

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

**Étude *in vitro* et *in silico* de l'effet inhibiteur de
quelques molécules pures sur la lipase de *Candida
rugosa***

Présenté par :

LINANI Fatna Narimane

BOUAZARA Safia

Devant le jury :

Président(e) : Pr YOUSFI Mohamed

Rapporteur : Dr BENAROUS Khedidja (MCA)

Examinatrice : Dr BOUSSOUSSA Hadjer (MCB)

Soutenu publiquement le : 17 Mai 2017.

Dédicaces

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie,

Je dédie ce modeste travail

À la mémoire de mon père Hassane qui nous a quittés voilà 3 ans,

*Qui a été toujours là pour moi, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me
donner l'aide et à me protéger.*

*A ma mère Fadhila : en vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à se sacrifier pour le
bonheur de ses enfants, qui m'a toujours soutenu et qui m'a fait tout possible pour moi.*

Que dieu la garde et la protège.

À mes très chers frères : Djamel et Omar El-Farouk

À m'adorable sœur : Manal

À mes amies

À tous ceux qui me sont chères

À tous ceux qui m'aiment

À tous ceux que j'aime.

NARIMANE

Dédicace

Je dédie cette thèse à

A ma très chère mère, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mon père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation..

A mes sœurs et mes frères

A mes chères ami(e)s surtout

A mes chers collègues.

SAFIA

Remerciements

Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous guidé vers le droit chemin, de nous avoir aidé tout au long de nos années d'étude.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude ainsi que nos sincères remerciements à Dr BENAROUS Khedidja qui malgré les occupations et les responsabilités qu'elle assume, elle a toujours eu le temps pour nous conseiller et nous fournir la documentation nécessaire durant la réalisation de ce travail.

Nous adressons notre profond remerciement à nos collègues LINANI Abderrahmane et SERSEGUE Talia pour ses collaborations, ses conseils et ses soutiens afin de réaliser ce travail.

Nos remerciements aux honorables membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos profondes reconnaissances à l'ensemble des enseignants du département de biologie pour leur enseignement et conseils durant les cursus d'étude.

Nous adressons nos remerciements les plus chaleureux à nos familles pour leur amour, leur patience et leur sacrifice qui s'inscrivent à chaque page de ce document.

Enfin, un grand remerciement à l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin

à l'élaboration de ce travail.

RÉSUMÉ

Le présent travail a pour objectif, de mettre en évidence l'effet inhibiteur *in vitro* et *in silico* de quatorze molécules pures sur l'activité enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* (LCR). Les molécules utilisées sont trois terpènes : alpha pinène, linalool, myrcène, un composé phénolique l'hispidine, quatre alcaloïdes: harmalin, harmin, harmalol et harmol, six acides organiques tels que : l'acide ascorbique, l'acide benzoïque, l'acide citrique, l'acide galique, l'acide oxalique et l'acide salicylique. Le linalool représente le meilleur effet d'inhibition avec une valeur d'IC50 de 0,581 mg/ml tandis que l'acide citrique a enregistré l'effet d'inhibition le plus faible avec une valeur d'IC50 de 4,642 mg/ml. Les résultats obtenus montrent que les molécules ont un pouvoir inhibiteur contre la LCR avec un type compétitif pour huit molécules, incompétitif pour trois et non compétitif pour deux et une molécule n'a prouvé aucune inhibition. La modélisation par Docking moléculaire est effectuée afin d'étudier les interactions chimiques des inhibiteurs avec la lipase de *Candida rugosa* et de confirmer le type d'inhibition. Ces expériences ont montré que ces molécules peuvent être utilisées pour traiter quelques maladies comme l'obésité.

Mots clés : lipase de *Candida rugosa* (LCR), inhibition, IC50, acides organiques, alcaloïdes, les terpènes, Docking moléculaire.

ABSTRACT

This work aims to demonstrate the inhibitory effect *in vitro* and *in silico* of fourteen pure molecules on the enzymatic activity of *Candida rugosa* lipase (CRL). The used molecules are: three terpenes: pinene, linalool, myrcene, one Phenolic compound hispidin, four Alkaloids: harmalin, harmin, harmalol and harmol, six organic acids such as: ascorbic acid, benzoic acid, citric acid, galic acid, oxalic acid and salycelic acid. Linalool represents the best effect of inhibition with an IC50 of 0,581 mg/ml while the citric acid recorded the lowest inhibitory effect with a value of 4,642 mg/ml. The results obtained show that the molecules have an inhibitory capacity against CRL with a competitive-type for eight molecules, incompetitive for three and non competitive for two molecules, and one molecule didn't prove any inhibition. Molecular Docking is carried out to study the chemical interactions of inhibitors with *Candida rugosa* lipase and to confirm the type of inhibition. These experiments showed that these molecules could be used to treat some diseases as obesity.

Keywords: *Candida rugosa* Lipase (CRL), inhibition, IC50, acids, alkaloids, terpenes, Molecular docking.

ملخص

يهدف هذا العمل الى اظهار تاثير تثبيط أربعة عشر جزيئة نقية على النشاط الأنزيمي للليباز . الجزيئات المستخدمة هي ثلاثة جزيئات طيارة: ألفا بينين ، لينالول، ميرسين، و مركب الفينول هيسبيدين أربعة قلويدات هرملين، هرمين هرملول و هرمول ، ستة الأحماض : حمض الأسكوربيك، حمض البنزويك وحمض الستريك وحمض الغاليك وحمض الأكساليك وحمض الساليسيليك. يمثل لينالول أفضل تاثير تثبيط مع قيمة 0,581 ملغ /مل في حين أن حامض الستريك قد سجل أدنى تاثير كمثبط بقيمة 4,642ملغ / مل. وأظهرت النتائج أن جزيئات لها قوة مثبطة ضد الليباز مع نوع تنافسية لثمانية جزيئات، ثلاثة لا تنافسية ، جزيئين غير قادرة على المنافسة و جزيئة واحدة لم تثبت أي تثبيط. النمذجة الجزيئية نفذت لدراسة

التفاعلات الكيميائية للمثبطات مع الليباز وتأكيد نوع نوع التثبيط. وقد أظهرت هذه التجارب أن هذه الجزيئات يمكن أن تستخدم لعلاج بعض الأمراض.
الكلمات المفتاحية: الليباز ، تثبيط ، التركيز المثبط (م)، جزيئات طيارة ، قلويدات ، الأحماض ، النمذجة الجزيئية.

Liste des figures

Figure 1. Représentation des structures des terpènes et le composé phénolique.....	17
Figure 2. Représentation des structures des alcaloïdes	18
Figure 3. Représentation des structures des acides organiques.....	19
Figure 4. Le schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne.....	20
Figure 5. La courbe d'étalonnage réalisée par le p-nitrophénol.....	23
Figure 6. Représentation graphique de l'inhibition des molécules de la réaction	29
Figure 7. Représentation des interactions 2D d'alpha pinène obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite	46
Figure 8. Représentation des interactions 2D de linalool obtenue par le logiciel Discovery studio	46
Figure 9. Représentation des interactions 2D de hispidine obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite	47
Figure 10. Représentation des interactions 2D de harmaline obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite	47
Figure 11. Représentation des interactions 2D de harmine obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite	48
Figure 12 . Représentation des interactions 2D de harmalol obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite	48
Figure 13. Représentation des interactions 2D de harmol obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite	49
Figure 14. Représentation des interactions 2D de l'acide ascorbique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite.....	49
Figure 15. Représentation des interactions 2D de l'acide benzoïque obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite.....	50
Figure 16. Représentation des interactions 2D de l'acide citrique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite.....	50
Figure 17. Représentation des interactions 2D de l'acide gallique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite.....	51
Figure 18. Représentation des interactions 2D de l'acide oxalique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite.....	51
Figure 19. Représentation des interactions 2D de l'acide salicylique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite	52
Figure 20. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'alpha pinène.....	53
Figure 21. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour linalool	53
Figure 22. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'hispidine.	54
Figure 23. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmaline.	54

Figure 24. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmine.....	55
Figure 25. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmalole.....	55
Figure 26. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmol.....	56
Figure 27. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide ascorbique.	56
Figure 28. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide benzoïque.	57
Figure 29. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide citrique.	57
Figure 30. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide gallique.....	58
Figure 31. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide oxalique.....	58
Figure 32. Représentation de la meilleure position obtenue par le Docking pour l'acide salicylique.	59

Liste des tableaux

Tableau 1. Les paramètres cinétiques de la lipase de <i>Candida rugosa</i>	23
Tableau 2. Les valeurs d'IC50, Ki et type inhibition des terpènes, les composés phénoliques, les alcaloïdes et les acides organiques.	29
Tableau 3. Valeurs d'IC50 pour quelques molécules selon la littérature.	33
Tableau 4. Résultats de traitement de Docking et nombre de la répétition.	45

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	9
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	12
1. Les maladies causées par les lipases	12
1. 1 L'obésité par la lipase pancréatique humaine	12
1. 2 L'Acné par la lipase de <i>Propionibacterium acnes</i>	13
1. 3 L'Ulcère par la lipase de <i>Helicobacter pylori</i>	15
MATERIELS ET METHODES	17
1. Les molécules pures.....	17
1. 1. Les terpènes et les composés phénoliques	17
1. 2 Les alcaloïdes	18
1. 3 Les acides organiques.....	19
2. Activité enzymatique de la lipase	20
2.1. Principe de l'activité enzymatique de la lipase	20
3.2. Étude de l'inhibition de l'activité de la lipase	20
3.3. Analyse statistique.....	22
3.4. Docking moléculaire.....	22
RESULTATS ET DISCUSSION.....	23
1. La courbe d'étalonnage de p-NP.....	23
2. Paramètres cinétiques déterminés pour la lipase de <i>Candida rugosa</i>	23
3. Inhibition de la réaction catalysée par la lipase.....	24
CONCLUSION	60
REFERENCES.....	61
ANNEXE	63

INTRODUCTION GENERALE

Les lipases sont des enzymes ubiquitaires jouent un rôle centrale dans tous les aspects de métabolisme des graisses (Desnuelle, 1986). Elles sont des esters glycérol hydrolases, qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides pour libérer les acides gras (Ruiz *et al.*, 2006 ; Stolley *et al.*, 2008 ; Benarous, 2014)

Les triacylglycérollacyl-hydrolases, ou lipases (E.C.3.1.1.3), sont des enzymes appartiennent à la famille des hydrolases d'ester carboxylique. Leur rôle physiologique est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques, insolubles dans l'eau, se produit à l'interface entre lipide et eau (Bataiche, 2014) (Uyanik *et al.*, 2010).

Les lipases sont largement répandues dans la nature, elles peuvent être confinées dans une organelle c'est-à-dire lysosome, ou elles peuvent être trouvés dans les espaces extracellulaires pour jouer leur rôle dans le métabolisme, l'absorption et le transport des lipides. Les lipases peuvent être intracellulaire à fin de catalyser la dégradation des substrats lipidiques présent dans l'environnement cellulaire (Benarous, 2010). On les trouve aussi bien dans le règne végétal, chez les invertébrés mais également chez nombreux microorganismes principalement sous forme des protéines extracellulaires (Patrik *et al.*, 2008). Elles sont également largement répandus chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces* ainsi que chez les levures du genre *Geotrichum* ou *Candida*. (Beisson *et al.* , 2001).

La lipase de *Candida rugosa* (connues aussi sous le nom de *Candida cylindracea*) (LCR) est un biocatalyseur souple qui catalyse l'hydrolyse, l'alcoolyse, l'estérification et la transestérification des triacylglycérols et d'autres esters hydrophobes. Elle est largement appliquée dans une série d'applications biotechnologiques diverses comme la production des

esters de carbohydrates des acides gras, la synthèse des produits pharmaceutiques et d'une multitude d'applications dans la production alimentaire (Pandey *et al.* 1999).

La LCR est une protéine de 534 acides aminés, dont trois d'eux constituent la triade catalytique (SER 209, HIS 449, GLU341) forment le trou d'oxyanion avec deux autres acides aminés ALA 210 et GLY 124, le site actif est recouvert dans l'état inactif par le volet peptidique de GLU 66 à CYS 97, la cavité interne du site actif pour la fixation de la chaîne aliphatique de substrat est sous forme d'un tunnel hydrophobe constitué de LEU304 , LEU 410, SER 300, LEU 365, LEU 413 et PRO 246 (Grochulski *et al.*, 1994 ;Schmitt *et al.*,2009, Benarous, 2010 et 2014).

L'application d'un inhibiteur de lipase a été examinée plus tôt comme traitement pour l'obésité car il y a un lien de causalité entre l'obésité et de nombreuses complications celles-ci peuvent être : soit à risque vital (risque cardiovasculaire, coronaropathies, diabète et certains cancer) soit source de handicaps importants (risque respiratoire, pathologies ostéorarticulaire, problèmes dermatologiques et de fertilité) (Merrouche *et al.*, 2005).

La candidose est une maladie causée par les levures du genre *Candida* représente un vrai souci pour la santé humaine d'où l'importance attribuée aux recherches dans ce domaine encore aujourd'hui *Candida* est l'agent principal impliqué dans la candidose de la sphère oropharyngée et œsophagienne. *C. albicans* est également responsable de la grande majorité des cas près de 90%, des candidoses digestives (Gales, 2009).

L'acné est la maladie la plus commune associée à la bactérie *Propioni bacteriumacnes*, est une pathologie inflammatoire chronique du follicule pilosébacé évoluant par poussée. Elle touche 70 à 80% des adolescents et peut être à l'origine de cicatrices, Elle apparaît à la puberté et disparaît plus souvent à l'âge adulte (Derno, 2010, Benarous, 2010).

D'autre part l'*Helicobacter pylori* est un gram négatif, à forme spirale, flagellé (unipolaire ou bipolaire). Cette bactérie a été principalement trouvée chez l'homme et d'autres animaux, elle vit dans les segments antrale et fundique de l'estomac (entre la couche de la muqueuse et la surface des cellules épithéliales et dans le duodénum. Le mode de la transmission de l'infection de *H. pylori* n'est pas encore bien identifié. Les segments antrale et fundique de l'estomac a plupart des individus infectés développent des gastrites asymptomatiques mais pour environ 1 personne sur 10, l'infection à *H. pylori* est associée au développement de gastrite chronique, l'ulcère gastroduodénaux (Nagorni, 2000).

Durant ces trois dernières décennies, il a été montré que de nombreux métabolites secondaires jouaient un rôle écologique important. Des fonctions aussi importantes que la préservation contre les infections microbiennes et les herbivores, ou que l'attraction exercée contre les pollinisateurs et les agents qui permettent la dispersion des fruits, sont devenues des thèmes qui sont au centre de la recherche sur ces métabolites secondaires. Parmi eux, les terpènes sont des substances généralement lipophiles dérivant d'une entité simple à cinq atomes de carbone. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans le divers mode d'assemblage (Hapokins., 2003).

A la différence des composés terpéniques, un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétal), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique (Juenger .,2007). Les alcaloïdes provoquant chez l'homme diverses réponses physiologiques et psychologiques parce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. À forte dose la plupart des alcaloïdes sont toxique, par contre à faible dose, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique (Hapokins., 2003).

Il y a 10 ans et nos travaux sont continus, sur l'inhibition de la lipase de *Candida rugosa* afin de traiter l'obésité, la candidose, l'acné et l'ulcère par des extraits naturels et l'isolement des molécules bioactives. De cette approche, Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois *in vitro* et *in silico*, l'effet inhibiteur des terpènes et les alcaloïdes isolés à partir de l'espèce *Peganum harmala* et les acides sur la lipase de *Candida rugosa*.

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'effet inhibiteur de quelques terpènes, alcaloïdes et acides organiques sur la lipase de *Candida rugosa* et d'utiliser ces molécules comme une cure de certaines maladies comme l'obésité, candidose, acné, ulcère...etc.

Dans ce cadre, nous avons défini une stratégie de recherche commencera par une introduction générale. Second, nous avons décrit tous le matériel et les méthodes utilisés ainsi que l'outil bioinformatique et nous avons étudié le pouvoir inhibiteur de quelques terpènes, alcaloïdes et acides organiques contre la lipase par la suite, nous procédons à l'étude *in silico* de la fixation de l'inhibiteur dans le site actif de la lipase de *Candida rugosa* par le DOCKING moléculaire de ces molécules pures, suivies des résultats et leur discussion et se terminera par une conclusion générale.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Les maladies causées par les lipases

1. 1 L'obésité par la lipase pancréatique humaine

L'obésité est une maladie chronique et qui peut être définie comme un état d'accumulation excédentaire de masse grasseuse, en tenant compte des normes en fonction de l'âge et du sexe (Formiguera et Canton, 2004 in benarous, 2010).

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre la prise d'énergie et la dépense énergétique ; c'est-à-dire, quand un individu ingère plus que le corps dépense, la prise d'énergie excessive est stockée en cellules de graisse du corps qui agrandissent ou augmentent en nombre (Marcus, et Wildes, 2009 in benarous, 2010).

La mesure directe du taux de masse grasseuse est difficile et n'est pas toujours fiable. Mais l'obésité peut être mesuré par l'indice de masse corporelle (IMC) «*Body Mass Index (BMI)*», (Formiguera et Canton, 2004 in benarous, 2010), c'est un rapport de poids en Kg divisé par le carré de la taille en mètre (Kg/m^2) (Marcus et Wildes, 2009 in benarous, 2010). C'est l'indicateur le plus couramment utilisé, chez l'adulte il existe une valeur seuil unique de l'IMC pour : le poids insuffisant (IMC inférieur à 18.5 Kg/m^2), le poids normal (IMC entre $18,5\text{-}24,9 \text{ Kg/m}^2$), le surpoids (IMC supérieur à 25 kg/m^2) et l'obésité (supérieur à 30 kg/m^2), chez l'enfant les seuils évoluent avec l'âge et le sexe du fait des variations de la corpulence survenant au cours de la croissance (Mantey *et al.*, 2003 in benarous, 2010).

L'obésité augmente le risque d'atteinte d'un certain nombre maladies, y compris l'hypertension, le diabète de type 2, la dyslipidémie, l'artère coronaire, l'arthrose et le cancer de sein post-ménopausique. La prédominance de l'obésité a été significativement augmentée au cours des 30 dernières années, et environ 32 % des adultes dans les états unis sont actuellement obèses (Stolley *et al.*, 2008 in benarous, 2010).

La lipase pancréatique est le principal enzyme responsable de la digestion des lipides alimentaires. Elle agit principalement sur les diglycérides libérés par la lipase gastrique. Elle est sécrétée dans le duodénum et fonctionne à des pH légèrement alcalins, contrairement à la lipase gastrique. Les produits de la lipolyse sont, suite à son action, véhiculés à l'aide des agents tensioactifs naturels que sont les sels biliaires. L'activité de la lipase pancréatique peut s'exercer en présence ou en absence des sels biliaires. En leur absence, la lipase s'adsorbe d'abord à l'interface lipide / eau avant d'hydrolyser les esters carboxyliques. Par contre, en présence de ces sels biliaires, la lipase pancréatique est inactive, mais son activité est restaurée par un cofacteur protéique appelé colipase (figure 38) (Borgstrom *et al.*, 1973 in benarous, 2010).

L'orlistat est un inhibiteur compétitif de la lipase qui appartient à une nouvelle classe des médicaments anti-obésité. Il empêche la lipolyse des triglycérides diététiques (TG), et réduit ainsi l'absorption intestinale suivante de la graisse. La lipase pancréatique humaine (LPH) a été la cible principale dans le développement d'Orlistat™ (figure 39). L'inhibition de la lipase gastrique humaine (LGH) par Orlistat™ a été également étudiée in vitro mais n'avait pas été encore étudiée au cours des repas d'essai. Dans les études les plus cliniques, les effets d'Orlistat™ ont été estimés indirectement à partir des gros niveaux fécaux d'excrétion, mais l'inhibition exercée sur les lipases digestives et les niveaux de la lipolyse n'ont pas été mesurés simultanément in vivo (Carrière *et al.*, 2001 in benarous, 2010).

1. 2 L'Acné par la lipase de *Propionibacterium acnes*

L'acné, est la maladie la plus commune associée à la bactérie *Propionibacterium acnes* (connue aussi sous le nom de *Corynebacterium acnes/parvum*, figure 40). Cette maladie affecte 80% de la population totale au moins une fois pendant la vie, et c'est la cause principale de la consultation dermatologique, elle se développe principalement chez les patients d'âge de 10-30 ans (Toyoda et Morohashi, 2001 ; Jappe, 2003 in benarous, 2010).

L'acné est une éruption folliculaire qui commence comme un comédon, prospère alors une inflammation qui entraîne à la formation de papules et pustules rouges. Plusieurs patients souffrant d'acné subir une résolution complète de leur lésions ne présentent aucun symptôme restants, alors que d'autres patients ont l'acné continue ou de longue durée et comme conséquences, ils auront des cicatrices et des chéloïdes (figure 41).

Les lésions initiales non inflammatoires ont été vérifiées par la microscopie optique et par microscopie électronique (Toyoda et Morohashi, 2001 in benarous, 2010). Ceci conduit à un

microcomédon, qui va progresser vers un comédon fermé ou ouvert. Les lésions inflammatoires sans doute commencent lorsque la prolifération de *Propionibacterium acnes* attire les neutrophiles aux follicules sébacés. Le contenu diffuse dans le derme qui déclenche l'inflammation. Dans la plupart des cas, l'inflammation disparaît progressivement, subsistent sur quelques jours à 2 semaines. Comme il a été largement connu, organisme prédominant est *P. acnes* (Puhvel et al., 1975 in Higaki, 2003 in benarous, 2010).

La multiplication de *P. acnes*, la surproduction de sébum, et l'hyperkératinisation folliculaires sont trois facteurs consécutifs physiologiques dans la pathogenèse de l'acné. Il est bien établi que l'abondance des acides gras libres dans les lésions détectées en tant que formes d'acné par l'effet de la lipase de *P. acnes* sur les triglycérides sébacées. Les acides gras libres stimulent l'épithélium folliculaire suffisamment pour aboutir à sa rupture, qui permet alors d'obtenir ceux à travers le derme et pour induire l'inflammation (Higaki, 2003). Marples *et al.* (1971 in Higaki, 2003) a signalé qu'une diminution des acides gras libres précède une baisse dans le nombre de *P. acnes*. L'injection intradermique des acides gras libres dans les sujets sains provoque de graves l'inflammation (Strauss et Pochi, 1965 in Higaki, 2003 in benarous, 2010). La lipase de *P. acnes* elle-même peut agir comme un facteur chimiotactique (Lee et al., 1982 in Higaki, 2003 in benarous, 2010), et il est probable que d'autres facteurs contribuent et qui ont été traités légèrement jusqu'à ce jour (Puhvel et Sakamoto, 1978 in Higaki, 2003 in benarous, 2010). De ce fait, l'importance de la lipase de *P. acnes* dans l'acné a également été fortement confirmée (Kellum, 1968 in Higaki, 2003 in benarous, 2010).

La lipase de *P. acnes* a quelques propriétés intéressantes. Elle clive aux positions α et β des triglycérides simultanément, en libérant des acides gras libres et de glycérol. La lipase de *P. acnes* est stable et active au pH compris entre 5 et 8; si le pH est inférieur à 5, l'activité de *P. acnes* lipase est plus faible. Bien que d'autres facteurs aient été récemment discutés avec l'égard de la pathogenèse de l'acné, la lipase de *P. acnes* a toujours été considérée comme un élément important dans la pathogenèse de l'acné. En outre, nous ne devrions pas ignorer l'existence de phosphatase acide et la protéase, qui sont des enzymes extracellulaires produites par *P. acnes* (Ingham et Cunliffe, 1981 in Shuichi Higaki, 2003 in benarous, 2010) Ces enzymes peuvent également être d'importance dans l'acné inflammatoire.

La thérapie d'acné consiste à la réduction de la production de sébum, réduction de l'hypercornification, inhibition de la croissance de *P. acnes* (et la réduction de la synthèse et/ou l'activité des enzymes de *P. acnes* et des antigènes pro-inflammatoires), et réduction de

l'inflammation. L'acné douce est traitée en utilisant des composés comme : les rétinoïdes (tretionine, tazarotene, adapalene), qui sont sebo-statiques, kératolytiques, et les médicaments anti-inflammatoires, ou le peroxyde de benzoyle, qui sont kératolytiques et anti-*P. acnes*. Ces composés ont une efficacité limitée, ainsi l'acné douce modérée exige la combinaison des traitements précédents avec des antibiotiques tels que les tétracyclines (tétracycline, clindamycine, minocycline, etc.) ou les macrolides (érythromycine ou roxithromycine).

1. 3L'Ulçère par la lipase de *Helicobacter pylori*

L'Helicobacter pylori (appelée aussi des *Campylobacter pylori/pyloridis*) est à Gram négatif, à forme spirale, flagellé (unipolaire ou bipolaire) (figure 42). Cette bactérie a été principalement trouvée chez l'homme et d'autres animaux (primats, chats, etc.), elle vit dans les segments antrale et fundique de l'estomac (entre la couche de la muqueuse et la surface des cellules épithéliales figure 43), et dans le duodénum. Le mode de la transmission de l'infection de *H. pylori* n'est pas encore bien identifié (Nagorni, 2000; <http://www.helicobacterspain.com> in Ruiz, 2005 in benarous, 2010)

H. pylori a suscité un grand intérêt car elle a été isolée par Warren et Marshall en 1983 (Nagorni, 2000 in benarous, 2010) à partir de biopsies gastriques, car elle provoque l'une des plus infections répandues dans le monde entier. *H. pylori* colonise environ 60% de la population mondiale, mais une prévalence plus élevée est associée au statut socio-économique faible, surpeuplement et d'âge plus élevé, étant aussi élevée que 90% chez les adultes des pays en développement. La plupart des individus infectés développent des gastrites asymptomatiques, mais pour environ 1 personne sur 10, l'infection à *H. pylori* est associée au développement de gastrite chronique, ulcères gastro-duodénaux (ulcères sur la paroi de l'estomac ou du duodénum; Figure 43), ou systémiques, les maladies cardiovasculaires, respiratoires, neurologiques, auto-immunes, et la croissance troubles, entre autres maladies (Nagorni, 2000; <http://www.helicobacterspain.com> in Ruiz, 2005 in benarous, 2010).

L'approche thérapeutique la plus acceptée recommande un inhibiteur de la sécrétion acide par les cellules pariétales (Inhibiteurs de la pompe à protons: comme l'oméprazole, Pantoprazol, etc; ou antagonistes des récepteurs H₂: ranitidine, famotidine, etc) et deux antibiotiques (clarithromycine ou le métronidazole en association avec l'amoxicilline), ou amoxicilline en association avec le métronidazole ou la tétracycline (Perna *et al.*, 2003 in benarous, 2010). Toutefois, des études récentes ont montré des résultats décevants avec ces régimes, principalement en raison de la situation d'urgence rapide de la résistance bactérienne aux

antibiotiques utilisés (Nagorni, 2000 in benarous, 2010). Ainsi, la recherche sur les thérapies alternatives est en cours, y compris l'utilisation de composés antiulcéreux obtenus à partir de médicaments à base de plantes qui, généralement, ils ont un large éventail d'activités bénéfiques tels que les anti-*H. pylori*, anti-inflammatoires, et effets antioxydants, l'inhibition de la sécrétion acide... (Borrelli et Izzo, 2000 in benarous, 2010).

Plusieurs bactéries et champignons lipolytiques sont impliqués dans les maladies infectieuses (tableau 9), les lipases jouent un rôle important pour certains d'eux comme *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp. (Jaeger *et al.*, 1994 in benarous, 2010), *Propionibacterium acnes* (Higaki, 2003) et *Helicobacter pylori* (Smoot, 1997 in benarous, 2010). Pendant la dernière décennie, les deux bactéries *Propionibacterium acnes* et *Helicobacter pylori* ont généré un grand intérêt grâce à ses implications sociales et cliniques (Ruiz, 2005 in benarous, 2010).

MATERIELS ET METHODES

1. Les molécules pures

1. 1. Les terpènes et les composés phénoliques

Nous avons utilisé les terpènes synthétisés de l'Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UR1264, MycSA, Bordeaux, France qui sont : sont α pinène, linalool et mycène et le composé phénolique hispidine isolé à partir *d'Inonotus hispidus* selon la méthode publié dans Benarous *et al.*, 2015 dont les structures 2D sont montrées dans la figure1.

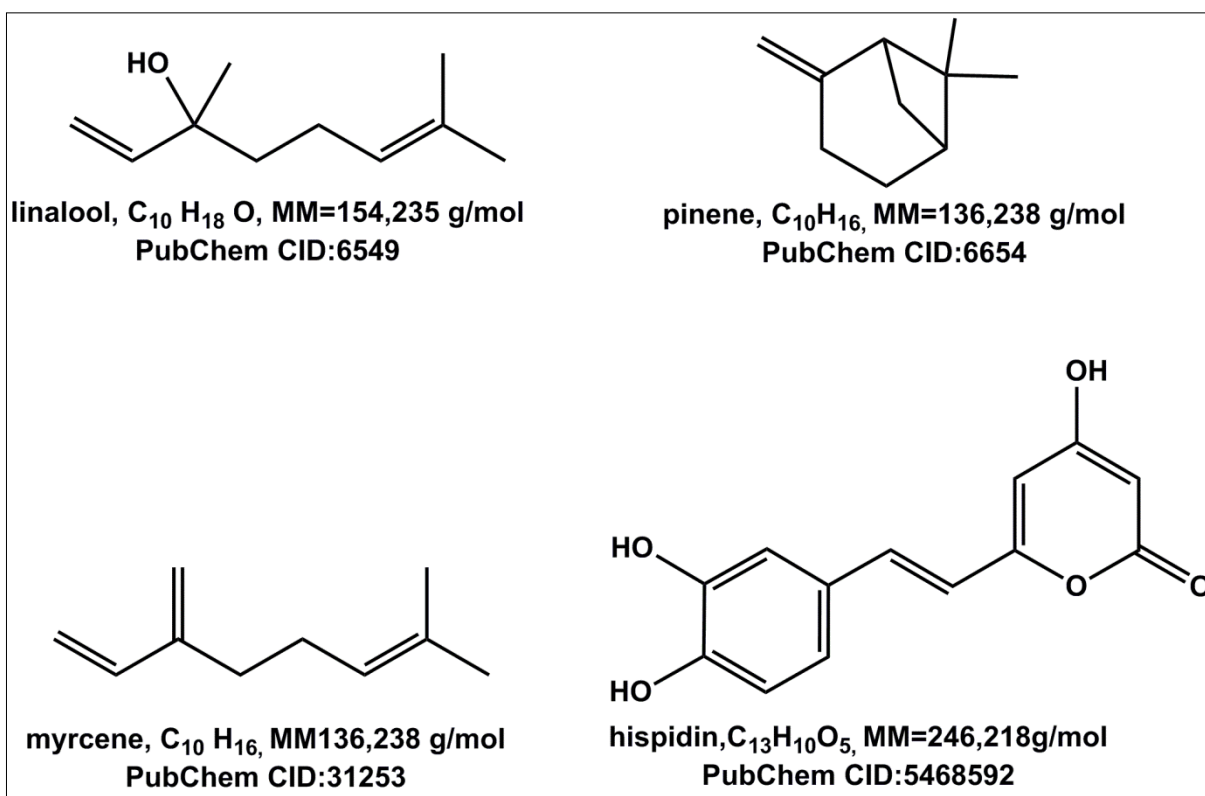


Figure 1. Représentation des structures des terpènes et le composé phénolique.

1. 2 Les alcaloïdes

Nous avons pris cinq alcaloïdes à partir de l'institut de recherche ICTAN- Madrid, Sigma Aldrich, ces alcaloïdes sont: harmine, harmol et harmalol et harmaline est isolée à partir de la plante médicinale *Peganum harmala*. Les structures 2D sont montrées dans la figure 2.

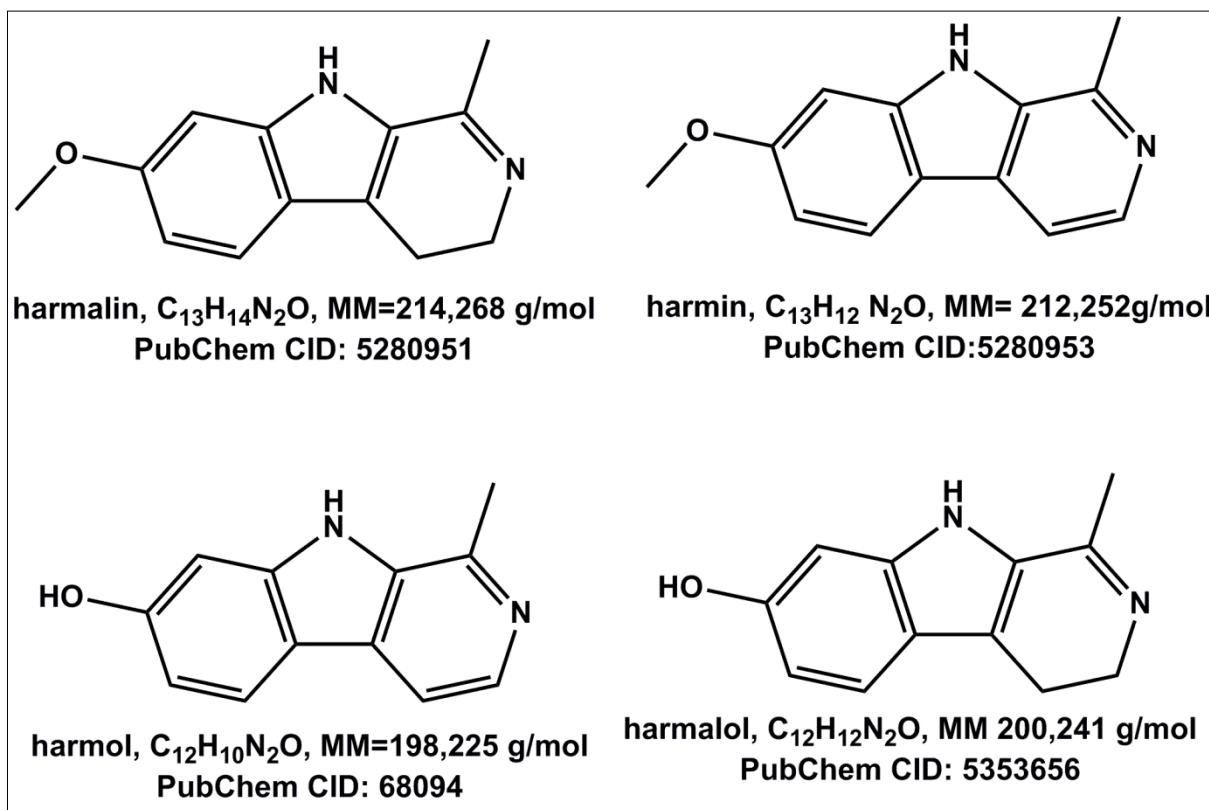


Figure 2. Représentation des structures des alcaloïdes

1. 3 Les acides organiques

Nous avons obtenu les six acides organiques du laboratoire de département de la biologie université Amar Telidji Laghouat, ces acides sont l'acide gallique, l'acide oxalique, l'acide salicylique, l'acide ascorbique, l'acide benzoïque et l'acide citrique. Les structures 2D sont montrées dans la figure3.

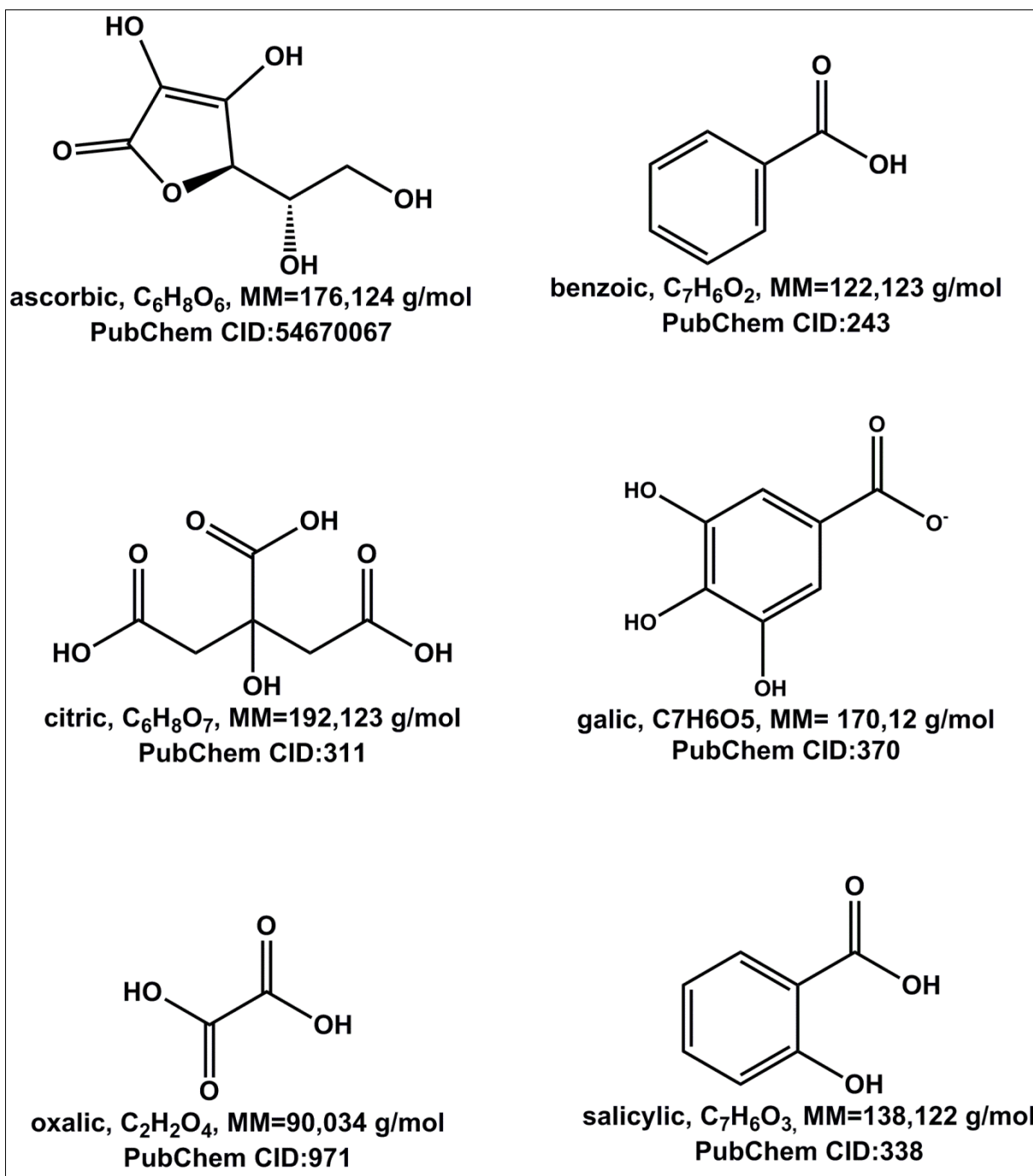


Figure 3. Représentation des structures des acides organiques.

2. Activité enzymatique de la lipase

2.1. Principe de l'activité enzymatique de la lipase

La technique physico-chimique utilisée pour étudier la cinétique de l'hydrolyse de l'ester par la lipase microbienne est la spectrophotométrie UV-Visible. Dans cette étude, nous nous intéressons à l'apparition du produit d'une coloration jaune (*p*-nitrophénol) en suivant l'évolution de sa densité optique. Le *p*-nitrophénol se produit de l'hydrolyse de *p*-nitrophényl-laurate en présence de la lipase microbienne selon l'équation de la réaction suivante :

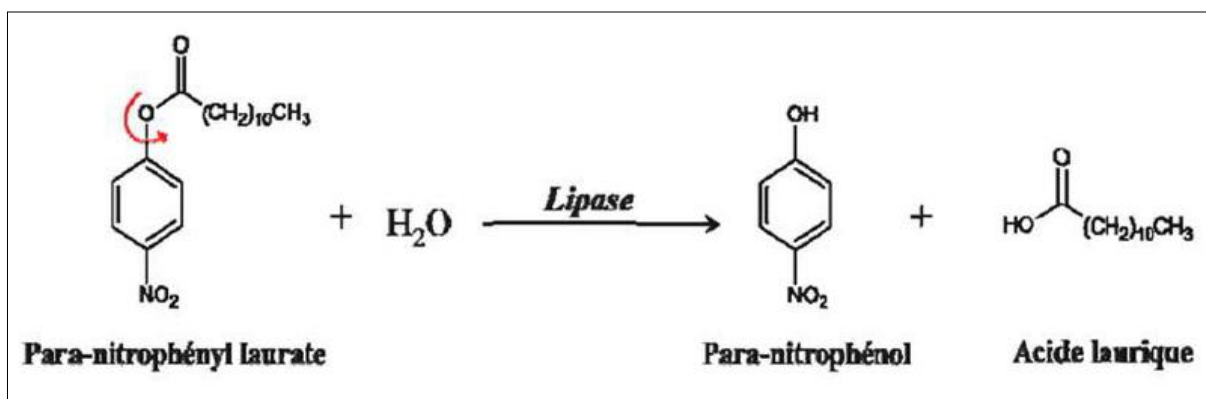


Figure 4. Le schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne (Benarous, 2010 et 2014)

3. Protocole expérimental

3.1. Courbe d'étalonnage réalisée avec le *p*-nitrophénol

À partir d'une solution préparée du solvant *p*-nitrophénol de concentration 1mM, des solutions diluées ont été préparées avec des concentrations croissantes. Nous avons introduit 20 μ L de l'enzyme solubilisée dans un tampon de pH égale à 7, avec 20 μ L de méthanol ; et 180 μ L du *p*-NP des différentes concentrations.

3.2. Étude de l'inhibition de l'activité de la lipase

Le milieu réactionnel contient 20 μ L de la solution des molécules diluées et 20 μ L de la LCR de 0,5 mg/ml a été pré-incubé dans une étuve à 37°C pendant 15 min, la réaction a été déclenchée par l'ajout de 180 μ L de p-NPL de concentrations différentes pendant 15 min.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaques Biotek ELX 800 UV à une longueur d'onde de 405 nm contre un blanc.

Les calculs des IC 50 se fait à partir de la représentation graphique $I\% = f(C)$ tel que $I\%$ est déterminée suivant cette relation :

$$I\% = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{molecule}}}{A_{\text{control}}} \right) \right) * 100$$

Avec : - $I\%$: le pourcentage d'inhibition.

- $A_{\text{molécule}}$: l'absorbance de l'activité lipolytique en présence de l'extrait chimique.

- A_{control} : l'absorbance de l'activité lipolytique en absence de l'extrait chimique.

Dans le but d'étudier l'effet de nos molécules sur la LCR et de déterminer le paramètre d'inhibition IC_{50} : la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50 % de l'activité enzymatique (IC_{50}) nous avons procédé à la méthode décrite par Benarous, 2010, Benarous et al., 2013 ; 2015) avec modification. Après avoir testé l'activité inhibitrice des molécules pures pour deux concentrations (1 mg/ml et 2 mg/ml). On s'est intéressé par les molécules pures qui ont donné une inhibition importante ($> 50\%$) et pour lesquels nous avons procédé à la détermination du paramètre IC_{50} .

Nous avons utilisé un lecteur de microplaque *Biotek* de 96 puits par laquelle nous avons profité l'avantage d'utilisation des micro-volumes.

L'activité inhibitrice de nos molécules a été confirmée par le test précédent, nous avons ensuite procédé à l'étude de l'activité de la lipase de *candida rugosa* en vue de déterminer le type d'inhibition et les constantes d'inhibition. À partir de la représentation graphique $1/V = f(I)$ tel que I est la concentration de molécules, nous avons déterminé la constante d'inhibition K_i . En plus, des représentations graphiques et pour comparer nos résultats, nous avons aussi calculé les constantes d'inhibition K_i en utilisant l'équation suivante (Cer et al, 2009).

$$k_i = \frac{IC_{50}}{\frac{Km}{S} + 1}$$

Pour cela, il faut varier la concentration en molécules et en substrat. À partir de la courbe de la cinétique enzymatique, nous avons pu choisir trois concentrations du substrat (0,1mM, 0,06mM, 0,08mM).

3.3. Analyse statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique Microsoft office Excel 2013. Toutes les expériences ont été faites en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n=3) pour chaque cas.

3.4. Docking moléculaire

Toutes les molécules proviennent de base de données *pubchem* , ils ont été assemblés avec *Discovery Studio visualizer* v4.0. La structure 3D de la lipase de *C. rugosa* (PDB ID : 1CRL) a été pris à partir de la base de données des protéines (PDB). Pour étudier le docking, initialement il faut préparer la protéine en éliminant toutes les molécules d'eau, hétéroatomes, n'importe quel ligands et solvant Co-cristallisé. Il est bien connu que les fichiers pdb sont dépourvus des atomes d'hydrogène. Par conséquent, les hydrogènes polaires et les charges partielles ont été ajoutés à la structure à l'aide de logiciel Autodock tools (ADT) (version 1.5.4). Le docking moléculaire était performé par le programme AutoDock Vina dans une station de 12 CPU [40]. Puisque logiciel utilise des boîtes rectangulaires pour le site de liaison, le centre de la boîte a été défini et la zone d'accueil est affichée à l'aide d'ADT.

Le docking était aveugle avec une grille de boîte de 68 * 68 * 68 avec points de grille séparés de 1 Å a été positionné au milieu de la protéine (x = 72,33 ; y = 55.391 ; z = 20.425). Les paramètres par défaut ont été utilisés, sauf que le nombre des conformations de sortie a été réglé à 40. Le nombre de tour de docking s'est fixé sur 50 tours. Le nombre des solutions obtenus est égal à 1000 conformations. Toutes ces solutions sont très bien traitées. Le « *random seed* » est aléatoire. Les conformations privilégiées étaient celles de plus faible énergie de liaison au sein du site actif. Enfin, les résultats de docking générés étaient directement chargés dans *Discovery Studio visualizer* , v 4.0.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. La courbe d'étalonnage de p-NP

La courbe d'étalonnage réalisée par le p-NP est montrée dans la figure 2.

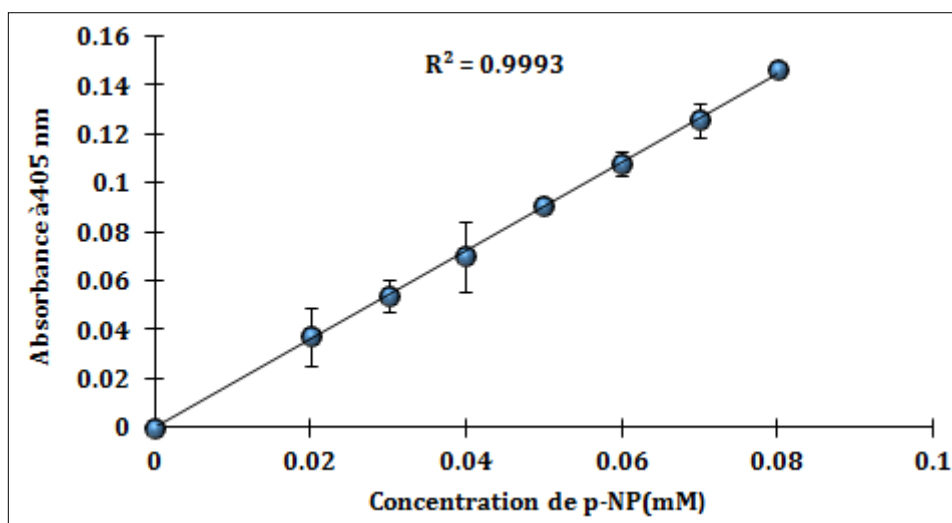


Figure 5. La courbe d'étalonnage réalisée par le p-nitrophénol

2. Paramètres cinétiques déterminés pour la lipase de *Candida rugosa*

À l'aide des mesures spectrophotométriques réalisées sur l'activité enzymatique de la lipase décrite par Benarous et al (2013), on aperçoit que cet enzyme présente une cinétique michaelienne.

Les paramètres cinétiques de l'enzyme (K_{cat} , K_m) sont déterminés selon l'hypothèse d'une cinétique Michaelienne à l'aide de l'équation en double inverse de Lineweaver Burk [$1/v=f(1/S)$]. D'après la représentation graphique de Lineweaver Burk, on peut alors déterminer la vitesse maximale V_{max} , la constante catalytique K_{cat} et la constante michaelienne K_m , et par conséquent on déduit l'efficacité de l'enzyme à partir du rapport K_{cat}/K_m . Le tableau suivant résume les valeurs obtenues de ces paramètres déterminés par Benarous, 2010 ; 2014.

Tableau 1. Les paramètres cinétiques de la lipase de *Candida rugosa* (Benarous, 2010 ; 2014).

Vmax (mM/min)	Km (mM)	Kcat (Min-1)	Kcat/Km (Min1.mM-1)
0,08±0,01	0,50±0,26	13400±0,03	26800±0,05

Sachant que : V_{max} : vitesse maximal ; K_m : la constante michaelienne ; K_{cat} : la constante catalytique ; K_{cat}/K_m : la spécificité de l'enzyme

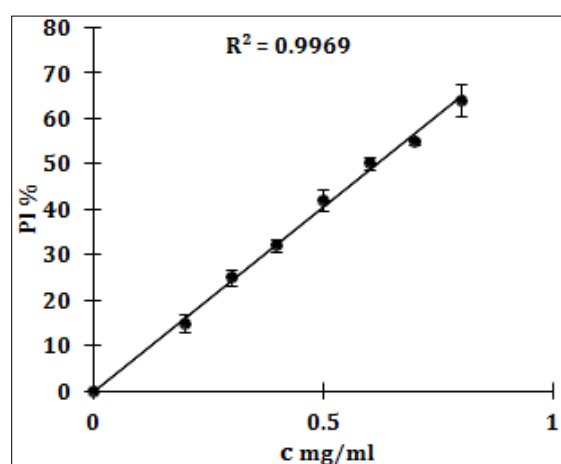
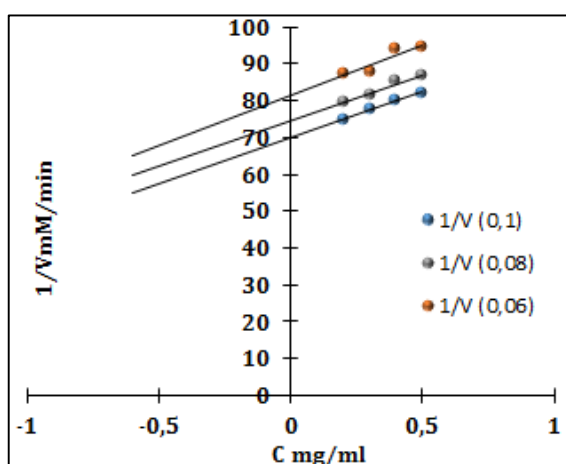
3. Inhibition de la réaction catalysée par la lipase

À partir de l'étude bibliographique sur la fonction physiologique de la lipase et le rôle de ses inhibiteurs dans le traitement de plusieurs maladies. Nous avons évalué le pouvoir inhibiteur de nos molécules sur l'activité de cette enzyme dans le but de trouver des inhibiteurs de cet enzyme.

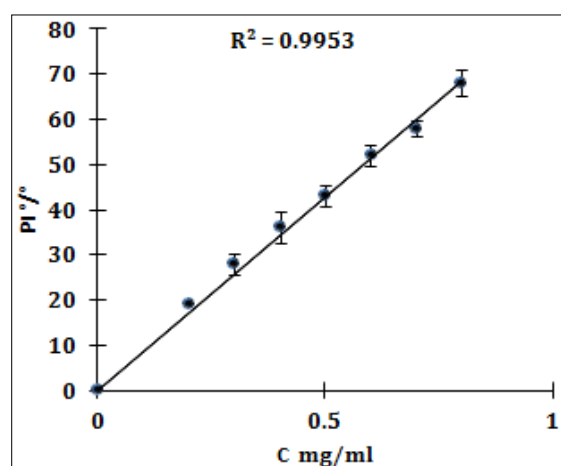
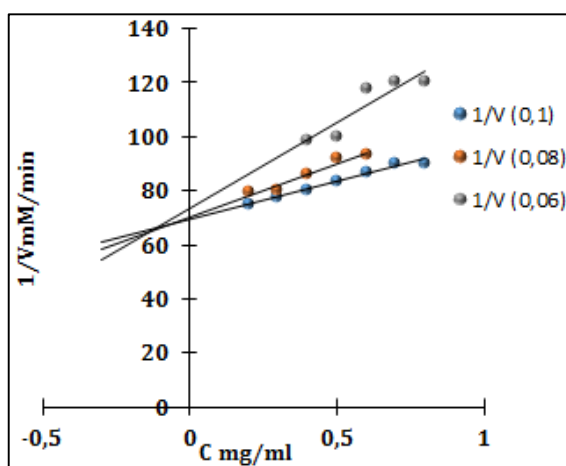
Les résultats obtenus montrent que les treize molécules présentent un pouvoir d'inhibition vis-à-vis de la lipase avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50% la concentration de substrat (0,1 mM).

Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I % en fonction des concentrations des molécules exprimées en mg/ml pour une seule concentration de substrat (0,1 mM), nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀) de chaque échantillon (les courbes sont présentés dans la figure 3). Ces représentations graphiques nous permettent de déterminer les valeurs des IC₅₀. Ainsi, nous avons calculé les K_i selon l'équation citée précédemment et à partir des représentations graphiques $1/V=f(I)$ (figure 3). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2.

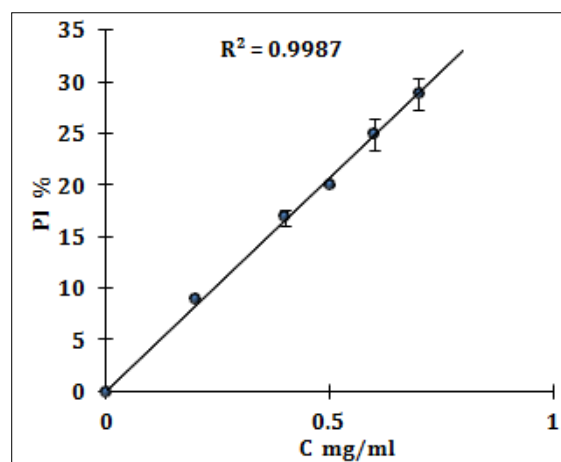
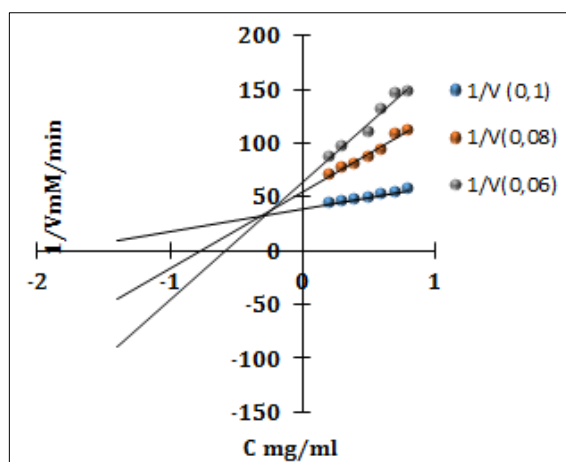
Alpha pinène



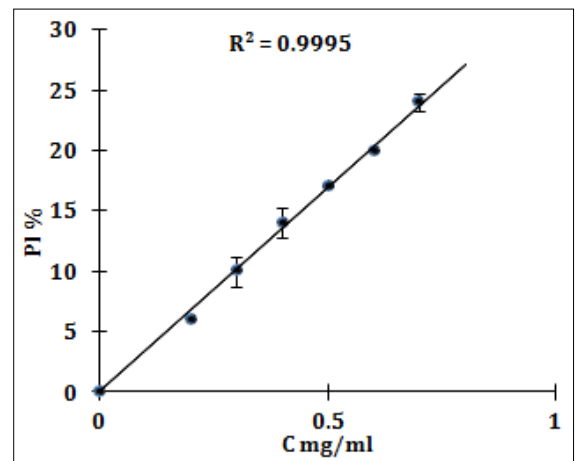
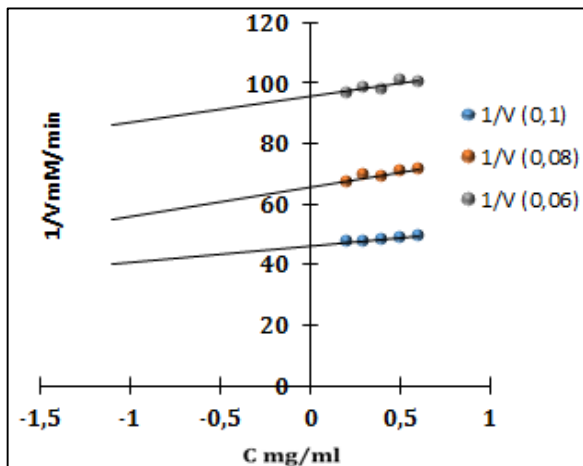
Linalool



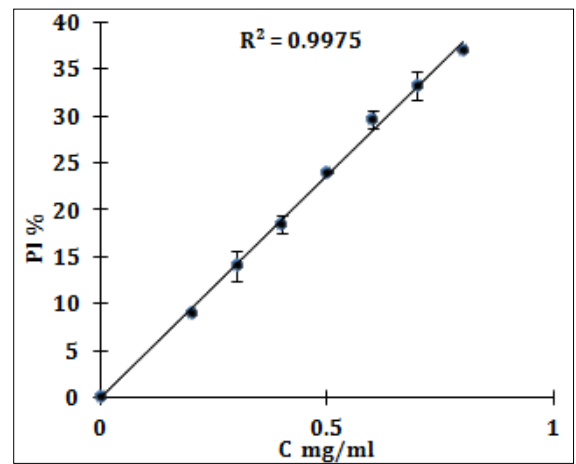
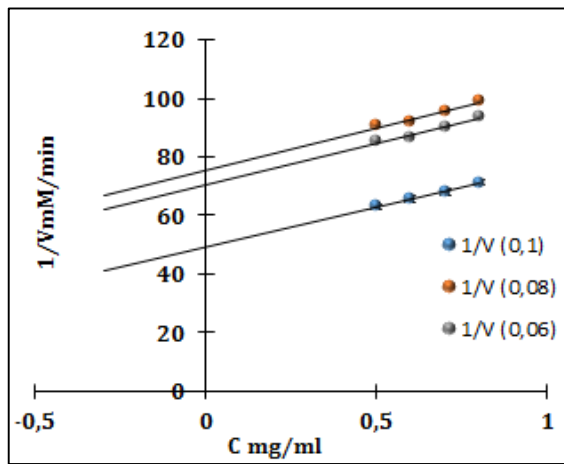
Hispidin



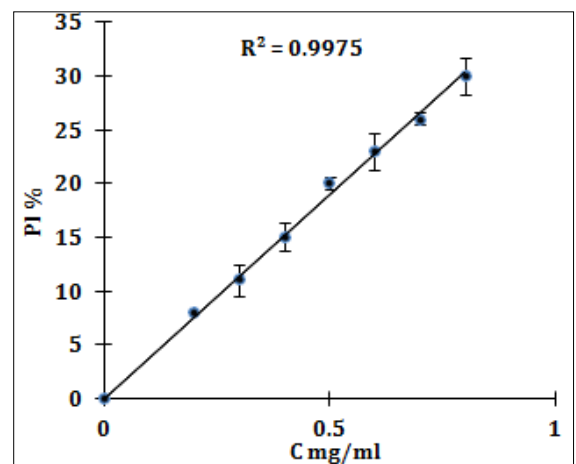
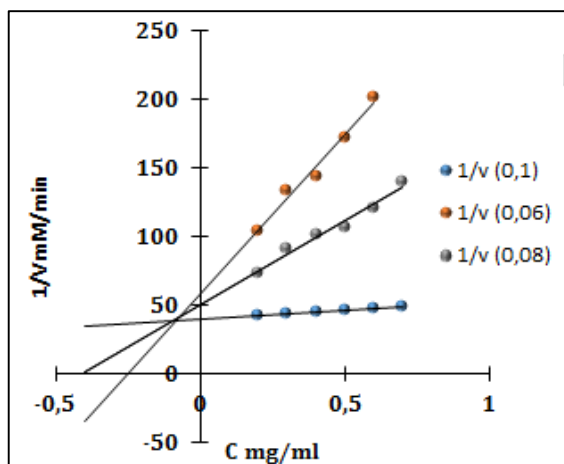
Harmaline



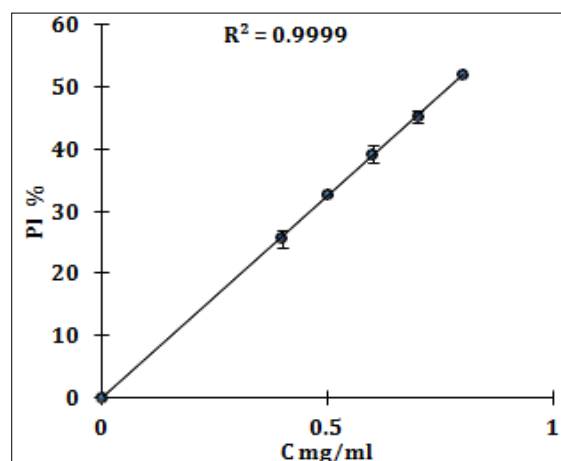
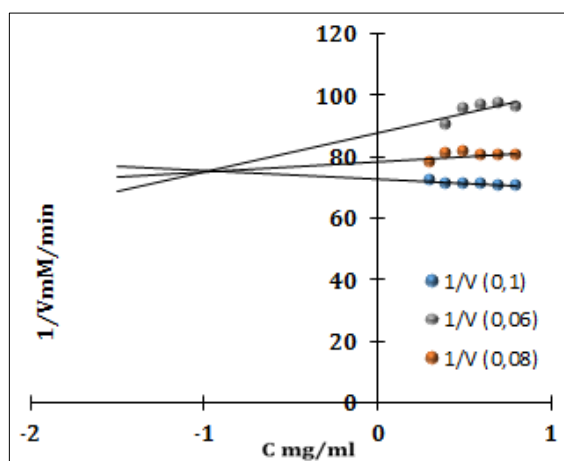
Harmine



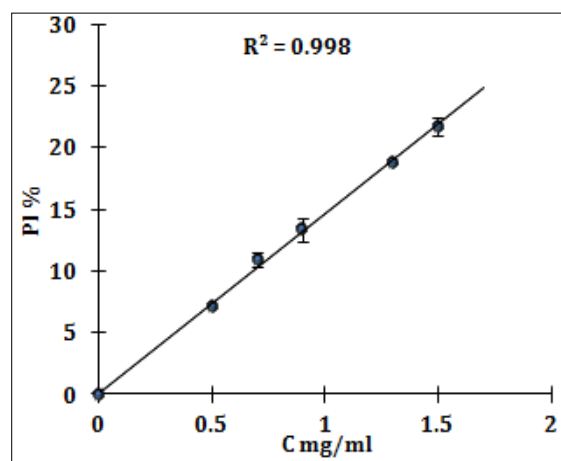
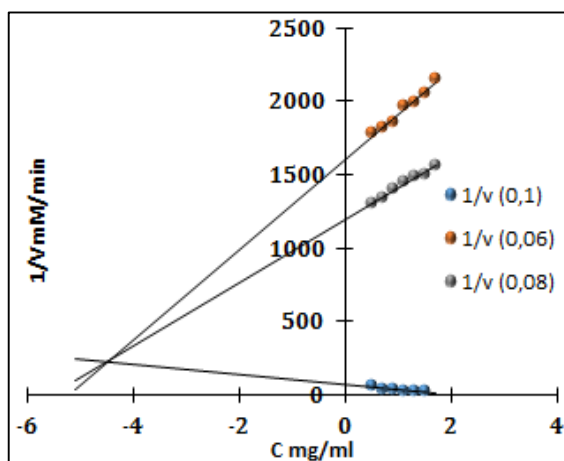
Harmalol



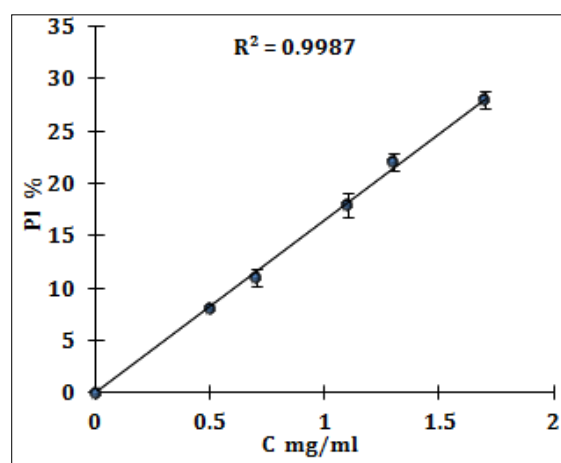
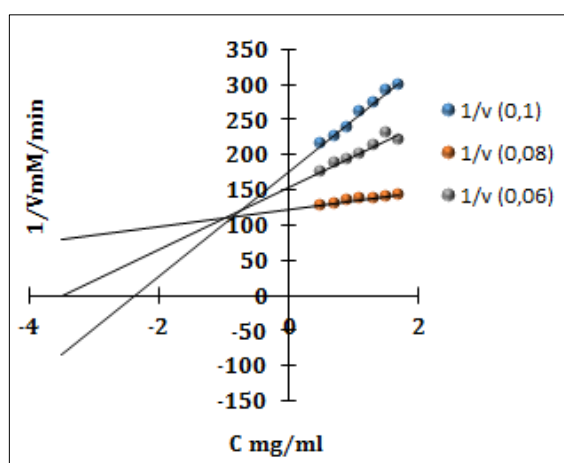
Harmol



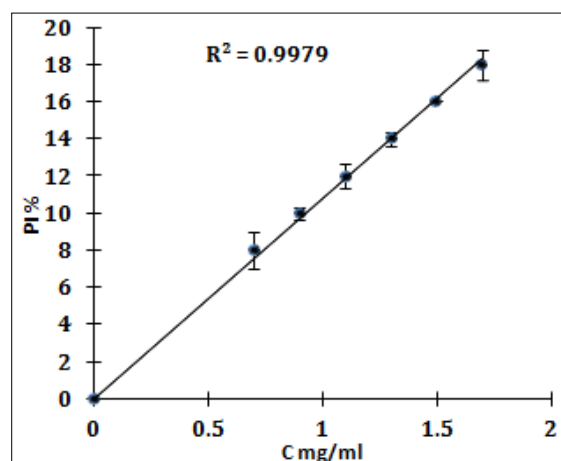
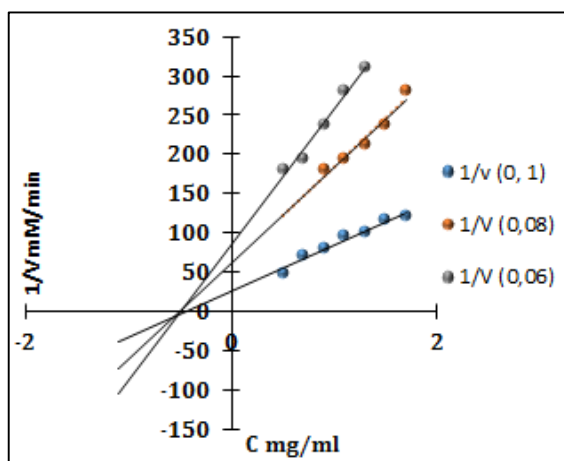
Acide ascorbique



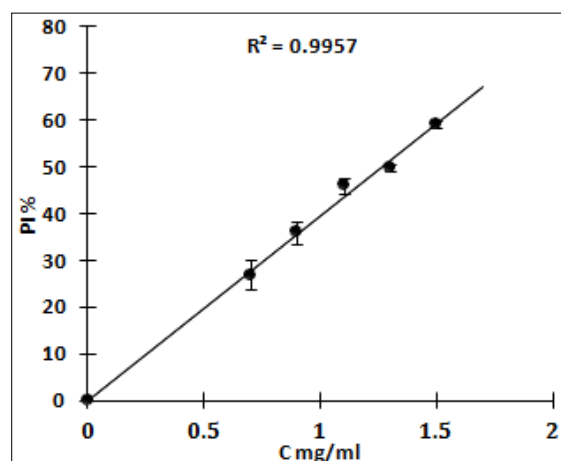
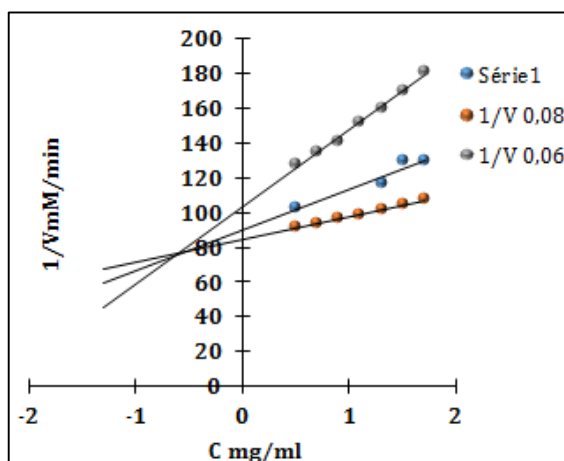
Acide benzoïque



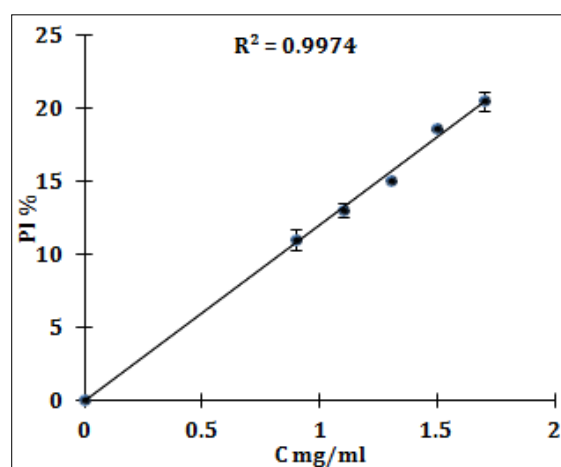
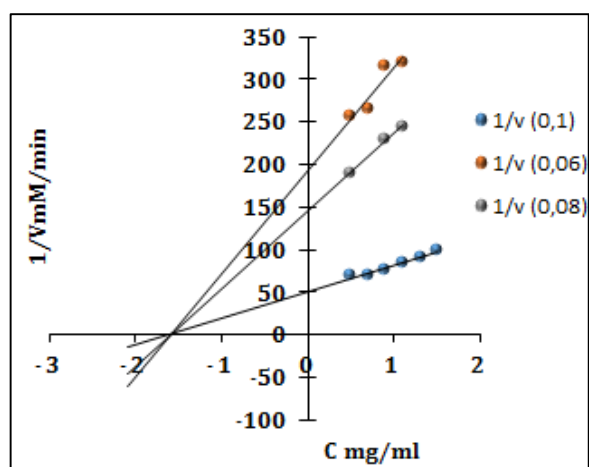
Acide citrique



Acide gallique



Acide oxalique



Acide salicylique

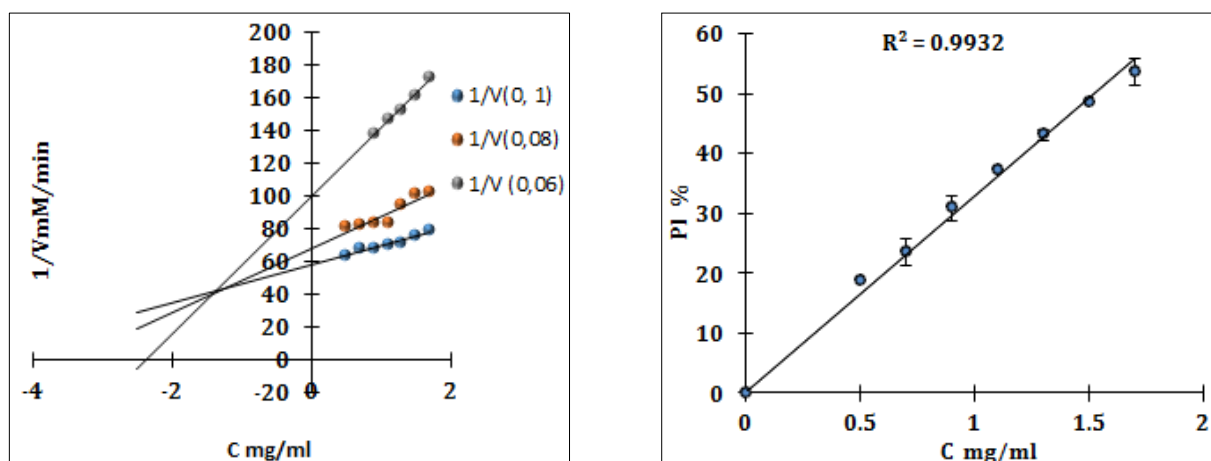


Figure 6. Représentation graphique de l'inhibition des molécules de la réaction
Catalysée par lipase de *Candida rugosa*

Tableau 2. Les valeurs d'IC₅₀, K_i et type inhibition des terpènes, les composés phénoliques, les alcaloïdes et les acides organiques.

Famille	Molécules pures	IC ₅₀ (mg/ml)	IC 50 (mM)	K _i (mg/ml)	Type d'inhibition
Terpènes	Alpha pinène	0,61±0.01	5±0.01	ND	Incompétitive
	Linalool	0,58±0.02	3,77±0.02	0,10	Compétitive
Composés phénoliques	Hispidine	1,21±0.007	4,91±0.00	0,22	Compétitive
Alcaloïdes	Harmaline	1,45±0.01	6,8±0.01	ND	incompétitive
	Harmine	1,05±0.00	4,96±0.00	ND	incompétitive
	Harmalol	1,31±0.01	6,6±0.01	0,99	compétitive
	Harmol	1,16±0.01	6,58±0.01	1	compétitive
Acides organiques	Acide ascorbique	3,41±0.06	19,38±0.06	4,4	Compétitive
	Acide benzoïque	3,03±0.01	24,81±0.01	0,8	compétitive
	Acide citrique	4,64±0.00	24,16±0.00	0,42	Non compétitive
	Acide gallique	1,26±0.06	7,41±0.06	0,6	Compétitive
	Acide oxalique	4,15±0.01	46,17±0.01	1,6	Non Compétitive
	Acide salicylique	1,51±0.01	10,99±0.01	1,4	Compétitive

Dans ce travail, nous avons testé pour la première fois l'inhibition de la lipase de *Candida rugosa* par des acides organiques qui sont l'acide ascorbique, l'acide benzoïque, l'acide citrique, l'acide gallique, l'acide oxalique et l'acide salicylique. Ainsi, aucune étude n'a été trouvée pour les terpènes que nous avons utilisés : linalool, alpha pinène et myrcène, un composé phénolique isolé à partir de l'espèce: *Inonotus hispidus* et des alcaloïdes de synthèse à savoir harmaline, hamine, harmalol et harmol.

D'une manière générale, ces molécules sont des inhibiteurs d'activité intermédiaires de la lipase de *Candida rugosa* par rapport aux autres molécules pures, les valeurs des IC₅₀ et K_i varient selon la nature et la structure chimique de chaque molécule, leur degré de complexité et les groupements fonctionnels qu'elles constituent.

Les résultats obtenus montrent que les terpènes ont un pouvoir inhibiteur important de l'activité enzymatique de la lipase à l'exception de myrcène. Alors que les alcaloïdes ont un pouvoir inhibiteur moins important que les terpènes par contre les acides possèdent la plus faible activité.

Le linalool est le plus puissant inhibiteur parmi les molécules étudiées dans ce travail (IC₅₀=0,441 mg/ml) tandis que le plus faible se présente dans l'acide citrique (IC₅₀=4,642 mg/ml), les autres valeurs varient dans cet intervalle, mais nous n'avons pas enregistré une activité inhibitrice sur la lipase de *Candida rugosa* pour le myrcène peut être à raison de sa structure linéaire.

Le plus puissant inhibiteur parmi les terpènes est le linalool et le plus puissant inhibiteur parmi les alcaloïdes est l'harmine tandis que l'acide gallique est le plus puissant parmi les acides étudiés.

Si nous comparons ces valeurs avec celle de l'orlistat (IC₅₀=0,068± 0,02 mg/ml), (Benarous *et al.*, 2015), qui est un médicament anti-obésité, nous pouvons dire que nos molécules sont huit fois moins efficaces que l'orlistat.

Beaucoup de recherches scientifiques ont été réalisées pour évaluer les effets anti-obésité, anti-acné et anti-candidose des extraits et des molécules isolées des plantes médicinales sur l'activité de la lipase, dans le but de trouver une nouvelle molécule naturelle traitant ces maladies sans effets secondaires. Dans cette étude, nous avons fait la même chose et nous voulons comparer nos molécules pures par ces molécules isolées des extraits naturels par ces travaux antérieurs qui sont regroupés dans le tableau 6.

Par comparaison du Thymol pur (IC₅₀=10,6 ± 0,1 mg/ml) et l'huile essentielle (HE) de *O. syriacum* isolé à partir de la plante *Origaum syriacum* (IC₅₀=1,1 ± 0,2mg/ml) (Afifi *et al.*, 2017) et le kaempferol : IC₅₀=2.1800±0.00 mg/ml (Ruiz *et al.* 2006) avec nos terpènes qui

sont linalool et alpha pinène avec une valeur de $IC_{50}=0,581$ mg/mL, $IC_{50}=0,681$ mg/mL respectivement, nous pouvons dire que nos terpènes sont plus efficaces et présentent des effets inhibiteurs meilleurs que le thymol et le HE d'*O. syriacum* et le kaempferol.

Mais si nous comparons les trois composés terpéniques alismol ($IC_{50}=0,014$ mg/ml) alisol F avec ($IC_{50}=0,088$ mg/ml) et ligucyperonol ($IC_{50}=0,025$ mg/ml) qui ont été isolés à partir de l'espèce *Alisma orientalis* (Cang *et al.* 2017) par nos terpènes, nous pouvons dire que ces composés terpéniques sont plus efficaces et présentent des effets inhibiteurs meilleurs que le linalool et alpha pinène.

Les alcaloïdes déjà connus comme des inhibiteurs de la lipase parmi eux Stephalagine qui a été isolé à partir de la plante *Annona crassiflora* ($IC_{50}= 0,00835$ mg/ml) (Pereira *et al.*, 2017) et Bis-indole qui a été isolé à partir *Tabernaemontana divaricata* avec une valeur de ($IC_{50}= 0,01273$ mg/ml) (Sridhar *et al.*, 2017) aussi que le koenigicine ($IC_{50} = 0,138$ mg/ml) et koenimbin ($IC_{50} = 0,049$ mg/ml) qui ont été isolés à partir *Murraya koenigii* (Birari *et al.*, 2009).

Si nous comparons ces valeurs des IC_{50} des alcaloïdes précédents avec celle de nos alcaloïdes, nous observons que nos alcaloïdes présente une inhibition moins importante avec une valeur d' IC_{50} varient dans cet intervalle [1,053-1,457] mg/ml.

Par contre tous nos alcaloïdes présentent une inhibition plus importante à celle que trigonelline, ($IC_{50} = 2,74$ mg/ml), (les valeurs d' IC_{50} ont été déterminées pour la lipase de *Candida rugosa* et le p-nitrophényllaurate comme substrat) (Ruiz *et al.*, 2006).

Plusieurs molécules isolées mais à partir des autres sources que les plantes et ont présenté leur pouvoir inhibiteur de la lipase à savoir : (+)-ganodilactone, (-)-ganodilactone, ($\pm$)-ganodilactone qui sont des meroterpenoides isolés à partir la macromycète *Ganoderma leucocontextum* et présentent des valeurs d' IC_{50} respectivement, $IC_{50} = 0,004$ mM, $IC_{50} = 0,0025$ mM et $IC_{50} = 0,0273$ mM (Chen *et al.* 2016) et methyl 22-bromo-(17E,21E)-docosa-17,21-diene-9,11,19 triynoate isolés à partir des éponges marine *Xestospongia testudinaria* $IC_{50} = 0,0007$ mM (Yang *et al.* 2017) sont des molécules présentent une inhibition plus importante par comparaison à toutes nos molécules.

Aucun travail récent n'est trouvé sur l'inhibition de la lipase pancréatique humaine ou la lipase de *Candida rugosa* par les acides, donc ce travail mettre en évidence pour la première fois *in vitro* et *in silico* l'inhibition par les acides organiques.

Les résultats obtenus montrent que l'acide gallique ($IC_{50} = 1,262 \text{ mg/ml}$) est le meilleur inhibiteur par comparaison des autres acides par contre l'acide citrique ($IC_{50} = 4,642 \text{ mg/ml}$) est le plus faible inhibiteur parmi les acides spécialement et toutes les molécules étudiées généralement.

Par comparaison générale, des valeurs d' IC_{50} des molécules qui sont décrits dans le tableau 6 et les valeurs d' IC_{50} de nos acides qui varient dans cet intervalle $[1,262-4,642 \text{ mg/ml}]$ (Tableau 4), nous observons que la plupart des molécules décrits dans le tableau 6 sont plus efficaces que nos acides à l'exception des deux terpènes Thymol ($IC_{50} = 10,6 \text{ mg/ml}$), qui est moins efficace et présentent des effets inhibiteurs faibles à celle que tous nos acides et le Kaempferol ($IC_{50} = 2,18 \text{ mg/ml}$), et l'alcaloïde trigonelline ($IC_{50} = 2,74 \text{ mg/ml}$) qui sont moins efficaces et présentent des effets inhibiteurs faibles à celle que l'acide gallique et l'acide salicylique.

Le type d'inhibition et les constantes d'inhibition K_i ont été déterminés à partir de la représentation graphique $1/V = f(I)$ "Représentation de Dixon " tel que I est la concentration de molécules. Sachant que les constantes d'inhibition K_i sont calculées à partir de ce graphe, par la projection du point d'intersection des droites sur l'axe des abscisses. Tandis que le type est déduit à partir du point de rencontre de ces tracés. Et ensuite confirmé par la représentation graphique $1/V = f(1/S)$ "Représentation de Lineweaver Burk"(mentionnée dans l'annexe).

Ces résultats montrent que parmi les treize molécules étudiées, il y a huit molécules qui ont un pouvoir inhibiteur pour la lipase de *Candida rugosa* de type compétitif telles que linalool, hispidine, harmalol, harmol, acide ascorbique, acide benzoïque, acide gallique, et l'acide salicylique et trois molécules de type incompétitif telles que alpha pinène et harmine et harmaline et deux molécules de type non compétitif qui est l'acide citrique et oxalique comme il est mentionné dans le tableau 3.

Tableau 3. Valeurs d'IC50 pour quelques molécules selon la littérature.

Molécule	Plante		IC50 (mg/ml-mM*)	Référence
	famille	Espèce		
O. syriacum (HE)	Lamiaceae	<i>Origaum syriacum</i>	1,1	Afifi <i>et al.</i> , 2017
Thymol (terpène)	Lamiaceae	<i>Origaum syriacum</i>	10,6	Afifi <i>et al.</i> , 2017
Alismol (terpène)	Alismataceae	<i>Alisma orientalis</i>	0,014	Cang <i>et al.</i> 2017
alisol F (terpène)	Alismataceae	<i>Alisma orientalis</i>	0,088	Cang <i>et al.</i> 2017
Ligucyperonol (terpène)	Alismataceae	<i>Alisma orientalis</i>	0,025	Cang <i>et al.</i> 2017
Stephalagine (alcaloïde)	Annonaceae	<i>Annona crassiflora</i>	0,0083	Pereira <i>et al.</i> , 2017
Bis-indole (alcaloïde)	/	<i>Tabernaemontana divaricata</i>	0,0127	Sridhar <i>et al.</i> ,2017
Koenimbin (alcaloïde)	Rutaceae	<i>Murraya koenigii</i>	0,138	Birari <i>et al.</i> 2009
Koenigicine(alcaloïde)	Rutaceae	<i>Murraya koenigii</i>	0,049	Birari <i>et al.</i> 2009
Kaempferol (terpène)	/	/	2,18	Ruiz <i>et al.</i> 2006
trigonelline (alcaloïde)	/	/	2,74	Ruiz <i>et al.</i> , 2006
Theaflavin-3,3_-digallate (coumarine)	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	0,0019*	Glisan <i>et al.</i> 2017
theaflavin-3_-gallate (coumarine)	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	0,0042*	Glisan <i>et al.</i> 2017
theaflavin-3-gallate (coumarine)	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	0,003*	Glisan <i>et al.</i> 2017
Theaflavin (coumarine)	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	>0,01*	Glisan <i>et al.</i> 2017
b-Mangostin(Xanthone)	Guttiferaceae	<i>Garcinia mangostana</i>	0,0275*	Chae <i>et al.</i> 2016
1-Isomangosti(Xanthone)	Guttiferaceae	<i>Garcinia mangostana</i>	0,0345*	Chae <i>et al.</i> 2016
Garcinone D(Xanthone)	Guttiferaceae	<i>Garcinia mangostana</i>	0,0225*	Chae <i>et al.</i> 2016
Smeathxanthone A(Xanthone)	Guttiferaceae	<i>Garcinia mangostana</i>	0,0195*	Chae <i>et al.</i> 2016
silphioside (triterpenoides)	Araliaceae	<i>Acanthopanax senticosus</i>	0,22	Li Fang, 2007
copterosideB (triterpenoides)	Araliaceae	<i>Acanthopanax senticosus</i>	0,25	Li Fang, 2007
hederagenin3-O-b-D glucuronopyranoside6-O-methyl ester (triterpenoides)	Araliaceae	<i>Acanthopanax senticosus</i>	0,26	Li Fang, 2007
gypsogenin3-O-bDglucuronopyranoside-(triterpenoides)	Araliaceae	<i>Acanthopanax senticosus</i>	0,29	Li Fang, 2007
Autres inhibiteurs				
(+)-ganodilactone	<i>Ganoderma leucocontextum</i> (micromycète)		0,004*	Chen <i>et al.</i> 2016
(-)-ganodilactone	<i>Ganoderma leucocontextum</i> (micromycète)		0,0025*	Chen <i>et al.</i> 2016
(±)-ganodilactone	<i>Ganoderma leucocontextum</i> (micromycète)		0,0273*	Chen <i>et al.</i> 2016
methyl 22-bromo-(17E,21E)-docosa-17,21-diene-9,11,19-triynoate	<i>Xestospongia testudinaria</i> (marine sponge)		0,0007*	Yang <i>et al.</i> 2017
Orlistat	Médicament synthétique d'anti-obésité		0,068	Benarous <i>et al.</i> 2015

Dans le but de confirmer le type d'inhibition de chaque molécule et d'étudier les interactions chimiques dans le complexe inhibiteur –enzyme, nous avons procédé au Docking moléculaire. La modélisation moléculaire est un ensemble de techniques pour modéliser ou simuler le comportement de molécule. Elle est utilisée pour recombinaison la structure tridimensionnelle de molécules en particulier en biologie structurale.

Méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable.

Il est fréquemment utilisé sur l'étude de la cible moléculaire des médicaments et réduire les essais expérimentaux.

Basée sur la complémentarité des surfaces basée sur le calcul de l'énergie de complexe

Les distances interatomiques entre les acides aminés de l'enzyme et l'inhibiteur sont affichées dans les images obtenues par le logiciel LigPlot qui mesure les distances entre les acides aminés de l'enzyme qui interagissent avec le ligand, ce logiciel n'affiche que les interactions hydrogène alors que Discovery Studio montre celles hydrophobes.

D'après le Docking moléculaire, nous pouvons dire qu'un inhibiteur est compétitif seulement s'il interagit directement avec deux acides aminés catalytiques du site actif, incompétitif s'il interagit avec un ou deux acides aminés catalytiques du site actif mais l'interaction est avec des liaisons non covalentes (hydrogènes et hydrophobes), alors que pour le non compétitif, s'il interagit avec un seul acide aminé catalytique du site actif et un seul type d'interaction (soit hydrogène ou hydrophobe), ce qui nous avons confirmé à travers cette analyse.

À partir de 1000 résultats obtenus de 50 tours, nous avons sélectionnés les meilleures solutions en se basant selon leurs répétitions et leurs énergies. Nous avons trouvé que 8 molécules présentent une inhibition compétitive sur la lipase de *Candida rugosa* parce qu'ils interagissent directement avec les deux acides aminés SER 209 et HIS 449 de la triade catalytique dont le type d'interaction se présente par des liaisons hydrogènes, et 3 molécules présentent une inhibition incompétitive sur la lipase de *Candida rugosa* parce qu'ils interagissent soit avec un seul ou les deux acides aminés SER 209 et HIS 449 de la triade catalytique mais le type d'interaction est avec des liaisons non covalentes. Ainsi, 2 molécules dont le type de d'inhibition est non compétitif car ils interagissent avec un seul acide aminé catalytique du site actif que ce soit le type d'interaction.

Afin d'assurer la fiabilité de notre travail, il faut trouver le même type d'inhibition à partir des résultats de l'étude *in vitro* et les résultats de l'étude *in silico*, pour cette raison on doit discuter les résultats de chaque inhibiteur tout seul et les interpréter commençant par les terpènes et le composé phénolique passant par les alcaloïdes et par la suite les acides organiques.

Tout d'abord le terpène alpha pinène montre qu'il présente un pouvoir inhibiteur pour la lipase de *Candida rugosa* de type incompétitif, ce que nous avons trouvé à partir l'étude *in vitro*. L'étude *in silico* aussi donne le même résultat où seulement l'HIS 449, l'acide aminé de site actif catalytique interagit avec l'alpha pinène 151 fois avec quelques types d'interactions, les interactions les plus répétées sont Pi-alkyl se répète 79 fois (52,31%), l'interaction Alkyl se répète 45 fois (29,80 %) avec HIS 449 et Van Der Waals se répète 27 fois (17,88%). Ainsi avec l'HIS 449, les autres acides aminés de site actif tels que GLU 341 et SER 209 n'ont prouvés aucune interaction avec l'alpha pinène. Mais toutes les interactions enregistrées sont de nature non covalentes ce qui prouve le type d'inhibition incompétitif.

Il y a d'autres interactions de type Pi-alkyl existent entre l'alpha pinène et d'autres acides aminés hors le site actif tels que PHE 296, PHE344 et PHE 345. Les interactions sont figurées dans la figure 20.

Aucune distance n'est enregistrée dans l'image de LigPlot entre l'alpha pinène et les acides aminés de la lipase de *Candida rugosa*, car ce logiciel mesure que les distances des interactions hydrogènes, mais dès que l'alpha pinène a un pouvoir d'inhibition incompétitif, tous les interactions marquées qui sont Vander Waals, pi-alkyl et alkyl-alky sont hydrophobes (figure 7).

L'alpha pinène possède une structure bicyclique complexe, ces deux cycles lui permet d'interagir pour former les interactions de type alkyl et pi-alkyl et ces atomes de carbones C2, C4, C5, C6, C7, C8, C9 et C10 et les atomes d'hydrogènes libres pour former des interactions de Vander Waals.

L'étude *in vitro* montre que le linalool présente un pouvoir inhibiteur pour la lipase de *Candida rugosa* de type compétitif, le même résultat est montré par l'étude *in silico* où le HIS 449 et SER 209 qui sont deux acides aminés de site catalytique interagissent avec le linalool 169 fois avec 3 types d'interactions différents, nous avons choisis ces 3 interactions les plus répétées telle que : l'interaction Pi-alkyl se répète 104 fois (61,53%), l'interaction Carbone hydrogène se répète 32 fois(18,93 %) avec HIS 449 et l'interaction hydrogène se

répète 15 fois (8,87%) avec SER 209 ainsi que le troisième acide aminé de site actif GLU 341 n'a prouvé aucune interaction avec le linalool, même si qu'on a marqué autres interactions de type alkyl et Pi-alkyl qui existent entre linalool et autres acides aminés que les acides aminés de site actif tel que PHE 296, LEU 297 et PHE 344. Les interactions sont figurées dans la figure 21.

La distance entre l'hydrogène de groupement hydroxyle OH de linalool et l'oxygène de radical OH de SER 209 est 3,07 Å d'après l'image de LigPlot, ce qui confirme la bonne insertion de linalool dans le site actif de la Lipase de *Candida rugosa* (figure 8).

Ces types d'interactions résultent de la structure chimique de linalool et les groupements fonctionnels que les constituent. D'une part, son groupement hydroxyle OH interagit avec les acides aminés de site actif pour former des interactions de type Carbone hydrogène et des interactions hydrogènes et d'autre part les atomes hydrogènes libres de carbone 9 et 10 du squelette carbonée de linalool interagissent pour former des interactions alkyl et Pi-alkyl avec HIS449 ou bien n'importe quel acide aminé de la poche catalytique de l'enzyme qui possède un cycle aromatique.

Le composé phénolique l'hispidine aussi montre un type d'inhibition compétitif pour la lipase de *Candida rugosa* à partir des résultats obtenus de représentation graphique $1/V = f(I)$ "Représentation de Dixon" tel que I est la concentration des molécules. Si nous comparons ce résultat avec celui de Docking où il montre que cet inhibiteur interagit 105 fois avec HIS 449 et SER 209 divisées sur plusieurs types d'interaction parmi eux : Pi-pi shaped à 31 fois (29,52%) avec HIS 449, Vander waals à 21 fois (20%) avec HIS 449 et une interaction de type hydrogène 26 fois (24,76%) avec SER 209. Nous pouvons dire que le type d'inhibition compétitif d'après l'étude *in vitro* et *in silico* parce que dans cette inhibition il y a l'intervention de deux acides aminés de site actif ce qui demande le type d'inhibition compétitif.

Pas seulement l'HIS 449 et le SER 209 qui forment des liaisons avec l'inhibiteur hispidine, mais il y a autres acides aminés comme GLY 128, GLY129, GLY123 et GLY 124 avec des interactions Carbone hydrogène, hydrogène, Pi-sigma et vander waals, respectivement. Les interactions sont figurées dans la figure 22.

Concernant les distances interatomiques, elle présente une valeur de 2,97 Å entre l'hydrogène de groupement hydroxyle numéro 3 de l'hispidine et l'atome d'azote hétérocyclique du HIS449. Une mesure est enregistrée de 3,11 Å entre l'hydrogène de groupement hydroxyle

numéro 2 de l'hispidine et l'atome d'oxygène de SER 209. Ainsi, il y a d'autres distances mesurées dans l'image du logiciel LigPlot (figure 9) dans cette position telles que : 3,11 Å entre le l'hydrogène de groupement NH₂ de GLY 129 et l'oxygène de la fonction cétone de l'hispidine et 2,76 Å entre l'oxygène de groupement hydroxyle OH de SER 450 et l'hydrogène de groupement hydroxyle numéro 3 del'hispidine.

Toutes ces distances importantes et les interactions et ces répétitions montrent la très bonne insertion de l'inhibiteur hispidine dans le site actif de l'enzyme de la lipase de *Candida rugosa* LCR, donc l'inhibition est de type compétitif.

L'hispidine possède une structure chimique complexe et des groupements fonctionnels variés qui sont les trois groupements hydroxyles OH, l'hétéroatome l'oxygène et la fonction cétone ce qui facilite la formation des interactions de type Vander waals, hydrogènes, et ses deux cycles pour former l'interaction de type Pi-pi shaped avec les acides aminés du site actif de l'enzyme lipase de *Candida rugosa*.

Passant aux alcaloïdes où les résultats obtenus de l'étude *in vitro* montrent que le Harmaline et Harmine ont un pouvoir d'inhibition de type incompétitif et le harmalol et harmol ont un pouvoir d'inhibition de type compétitif.

L'Harmaline : par comparaison de ses résultats *in vitro* avec les résultats de Docking moléculaire où nous avons trouvé que cet inhibiteur interagit 50 fois distribuées sur quatre types d'interaction parmi eux, Vander waals 12 fois (20%) avec HIS 449, la même interaction avec SER 209 répétée 10 fois (22 %) et une interaction de type hydrogène répétée 11 fois (22%), nous pouvons dire que le type d'inhibition est incompétitif d'après l'étude *in vitro* et *in silico* parce que malgré l'intervention des deux acides aminés du site actif SER 209 et HIS 449 mais la plupart de ces interactions sont de type Vander waals ce qui prouve le type d'inhibition incompétitif.

L'harmaline n'interagit pas seulement avec les acides aminés de site actif de l'enzyme mais aussi avec d'autres tel que GLU 208 et GLY 124 qui forment des liaisons de type Vander Waals et hydrogène, respectivement avec cet inhibiteur. Les interactions sont figurées dans la figure 23.

Dès que l'harmaline a un type d'inhibition incompétitif donc la plupart des interactions entre l'harmaline et les acides aminés de LCR sont non hydrogènes, pour cette raison, il y a une seule distance mesurée par le logiciel Lig Plot entre l'hydrogène de groupement hydroxyle

numéro 1 du harmaline et l'atome d'azote de l'acide aminé GLY 124, cette distance est de 3,09Å (Figure 10).

L'harmaline possède une structure chimique complexe et des groupements fonctionnels variés qui sont les deux hétérocycles, le cycle aromatiques et un groupement COOH, ce qui facilite son interaction avec les différents groupements des acides aminés de site actif et les autres acides aminés de l'enzyme pour former les différentes interactions.

L'harmine aussi possède un type d'inhibition incompétitif pour la lipase de *Candida rugosa*, nous avons trouvé ce résultat à partir l'étude *in vitro*, si nous comparons ces résultats avec les résultats de traitement de Docking moléculaire qui se présente comme suit : l'harmine interagit 139 fois distribuées sur six types d'interaction, les plus répétées sont Pi-pi shaped 38 fois (27,3%) avec HIS 449, Vander waals 27 fois (19,4%) aussi avec HIS 449 et Une interaction de type Carbone hydrogène répété 9 fois (6,47%) avec SER 209, nous pouvons dire que le type d'inhibition est incompétitif d'après l'étude *in vitro* et *in silico* parce que malgré l'intervention des deux acides aminés de site actif Ser 209 et His 449 mais l'acide aminé HIS449 qui enregistre le nombre le plus grand des répétitions, interagit de façon non covalente ce qui prouve le type d'inhibition incompétitif.

L'harmine n'interagit pas seulement avec les acides aminés de site actif de l'enzyme mais aussi avec d'autres tels que GLY 123, THR 132 où forment des liaisons de type hydrogène et avec Ile 453 par une liaison de type Pi-sigma et 2 liaisons de type Pi-alkyle aussi avec Val 454 par une liaison de type Alkyle et avec l'acide aminé PHE 133 par une liaison de type Pi-pi shaped. Les interactions sont figurées dans la figure 24.

Aucune distance n'est enregistrée dans cette position d'après l'image de LigPlot parce que la plupart des liaisons formées entre l'harmine et les acides aminés de LCR sont de nature hydrophobe et non covalente et ce logiciel ne mesure que les distances des interactions de type hydrogène, cela n'affirme qu'il n'y a pas des interactions de type hydrogène (Figure 11).

L'harmalol interagit avec deux acides aminés de site actif, HIS 449 et SER 209 avec un total de 60 fois et forme des interactions de type Pi-pi shaped 13 fois (21,66%) et Carbone hydrogène bond 9 fois (15%) avec HIS 449 et avec SER 209 par interaction hydrogène 35 fois (58,33%) et les autres interactions sont minoritaires. Ce qui confirme son type d'inhibition compétitif qui a été déjà confirmé par l'étude *in vitro*, mais pas seulement le HIS 449 et SER 209 mais il y a des acides aminés hors le site actif qui interagissent avec le

harmalol à cause de sa structure et ces groupements fonctionnels comme le GLU 208 par interaction de type « attractive charge » et SER 450 par une interaction de type hydrogène et le PHE 344 avec une interaction Pi-Pi Stacked comme il est illustré dans la figure 25.

Deux distances sont enregistrées entre l'harmalol et les acides aminés de la lipase de *Candida rugosa* dans l'image obtenue par le logiciel LigPlot. L'un des deux est 2,93 Å entre l'hydrogène du radical OH de SER 209 et l'atome d'azote N1 hétérocyclique de harmalol, l'autre est 3,16Å entre l'hydrogène de groupement OH et l'atome d'hydrogène de groupement fonctionnel NH hétérocyclique de harmalol (figure 12), c'est-à-dire le harmalol est très bien inséré dans le site actif de l'enzyme LCR.

Les différents radicaux de l'alkaloïde harmalol sont responsables aux interactions enregistrés lors de traitement des résultats de Docking en s'avoir : les groupements NH hétérocycliques, les cycles aromatiques, le groupement hydroxyles OH ainsi les atomes d'hydrogènes libres.

L'étude *in vitro* de harmol montre qu'il présente un pouvoir inhibiteur pour la lipase de *Candida rugosa* de type compétitif, ce qui est obtenue de la représentation graphique $1/V = f(I)$ "Représentation de Dixon " et la représentation graphique $1/V = f(1/S)$ "Représentation de Lineweaver Burk ", le même résultat est montré par l'étude *in silico* où il interagit avec deux acides aminés de site actif, HIS 449 et SER 209 avec un total de 148 fois devisé en 05 types d'interactions différentes, nous avons choisis les interactions les plus répétées telles que : L'interaction Carbone hydrogène qui se répète 14 fois (9,45%) avec HIS 449, une interaction de même type avec HIS 449 répétée 13 fois avec SER 209, l'interaction hydrogène répétée 34 fois (22,9%) avec SER 209, l'interaction Carbone hydrogène se répète 14 fois (9,45%) avec SER 209.

L'harmol n'interagit pas seulement avec les acides aminés de site actif de l'enzyme mais aussi avec d'autres tels que SER 450 qui forme une liaison de type hydrogène, et avec l'acide aminé PHE 344 par une liaison de type Pi-pi shaped. Les interactions sont figurées dans la figure 26.

Concernant les distances indiquées par le logiciel Lig Plot, il y a une distance de 3,04 Å entre l'atome d'hydrogène de NH numéro 3 de l'hétérocycle du harmol et l'oxygène de l'acide aminé SER 450 et 3,11 Å entre l'atome d'hydrogène de NH numéro 2 de l'hétérocycle et l'oxygène de l'acide aminé SER 209 (Figure 13).

L'harmol est parmi les alcaloïdes qui présentent une structure chimique complexe et des groupements fonctionnels variés qui sont les deux hétérocycles, un cycle aromatique et un groupement cétone, ce qui facilite son interaction avec les différents groupements des acides aminés de site actif et les autres acides aminés de l'enzyme pour assurer des différentes interactions.

Tous les acides étudiés dans ce travail ont un pouvoir inhibiteur pour la lipase de *Candida rugosa* de type compétitif à l'exception de l'acide citrique et oxalique qui ont un pouvoir d'inhibition de type non compétitif.

Commençant par l'acide ascorbique, qui est un inhibiteur pour la lipase de *Candida rugosa* d'après la représentation graphique $1/V = f(I)$ "Représentation de Dixon" tel que I est la concentration des molécules. Le résultat de Docking moléculaire est comme suit : le total de toutes les interactions entre l'acide ascorbique et les acides aminés HIS 449 et SER 209 est 46 interactions tel que l'interaction hydrogène est répétée 21 fois (45,65%) avec HIS 449, la même interaction se répète 8 fois (17,39%) avec SER 209 et l'interaction carbone hydrogène se répète 17 fois (36,95%) avec HIS 449. L'acide ascorbique peut interagir avec d'autres acides aminés comme le GLY 123 et il effectue une interaction de type carbone hydrogène. Les interactions sont figurées dans la figure 27.

Cinq distances sont mesurées par LigPlot la première est 3,03 Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxylique OH numéro 4 de l'acide ascorbique et l'atome d'oxygène de l'acide aminé HIS 449, la deuxième est 2,93 Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxylique OH numéro 4 aussi de l'acide ascorbique et l'oxygène du radical OH de SER 450, l'autre distance entre l'atome d'oxygène de GLY 122 et l'atome d'hydrogène du cinquième groupement hydroxylique OH de l'acide ascorbique est 2,71 Å, ainsi, 3,12 Å entre l'oxygène de GLY 122 et l'atome d'hydrogène du troisième groupement hydroxylique OH de l'acide ascorbique et la dernière distance 3,19 Å entre l'atome d'hydrogène du troisième groupement hydroxylique OH de l'acide ascorbique et l'atome d'oxygène de radical OH de SER 209 (Figure 14).

Donc la structure complexe de l'acide ascorbique qui constitue quatre groupements hydroxyliques OH, une fonction cétone ainsi que son cycle responsable de la formation de différentes interactions avec les acides aminés de site actif et les autres acides aminés et l'insertion dans le site actif catalytique de LCR ce qui le laisse posséder un pouvoir d'inhibition de type compétitif.

L'acide benzoïque aussi a un pouvoir d'inhibition compétitif d'après l'étude *in vitro* et le Docking qui donne 150 interactions entre l'acide benzoïque et les acides aminés de site actif catalytiques, les interactions majoritaires à partir ces 150 interactions sont : Van der waals répétée 54 fois (36%) avec HIS 449, Pi-sigma répétée 45 fois (30%) avec HIS 449 et hydrogène avec le SER 209 répétée 15 fois (10%).

La structure de l'acide benzoïque le permettant d'interagir avec plusieurs acides aminés de l'enzyme LCR comme le GLY 124 qui forme avec l'acide benzoïque une liaison de type hydrogène, le PHE 344 forme liaison de type Pi-Shaped et autres interactions, mais le troisième acide aminé de site actif n'enregistre aucune interaction avec l'acide benzoïque. Les interactions sont figurées dans la figure 28.

La distance entre l'hydrogène de groupement carboxylique COOH de l'acide benzoïque et l'atome d'azote hétérocyclique de HIS449 est 3,22 Å et la distance entre l'hydrogène de groupement carboxylique COOH de l'acide benzoïque et l'oxygène du groupement hydroxyle OH de SER 209 est 3,01 Å, ainsi, que la distance entre l'oxygène de groupement carboxylique COOH d'acide benzoïque et l'atome d'hydrogène de groupement NH de GLY 124 est 2,99Å. C'est tous ce que nous avons obtenu à partir le logiciel Lig Plot et ce qui confirme l'interaction directe avec le site actif, donc, l'acide benzoïque est un inhibiteur compétitif. (Figure 15).

Nous pouvons dire que l'acide benzoïque ne peut interagir donc inhiber qu'avec les atomes de groupement carboxylique COOH et les atomes d'hydrogènes libre pour former des interactions Vander Waals et hydrogène et son cycle benzénique pour former une interaction Pi-sigma car sa structure est plus au moins simple.

Au contraire de l'acide ascorbique et benzoïque, l'acide citrique possède un type d'inhibition non compétitif pour la lipase de *Candida rugosa* d'après les résultats de l'étude *in vitro*, si nous comparons ce résultat avec les résultats de Docking, nous pouvons dire qu'il est logique et conforme. Parce que l'acide citrique n'interagit qu'avec un seul acide aminé de site actif qui est le HIS 449 et seulement 11 fois où l'interaction carbone hydrogène se répète 6 fois (54,54%) et l'interaction hydrogène se répète 5 fois (45,45%), mais il peut interagir avec autres acides aminés comme le GLY 124, GLY 122 et SER 450 et forme une interaction de type hydrogène. Les interactions sont figurées dans la figure 29.

La distance interatomique entre l'atome d'oxygène de HIS 449 et l'atome d'hydrogène de la fonction carboxylique COOH de l'acide citrique est 3,01Å, la distance entre l'hydrogène de la fonction carboxylique COOH de l'acide citrique et l'oxygène de la fonction alcool de SER 450 est 2,88Å et la distance entre l'atome d'oxygène de groupement COOH de l'acide citrique et l'atome d'hydrogène de NH₂ de GLY 124 est 3,15Å. Une distance mesurée de 2,91Å entre l'hydrogène de la fonction COOH de l'acide citrique et l'oxygène de GLY122 (Figure 16).

La structure de l'acide citrique est linéaire avec 3 groupements carboxylique COOH, il participe avec les atomes de ces fonctions et forme des interactions que de type hydrogène et carbone hydrogène avec les acides aminés de site catalytique, il se fixe aussi dans un site hors le site actif, ce que nous avons remarqué lors de traitement des résultats de Docking par le logiciel Discovery studio. CE qui confirme le type d'inhibition non compétitif.

Le type d'inhibition de l'acide gallique sur la lipase de *Candida rugosa* est compétitif, ce résultat et aussi confirmé par le Docking ou les interactions entre l'acide gallique et les deux acides aminés de site actif HIS449 et SER209 sont répétées 117 fois distribuées sur 3 types d'interactions différentes qui sont : des interactions de type Pi-pi shaped, 96 fois (82,05%) et des interactions de type hydrogènes, 9 fois (7,6%) avec HIS 449 et 12 fois (10,25%) avec SER 209, nous avons enregistré des interactions de l'acide gallique avec d'autres acides aminés que HIS 449 et SER 209 comme GLY 124 de type hydrogène. Les interactions sont figurées dans la figure 30.

Concernant les distances mesurées par le logiciel Lig Plot, une distance mesurée de 2,94 Å entre l'hydrogène du troisième groupement hydroxyle de l'acide gallique et l'oxygène de groupement hydroxyle OH de SER 209. Une autre distance est égale à 3,05Å entre l'atome d'hydrogène du groupement NH₂ de GLY124 et l'atome d'oxygène du troisième groupement hydroxyle de l'acide gallique. À partir de ces informations, nous pouvons dire que ce dernier a un pouvoir d'inhibition de type compétitif car il est bien inséré dans le site actif de la LCR (Figure 17).

La structure de l'acide gallique est constituée par 3 groupements hydroxyles OH, une fonction carboxylique COOH et des atomes d'hydrogènes libres H qui lui aident pour former l'interaction de type hydrogène et un cycle benzénique pour former l'interaction de type Pi-pi shaped.

Au contraire de l'acide gallique, l'acide oxalique possède un type d'inhibition non compétitif pour la lipase de *Candida rugosa* d'après les résultats de l'étude *in vitro*, si nous comparons ce résultat avec les résultats de Docking, nous pouvons dire qu'il est logique.

Parce que l'acide oxalique n'interagit qu'avec un seul acide aminé de site actif qui est le SER209 et seulement 35 fois distribué sur quelques types d'interactions différentes, nous avons choisis les interactions les plus répétées telles que : l'interaction de type hydrogène qui se répète 26 fois (74,2%), l'interaction de type Van der Waals qui se répète 12 fois (34,28%).

L'acide oxalique n'interagit pas seulement avec les acides aminés de site actif de l'enzyme mais aussi avec d'autres tels que GLY 12, GLY124 et GLY 123 qui forment des liaisons de type hydrogène et carbone hydrogène, respectivement avec l'acide oxalique. Les interactions sont figurées dans la figure 31.

Concernant les distances, il y a une distance de 3,13 Å entre l'hydrogène de groupement hydroxyle numéro 1 de l'acide oxalique et l'atome d'oxygène de l'acide aminé GLU 208 et une autre de 3,05 Å entre l'hydrogène de groupement hydroxyle numéro 2 de l'acide oxalique et l'atome d'oxygène de l'acide aminé GLY 122 (Figure 18).

L'acide oxalique est parmi les acides organique qui présentent une structure chimique simple linéaire avec des groupements fonctionnels variés qui sont les deux groupements carboxyliques COOH, et les deux groupements hydroxyles OH ce qui facilite son interaction avec les différents groupements des acides aminés de site actif et les autres acides aminés de l'enzyme pour assurer des différentes interactions.

La dernière molécule étudiée, dans ce travail, est l'acide salicylique, qui possède un type d'inhibition compétitif, ce que nous avons confirmé à partir l'étude *in vitro* et *in silico* parce que nous avons trouvé d'après le Docking que cet acide interagit avec les deux acides aminés de site actif catalytique le HIS 449 et SER 209 avec un total de 136 fois divisées sur quelques types d'interaction, nous avons choisis ces 3 interactions les plus répétées telles que : l'interaction hydrogène se répète 45 fois (33,08%) avec HIS 449, la même interaction se répète 11 fois (8,08 %) avec SER 209 et l'interaction carbone hydrogène se répète 38 fois (27,79 %) avec HIS 449. L'acide salicylique fais des interactions de type hydrogène avec GLU 208 et autres interaction de type Pi sigma et Pi-pi shaped avec plusieurs acides aminés de l'enzyme LCR comme ce que nous avons montré dans la figure 32.

Seulement deux distances sont enregistrées dans cette position la première est de 3,25Å entre l'atome d'oxygène de la fonction carboxylique COOH de l'acide salicylique et l'atome d'hydrogène liée avec l'atome d'azote N hétérocyclique de HIS449 et la deuxième est de 2,96Å entre l'hydrogène de groupement COOH du GLU 208 et l'un des deux oxygènes de la fonction carboxylique COOH de l'acide salicylique(Figure 19).

Cet acide participe avec les atomes de sa fonction carboxylique COOH et son groupement hydroxyle OH avec les acides aminés de l'enzyme LCR et donne naissance à la formation des interactions de type hydrogène et carbone hydrogène et participe aussi avec son cycle benzénique et forme des interactions de types Pi-sigma et Pi-pi shaped.

En conclusion, les valeurs des IC50 et le type d'inhibition des molécules étudiées varient selon la nature et la structure chimique de chaque molécule et les groupements fonctionnels que les constituent.

Tableau 4. Résultats de traitement de Docking et nombre de la répétition.

L'inhibiteur	Type d'interaction	L'AA responsable de l'interaction	Nombre de répétition
Alpha pinène	Pi-Alkyl	HIS 449	79 fois
	Alkyl	HIS 449	45 fois
	Van der waals	HIS 449	27 fois
	Pi-alkyl	HIS 449	104 fois
Linalool	Carbon hydrogen bond	HIS 449	32 fois
	Conventional hydrogen bond	SER 209	15 fois
	Pi-pi shaped	HIS 449	31 fois
	Conventional hydrogen bond	SER 209	26 fois
Hispidine	Vander waals	HIS 449	21 fois
	Conventional hydrogen bon	SER 209	11 fois
	Van der waals	SER 209	10 fois
	Van der waals	SER 209	12 fois
Harmaline	Pi-pi shaped	HIS 449	38 fois
	Carbon hydrogen bond	SER 209	9 fois
	Van der waals	HIS 449	27 fois
	Conventional hydrogen bond	SER 209	35 fois
Harmine	Pi-pi shaped	HIS 449	13 fois
	Carbon hydrogen bond	HIS 449	9 fois
	Conventional hydrogen bond	SER 209	34 fois
	Pi-pi shaped	HIS 449	32 fois
Harmalol	Pi-Pi T- shaped	HIS 449	26 fois
	Conventional hydrogen bond	HIS 449	21 fois
	Carbon hydrogen bond	HIS 449	17 fois
	Conventional hydrogen bond	SER 209	8 fois
Acide ascorbique	Van der waals	HIS 449	54 fois
	Pi-sigma	HIS 449	45 fois
	Carbon hydrogen bond	SER 209	10 fois
	Conventional hydrogen bond	HIS 449	5 fois
Acide citrique	Pi-pi shaped	HIS 449	96 fois
	Conventional hydrogen bond	SER 209	12 fois
	Conventional hydrogen bond	HIS 449	9 fois
	Conventional hydrogen bond	SER209	22 fois
Acide oxalique	Van der waals	SER209	12fois
	Conventional hydrogen bond	HIS 449	45 fois
	Carbon hydrogen bond	HIS 449	38 fois
	Conventional hydrogen bond	SER 209	11 fois

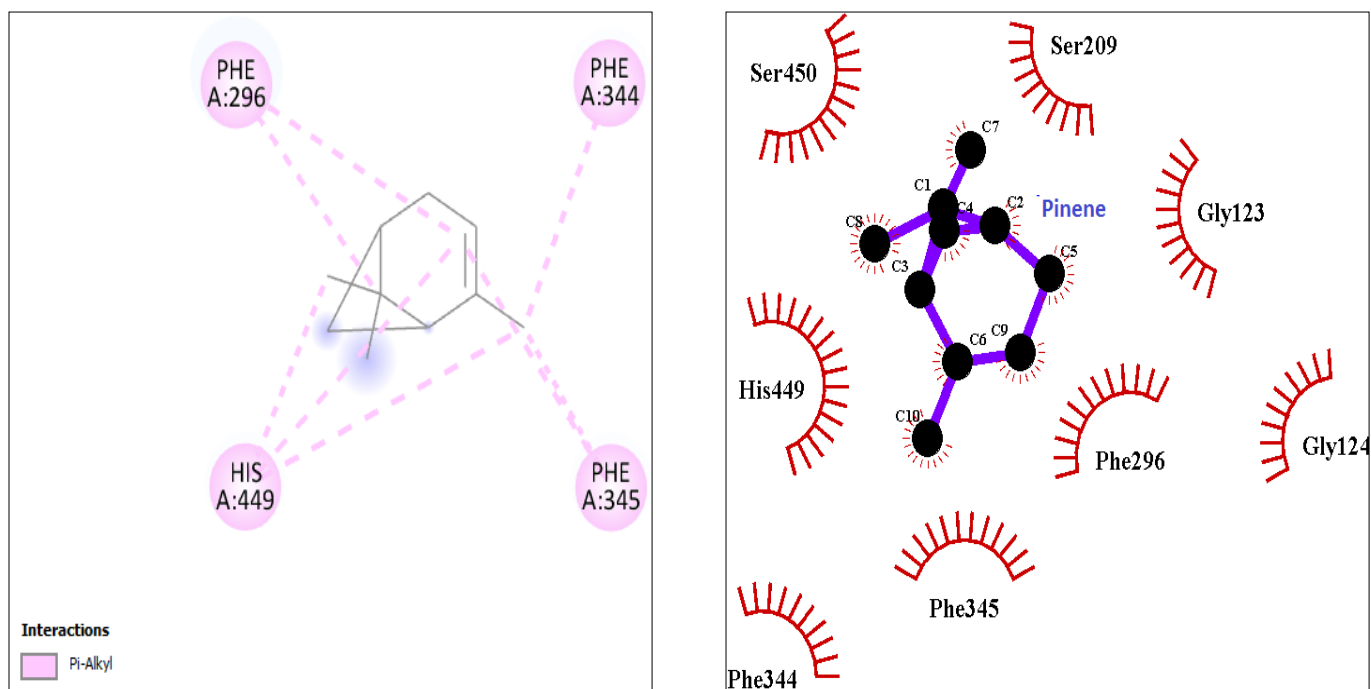


Figure 7. Représentation des interactions 2D d'alpha pinène obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

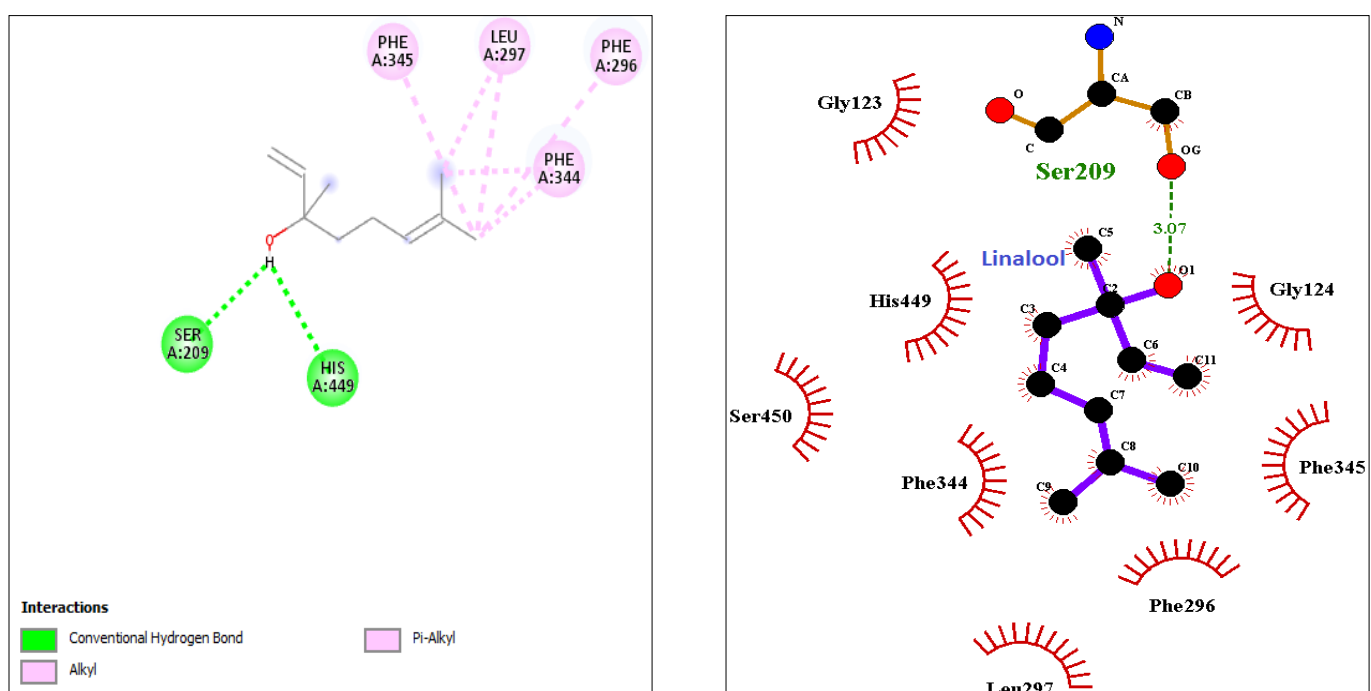


Figure 8. Représentation des interactions 2D de linalool obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

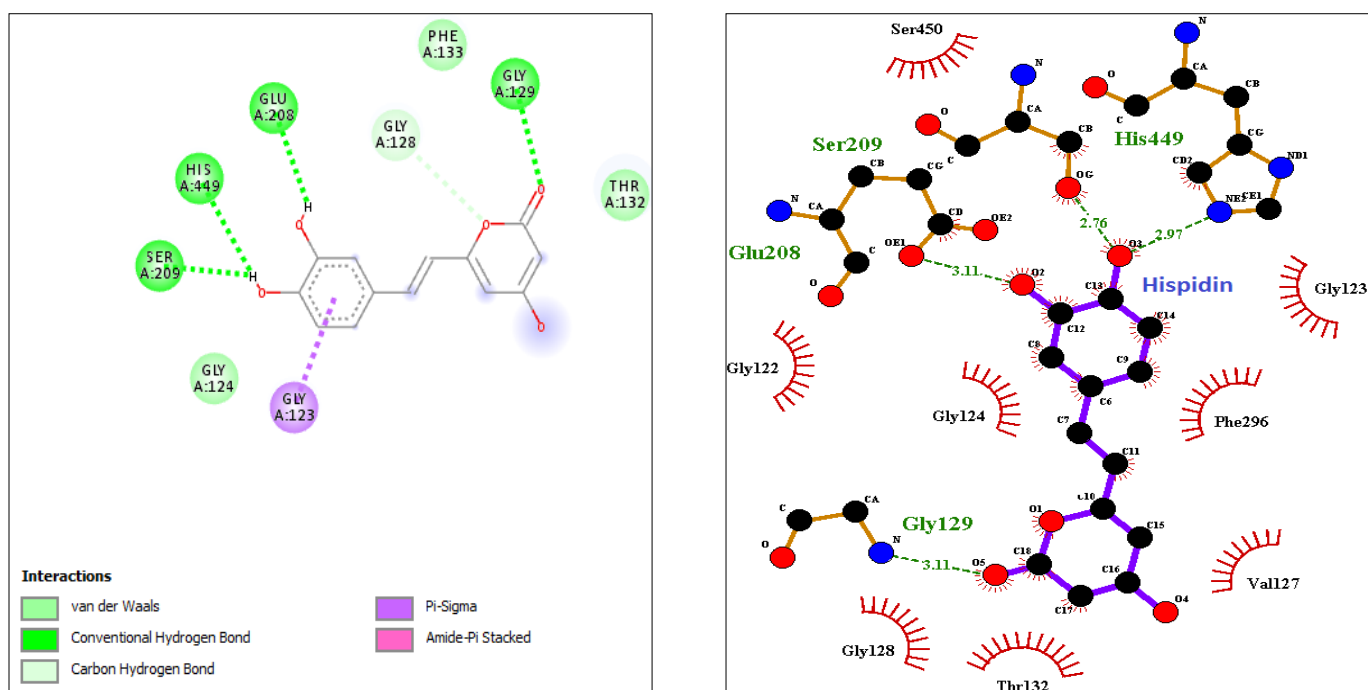


Figure 9. Représentation des interactions 2D de hispidine obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

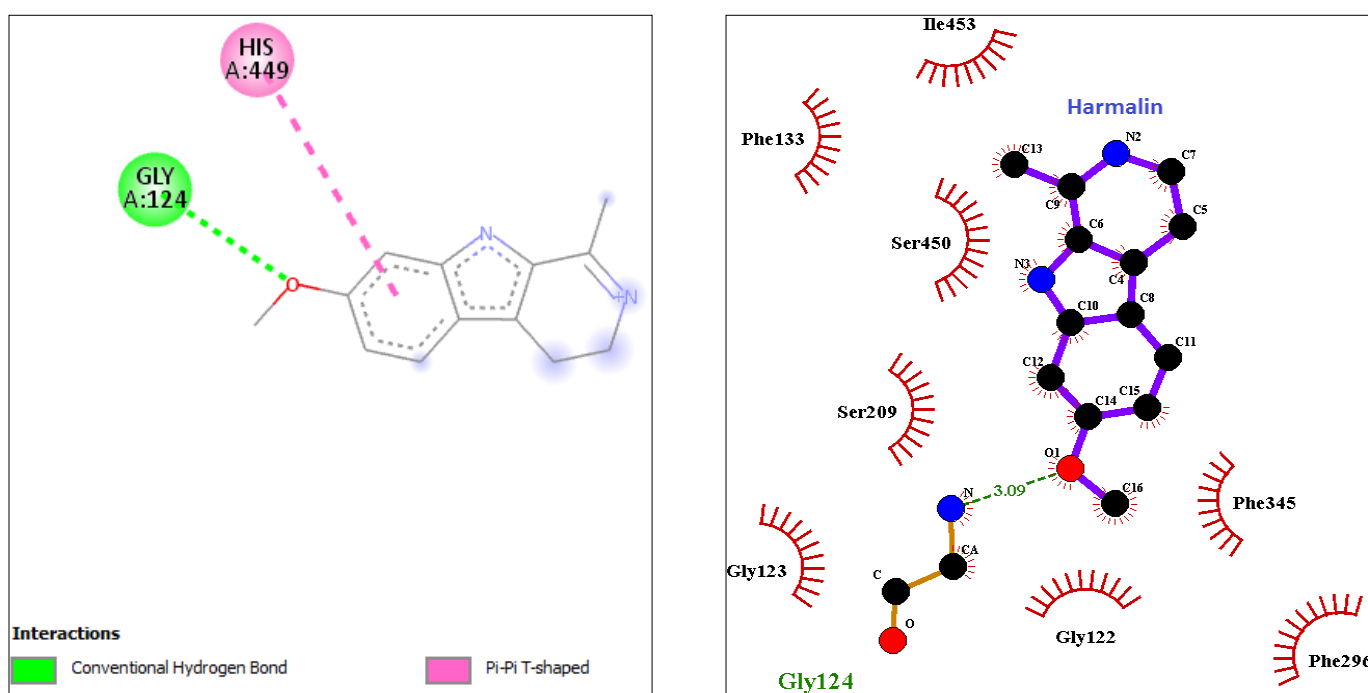


Figure 10. Représentation des interactions 2D de harmaline obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

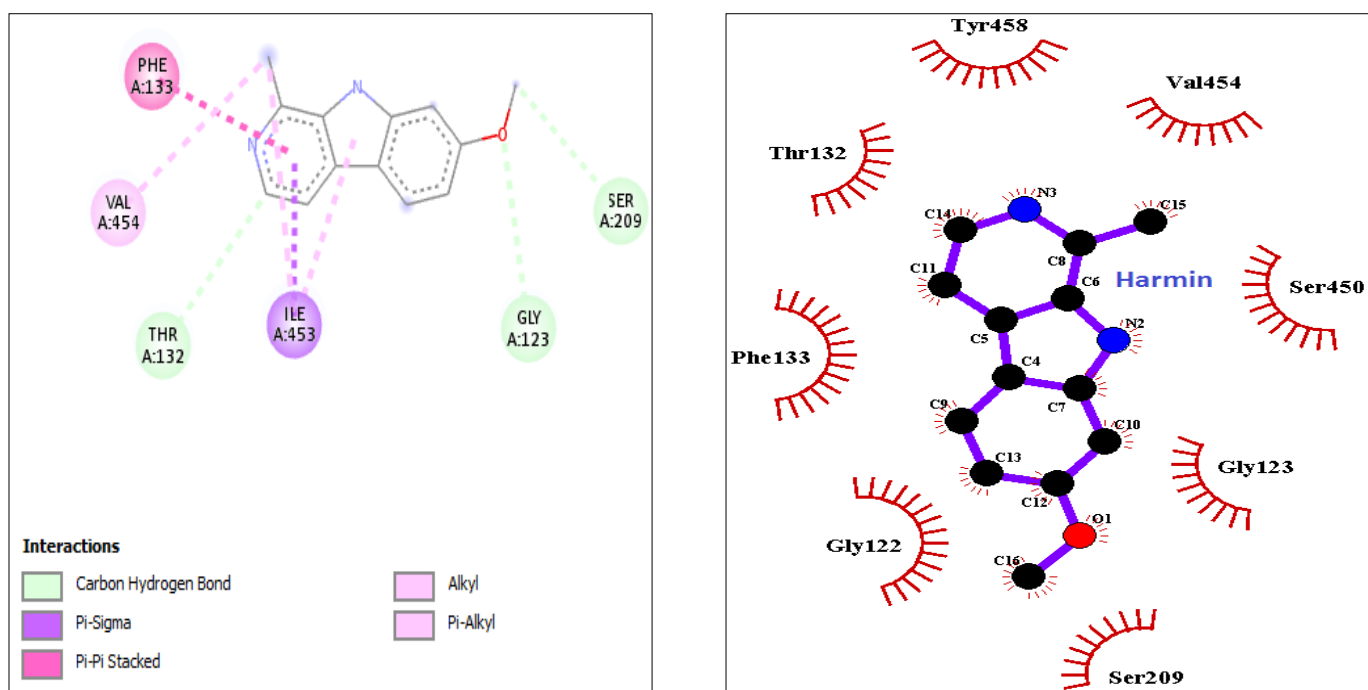


Figure 11. Représentation des interactions 2D de harmine obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

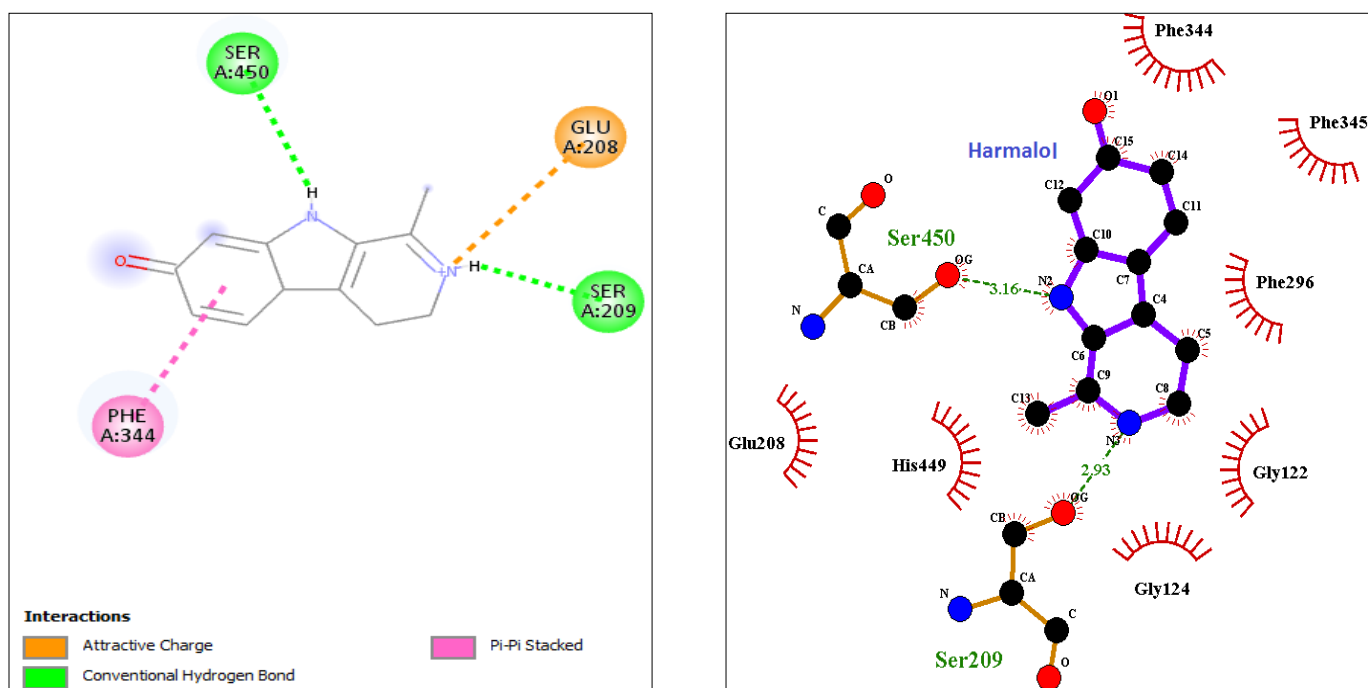


Figure 12 . Représentation des interactions 2D de harmalol obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

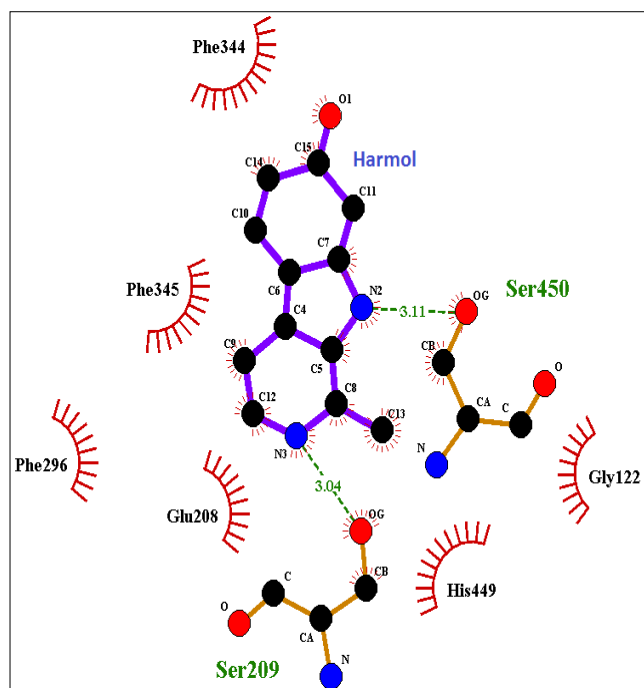
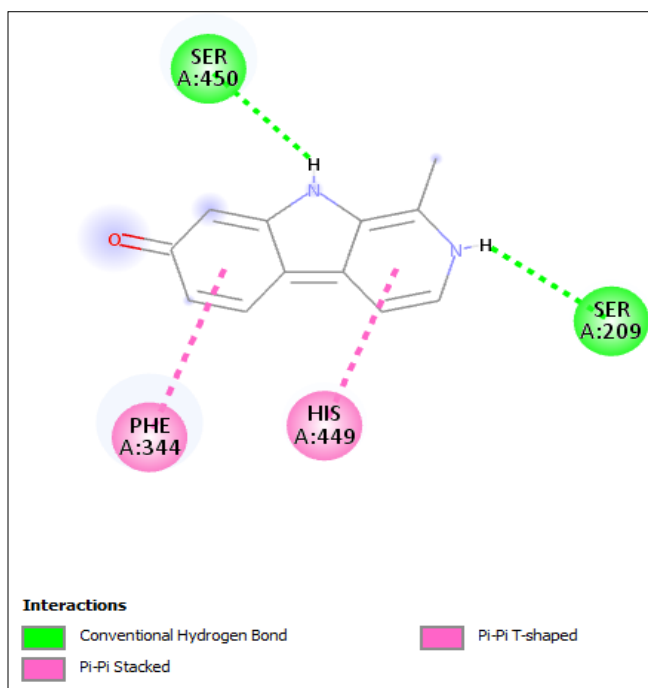


Figure 13. Représentation des interactions 2D de harmol obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

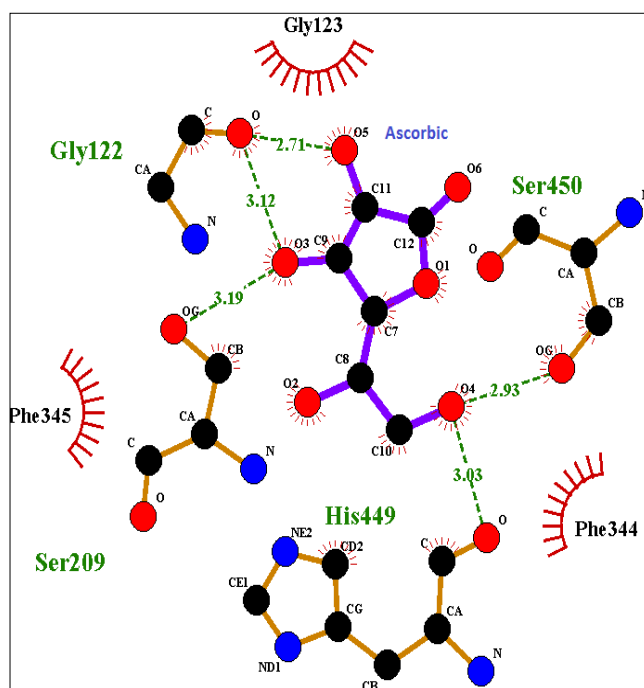
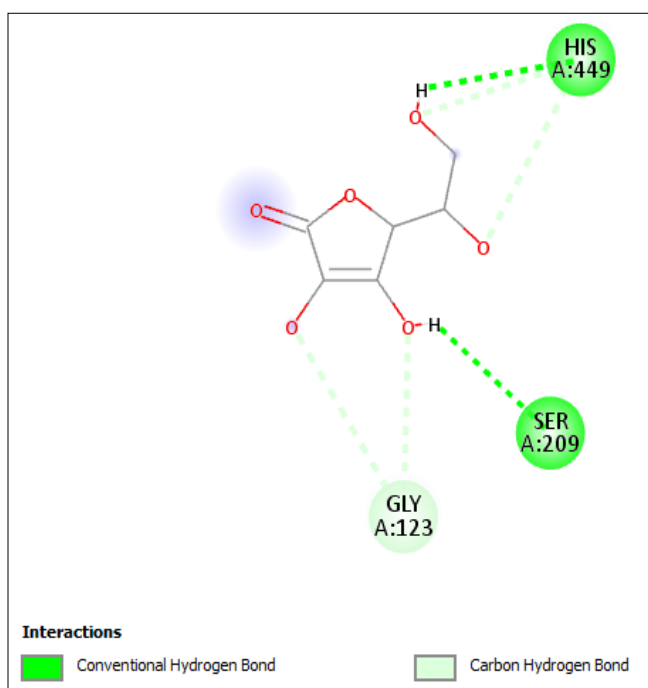


Figure 14. Représentation des interactions 2D de l'acide ascorbique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

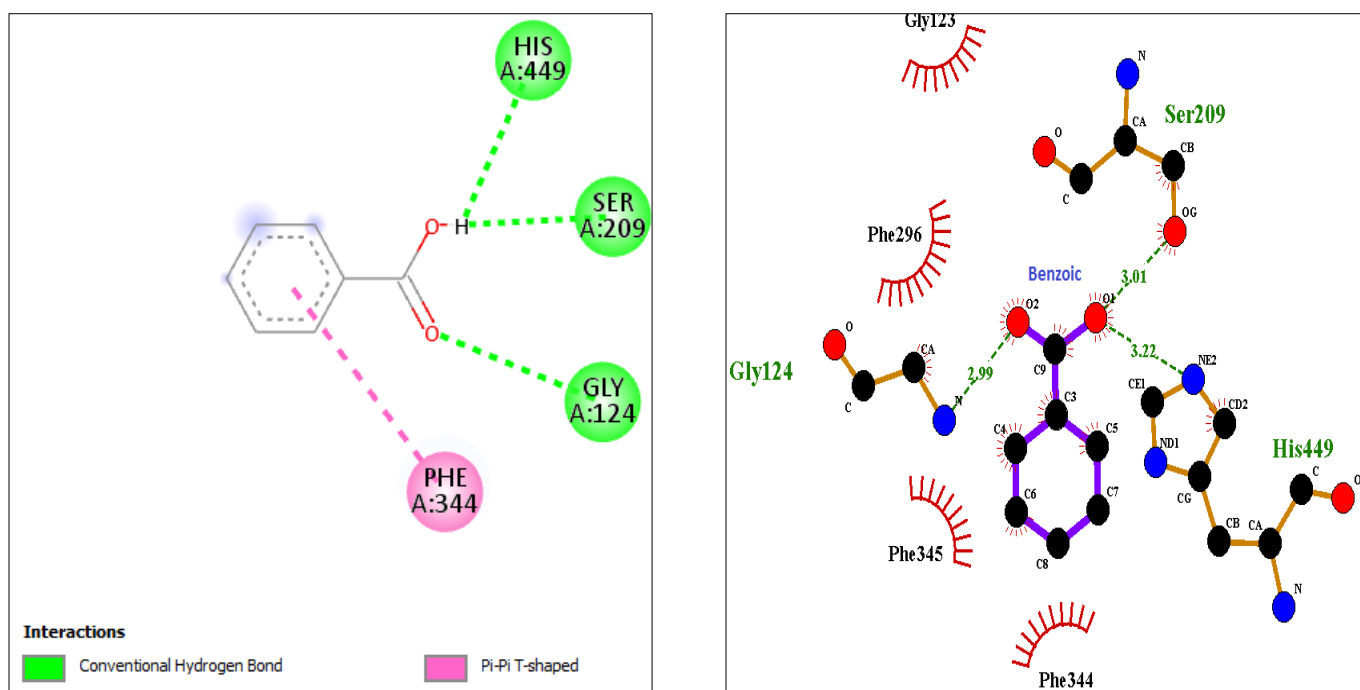


Figure 15. Représentation des interactions 2D de l'acide benzoïque obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

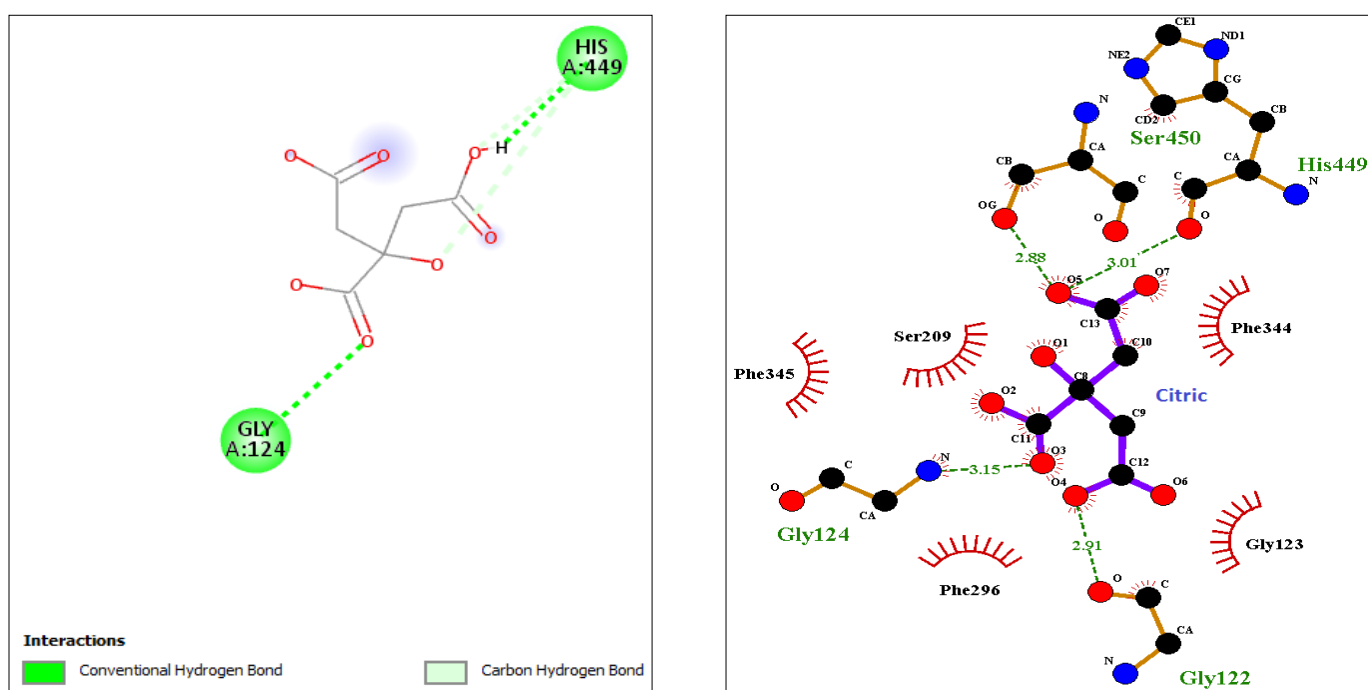


Figure 16. Représentation des interactions 2D de l'acide citrique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

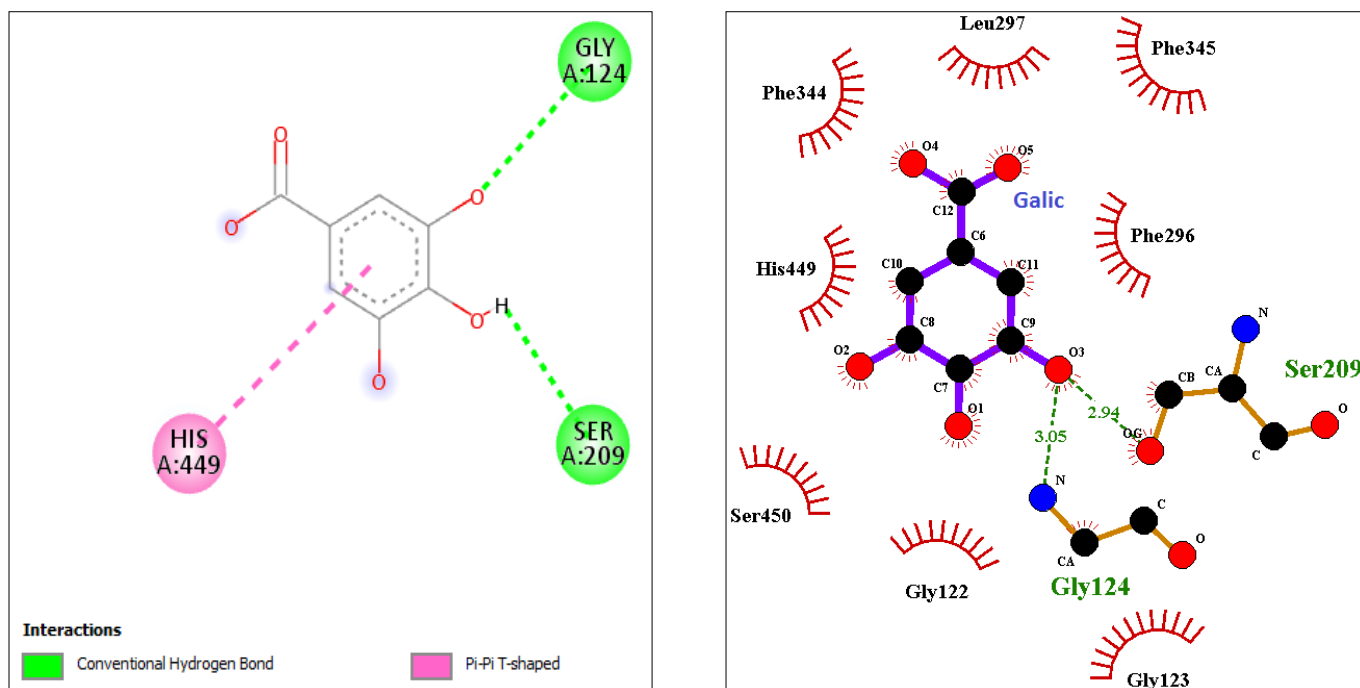


Figure 17. Représentation des interactions 2D de l'acide gallique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite

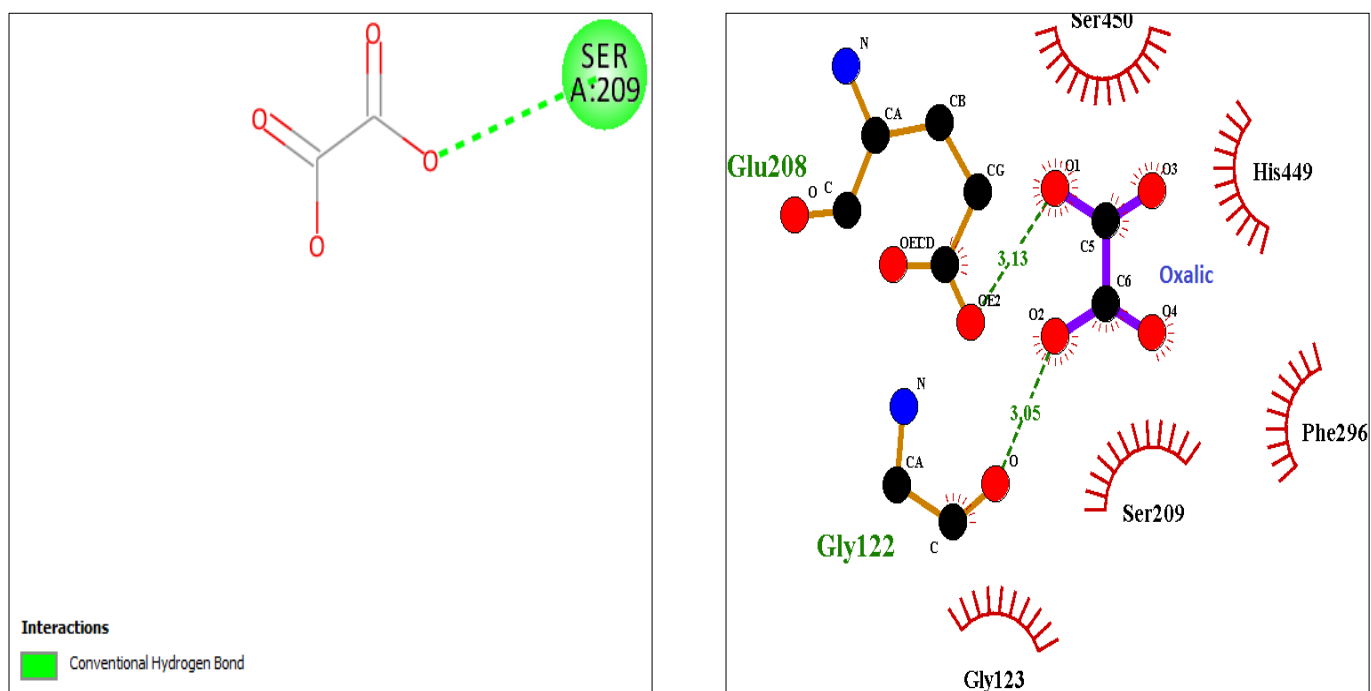
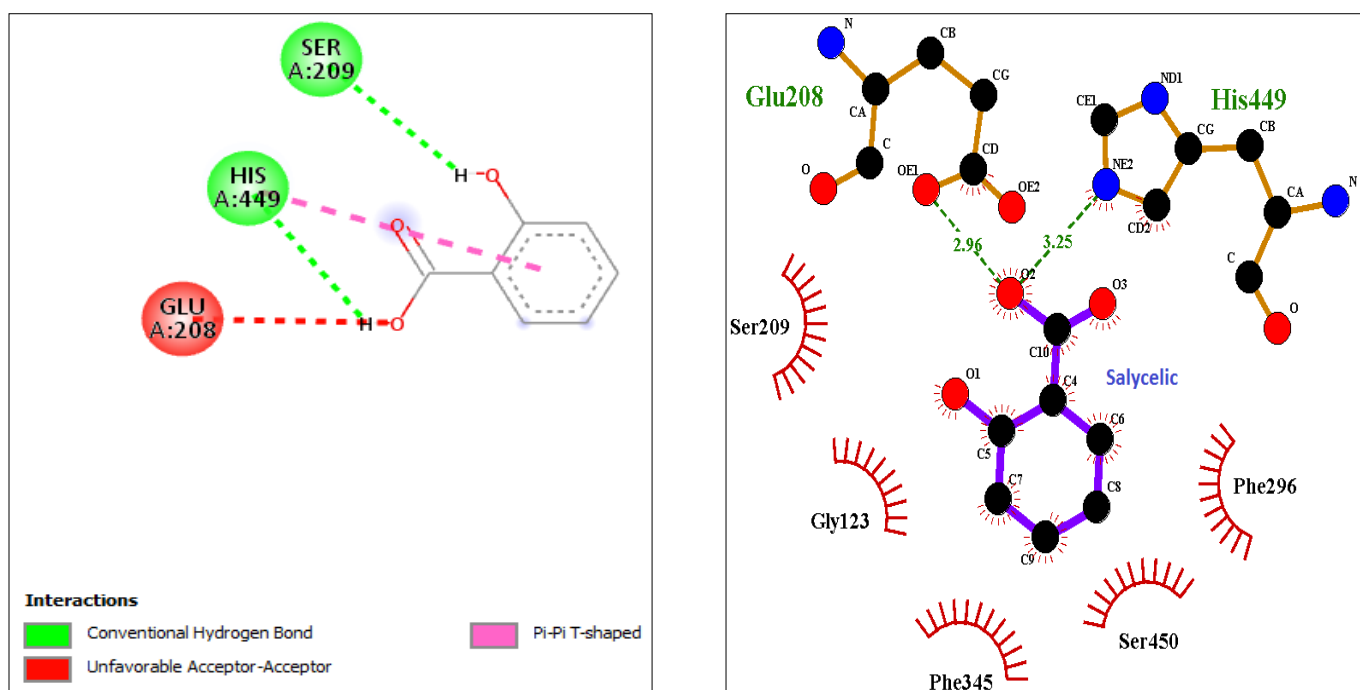


Figure 18. Représentation des interactions 2D de l'acide oxalique obtenue par le logiciel Discovery studio image à gauche et par logiciel Ligplot image à droite



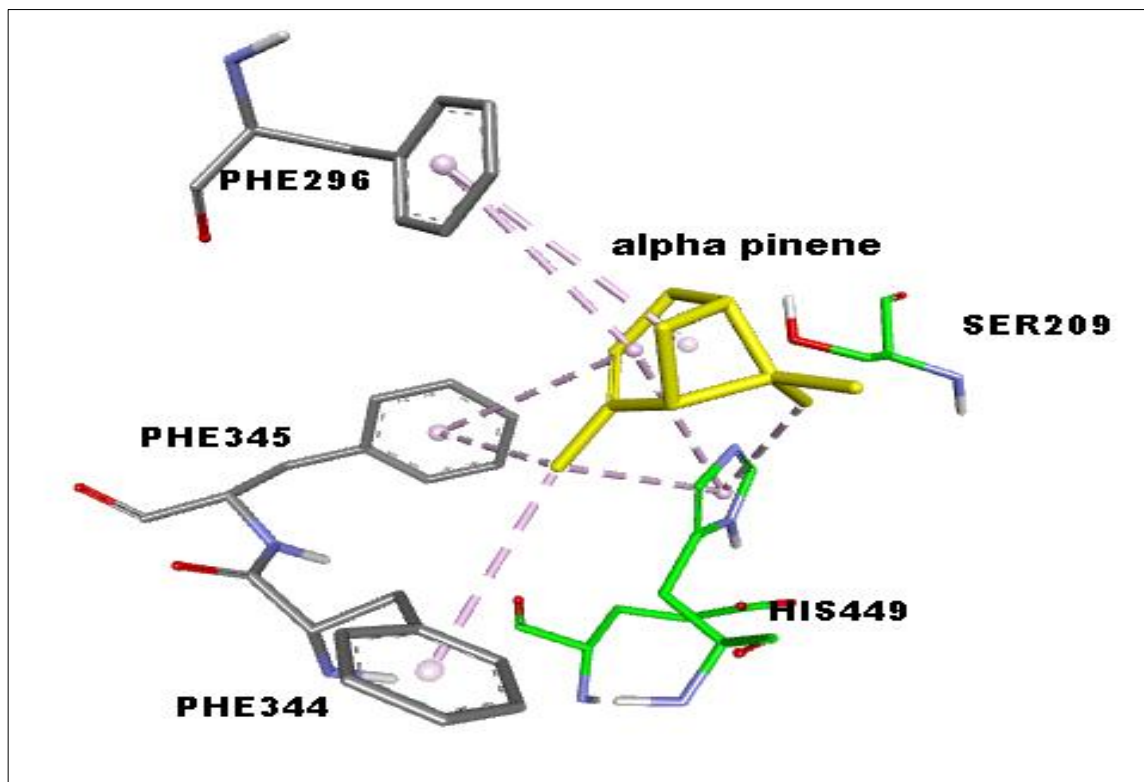


Figure 20. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'alpha pinène.

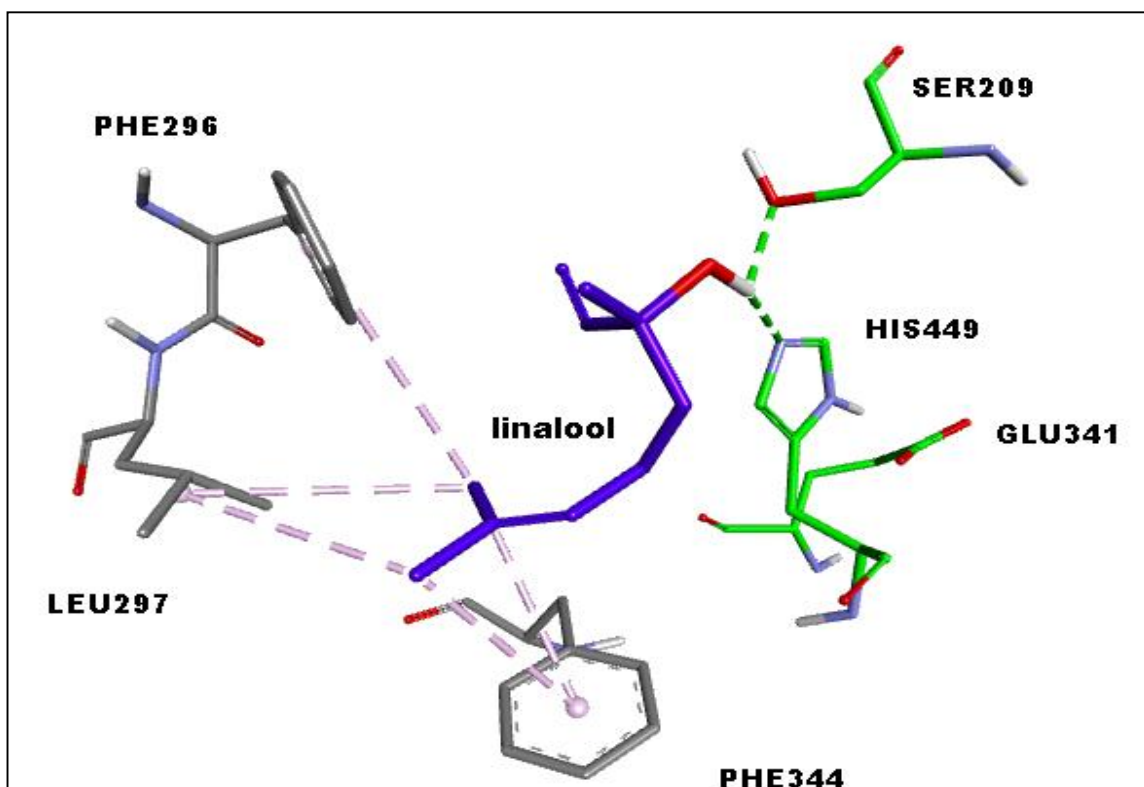


Figure 21. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour linalool

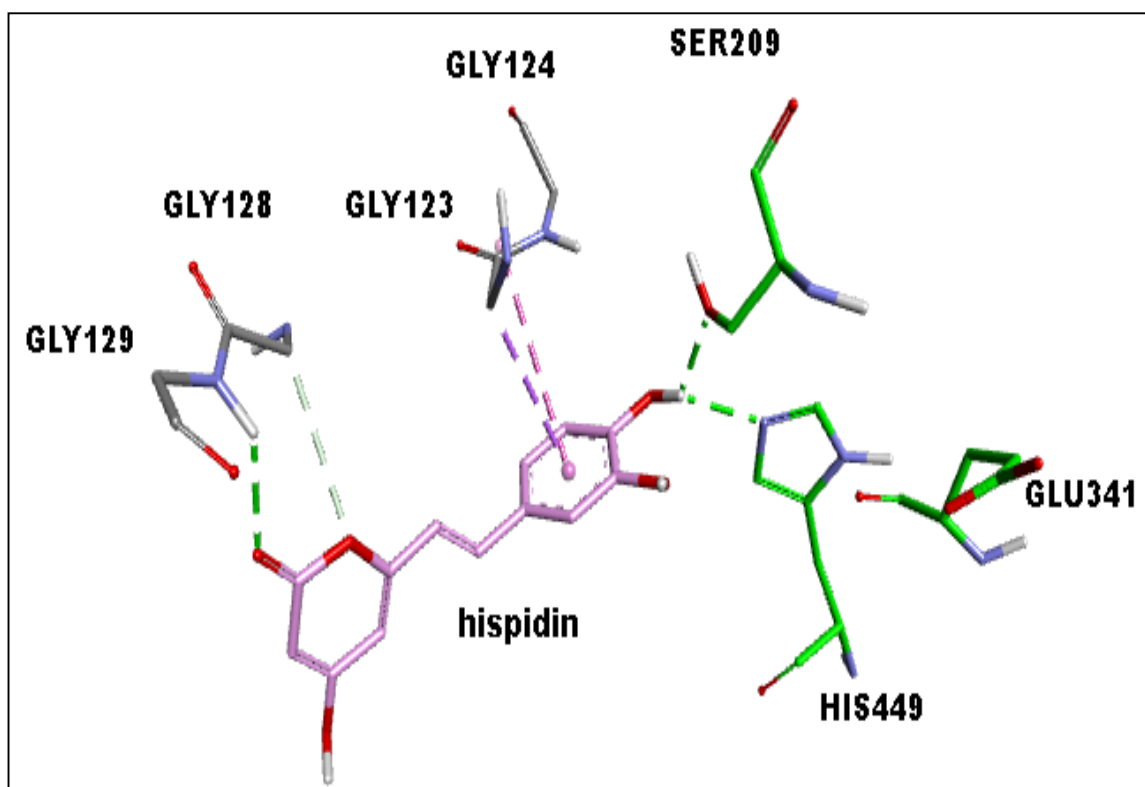


Figure 22. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'hispidine.

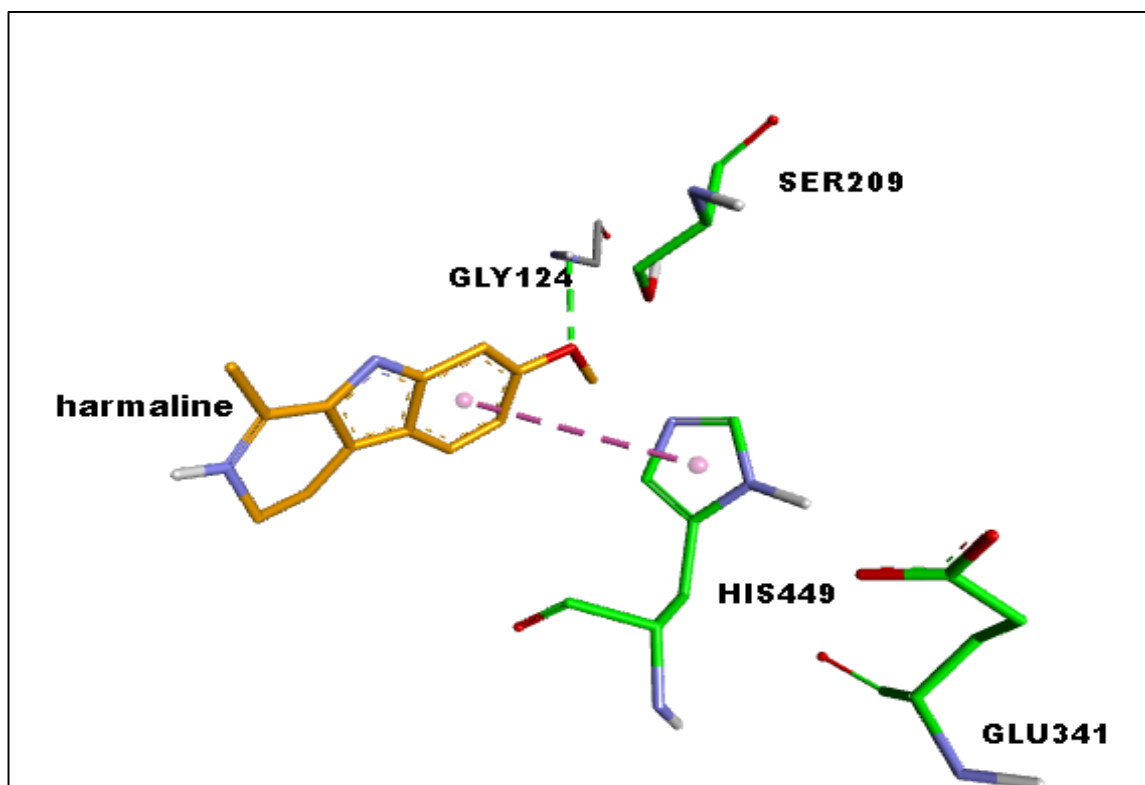


Figure 23. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmaline.

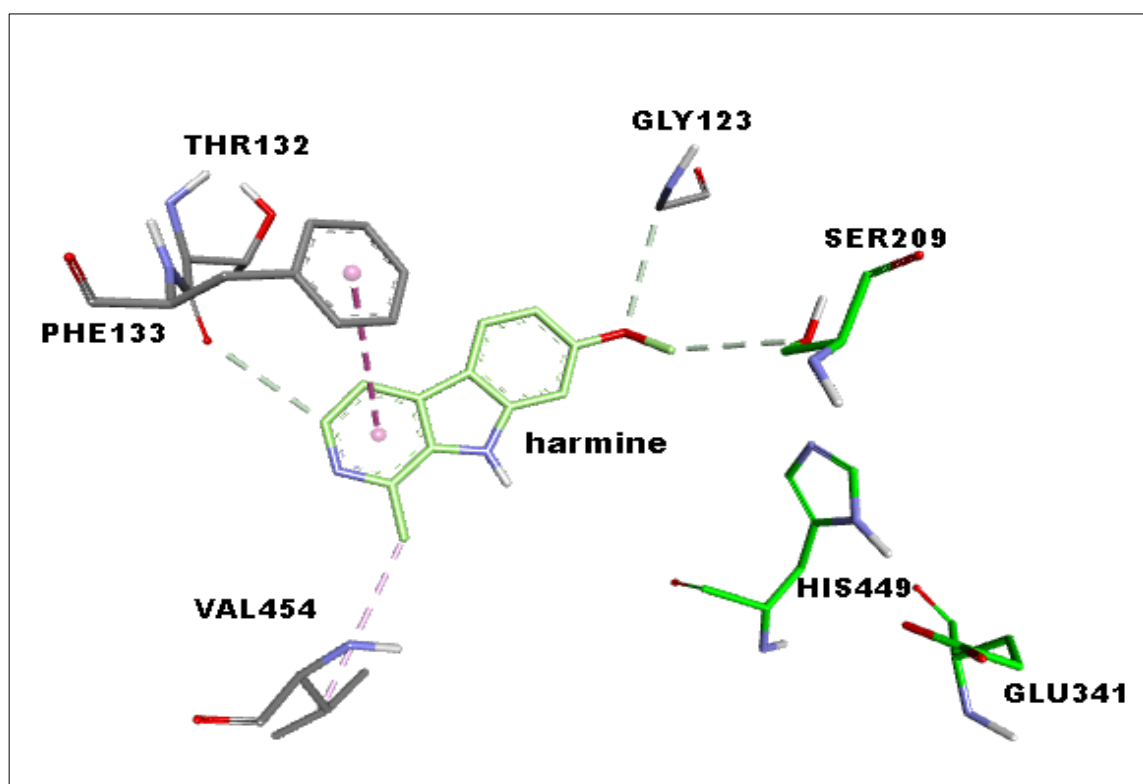


Figure 24. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmine.

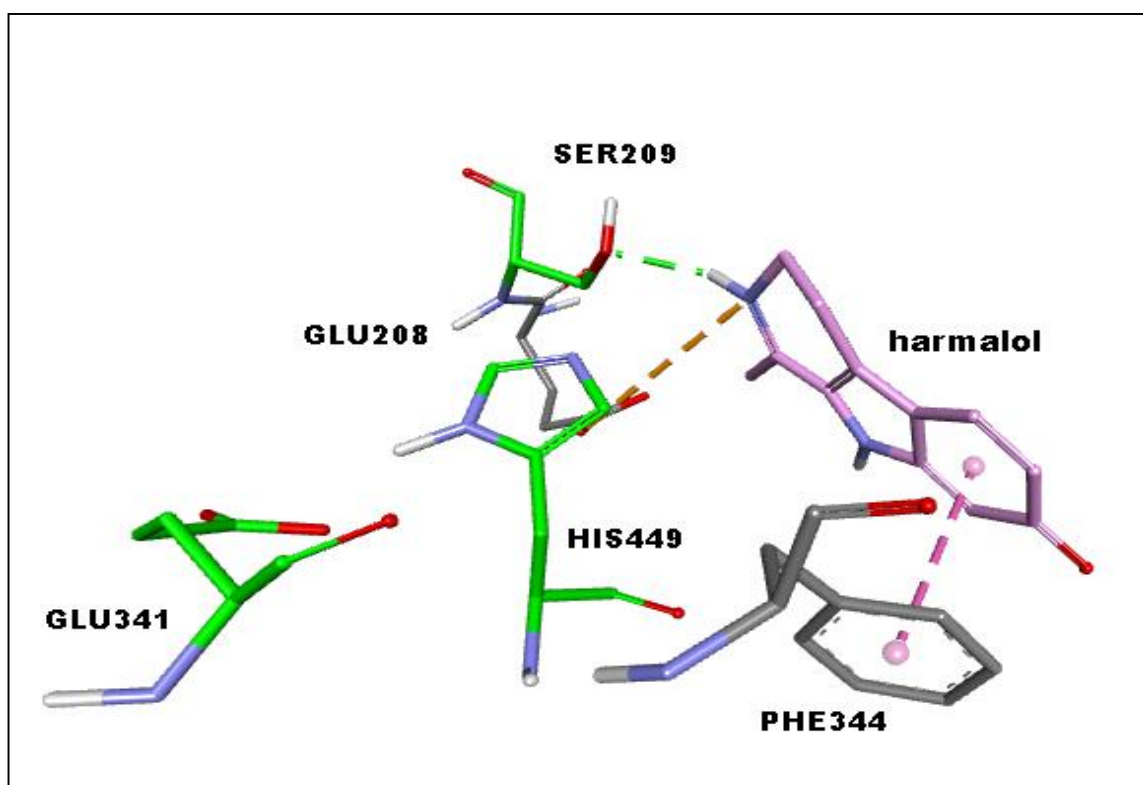


Figure 25. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmalole.

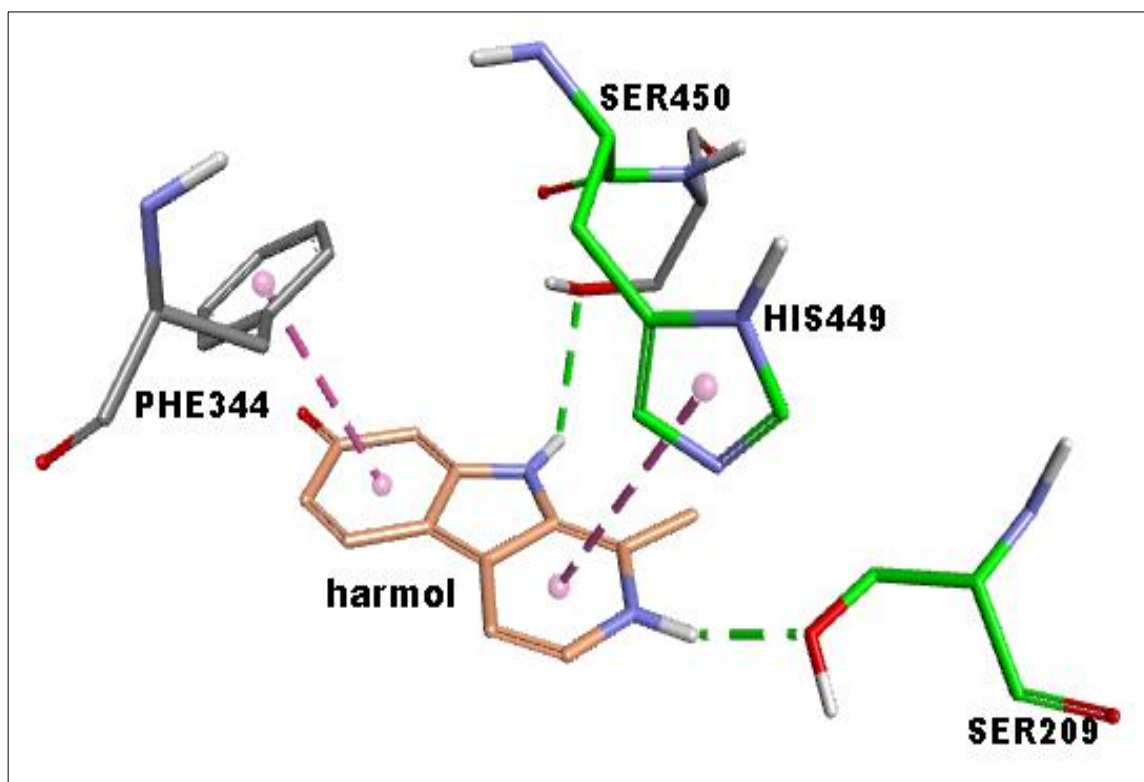


Figure 26. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'harmol.

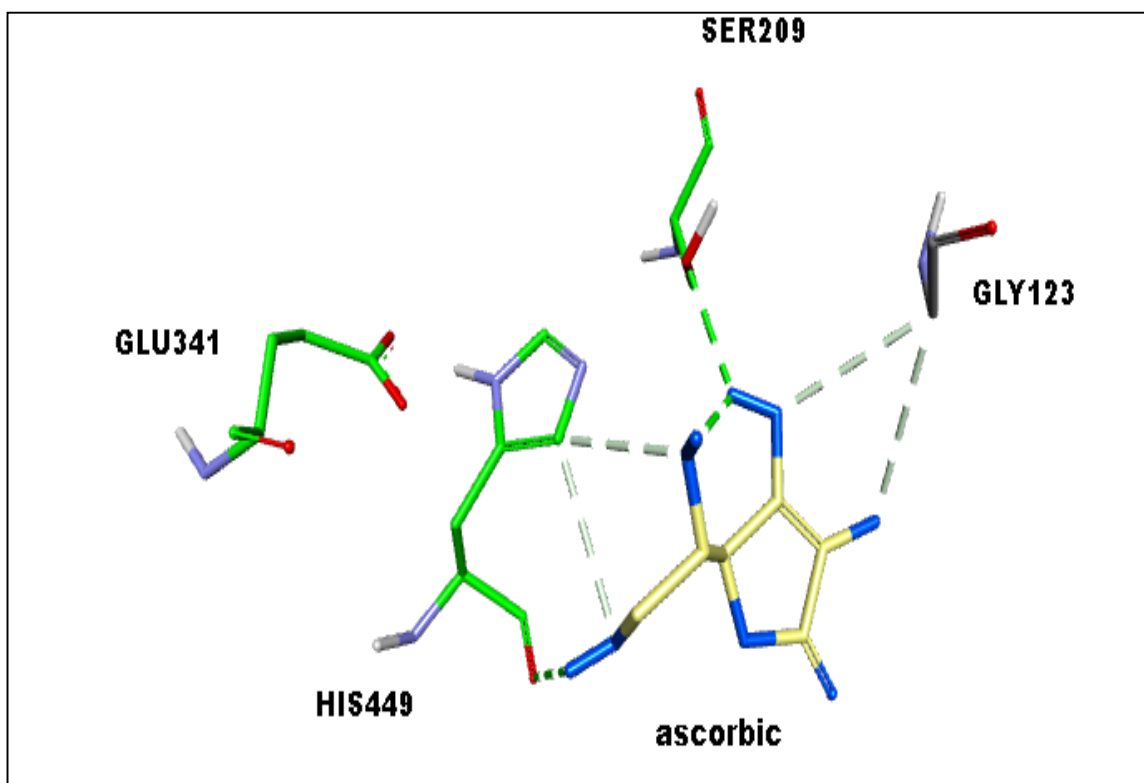


Figure 27. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide ascorbique.

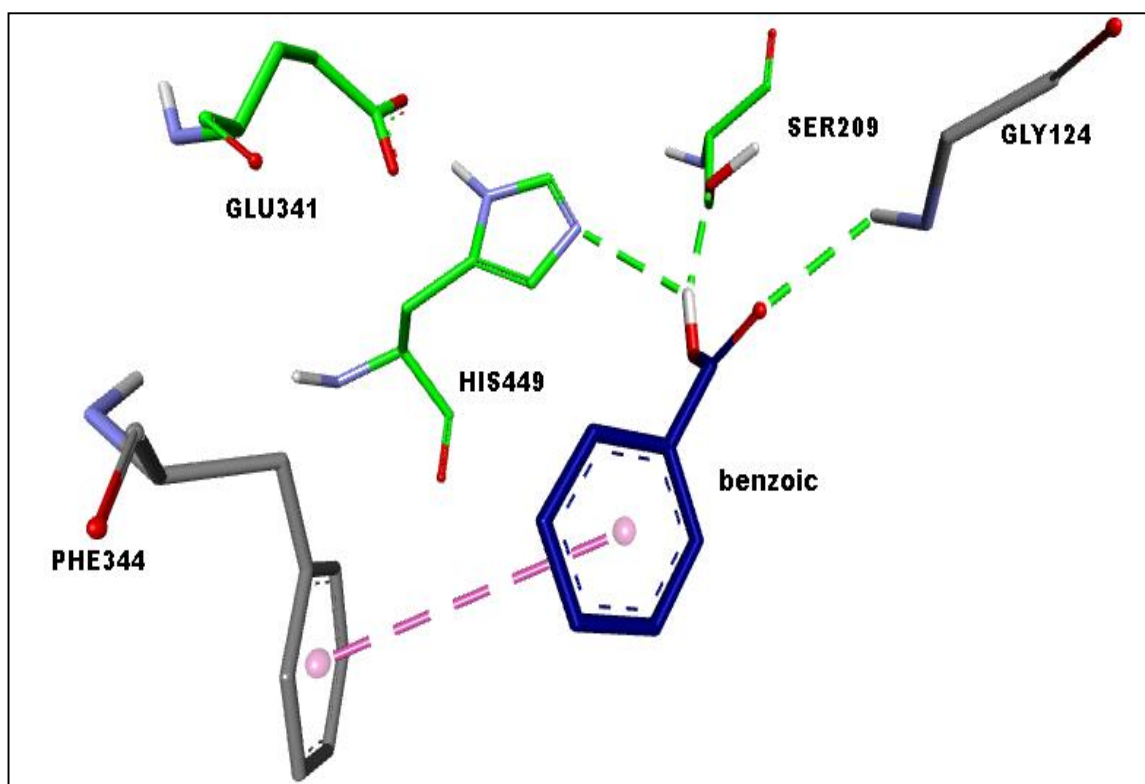


Figure 28. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide benzoïque.

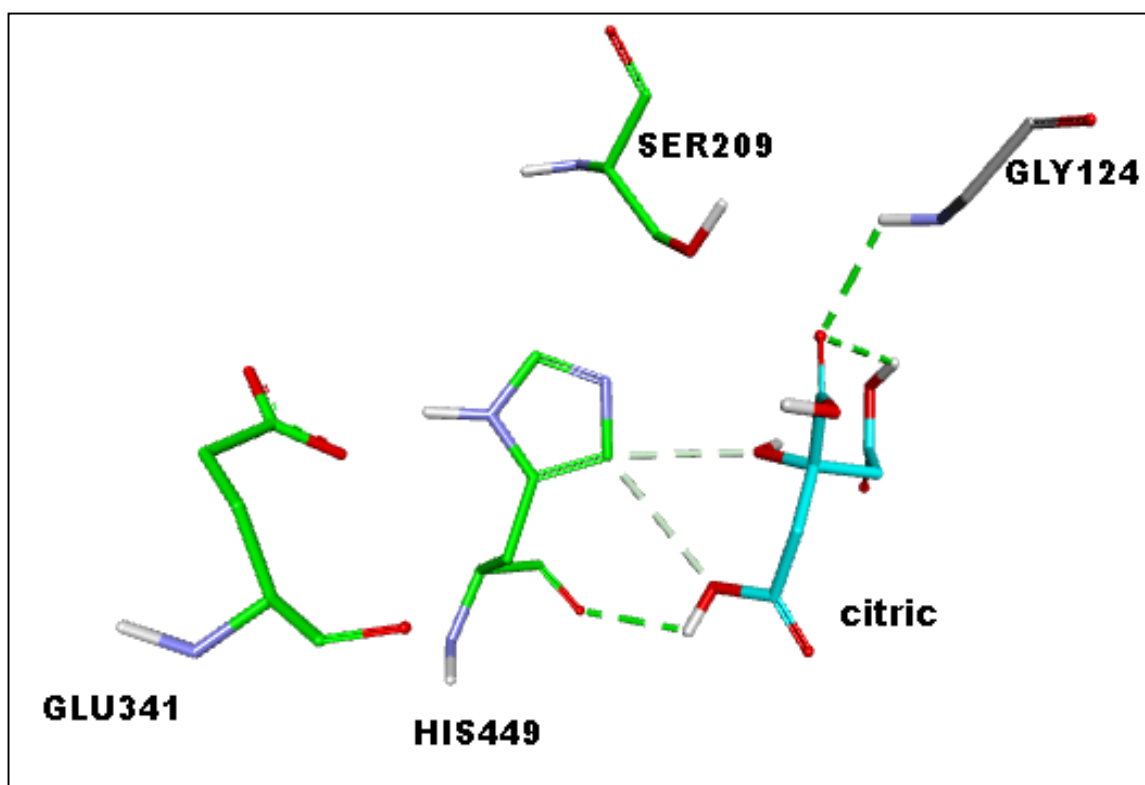


Figure 29. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide citrique.

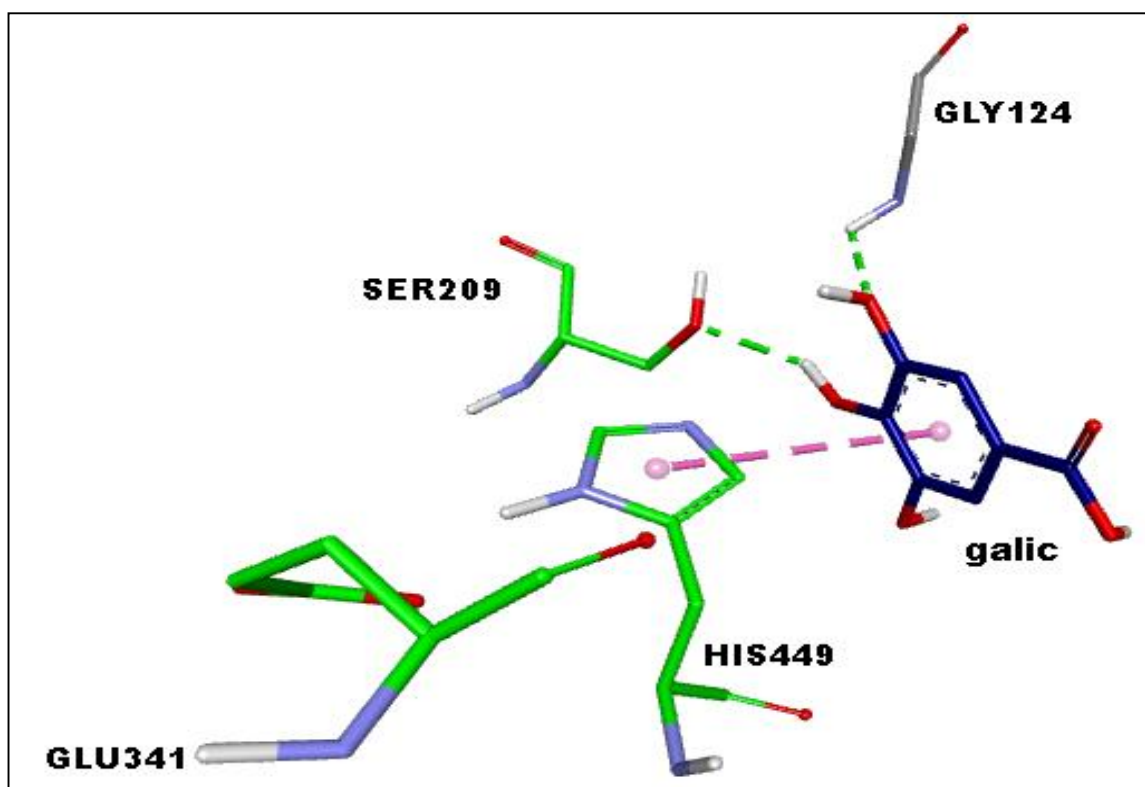


Figure 30. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide gallique.

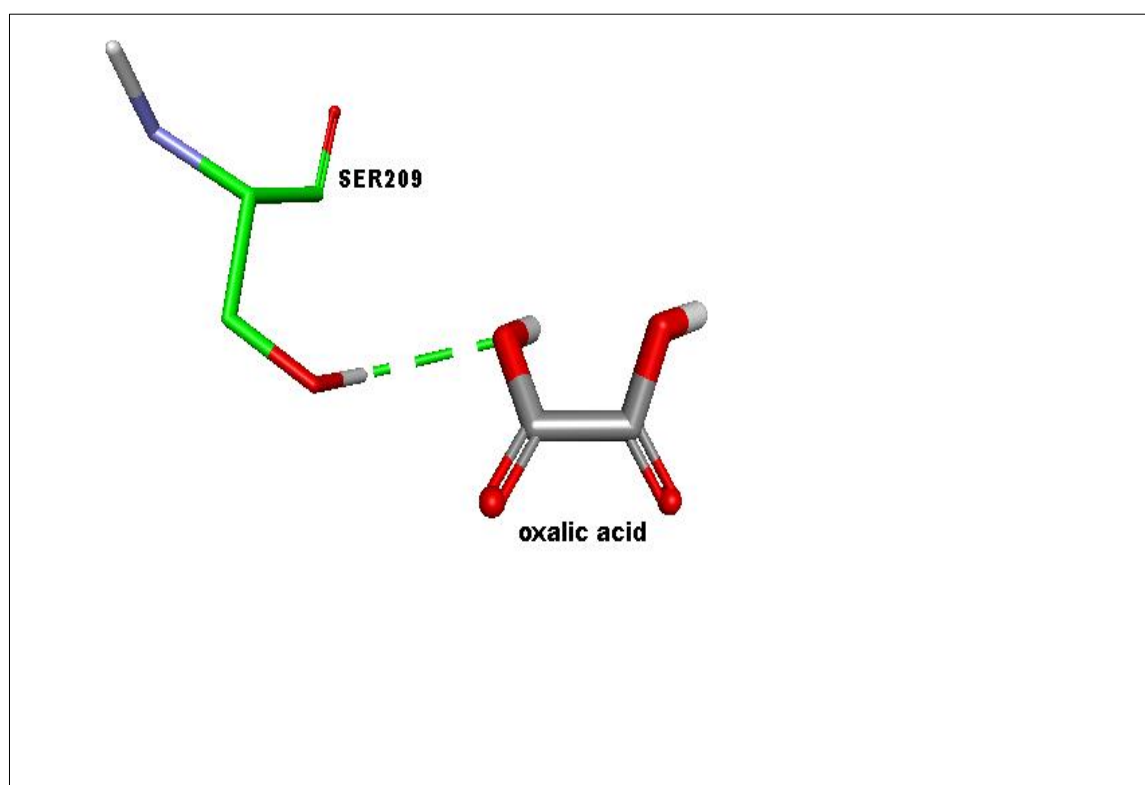


Figure 31. Représentation de la meilleure position obtenue par Docking pour l'acide oxalique.

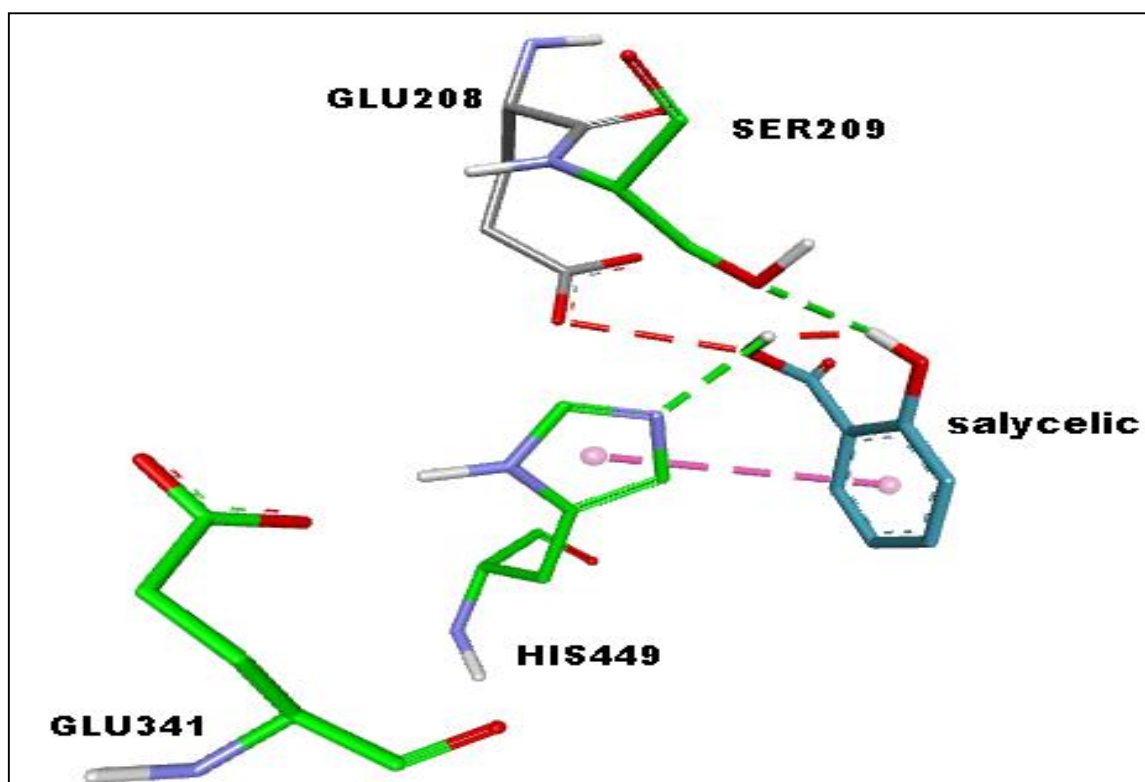


Figure 32. Représentation de la meilleure position obtenue par le Docking pour l'acide salicylique.

CONCLUSION

L'utilisation des molécules bioactifs qui se trouvent dans les plantes médicinales en phytothérapie, a reçu un très grand intérêt dans la recherche biomédicale. Ce regain d'intérêt vient d'une part, du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part, du besoin de la recherche d'une meilleure médication par la thérapie plus douce, sans effets secondaires. Parmi ces molécules biologiquement actifs les terpènes, les composés phénoliques les alcaloïdes et les acides organiques.

Le présent travail a porté sur l'étude de l'effet inhibiteur pour la première fois les trois terpènes : alpha pinène, linalool et myrcène, le composé phénolique qui est l'hispidine et quelque alcaloïdes tels que : harmaline, harmine harmalol et harmol et aussi quelques acides organiques qui sont l'acide ascorbique, benzoïque, citrique, gallique, oxalique et salicylique, sur la lipase de *Candida rugosa*, afin de l'utilisation de ces dernières contre certaines maladies.

Nous nous sommes intéressées dans la première partie à l'étude *in vitro* de ces molécules contre le LCR par la suite nous avons confirmé nos résultats par l'étude *in silico* à l'aide de Docking moléculaire qui présente actuellement un outil efficace pour déterminer l'interaction chimique possible entre l'inhibiteur et l'enzyme.

Le linalool représente le meilleur effet d'inhibition avec une valeur d'IC₅₀ de 0,581 mg/ml tandis que l'acide citrique a enregistré l'effet d'inhibition le plus faible avec une valeur d'IC₅₀ de 4,642 mg/ml. Les résultats obtenus montrent que les molécules ont un pouvoir inhibiteur contre la LCR avec un type compétitif pour huit molécules, incompétitif pour trois et non compétitif pour deux et une molécule n'a prouvé aucune inhibition. La modélisation par Docking moléculaire est effectuée afin d'étudier les interactions chimiques des inhibiteurs avec la lipase de *Candida rugosa* et de confirmer le type d'inhibition.

À travers ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées à savoir que ces molécules présentent des effets inhibiteurs importants. Ce qui est aussi confirmé par l'étude bioinformatique.

Ces résultats importants nous ont encouragés de sélectionner ces molécules pour les tester sur les différents autres types de lipases afin de voir leur effet inhibiteur et les utilisés comme un traitement pour certaines maladies.

REFERENCES

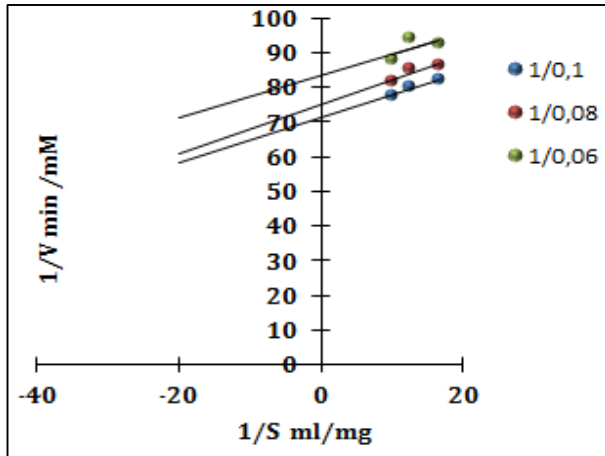
- Afifi, Fatma U., et al.** "Comparison of different methods in determination of essential oil composition of *Origaum syriacum* l. From jordan and its modulation of pancreatic enzymes." *revue roumaine de chimie* 62.1 (2017): 15-21.
- Bataiche, I. 2014.** Recherche de nouvelle potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé se différents milieux naturel pour des applications biologiques. Thèse de Doctorat, université de Constantine,P : 131.
- Beison, F. et al, 2001.** OIL-bodies as substrates for lipolytic enzyme biocim.Biophys.Acta, 1531, 47-58.
- Benarous , K. 2010,** Etude de l'effet inhibiteur des extraites naturels sur la lipase. Mémoire de magister, université Amar telidji-laghouat.p120.
- Benarous, K.2014.** Etude de l'activité anti-oxydante et l'activité inhibitrice de *Peganum harmala*, *Inontus hisidus*, *Marribum vulgare*, *Ziziphus lotus* et *Achillea santolina*.
- Benarous, Khedidja, et al.** "Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies." *Bioorganic chemistry* 62 (2015): 1-7.
- Birari, Rahul, et al.** "Pancreatic lipase inhibitory alkaloids of *Murraya koenigii* leaves." *Natural product communications* 4.8 (2009): 1089-1092.
- Cang, Jian, et al.** "Sesquiterpenes and triterpenoids from the rhizomes of *Alisma orientalis* and their pancreatic lipase inhibitory activities." *Phytochemistry Letters* 19 (2017): 83-88.
- Chae, Hee-Sung, et al.** "Xanthones with pancreatic lipase inhibitory activity from the pericarps of *Garcinia mangostana* L.(Guttiferae)." *European Journal of Lipid Science and Technology* (2016).
- Chen, He-Ping, et al.** "(+)-and (-)-ganodilactone, a pair of meroterpenoid dimers with pancreatic lipase inhibitory activities from the macromycete *Ganoderma leucocontextum*." *RSC Advances* 6.69 (2016): 64469-64473.
- Denuelle P. 1986,** In "Molecular and cellular Basis of Digestion" (PP. Desnuelle, ed.),Pp275-296.Elsevier,Amestrדם.
- Gales, A. 9 Octobre 2009.** Rôle central des monocytes/macrophages dans la défense anti-infectieuse; implication de la polarisation M2et des marqueurs associés Dectine-1, Récepteur Mannose et Interleukine-10, Université Toulouse III-Paul Sabatier, P67.11-156.

- Glisan, Shannon L., et al.** "Inhibition of pancreatic lipase by black tea theaflavins: Comparative enzymology and in silico modeling studies." *Food Chemistry* 216 (2017): 296-300.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J., Cygler M., 1994.** Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.*, 3:82-91.
- Hapokins, W.G. 2003.** *Physiologie végétale*. Edition Debock et lancier. P268-281.
- Hassanaïen F.R and Mukherjee K.D. 1986,** *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 893-897.
- Li, Fang, et al.** "Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from fruits of *Acanthopanax senticosus*." *Chemical and pharmaceutical bulletin* 55.7 (2007): 1087-1089.
- Merrouche M, B. Coffin. 2005.** Obésité : prise en charge, indication et méthodes du traitement endoscopique et chirurgical Obésité : management, indications and methods for endoscopic and surgical. Service d'hépatogastro-entérologie, Paris. France. P 189-200.
- Nagroni, A. 2000.** *Helicobacter pylori* at the end of the second millennium. *Facta universitatis (university of Nis) series: Medicine and biology*, 7, 15-25.
- Pandey A1, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. 1999.** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem.* 29 (Pt 2):119-31.
- Pereira, Mariana Nunes, et al.** "Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart." *Industrial Crops and Products* 97 (2017): 324-329.
- Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Villo, L., Nicolosi, G., Javier Pastor F.I., Diaz, P., Saso, L., 2006.** inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic.* 40: 138-143.
- Shimitt, T., Brocca, S., Schmid, R.D., Pleiss, J., 2002.** Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length, *protein Engineering.* 15 (7) :595-601.
- Sridhar, S. N. C., Seshank Mutya, and Atish T. Paul.** "Bis-indole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata* as potent pancreatic lipase inhibitors: molecular modelling studies and experimental validation." *Medicinal Chemistry Research* (2017): 1-11.
- Uhanik, A; Sen, N; Yilmaz, A. 2010.** Improvement of catalytic activity of lipase from *Candida rugosa* via sol-gel encapsulation in the presence of calyx (aza) crown. *Bioresource Technology* 102(2011) 4313-4318.

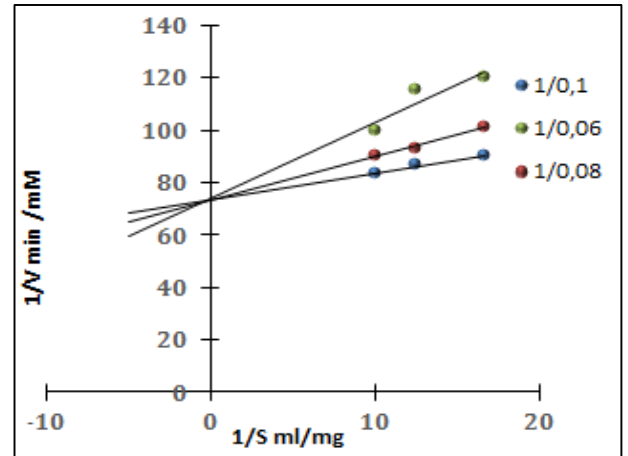
ANNEXE

Les Représentations de Lineweaver Burk

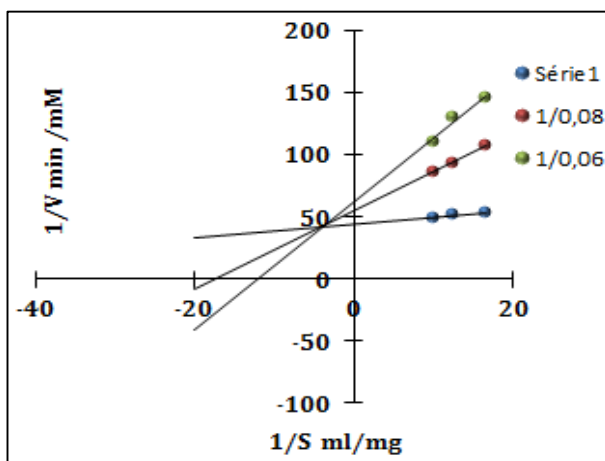
Alpha pinène



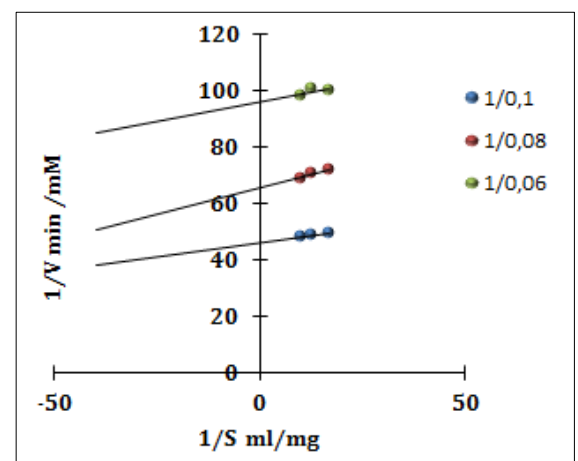
Linalool



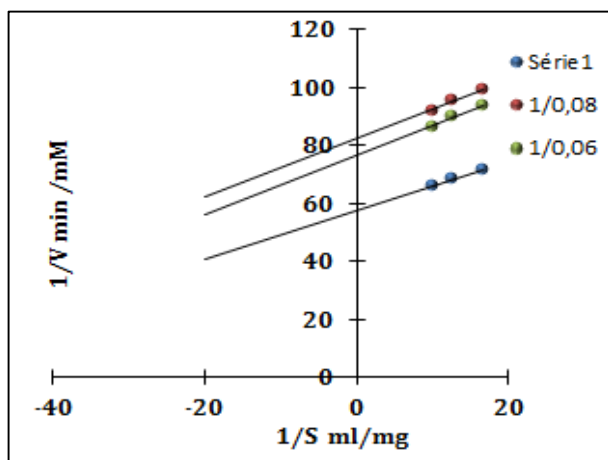
Hispidine



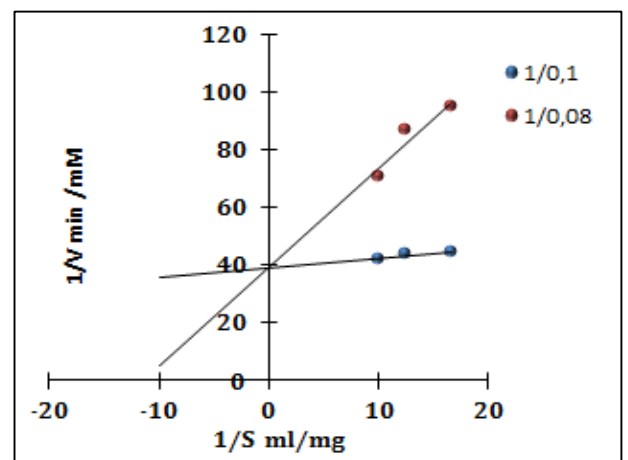
Harmaline



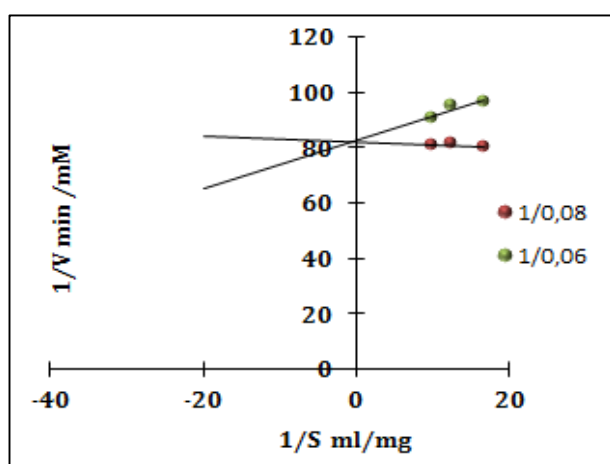
Harmine



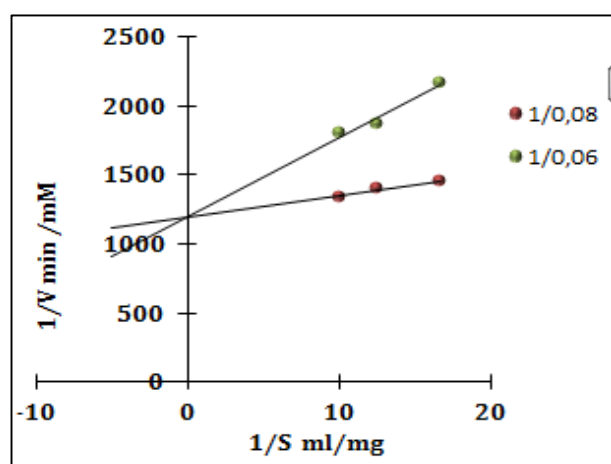
Harmalool



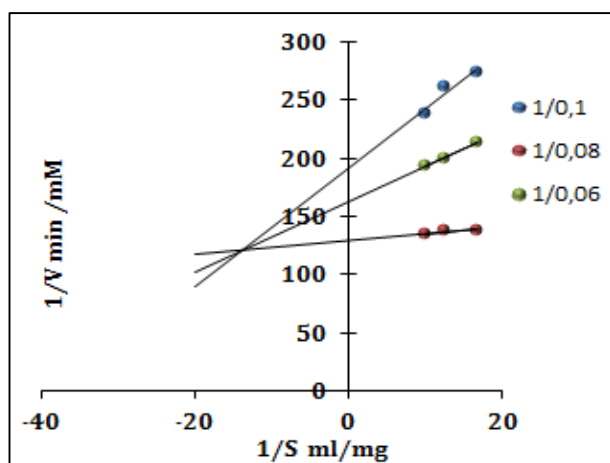
Harmaol



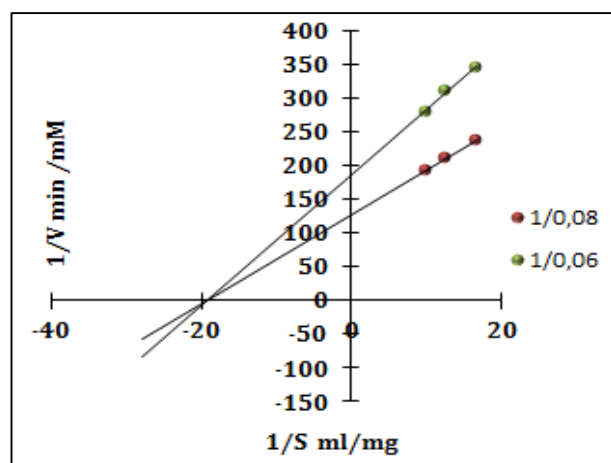
Acide ascorbique



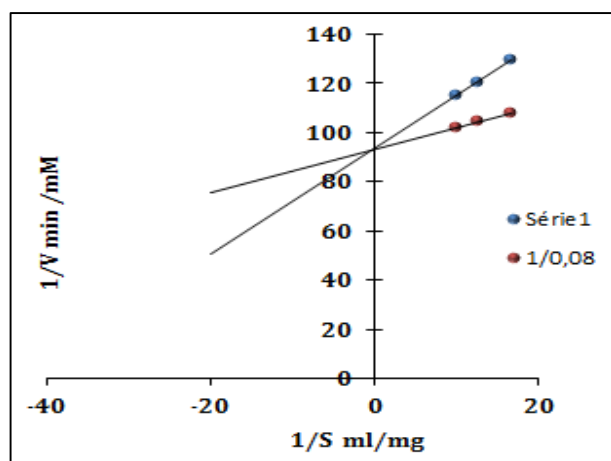
Acide benzoïque



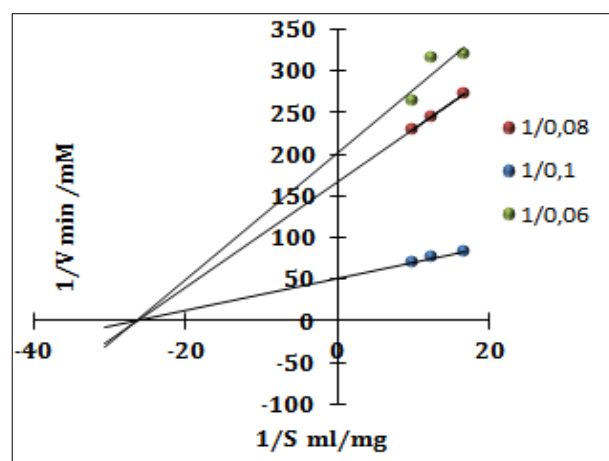
Acide citrique



Acide gallique



Acide oxalique



Salicylique

