

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/20

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :
CHAREF Dalal & SLIMANI Lylia

Thème

Caractérisation et optimisation de l'activité de l' α -amylase
présente dans les graines des deux plantes médicinales :
Opuntia ficus indica et *Pinus halepensis* Mill

Soutenu le : 22 / 09 / 2020

Devant le jury composé de :

Nom et prénom :

Grade :

M. KADRI Nabil

MCA

Univ. de Bouira

Président

M. CHERGUI Achour

MCB

Univ. de Bouira

Promoteur

M. TIGHRINE Abderrahmane

MAB

Univ. de Bouira

Examineur

Année universitaire : 2019/2020



Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté, l'amour du savoir, le courage et la patience pour accomplir ce modeste travail.

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur

M. CHERGUI Achour de nous avoir donné l'honneur de nous encadrer, et pour sa précieuse aide, sa gentillesse, sa compréhension. Veuillez trouver ici, Monsieur, notre reconnaissance et tout notre respect.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect aux jurys

Pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger ce mémoire :

M. KADRI Nabil et M. TIGHRINE Abderrahmane

Enfin, notre remerciement s'adresse également à tous les enseignants de l'Université Akli Mohand Oulhadj, et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail





Dédicace

Grace à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je

dédie :

A mes très chers parents maman et papa, source de tendresse, la

force de courage d'étude et de vie, à mes précieux frères :

Mohamed et Yahia et à mon adorable sœur Kahina et son petit

Islam, sans oublier ma meilleure amie Sara.

Je vous remercie d'être toujours à mes côtés de me soutenir,

aimer, protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

Je vous aime infiniment

Et un spécial dédicace à ma merveilleuse binôme « Dallo »





Dédicace

Au nom de DIEU le clément et le Miséricordieux Louange à ALLAH le Tout puissant En tout premier lieu, je remercie le bon DIEU, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Je dédie ce modeste travaille :

A Mes chers parents AICHA et ALI, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse.

A mes chères sœurs et mes chers frères HAKIM, AZIZ et surtout à HALIM ; tu es le meilleur frère qui existe, je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

Une spéciale dédicace à ma magnifique et merveilleuse binôme qui compte énormément pour moi « Lili ».

A tous mes amies Soulaf, Chaima, Hindo et Soumia pour votre soutien et affection. Puissiez-vous trouver dans ce travail le témoin de mon affection et estime.

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux que j'aime



Pandémie de Covid-19

En décembre 2019, Une épidémie de pneumonie d'allure virale d'étiologie inconnue a émergé dans la ville de Wuhan (province de Hubei, Chine), très vite il a été confirmé qu'il s'agissait d'un nouveau virus initialement appelé nCOV-2019 pour nouveau coronavirus 2019, puis renommé SARS-CoV-2 est à l'origine d'une maladie appelée COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*). Les *Coronavirus* sont des virus appartenant à la famille des *Coronaviridae*, responsables d'infections des voies respiratoires chez l'être humaine et l'animal, tirent leurs noms du fait de leurs apparences : ils sont entourés d'une capsule de protéines formant une couronne.

Le Sars-CoV-2, par rapport au syndrome respiratoire aigu sévère provoqué par *Coronavirus 2* , il s'agit d'un coronavirus, appartenant à l'espèce virale *SARSr-CoV*, dans le sous genre *Sarbecovirus* du genre *Betacoronavirus*, son hôte naturel apparaît être la chauve-souris sauf que plusieurs hypothèses ont été émises à propos de réservoir intermédiaire du virus, notamment celles du pangolin, mais aucune n'a été validée avec certitude. L'entrée de ce virus dans le corps humain provoque une maladie infectieuse respiratoire pouvant être mortelle chez les patients fragilisés par l'âge ou une autre maladie chronique. Elle se transmet par contact rapproché avec des personnes touchées, ces symptômes principales sont la fièvre, la fatigue et la toux sèche comme certains patients peuvent présenter des symptômes secondaires tels que les douleurs, l'écoulement nasal, les maux de gorge et la diarrhée, ces derniers sont généralement bénins tandis que la pneumonie est la complication la plus fréquente de la maladie COVID-19.

La situation épidémique a évolué au niveau mondial, la COVID-19 est maintenant pandémique et touche de nombreux pays dans le monde y compris l'Algérie. Depuis le 25 février 2020, la maladie se propage sur le territoire Algérien amenant l'état Algérien à imposer un confinement de façon progressif ainsi la fermeture de tous les secteurs économiques, éducatifs à savoir les entreprises, les établissements dont les établissements scolaires et universitaires.

Sur ce, malheureusement, nous n'avons pas pu y parvenir à mettre en pratique nos connaissances sur le terrain, avec un travail expérimental visant l'optimisation de procédé d'extraction et la purification de l' α -amylase présent dans les graines de la plante médicinal *Pinus halepensis* Mill, citant que ce travail est prévu qu'il soit réalisé selon plusieurs étapes :

une extraction par macération et précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium présentes dans les graines de *Pinus halepensis* et les graines d'*Opuntia ficus indica* traitées par un broyage et une délipidation, dosage de taux de protéines et la présence de α -amylase, optimisation selon méthodologie d'expérience choisissant le plan box behnken à la suite purification de α -amylase selon divers étapes chromatographiques et ultrafiltration à la fin une électrophorèse de cet enzyme purifier.

Résumé

L' α -amylase (E.C.3.2.1.1.) est une enzyme appartenant à la famille des hydrolases. Elle hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amidon, amylopectine... pour donner des composées d'unité de glucose, elle est largement distribuée dans les plantes, les tissus des mammifères et les microorganismes. Et elle est classée parmi les enzymes les plus utilisées dans des procédés industriels agroalimentaire mais aussi utilisé dans les domaines pharmaco-médicales et biologiques.

L'objectif de ce travail repose sur l'optimisation de procédé d'extraction de l' α -amylase à partir des graines de deux plantes médicinales : *Opuntia ficus indica* et *Pinus halepensis* Mill, utilisant la méthode de surface de réponse basée sur le plan d'expérience Box Behnken afin de déterminer les conditions optimales de l'extraction de cette enzyme végétale. Ensuite la purification de l'enzyme par un enchainement des méthodes chromatographiques, citant : chromatographie d'exclusion moléculaire, chromatographie échangeuse d'ions, l'ultrafiltration, et à la fin une l'électrophorèse SDS-PAGE.

Ce travail est fait d'une manière théorique résumant toutes les étapes à suivre pour résoudre la problématique posée et aussi donnant des travaux déjà réalisés afin d'argumenter et d'apporter plus d'importance à notre thématique, et tout ça à cause de l'état sanitaire actuelle et la propagation gigantesque de la pandémie « COVID-19 » qui nous a entraver de rejoindre le lieu de notre stage afin d'appliquer sur le terrain les expériences qui nous auraient permis d'avoir les résultats voulus.

Mots clés: Plantes médicinales, *Pinus halepensis* Mill, *Opuntia ficus-indica*, α -amylase, plan Box Behnken, optimisation, extraction

Abstract

α -amylase (E.C.3.2.1.1.) is an enzyme that belongs to the hydrolase family. It randomly hydrolyses the osidic bonds of starch, amylopectin, etc. to give glucose unit compounds, and it is widely distributed in plants, mammalian tissues and microorganisms and it is classified among the most widely used enzymes in industrial processes.

The objective of this work is based on the optimization of α -amylase extraction processes from two medicinal plants seeds: *Opuntia ficus indica* and *Pinus halepensis* Mill, using the response surface method using the Box Behnken design to determine the optimal conditions for the extraction of this plant amylolytic enzyme. Then the purification of the enzyme by a sequence of chromatographic methods, citing: Molecular exclusion chromatography, ion exchange chromatography and ultrafiltration and at the end a SDS-PAGE electrophoresis.

This work is done in a theoretical way summarizing all the steps to be followed to solve the problem posed and also giving similar works in order to argue and bring more importance to our theme, and all this because of the current sanitary situation and the gigantic propagation of the pandemic "COVID-19" which hindered us to reach our stage site in order to apply in the field the experiments which would have allowed us to have the desired results.

Keywords: Medical plants, *Pinus halepensis* Mill, *Opuntia ficus-indica*, α -amylase, Box Behnken design, optimization, extraction

ملخص

الافا-أميلاز هو إنزيم ينتمي إلى عائلة Hydrolase، يحل بشكل عشوائي الروابط الأوسيدية للنشاء، الأميلويكتين... لإعطاء وحدات الغلوكوز، تتواجد في النباتات وأنسجة الثدييات والكائنات الحية الدقيقة. يصنف هذا الإنزيمات من ضمن أكثر الإنزيمات المستخدمة العمليات الصناعية.

يهدف هذا العمل إلى تحسين عمليات استخلاص الالفافا-أميلاز من بذور بعض النباتات الطبية: الصنوبر الحلبي والتين الشوكي باستخدام طريقة الاستجابة السطحية التي طورها تصميم Box Behnken لتحديد الظروف المثلى لاستخراج هذا الإنزيم المحلل النباتي. تم الحصول على نتائج هذا التصميم بواسطة برنامج إحصائي يسهل تصميم التجارب يسمى MINITAB، وتفسير هذه النتائج تتم عن طريق تحليل التباين (ANOVA) وتحليل الرسوم البيانية، ثم تنقية الإنزيم تتم بتسلسل من التقنيات الكروماتوجرافية نذكر: كروماتوغرافيا الإقصاء الجزئي، كروماتوغرافيا التبادل الأيوني والترشيح الفائق وفي النهاية، الرحلان الكهربائي SDS .PAGE

غير ان هذا العمل تم القيام به بطريقة نظرية تلخص جميع الخطوات التي يجب اتباعها لاستكمال هذا الموضوع وأيضا قمنا بذكر دراسات سابقة من أجل إعطاء أهمية أكبر لموضوعنا. وهذا كله بسبب الوضع الصحي "كوفيد-19" الذي أعاقنا للوصول إلى موقع التدريب العملي من أجل تطبيق التجارب التي كانت ستنجح لنا الحصول على النتائج المرجوة.

الكلمات المفتاحية : الفافا-أميلاز، التين الشوكي، الصنوبر الحلبي، تصميم Box behnken, الاستخراج, التحسين ...

Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction Générale 1

Chapitre I : Les plantes médicinales

1. *Pinus halepensis* Mill

1.1. Présentation de la plante.....	3
1.2. Taxonomie de l'espèce.....	4
1.3. L'aire de répartition géographique	4
1.3.1. Dans le monde.....	4
1.3.2. En Algérie.....	5
1.4. Description botanique.....	6
1.5. Composition chimique.....	9
1.6. Les propriétés pharmacologiques et biologiques de la plante.....	10
1.6.1. Usages traditionnels.....	10
1.6.2. Intérêts nutritionnels et organoleptiques.....	10
1.6.3. Intérêts thérapeutiques.....	10
1.6.4. Intérêts biologiques.....	11
1.6.5. Intérêts économiques.....	12

2. *Opuntia ficus indica*

2.1. Présentation de la plante.....	13
2.2. Nomenclature et appellation.....	13
2.3. Classification.....	13
2.4. Distribution géographique.....	14
2.5. Description botanique.....	15
2.6. Composition chimique.....	17
2.7. Les principales utilisations du figuier de barbarie.....	18
2.7.1. Utilisations traditionnelles.....	18
2.7.2. Utilisations pharmaco-médicales.....	19
2.7.3. Utilisations cosmétiques.....	19

2.7.4. Utilisations agroalimentaires.....	20
---	----

Chapitre II : L' α -amylase

1. Définition	21
2. Nomenclature	22
3. Structure de l' α -amylase.....	22
4. Différentes origines.....	24
4.1. Origines animales.....	24
4.2. Origines végétales.....	24
4.3. Origines microbiennes.....	26
5. Mécanisme d'action.....	27
6. Caractéristiques Physico-chimiques de l' α -amylase.....	28
6.1. Le poids moléculaire.....	28
6.2. Le pH optimale d'activité	28
6.3. La température optimale d'activité.....	29
6.4. Effet des cofacteurs métalliques sur l'activité enzymatique.....	29
7. Les applications industrielles et biotechnologiques de l' α -amylase	29
7.1. Utilisation de l' α -amylase dans les industries agro-alimentaires.....	29
7.2. Autres Domaines d'application de l' α -amylase	31

Chapitre III : Les méthodes d'études de l' α -amylase végétale

1. Extraction des protéines végétales totales.....	32
1.1. Broyage.....	32
1.2. Délipidation	32
1.3. Macération.....	32
1.4. Test à l'iode.....	32
1.5. Précipitation fractionnée de l' α -amylase par le Sulfate d'Ammonium (NH ₄) ₂ SO ₄	33
1.6. Dialyse.....	34
2. Dosage des protéines totales.....	35
3. Dosage de l'activité amylolytique.....	36

4. Optimisation des paramètres d'extraction par la méthodologie des plans d'expériences.....	36
4.1. Plan d'expérience Box-Behnken.....	37
4.1.1. La Sélection des facteurs influençant l'extraction de l' α -amylase	37
4.1.2. La Matrices des expériences.....	38
4.1.3. Résultats et interprétations.....	39
4.1.4. Optimisation des conditions influençant le procédé d'extraction.....	39
5. Purification de l' α amylase.....	41
5.1. Chromatographie par filtration sur gel.....	41
5.2. Chromatographie échangeuse d'ions.....	42
5.3. Ultrafiltration.....	43
5.4. Electrophorèse SDS-PAGE.....	44

Chapitre IV : Résultats des autres études relatives

1. Extraction et optimisation de l' α -amylase présente dans les graines de pin Coréen.....	46
2. Extraction et optimisation de l' α -amylase présente dans les graines de figue de barbarie....	47
Conclusion générale.....	49

Références bibliographiques

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
01	Figure montre aire de répartition du pin d'Alep dans la région méditerranéenne	05
02	Figure représente aire de répartition du <i>Pinus halepensis</i> en Algérie	06
03	Photo illustre l'écorce de <i>Pinus halepensis</i> adulte	07
04	Photo illustre les aiguilles de <i>Pinus halepensis</i>	07
05	Figure présente un cône de <i>Pinus halepensis</i>	08
06	Figure montrant l'aspect du fruit après libération des graines a- Cône ouverte de <i>P. halepensis</i> b- Les graines de <i>P. halepensis</i>	08
07	Photo représente le tronc d' <i>Opuntia ficus indica</i>	15
08	Photo représente les cladodes d' <i>Opuntia ficus indica</i>	15
09	Photo montre l'aspect de fleur d' <i>Opuntia ficus indica</i>	16
10	Photo représente les fruits d' <i>Opuntia ficus indica</i>	16
11	Photo illustre les graines d' <i>Opuntia ficus indica</i>	17
12	Structure tridimensionnelle de l' α -amylase	22
13	La représentation des domaines et des éléments de la structure secondaire de l' α -amylase	23
14	Photo illustrant la biosynthèse de l' α - amylase dans la cellule végétale	25
15	Mécanisme d'action de l' α -amylase	28
16	Image représente le tableau de pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium	34
17	Photo illustrant la séparation par dialyse	35
18	La réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique	36
19	Figure illustrant un exemple des courbes de surfaces de réponses (d'iso-réponse) a- Diagramme de contour b- Graphique de surface	40
20	Photo présentant la chromatographie sur gel de filtration	42
21	Photo correspondant la chromatographie d'affinité	44

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
I	Situation botanique de l'espèce <i>Pinus halepensis</i> Mill	4
II	La composition chimique des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill	9
III	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du <i>Pinus halepensis</i> Mill	11
IV	Activité antifongique de l'huile essentielle du <i>Pinus halepensis</i> Mill	12
V	Position systématique de l'espèce <i>Opuntia ficus indica</i>	14
VI	Composition chimiques des graines de figue de barbarie	17
VII	Composition en vitamine de la graine de figue de barbarie	18
VIII	La quantité des composés phénoliques et des flavonoïdes présente dans les graines d' <i>Opuntia ficus indica</i>	18
IX	Utilisations agroalimentaires d' <i>Opuntia ficus indica</i>	20
X	Principales classes des enzymes et leurs types de réactions	21
XI	Les applications de l' α -amylase dans l'industrie agro-alimentaire	30
XII	Tableau montrant la relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan Box Behnken pour améliorer l'extraction de l' α -amylase.	37
XIII	Tableau présentant la matrice des expériences : Plan d'expérience Box-Behnken pour l'étude de 03 facteurs obtenus par le logiciel statistique MINITAB.	38
XIV	Tableau représente le résumé des étapes utilisées dans le 1 ^{er} article	46
XV	Tableau résume brièvement les étapes utilisées dans le 2 ^{eme} article	48

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
ACE 2	Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ASP	Acide Aspartique
BBD	Box Behnken Design = Plan de box Behnken
BSA	Bovin Serum Albumin = Albumine de sérum bovin
CEI	Chromatographie Echangeuse d'Ions
Da	Dalton
DEAE	Diéthylaminoéthyle
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
GA ₁	Gibbérellines bioactives 1
GLA	Gamma linoléic acid = Acide Gamma Linoléique
GLU	Acide Glutamique
GMPc	Guanosine Monophosphate cyclique
KDa	Kilo Dalton
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PM	Poids Moléculaire
RSM	Response surface methodology = Méthodologie des surfaces de réponse
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécysulfate de sodium
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UI/mg	Unité interactionnelle par milligramme

***INTRODUCTION
GENERALE***

Depuis l'Antiquité et jusqu'à ce jour, l'être humain utilise les plantes qu'il trouve dans la nature pour traiter et soigner ces maux. L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement une part d'intérêt auprès du public. selon l'O.M.S : environ 65-80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**Bouziane, 2017**). Au cours des dernières années, un intérêt croissant pour l'exploitation des différentes parties des plantes médicinales (feuille, tige, fruit, graines...etc.) a été observé dans différents domaines non seulement dans le domaine médical mais surtout dans les industries agroalimentaires (**Baghdali et Maameri, 2019**).

Ces plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances naturelles bioactives. Les diverses propriétés connues sont liées à la grande source de molécules chimiques complexes qu'elles représentent : métabolites primaires voir les protéines, mais aussi en métabolites secondaires (**Kadri et al., 2013**). Ces protéines végétales sont une très bonne alternative aux protéines animales que ce soit pour une application alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique, en raison de leurs faibles coûts, de l'abondances et de la diversités de leurs sources, de leurs qualités et valeurs nutritives, de leurs facilités de digestion et enfin pour leurs propriétés fonctionnelles (**Abbou et al., 2020**).

Sous l'intitulation : « Caractérisation et optimisation de l'activité de l' α -amylase présente dans les graines des deux plantes médicinales : *Pinus halepensis* Mill et *Opuntia ficus indica*», les principaux objectifs choisis pour réaliser ce travail sont : Extraction de l'enzyme α -amylase à partir des graines de pin d'Alep, identification des conditions physico-chimiques influençant le procédé d'extraction ensuite l'optimisation de ces conditions choisies en utilisant la méthodologie des plan d'expérience.

Les différentes parties de ce mémoire sont :

- Le 1^{er} chapitre sous le titre Plantes médicinales consiste une description botanique de 02 plantes médicinales : *Pinus halepensis* Mill et *Opuntia ficus indica*.
- Le 2^{eme} chapitre est consacré pour l'état de l'art de l'enzyme α -amylase.
- A cause de la pandémie COVID-19 qui a affecté le monde et a entravé l'accès aux travaux de groupe, via des mesures de confinement drastiques prises par le gouvernement, nous n'avons pas pu concrétiser nos objectifs expérimentaux, sur le terrain (entreprise SAIDAL), pour cela, nous avons pensé à consacrer le chapitre 03 à

la description de l'ensemble des investigations souvent utilisées pour l'étude de l' α -amylase d'origine végétale, et ce notamment par :

- Les méthodes d'extraction et de dosage de la fraction protéique présente dans les graines des 02 plantes choisis : Pin d'Alep et figuier de Barbarie.
- L'étape d'optimisation utilisant le plan d'expérience Box Behnken, dans le but d'augmenter le rendement d'extraction de l' α -amylase végétale permettant d'avoir une activité amylolytique maximale.
- Les méthodes chromatographiques à suivre afin d'obtenir une enzyme purifiée.
- A la fin un 4^{eme} chapitre qui est consacré à l'étude de quelques exemples de recherches relatives à notre thématique, traitant l' α -amylase végétale et optimisant quelques caractères qui influence son activité.

CHAPITRE I :
Les plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (feuille, tige, racine, fleur...) (Zeghad, 2010), leurs actions proviennent de leurs divers composés chimiques (métabolites primaires et secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (Sanago, 2006). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj et al., 2007).

Et parmi tous les plantes médicinales existantes, *Pinus halepensis* Mill et *Opuntia ficus indica* représentent l'objet de notre étude, choisies en fonction de leur large disponibilité et de leur emploi très fréquent en Algérie.

1. *Pinus halepensis* Mill

1.1. Présentation de la plante

Le pin est la désignation générique des plantes appartenant au genre *Pinus*. L'origine du nom *Pinus* provient du mot « pit », c'est un mot Indo-Européen désignant une résine (Bellahoual, 2012). Le genre *Pinus* est un conifère de la famille des pinacées (Philippe et al., 2006), qui comprend 250 espèces réparties dans le monde entier et essentiellement autour des côtes méditerranéennes (Fekih et al., 2014), appelés aussi les résineux ou sécrétrices de la résine, une substance visqueuse utilisée dans la fabrication de nombreux produits. Elles sont des arbres ou plus rarement des arbustes aux rameaux régulièrement verticillés. Les feuilles sont en forme d'aiguilles et persistantes (Lin et al., 2010).

Le pin d'Alep est une espèce décrite par le botaniste écossais Philip Miller en 1768 (Tekić et al., 2015). C'est un arbre circum méditerranéen que l'on trouve à l'état spontané autour du bassin méditerranéen sauf l'Égypte (Bouazza, 2013), est souvent connu sous le nom de pin méditerranéen du groupe *halepensis* ou pin d'Alep, Pin blanc, Pin de Jérusalem en français, Sanawbar el halabi en arabe, Azoumbei, tayada en berbère et Aleppo Pine, jerusalem pine pour les Britanniques (Guit et al., 2016).

1.2. Taxonomie de l'espèce

Le Tableau I présente la taxonomie du pin d'Alep qui fut retenue par tous les botanistes qui est celle donnée par Philip Miller (1768).

Tableau I : Situation botanique de l'espèce *Pinus halepensis* Mill (**Schiller, 2014**).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Coniferales
Famille	Pinaceae
Sous famille	Pinoideae
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i> Mill

1.3. L'aire de répartition géographique

1.3.1. Dans le monde

Pinus halepensis Mill occupe une place primordiale des pins méditerranéens. Il est très répandu en Afrique du Nord surtout en Algérie, Tunisie et Maroc où il constitue les massifs les plus importants et en Moyen-Orient (Syrie, Liban, Jordanie, Palestine et Turquie) (**Elaieb et al., 2017**). Et sur les rivages européens, il est présent en Espagne, France, Italie, et en Grèce (**Djerrad et al., 2015**), voir la figure 1. La couverture forestière totale est estimée à environ 3.5 millions d'hectare (**Vennetier et al., 2010**).

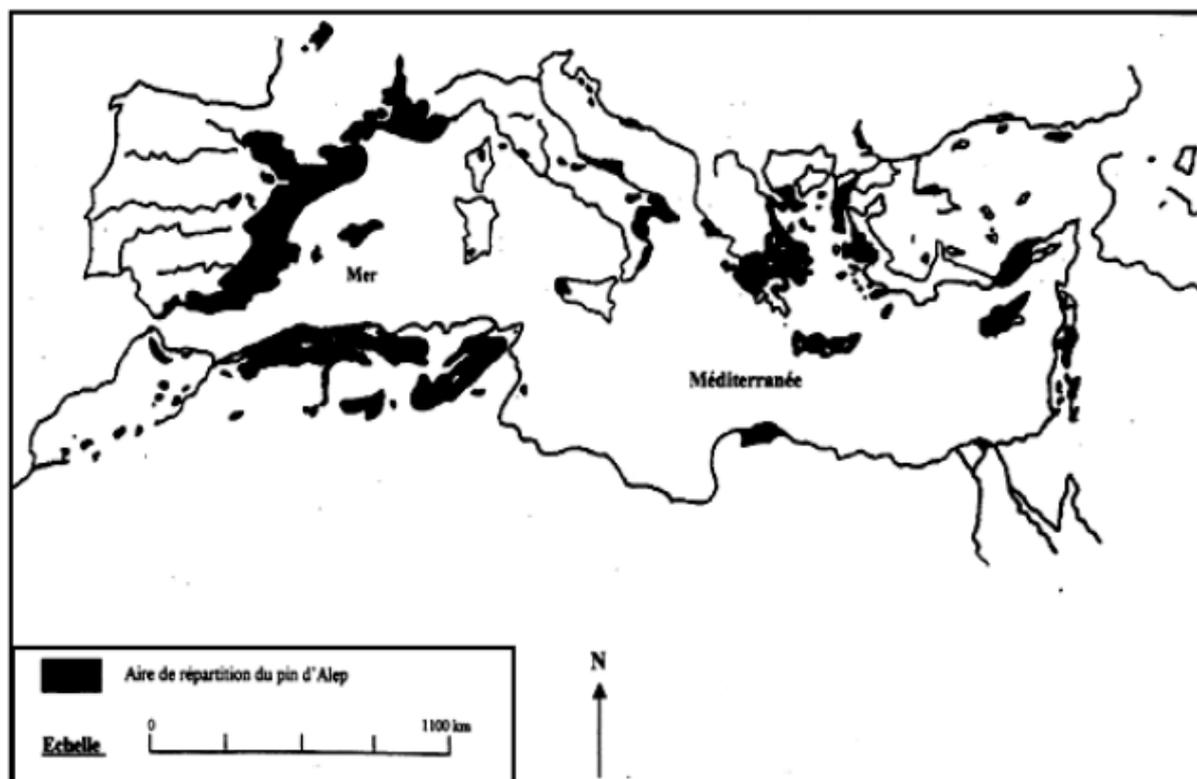


Figure 01 : Figure montre aire de répartition du pin d'Alep dans la région méditerranéenne (Guit et al., 2016).

1.3.2. En Algérie

En l'Algérie, le pin d'Alep est fréquent surtout sur les massifs du Tell littoral et l'Atlas Saharien, Il s'étend à lui seul sur près de 900.000 hectare (Kadri et al., 2015), il occupe 37% de la surface boisée de l'Algérie (Bentouati, 2006), s'étend essentiellement dans la partie septentrionale du pays, exception faite de la région Nord orientale. C'est ainsi qu'il occupe de spacieux peuplements en Oranie (Sidi-Bel-Abbès, Saida, Tlemcen, Tiaret, Ouarsenis) sur le Tell algérois (Médéa, Bibans), sur l'Atlas saharien (Monts des Ouleds Nails). Dans le Constantinois, il est surtout localisé dans les Aurès et les Monts de Tébessa où il rejoint la Tunisie par la dorsale (Bouguenna, 2011) comme l'indique la figure 2.

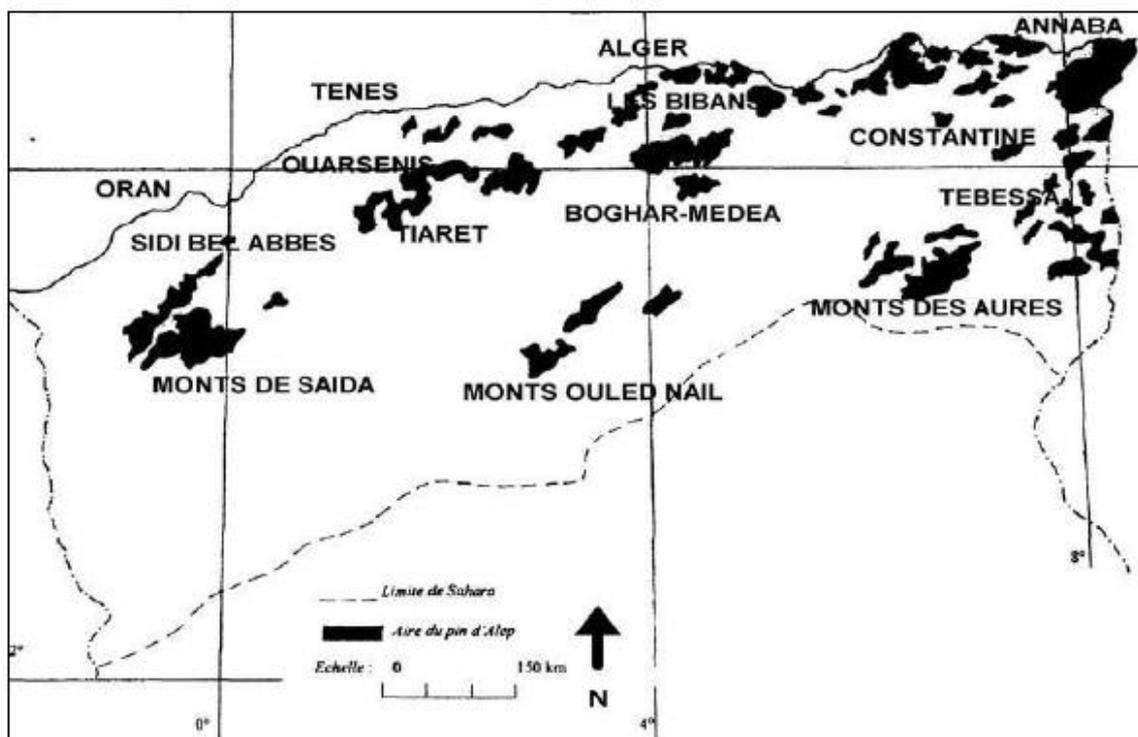


Figure 02 : Figure représente aire de répartition du *Pinus halepensis* en Algérie (Guit et al., 2016).

1.4. Description botanique

Le pin d'Alep est un arbre toujours vert et vivace, pouvant atteindre une hauteur de 25 à 30 m et une circonférence de plus de 3 m, peut vivre jusqu'à 200 ans. Il est doté :

- D'un tronc d'arbre tordu recouvert d'une épaisse écorce fissurée. Cette écorce est lisse, de couleur grise-argentée chez les jeunes arbres et devient fissurée et plus sombre de couleur brune rougeâtre chez les adultes (Durand et Saichi, 2009). L'écorce est très inflammable et très riche en tanin et en résine (Nedjimi et al., 2014).



Figure 03 : Photo illustre l'écorce de *Pinus halepensis* adulte
(Mifsud, 2002).

- Des aiguilles ou feuilles ont une longueur de 6 à 10 cm et une largeur moins de 1mm, serrulées sur les bords, molles, lisses et aiguës, fasciculées par deux, groupées en touffe à l'extrémité des rameaux, de couleur vert-jaunâtre (figure 4) (Schiller, 2014).



Figure 04 : Photo illustre les aiguilles de *Pinus halepensis* (Photo originale, 2020).

- Des fruits appelés les « cônes » ligneux, durs et écailleux, les cônes mûrs sont ovoïdes et allongés, fins, brun rougeâtre brillant, de 6 à 12 cm de long et portés par un pédicelle courbé vers le sol (figure 5). Ils persistent 3 ans sur l'arbre mais peuvent libérer les graines dès la deuxième année et aussi après passage d'un incendie qui favorise leurs germinations et leurs dispersions (Durand et Saichi, 2009).



Figure 05 : Figure présente un cône de *Pinus halepensis* (Photo originale, 2020).

- Les écailles s'écartent à maturité, libérant des graines d'environ 7 mm, mates, à aile allongée 4 fois plus longue qu'elles et presque droite des deux côtés (figure 6), cette aile persistante permet de disséminer les graines d'une manière rapide, éloignée et efficace assurant la colonisation de nombreux milieux (Bellahoual, 2012).



Figure 06 : Figure montrant l'aspect du fruit après libération des graines (Photo originale, 2020).

a- Cône ouverte de *P. halepensis* b- Les grains de *P. halepensis*

1.5. Composition chimique

En raison de sa large gamme d'utilisation médicales, les graines des pins ont fait l'objet de plusieurs études dans le but d'évaluer le potentiel biopharmaceutique de différentes espèces de pin, rapportées dans la littérature (**Simard, 2007**).

Ces études ont révélé que ces graines sont riches en plusieurs constituants tels que les lipides, les protéines, les sucres, les sels minéraux et les composés secondaires comme les composés phénoliques, et les flavonoïdes, dont la teneur peut varier d'une espèce à une autre selon les conditions du milieu, comme le montre le tableau II.

Tableau II : La composition chimique des graines de *Pinus halepensis* Mill (**Cheikh-Rouhou et al., 2006**).

Composition	Pourcentage
Protéines	22.7%
Lipides	43.3%
Cendres	8.3%
Carbohydrates totaux	25.7%
Potassium, magnésium, calcium	1%
Composés phénoliques	3.71%
Flavonoïdes	0.80%
Acides gras insaturés	
Acide oléique	27.3%
Acide linoléique	48.8%
Acide gras saturés	
Acide palmitique	8.75%

Les graines de pin sont des graines oléagineuses riches en huiles (**Chokri, 2005**), aussi sont pleines en vitamines, voir les vitamines : E ; F, connues pour leurs haut niveau physiologique et propriétés antiacides, B1 ; B2 ; B3 ; vitamine pro A (bêta-carotène) et d'autres caroténoïdes (**Kadari, 2012**).

1.6. Les propriétés pharmacologiques et biologiques de la plante

1.6.1. Usages traditionnels

Les Pins sont utilisés en médecine traditionnelle algérienne. Ils sont le plus souvent utilisés comme :

- Antiseptique puissant à action dynamisant ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires et les calculs biliaires... (**Šarac et al., 2014**);
- Rubéfiant et balsamique, actif dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes (**Šarac et al., 2014**).

1.6.2. Intérêts nutritionnels et organoleptiques

Les protéines de pin d'Alep présentent un apport énergétique essentiel, de même sont riches en corps gras qui fournissent environ deux fois plus de calories que les glucides (**Kadari, 2012**). En plus de leur rôle nutritionnel, les corps gras ont un intérêt organoleptique non négligeable. En effet, ils contribuent par leurs utilisations culinaires, à la sapidité des aliments qu'à leurs textures (**Kadri et al., 2014**).

1.6.3. Intérêts thérapeutiques

Depuis l'Antiquité, le pin d'Alep est traditionnellement utilisé comme agent thérapeutique dans le but de guérir les troubles humains internes et externes tels que : diabète, douleurs musculaires, bronchite, inflammation des articulations, problèmes dentaires et blessures et en tant que désinfectant des voies respiratoires et urinaires et même antifongique (**Schiller, 2014**).

Il existe aussi quelques études récentes sur le potentiel thérapeutique des extraits de pin et des composés provenant du genre *Pinus*. En particulier :

- Suppression de l'appétit : L'huile de pin fournit un moyen naturel pour réduire la sensation de la faim. Ceci conduit à une consommation calorique réduite et à la diminution de l'absorption des graisses. Donc elle peut être prescrite pour les personnes obèses sans s'inquiéter des effets secondaires, rencontrés lors de la prise des médicaments chimiques (**Woods, 2004**).
- Maladies cardio-vasculaires : L'huile contient de l'acide pinoléique, un acide gras polyinsaturé, isomère de position de l'acide gamma linoléique (GLA), qui régule le taux des lipides totaux dans le sang et réduit la consolidation des plaquettes, réduisant ainsi la pression artérielle (**Benseghier et khamed, 2014**). De même en

raison de la teneur élevée en β -sitostérol, les graines sont devenues plus importantes. Cette dernière peut être la plus appropriée et la plus efficace pour abaisser le cholestérol sanguin et prévenir les maladies coronariennes (Schiller, 2014).

- **Activité antioxydante** : Au cours de ces dernières années, l'activité antioxydante des extraits de Pin a été clairement démontrée où la présence des composés phénoliques explique en grande partie ce puissant potentiel antioxydant (Kadri et al., 2014).
- **Affection gastro-intestinale** : Des études ont montré que l'huile vierge des pins peut soulager efficacement des maladies gastriques, telles que les ulcères d'estomac et d'autres affections liées aux inflammations du revêtement gastro-intestinal (Benseghier et khamed, 2014).

1.6.4. Intérêts biologiques

➤ **Activité antimicrobienne**

L'effet de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* provenant de l'Ouest d'Algérie sur 11 types de bactéries a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Les tests montrent que l'huile a une activité antibactérienne variable contre les souches testées, la zone maximale d'inhibition a été enregistrée contre les cinq souches mentionnées dans le tableau III ci-dessous (Fekih et al., 2014).

Tableau III : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Pinus halepensis* Mill (Fekih et al., 2014).

Micro-organismes	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	9
<i>Lysteria monocytogenes</i>	10
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9.5
<i>Citrobacter freundii</i>	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10

Les résultats de la présente étude ont montré que l'huile essentielle de *Pinus halepensis* est potentiellement une bonne source de composés antimicrobiens (Seladji, 2014).

- **Activité antifongique** : D'après Abi-Ayad et ses collègues, les résultats présentés dans le tableau IV montrent que l'huile essentielle de *Pinus halepensis* possède une

activité antifongique contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus tolonifer* et peut donc être utilisée comme traitement naturel pour les infections fongiques, ainsi que comme conservateur naturel dans la nourriture (Abi-Ayad et al., 2011).

Tableau IV : Activité antifongique de l'huile essentielle du *Pinus halepensis* Mill (Abi-Ayad et al., 2011).

Champignons	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Aspergillus niger</i>	3.75
<i>Fusarium oxysporum</i>	9
<i>Rhizopus stolonifer</i>	3.5

1.6.5. Intérêts économiques

Sur le plan écologique, *Pinus halepensis* est l'espèce forestière la plus importante dans de nombreux pays méditerranéens. Il est utilisé dans les programmes de reboisements et dans la reconstitution des zones dégradées. Son rôle se manifeste par la fixation du sol par les racines d'une part et par la formation d'un couvert végétal assez large protégeant ce sol contre les pluies torrentielles d'autre part (Cherak, 2010). C'est le cas de la « ceinture verte » dans le Sud de l'Algérie, où 1.000.000 d'hectares de pin d'Alep ont été plantés il y a plus de 20 ans (Ghougali, 2011).

Les bois du pin d'Alep sont recherchés tant pour les usages industriels (pâte à papier) que comme bois d'œuvre pour l'ameublement, les parquets et lambris, bois de mine et poteaux télégraphiques, etc. Son bois tendre et dur fut utilisé pour le support des mines, la construction navale et la menuiserie (Bouguenna, 2011).

Le pin d'Alep produit environ 3 Kg de résine (la gemme) par arbre et par an. La gemme pure contient 20 à 24% de térébenthine et 75 à 80% de cellophane, elle a aussi plusieurs usages médicaux (Bellahoual, 2012).

Le pin est utilisé en cosmétique vu sa richesse en huiles essentiels, acides gras, vitamine E, composés phénoliques et antioxydants naturels (Cheikh-Rouhou et al., 2006). Les graines de pin sont comestibles et utilisées dans les préparations culinaires, en pâtisserie et confiserie (Fekih et al., 2014).

2. *Opuntia ficus indica*

2.1. Présentation de la plante

L'espèce *Opuntia ficus indica* ou bien figuier de Barbarie est originaire du Mexique (Abdel-Hameed et al., 2014). Elle était inconnue dans le monde avant les voyages de Christophe Colomb et fut décrite de façon précise pour la première fois en 1535 par l'Espagnol Gonçalo Hernández de Oviedo y Valdés dans son « Histoire des Indes Occidentales » (Bhira, 2012).

C'est une Cactacée originaire des régions tropicale ou subtropicale cultivée dans les climats arides, comme l'Amérique centrale (Ginestra et al., 2009; Temagoult et al., 2017). Elle a été introduite en Afrique du nord vers le 16^{ième} siècle (Salim et al., 2009).

On compte, de nos jours, 1500 espèces de cactus appartenant au genre *Opuntia* (El-Mostafa et al., 2014), et la plus grande diversité, pour le genre et les espèces (63 et 669, respectivement), se trouve au régions semi-arides du Mexique (Santos-Díaz et al., 2010), elle se caractérise par une remarquable adaptation à la sécheresse obtenue au fil du temps par la fantastique évolution de la structure de son organisme (Schweizer, 2000).

2.2. Nomenclature et appellation

Le Figuier de barbarie « *Opuntia ficus indica* » son appellation scientifique vient du latin *Opuntius* « Oponte » ; nom de la ville grecque. Il peut porter un nom différent selon l'idiome local, dont le Nopal est le nom mexicain de la plante, vient du mot Nochtli en nahuatl, langue classique des Aztèques. En Espagne, outre Nopal, est appelé familièrement Tuna, Ensada (Cota-Sánchez, 2016). Dans les pays francophones du bassin méditerranéen, où il est très populaire, l'*Opuntia* est une appellation savante, aussi il est surnommé Cactus raquette, Figuier à raquettes, Figuier de Barbarie, Figuier d'Inde... En Angleterre : Barbary dig, Devils tongue, Prickly pear, Indian fig tree (Halmi, 2015; Schweizer, 2000), en arabe c'est : el-tin-el-Choki. Et en Algérie, Hendi et Karmous Nssara, plus précisément en Kabylie, elle est surnommée Akermousse.

2.3. Classification

De nombreux auteurs ont élaboré des classifications du Genre *Opuntia*. La classification considérée comme la plus valable à ce jour est comme suite dans le tableau V (Halmi, 2015) :

Tableau V : Position systématique de l'espèce *Opuntia ficus indica* (Halmi, 2015).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Caryophyllidae
Ordre	Caryophyllales
Famille	Cactaceae
Sous famille	Opuntioideae
Genre	Opuntia
Espèce	<i>Opuntia ficus indica</i> .

2.4. Distribution géographique

Le genre *Opuntia* est originaire du Mexique. Sa distribution géographique est très large, localisée principalement dans : le Mexique, la Sicile, le Chili, le Brésil, la Turquie, Espagne, la Corée, l'Argentine et l'Afrique du Nord (El-Mostafa et al., 2014; Halmi, 2015; Kabas et al., 2006). Il a été introduit d'abord en Espagne et plus tard au 16^{ème} siècle au Nord et au Sud de l'Afrique et s'est diffusé rapidement dans le bassin méditerranéen : sud de l'Espagne, l'Italie, le Portugal, et l'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie et Maroc) et s'y est naturalisé au point de devenir un élément caractéristique du paysage (Neffar, 2012; Valente et al., 2010). Dans certains pays tels que l'Italie, l'Espagne ou le Mexique ; la culture du cactus est pratiquée de façon intensive et moderne avec des programmes de recherche-développement pour la production du fruit ou de fourrage et même pour des usages industriels (Arba et al., 2018). En revanche, en Australie et en Afrique du Sud, ce végétal, en particulier la variété asperme est considérée comme une mauvaise herbe à cause de la facilité avec laquelle elle se propage (Mulas et Mulas, 2004).

2.5. Description botanique

Le figuier de Barbarie est une plante arborescente robuste de 2 à 6 m de haut possède un tronc épais et ligneux (figure 7) (Neffar, 2012).

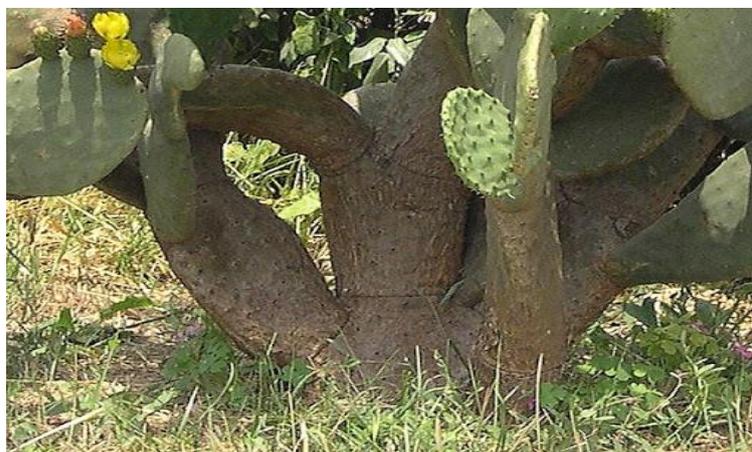


Figure 07 : Photo représente le tronc d'*Opuntia ficus indica* (Drouet, 2015).

Du point de vue morphologique, la caractéristique principale est le fait que les branches sont transformées en organes aplatis en forme elliptique ou ovoïdale, carnées et de couleur verte mate ayant une longueur de 30 à 50 cm, une largeur de 15 à 30 cm et une épaisseur de 1.5 à 3 cm, appelées raquettes ou cladodes (figure 8) (Benattia, 2017). Ces derniers assurent la fonction chlorophyllienne à la place des feuilles, ils sont recouvertes d'une cuticule cireuse (la cutine) qui limite la transpiration de la plante et la protège contre différents prédateurs (Obulbiga et al., 2018). Aussi ils sont couverts de petites aréoles, d'épines et glochides blancs (Bhira, 2012).



Figure 08 : Photo représente les cladodes d'*Opuntia ficus indica* (Drouet, 2015).

Le figuier de barbarie donne des fleurs marginales sur le sommet des cladodes âgés d'un an, large de 4 à 10 cm (Tamine, 2019), de couleur jaune et deviennent rougeâtres à l'approche de la sénescence de la plante (figure 9) (Toure, 2017). Ces fleurs sont hermaphrodites, à ovaire infère uniloculaire, et étamines visibles. Le pistil est surmonté d'un stigmate multiple (Benattia, 2017).



Figure 09 : Photo montre l'aspect de fleur d'*Opuntia ficus indica* (Benattia, 2017).

Ces fleurs donnent naissance aux fruits appelé figue de barbarie; des grosses baies charnues (100 à 150g) ovales où piriformes, ornées de petites épines (Rai, 2017). Ils sont généralement verdâtres, mais prends une couleur variant du jaune clair au rouge violacé à maturité. La pulpe est toujours juteuse, de couleur jaune orangé, rouge ou pourpre, parsemée de nombreuses petites graines (figure 10) (Medina et al., 2007; Wilson et al., 2019).



Figure 10 : Photo représente les fruits d'*Opuntia ficus indica* (Drouet, 2015).

Les graines d'*Opuntia ficus indica* sont de 5 mm de diamètre, dures, indigestes, mais très riche en vitamines (figure 11) (Rai, 2017).

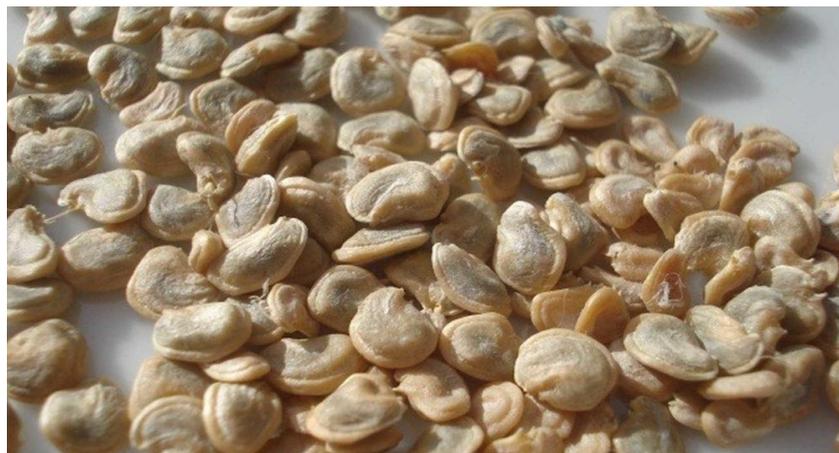


Figure 11 : Photo illustre les graines d'*Opuntia ficus indica* (Halmi, 2015).

2.6. Composition chimique

Les graines du cactus ont suscité ces dernières années beaucoup d'intérêt et les études se sont multipliées pour caractériser leurs constituants afin d'évaluer surtout leurs valeurs nutritives. Ces graines qui sont l'objet de notre travail sont riches en sels minéraux et acides aminés soufrés et elles sont caractérisées par une grande teneur en protéine, fibre brute, cendres, glucides et l'huile brute comme montre le tableau VI suivant :

Tableau VI : Composition chimiques des graines de figue de barbarie (Habibi, 2004).

Constituants	Teneur (%)
Eau	5-6
Huile	7-8,5
Cendres	1,5
Lignine	18
Protéines	11-12
Cellulose	30
Autres polysaccharides	27

Comme ces graines contiennent diverses vitamines (tableau VII), avec une teneur qui diffère d'une espèce à une autre, tout dépend des conditions climatiques et édaphiques etc.

Tableau VII : Composition en vitamine de la graine de figue de barbarie (**Ramadan et Mörsel, 2003**).

Vitamines	Teneur (mg/g)
α -tocophérol	56
β -tocophérol	12
γ -tocophérol	33
σ -tocophérol	5
β -Carotènes	47
Vitamine E	106
Vitamine K ₁	52,5

Encore, le tableau VIII montre la quantité des composés phénolique et des flavonoïdes présente dans les graines d'*Opuntia ficus indica* (**El-Mostafa et al., 2014**) :

Tableau VIII : La quantité des composés phénoliques et des flavonoïdes présente dans les graines d'*Opuntia ficus indica*

Composés	Quantité en mg / 100g
Les acides phénoliques totaux	48-89
Les flavonoïdes totaux	1,5-2,6
Les tannins totaux	4,1-6,6

2.7. Les principales utilisations du figuier de barbarie

Le figuier de barbarie possède des intérêts multiples et diverses utilisations :

2.7.1. Utilisations traditionnelles

Le nopal figurait dans l'antique formulaire des plantes médicinales de la pharmacopée aztèque où pratiquement tout ce que nous savons aujourd'hui était déjà consigné. Par ailleurs, dans tous les pays où le figuier de Barbarie s'est implanté, on lui a reconnu de précieuses vertus médicinales :

- Dans les campagnes marocaines, les raquettes frottées en surface pour éliminer les épines, puis ouvertes en deux tranches, sont appliquées, face interne contre la peau, comme cataplasme anti-inflammatoire et émollient, dans les contusions

douloureuses, les bleus, les hématomes, les plaques eczémateuses, l'arthrose et les rhumatismes (**Keller et al., 2009**).

- Pour les nomades du Sahara, les raquettes étaient, au même titre que l'Aloès, la plante des premiers soins (**Keller et al., 2009**).
- En Afrique du Sud, les cladodes, chauffés avec du savon et du sel, sous forme de cataplasme, sont également utilisés pour soigner les blessures, les coupures, les plaies, les crevasses et les furoncles.
- Les bergers d'Australie appliquaient sur leurs blessures la partie interne de la raquette pour arrêter le saignement et éviter l'infection (**Keller et al., 2009**).
- Le thé aux fleurs d'*Opuntia* est utilisé en Sicile comme remède aux maux des reins, aussi utilisé comme anti-diarrhéique et contre la dysenterie, et indiqué contre les hémorroïdes (**Arba, 2009; Minhaj et al., 2019**).

2.7.2. Utilisations Pharmaco-médicales

Le figuier de barbarie appartient depuis toujours aux plantes médicinales les plus utilisées. La recherche médicale moderne redécouvre avec un intérêt grandissant la plante et ses propriétés elle étudie les molécules actives qui la composent et lui permettent de lutter efficacement contre quelques-unes des affections les plus graves de notre temps : réduire le taux de sucre et de cholestérol dans le sang (**Toure, 2017**), utilisée comme régulant diurétique et comme remède au dysfonctionnement de la prostate (**Minhaj et al., 2019**). Cette plante a aussi des effets anti-ulcères, effets anti inflammatoires et analgésiques, effet antimicrobiens, effets anti oxydants, effets neuroprotecteurs, effets anti alcools, effet ostrogénique, effet anti hyperlipidémique, effet hypercholestérolémique (**Tamine, 2019**). Utilisé aussi comme remède aux douleurs gastro-intestinales, l'angoisse, l'artériosclérose, la spasmophilie, le stress, aux brûlures et coups de soleil (**Mssadak, 2018**).

2.7.3. Utilisations cosmétiques

L'huile essentielle des graines des fruits du cactus sont riches en acides gras polyinsaturés, en stérols et en vitamines, elle est utilisée comme antiride naturel et pour la fabrication des crèmes dermiques antirides et des crèmes antisolaires (**El Hachimi et al., 2015**).

Le mucilage des raquettes est utilisé dans la fabrication des champoings, des assouplissants des cheveux, des crèmes dermiques et des laits hydratants (**Arba, 2009**).

2.7.4. Utilisations agroalimentaires

Le tableau IX suivant résume certains usages d'*Opuntia ficus indica* dans le domaine agroalimentaire.

Tableau IX : Utilisations agroalimentaires d'*Opuntia ficus indica* (Neffar, 2012).

Aires commerciales	Usages spécifiques
Production alimentaire	Fruits, jus de fruit, huiles des graines
Production d'énergie	Alcool, biomasse fraîche
Aliment de bétail	Fourrage, déchets de fruits
Usage agronomique	Fixation du sol, source d'eau complémentaire, brise-vent

CHAPITRE II :

L' α -amylase

Tous les organismes vivants, des bactéries jusqu'à l'être humaine, dépendent pour leurs existences des catalyseurs biologiques, appelés « Enzymes » (**Charnock et McCleary, 2005**). Après des millions d'années d'évolution, ces micromachines composées des protéines de très hauts poids moléculaires de 10.000 à 1.000.000 Da (**Meunier, 1999**), sont capables de réaliser des tâches biochimiques très précises. Certaines enzymes ont été conçues par la nature pour produire des composés chimiques, tandis que d'autres jouent un rôle dans la décomposition ou la modification de tels composés. Ces réactions impliquent la création ou la rupture des liaisons chimiques, et les enzymes font en sorte que ces réactions se produisent plus rapidement, souvent des millions de fois plus vite, qu'elles ne le feraient en absence d'enzymes, d'où le nom catalyseurs (**Charnock et McCleary, 2005**).

Le tableau X montre une classification des enzymes en six groupes selon la Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie en se basant sur leurs actions spécifiques (**Meunier, 1999**).

Tableau X : Principales classes des enzymes et leurs types de réactions (**Cornish-Bowden, 2014**).

Classes	Types de réactions catalytiques
Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électrons
Transférases	Transfert des radicaux chimiques
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse
Lyases	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupement chimique sans hydrolyse
Isomérases	Réaction d'isomérisation
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

1. Définition

L' α -amylase est largement présent dans les plantes, les tissus des mammifères et les microorganismes. C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires de type Endoglucanase de la classe des hydrolases dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60 kDa (**Feillet, 2000**), elle catalyse l'hydrolyse au hasard des liaisons α -D-(1,4) glucosidiques des composants de l'amidon (amylose et amylopectine), de glycogène et divers

oligosaccharides pour donner des simples unités du glucose, du maltose et surtout d' α -dextrines (Ait Kaki et al., 2012).

2. Nomenclature

Nom systématique : α -(1-4) D-glucane glucanohydrolase.

Nom codifié : E.C .3.2.1.1

Nom recommandé : Alpha-amylase.

Synonymes: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin (Laiche et Siboukeur, 2018).

3. Structure de l' α -amylase

Le domaine A est représenté en rouge (hélices et feuillets bêta), le domaine B en jaune et le domaine C en bleu foncé, l'ion calcium est représenté dans la sphère bleue et l'ion chlorure dans la sphère jaune. La flèche indique la fente du site actif située entre le domaine A et B (Hiteshi, 2014; Toumi, 2018).

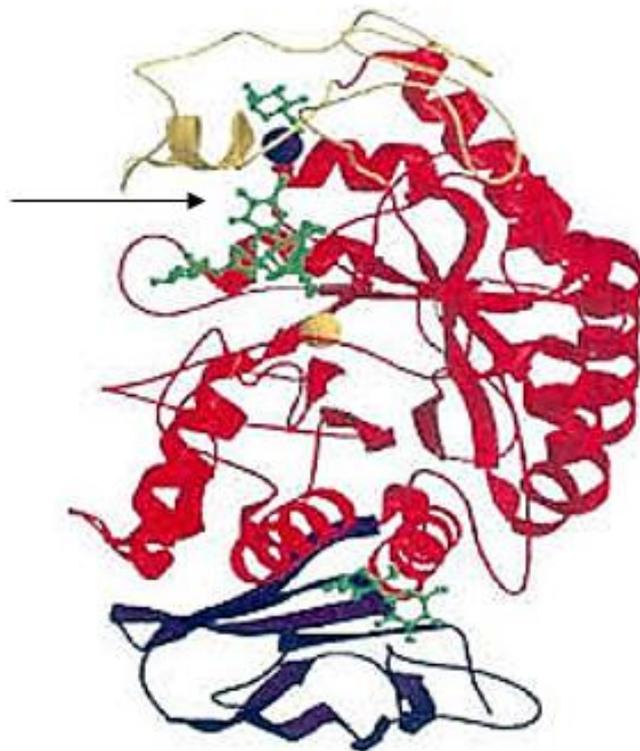


Figure 12 : Structure tridimensionnelle de l' α -amylase (Hiteshi, 2014).

La protéine contient 3 domaines : A, B et C (figures 12 et 13) :

- Le domaine central A, forme un tonneau (β/α) qui contient 8 feuillets β plissés, disposés en parallèle et 8 hélices α , il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets β (**Maktouf, 2013**);
- Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acides aminés reliant A- β_3 avec A- α_3 , et forme une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif ;
- Alors le domaine C est constitué d'un tonneau de 8 feuillets β antiparallèles formant un motif clé grecque (**Franco et al., 2002; Souza, 2010**);
- Le calcium (Ca^{2+}) est situé entre les domaines A et B et peut agir dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle et comme activateur allostérique (**Souza, 2010**).

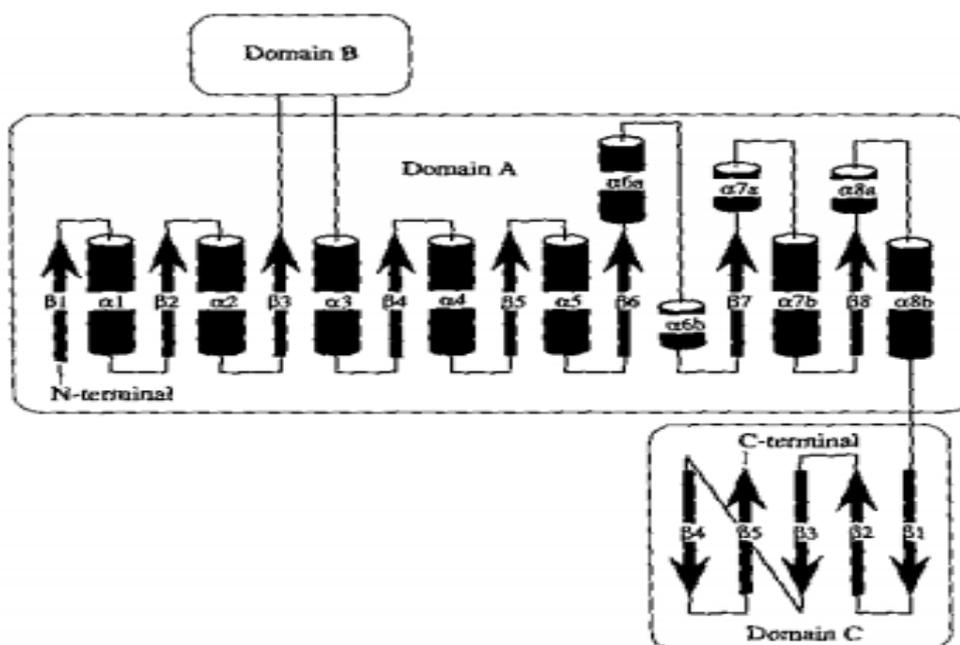


Figure 13 : La représentation des domaines et des éléments de la structure secondaire de l' α -amylase (**Kadziola et al., 1994**).

En outre l' α -amylase est une métallo-enzyme dépendante de calcium, le Ca^{2+} joue un rôle crucial pour la fonction de l' α -amylase en général (activateur allostérique) et dont son absence entraîne l'inactivation (**Demers, 2010; Franco et al., 2002**). Cet ion divalent se liera à son site, stabilisant ainsi la structure de l'enzyme en maintenant l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis à vis de la dénaturation thermique (le maintien de sa structure tertiaire) (**Nouadri, 2011; Savchenko et al., 2002**). De plus, la présence des ions anioniques aident également à activer cette enzyme, mais l'ion chlorure le fait d'une manière plus importante (**Demers, 2010**).

4. Différentes origines

L' α -amylase est une enzyme synthétisée par des plantes, des animaux et des micro-organismes. En dépit de la large distribution des amylases de source microbienne, à savoir les amylases fongiques et bactériennes (**Gupta et al., 2003**), elles sont utilisées pour la production industrielle grâce à leurs faibles coûts, réduction du temps et d'espace requis et la facilité de l'optimisation ainsi que l'efficacité enzymatique élevée (**Mouas, 2016**).

Bien que l' α -amylase de différentes origines n'aient presque pas de séquences d'acides aminés identiques, leurs structures tridimensionnelles et l'organisation de leur site actif sont similaires (**Nouadri, 2011**).

4.1. Origines animales

Chez les mammifères, l' α -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques (**Sales et al., 2012**).

4.2. Origines Végétales

Les α -amylases végétales possèdent un rôle capital dans le métabolisme des glucides où elles participent à la conversion de l'amidon en sucres réducteurs qui présente une source énergétique nécessaire à la germination (**Nouadri, 2011**). Mais elles sont également obtenues par extraction à partir des sources végétales telles que céréales, notamment le blé, le mil, le sorgo, l'orge, et le riz (**Rao et al., 2005**). Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué (figure 14), Elles sont souvent formées au cours de la germination des graines, qui nécessite une activité enzymatique très importante pour l'utilisation des réserves et le développement des embryons (**Zoubiri, 2017**).

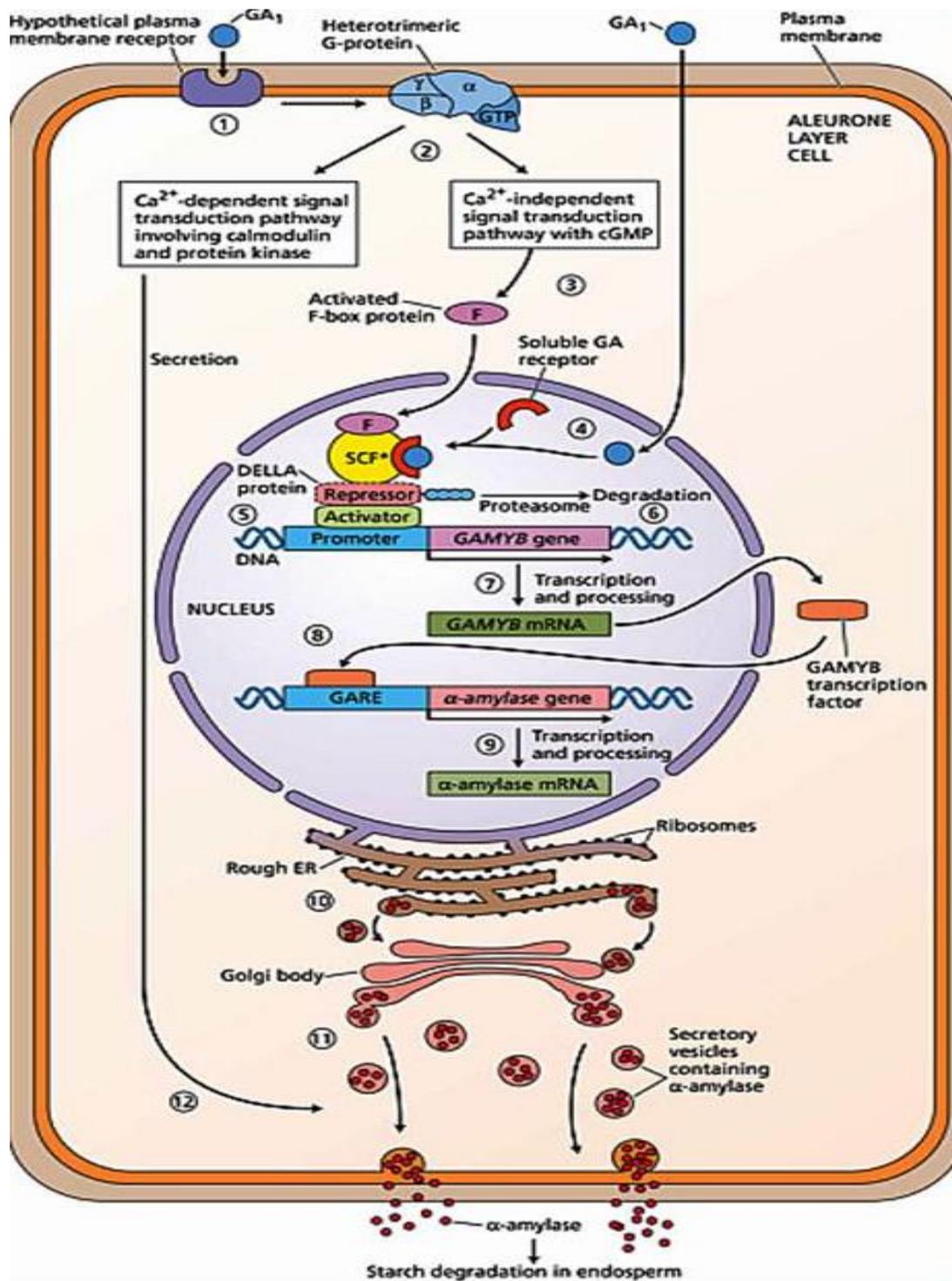


Figure 14 : Photo illustrant la biosynthèse de l' α -amylase dans la cellule végétale (Nouadri, 2011).

Les gibbérellines bioactives (GA) sont des phytohormones essentielles pour de nombreux processus du développement comme la germination de la graine, l'allongement de la tige, l'expansion des feuilles, la maturation du pollen et l'induction de la floraison (Regnault, 2014). Par exemple, pendant la germination des graines de céréales, la GA est synthétisée par

l'embryon et sécrété dans l'aleurone. Dans cette situation, la GA régule la synthèse et la sécrétion des enzymes d'hydrolyses (telles que l' α -amylase) dans l'endosperme (**Fu et al., 2002**), cela se fait comme suit :

- 1- Le GA₁ de l'embryon se lie d'abord à un récepteur membranaire à la surface d'une cellule aleurone ;
- 2- Le complexe de récepteur GA sur la surface cellulaire interagit avec la protéine G, déclenchant deux chaînes de transduction de signal distinctes ;
- 3- Une voie indépendante du calcium impliquant la GMPc (Guanosine Monophosphate cyclique) et autres composants entraîne l'activation d'une protéine F-box, qui fait partie d'un complexe SCF-ubiquitine ligase ;
- 4- La GA₁ peut également pénétrer directement dans la cellule et se fixer à une protéine réceptrice, qui est principalement située dans le noyau ;
- 5- À l'intérieur du noyau, les protéines DELLA, une famille de régulateurs transcriptionnels, servent comme des médiateurs de signal de la GA. La protéine F-box activée se lie à une protéine répresseur de domaine DELLA qui bloque la transcription d'un gène appelé GAMYB et bloque alors l'activité de l'activateur de transcription ;
- 6- Le répresseur est dégradé ensuite par le complexe SCF-ubiquitine ligase ;
- 7- La dégradation du répresseur permet l'expression des gènes GAMYB et les gènes de réponse précoce ;
- 8- La protéine GAMYB nouvellement synthétisée entre dans le noyau et se lie aux promoteurs de l' α -amylase et aux gènes codant pour d'autres enzymes hydrolytiques.
- 9- La transcription de ces gènes est activée ;
- 10- L' α -amylase et les autres hydrolases sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique ;
- 11- Les protéines sont ensuite sécrétées par l'appareil de Golgi vers l'extérieur de la cellule végétale ;
- 12- Cette voie sécrétoire des enzymes nécessite au début une stimulation par la GA d'une voie dépendant du calcium-calmoduline (**Fu et al., 2002; Sponzel, 2003**).

4.3. Origines microbiennes

Les enzymes amylolytiques microbiennes sont souvent exo-cellulaires (**Merabti, 2006**). L' α -amylase peut être produite par différentes espèces de micro-organismes, mais pour des applications commerciales les bactéries sont les plus utilisées, principalement les bactéries dérivées du genre *Bacillus* (**Dakhmouch-djekrif, 2016**). Les α -amylases produites à partir de

Bacillus licheniformis, *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus amyloliquefaciens* trouvent une application potentielle dans un certain nombre de processus industriels tels que les industries alimentaires, de fermentation, des textiles et du papier (Souza, 2010).

De même, les champignons appartenant au genre *Aspergillus* et les levures ont été largement utilisés comme des producteurs des protéines extracellulaires, aussi ils sont largement exploités pour la production de différentes enzymes, y compris l' α -amylase (Mouas, 2016).

5. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261 (donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp 328 (l'aide de catalyse) (Sales et al., 2012). En effet, le mode d'action de l' α -amylase est décrit en 4 étapes, la figure 12 illustre les différents mécanismes biochimiques mis en jeu.

Etape 1 : Formation du complexe enzyme/substrat : l'enzyme se lie à l'intérieur de la chaîne ou sur les extrémités réductrices de l'amidon par affinité, les chaînes d'amidon déformées par le complexe enzyme/substrat, mais stabilisées par un grand nombre de liaisons hydrogènes entre les acides aminés du site de fixation de l'enzyme et les groupements polaires (OH) de la chaîne carbonée (figure 12) (Faiveley, 2010).

Etape 2 : L'attaque de la liaison α (1-4) : Au niveau de la liaison osidique située sur le site catalytique, l'acide glutamique (Glu 261) est le point du départ de l'attaque, sous sa forme protonnée (au pH optimal de l'enzyme), il fournit un atome d'hydrogène à l'atome d'oxygène de la liaison glycosidique à cliver, situé sur le carbone C₄ de la chaîne, ce qui provoque alors la rupture de cette liaison. L'acide aspartique (Asp 231) est en revanche ionisé au pH optimal de l'enzyme en forme électronégative, il établit une liaison covalente avec le carbone anomérique ou C₁, ce qui permet alors la libération de la première partie de la chaîne carbonée (Faiveley, 2010; Sales et al., 2012). Pendant le clivage, il y a formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent (figure 15) (Devin, 2010).

Etape 3 : le retour à l'état initial de l'enzyme : cette étape est réalisée par l'intervention d'une molécule d'eau. L'eau est une molécule polaire qui va se substituer à la molécule de glucose encore rattachée à l'enzyme. L'acide glutamique, chargé négativement, capte un proton de la molécule d'eau, le groupement OH restant instable, il se combine avec le carbone

anomérique ou C₁ après le clivage de la liaison entre C₁ et l'acide aspartique (Asp 328), cette réaction permet d'éjecter de la deuxième partie de la chaîne carbonée, c'est l'étape 4 (figure 15) (Faiveley, 2010; Khacheba et Benamar, 2008).

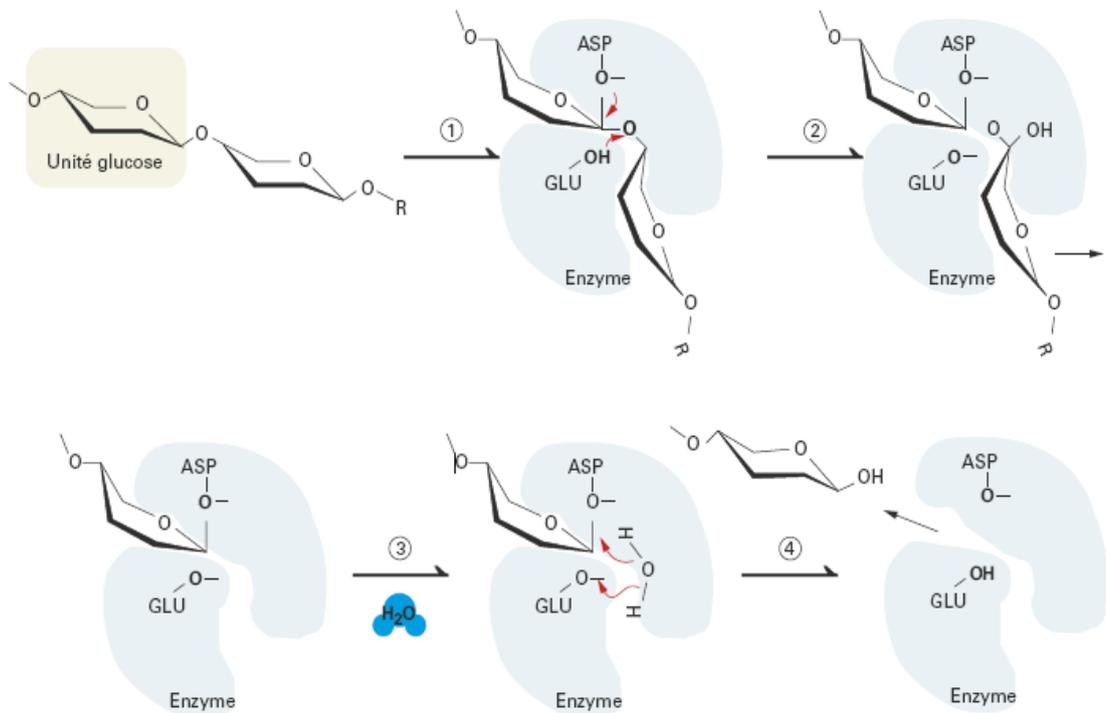


Figure 15 : Mécanisme d'action de l' α -amylase (Faiveley, 2010).

6. Caractéristiques physico-chimiques de l' α -amylase

6.1. Le poids moléculaire

Le poids moléculaire de la majorité des α -amylases est compris entre 40.000 et 70.000 Da, il varie d'une origine à une autre et d'une espèce à une autre (El-Fallal et al., 2012).

6.2. Le pH optimale d'activité

Les α -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 4 à 8 (Laiche et Siboukeur, 2018), avec un pH optimum situé entre 4 à 5 pour les α -amylases fongiques (Ait Kaki et al., 2012), 6 à 8.5 pour les α -amylases bactériennes. Pour les levures le pH optimum varie entre 4 à 6,5 (Zoubiri, 2017). Les α -amylases végétales signalent une activité optimale avec un pH qui se situe entre 6 à 7 (Saini et al., 2017).

6.3. La température optimale d'activité

En général, les α -amylases ont une température optimale comprise entre 25 °C et 70 °C, avec une grande stabilité thermique pour les α -amylases bactériennes (Toumi, 2018), signalent que la température optimale des α -amylases bactériennes varie de 50 °C à 90 °C accompagnée avec une résistance thermique à des températures très élevées chez des souches thermophiles. (Nouadri, 2011; Zoubiri, 2017). Cependant, la température optimale des α -amylases fongiques est de 40°C à 60°C avec une thermostabilité assez faible (Bakri et al., 2009). Et pour la température optimale de α -amylase végétale, elle diffère d'une espèce à une autre et varié entre 5 à 75°C (Saini et al., 2017).

6.4. Effet des cofacteurs métalliques sur l'activité enzymatique

L' α -amylase est une métallo-enzyme dépendante du Ca^{2+} qui a un rôle d'un activateur allostérique et stabilisateur en maintenant la structure tertiaire de l'enzyme vis-à-vis de dénaturation thermique (Savchenko et al., 2002). Les ions Cl^- , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} sont également des activateurs de l' α -amylase (Saini et al., 2017), et cette activité reste intacte en présence de K^+ , Na^+ , NH_4^+ (Nouadri, 2011). L'activité de l' α -amylase est fortement inhibée par l'acide formique, l'urée, l'acide oxalique, l'acide citrique et par l'EDTA et les métaux lourds (Gupta et al., 2003).

7. Les applications industrielles et biotechnologiques de l' α - amylase

Les amylases ont des applications potentielles dans un certain nombre de processus industriels tels que dans les industries alimentaires, textiles, papetières, panification, détergents, jus de fruits, boissons alcoolisées, édulcorants, aide digestive et détachant dans le nettoyage à sec...etc. (Saranraj et Stella, 2013; Singh et al., 2011).

Actuellement, les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées en raison de leur productivité et thermostabilité (Mobini-Dehkordi et Javan, 2012).

7.1. Utilisation de l' α -amylase dans les industries agro-alimentaires

Le tableau XI montre les différentes industries agro-alimentaires utilisent l'enzyme α -amylase dans diverses préparations.

Tableau XI : Les applications de l' α -amylase dans l'industrie agro-alimentaire (**Mobini-Dehkordi et Javan, 2012**).

Industries	Applications
Glucoserie	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradation et transformation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction).
Sucrierie	<ul style="list-style-type: none"> - Faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre en éliminant des traces d'amidon gênant la purification.
Biscuiterie et panification	<ul style="list-style-type: none"> - Décomposition de l'amidon ; production de dextrines ; - Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume et la texture de la mie ; - Génère du sucre supplémentaire dans la pâte, ce qui améliore le goût, la couleur de la croûte et les qualités de grillage du pain.
Brasserie	<ul style="list-style-type: none"> - Liquéfaction ; - Clarification ; - Compléments des enzymes de malt.
Textile	<ul style="list-style-type: none"> - Le désencollage des tissus ; - Améliore la résistance du textile ; - Offre une douceur à la surface de fil.
Détergent	<ul style="list-style-type: none"> - L'utilisation de cet enzyme dans la formulation des détergents améliore la capacité des détergents à éliminer les taches tenaces et à rendre le détergent écologique ; - L'augmentation du pouvoir blanchissant.

7.2. Autres Domaines d'application de l' α -amylase

- Le domaine pharmaceutique : les α -amylases sont utilisées comme agents anti-inflammatoires et aussi comme des aides pour le traitement des troubles digestifs (**Mobini-Dehkordi et Javan, 2012**), tels que : les dyspepsies et les fermentations intestinales (**Nouadri, 2011**).
- Le domaine médical : une concentration plus élevée que la normale des α -amylases peut refléter plusieurs atteintes médicales, y compris une inflammation aiguë du pancréas mais également un ulcère gastroduodéal perforé, une torsion d'un kyste ovarien, un iléus d'étranglement, une macroamylasémie et des oreillons. L'amylase peut être mesurée dans d'autres fluides corporels, y compris l'urine et le liquide péritonéal (**Saranraj et Stella, 2013; Singh et al., 2011**).
- Le domaine de biologie moléculaire : en biologie moléculaire, la présence de l' α -amylase peut servir comme cible mutationnelle dans la méthode de sélection des cellule ayant inséré un gène étudié (**Mobini-Dehkordi et Javan, 2012**). Une intégration réussie perturbera le gène de l'amylase et empêchera la dégradation de l'amidon, qui est facilement détectable par coloration à l'iode (**Singh et al., 2011**).

CHAPITRE III :

Les méthodes d'études de l' α -amylase végétale

L'objectif anticipé pour cette étude est la détermination du taux des protéines présente dans l'extrait des graines de figue de Barbarie et de pin d'Alep et la recherche de leurs activités amylolytiques. D'autre part, nous avons prévu de réaliser une étude mathématique basée sur la mise en place d'un plan d'expérience au vue de sélectionner les conditions optimales permettant d'avoir un rendement élevé en protéines et d'augmenter l'activité amylasique résiduelle, cette étape est appelée optimisation des conditions d'extraction de α -amylase. Ce chapitre est consacré à mentionner les aspects expérimentaux a utilisé pour atteindre cet objectif.

1. Extraction des protéines végétales totales

1.1. Broyage

Le broyage est une opération unitaire visant à fragmenter les graines dans le but de réduire leur taille sous forme de poudre et de séparer ses constituants (**Chamayou et Fages, 2003**).

1.2. Délipidation

Les lipides totaux, que comprenaient les graines finement broyées sont éliminées dans cette étape à l'aide de l'appareil Soxhlet. Cet appareil consiste à libérer la matière grasse contenue dans l'échantillon à l'aide d'un solvant organique non miscible à l'eau, souvent l'hexane. A la fin, la phase huileuse extraite est éliminée et la poudre délipidée sera récupérée et laissée sous la hotte afin d'aspirer les traces restantes d'hexane (**Bou-Maroun et Cayot, 2011**).

1.3. Macération

La poudre délipidée sera ensuite macérée, une étape qui consiste à laisser séjournée la poudre dans un solvant (Tris HCL, éthanol etc.) à température ambiante pendant une période de 20 min à 1h (**Abbou et al., 2020**).

1.4. Test à l'iode

Ce test permet la confirmation de la présence de l' α -amylase, il est basé sur la réaction qui a lieu entre l'amidon et l'iode et qui donne une coloration bleu violet, la disparition de la couleur indique d'abord la dégradation de l'amidon qui justifie la présence de l'enzyme dans le milieu réactionnel (**Chavan et Wadatkar, 2014**).

1.5. Précipitation fractionnée de l' α -amylase par le Sulfate d'Ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

C'est une démarche très souvent utilisée comme étape dans l'extraction des protéines. Elle est basée sur le fait que les conditions ioniques et le pH rendent les protéines insolubles, varient pour chaque type protéique. Par conséquent, la concentration ionique et le pH peuvent être ajustés pour séparer la protéine désirée

L'électrolyte le plus couramment utilisé pour la précipitation différentielle est le sulfate d'ammonium vu sa haute solubilité dans les milieux aqueux permettant d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il a une forte hydrophilicité et rentre en compétition avec les protéines pour l'eau provoquant leurs déshydratations. Les ions sulfate d'ammonium sont assez petits et peuvent facilement accéder à des résidus protéiques chargés à fin les neutraliser en formant des liaisons électrostatiques. Ce sel présente également l'avantage de dénaturer légèrement la protéine permettant de maximiser l'extraction des protéines biologiquement actives (**Duong-Ly et Gabelli, 2014**).

Selon (**Wingfield, 2016**), cette méthode consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium dans la solution dont on veut précipiter les protéines. Et pour calculer cette quantité 02 méthodes sont utilisées :

$$\begin{aligned} \text{➤ Une équation de masse : } m(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 &= \frac{515(X-X_0)}{100-0.27X} \quad (\text{Pour 1L de l'extrait à } 0^\circ\text{C}) \\ &: m(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{533(X-X_0)}{100-0.3X} \quad (\text{Pour 1L de l'extrait à } 20^\circ\text{C}) \end{aligned}$$

Où : X : Taux de saturation à atteindre

X_0 : Taux de saturation initial.

- Un tableau de pourcentage de saturation ou précipitation de protéine par le sulfate d'ammonium [20% - 90%] :

On peut tirer la masse de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nécessaire directement à partir de la figure 16 ci-dessous qui nous donne les quantités requises pour atteindre le niveau de saturation voulu à 0°C . La figure indique aussi la quantité de sel à ajouter à une solution qui contient déjà le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
								0	31	62	95	129	164	201	239	279
									0	31	63	97	132	168	205	244
										0	32	65	99	134	171	209
											0	32	66	101	137	174
												0	33	67	103	139
													0	34	68	105
														0	34	70
															0	35
																0

Figure 16 : Image représente le tableau de pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium (Wingfield, 2016).

Dans notre travail les pourcentages utilisés sont : 20%, 50%, 80% selon le tableau précédent : à une température de 0°C et un pourcentage initiale de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en solution nulle, les masses à rajouter pour précipiter les protéines dont l' α -amylase dans 1 litre de solution sont : 106 g, 291g ,519g respectivement, Cependant si le pourcentage initial en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \neq 0$; soit disant 20%, pour atteindre 50% il nous faut rajouter 175 g de sulfate d'ammonium.

A la fin de l'expérience, la solution protéique aura une concentration élevée en sel, la dialyse est généralement la meilleure méthode pour retirer le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ d'un échantillon.

1.6. Dialyse

La dialyse permet de séparer des molécules selon leurs tailles. En utilisant des membranes semi-perméables dont les pores ont une taille inférieure aux dimensions macromoléculaires. Ces pores permettant aux petites molécules comme celles du solvant, des sels, et des petits métabolites de se diffuser au travers de la membrane mais empêchant le passage des grosses molécules (Voet et Voet, 2016).

Les membranes de dialyse utilisées se présentent sous forme de cylindres allongés nommée « boudin de dialyse », il est fermé aux deux extrémités et contiennent dedans le liquide

à dialyser. Il sera placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse (figure 17) (Hainque, 2008).

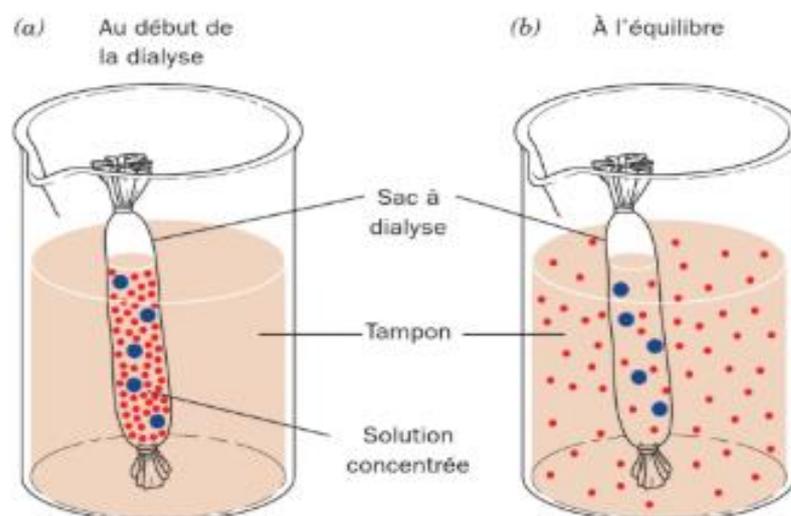


Figure 17 : Photo illustrant la séparation par dialyse (Voet et Voet, 2016).

2. Dosage des protéines totales : Méthode de Bradford (1976)

C'est un dosage colorimétrique qui permet d'estimer la quantité de protéine contenue dans un extrait en utilisant le réactif Coomassie protein Assay reagent (Uptima) et la sérum albuminé bovine (BSA) comme standard (Hijazi, 2011).

Cette méthode est très sensible, rapide et stable, ayant pour principe la formation de complexes entre le bleu de Coomassie avec les groupements basiques des acides aminés (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines... Elle est basée sur le changement d'absorbance qui se manifeste par la modification de la couleur du Bleu de Coomassie qui se fixe sur les liaisons peptidiques et se stabilise sous forme anionique. La solution initialement marronne se change au bleu en présence des protéines, déplaçant la bande d'absorption de 465 nm à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant ainsi la concentration en protéines dans l'extrait des graines exprimée en mg/ml (Boumaza, 2015).

4.1. Plan d'expérience Box-Behnken

C'est un plan mathématique quadratique combiné à la méthode de surface de la réponse (RSM), qui sert à créer un plan d'expérience afin de modéliser la courbure des données expérimentales et de déterminer les paramètres des facteurs qui optimisent la réponse. Les plans de Box-Behnken sont utiles car pour un même nombre de facteur, ces plans contiennent généralement moins d'essais. De plus, ces plans n'incluent pas de point définis sur les paramètres extrêmes de tous les facteurs, ce qui peut être plus adapté pour certains procédés (Carletti et al., 2006). Cette démarche est réalisée suivant les étapes citées ci-après, en considérant l'exemple de l'extraction de l' α -amylase :

4.1.1. La Sélection des facteurs influençant l'extraction de l' α -amylase

Les facteurs sont les variables que l'on désire étudier et qui sont supposées avoir une influence sur le système généralement caractérisés par une seule variable naturelle : qualitative ou quantitative (Bouzaouit, 2016).

Ces facteurs sont limités par deux bornes, valeur minimale et maximale. On désigne la valeur basse par le signe (-1) et la valeur haute par le signe (+1) et (0) pour la valeur moyenne (Dakhmouche-Djekrif, 2016). Dans le cas de notre travail, comme le montre le tableau XII, les facteurs choisis sont : Température, pH, quantité de sulfate d'ammonium rajouté pour la précipitation.

Et pour optimiser ces facteurs affectant l'étape d'extraction de l' α -amylase, la méthodologie de surface de réponse (RSM) avec Box Behnken Design a été réalisée à l'aide du logiciel statistique MINITAB.

Tableau XII : Tableau montrant la relation entre les niveaux codés et les niveaux réels des facteurs utilisés dans le plan Box Behnken pour améliorer l'extraction de l' α -amylase.

Facteurs	Valeurs minimales		Valeurs moyennes		Valeurs maximales	
	Codées	Réelles	Codées	Réelles	Codées	Réelles
T (°C)	-1	10	0	50	1	90
pH	-1	4	0	6.5	1	9
Quantité d'(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	-1	20	0	50	1	80

4.1.2. La Matrices des expériences

La matrice d'expérience est un utile mathématique qui représente, sous forme codée ou non codée, l'ensemble des expériences à réaliser (Karam, 2004). Dans cette étude, quinze expériences ont été réalisées avec les différentes valeurs de pH (4, 6.5, 9), de température (10, 50, 90°C) et de pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium (20, 50, 80%) comme indique dans le tableau XIII suivant :

Tableau XIII : Tableau présentant la matrice des expériences : Plan d'expérience Box-Behnken pour l'étude de 03 facteurs obtenus par le logiciel statistique MINITAB.

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Temp (T)	pH (P)	Sulfate d'ammonium (SA)	Response (α -amylase activity UI/mg)
3	1	2	1	-1	1	0	
14	2	0	1	0	0	0	
2	3	2	1	1	-1	0	
13	4	0	1	0	0	0	
15	5	0	1	0	0	0	
12	6	2	1	0	1	1	
5	7	2	1	-1	0	-1	
10	8	2	1	0	1	-1	
7	9	2	1	-1	0	1	
11	10	2	1	0	-1	1	
9	11	2	1	0	-1	-1	
4	12	2	1	1	1	0	
1	13	2	1	-1	-1	0	
8	14	2	1	1	0	1	
6	15	2	1	1	0	-1	

4.1.3. Résultats et interprétations

Le calcul des coefficients de régression avec les données codées (probabilités) est fourni par le logiciel MINITAB. C'est un logiciel de traitement statistique, qui comprend un grand nombre de fonctionnalités (Carletti et al., 2006), il prend en charge les calculs d'analyse de la variance à un ou plusieurs facteurs, les comparaisons des résultats statistiques et de nombreux types de graphiques. L'analyse de la variance est également fournie par ce logiciel (Bouzaouit, 2016).

➤ Détermination du modèle mathématique

Dans le processus d'optimisation, la réponse peut être liée aux variables choisies par des modèles linéaires ou quadratiques (Elmoubarki et al., 2017). Le modèle quadratique prévu à utiliser est donné dans l'équation suivante :

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{i>j}^k B_{ij} X_i X_j \equiv B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3$$

Où : Y : la réponse mesurée dans notre cas c'est l'activité α -amylasique UI/mg (Tableau VIII)

X : les facteurs ;

B_0 : coefficient constant ;

k : Nombre des facteurs à optimiser ;

B_i : coefficients des effets linéaires ;

B_{ii} : Coefficients des effets quadratiques ;

B_{ij} : coefficients des interactions (Abbou et al., 2020).

Et après l'obtention de l'équation mathématique, elle sera remplie à partir du tableau de régression obtenue par MINITAB et ensuite l'équation sera améliorée à une équation optimale après exclusion des termes non significatifs dont leurs probabilités >0.05 (Elmoubarki et al., 2017).

4.1.4. Optimisation des conditions influençant le procédé d'extraction

Pour la recherche des conditions optimales, c'est-à-dire les valeurs des facteurs permettant d'aboutir à une meilleure extraction, l'utilisation des fonctionnalités de traçage des surfaces de réponses par MINITAB nous aide à visualiser les effets mutuels des facteurs et les relations

entre une variable de réponse et deux facteurs (Peng et al., 2020). Deux types de graphiques de surface de réponse peuvent être générés : le graphique de contour et le diagramme de surface (figure 19) (Karam, 2004). Ces graphiques montrent les relations entre une variable de réponse et deux facteurs à partir d'un modèle d'équation, les facteurs supplémentaires éventuels étant maintenus constants. Ils permettent aussi d'obtenir les valeurs de réponses et les conditions d'utilisation souhaitables (Bouzaouit, 2015).

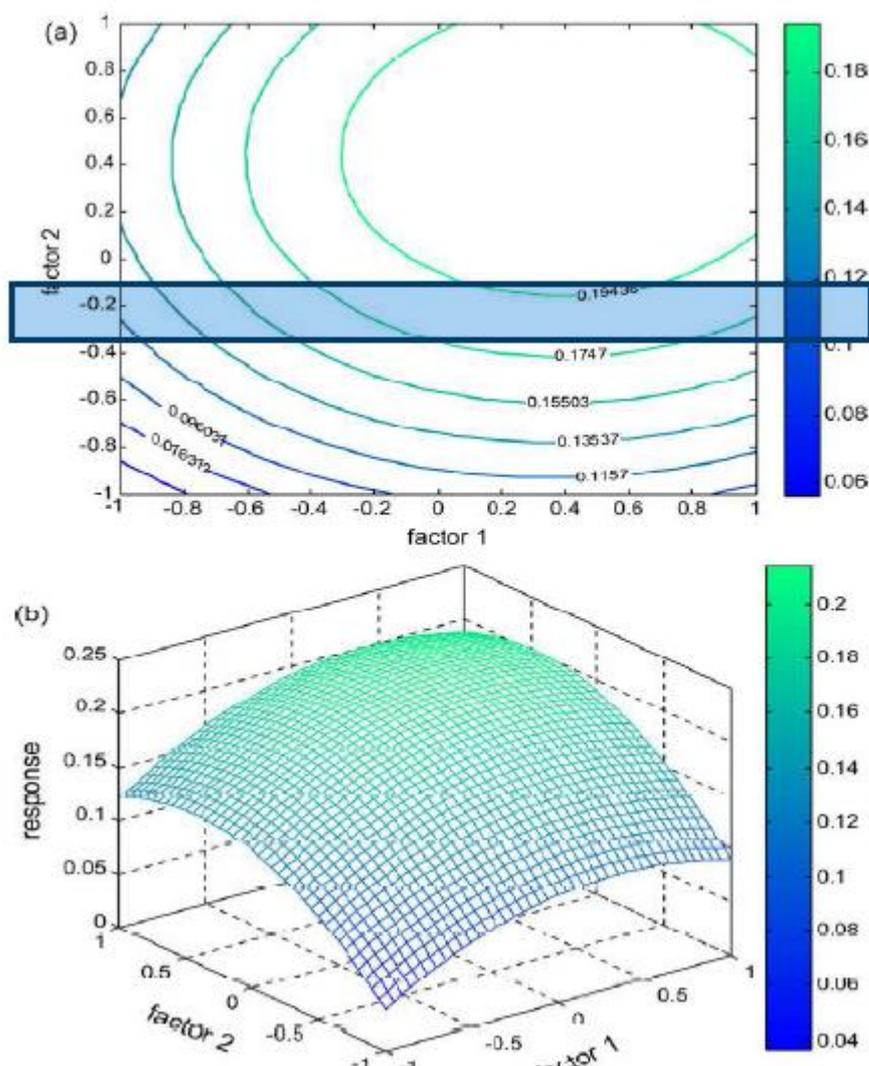


Figure 19 : Figure illustrant un exemple des courbes de surfaces de réponses (d'iso-réponse) (Bouzaouit, 2016) :

a- Diagramme de contour **b-** Graphique de surface

5. Purification de l' α amylase

5.1. Chromatographie de filtration sur gel

Elle est dite aussi chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire (**Walls et al., 2017**), c'est une technique qui permet une séparation simple et rapide des molécules solubles dans l'eau ou certains solvants organiques, en fonction de leurs tailles, donc de leurs masses molaires (**Coskun, 2016**). Dans la colonne chromatographique, les gels sont formés de dextran, de polyacrylamide, d'agarose modifiée aussi le séphacryl (gel formé à base de sépharose combiné au polyacrylamide) et se présentent sous forme de billes poreuses dont les pores correspondent à une zone relativement étroite (**Voet et Voet, 2016**). Le meilleur gel indiqué pour cette technique est le séphacryl, vu à sa grande résistance aux variations physico-chimiques (pH, force ionique et température) et facilité de mise en œuvre : commercialisé sous forme d'une pâte.

Pour la purification des α -amylases, le gel Séphadex G-75 est le mieux adapté pour la séparation des protéines de masse moléculaire : $3000 \text{ Da} < PM < 80.000 \text{ Da}$ (**Mouas, 2016**).

Si une solution contenant des protéines de tailles différentes traverse une telle colonne, qui constitue en quelque sorte un « tamis moléculaire », les molécules dont la taille est supérieure à celle des pores du gel, c'est-à-dire supérieur à la limite d'exclusion ne peuvent y pénétrer, migrent dans la phase aqueuse qui entourent les grains du gel et quittent la phase stationnaire les premières, par contre les plus petites molécules y compris l' α -amylase pénètrent dans le gel et leur migration est ainsi retardées. A la fin les molécules quittent donc la colonne dans l'ordre de masse moléculaire décroissant. Cette colonne peut être réutilisée lorsque les molécules de petites tailles quittent le gel (figure 20) (**Mouas, 2016**).

Citant que même s'ils partagent le même principe de séparation, il existe une différence de diamètre des pores du gel servant de phase stationnaire entre le tamisage moléculaire et la chromatographie d'exclusion, ce qui influence le mécanisme de la séparation : Le tamis moléculaire est un matériau avec des très petits pores et donc les grandes molécules ne peuvent pas entrer (**Takeshi et al., 2015**). Cependant, la chromatographie d'exclusion est généralement appliquée à des grosses molécules ou à des gros complexes macromoléculaires (**Giridhar et al., 2017**).

A la fin, la fraction éluée celle qui contient l'activité d'amylase sera analysée et ensuite poursuit le chemin de purification.

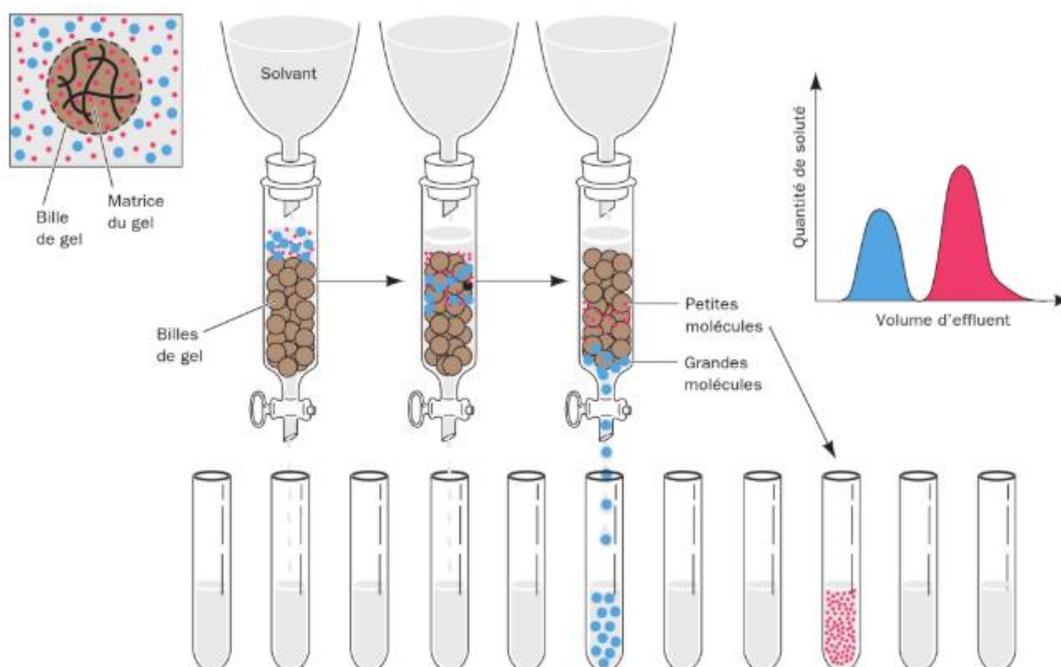


Figure 20 : Photo présentant la chromatographie sur gel de filtration (Voet et Voet, 2016).

5.2. Chromatographie échangeuse d'ions

La chromatographie échangeuse d'ions (CEI), est basée sur les interactions électrostatiques entre les groupements des acides aminés des protéines chargées et le matériau de support solide (matrice), les matrices utilisées sont des polymères insolubles préparés sous formes de billes griffés sur la colonne, appelées résines. Citant que ces résines doivent avoir une charge opposée à celle de la protéine à séparer (Coskun, 2016) ; cette charge dépend de pH du milieu c'est-à-dire, dans un milieu avec une valeur de pH inférieur a son point isoélectrique, une protéine aura une charge nette négative est retenue sur l'échangeur de cations, tandis qu'à un pH supérieur, ce sera sur un échangeur d'anions.

La colonne DEAE-Cellulose, pour Di-éthyl-aminoéthyl-cellulose, elle est souvent utilisée pour la purification de l' α -amylase. C'est une échangeuse cationique, fixe seulement les molécules chargées négativement tels que l' α -amylase. Les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas être retenues et vont donc être éluées immédiatement (Walls et al.,

2017). La récupération de la protéine désirée fixée à la colonne est ensuite obtenue par des modifications de pH, de force ionique de la solution tampon (**Dey et Banerjee, 2015**).

Et après l'analyse de la fraction éluée, les fractions actives sont ensuite réunies et concentrées par ultrafiltration.

5.3. Ultrafiltration

C'est une séparation des macromolécules en solution dans une phase dispersante, permettent la concentration des protéines (**Baltas et al., 2016**). Il s'agit des dispositifs de membrane avec une porosité très faible qui peuvent être constituées de divers matériaux tels que l'acétate de cellulose. Le solvant et les petits solutés traversent la membrane et les macromolécules restent dedans plus concentrées. Le concentrât est obtenu après une centrifugation (**Dakhmouch-djekrif, 2016; Voet et Voet, 2016**).

Les tubes d'ultrafiltration AMICON 10 KDa sont les dispositifs utilisés pour concentrer l' α -amylase (**Dey et Banerjee, 2015**).

Citant qu'il existe une autre méthode plus sélective pour la purification des enzymes : la chromatographie d'affinité, basée sur le principe d'interaction spécifique substrat - ligand. C'est une méthode de purification plus robuste, généralement utilisée dans les premiers stades de purification et peut être la seule étape de chromatographie nécessaire pour atteindre une pureté adéquate sauf qu'elle est plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie (figure 21).

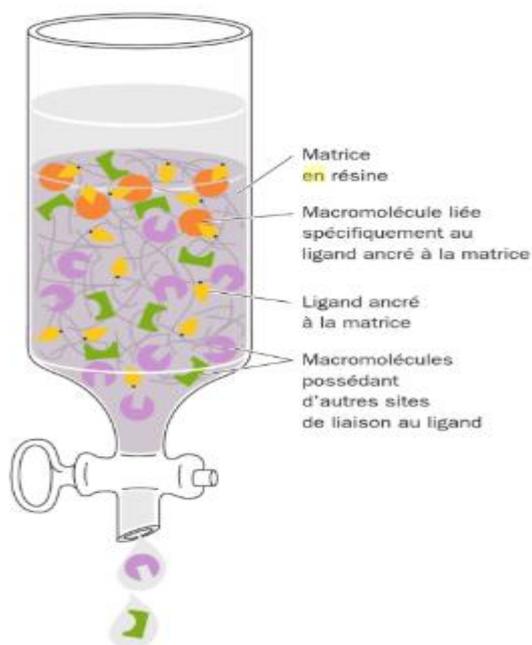


Figure 21: Photo correspondant la chromatographie d'affinité (Voet et Voet, 2016).

5.4. Electrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse présente un principe commun qui consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique, ce qui entraîne la migration des molécules chargées (Voet et Voet, 2016).

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE est une technique utilisée le plus souvent dans un but de séparation et de détermination de la masse moléculaire et le nombre d'unités composantes d'une protéine mais également parfois pour la purification des molécules (Dey et Banerjee, 2015).

La détermination du poids moléculaire de l' α -amylase repose sur la comparaison de sa mobilité électrophorétique avec des marqueurs protéiques standards ayant un poids connu (Baltas et al., 2016; Bano et al., 2011).

Les standards utilisés pour déterminer le poids moléculaire de l' α -amylase sont :

- La Phosphorylase B (94 KDa) ;
- Fructose 6 phosphate kinase (84 KDa) ;
- BSA (sérum bovine albumine) (66 KDa) ;
- Glutamate déshydrogénase (55KDa) ;
- Ovalbumine (43 KDa) ;
- Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (36 KDa) ;

- Anhydrase Carbonique (30 KDa) ;
- Trypsinogène (24KDa) ;
- Inhibiteur de trypsine de soja (20 KDa) ;
- α -Lactalbumin (14 KDa) (**Martínez et al., 2000**).

CHAPITRE IV :
Résultats des autres études
relatives

Vu à l'absence de nos propres résultats, on a fait une recherche bibliographique afin de trouver des travaux similaires. Les exemples trouvés sont partiellement semblables à notre sujet, traitent la caractérisation et l'extraction de l' α -amylase à partir des plantes et inclus aussi l'étapes d'optimisation de température et de pH sauf que ces derniers sont optimisés par la méthodologie de pas à pas et non par l'utilisation de la méthodologie des plans d'expériences.

1. Extraction et optimisation de l' α -amylase présente dans les graines de pin Coréen

En raison du manque des études faites sur l' α -amylase de pin d'Alep, on a utilisé comme un exemple une autre espèce de Pinaceae appelé pin Coréen. Et donc le tableau XIV suivant résume toute les informations présentent dans l'article avec le titre « Isolation and characterization of a novel thermostable α -amylase from coréen pine seeds » : extraction et caractérisation d'une nouvelle α -amylase thermostable à partir des graines de pin korean (Azad et al., 2009).

Tableau XIV : Tableau représente le résumé des étapes utilisées dans le 1^{er} article

Espèce	Auteurs	Méthodes d'extraction, de purification et de dosage utilisées	Résultats trouvés
Pin coréen	Md. Abul Kalam Azad; Jae-Han Bae; Jong-Sang Kim; Jin Kyu Lim ; Kyung-Sik Song;	<p>1. Préparation d'extrait protéique brut</p> <ul style="list-style-type: none"> - Broyage des graines. - Homogénéisation dans un tampon (acétate de sodium 20 mM, pH 5,5, CaCl₂ 10 mM) pendant 3 minutes à 4 ° C. - Centrifugation a 13 000 tr / min pendant 30 min à 4°C. - Filtration de surnageant avec papier wattman. - Obtention de l'extrait brut de graines de pin. <p>2. Purification de l'extrait protéique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Précipitation par sulfate d'ammonium et dialyse - Chromatographie échangeuse d'ions (DEAE- 	<p>pH optimale : 4,5</p> <p>Température optimale : 65°C</p>

	<p>Beom-Soo Shin;</p> <p>Hak-Ryul Kim.</p>	<p>Sépharose CL-6B et l'élution a été réalisée par Tampon Tris– HCl 50 mM (pH 7,6) avec un gradient progressif de NaCl (0 à 500 mM).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Chromatographie d'affinité (Colonne préparée avec 40,0 g d'amidon de maïs et l'élution se fait avec le même tampon acétate de sodium en utilisant un gradient de concentration de NaCl (100–400 mM) à un débit de 5,6 ml / h.) - Electrophorèse SDS-PAGE. - Les concentrations protéiques sont mesurées par le dosage de Bradford. <p style="text-align: center;">3. Dosage enzymatique</p> <ul style="list-style-type: none"> - L'activité enzymatique de l'α-amylase est déterminée par la méthode de Bernfeld. 	
--	--	--	--

2. Extraction et optimisation de l' α -amylase présente dans les graines de figue de barbarie

Les étapes suivies par les auteurs dans l'article sous le titre « Purification and characterization of an amylase from *Opuntia ficus-indica* seeds » (Ennouri et al., 2013): Caractérisation et purification d'une α -amylase à partir des graines d'*Opuntia ficus indica*, sont brièvement citées dans le tableau XV suivant :

Tableau XV : Tableau resume brievement les étapes utilisées dans le 2^{ème} article

Espèce	Auteurs	Méthodes d'extraction, de purification et de dosage utilisées	Résultats trouvés
<i>Opuntia ficus indica</i>	Monia Ennouri;	<p style="text-align: center;">1. Préparation d'extrait protéique brut</p> <ul style="list-style-type: none"> - Broyage des graines. - Homogénéisation dans un tampon (acétate de sodium 20 mM, pH 5) pendant 30 minutes à 4 °C. - Centrifugation a 19650 × g pendant 30 min à 4 °C - Filtration de surnageant avec papier filtre. - Obtention de l'extrait brut de graines de pin. 	<p style="text-align: center;">pH optimale : 5</p> <p style="text-align: center;">Température optimale : 60°C</p>
	Bassem Khemakhem; Hanen Ben Hassen; Imen Ammar; Karima Belghith; Hamadi Attiab	<p style="text-align: center;">2. Purification de l'extrait protéique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Précipitation par sulfate d'ammonium (précipitation fraction entre 60% et 80% de saturation en sulfate d'ammonium) - Dialyse utilisant une membrane de 12kDa. - Centrifugation et récupération du surnageant. - Chromatographie échangeuse d'ions (colonne (Bio-Rad) (2,1 × 24 cm), l'élution est faite avec gradient de 0-1 mol L⁻¹ d'NaCl dans le même tampon acétate à un débit de 5 mL min⁻¹). - Electrophorèse SDS-PAGE. - Chromatographie liquide haute performance - Les concentrations protéiques sont mesurées par le dosage de Bradford. <p style="text-align: center;">3. Dosage enzymatique</p> <ul style="list-style-type: none"> - L'activité enzymatique de l'α-amylase est déterminée par la méthode de Bernfeld 	

CONCLUSION
GENERALE

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire est consacré essentiellement à optimiser les facteurs influençant l'extraction de l' α -amylase à partir des graines de pin d'Alep et de figuier de Barbarie. L'efficacité de l'extraction de l'enzyme dépend de plusieurs facteurs et plus précisément le traitement de la matière végétale, aussi le choix de la méthode de l'extraction et du solvant reste primordial.

Le traitement de la matière végétale renferme le lavage des graines, broyage suivi d'une délipidation, dans le but d'éliminer la fraction lipidique présente dans la poudre broyée. Cependant, l'étape de l'extraction débute par une macération qui consiste à faire sortir les protéines libres solubles dans l'eau, et pour les protéines non solubles une étape de précipitation par sulfate d'ammonium se poursuit. Ensuite vient la modélisation de l'étape d'extraction par la méthodologie de surface de réponse utilisant le plan Box-behnken avec 03 facteurs (Température, pH et pourcentage de précipitation en sulfate d'ammonium). Les données statistiques (Coefficient de régression, les probabilités, tableau de la variance et coefficient de détermination) sont tout obtenus par le logiciel MINITAB et leurs traitements est se fait par l'analyse de la variance (ANOVA).

A la fin il est souhaitable que ce travail aura l'occasion de se réaliser au laboratoire afin d'obtenir des résultats voulus permettant de déchiffrer la thématique, ainsi que de donner naissance à d'autre travaux relatifs citant :

- Etude détaillée sur l'enzyme α -amylase extrait et purifiée à partir des graines d'*Opuntia ficus indica* et de *Pinus halepensis* Mill.
- Optimisation d'autres conditions influençant l'activité de l'enzyme α -amylase.
- Etude d'autres activités enzymatiques présentes dans les graines de nos 02 plantes.

Et tout ça dans le but d'enrichir le savoir sur la flore méditerranéenne.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A.

- Abbou, A., Kadri, N., Dahmoune, F., Chergui, A., Remini, H., Berkani, F., Adel, K., Boukhalifa, F., Madani, K., 2020. Optimising functional properties and chemical composition of *Pinus halepensis* Mill. Seeds protein concentrates. *Food Hydrocolloids* 100.
- Abdel-Hameed, E.-S. S., Nagaty, M. A., Salman, M. S., Bazaid, S. A., 2014. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food chemistry* 160, 31-38.
- Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F., Lazzouni, H., Rebiahi, S., Ziani_Cherif, C., 2011. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 5433-5436 p.
- Ait Kaki, E.-H., El-Okki, A., Leghlimi, H., Djekrif-Dakhmouche, S., Bennamoun, L., Meraihi, Z., 2012. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de l' α -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*. 6, 1-17 p.
- Arba, M., 2009. Le cactus *Opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. Actes du Symposium International AGDUMED-durabilité des systèmes de culture en zone méditerranéenne et gestion des ressources en eau et en sol. Cana Print Rabat, pp. 14-16.
- Arba, M., Aich, E., Sarti, A., Belbahri, B., Boubkraoui, L., Ait Hammou, A., Zemmouri, A., Sbaa, A., 2018. Valorisation du figuier de barbarie en élevage. *Bull Mens Inf Liaison PNTTA* 68, 1-4.
- Azad, M. A. K., Bae, J.-H., Kim, J.-S., Lim, J.-K., Song, K.-S., Shin, B.-S., Kim, H.-R., 2009. Isolation and characterization of a novel thermostable α -amylase from Korean pine seeds. *New Biotechnology* 26, 143-149 p.

B.

- Baghdali, Z., Maameri, C., 2019. Essai de mise au point d'un fromage frais enrichis avec les graines du pin d'Alep «*Pinus halepensis* Mill.».
- Bakri, Y., Magali, M., Thonart, P., 2009. Isolation and identification of a new fungal strain for amylase biosynthesis. *Polish Journal of Microbiology* 58, 269-273.
- Baltas, N., Dincer, B., Ekinici, A., Kolayli, S., Adiguzel, A., 2016. Purification and characterization of extracellular α -amylase from a thermophilic *Anoxybacillus thermarum* A4 strain. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59.
- Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., Azhar, A., 2011. Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech* 12, 255-261 p.
- Bechroune, K., Larab, A., 2018. Activité anti-enzymatiques des plantes de la région de la Kabylie. Biologie. (Doctoral dissertation. Université Abderrahman Mira, Bejaia, Algerie). .
- Bellahoual, s., 2012. Etude de pouvoir antibactérien et mycorhiziens de deux espèces de terfez. Microbiologie appliquée et physiopathologie. (Doctoral dissertation. Université Ahmed Ben Bella, Oran, Algerie). 205 p.
- Benattia, F. K., 2017. Analyse et Application des Extraits de pépains de Figue de Barbarie. Chimie. (Doctoral dissertation. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algerie).184p.
- Benseghier, K., khamed, O., 2014. Huiles Alimentaire de graines *Pinus pinea*: Extraction et Caractérisation physique-chimique. Technologie Alimentaire. (Doctoral dissertation. Université Kasdi Merbah, Ouargla, Algerie).
- Bentouati, A., 2006. Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* M.) du massif de Ouled Yagoub (Khenchela-Aurès). Agronomie. (Doctoral dissertation, Université El Hadj Lakhder, Batna, Algerie). 116 p.

- Bhira, O., 2012. Potentialités thérapeutiques d'*Opuntia ficus indica* au Maroc et en Tunisie. Pharmacie. (Doctoral dissertation. Université Mohammed V, Rabat, Maroc).171p.
- Bou-Maroun, E., Cayot, N., 2011. Odour-active compounds of an *Eisenia foetida* protein powder. Identification and effect of delipidation on the odour profile. *Food chemistry* 124, 889-894 p.
- Bouazza, F., 2013. Intéret de la mycorhization contrôlée du chêne vert (*Quercus ilex* L.) et du pin d'Alep (*Pinus Halepensis* Mill) par deux espèces de terfez, en conditions gnotoxéniques et acéniques. Biotechnologie. (Mémoire de magister . Université Es-senia, Oran, Algérie). 99 p.
- Bouguenna, S., 2011. Diagnostic écologique, mise en valeur et conservation des pineraies de *Pinus halepensis* de la région de Djerma (Nord-est du parc national de Belezma, Batna). Agronomie. (Mémoire de magister . Université El Hadj Lakhdar, Batna, Algérie). 162 p.
- Boumaza, S., 2015. Evaluation rapide des protéines par turbidimétrie : Application à quelques effluents agro-alimentaires avant et après un traitement de clarification. Biochimie Appliquée. (Doctorale dissertation. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie). 148 p.
- Bouzaouit, N., 2015. Optimization of lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose ester using statistical experimental designs. *Der Pharma Chem* 1, 261-269 p.
- Bouzaouit, N., 2016. Optimisation de la synthèse enzymatique d'esters de sucres par la méthodologie des plans d'expériences. Chimie. (Doctoral dissertation. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie). 296 p.
- Bouziane, Z., 2017. Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales de la région d'Azail. Ecologie. (Doctoral dissertation. Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen, Algérie).

C.

- Carletti, I., Clissen, V., Claustrioux, J.-J., 2006. Introduction au logiciel Minitab sous Windows. Notes de Statistique et d'Informatique, 1-23 p.
- Chamayou, A., Fages, J., 2003. Broyage dans les industries agroalimentaires.
- Charnock, S. J., McCleary, B. V., 2005. Les enzymes: Applications industrielles et analytiques. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle* 32, 11-15 p.
- Chavan, S., Wadatkar, C., 2014. Isolation, Purification and Characterisation of Alpha amylase From *Phaseolus Aconitifolius*. *Journal of Advanced Drug Delivery* 1, 114-121 p.
- Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H., 2006. Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international* 12, 407-415 p.
- Cherak, I., 2010. Facteurs d'échec et de réussite des reboisements de pin d'Alep dans trois stations : Ain-Touta, Tazoult et Bouilef. Agronomie. (Mémoire de magister. Université El Hadj Lakhdar, Batna, Algérie). 107p.
- Chokri, M., 2005. The effect of radiation on the conservation of Alep pine and mycotoxins, Etude de l'effet de l'irradiation sur la conservation de pin d'Alep et sur les mycotoxines. (Doctoral dissertation. Ecole supérieure des industries alimentaire, Tunisie). 133 p.
- Cornish-Bowden, A., 2014. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science* 1, 74-87 p.
- Coskun, O., 2016. Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul* 3, 156 p.

Cota-Sánchez, J. H., 2016. Nutritional composition of the prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Elsevier, pp. 691-712.

D.

Dakhmouch-djekrif, S., 2016. Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. *Biologie moléculaire et cellulaire*, pp. 201.

Dakhmouche-Djekrif, S., 2016. Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure *Clavispora lusitaniae* ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides. *Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire*. (Doctoral dissertation. Université de Technologie, Compiègne, France). 201 p.

Demers, D., 2010. Optimisation de méthodes chromogéniques pour l'évaluation d'enzymes pancréatiques en milieu pharmaceutique. *Chimie*. (Mémoire de maîtrise. Université du Québec, Montréal, Canada). 125 p.

Devin, A., 2010. Etablissement de l'implication des α -et β -amylases et des α -glucanes phosphorylases au cours de la dégradation de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. *Biologie et santé*. (Doctoral dissertation. Université des sciences et de technologies, Lille, France). 114 p.

Dey, T. B., Banerjee, R., 2015. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4, 83-90 p.

Djerrad, Z., Kadik, L., Djouahri, A., 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 74, 440-449 p.

Drouet, F., 2015. Comprendre le Figuier de Barbarie : *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., Les fruitiers rares.

Duong-Ly, K. C., Gabelli, S. B., 2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in enzymology*, Vol. 541. 85-94 p. Academic Press.

Durand, p., Saichi, n., 2009. Guide des conifères et espèces apparentées. André Cassan, France.

E.

El-Fallal, A., Dohara, M. A., El-Sayed, A., Omar, N., 2012. Starch and microbial α -amylases: from concepts to biotechnological applications. *Carbohydrates–Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, 459-488 p.

El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., Cherkaoui-Malki, M., 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 19, 14879-14901.

El Hachimi, F., El Antari, A., Boujnah, M., Bendrisse, A., Alfaiz, C., 2015. Comparaison des huiles des graines et de la teneur en acides gras de différentes populations marocaines de jujubier, de grenadier et de figuier de barbarie. *Journal of Materials and Environmental Science* 6, 1488-1502.

Elaieb, M. T., Shel, F., Elouellani, S., Rahouti, M., Thévenon, M.-F., Candelier, K., 2017. Physical, mechanical and natural durability properties of wood from reforestation *Pinus halepensis* Mill. in the Mediterranean Basin.

Elmoubarki, R., Taoufik, M., Moufti, A., Tounsadi, H., Mahjoubi, F., Bouabi, Y., Qourzal, S., Abdennouri, M., Barka, N., 2017. Box-Behnken experimental design for the optimization of methylene blue adsorption onto Aleppo pine cones. *Journal of Materials and Environmental Science* 8, 2184-2191 p.

Elqaj, M., Ahami, A., Belghyti, D., 2007. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

Ennouri, M., Khemakhem, B., Ben Hassen, H., Ammar, I., Belghith, K., Attia, H., 2013. Purification and characterization of an amylase from *Opuntia ficus-indica* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 61-66 p.

F.

Faiveley, M., 2010. Fabrication des bières. *Techniques de l'ingénieur Filière de production : produits d'origine végétale*. 186 p.

Feillet, P., 2000. Le grain de blé: composition et utilisation. Editions Quae.

Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B., Costa, J., 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian pacific journal of tropical disease* 4, 97-103 p.

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Grossi-de-Sá, M. F., 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. *European journal of biochemistry* 269, 397-412 p.

Fu, X., Richards, D. E., Ait-Ali, T., Hynes, L. W., Ougham, H., Peng, J., Harberd, N. P., 2002. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *The Plant Cell* 14, 3191-3200 p.

G.

Ghougali, F., 2011. Contribution à l'évaluation de la diversité et du contrôle génétique de la croissance et de la fructification chez les pins de types halepensis (*Pinus brutia*-*Pinus halepensis*). (Doctoral dissertation. Université Henri Poincaré, Avignon, France).

Ginestra, G., Parker, M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R. B., Bisignano, G., Faulds, C. B., Waldron, K. W., 2009. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10323-10330.

Giridhar, G., Manepalli, R. K. N. R., Gudimalla, A., 2017. Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization, Santa Barbara, United States.

Guit, B., Nedjimi, B., Chakali, G., Guibal, F., 2016. État sanitaire des peuplements de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans le massif forestier de Senalba (Djelfa, Algérie). *Revue d'écologie*.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry* 38, 1599-1616 p.

H.

Habibi, Y., 2004. Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie. Les polysaccharides pariétaux: caractérisation et modification chimique. (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, France). 265p.

Hainque, B., 2008. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.

Halimi, S., 2015. Etude botanique et phytochimique : Approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus indica*. Biotéchnologie végétale (Doctoral dissertation. Université des frères mentouri, Constantine, Algérie). 243p.

Hijazi, M., 2011. Caractérisation structurale et fonctionnelle d'AGP31, une glycoprotéine atypique de la paroi chez *Arabidopsis thaliana*. (Doctoral dissertation. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, France).

Hiteshi, K., 2014. Thermal adaptation of α -amylases: a review. *Extremophiles* 18, 937-944 p.

K.

- Kabas, O., Ozmerzi, A., Akinci, I., 2006. Physical properties of cactus pear (*Opuntia ficus indica* L.) grown wild in Turkey. *Journal of food Engineering* 73, 198-202.
- Kadari, A., 2012. Etude Exploratoire Des Acides Gras Polyinsaturés Des Aiguilles De Pin. Chimie. (Mémoire de magistre. Université Abou Baker Belkaid, Telemcan, Algerie).
- Kadri, N., Khettal, B., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., Montero, J.-L., 2013. Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. *Industrial Crops and Products* 51, 116-122 p.
- Kadri, N., Khettal, B., Aid, Y., Kherfella, S., Sobhi, W., Barragan-Montero, V., 2015. Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food chemistry* 188, 184-192 p.
- Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., Montero, J.-L., 2014. Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial crops and products* 54, 6-12 p.
- Kadziola, A., Abe, J.-i., Svensson, B., Haser, R., 1994. Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *Journal of molecular biology* 239, 104-121 p.
- Karam, S., 2004. Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt.
- Keller, A.-L., Girard, C., Chaumont, J.-P., 2009. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, le figuier de barbarie ou nopal, une plante aux multiples usages. *La Phytothérapie européenne*, 24-27.

Khacheba, I., Benamar, H., 2008. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha-amylase. Génie biologique. (Thèse d'ingénieur. Université Amar Telidji, Laghouat, Algérie). 81 p.

L.

Laiche , T., Siboukeur, O., 2018. Production d'enzymes amylolytiques chez des souches levuriennes isolées à partir de deux origines (sol saharien et blé) et cultivées sur milieu à base de lactosérum. Biologie. (Doctoral dissertation. Université Kasdi Merbah, Ourgela, Algérie). 181 p.

Lin, C.-P., Huang, J.-P., Wu, C.-S., Hsu, C.-Y., Chaw, S.-M., 2010. Comparative chloroplast genomics reveals the evolution of Pinaceae genera and subfamilies. *Genome biology and evolution* 2, 504-517 p.

M.

Maktouf, S., 2013. Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de Bacillus. Production sur milieu solide et caractérisation. (Doctoral dissertation. Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse, France). 171 p.

Martínez, T. F., Alarcón, F. J., Díaz-López, M., Moyano, F. J., 2000. Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. *Electrophoresis : An International Journal* 21, 2940-2943 p.

Medina, E. D., Rodríguez, E. R., Romero, C. D., 2007. Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food chemistry* 103, 38-45.

Merabti, R., 2006. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Biochimie et microbiologie appliquée. (Mémoire de magister. Université mentouri, Canstantine, Algérie). 85 p.

- Meunier, N., 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Maîtrise en sciences de l'eau. (Doctoral dissertation. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique). 184 p.
- Mifsud, S., 2002. *Pinus halepensis* (Aleppo Pine) : MaltaWildPlants. com-the online Flora of the Maltese Islands.
- Minhaj, M., El Jemli, Y., Taourirte, M., Bouyazza, L., 2019. Preliminary phytochemical screening, total phenolic, flavonoids and polysaccharides contents and antioxidant capacity of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Opuntia ficus-barbarica* flowers.
- Mobini-Dehkordi, M., Javan, F. A., 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol. today's world* 1, 39-50 p.
- Mouas, K., 2016. Extraction, purification et caractérisation d'une enzyme amylolytique issue de *Bacillus amyloliquefaciens*. Technologie alimentaire. (Doctoral dissertation. Université M'hamed Bougara, Boumerdas, Algérie).
- Mssadak, I., 2018. Propriétés techno-fonctionnelles et substances bioactives de deux ingrédients alimentaires : cladodes du figuier de barbarie et feuilles de vigne. Biologie. (Doctoral dissertation. Université de Gabès, Tunisie). 146p
- Mulas, M., Mulas, G., 2004. Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification.

N.

- Nedjimi, B., Difi, M., Haddioui, A., 2014. Effets des différents prétraitements sur la germination des semences de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). *Revue des BioRessources* 4, 40-45 p.
- Neffar, S., 2012. Etude de l'effet de l'âge des plantations de figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica* L. Miller) sur la variation des ressources naturelles (sol et végétation) des steppes

algériennes de l'Est. Cas de Souk Ahras et Tébessa. (Doctoral dissertation. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria). 236 p.

Nouadri, T., 2011. L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. (Doctoral dissertation. Université Mentouri, Constantine, Algeria). 143 p.

O.

Obulbiga, M., Gava, C., Bougouma, V., Sanon, H., Kocty, D., Kiemde, D., Coulibaly, A., Diallo, M., 2018. Effet du type de bouture de la palme fourragère (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) sur la capacité de reprise et le développement de la plante sous conditions pluviales au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 12, 1199-1207.

P.

Peng, X., Yang, G., Shi, Y., Zhou, Y., Zhang, M., Li, S., 2020. Box–Behnken design based statistical modeling for the extraction and physicochemical properties of pectin from sunflower heads and the comparison with commercial low-methoxyl pectin. *Scientific Reports* 10, 1-10 p.

Philippe, G., Baldet, P., Héois, B., Ginisty, C., 2006. Reproduction sexuée des conifères et production de semences en vergers à graines. Editions Quae.

R.

Rai, A., 2017. Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous. Microbiologie appliquée. (Doctoral dissertation. Université Ferhat Abbas, Setif, Algeria). 246 p

Ramadan, M. F., Mörsel, J.-T., 2003. Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: a good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. *Food Chemistry* 83, 447-456.

Rao, M. S., Reddy, N., Rao, G. V., Rao, K. S., 2005. Studies on the extraction and characterization of thermostable α -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology* 4, 288-291 p.

Regnault, T., 2014. Biosynthèse et transport des gibbérellines chez *Arabidopsis thaliana*. (Doctoral dissertation. École doctorale Sciences de la vie et de la santé, Strasbourg, France). 297 p.

S.

Saini, R., Saini, H. S., Dahiya, A., 2017. Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6, 1865-1871.

Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., Silveira, D., 2012. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 15, 141-183 p.

Salim, N., Abdelwaheb, C., Rabah, C., Ahcene, B., 2009. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *African Journal of Biotechnology* 8.

Sanago, R., 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako, Mali 53.

Santos-Díaz, M., Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H., Ochoa-Alejo, N., 2010. Mexican threatened cacti: current status and strategies for their conservation. *Species diversity and extinction*. Nova Science Publishers, Inc., New York, 1-60.

- Šarac, Z., Matejić, J. S., Stojanović-Radić, Z. Z., Veselinović, J. B., Džamić, A. M., Bojović, S., Marin, P. D., 2014. Biological activity of *Pinus nigra* terpenes evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in biology and medicine* 54, 72-78 p.
- Saranraj, P., Stella, D., 2013. Fungal amylase : a review. *Int J Microbiol Res* 4, 203-211 p.
- Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S., Zeikus, J. G., 2002. *Pyrococcus furiosus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry* 41, 6193-6201 p.
- Schiller, G., 2014. Therapeutic use of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). Medicinal and aromatic plants of the middle-east. Springer, pp. 215-224 p.
- Schweizer, M., 2000. Docteur Nopal: médecin du bon Dieu. APB, Aloe plantes et beauté.
- Seladji, D., 2014. Composition chimique , propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielle des racines de trois *Pinaceae* d'Algérie. Chimie. (Mémoire de magister. Université Abou Beker Belkaid, tlemcen, Algeria).
- Simard, F., 2007. Évaluation du potentiel anticancéreux des extractibles du bois de pin rouge. Ressources renouvelables. (Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Chicoutimi). 72 p.
- Singh, S., Sharma, V., Soni, M., DAS, S., 2011. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2, 486-496 p.
- Souza, P. M. d., 2010. Application of microbial α -amylase in industry : A review. *Brazilian journal of microbiology* 41, 850-861 p.
- Sponsel, V. M., 2003. Encyclopedia of Hormones, Université de California, Riverside, USA.

T.

Takeshi, M., Ahmad, F. I., Kailash, C. K., 2015. Gas Separation Membranes : Polymeric and Inorganic. Springer, Cham, Switzerland.

Tamine, M., 2019. Production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sur jus de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). Biologie. (Doctoral dissertation. Université Ferhat Abbas, Sétif, Algerie). 234p.

Tekić, I., Fuerst-Bjeliš, B., Durbešić, A., 2015. The Impact of Aleppo Pine Afforestation on the structure and dynamics of Landscape in Mediterranean Croatia The overarching issues of the European space: spatial planning and multiple paths to sustainable and inclusive development, Porto 207-221 p.

Temagoult, A., Zitouni, B., Noui, Y., 2017. Algerian prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) physicochemical characteristics. International Journal of Scientific Research & Engineering Technology 5, 14-17.

Toumi, S., 2018. Isolement et caractérisation des souches levuriennes productrices d'amylase à partir de sol saharien Algérien et cultivée sur un milieu à base de lactosérum. Biologie moléculaire. (Doctoral dissertation. Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algerie). 129 p.

Toure, H. A., 2017. Contribution à la Valorisation de l'*Opuntia ficus indica* en Nutraceutique et Phytothérapie. (Doctoral dissertation. Université Mohammed V, Rabat, Maroc). 155 p.

V.

Valente, L. M., da Paixão, D., Do Nascimento, A. C., dos Santos, P. F., Scheinvar, L. A., Moura, M. R., Tinoco, L. W., Gomes, L. N. F., da Silva, J. F., 2010. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). Food chemistry 123, 1127-1131.

Vennetier, M., Ripert, C., Brochiéro, F., Rathgeber, C., Chandiooux, O., Estève, R., 2010. Évaluation de la croissance du pin d'Alep en région méditerranéenne française. *Revue Forestière Française Ecole nationale du génie rural*, 11 p.

Voet, D., Voet, J. G., 2016. *Biochimie (3^o Éd.)*. De Boeck Supérieur, Librairie professionnelle internationale.

W.

Walls, D., Loughran, S. T., Madadlou, A., O'Sullivan, S., Sheehan, D., 2017. *Protein chromatography : Methods and Protocols*. Humana Press, Dublin, Ireland.

Wilson, H., Wyatt, M., Zilliox, P., 2019. *Prickly Pear Cactus: Food of the Desert*. The University of Arizona.

Wingfield, P. T., 2016. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science* 84, A. 3F.

Woods, S. C., 2004. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286, G7-G13.

Y.

Yao, A., Koffi, D. M., Blei, S. H., Irie, Z. B., Niamke, S. L., 2015. Propriétés biochimiques et organoleptiques de trois mets traditionnels ivoiriens (attiéké, placali, attoukpou) à base de granulés de manioc natifs. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 9, 1341-1353 p.

Z.

Zeghad, N., 2010. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité

antibactérienne. Biotechnologie végétale. (Doctoral dissertation. Université Mentouri, Constantine, Algeria). 130p.

Zoubiri, L., 2017. Production d'alpha amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. (Mémoire de magister. Université Mentouri, Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), Constantine, Algeria).