'espèce.Il est compris entre 40,000 et 90,000 Dalton (**Schomburg et Salzmman,1991**).Pour l'origine levurienne varie entre 40,000 et 70,000 Dalton (**Panchal,1990**).
- **pH optimum:** L'enzyme d' α -amylase est très sensible au pH, et le choix de se dernier est très essentiel pour la production de cette enzyme (**McMahon et al., 1999**).Généralement les α -amylases sont stable dans une gamme de pH de 5 à 8 . Pour les α -amylases fongiques un optimum pH situent entre 4 à 5 et alors que les bactéries ont un optimum supérieure à la neutralité.En ce qui concerne l'alpha amylases levurienne, l'enzyme requiert selon les espèces des pH situant entre 4 et 6 (**Panchal,1990**).
- **Température:** les alphas amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C et ces températures varié selon l'origine et l'espèces (**Schombury et Salzman, 1991**).En effet, l'alpha amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermo stabilité (70°C à 90°C) alors que l'alpha amylase fongique est d'une thermo stabilité assez faible (**Sicard, 1982**).
L'alpha amylase levurienne à des températures allant de 40°C à 60°C(**Panchal ,1990**).

6. Les effecteurs d'alpha amylase :

6.1.Activateurs:

les ions de calcium joue un rôle d'activateur et participe dans l'activation catalytique de l'enzyme (**Graham,1996**).Egalement les ions Cl^- qui effectue l'augmentation d'activité d'enzyme et changement de conformation.D'autres ions tels que : Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} et Fe^{+2} , ont été rapportés comme stimulateurs et activateurs de l'alpha amylase(**Schomburg et Salzmman,1991**).

De plus, l'histidine, le mercaptoéthanol et le dithiothritol sont aussi considérés comme des activateurs [(**Kekosetal., 1983**), (**Bealinet al., 1990**)].

6.2.Inhibiteurs:

L'alpha amylase peut être sensible à plusieurs agent inhibiteurs comme: l'EDTA (agent chélateur du calcium),les métaux lourds, l'urée et certains composants amide (**Toralballa et Eitingon,1967**). Il y a des éléments ont des effets négative sur l'activité amyliasique : l'iodoacétate, l'acide ascorbique, l'isopanitol et le maltotriitol(**Schomburg et Salzmman,1991**).

Matériels et Méthodes

Notre étude comporte deux parties : la première *in vitro*, consiste à déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme alpha-amylase d'*Aspergillus oryzae*, dans la deuxième *in silico*, nous avons utilisé un logiciel d'amarrage moléculaire afin de proposer les modes d'interactions possibles entre certains métabolites secondaires de plants (ligands) et notre enzyme (alpha amylase).

1. partie *in vitro* :

1.1. Préparation des solutions

Afin de déterminer les paramètres K_m et V_{max} pour l'alpha amylase *Aspergillus oryzae*, Nous avons préparé les solutions suivantes :

- **Le réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)**

Dans un Erlen Meyer, 1 g de DNSA est dispersé dans 40 mL d'eau distillée. A cette solution 30 g de tartrate double de sodium et de potassium (sigma-aldrich) sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 mL d'une solution de NaOH(sigma-aldrich)2N rend le réactif limpide avec une couleur orange. Le volume obtenu 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

- **La solution tampon :**

Afin d'éliminer l'effet probable des variations de pH du milieu réactionnel sur l'activité d'enzyme, nous avons préparé une solution à pH=6.9 de 0.02M à partir d'un mélange de deux solutions : une de Na_2HPO_4 (la solution A) et autre de NaH_2PO_4 (la solution B), préparées à une concentration de 0.1M avec de l'eau distillée.

Solution A: dans un bécher, une masse de 1.1998g de NaH_2PO_4 (sigma-aldrich) a été dissoute totalement dans 80 mL d'eau distillée, le volume final est ajusté dans une fiole jaugée de 100 mL.

Solution B: dans un bécher, une masse de 1.4196g de Na_2HPO_4 (sigma-aldrich) a été dissoute totalement dans 80 mL d'eau distillée, le volume final est ajusté dans une fiole jaugée de 100 mL.

Nous avons mélangé 24,8 mL de la solution (A) avec 25,17 mL de la solution (B) , le pH du tonpon et vérifié et ajusté , ensuite à 6,9 par l'addition de l'une des deux solutions. Le volume est ajusté jusqu'a 250 mL avec l'eau distillée dans une fiole jaugée.

- **La solution d' α -amylase :**

L'enzyme utilisée est l' α -amylase d'*Aspergillus oryzae* (E.C.3.2.1.1) sous forme lyophilisée (Fluka), son poids moléculaire est de 51000 Da avec une activité spécifique de 28,75 UI/mg, conservée à +4°C.

1.1043gd' α -amylase est solubilisé dans 25mL de solution tampon phosphate (0.02 M, pH 6.9). La solution obtenue contient une activité α -amylasique de 03 UI/mL.

A partir de cette solution mère nous avons préparé une solution dont l'activité enzymatique finale de l' α -amylase dans le milieu réactionnel est de 1 UI/mL. L'activité α -amylasique d'*Aspergillus oryzae* est étudiée à pH 6.9 pour une température de 40°C.

- **La solution de substrat :**

Le substrat utilisé dans cette expérience est l'amidon soluble de pomme de terre (Merk). Les concentrations finales d'amidon trouvées dans le milieu réactionnel sont :0.066, 0.133, 0.200 et 0.266 g/L. Ces concentrations sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.02M, pH 6.9).

- **La solution de maltose (étalon) :**

Une solution mère dont la concentration égale à 0.06 M est préparée par solubilisation d'une masse de 0.51 g dans un volume d'eau distillée puis ajusté jusqu'a 25 mL dans un fiole jaugée.

Une gamme d'étalonnage de différentes concentrations de maltose est nécessaire pour déterminer la quantité du maltose produite après hydrolyse enzymatique de l'amidon(Tableau02).

Tableau02 : Gamme d'étalonnage du maltose.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solution de maltose (mL)	2.25	2.00	1.75	1.50	0.75	0.50	0.25	0.125	0.00
Eau distillé (mL)	0.75	1.00	1.75	1.50	2.25	2.50	2.75	2.875	3.00
Volume final (mL)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
[Maltose] Mol	4.50	4.00	3.50	3.00	1.50	1.00	0.50	0.25	0.00

1.2. Méthodes

--Méthode 01 :

a. Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bernfeld (1955)

Cette méthode colorimétrique est basée sur la mesure de l'absorbance de la lumière, à une longueur d'onde de 540 nm, par l'acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge, le produit d'une réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune par des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres, en milieu alcalin et à chaud. L'intensité de la coloration varie selon la quantité de sucres réducteurs présente dans le milieu réactionnel (**Bernfeld P., 1955**) Dans une série de tubes à essai on introduit 0.2 mL de réactif DNSA, puis 0.2 mL du milieu à doser (Etalon ou milieu réactionnel contenant l'enzyme et l'amidon) ;

- Les tubes sont agités et placés dans un bain marie bouillant pendant 5 min (T=100°C) ;

- Les tubes sont immédiatement refroidis dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le maltose et le réactif DNSA ;
- On ajoute 4 mL d'eau distillée dans chaque tube, puis on homogénéise par agitation mécanique;
- Les densités optiques sont lues contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 540 nm.

b. Mesure de la vitesse initiale

La vitesse initiale de la réaction enzymatique, est la mesure de la quantité de produit apparu ou le substrat disparu pendant les premières minutes de la réaction enzymatique.

Dans cette expérience, le produit formé après hydrolyse enzymatique de l'amidon par l' α -amylase est le maltose, qui est un sucre réducteur formé de deux sous unités α -D-glucopyranose après rupture des liaisons $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glucosidiques à n'importe quel endroit à l'intérieur de la molécule de polysaccharide.

La vitesse initiale de la réaction enzymatique est mesurée à partir des pentes des droites «[Produit]= f (tps) » après hydrolyse enzymatique de substrat selon la formule suivante :

$$V_i = \Delta P / \Delta t$$

V_i : vitesse initiale.

ΔP : différence entre deux concentrations du produit formé.

Δt : différence entre deux temps de la réaction.

-Méthode 02 :

Ou par calcul de la dérivé primaire au temps 0 suit à un traitement des résultats obtenus, par régression non linéaire sous logiciel TABLE CURVE 2D (SYSTAT software inc., 2002).

c. Détermination des paramètres cinétique de l' α -amylase

Les paramètres cinétiques de l' α -amylase (V_{max} et K_m), sont déterminés en utilisant la représentation en double inverse, celle de LineweaverBurk ($1/V_i = f(1/[S])$), qui permet de déterminer précisément les paramètres cinétiques de l' α -amylase.

2. Partie *in silico* (amarrage moléculaire) :

Dans cette partie, MVD Molegro Virtual Docker 5.5 (**Molegro Virtual Docker, 2010**), un logiciel conçu pour l'amarrage moléculaire est utilisé avec un processeur Intel dual core.

la figure 05 montre les étapes suivies lors de la préparation des molécules jusqu'à l'exécution des algorithmes de « docking » des quatre structures moléculaires attribuées à 4 différents métabolites secondaires (ligands flexibles) sur le site de fixation (fixé) d'un ligand inclus dans la structure cristallographique de l'enzyme.

- **La protéine :**

La structure tridimensionnelle de l'enzyme alpha amylase d'*Aspergillus oryzae* (PDB code : 3XV1) est obtenue à partir de la base des données (**Berman H. M. et coll., 2000**), les molécules d'eau sont éliminées, la structure du ligand native incluse dans les données cristallographiques est utilisée pour la recherche des crevasses d'enzyme.

- **Les ligands :**

Les structures des ligands que nous avons utilisés dans cette partie d'étude, sont obtenues à partir de la base des données gratuites ZINC (**Irwin J. J. et coll., 2012**) sous la forme d'un fichier MOL2. (Tableau 03)

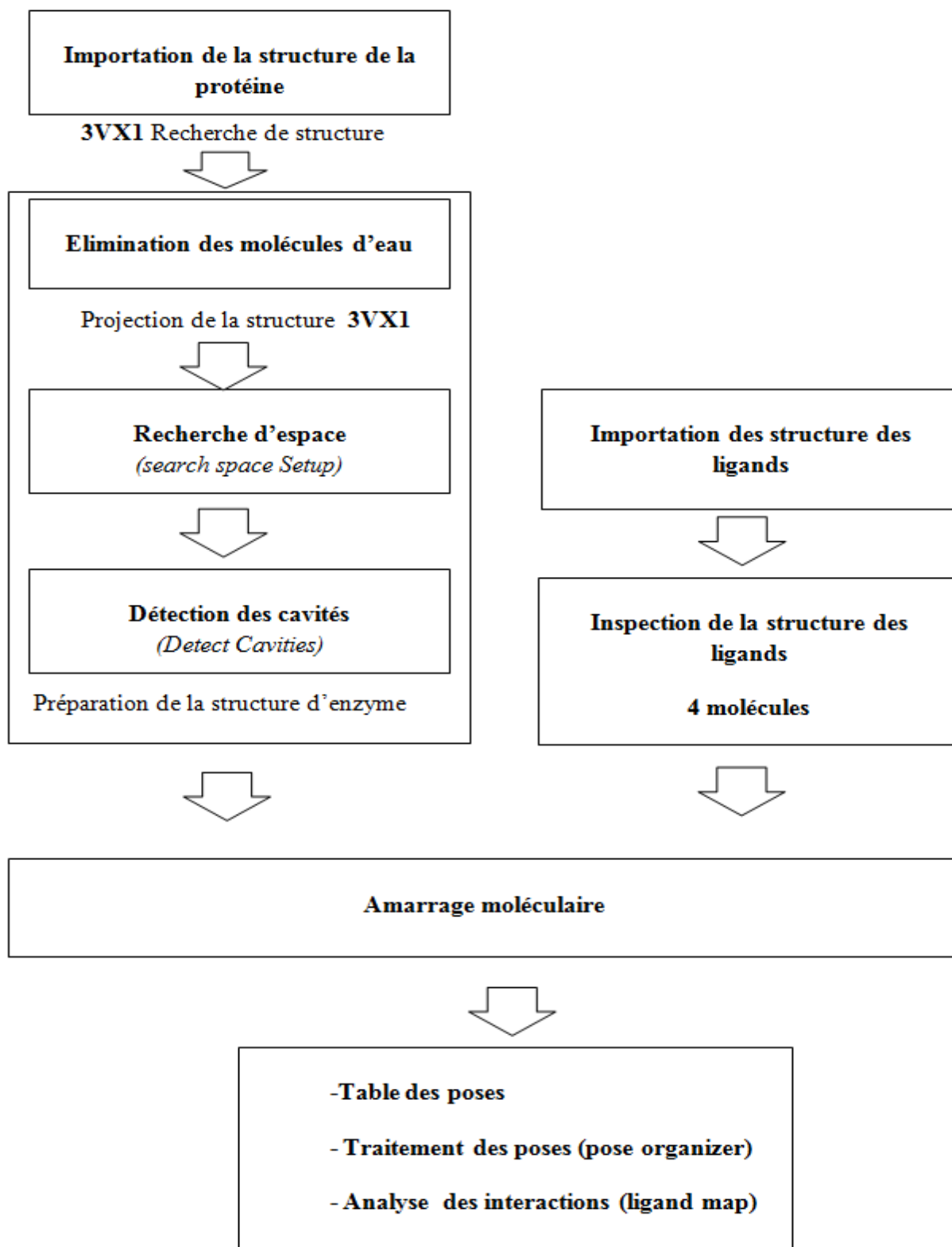
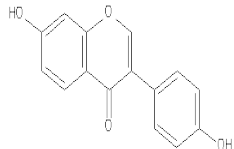
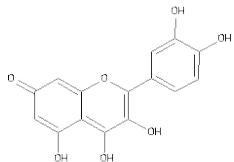
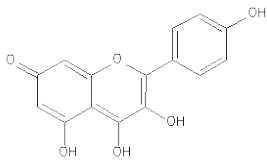
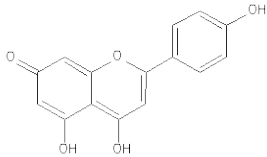


Figure 05 : Etapes de préparation, amarrage et analyse des résultats du docking des protéine-ligands

Tableau 03 : Codes et noms des ligands utilisés pour l'amarrage moléculaire

Ligand	ZINC ID	Nom	Structure chimique
1	18847034	Daidzein : 4',7-Dihydroxyisoflavanone	
2	3869685	Quercetin : 3,3',4,5,7-Pentahydroxyflavone	
3	3869768	Kaempferol : 3,4',5,7-Tetrahydroxy-Flavone	
4	3871576	Apigenin 4',5,7-Trihydroxyflavone	

Résultats et discussion

1. La cinétique enzymatique de l' α -amylase

1.1. Courbe d'étalonnage :

La gamme d'étalonnage réalisée avec le maltose donne une droite représentée graphiquement sur la figure 06 ($R^2= 0.990$; $y=0.1109x$).

Le résultat obtenu montre une relation proportionnelle entre la DO et l'augmentation de la concentration du maltose. Une telle relation est due à l'augmentation dans le taux de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique par les fonctionsaldéhydes libresportées par les résidus glucose.

1.2. Mesure des vitesses initiales :

Afin de déterminer les vitesses initiales de la réaction enzymatique, nous avons choisi différentes concentrations finales de substrat à savoir 0.066, 0.133, 0.200 et 0.266 g/L et une activité enzymatique finale de l' α -amylase égale à 1 UI/mL dans le milieu réactionnel. Le pH est tamponné à 6.9 et la température est fixée à 40°C.

Les vitesses initiales (V_i) sont : les pentes des droites ($\Delta P/\Delta t$), tracées à travers les points expérimentaux temps 0 et 1.5 min des courbes qui correspondent aux concentrations de produit formé en fonction du temps, ou les pentes des tangentes à temps 0 pour les courbes obtenues suite à une régression non linéaire contre une équation de cinétique de formation $y=a[1- \exp(-bx)]$,**méthode (2)**.

Les valeurs des V_i obtenues par les deux méthodes de traitement sont regroupées dans le tableau (04).

Les résultats obtenus montrent que le traitement par la méthode des pentes entre le 0 et 1.5 min donne les valeurs les plus élevées des V_{i0} . De plus, nous remarquons que la V_i de la réaction enzymatique augmente avec l'augmentation de la concentration d'amidon.

Les figures 07,08,09 et 10 présentent les courbes cinétiques de variation de la concentration du maltose libéré par l'enzyme en fonction du temps. Les points expérimentaux montrent des fluctuations pour les valeurs des DO mesurées lorsque le temps d'incubation dépasse les 3 min, ces fluctuations sont dues à l'incertitude dans : les volumes prélevés et /ou dans le volume d'eau distillée ajoutée lors de l'étape de dilution qui précède la mesure spectroscopique.

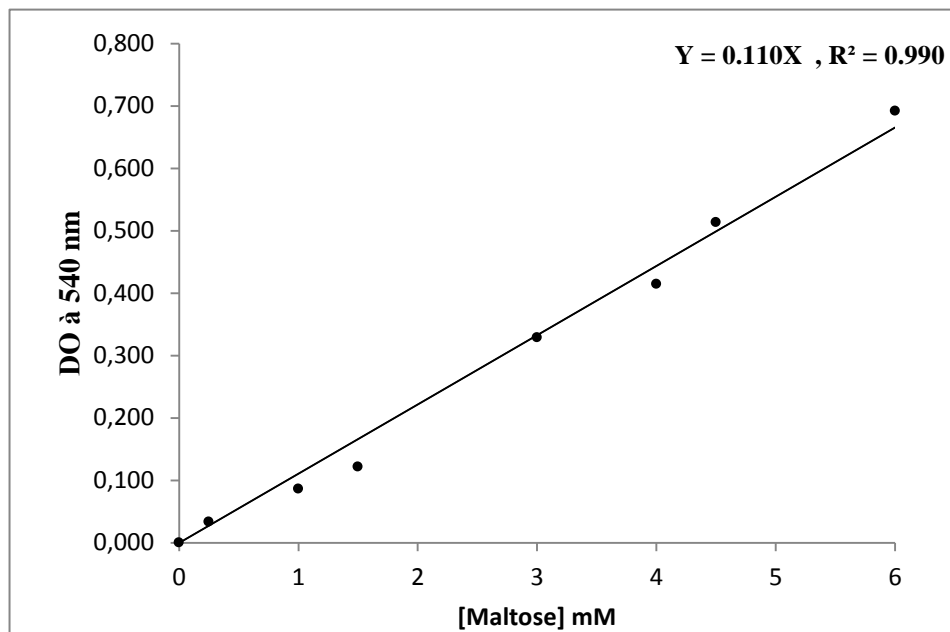


Figure 06 : Courbe d'étalonnage du maltose ($\lambda=540\text{nm}$)

Tableau 04 : Vitesses initiales de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat.

[Amidon] initiale (g/L)	Vi (mM/min)	
	Méthode (1)	Méthode (2)
0.8	9.761	7.474
0.6	4.164	7.438
0.4	2.947	5.360
0.2	1.586	1.221

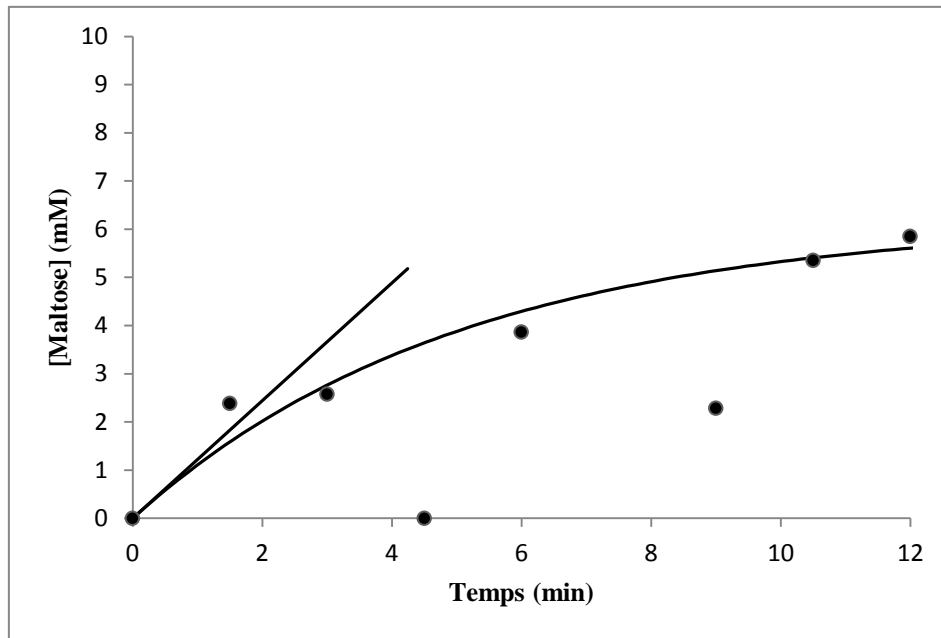


Figure 07: Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps

[Amidon] = 0.066 g/L , [alpha amylase]= 1UI/mL, pH=6.9, T° = 40°C

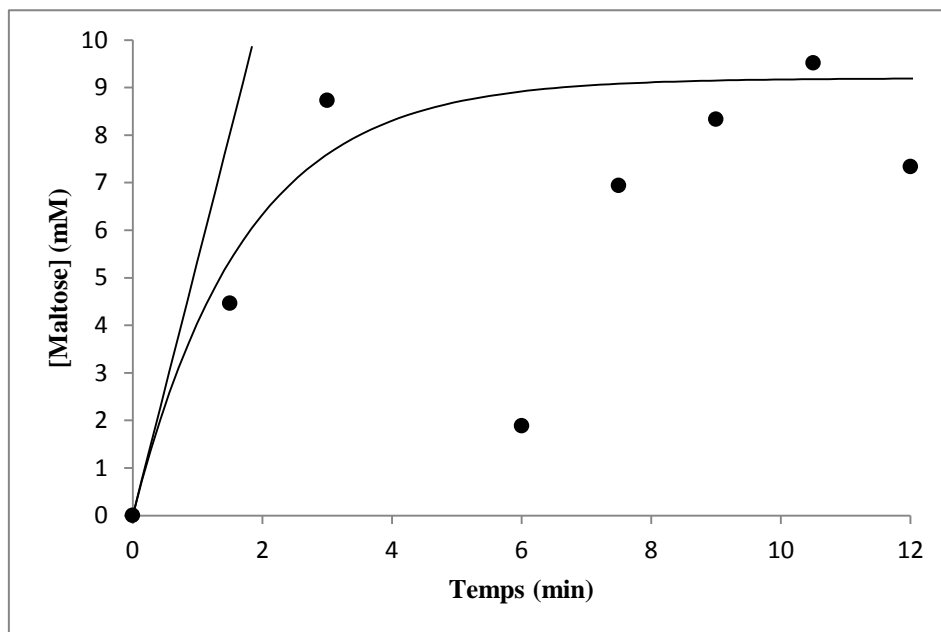


Figure 08 : Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps

[Amidon] = 0.133 g/L, [alpha amylase]= 1UI/mL, pH=6.9, T° = 40°C

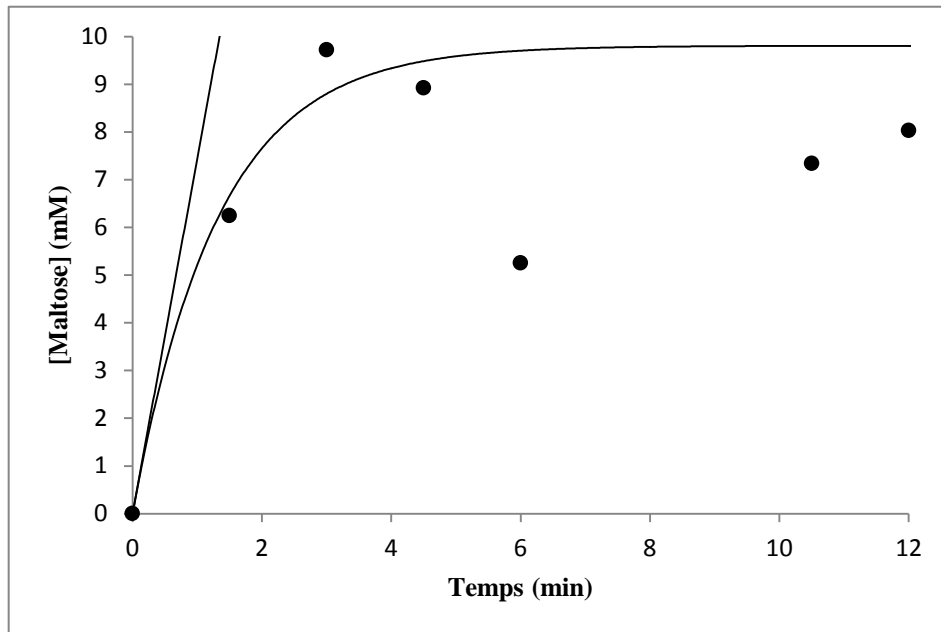


Figure 09: Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps

[Amidon] = 0.200 g/L, [alpha amylase] = 1UI/mL, pH = 6.9, T° = 40°C

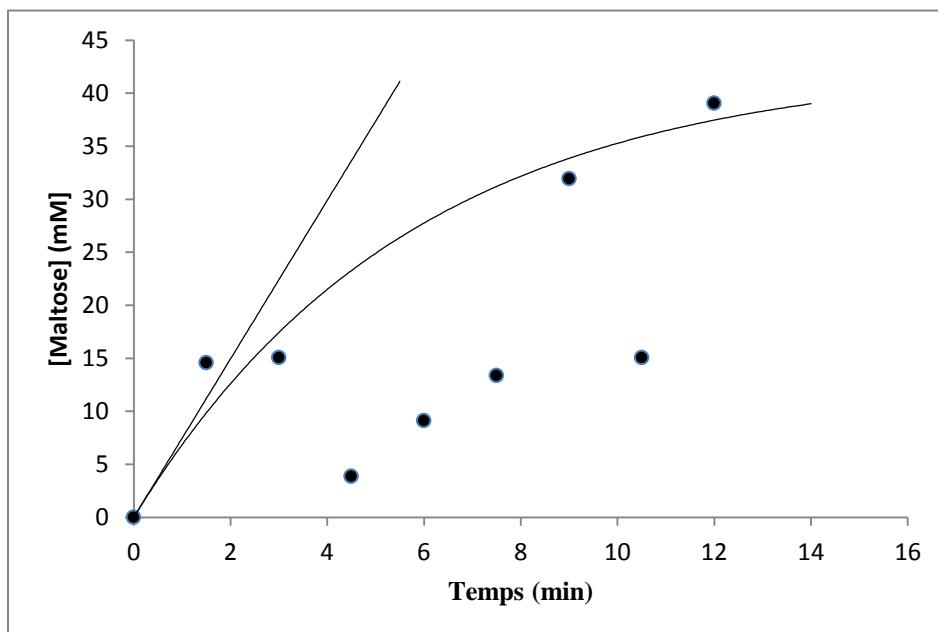


Figure 10 : Variation de la concentration du maltose libéré en fonction du temps

[Amidon] = 0.266g/L, [alpha amylase] = 1UI/mL, pH = 6.9, T° = 40°C

1.3. Détermination des paramètres cinétiques de l' α -amylase

La courbe en double inverse de *Lineweaver et Burk* ($1/V_i = f(1/[S])$) des V_i obtenu par la première méthode, nous a permis de déterminer les paramètres cinétiques de l' α -amylase, qui sont la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m) qui correspond à la concentration en substrat à laquelle la catalyse enzymatique se produit à la moitié de sa vitesse maximale (figure 11).

Le point correspondant à la concentration 0.8 g/L est considéré comme aberrant lors du traitement des données.

La vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m) calculées à partir de cette représentation, donnent les résultats suivants :

$$V_{max} = 2.222 \text{ mM/min}$$

$$K_m = 1.154 \text{ g/L}$$

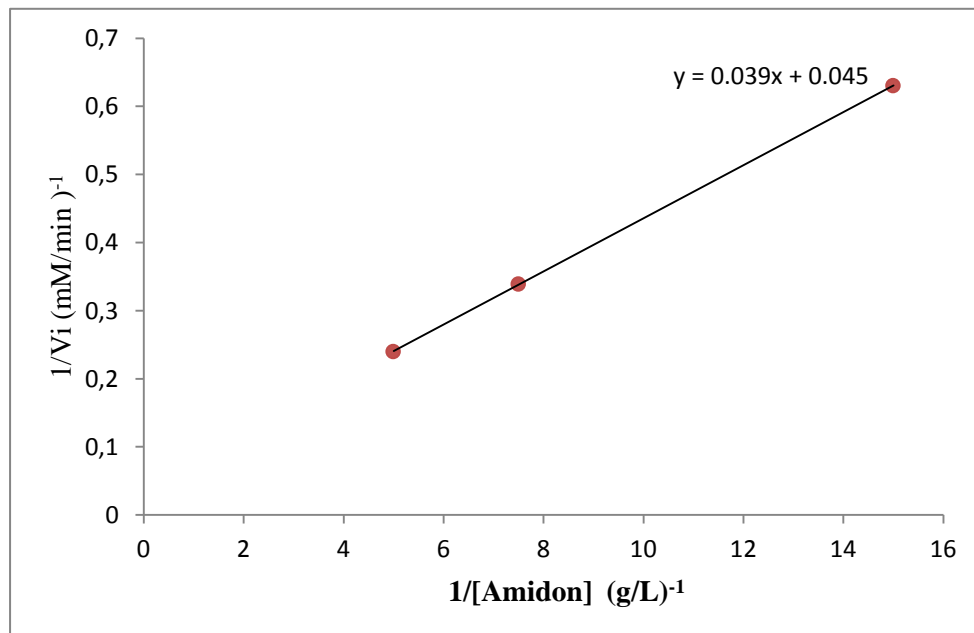


Figure 11: Représentation de *Lineweaver et Burk* de la réaction enzymatique à différentes concentrations de substrat.

2. Amarrage moléculaire et étude des interactions enzyme–ligands

La terminologie utiliser pour le « docking » est la suivante :

- Mode d'interaction : signifie la position relative de ligands par rapport à l'enzyme.
- Pose : signifie une solution d'amarrage ; l'ensemble des modes d'interactions possible entre le ligand et la protéine.
- « Scoring » : signifie l'évaluation d'une pose particulière en fonction du nombre et de la force des interactions entre le ligand et la protéine.
- « Ranking » : classement des ligands en fonction de l'affinité d'interaction / score d'interaction.
- HBond : signifie l'énergie totale de l'interaction hydrogénée établies entre le ligand et la protéine.

L'enzyme choisit dans notre étude est l'alpha amylase *d'aspergilluseoryzea*. Le téléchargement de l'alpha amylase (figure 2) a été fait a partir de la base de données BookhavenProteinData Bank (code d'accès 3XV1).

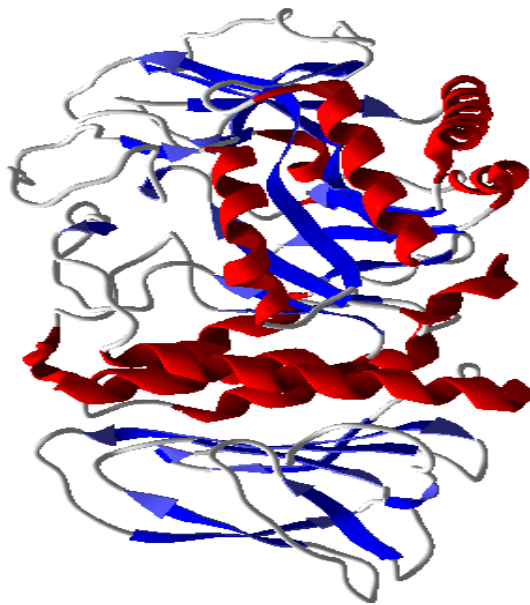


Figure12 : Structure secondaire d'alpha amylase « originale » (code pdb : 3XV1)

Dans ce travail l'étape du docking moléculaire qui consiste la formation des complexes alpha amylase et 4 molécules représentent deux familles de Flavonoïdes, les flavonones et les flavone, a été réalisé par le programme Molegrovirtual dockeroù les paramétrés sont mises, par défaut.

Les ligands sont incorpore dans la crevasse de site de fixation du ligand native de la structure cristallographique, après que cette dernier est localisé par l'exécution du logarithme « cavities détecte » du programme.

Le tableau regroupe la pose représentant le Moldock Score le plus faible donc l'interaction protéine - ligands la plus stable pour chaque molécule. D'après ces résultats nous remarquons bien que la quercitrine est la susceptible pour interagir avec la protéine et cela malgré que les liaisons hydrogènes du Kaempferol, sont les plus stable énergétiquement HBond :-28.6607

Tableau 05: Paramètres de docking des ligands dans le site de fixation d'alpha amylase.

Ligand	MoldockScore	Rank Scors	Hbond
Quercitin	-93.5717	-72.07065	-12.7152
Apigenin	-89.3621	-78.4726	-7.58801
Daidzein	-89.0095	-71.2409	-12.5664
Kaempferol	-88.9998	-66.1749	-28.6607

Suite à ces résultats que nous avons analysé chaque pose afin de déterminé les résidus et les atomes de ligands qui contribuent à la formation des complexe protéine-ligands.

Quercitine :

Tableau 06 : Ensemble des groupements fonctionnel de la quercitrine dans l'établissement des liaisons hydrogènes

Atome	Fonction chimique	Résidus d'acide aminé Code à trois lettres
Oxygène 17	Hydroxyle OH	Tyr 88
Oxygène 18	Hydroxyle OH	Ile 87
Oxygène 19	Hydroxyle OH	Trp 190
Oxygène 20	Hydroxyle OH	Tyr 88 , Asp 189

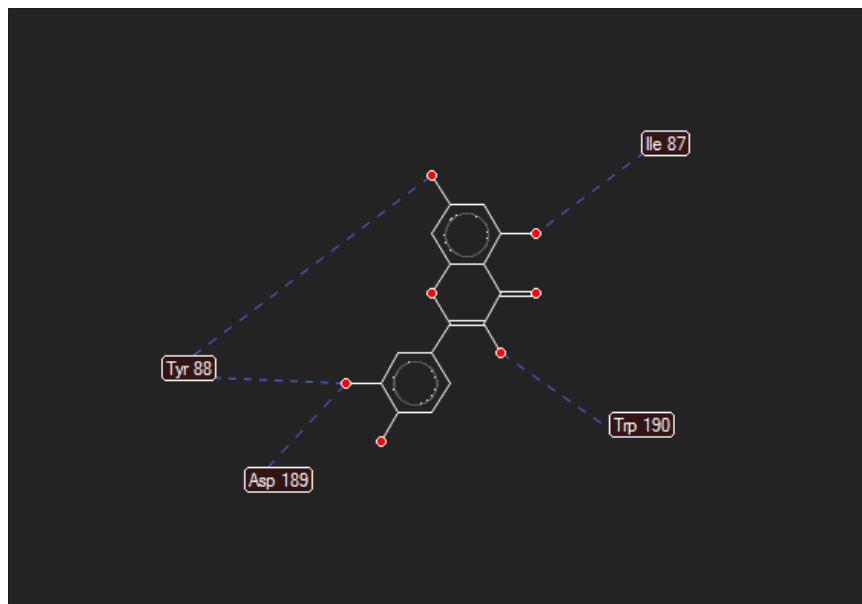


Figure 13 : Interactions hydrogènes entre lequercitrin et l'alpha amylase « originale »

Kaempferol :

Tableau 07 : Ensemble des groupements fonctionnel de la Kaempferol dans l'établissement des liaisons hydrogènes

Atome	Fonction chimique	Résidus d'acide aminé Code à trois lettres
Oxygène 17	Hydroxyle OH	Tyr 198
Oxygène 18	Hydroxyle OH	Ile 87
Oxygène 19	Hydroxyle OH	Trp 190

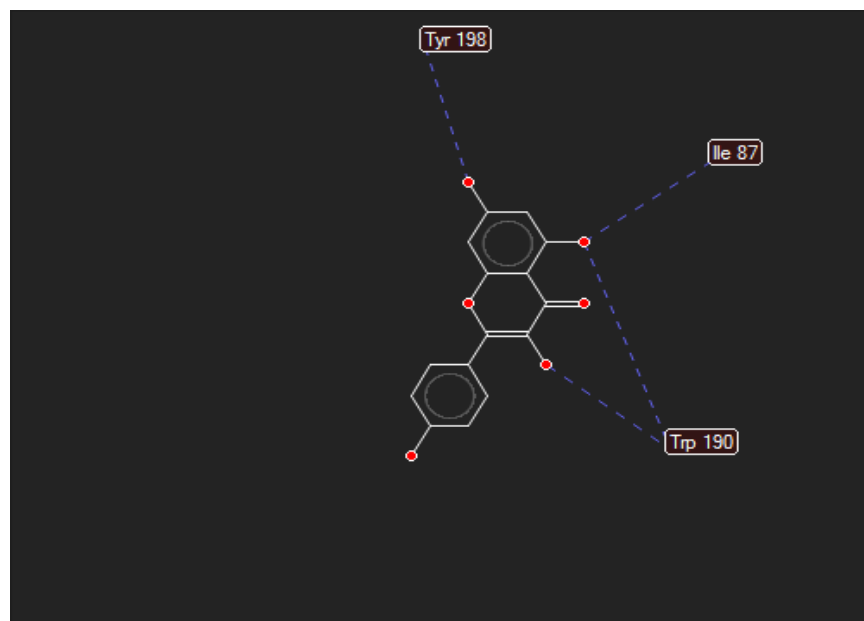


Figure 14 : Interactions hydrogènes entre le Kaempferol et l'alpha amylase « originale »

Daidzein:

Tableau 08 : Ensemble des groupements fonctionnel de la daidzein dans l'établissement des liaisons hydrogènes

Atome	Fonction chimique	Résidus d'acide aminé Code à trois lettres
Oxygène 16	Hydroxyle OH	Asn 197
Oxygène 17	Hydroxyle OH	Ser 89

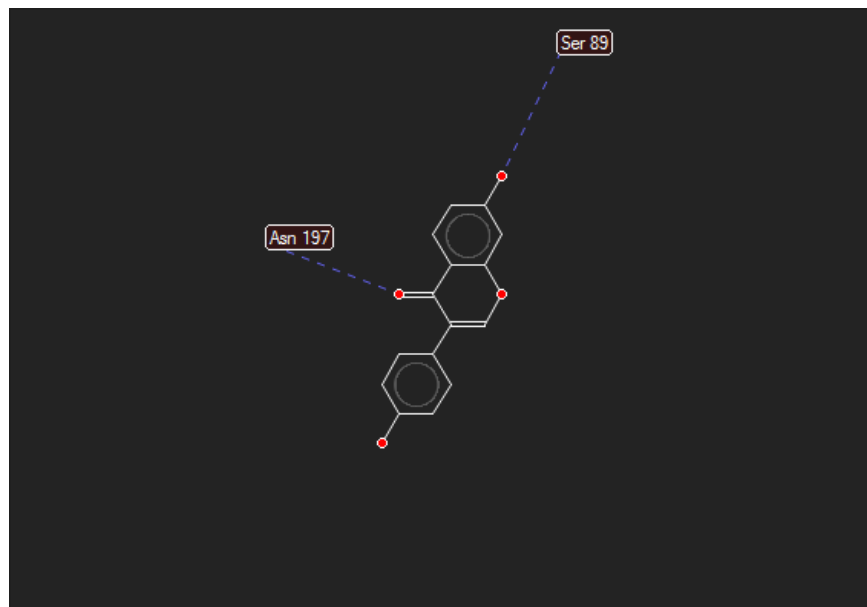


Figure 15 : Interactions hydrogènes entre la daidzein et l'alpha amylase « originale »

Apigenin:

Tableau 09: Ensemble des groupements fonctionnel de la apigenin dans l'établissement des liaisons hydrogènes

Atome	Fonction chimique	Résidus d'acide aminé Code à trois lettres
Oxygène 16	Hydroxyle OH	Tyr 198
Oxygène 17	Hydroxyle OH	Ile 87, Trp 190
Oxygène 18	Hydroxyle OH	Asn 197

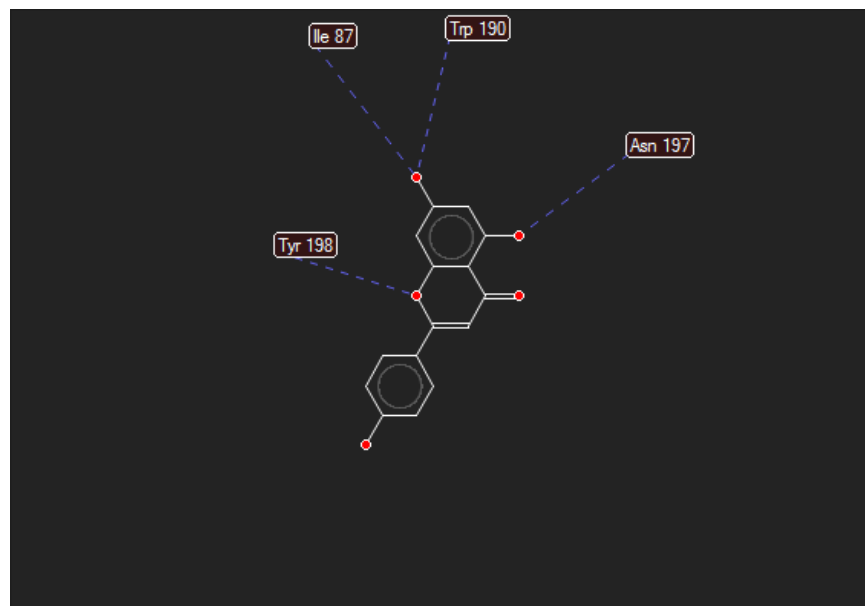


Figure 16 : Interactions hydrogènes entre l'apigenin et l'alpha amylase « originale »

A partir des informations des tableaux 06,07,08 et 09 l'augmentation du nombre des fonctions hydroxyle OH dans la structure des molécules engendre une augmentation dans le nombre des liaisons hydrogènes établies entre les ligands et l'enzyme .

Conclusion

Cette étude nous a permis de caractériser les paramètres cinétiques d'alpha amylase fongique extraite a partir d'*Aspegilluseoryzae*. Dans les conditions expérimentale de pH 6,9 et de température de 40°C. Les résultats obtenu montre que l'enzyme vis-à-vis l'amidon présente une activité caractérisé par une $V_{max} = 2.222$ mM/min et un $K_m = 1.154$ g/L. De plus, les résultats d'amarrage montre une possibilité d'utilisation de l'apiginie , de la quercitin, du kaempferol, et ladaidzein comme effecteur pour la régulation de l'activité de cette enzyme, ces molécules présente la possibilité d'établir des interactions type hydrogènes avec les chaineslatérales des acides aminés inclus dans les site actif de l'enzyme.

Références bibliographiques

Références bibliographiques:

- **Bealin K. F., Kelly C. T., Fogarty W., M. (1990).** *Biochem. Soc. Trans*, 18: 310-311.
- **Ben Arous.K.2006.** Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase. Diplôme d' Ingénieur d'état en génie biologique. Université Amar Telidji Laghouat.alger .
- **Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. (2000).** "The Protein Data Bank." *Nucleic Acids Res* 28(1): 235-242.
- **Bernfeld P. (1955).** [17] Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, Academic Press. Volume 1: 149-158.
- **BERRY D. R., ET PATERSON A. (1990).** Enzymes in foodindustry.. In Suckling C.J.*Enzymeschemistry impact and application*. Ed. Chapman H. London. : 306-351.
- **Boel E., Brady L., Brozowski A-M., Derewanda Z., Dodson G-G., Jensen V-J., Petersen S-B., Swift H., Thim I. &Woldike H-F. (1990).** Calcium binding in -amylase: an X-raydiffraction studyat 2,1 Å resolution of two enzymes from*Aspergillus* . *Biochem.*,(**29**): 6244-6249.
- **ChabraouiL.Kabbage.W.(2011).**ENZYMOLOGIE . Cours 1^{er} année medecine .
- **CHIBA S. (1988).** Amyloglycosidase. In: *Handbook of Amylases and related enzymes* (The AmylaseResearch Society of Japan, éd.). PergamumPress, Oxford, U.K :104-116.
- **FOGARTY W M., KELLY C.T. (1980).** Amylase, amyloglucosidase and relatedglucanases. In Rose(A.H.) Ed. *Economicmicrobiology, microbial enzymes and bioconversion*. London: AcademicPress.(5):115-170.268.

- **Graham T.(1996)** . Acide α -amylase biochemistry .2ED.Rathews& Van Holde -132 .
- **Irwin J. J., Sterling T., Mysinger M. M., Bolstad E. S. and Coleman R. G. (2012)**. "ZINC: a free tool to discover chemistry for biology." *J Chem Inf Model* 52(7): 1757-1768.
- **Kadziola A., Abe J., Svensson B ., Aser R. (1994)**. Crystal and molecular structure of barley -amylase. *J. Mol. Biol.* (239): 104-121.
- **Kandra L .,Gyemant G., Farakas E .,Liptak A.(1997)**. Action pattern of porcine pancreatic α -amylase on threedifferentseries of beta -maltooligosaccharide glycoside ,carbohyde .Res .289.(3).: 237-242.
- **Kekos D .,Macris B .J. (1983)**.Appl. Environ. Microbiol. (45): 935-941.
- **Mc Carter J.D and Withers S.G. (1996)**. Unequivocal identification of Asp-214 as the catalyticnucleophile of *Saccharomyces cervisiae*-glucosidaseusing 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.*, (271): 6889-6894.
- **Manstala p ., Zalkin H.(1979)**. j.Biol.chem. (254):8540-8547.
- **Mastuura Y.M ., HaradaW ., Kakudo M . (1984)**. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem .Tokyo.*(95) :697–702.
- **Mazur A.K .,NakataniH.(1993)**. Multiple attackmechanisme in the porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of amylose and andamylopectineArch-Biophysics.Volume ,306(1) 29 -38 .
- **Mercier C.(1985)**.Lez enzymes amylyolytiques.InmourancheA.costeC. Hydrolases et depolymerases . Gauthier -Villars. :110-140 .
- **Moulin G., Glazy p (1978)** .Z.allg.mikrobiol.(18) :269-274.

- **Nielsen J.E., Borchert T.V., Varien G (2001)** . The determinants of α -amylase PH- activity profiles .protein engineering oxford universitypress .14(7) : 505-512.
- **Panchall C.j. (1990)** .Yeaststrainselection .Marcel Dekker. ED Usa :189 .
- **PARK C.S., CHANG C. C., KIM J .Y., OGRYDZIAK D.M., RYUI D D.Y. (1997).** Expression,secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast*Yarrowialipolytica*. - *J. Biol. Chem.*,**272**(11) :6876-6881.
- **Pazur J . H ., Marchetti N.T (1992)** .Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-14 c] malto - oli .
- **pierre Sine .J.2010.** Enzymologie et applications .(32).rue bargue : 141-145 .
- **Priestle Y.P. (1988).** A sterea cartoon-drawing program for proteins. *J.Appl. Crystall.*(21): 472-576.
- **Scriban R .(1999).** Biotechnologie.techniques et documentation-lavoisier : 401-409.
- **Schomburg D., Salzman M (1991)** . Enzyme hand book 4 .classe 3 :hydrolases .spring .verlag . ED.Berlin Heidelberg .Germany : 1-12 .
- **Sicard P. (1982).**Applications industrielles des enzymes . *In* : Les enzymes production et utilisations industrielles . Durand G., Monson P. Editions Gauthier – Villars, Paris.p:121-164.
- **Stefanova M ., Emanuilova E. (1992).** Characterization of a thermostable -Amylase from *Bacillus brevis* . *Eu . J. Biochem.*, **207**(1) : 345-349.
- **Uitdehaag J C.M., Mosi R., Kalk K.H., Vander Veen B.A., Dijkhuizen L., Withers S.G ., Dijkstra B.W. (1999).** X-ray structure along the reactionpathwav of cyclodextrin

Références bibliographiques

glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. *Nat. Struct. Biol.* (6) : 432-436.

- **Toralballe .G ., Eitingon . M (1967)** . Action of urea and certain other amide Reagenstoncrystalline porcine pancreatic -amylase , *Archbiochemiebiophys* : 119 - 519 .
- **Voet D. Voet J.G .,(2005)**.biochemie .©de boeck et larcier .rue des minimes 39,B.1000.Bruxelles :459-485.
- Wikipédia «Inhibiteur enzymatique ».,2014 .[.http://fr.wikipedia.org/wiki](http://fr.wikipedia.org/wiki) , date de consultation : 03 /04/2014 .
- <http://www.enzyme2.html> , date de consultation : 11/04/2014 .