

الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biochimie Appliquée

Option : Biochimie des Produits Naturels

THEME

Etude de l'effet inhibiteur de la lipase de *Candida rugosa* par les extraits des plantes *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crista*

Par :

BOUHOUN EL AMINE

Devant le jury composé de :

Mme. BOUSSOUSSA Hadjer

M.A.B

Président

M. DJERIDANE Amar

M.C.A

Examineur

Mme. BENAROUS Khedidja

M.A.A

Rapporteur

Année Universitaire 2013/2014

Dédicace

- Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

- Mon très cher père et Ma mère

- Mon frère et Mes sœurs

- Mon gendre

- Mon Ami

-Toute ma famille

- With Allah's help, I was able to achieve this modest work that I dedicate:

- My dear father and my mother

- My brother and my sisters

- My Brother-in-Law

- My friend

-My whole family

Remerciements

Elhamdelellah, le Miséricordieux de m'avoir donné foi, volonté et courage pour atteindre mon objectif.

***Je** tiens à exprimer mes sincères remerciements au Pr Mohamed YOUSFI, Directeur de laboratoire des recherches de l'Université de Laghouat, pour avoir autorisé la réalisation de ce mémoire au sein du laboratoire de recherche .*

***Je** voudrais rendre un hommage particulier à ma chère promotrice Mme BENAROUS Khaddidja, pour avoir accepté de m'encadrer pour le choix du thème et pour avoir participé activement à la correction de ce mémoire. Ses compétences techniques et son efficacité ont fortement contribué à la réalisation de ce mémoire.*

***Mes** sincères remerciements iront également à mon ami M Abderhmane LINANI, pour son aide appréciable. son soutien moral pendant toute la durée de ce travail était inestimable.*

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

***Mes** remerciements vont également à mes enseignants, leur disponibilité et leurs précieux enseignements ont été fortement utiles.*

***En** préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à la réussite de cette formidable année académique.*

***Enfin,** les mots me manquent pour exprimer ma profonde reconnaissance à ma tendre famille dont l'amour, la patience et le sacrifice s'inscrivent à chaque page de ce document.*

Résumé

Historiquement, les produits naturels présentent des activités biologiques importantes. C'est pour cette raison qu'ils ont permis d'importantes avancées pharmaceutiques en fournissant notamment des agents thérapeutiques. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés dans la première partie à l'extraction et la quantification des différents composés des deux plantes locales *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crispa* telles que les composés phénoliques et les flavonoïdes. Les résultats obtenus montrent que les extraits sont riches en composés phénoliques dont les teneurs varient de $256,25 \pm 11,59$ mg/g à $390,277 \pm 24,02$ mg/g GAE et riches en flavonoïdes dont les teneurs varient entre $180,448 \pm 17,54$ mg/g à $408,333 \pm 11,53$ mg/g RE. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié l'effet inhibiteur des extraits sur l'activité enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* (LCR), et la constante d'inhibition K_i et aussi l'isolement du composé inhibiteur par colonne chromatographique. Les résultats obtenus montrent que la majorité des extraits des deux plantes étudiées ont présenté un pouvoir inhibiteur important contre la LCR qui sont de type d'inhibition compétitive avec un IC 50 qui varie entre 1,29 g/l et 1,76 g/l. La dernière partie est consacrée à l'étude bio-informatique de molécules inhibitrices vis-à-vis de la LCR et la lipase pancréatique humaine (HPL), reposant sur le docking moléculaire et en utilisant le logiciel GOLD. Nos résultats présentent 10 solutions possibles de fixation de l'inhibiteur dans le site actif de LCR et de HPL en se basant sur la distance interatomique minimale (DI) entre la fonction hydroxyle de l'acide aminé (Ser 209 pour LCR et Ser 152 pour HPL) et la fonction cétone de la molécules isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside isolée de *Haloxylon scoparium* et l'apigenin-7-glucoside isolé du *Pilularia crispa*. Nous avons obtenu une DI de 1,2 Å et 1,5 pour la LCR et de 0,8 et 1,4 Å pour la HPL. Ces résultats montrent que les deux inhibiteurs présentent une meilleure affinité vis-à-vis la HPL que la LCR. Ces résultats nous encourageons de continuer ce travail par des tests in vivo afin de vérifier ces résultats.

Mots clés : *Haloxylon scoparium*, *Pilularia crispa*, Les composés phénoliques, Flavonoïdes, Inhibition enzymatique, LCR, HPL, Docking.

Abstract

Historically, natural products present important biological activities. It is for this reason that they have led to significant advances in pharmaceutical providing various therapeutic agents. In this work, we interested in the first part to the extraction and the quantification of the various phenolic compounds and flavonoids of both local plants *Haloxylon scoparium* and *Pilularia crispera*. The obtained results show that extracts are rich in polyphenols compounds which content vary between $256,25 \pm 11,59$ mg / g and $390,277 \pm 24,02$ mg/g GAE .They are also rich in flavonoids varied between $180,448 \pm 17,54$ mg/g and $408,333 \pm 11,53$ mg/g RE. In the second part of this work, we are interested to study the inhibitory effect of the extracts on the enzymatic activity of *Candida rugosa* lipase (CRL), than the isolation of the inhibitor compound by chromatographic column. We found that all the plants tested showed a significant inhibitory potency of the lipase with one type of inhibition competitive with an IC 50 varied between 1,29 g/l and 1,76 g/l. In the last part of this work, we have studied using bioinformatics tools the binding of the inhibitor into LCR and human pancreatic lipase (HPL), basing on the molecular docking using GOLD software. The obtained results have shown 10 binding modes of the inhibitor in the active site of CRL and HPL, according to the lower interatomic distances (ID) between the hydroxyl function of the amino acid (Ser 209 for CRL, Ser 152 for HPL) and the ketone function of isolated isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside from *Haloxylon scoparium* and isolated Apigenin-7-glucoside from *Pilularia crispera*. We obtained an ID varied between 1,2 Å and 1,5 for the LCR and 0,8 Å and 1,4 for the HPL. These results show that both inhibitors present a better affinity for the HPL than the LCR. These results needs tests in vivo to verify them.

Keywords: *Haloxylon scoparium*, *Pilularia crispera*, Polyphenol, Flavonoids, enzymatic Inhibition, LCR, HPL, Docking.

الملخص

اثبتت المنتجات الطبيعية تاريخيا أن لها أنشطة بيولوجية مهمة وهي السبب في التقدم الكبير في توفير العوامل العلاجية. في إطار هذا العمل ، قمنا باستخراج مختلف المركبات الفينولية من نباتات طبية محلية هي *Haloxylon scoparium* و *Pilularia crispa* أظهرت النتائج بأن المستخلصات غنية بالمركبات الفينولية حيث تتراوح قيمتها من $11,59 \pm 256,25$ مغ / غ الى $390,277 \pm 24,02$ مغ / غ GAE و غنية ايضا بالفلافونويدات حيث تتراوح قيمتها بين $17,54 \pm 180,448$ مغ / غ و $11,53 \pm 408,333$ مغ / غ RE. في الجزء الثاني من هذا العمل ، درسنا تأثير هذه المستخلصات على النشاط الانزيمي لليباز من *candida rugosa* ، وقياس ثابت التثبيط KI وحاولنا إستخراج المركب المسؤول عن هذا التثبيط باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا. اثبتت النتائج المتحصل عليها هي ان معظم مستخلصات النباتات المدروسة تملك نشاط تثبيطي مهم ومن نوع تنافسي حيث تتراوح قيمة IC50 بين 1,29 غ / ل و 1,76 غ / ل. فيما يتعلق بالجزء الأخير ، قمنا باقتراح الجزيئات المسؤولة عن هذا التثبيط إعتمادا على البحوث السابقة، ثم قمنا بعملية الارساء باستخدام التقنية البيومعلوماتية للإنزيمي الليباز LCR و HPL. بينت النتائج وجود 10 حلول ممكنة لتثبيط هذا المثبط داخل الموقع الفعال للإنزيم استنادا على اصغر مسافة ذرية بين الوظيفة الهيدروكسيلية للحمض الاميني ser 209 لأنزيم LCR او ser 152 لأنزيم HPL والوظيفة الكيتونية للمركب isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside من نبات *Haloxylon scoparium* او apigenin-7-glucoside من نبات *Pilularia crispa*. كانت هذه النتائج مشجعة لمواصلة هذا العمل في الوسط الحيوي.

كلمات مفتاحية: المركبات الفينولية، الفلافونويدات، تثبيط انزيمي ، *Haloxylon scoparium*

. *Pilularia crispa*

Liste des Abréviations

A-C-D

3 D 3 Dimension

Ac-o-et Acétate d'éthyle

Å Angstrom

Ala Alanine

CCM Chromatographie sur
Couche Minces

CoA Co Enzyme

Cys Cystéine

°C Degré Celsius

G-H-I

GA Algorithme Génétique

GAE Equivalent en acide gallique

Glu Glutamine

GOLD Genetic Optimization Ligand For
Docking

Gly Glycine

Hs *Haloxylon scoparium*

HPL Lipase pancréatique humaine

I % le pourcentage d'inhibition

GAE Equivalent en acide gallique

IC50 la concentration nécessaire de
l'inhibiteur pour inhiber 50 % de
l'activité enzymatique

L

LCR Lipase de *Candida rugosa*

O-P

OMS Organisation Mondiale de la
Santé

PAL Phénylalanine Ammonia
Lyase

Pro Proline

PC *Pilucaria crispa*

p-NP p-nitrophénol

p-NPL para nitrophényl-laurate

R-S

R % Rendement

RE Equivalent en rutine

S Système

Ser Serine

U

UV Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie de shikimate	399
Figure 2 : Structure générale des flavonoïdes	21
Figure 3 : La LCR avec la triade catalytique	198
Figure 4. Les acides aminés formant le tunnel.....	218
Figure 5. La candidose orale	Erreur ! Signet non défini.0
Figure 6. La candidose au niveau de la muqueuse œsophagienne	Erreur ! Signet non défini.0
Figure 7. Classification des inhibiteurs de la lipase.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 8. Étapes typiques d'un docking.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 9. Les différents types de docking	Erreur ! Signet non défini.7
Figure 10. Le protocole d'extraction des composés phénoliques	Erreur ! Signet non défini.2
Figure 11. Migration du solvant à travers la plaque CCM.....	Erreur ! Signet non défini.3
Figure 12. La réaction de trichlorure d'aluminium.....	Erreur ! Signet non défini.4
Figure 13. L'hydrolyse de p-nitrophényllaurate par la lipase microbienne	Erreur ! Signet non défini.5
Figure 14. Séparation par colonne Chromatographique.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 15. CCM des extraits dans le visible	52
Figure 16. CCM des extraits dans l'UV à 254 nm.....	Erreur ! Signet non défini.2
Figure 17. CCM des extraits dans l'UV à 366 nm.....	Erreur ! Signet non défini.2
Figure 18. CCM des extraits avec révélation par le folin ciocalteu	513
Figure 19. CCM des extraits avec révélation par AlCl ₃	513
Figure 20. CCM des extraits avec révélation par DPPH.....	513
Figure 21. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	525
Figure 22. Courbe d'étalonnage de la rutine.....	526
Figure 23. Les teneurs des fractions acétate d'éthyle en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits	526
Figure 24. La courbe d'étalonnage de p-nitrophénol	547
Figure 25. Courbe de l'IC 50 du système hydroalcoolique ternaire de la plante <i>Haloxylon scoparium</i>	59
Figure 26. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique ternaire de la plante <i>Haloxylon scoparium</i>	55
Figure 27. Courbe de l'IC 50 du système hydroalcoolique binaire de la plante <i>Haloxylon scoparium</i>	590
Figure 28. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique binaire de la plante <i>Haloxylon scoparium</i>	591
Figure 29. Courbe de l'IC 50 du système hydroalcoolique ternaire de la plante <i>Pilularia crispa</i>	601
Figure 30. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique ternaire de la plante <i>Pilularia crispa</i>	602
Figure 31. Courbe de l'IC 50 de système hydroalcolique binaire de la plante <i>Pilularia crispa</i>	612
Figure 32. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique binaire de la plante <i>Pilularia crispa</i>	613
Figure 33. Courbe de l'IC 50 de Harmaline.....	623
Figure 34. La représentation de de Dixon de Harmaline	624
Figure 35. La plaque CCM avant et après la réaction enzymatique.....	635
Figure 36. Courbe de l'IC 50 de la fraction Isolée.....	636
Figure 37. La représentation de Dixon de la fraction isolée.	566
Figure 38. Les structures 2D et 3D d'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside	658
Figure 39. La structure 2D et 3D d'Apigenin-7-glucoside	68
Figure 40. Calcul de l'énergie pour LCR.....	69
Figure 41. Calcul de l'énergie pour HPL.....	69
Figure 42. Calcul de l'énergie pour isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside.....	69
Figure 43. Calcul de l'énergie pour Apigenin-7-glucoside.....	700
Figure 44. Minimisation de l'énergie pour isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside.....	700
Figure 45. Minimisation de l'énergie pour apigenin-7-glucoside.....	700
Figure 46. Optimisation de la Structure de la LCR.....	711

Figure 47. Optimisation de la Structure de la HPL	711
Figure 48. Docking de l'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside B dans la LCR	722
Figure 49. Docking de l'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside dans la HPL	722
Figure 50. Docking de L'Apigenin-7-glucoside dans la LCR	733
Figure 51. Docking de l'Apigenin-7-glucosidedans la HPL	733

Liste des tableaux

Tableau 1. Structure des squelettes des polyphénols	389
Tableau 2. Structures des squelettes de base des flavonoïdes	19
Tableau 3. Les différents flavonoïdes glycosylés	223
Tableau 4. Classification des lipases	236
Tableau 5. Définition et classification des obésités de l'adulte d'après l'OMS	263
Tableau 6. L'obésité en chiffres	323
Tableau 7. Les descriptions des deux plantes étudiées	39
Tableau 8. Les molécules présentes dans les plantes <i>Haloxylon scoparium</i> et <i>Pilularia crista</i>	48
Tableau 9. Teneurs, couleurs et aspects des différentes fractions	501
Tableau 10. L'interprétation des différents CCM des extraits	534
Tableau 11. La teneur en phénols totaux des plantes investiguées	545
Tableau 12. La teneur en flavonoïdes totaux des plantes investiguées	56
Tableau 13. Tests préliminaires d'inhibition des différents extraits des deux plantes	58
Tableau 14. Les IC ₅₀ , K _i et les types d'inhibition des extraits	584
Tableau 15. Les différentes fractions et leur rendement	645
Tableau 16. L'IC ₅₀ , K _i et les types d'inhibition de la fraction isolée	67
Tableau 17. L'énergie et le gradient des différentes molécules	68

Table des matières

INTRODUCTION.....	Erreur ! Signet non défini.3
-------------------	------------------------------

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES METABOLITES SECONDAIRES.....	16
-------------------------------------	----

I. PRESENTATION DES PLANTES ETUDIEES	17
--	----

II. LES METABOLITES SECONDAIRES.....	19
--------------------------------------	----

III. LES COMPOSES PHENOLIQUES	20
-------------------------------------	----

II. LES LIPASES	28
-----------------------	----

I. DEFINITION	29
---------------------	----

II. LES REACTIONS CATALYSEES PAR LES LIPASES	29
--	----

III. ORIGINES ET CLASSIFICATION DES LIPASES.....	30
--	----

IV. LA LIPASE DE CANDIDA RUGOSA	31
---------------------------------------	----

V. LES MALADIES CAUSEES PAR LA LIPASE.....	33
--	----

VI. LA CLASSIFICATION DES INHIBITEURS DE LA LIPASE.....	37
---	----

III. ETUDE BIO-INFORMATIQUE	39
-----------------------------------	----

I. IMPORTANCE DE L'OUTIL INFORMATIQUE EN BIOLOGIE	40
---	----

II. LE DOCKING	40
----------------------	----

MATERIELS ET METHODES

I. EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES DIFFERENTS METABOLITES.....	43
---	----

I. ANALYSE QUALITATIVE	44
------------------------------	----

II. ANALYSE QUANTITATIVE	46
--------------------------------	----

II. ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	48
--	----

I. INHIBITION DE LA LIPASE	49
----------------------------------	----

II. CINETIQUE DE LA LIPASE	49
----------------------------------	----

III. ISOLEMENT PAR COLONNE PREPARATIVE	49
--	----

III. ETUDE BIO-INFORMATIQUE	Erreur ! Signet non défini.
--	------------------------------------

I. LE CHOIX DES INHIBITEURS	52
II. CONSTRUIRE LA STRUCTURE DES INHIBITEURS.....	52
III. CALCULES DE L'ENERGIE ET LE GRADIENT.....	52
IV. OPTIMISATION DE LA STRUCTURE DES INHIBITEURS.....	53
V. OPTIMISATION DE LA STRUCTURE DE LA LIPASE DE CANDIDA RUGOSA	53
VI. DOCKING DES INHIBITEURS	53

RESULTATS ET DISCUSSION

I. EXTRACTION ET QUANTIFICATION DES DIFFERENTS METABOLITES.....	55
--	-----------

I. ANALYSE QUALITATIVE	55
II. ANALYSE QUANTITATIVE	59

II. ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.....	62
---	-----------

I. INHIBITION DE LA LIPASE	62
II. CINETIQUE DE LA LIPASE	68
III. ISOLEMENT PAR COLONNE PREPARATIVE	69

III. ETUDE BIO-INFORMATIQUE	73
--	-----------

I. LE CHOIX DES INHIBITEURS	74
II. CONSTRUCTION DE LA STRUCTURE DES INHIBITEURS	74
III. CALCULES DE L'ENERGIE ET LE GRADIENT ET OPTIMISATION	74
IV. DOCKING DES INHIBITEURS	78

CONCLUSION.....	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	77

INTRODUCTION GENERALE

Depuis plusieurs années, l'homme qui vit côte à côte avec les plantes, est habitué à les consommer pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie (Pourbaix *et al.*, 2000).

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque et romaine. Le pouvoir thérapeutique des plantes était connu par nos ancêtres de façon empirique. Ainsi, on ignorait tout de la composition chimique des remèdes utilisés tous les jours par de nombreuses populations, pour les besoins de santé (Corrosion engineering, 2000).

De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (Fiaud, 2006).

L'Algérie, en dépit de sa localisation dans une zone tempérée loin de la biodiversité des hot spots "points chauds", possède des zones biogéographiques parmi les plus rares au monde et une biodiversité de première importance avec beaucoup de plantes d'intérêt thérapeutique (Elayyachy *et al.*, 2006).

Les propriétés pharmaco-biologiques des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés appartenant à différentes classes biochimiques, ont fait preuve de leurs diverses activités biologiques comme des inhibiteurs de la lipase issue de plusieurs organismes vivants, en citant les saponines comme β -aescin (Ruiz *et al.*, 2006), les flavonoïdes comme catéchine (Ruiz *et al.*, 2006).

Les lipases sont des esters glycérols hydrolases qui agissent sur les triacylglycérols pour libérer les acides gras, la lipase pancréatique humaine et leur activité excessive cause l'obésité qui 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 (Stolley *et al.*, 2008). Plusieurs lipases qui sont produites par des microorganismes pathogènes jouent un rôle important dans les maladies infectieuses, tels que l'ulcer (Borrelli & Izzo, 2002), candidiose (Tizki *et al.*, 2012).

Le présent travail a pour objectif de faire l'extraction des composés phénoliques de champignons *Inonotus hispidus* collecté à partir d'un arbre *P. atlantica* et tester les différents extraits de ce champignon et évaluer leurs pouvoirs inhibiteurs contre la lipase de *Candida rugosa*.

Dans ce cadre, nous avons défini une stratégie de recherche en commençant par le premier chapitre qui s'intéresse à l'extraction et la quantification des différents composés phénoliques des deux plantes *Haloxylon scoparium*, *Pulicaria crispa*. Dans le deuxième chapitre, nous étudions l'activité inhibitrice de nos extraits sur la lipase de *Candida rugosa* et déterminer leurs types d'inhibition et de réaliser des empreintes chromatographiques (CCM) pour les différents extraits avec différents révélateurs. Et aussi nous allons fractionner et isoler le composé inhibiteur par CCM et colonne chromatographique.

Dans le dernier chapitre, nous proposons les molécules inhibitrices en se basant sur les différentes données expérimentales et bibliographiques. 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* et la lipase pancréatique humaine par le Docking moléculaire des molécules inhibitrices (isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside, Apigenin-7-glucoside).

Synthèse bibliographique

I. LES METABOLITES SECONDAIRES

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle, au niveau de la plante, est mal connu. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général : ce sont des métabolites secondaires, n'exerçant pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...). Ils sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction (Guignard *et al.*, 1985). Les métabolites secondaires produits par les plantes montrent une grande diversité structurale. Les caractéristiques biochimiques et physiologiques sont fortement corrélées avec ses fonctions et ses structures chimiques. Ils ne sont pas des déchets inutiles mais aussi des outils importants de plantes, nécessaires contre les herbivores, les microbes (bactéries, champignons) et les virus (Guignard *et al.*, 1985).

Une partie des métabolites secondaires fonctionnent aussi comme molécules de signalisation pour attirer les pollinisateurs arthropodes. En raison des propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires, plusieurs d'entre eux sont utilisés en médecine pour traiter les troubles et les infections. D'autres sont intéressantes dans la biotechnologie en tant que pesticides rationnels (Guignard *et al.*, 1974). Les métabolites secondaires peuvent être classés en quatre grandes catégories : les composés aromatiques, les composés azotés (les alcaloïdes), les terpènes et les hétérosides (Guignard *et al.*, 1985).

II. COMPOSES PHENOLIQUES

II.1. Généralités

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Bruneton, 1993). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Mompon *et al.*, 1998). Selon leurs caractéristiques structurales, elles se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2007). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (Harbone, 1993).

Elles sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénoliques, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes

représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile à une présentation globale ce ci dues à des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement (Bruneton, 1993).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café, thé ou vin apportant le reste (Middleton *et al.*, 2000).

Les recherches des dix à quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de processus vitaux les plus divers (Middleton *et al.*, 2000).

Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours claires. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques (Brzozowska *et al.*, 1973) et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre (Loche, 1966).

Des travaux plus anciens (Nitsch, 1961) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leur effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ses propriétés antifongique et antibactérienne (Heimeur *et al.*, 2004). Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des Cistus et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée les anthocyanes, composés de couleurs rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs (Dubois *et al.*, 1977).

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydante sont très marquées (Dubois *et al.*, 1977).

II.2. Biosynthèse

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (Figure 1). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, li-gnanes et lignines, coumarines (Bruneton, 1993).

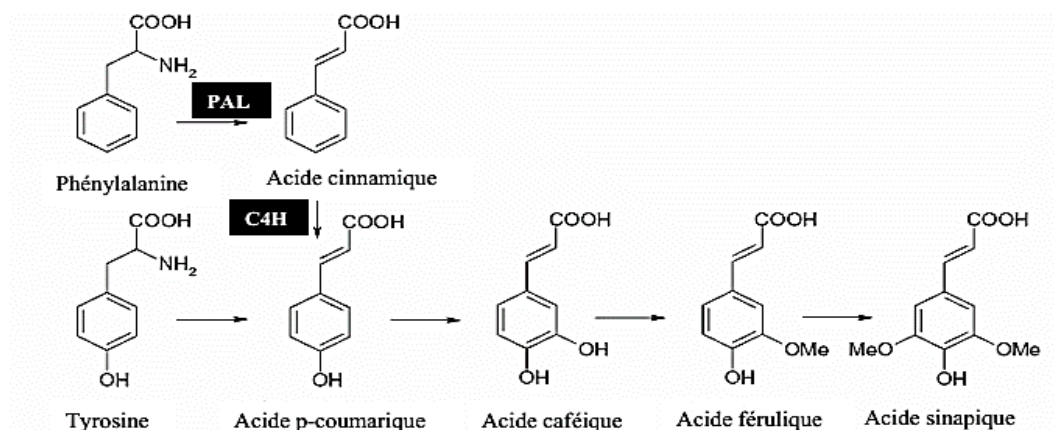
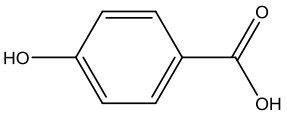
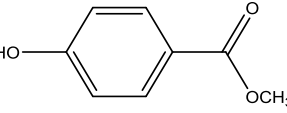
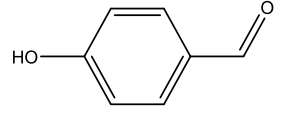


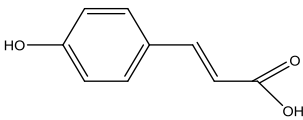
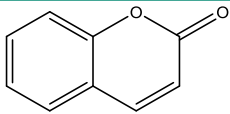
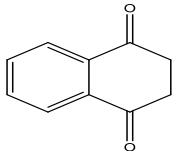
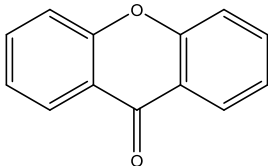
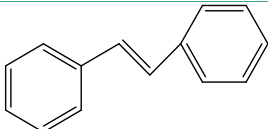
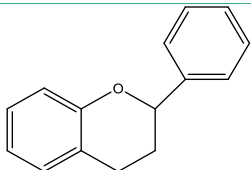
Figure 1 : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier *et al.*, 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate

II.3. Classification des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 1). Ces molécules sont généralement trouvées conjuguées aux sucres et aux acides organiques.

Tableau 1. Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénone	Gallactophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide p hydroxyphénylacétique	

9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglon	
13	C ₆ -C ₂ -C ₁	Xanthones	Magniferine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₂	Stilbénoides	resvératrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

II.4. Les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique ([Bruneton, 1993](#)).

II.4.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque

Les acides phénols en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondant à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique ([Bruneton, 1993](#)).

II.4.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique

La plupart des acides phénols en C₆-C₃ (acides o-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents ([Bruneton, 1993](#)). Les acides cinnamiques et caféiques sont des représentants communs du

groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation (Cowan, 1999).

II.4.3. Phénols simples

Tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montrés pour leurs toxicités vis-à-vis des microorganismes (Cowan, 1999).

II.5. Flavonoïdes

II.5.1. généralités

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane (Yao *et al.*, 2004) (Figure 2).

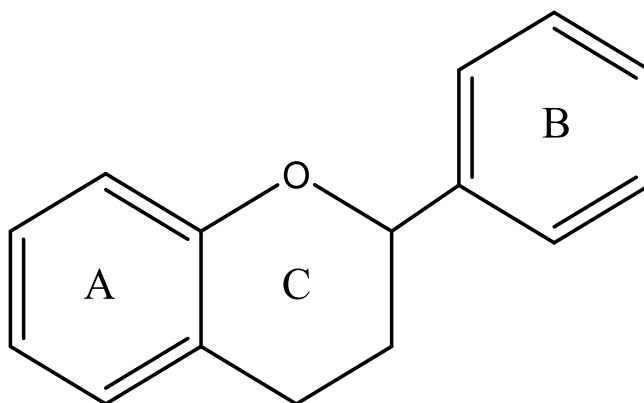


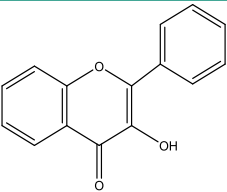
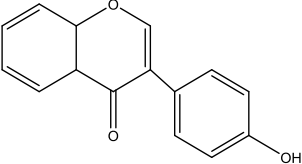
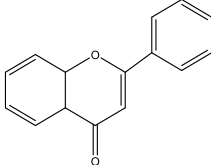
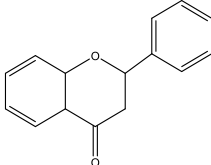
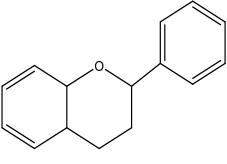
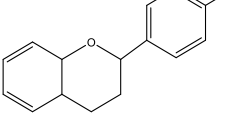
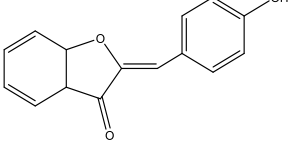
Figure 2. Structure générale des flavonoïdes

II.5.2. Les différentes classes de flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo

(Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; aurones (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003) (Tableau 2).

Tableau 2. Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002)

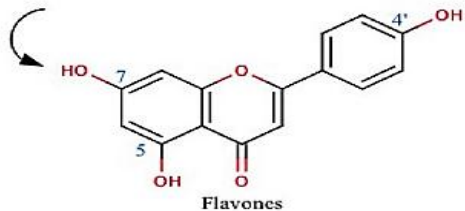
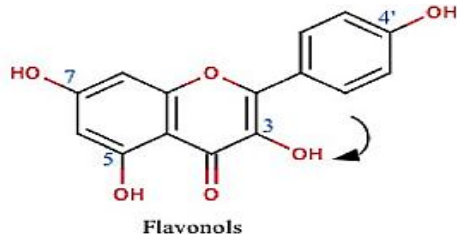
Nom	Structure
flavonole	
isoflavonole	
flavones	
Isoflavones	
flavanes	
flavanols	
aurones	

II.5.3. Substitutions

➤ Substitutions par les sucres

Il s'agit d'hétérosides car il y a une liaison entre une génine et un sucre. La génine possède des groupements -OH sur lesquels se fixent les sucres, on parle donc d'un O-hétéroside. (Sur les génines on fixe des sucres = un phénol réagit sur un sucre (Havsteen, 2002) (Tableau 3).

Tableau 3. Les différents flavonoïdes glycosylés (Havsteen, 2002).

les flavones	les flavonols
la position la plus couramment substituée par les sucres est la position 7	les sucres se substituent majoritairement en 3
 Flavones	 Flavonols

II.6. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculo-protectrices sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Hodek *et al.*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre)

qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker *et al.*, 1996). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-œstrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telles que l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers Citrus) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle *et al.*, 2007).

Les acides phénols et ses dérivés sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (Hennebelle *et al.*, 2007). Les composés possédant les activités antioxydants et anti radicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (Bossokpi, 2002). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuses du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tel que la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer. Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (Lee *et al.*, 2005).

III.LES LIPASES

III.1 Définition

Les lipases (Triacylglycerol-acylhydrolases) (E.C.3.1.1.3) jouent un rôle important dans le métabolisme des graisses et sont présentes dans la plupart des tissus animaux et végétaux, mais aussi dans de nombreux micro-organismes. La fonction biologique des lipases est de catalyser l'hydrolyse d'esters comme les triglycérides. Elles reconnaissent différemment les acides gras selon leur degré d'insaturation et la longueur de la chaîne carbonée. Cependant, elles sont capables d'hydrolyser une très grande variété de substrats naturels et non-naturels et de réaliser en milieu organique des réactions de synthèse (Pandey *et al.*, 1999).

III.2 Les réactions catalysées par les lipases

III.2.1 Les réactions d'hydrolyse



Les lipases sont capables de catalyser des réactions d'hydrolyse en milieu aqueux, biphasique ou dans des solvants polaires fortement hydratés. Le système biphasique résulte de la présence d'une phase organique non miscible à l'eau, cette phase étant constituée soit du substrat seul soit du substrat dissous dans un solvant non miscible à l'eau. Les réactions d'hydrolyse catalysées par les lipases trouvent des applications dans la production d'acides gras, de mono et diglycerides et d'arômes dans les détergents et l'industrie du cuir.

L'application de l'hydrolyse (ou digestion de lipides) est répondeu dans domaine du nettoyage (vaisselle, carrelage, lessive, etc....)

III.2.2 Les réactions de synthèse

Dans des milieux non conventionnels à faible activité de l'eau, qui représente la disponibilité de l'eau, les lipases sont capables de catalyser une grande variété de réactions de synthèse :

- **L'estérification**



- **La transestérification**

Alcoolyse : par échange du groupement alcool



Acidolyse : par échange du groupement acyle



- **Interesterification**

Par échange du groupement acyle et alcool



IV. Origines et classification des lipases

Les lipases sont largement répandues dans la nature où elles ont un rôle physiologique important dans le métabolisme des graisses. On les retrouve aussi bien dans le règne végétal, chez les

invertébrés et les vertébrés mais également chez de nombreux micro-organismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires (Tableau 4).

Tableau 4. Classification des lipases

Les lipases végétales	répandues au sein de la plante bien qu'on les retrouve principalement dans les graines où les triglycérides sont stockés dans des structures intracellulaires appelées oléosomes (ou oil bodies), (Beisson <i>et al.</i>, 2001). Sous l'action des lipases, ces triglycérides sont hydrolysés sous forme d'acides gras dont le rôle est de fournir l'énergie nécessaire à la germination de la graine et au développement de la jeune plante (Adlercreutz <i>et al.</i>, 1997).
Les lipases des mammifères	Chez l'homme ainsi que chez d'autres vertébrés, les lipases interviennent dans le contrôle de la digestion, de l'absorption et de la reconstitution des graisses. peuvent être classées en trois groupes. Le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguales, pharyngales, gastriques et pancréatiques. Le second groupe correspond aux lipases présentes dans le cerveau, les muscles, les artères, les reins, la rate, la langue, le foie et les tissus adipeux. Le troisième groupe correspond aux lipases produites par les glandes galactogènes produisant le lait maternel (Baba <i>et al.</i>, 1991).
Les lipases microbiennes	répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram + telles que celles des genres <i>Bacillus</i> et <i>Staphylococcus</i> que par des bactéries Gram – telles que <i>Pseudomonas</i>. Elles sont également largement répandues chez les levures du genre <i>Candida</i> ou <i>Geotrichum</i> ainsi que chez les champignons filamenteux tels que <i>Rhizopus</i> ou <i>Thermomyces</i> (Baba <i>et al.</i>, 1991).

V. La lipase de *Candida rugosa*

La lipase de *Candida rugosa* (connu 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).

Comme toutes les autres lipases microbiennes, la LCR hydrolyse préférentiellement des triglycérides en position sn-1/3. Seulement quelques lipases comprenant la LCR hydrolysent aussi plus faiblement dans sn-2, (Rogalska *et al.*, 1993).

La LCR a un large profil de substrats où se diffèrent principalement dans la longueur de la chaîne aliphatique (longue et courte) des esters et la nature des acides gras (saturés et polyinsaturés) (Osada *et al.*, 1990). Avec une préférence distincte pour les acides gras de la longueur C4, le C8, le C10 et le C12, (Janssen et Halling, 1994).

La LCR est une protéine de 534 acides aminés, dont trois d'eux constituent la triade catalytique (Ser 209, His 449 et Glu 341) formant 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 « the lid or flap » 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 Leu 304, Leu 410, Ser 300, Leu 365, Leu 413 et Pro 246 (figure 3 et 4) (Benarous, 2010 ; Grochulski *et al.*, 1994 ; Schmitt *et al.*, 2002).

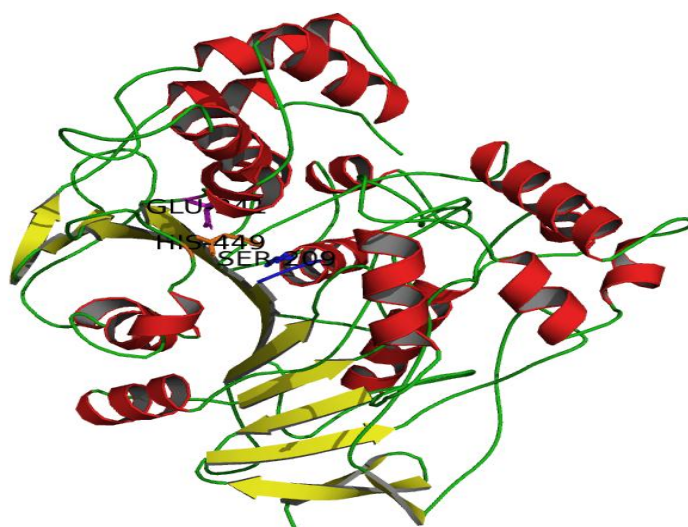


Figure 3. La LCR avec la triade catalytique (Ser209, coloré en bleu) (Glu341 coloré en violet) (His449 coloré en orange)

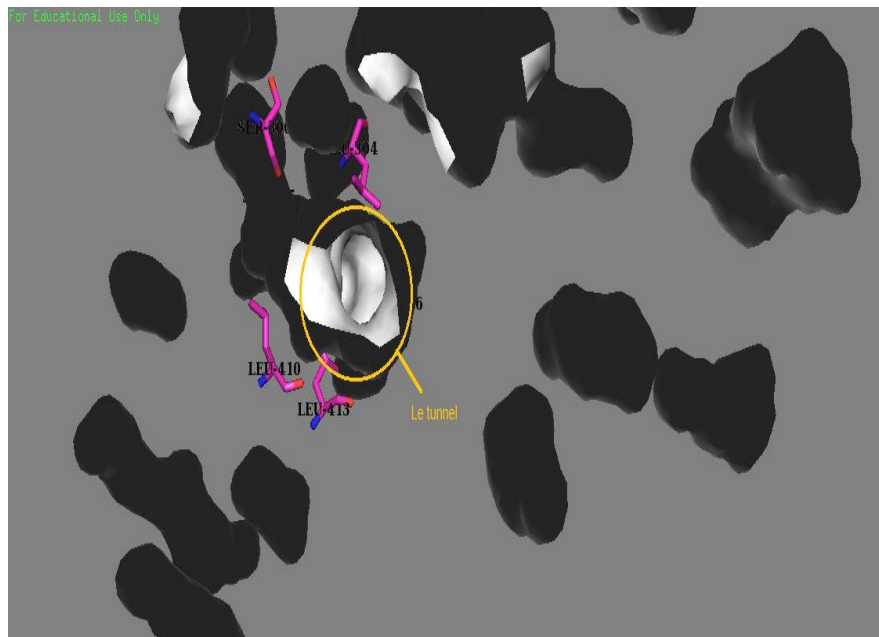


Figure 4. Les acides aminés formant le tunnel (Leu 365, Leu 413, Leu 304, Leu304, Pro 246, Leu410 et Ser 300)

VI. Les maladies causées par la lipase

VI.1. La Candidose

VI.1.1. Généralités

A la fin du dernier siècle s'est développé un nouveau type de pathologie, d'abord restreinte aux pays développés : la pathologie « opportuniste ». L'émergence de ces nouvelles maladies a été largement favorisée par les modifications éco-éthologiques des populations, l'évolution rapide des techniques médico-chirurgicales, et l'immunodépression consécutive à l'infection par le VIH et aux nouvelles thérapies immunosuppressives. En effet, ces facteurs facilitent le développement et l'expression du pouvoir pathogène d'organismes saprophytes. Ces dernières années, l'augmentation des infections fongiques montre que c'est au sein de l'embranchement des champignons que se trouvent les microorganismes potentiellement les plus adaptés à un tel comportement ([Lagane, 2007](#)).

Les candidoses dues aux levures du genre *Candida*, sont les infections opportunistes les plus fréquentes et leur fréquence a doublé entre les années 80 et 90. En effet, elles représentent désormais plus de 80% des infections à levures. Parmi les candidoses, l'infection par *Candida albicans*, commensal du tractus digestif humain, est la plus commune et représente plus de 60% des levures isolées chez l'homme. Ainsi, *Candida albicans* est responsable d'infections qui, par leur fréquence et leur gravité, se situent au premier rang des infections fongiques ([Lagane, 2007](#)).

VI.1.1.1. Les candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles peuvent atteindre les surfaces épidermiques et les muqueuses telles que la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, les intestins, le système urinaire et la muqueuse vaginale (Lagane, 2007).

VI.1.1.2. Les candidoses digestives

Ce sont les affections les plus représentées. C'est au niveau de l'intestin et de l'estomac, les plus importants réservoirs de *Candida albicans*, que se multiplient les levures. Ceci entraîne des troubles digestifs qui peuvent devenir chroniques : aigreurs, douleurs œsophagiennes, douleurs stomacales, diarrhées, constipation, colite intestinale (Lagane, 2007).

VI.1.1.3. La candidose orale

Manifestation la plus fréquente des candidoses, concerne à la fois les sujets non immunodéprimés et les sujets immunodéprimés, avec un caractère de gravité systématique chez ces derniers. L'intérêt porté à cette infection s'est accru ces dernières années, car elle constitue l'une des manifestations orales de l'infection par le VIH, mais elle peut aussi survenir chez des patients leucémiques ou cancéreux (Lagane, 2007).



Figure 5. La candidose orale

VI.1.1.4. La candidose au niveau de la muqueuse œsophagienne

Cliniquement, elle se traduit par une dysphagie douloureuse, un pyrosis et une sensation de brûlure au passage des aliments. L'examen révèle des membranes blanchâtres reposant sur une muqueuse très inflammatoire (Lagane, 2007).

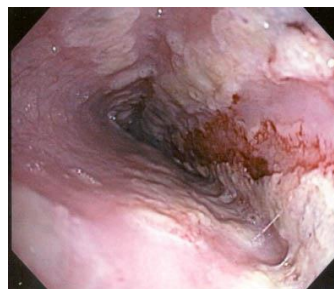


Figure 6. La candidose au niveau de la muqueuse œsophagienne

VI.1.1.5. La candidose au niveau de la muqueuse gastro-intestinale

Elle intéresse tout l'intestin, de l'estomac au colon. Les lésions se présentent comme un muguet intestinal avec des ulcérations. Elle se manifeste par des douleurs abdominales atypiques, des nausées et des vomissements (Lagane, 2007).

VI.1.1.6. Les candidoses uro-génitales

La vulvo-vaginite est une affection extrêmement fréquente chez la femme. En effet, on estime qu'environ 75% des femmes en activité génitale feront un épisode de candidose vulvo-vaginale. Les symptômes les plus évocateurs sont l'existence de leucorrhées abondantes blanchâtres, d'aspect granuleux, et d'un prurit vulvaire souvent intense. Le point de départ d'une telle infection reposerait sur un dysfonctionnement hormonal ou immunitaire local. La récurrence de la candidose vulvo-vaginale est un phénomène assez fréquent. Le caractère récidivant des infections candidosiques chez la femme est susceptible d'induire, lors de traitements répétés, des phénomènes de résistance aux traitements passant par l'émergence de souches moins sensibles.

Chez l'homme, l'atteinte génitale par *Candida albicans* est plus rare et correspond à une balanite mycosique ou balanoposthite, qui débute au niveau du sillon balano-prépuce, puis s'étend au gland et au prépuce. L'homme n'est pas porteur sain de la levure au niveau génital. Le développement de ces symptômes cliniques est plutôt secondaire à un rapport sexuel (Lagane, 2007).

VI.1.1.7. Les candidoses cutanées et unguéales

Ces candidoses des plis se manifestent par un érythème, associé à un enduit crémeux blanchâtre et sont souvent prurigineuses. Elles sont favorisées par l'obésité, l'humidité et la macération ainsi que le manque d'hygiène. On distingue classiquement deux grands types :

L'intertrigo des grands plis : concerne les plis inguinaux, axillaires, abdominaux, sous mammaires, interfessiers...

L'intertrigo des petits plis : concerne les plis interdigitaux palmaires, plus rarement les plis interdigitaux plantaires. Les onyxis et périonyxis candidosiques siègent préférentiellement aux mains. *Candida albicans* pénètre d'abord le bourrelet péri-unguéal et provoque un périonyxis. L'onyxis fait habituellement suite au périonyxis. La contamination se fait le plus souvent à partir d'un réservoir chez l'individu même (Lagane, 2007).

VI.2. L'obésité

VI.2.1. définition

L'obésité se définit selon l'OMS comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé, Cette organisation la reconnue comme une maladie en 1997(OMS 2003).

On distingue deux grands types d'obésité :

L'obésité androïde où la distribution des graisses est principalement abdominale c'est-à-dire que l'on a une importante accumulation de graisses péri-viscérales sous la paroi musculaire abdominale. Elle est plutôt rencontrée chez l'homme, c'est ce qu'on appelle une morphologie en forme de « pomme ».

L'obésité gynoïde où l'excès de graisse se situe principalement au niveau des cuisses. Elle est plutôt rencontrée chez la femme, c'est ce qu'on appelle une morphologie en forme de « poire ».

L'indice de masse corporelle : une mesure simple pour définir l'obésité est l'indice de masse corporelle (IMC). Sa formule est la suivante :

$$\text{IMC} = \frac{\text{masse en kg}}{\text{taille en m}^2}$$

Le résultat obtenu est en kg/m² mais la plupart du temps on ne mentionne pas l'unité de l'IMC. Il présente l'avantage d'être bien corrélé au risque de mortalité et morbidité et d'être représentatif de la masse grasse totale du corps. Outre son utilisation facile (une toise et une balance sont suffisantes), l'IMC est la mesure la plus pertinente du surpoids et de l'obésité au niveau de la population car elle s'applique aux deux sexes et à toutes les tranches d'âge adulte.

Cependant cette mesure comporte quelques limites. En effet, pour un même IMC, la composition corporelle peut être très différente d'un individu à l'autre en fonction, en particulier, de la musculature et du sexe. Il n'est pas applicable, par exemple, aux femmes enceintes et allaitantes, aux athlètes et aux personnes très musclées. Par ailleurs, au cours du vieillissement, le ratio masse grasse sur masse maigre augmente, même si l'IMC se maintient. L'IMC ne tient pas compte non plus des caractéristiques ethniques (Castle, 2012).

VI.2.2. Diagnostic de l'obésité

L'obésité correspond à « un excès de masse grasse entraînant des conséquences néfastes pour la santé » (OMS). Chez l'adulte jeune en bonne santé, la masse grasse corporelle représente 10-15 % du poids chez l'homme et 20-25 % chez la femme. Les différentes méthodes de mesure de la composition corporelle ne sont pas d'usage clinique courant.

En pratique, le statut pondéral est défini à partir de l'indice de masse corporelle (IMC) en anglais body mass index (BMI) qui est le rapport du poids (en kg) sur le carré de la taille chez l'adulte, l'obésité est définie à partir du risque pour la santé (relation entre IMC et mortalité) chez l'enfant, l'obésité est définie à partir de la distribution de la corpulence dans la population. Chez l'adulte (après 18 ans), l'obésité est définie par un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, associé à une augmentation du risque de co-morbidité et de mortalité. Les seuils sont les mêmes chez l'homme et chez la femme. (Castle, 2012).

Chez l'enfant, l'IMC varie au cours de la croissance : après une augmentation dans la première année de vie, l'IMC diminue pour atteindre un nadir vers 4-6 ans. La réascension de l'IMC qui intervient ensuite est appelée « rebond d'adiposité ». Plus le rebond est précoce, plus le risque d'obésité à l'âge adulte est élevé.

Chez l'enfant, l'obésité est définie à partir des courbes de croissance qui décrivent, séparément chez les garçons et les filles, l'évolution de l'IMC en fonction de l'âge. La définition internationale (Obesity International Task Force, IOTF) correspond aux centiles qui passent à l'âge de 18 ans par les valeurs d'IMC de 25 et 30 kg/m^2 utilisées pour la définition du surpoids et de l'obésité chez l'adulte (Castle, 2012) (Tableau 5).

Tableau 5. Définition et classification des obésités de l'adulte d'après l'OMS

Classification	IMC (kg /m^2)	Risque de comorbidités
Valeurs	18,5 à 24,9	Moyen
Surpoids	25,0 à 29,9	Légèrement augmenté
Obésité	30,0 à 34,9 35,0 à 39,9 ≥ 40	Modérément augmenté
Type I (modérée)		Fortement augmenté
Type II (sévère)		Très fortement augmenté
Type III (massive)		

La proportion de personnes obèses s'est accrue au cours des 30 dernières années. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence de l'obésité a pris des proportions épidémiques à l'échelle mondiale. L'augmentation du poids moyen s'observe dans toutes les tranches d'âge, dans tous les groupes socio-économiques (OMS 2003). Voici quelques données (Tableau 6).

Tableau 6. L'obésité en chiffres

	Algérie	France	États-Unis	Le Monde
% de l'obésité	17.5	15	33	33

IMC	>30	>35	>35	>35
Références	Statistiques mondiales.com 2008	ObÉpi-Roche 2009	CDCP 2011	OMS 2011

VII. La classification des inhibiteurs de la lipase

En général, les inhibiteurs d'enzymes sont classés comme réversible ou irréversible (figure 7). Les inhibiteurs réversibles sont subdivisés en compétitifs, non-compétitifs, incompétitifs et mixtes en fonction de leurs effets sur les paramètres cinétiques des enzymes qui répondent à la cinétique de Michaelis-Menten. Les inhibiteurs de lipase réversibles et irréversibles sont classés comme spécifiques ou non spécifiques, en fonction de leur mode d'action c'est-à-dire si elles agissent directement sur le site actif de l'enzyme ou non (Patkar et Björkling, 1994).

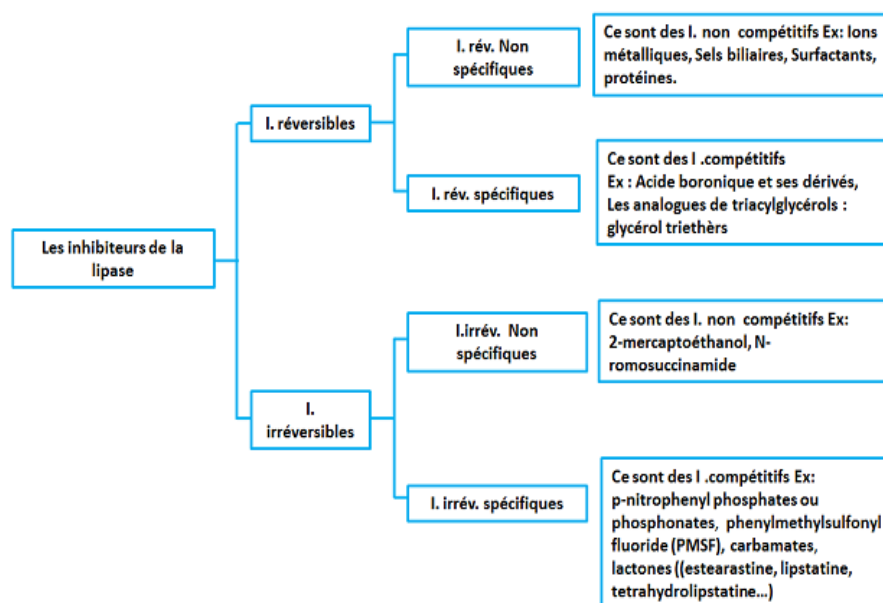


Figure 7. Classification des inhibiteurs de la lipase

Tels que I : inhibiteurs, rév : réversibles, irrév : irréversibles (Benarous, 2010).

VIII. ETUDE BIO-INFORMATIQUE

VIII.1 Importance de l'outil informatique en biologie

La bioinformatique, est une discipline émergente de la recherche qui se situe à l'interface de la biologie, des mathématiques et de l'informatique. Elle est aujourd'hui une discipline incontournable des sciences du vivant. L'acquisition de compétences en bioinformatique est donc un réel atout pour les étudiants et devrait leur ouvrir de nouvelles perspectives professionnelles (Grosdidier, 2007).

La bioinformatique est constituée par l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation de l'information génétique (séquences) et structurale (repliement 3-D) et d'effectuer la synthèse des données disponibles (à l'aide de modèles et de théories), d'énoncer des hypothèses généralisatrices (ex. : comment les protéines se replient ou comment les espèces évoluent) et de formuler des prédictions (ex. : localiser ou prédire la fonction d'un gène) (C Grosdidier, 2007).

Le terme bio-informatique a été forgé en 1979 par Paulien Hogeweg de l'université d'Utrecht, Pays-Bas, conjointement avec Ben Hesper. La définition qu'ils lui ont donnée est la suivante : l'étude des procédés informatiques dans les systèmes biotiques. Cela va de l'analyse du génome à la modélisation de l'évolution d'une population animale dans un environnement donné, en passant par la modélisation moléculaire, l'analyse d'image, l'assemblage de génome et la reconstruction d'arbres phylogénétiques (phylogénie). Cette discipline constitue la «biologie *in silico*», par analogie avec *in vitro* ou *in vivo* (Grosdidier, 2007).

VIII.2. Le Docking

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Les détails de ces interactions, au niveau moléculaire, sont donc d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, ces techniques ne permettent pas de détailler la totalité de ces interactions étant donné le nombre incalculable de molécules différentes au sein d'une seule cellule (Grosdidier, 2007).

Le docking ou l'amarrage moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales mentionnées ci-dessus. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites

molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée (Grosdidier, 2007).

La procédure typique à mettre en place pour prédire les interactions entre un ligand et son récepteur est présentée dans la figure 8. La première étape est l'obtention d'une structure pour le récepteur, par cristallographie aux rayons X, par RMN ou par modélisation. (Grosdidier, 2007).

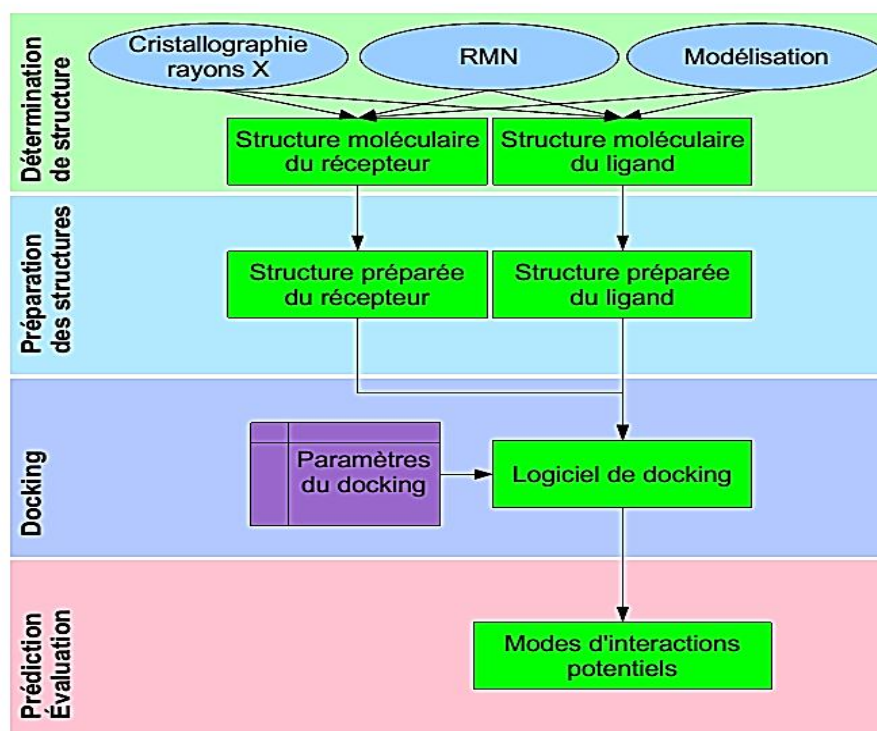


Figure 8. Étapes typiques d'un docking (Grosdidier, 2007).

Ensuite, la qualité de la structure doit être vérifiée au niveau des atomes eux-mêmes. Par exemple, le docking d'un ligand ne pourra pas être pertinent si des atomes manquent dans la région du site d'interaction, si l'identité de séquence avec la structure utilisée comme modèle est trop basse (si la structure de la cible a été obtenue par modélisation par homologie), ou si la région d'interaction contient des acides aminés flexibles (identifiés par leurs B-factor élevés pour les structures rayons X, ou par de multiples conformations différentes pour celle si identifiées par RMN) (Grosdidier, 2007).

Une fois identifiés, de tels problèmes doivent être pris en compte lors de la préparation de la structure en vue du docking. Il faut veiller à résoudre les problèmes de clashes stériques,

ainsi qu'aux états de protonation. La conformation initiale du ligand est généralement modifiée et optimisée durant le docking (Grosdidier, 2007).

VIII.2.1. Les types de docking

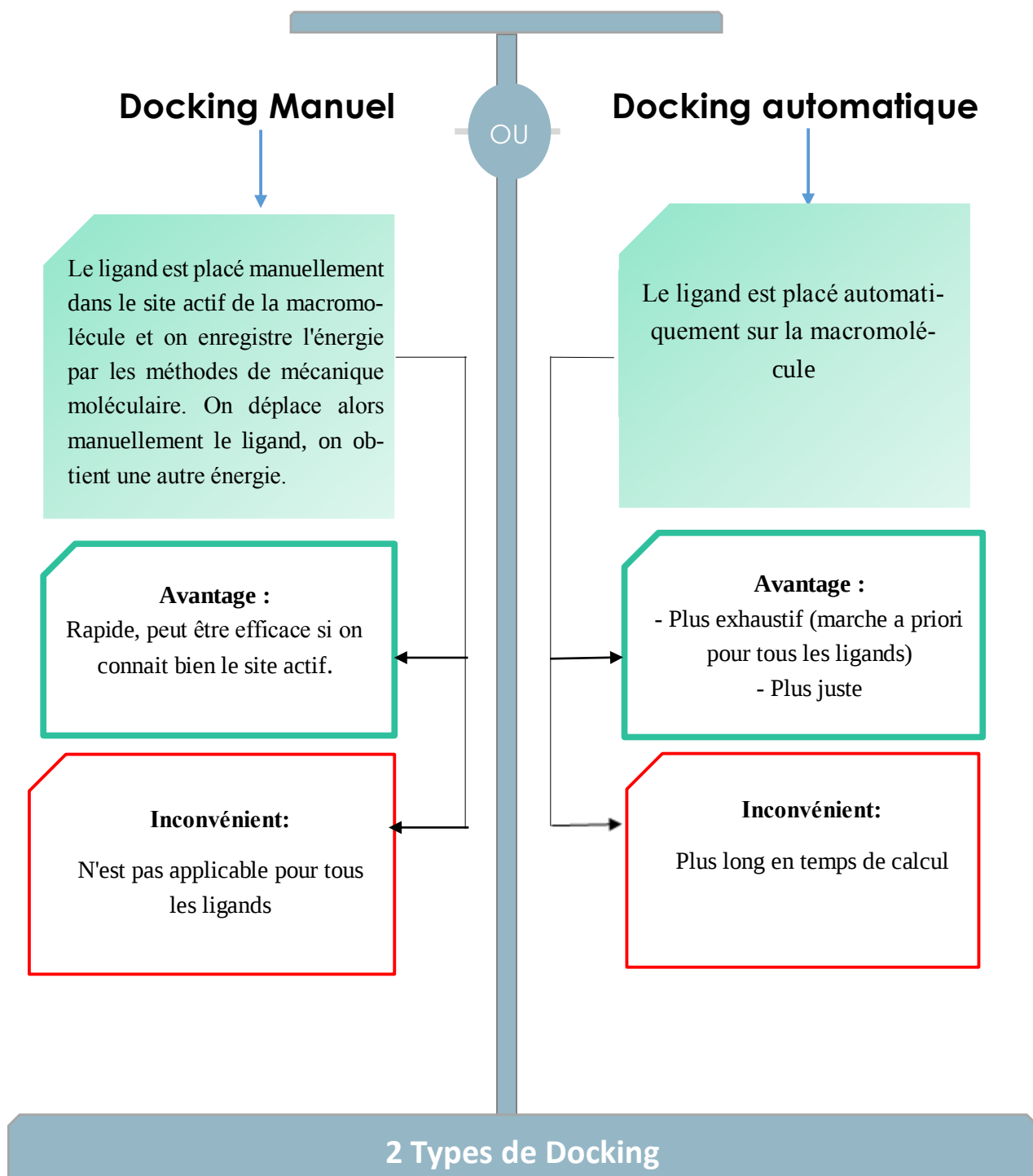


Figure 9. Les différents types de docking. (Grosdidier, 2007)

MATERIELS ET METHODES

I. EXTRACTION ET QUANTIFICATION

I.1 Le matériel végétal

Les plantes étudiées à savoir *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crista* ont été récoltées à 40 et 10 Km du sud de la wilaya de laghouat, dans les mois de mars 2012 et novembre 2013, respectivement. Ces deux plantes sont séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant quatre mois. Après le séchage, ces plantes sont finement broyées puis stockées dans des sacs en papier jusqu'à leur utilisation.

La description botanique, les propriétés et les parties étudiées des plantes qui sont subis aux dosages des différents métabolites secondaires ainsi l'étude de leurs activités enzymatiques sont mentionnées dans le tableau 7

Tableau 7. Les descriptions des deux plantes étudiée

	<i>Haloxylon scoparium</i>	<i>Pulicaria crista</i>
Synonymes	<i>Hammada scoparia</i>	<i>Francoeuria crista</i>
Appellations locales	En Arabe : الرمث En Français : Saligne à balai, Bunge	En Arabe : الحتحات En Français : Githgath, Tenadfert
Description	Des arbustes à rameaux cylindriques, souvent articulés, sans feuilles distinctes, assez proches des anabasis par leurs caractères botaniques. ils sont distribués en sud-est de l'Espagne, Afrique du Nord et en partie dans la région Irano-Turaniénne, (Mohammedi, 2013). un Arbrisseau à tiges grêles dressées, très rameuses. Rameaux secondaires rapidement érigés, verts foncés noircissant sur le sec. Entrenœuds allongés (Mohammedi, 2013).	Feuilles petites, alternes, allongées, dentées, velues, laineuses à limbe ondulé crispé sur ses bords. Fleurs en capitules petits d'un jaune lumineux, à ligules très courtes. les fruits sont des akènes. Cette plante n'est pas odoriférante comme d'autres plantes à qui elle ressemble (sahara-nature.com). Espèce saharo-sindienne très répandue dans l'Ahaggar. Elle pousse en larges touffes vert grisâtre de 40 à 100cm de haut (sahara-nature.com).
Systématique	Règne : Végétal Embranchement : Phanérogames	Règne : Plantes (Végétal) Embranchement : Spermatophytes

	Sous Embranchement : Angiospermes Classe : Eudicots Ordre : Caryophyllales Famille : Amaranthaceae Genre : <i>Haloxylon</i> Nom Latin : <i>Haloxylon scoparium</i> (www.sahara-nature.com).	Sous Embranchement : Angiospermes Classe : Dicotylédones Ordre : Asterales Famille : Asteraceae Genre : <i>Pulicaria</i> Nom Latin : <i>Pulicaria crispa</i> Forssk (www.sahara-nature.com).
Principes actifs	polyphénols, des saponosides et plus particulièrement des alcaloïdes, ainsi des dihydroisocoumarines. <i>Haloxylon scoparium</i> de l'Algérie contient la cargenine, et la N-méthylisosalsoline comme des alcaloïdes majoritaires de type tétrahydroisoquinoline et la isosalsoline, salsolidine, isotryptamine (Benkrief, et al 1990).	<i>Pulicaria crispa</i> renferme des polyphénols, des saponosides et plus particulièrement des alcaloïdes, ainsi des esquiterpènes tels que guaianolide (Dendougui et al., 2006).
Propriétés	Les parties aériennes sont utilisées pour traiter les problèmes de l'œil et la vision, les problèmes de digestion, les piqures des scorpions. Les extraits aqueux ont un pouvoir anticancéreux (Bourogaa et al. 2012).	Il est appliqué localement sur les enflures et des ecchymoses, est frotté sur les tempes pour les maux de tête, et une décoction prise pour les états fébriles (Dalziel, 1937).
Image	 Figure 10 : <i>Haloxylon scoparium</i> (www.sahara-nature.com)	 Figure 11 : <i>Pulicaria crispa</i> (www.sahara-nature.com)
Partie étudiée	Fleurs	Fleurs et feuilles

I.2. Extraction des composés phénoliques

I.2.1. Principe

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.

I.2.2. Méthode

Après la récolte et le séchage, une quantité de 3g des deux plantes *Haloxylon Scoparium* et *Pilularia Crispa* a été broyée. Les composés phénoliques sont extraits du matériel végétal par macération dans un mélange hydroalcoolique ternaire Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V) et binaire Méthanol/Eau, 8/2 (V/V).avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Les macérations hydroalcoolique sont alors réunies et évaporées sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Pour avoir les différentes phases (fractions), les phases aqueuse ainsi obtenus après évaporation sont soumis dans une ampoule à décanter à plusieurs affrontements par divers solvants organiques tels que :

- ✓ **L'éther de pétrole** : ce solvant va éliminer les lipides, pigment, composé apolaire.
- ✓ **L'acétate d'éthyle** : : ce solvant va extraire tout composé phénoliques existantes .cette fraction sera récupérée, séchée avec le Na_2SO_4 , filtrée puis évaporée à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Les résidus sec obtenus sont conservés a +4C jusqu'à leurs utilisations.

Le protocole d'extraction détaillé est présenté dans la figure 12.

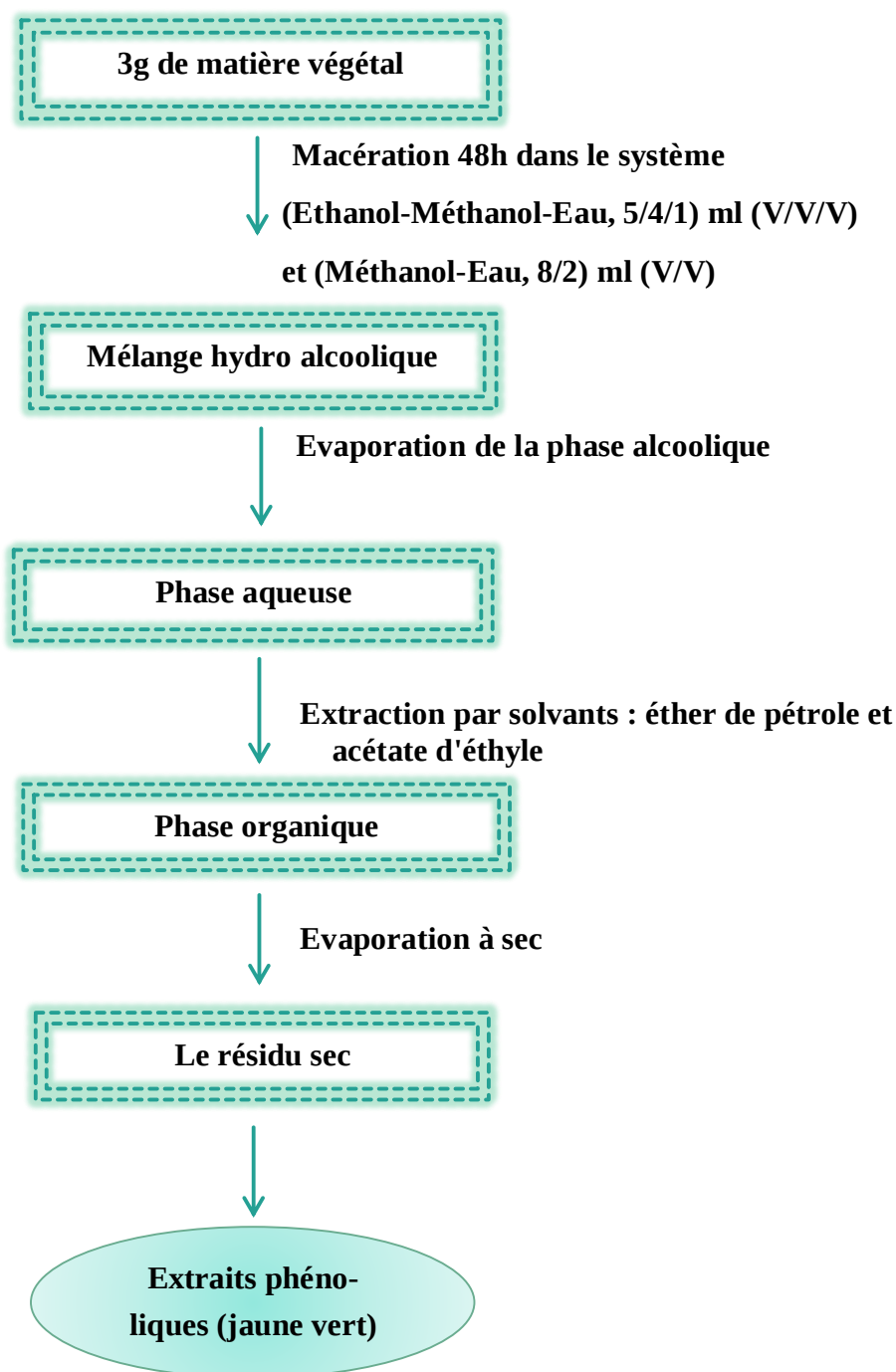


Figure 12. Le protocole d'extraction des composés phénoliques

I.3. Empreintes chromatographiques des extraits par CCM

La Chromatographie sur Couche Mince ou CCM est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné. Les plaques de CCM utilisées sont des plaques d'aluminium constituées de gel de silice. La migration s'effectue dans l'éluant (Acétate d'éthyle-Acétone, 6/4) ml (V/V) (figure 13). A la fin de la migration, la plaque est séchée et examinée sous UV à (254

et 360 nm). Les différents spots sont mis en évidence après pulvérisation par plusieurs révélateurs à savoir : le réactif de Folin-Ciocalteu, AlCl_3 et DPPH (0.1%).

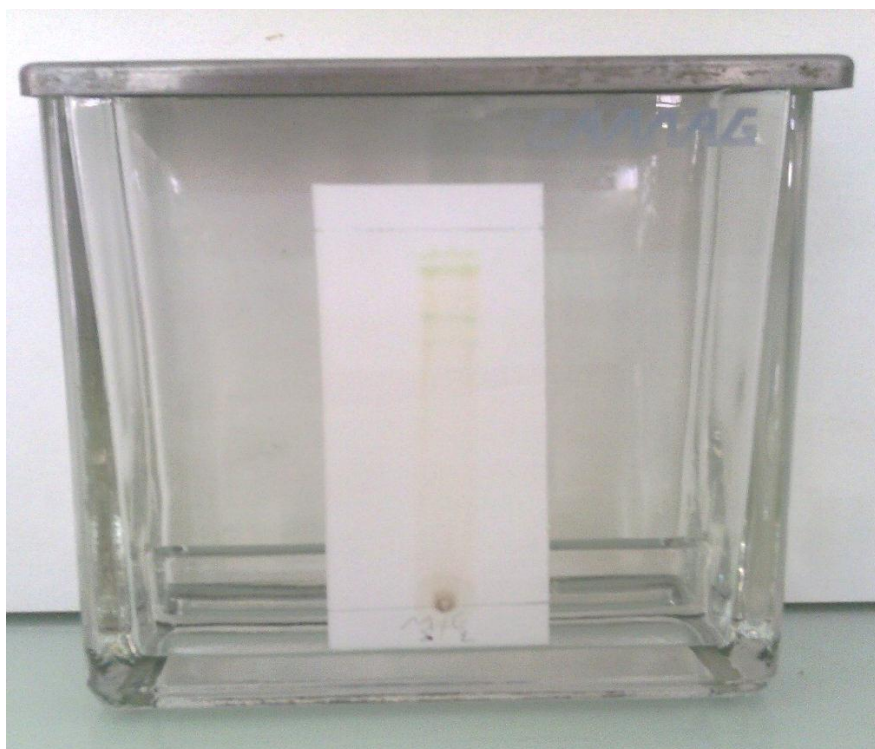


Figure 13. Migration des spots à travers la plaque CCM

II. Dosages des polyphénols

Tout le contenu phénolique dans l'extrait brut des extraits a été déterminé par spectrophotomètre au biais de la méthode Folin-Ciocalteu, rapportée dans [Slinkard and Singleton 1977](#), le réactif est formé d'acide phospho-tungestique $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_{40}$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène ([Giner, 1996](#)).

➤ Protocole expérimentale

Pour établir la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, une gamme des solutions diluées d'acide gallique a été préparée à partir d'une solution étalon.

Deux cents cinquante microlitres de réactif de Folin-Ciocalteu 10 % (dilué 10 fois) ont été ajoutés à 50 μl de chaque solution diluée de l'acide gallique ou de l'extrait végétal dilué, après 2 minutes, 1 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 4% (m/v) a été ajouté, ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre *SHIMADZU 1601* à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc. Ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de doser les phénols totaux dans les extraits végétaux.

III. Dosages des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par [Lamaison et Carnat., 1991](#) en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif ([Quettier et al., 2000](#)).

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec le groupement carbonyle C-4 et aussi les groupements hydroxyles C-3 et C-5 des flavones et flavonols, en plus il forme des complexes acides labiles avec les groupements dihydroxyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (figure 14) ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm. Le flavonol standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage est la rutine ([Mabry et al., 1970](#) ; [Benarous, 2010](#)).

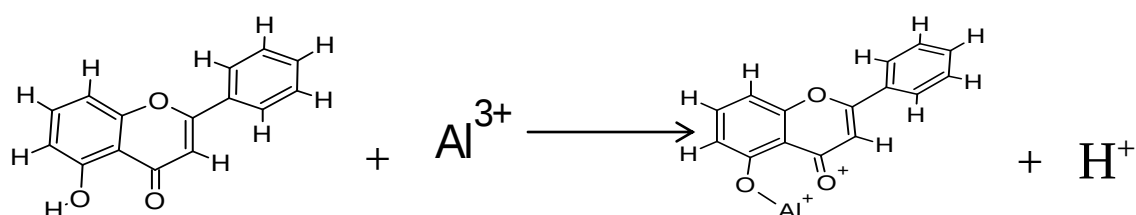


Figure 14. La réaction de trichlorure d'aluminium

➤ Le protocole expérimental

A partir d'une solution étalon méthanolique de la rutine, une gamme des solutions diluées a été préparée pour établir la courbe d'étalonnage.

500 µl de chaque solution diluée ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 500 µl du tri-chlorure d'aluminium 2 % (m/v), ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre *SHIMADZU 1601* à une longueur d'onde de 430 nm contre blanc. Ce qui nous permet de tracer la courbe d'étalonnage de la rutine et de doser les flavonoïdes dans les extraits végétaux.

IV. ETUDE DE L'INHIBITION ENZYMATIQUE

IV.1 Cinétique de la lipase

La technique physico-chimique utilisée pour suivre le déroulement de l'hydrolyse de l'ester par la lipase microbienne est la spectrophotométrie UV-Visible. Dans cette étude, on s'intéresse à l'apparition du produit (*p*-nitrophénol) en suivant l'évolution de sa densité optique le *p*-nitrophénol est le produit de l'hydrolyse de *p*-nitro phényl laurate en présence de la lipase microbienne selon la réaction suivante (figure 15).

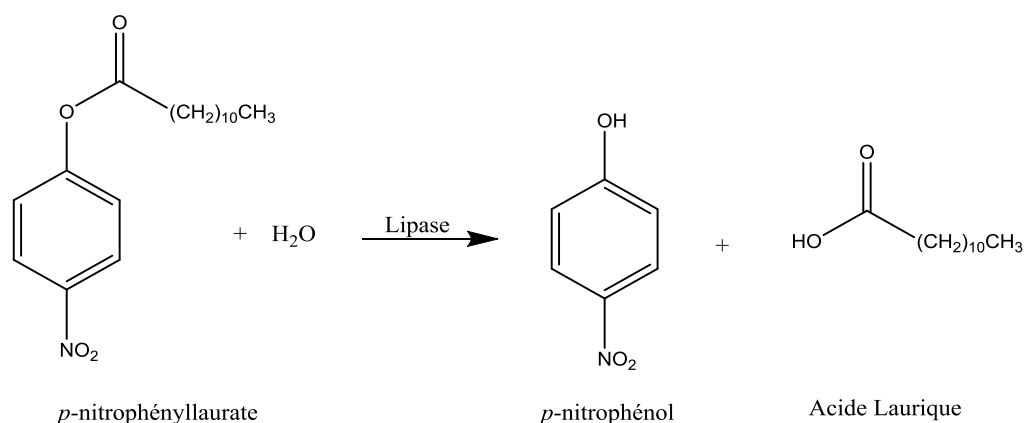


Figure 15. L'hydrolyse de *p*-nitrophényllaureate par la lipase microbienne

IV.1.1 la courbe d'étalonnage de *p*-nitrophénol

A partir d'une solution préparée du *p*-nitrophénol de concentration 1mM, une gamme de solutions diluées a été préparée pour établir la courbe d'étalonnage.

100 µl de tampon phosphate à pH = 7, 100 µl MeOH, 900 µl du *p*-nitrophénol et 100 µl de Na₂CO₃ à 1%. Ces solutions ont été maintenues pendant 15 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre SHIMADZU 1601 à une longueur d'onde de 405 nm contre un Blanc.

IV.2 Inhibition de la lipase

Dans le but d'étudier l'effet de nos extraits sur la lipase de *Candida rugosa* (LCR) et d'apprécier le pourcentage d'inhibition, il est nécessaire de déterminer la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour diminuer 50 % de l'activité enzymatique (IC₅₀) et la constante de d'inhibition du complexe, enzyme-inhibiteur (K_i), nous avons procédé à la méthode décrite par (Ruiz *et al.*, 2006 ; Benarous, 2010 ; Benarous *et al.*, 2013).

Le milieu réactionnel contient 100 µl de l'extrait végétal dilué et 100 µl de la LCR de 0,5 g/l a été pré incubé dans un bain marie à 37°C pendant 15 min, la réaction a été déclenchée par l'ajout de 900 µl de *p*-NPL de concentration de 1mM pendant 15 min, la réaction a été stoppée par l'addition de 100 µl de Na₂CO₃ à 1%. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre SCHIMADZU 1601 à une longueur d'onde de 405 nm contre un blanc. Les IC₅₀ ont été déterminées de la représentation graphique I % = f (c) tel que I % est déterminée suivant cette relation :

$$I \% = \frac{(A_{\text{control}} - A')}{A'}$$

Avec : I % : le pourcentage d'inhibition.

A' : l'absorbance de l'extrait inhibiteur.

A_{Control} : l'absorbance de l'activité de la LCR en l'absence de l'extrait végétal.

IV.2.1 Les tests d'inhibition

Avant de calculer IC 50 de chaque extrait, il faut confirmer par des tests préliminaires des inhibition de ces derniers sur LCR avec des concentrations 1 g/l et 2 g/l.

IV.2.2 Détermination de l'IC50

Les calculs de l'IC50 se fait à partir de la représentation graphique $I \% = f(c)$.

IV.2.3 Détermination de Ki

Nous avons déterminé la constante d'inhibition K_i à partir de la représentation graphique $1/V = f(I)$ tel que I est la concentration de l'extrait végétal.

V. Isolement par colonne chromatographique ouverte

V.1. Test d'inhibition sur CCM analytique

C'est un test préliminaire pour avoir localisé les spots qui donne un pouvoir inhibiteur contre la LCR afin de faciliter l'isolement des fractions au cours de l'isolement sur colonne préparative, se fait juste après la pulvérisation de la plaque CCM par l'enzyme et le substrat plusieurs fois.

V.2. Isolement par colonne ouverte

La phase mobile est un liquide et la phase stationnaire est un solide, c'est une chromatographie d'adsorption. La séparation est due à la différence d'adsorbabilité des divers composants du mélange ci-dessous, étant plus ou moins fortement adsorbés par la phase stationnaire solide, migreront donc plus ou moins rapidement à travers la colonne. La phase stationnaire est un solide adsorbant gel de silice. Le mélange introduit dans la colonne contenant le gel de silice est entraîné par l'éluant qui est séparé dans la colonne au contact avec l'adsorbant. On favorise souvent le pouvoir de séparation en augmentant progressivement le pouvoir éluant de la phase mobile ; on est donc généralement conduit à modifier la nature de l'éluant en cours de séparation, avec récupération de différentes fractions éluées dans des tubes, ces derniers sont testés une par une par CCM afin de déterminer les fractions pures et les récupérer et les évaporer ensuite à sec (figure 16).

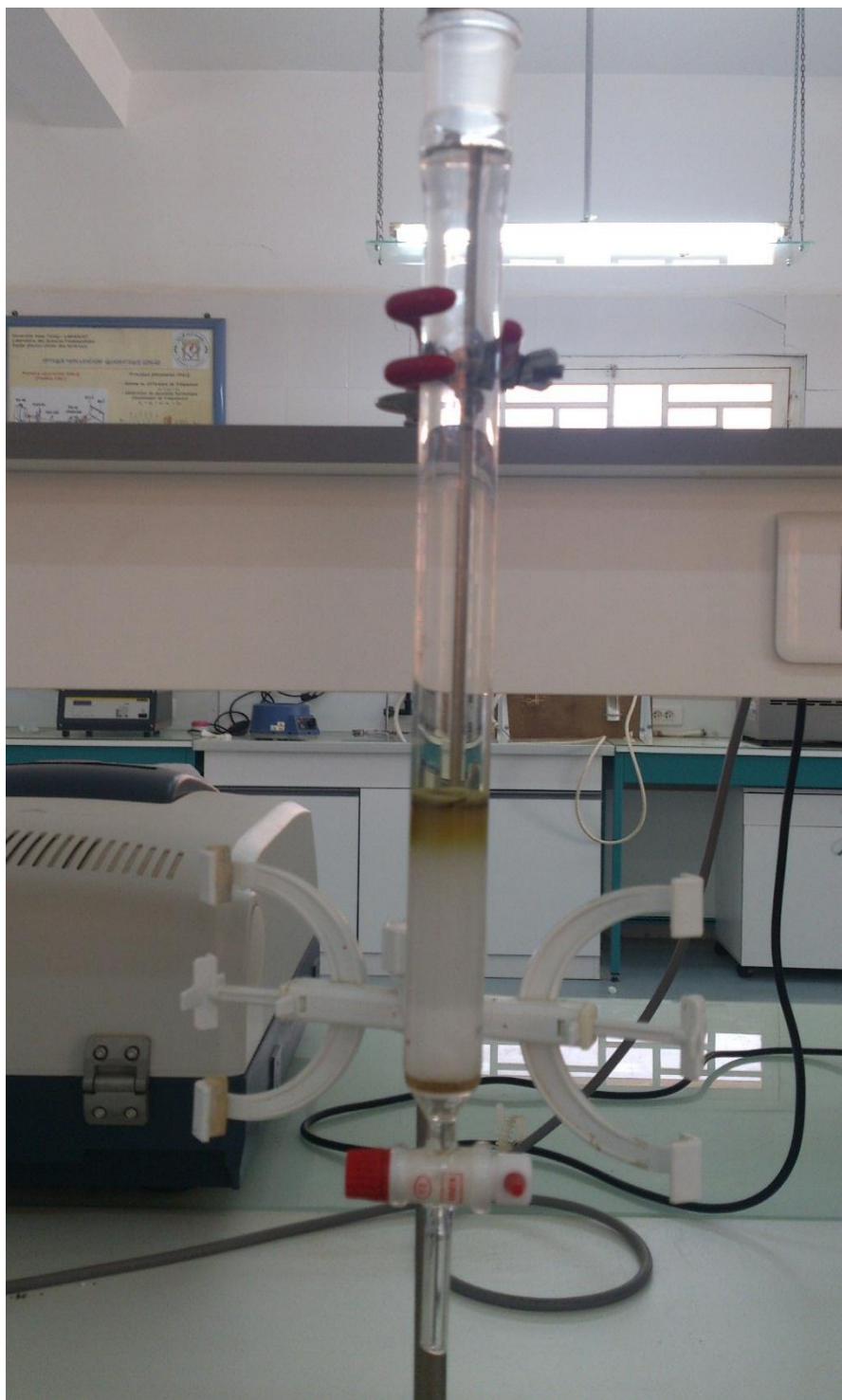


Figure 16. Séparation par colonne Chromatographique

VI. ETUDE BIO-INFORMATIQUE

Une étude bio-informatique ou bien étude *in silico* a été réalisée afin de faire le docking moléculaire ou bien l'amarrage, ce dernier c'est l'insertion d'un ligand au sein du site actif d'un enzyme afin de bloquer ou bien inhiber la fonction de ce dernier.

Pour faire le docking, il faut d'abord faire :

- la préparation de l'inhibiteur, téléchargement de la structure de l'enzyme à intérêt
- minimisation de l'énergie de l'inhibiteur et de l'enzyme et la visualisation des structures de l'inhibiteur avec l'enzyme. (Linani, 2013).

Toutes ces étapes sont assurées par des logiciels spécifiques. Les enzymes utilisés sont la lipase de *Candida rugosa*, et la lipase pancréatique humaine avec les inhibiteurs issus des extraits végétaux des deux plantes *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crisper*.

VI.1 Le choix d'inhibiteur

Nous avons choisi plusieurs inhibiteurs de différentes références bibliographiques pour faire le test préliminaire de docking, cette étape est très importante pour sélectionner le meilleur inhibiteur pour notre enzyme, nous avons choisi plusieurs molécules fréquentes chez *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crisper* et qui sont représentées dans le tableau 8.

Tableau 8. Les molécules présentes dans les plantes *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crisper*

	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Hétérosides
<i>Haloxylon scoparium</i>	N-methylisosalsoline carnegine isosalsolidine N-omega-methyl-tryptamine (Benkrief <i>et al.</i> , 1990).	Quercetin (Benkrief <i>et al.</i> , 1990).	isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside., (Benkrief <i>et al.</i> , 1990).
<i>Pilularia crisper</i>		3'-O-Methyl Quercetin, Rhamnetin. (Benkrief <i>et al.</i> , 1990).	Apegnine-7-glucoside (Benkrief <i>et al.</i> , 1990).

VI.2 Construire la structure de l'inhibiteur

Les inhibiteurs sont construits à l'aide du logiciel ChemsSketch et ChemBioDraw.

VI.3 Calculs de l'énergie et du gradient

Avant de procéder le docking, nous devons mesurer l'énergie et le gradient des molécules (enzymes et inhibiteurs), et doivent être réduits à la petite valeur possible en utilisant le logiciel Hyperchem (Benarous, 2011 et Linani, 2013).

VI.4 Optimisation de la structure des inhibiteurs

L'énergie globale de ces inhibiteurs a été calculée et minimisée à l'aide du logiciel Hyperchem pour rendre les molécules dans la conformation la plus stable (Tableau 19) (Benarous et Linani 2011).

La structure du modèle d'inhibiteur a été minimisée en effectuant une optimisation de mécanique moléculaire en utilisant MM⁺ champ de force et l'algorithme Ribier Polack pour obtenir la structure géométrique la plus stable (Benarous, 2011 et Linani, 2013).

VI.5 Optimisation de la structure des lipases

Les structures cristallines des lipases PDB_ID : 1CRL pour la lipase de *Candida rugosa* et PDB_ID : 1HPL pour la lipase pancréatique humaine) ont été obtenues à partir de la PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>).

- Les molécules d'eau, des atomes d'hétéro et des ligands tels que les ions calcium ont été éliminés.
- les atomes d'hydrogène ont été ajoutés à la protéine, y compris celles qui sont nécessaires pour définir l'ionisation correcte et précise les tautomères des résidus d'acides aminés en utilisant le logiciel Hyperchem (Benarous, 2011 et Linani, 2013).

VI.6 Docking des inhibiteurs

Le Docking de l'inhibiteur dans le site actif des deux lipases a été réalisé en utilisant le logiciel GOLD 5.0 (Genetic Optimization Ligand For Docking), La procédure se compose de trois parties principales :

- Une fonction de score pour classer les différents modes de liaison.
- Un mécanisme de mise au ligand dans le site de liaison GOLD utilise une méthode unique pour ce faire, qui est basée sur le point d'assemblage.
- Un algorithme de recherche à explorer le mode de liaison possible, GOLD utilise un algorithme génétique (GA). Cette méthode permet une flexibilité partielle des protéines et une flexibilité totale du ligand (Benarous, 2011 et Linani, 2013).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. EXTRACTION ET QUANTIFICATION

I.1 Extraction des différents métabolites secondaires des deux plantes

Les teneurs des extraits, leurs couleurs et leur aspect sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 9. Teneurs, couleurs et aspects des différentes fractions

Plante	Système	masse de résidu (g)	Couleur et Aspect	R %
<i>H.scoparium</i> <i>Ac-o-et</i>	S. Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	0,0644	Marron noir, visqueux	2,146
	S. Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	0,0521	Marron noir, visqueux	1,736
<i>P.crispa</i> <i>Ac-o-et</i>	S. Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	0,233	Marron noir, visqueux	7,766
	S. Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	0,2052	Marron noir, visqueux	6,48

Sachant que : Ac-O-Et = Acétate d'éthyle. S = système.

Les résultats obtenus montrent que les rendements des extraits des deux plantes avec l'utilisation des deux systèmes varient de 1,73 à 7,76 %. Les teneurs des extraits de *Pilularia crista* et *Haloxylon scoparium* varient dans les deux systèmes de macération avec augmentation en teneur remarquable dans le système Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V) qui a présenté une efficacité certaine dans le procédé d'extraction des composés phénoliques dans notre cas par rapport à l'autre système de macération.

La différence du rendement des extraits est due à plusieurs facteurs qui peuvent influencer sur les performances de l'extraction, tels que la taille des particules, la nature du solvant, la température, le temps d'extraction et la vitesse d'agitation (Mohammedi, 2013).

I 2. Empreintes chromatographiques des extraits CCM

Nous avons réalisé la séparation CCM afin de balayer les différentes fractions dans ces extraits en utilisant comme éluant AC-o-Et-Acétone, 6/4 (V/V) et comme révélateur : UV 254 nm (figure 18), 366 nm (figure19), folin ciocalteu (figure 20), AlCl₃ (figure 21), DPPH (figure 22), avec la symbolisation : 1 : acétate d'éthyle (liq-liq) du système Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V) de la plante *Haloxylon scoparium*, 2 : acétate d'éthyle (liq-liq) du système Méthanol/Eau, 8/2 (V/V) du la plante *Haloxylon scoparium*, 3 : acétate d'éthyle (liq-liq) du système Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V) de la plante *Pilularia crista*, 4 : acétate d'éthyle (liq-liq) du système Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)de la plante *Pilularia crista*.

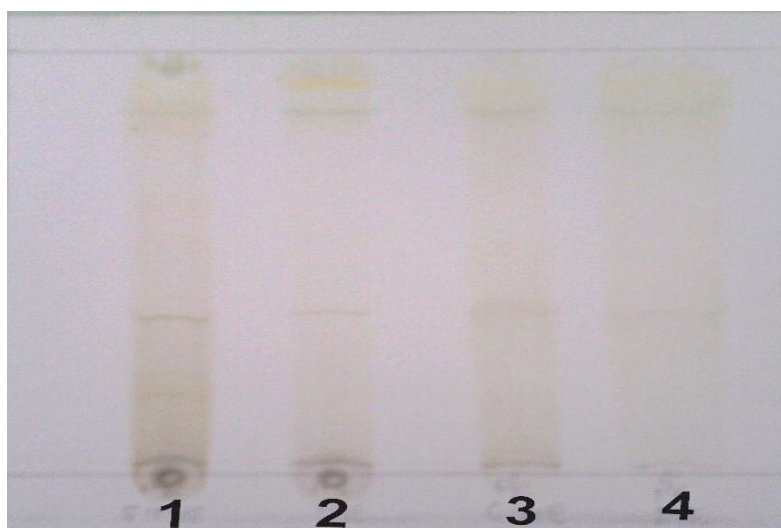


Figure 17. CCM des extraits dans le visible

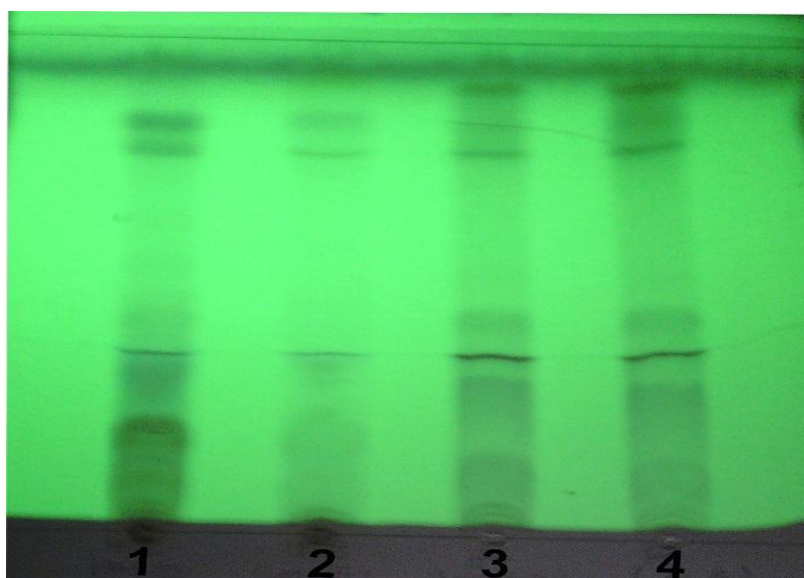


Figure 18. CCM des extraits dans l'UV à 254 nm

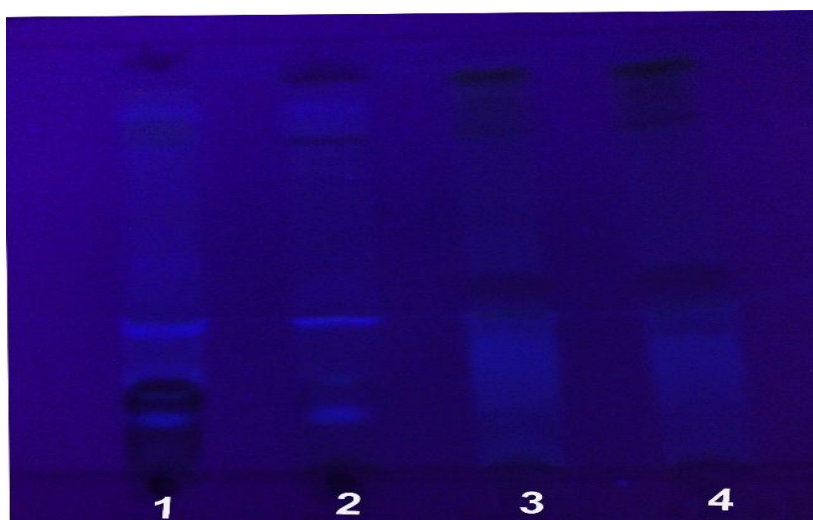


Figure 19. CCM des extraits dans l'UV à 366 nm

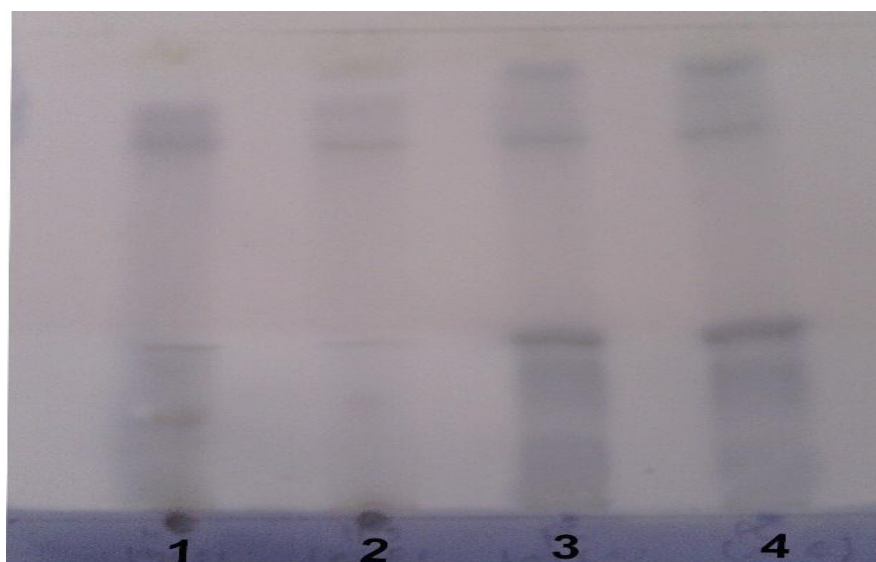


Figure 20. CCM des extraits avec révélation par le folin ciocalteu dans le visible

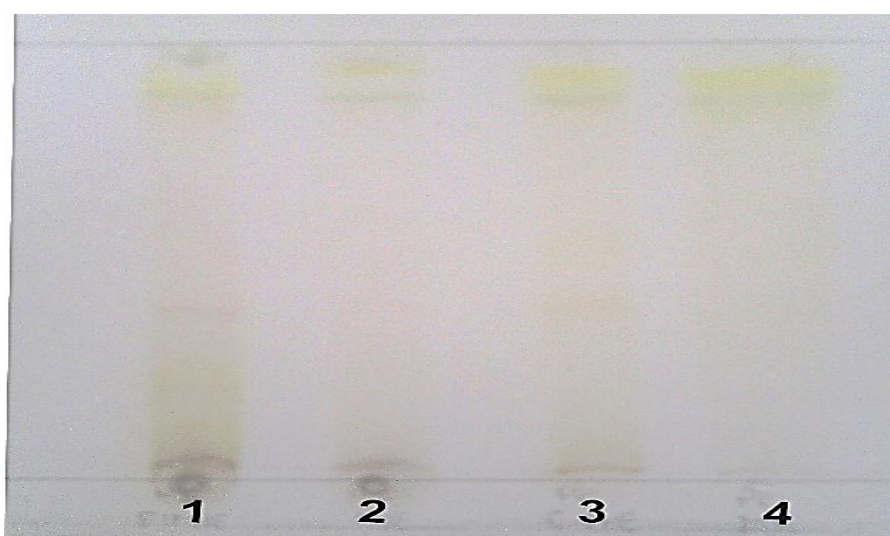


Figure 21. CCM des extraits avec révélation par AlCl_3 dans le visible

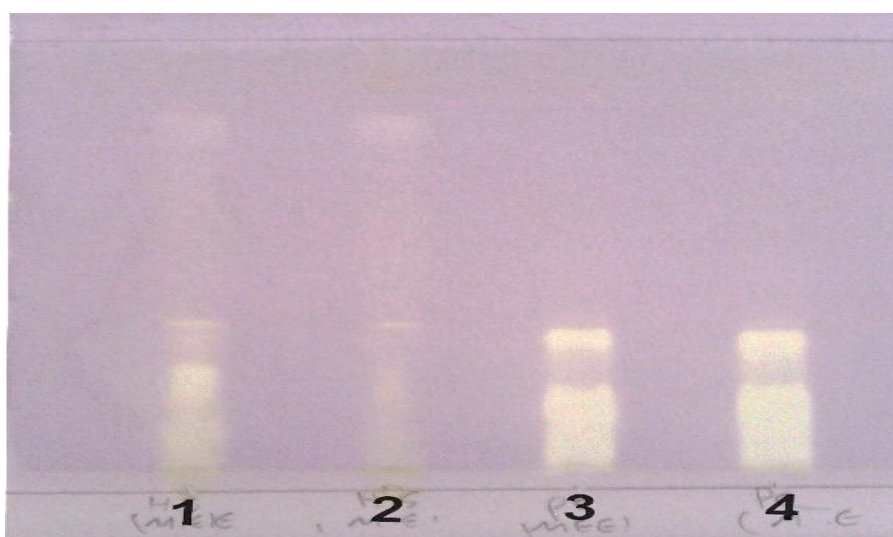


Figure 22. CCM des extraits avec révélation par DPPH dans le visible

Après la révélation des différentes plaques nous avons remarqué que les deux extraits acétate d'éthyle (liq-liq) de la plante *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crispata* sont riches en polyphénols et en flavonoïdes.

La révélation du pouvoir antioxydant de nos extraits par DPPH montre que les quatre extraits sont de bons antioxydants et ceci est dû à leurs richesses en composés phénoliques et flavonoïdes qui sont connus par leurs pouvoirs antioxydants (Tableau10).

Tableau 10. L'interprétation des différents CCM des extraits

Extrait	Système	Réactif de révélation utilisé	Couleurs	Groupes de composés identifiés
H. scoparium <i>Ac-o-et</i>	Etha- nol/Mé- tha- nol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	Sous UV 254 nm	2 Marron	Poly phénol
		Sous UV 366 nm	1 rouge, 1vert	Flavonoïdes
		Dans le visible	3 marrons, 1jaune	
		Folin-Ciocalteu	2 spots bleus	Poly phénol
		AlCl ₃ 2%	1 Jaune foncé	Flavonoïdes
		DPPH	2 spots blancs	Poly phénol
	Métha- nol/Eau, 8/2 (V/V)	Sous UV 254 nm	2 Marron	Flavonoïdes
		Sous UV 366 nm	1 rouge, 1vert	Flavonoïdes
		Dans le visible	2 marrons, 1 jaune foncé	
		Folin-Ciocalteu	1 spot bleu	Poly phénol
		AlCl ₃ 2%	2 Jaunes foncés	Flavonoïdes
		DPPH	2 spots blancs	Poly phénol
P.crispa <i>Ac-o-et</i>	Etha- nol/Mé- tha- nol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	Sous UV 254 nm	1 Marron claire	Flavonoïdes
		Sous UV 366 nm	1bleu, 1vert	Flavonoïdes
		Dans le visible	2 marrons, 1jaune	
		Folin-Ciocalteu	2 spots bleus	Poly phénol
		AlCl ₃ 2%	1 Jaune foncé	Flavonoïdes
		DPPH	1 spot blanc	Poly phénol
	Métha- nol/Eau, 8/2 (V/V)	Sous UV 254 nm	1 Marron claire	Flavonoïdes
		Sous UV 366 nm	1 bleu, 1vert	Flavonoïdes
		Dans le visible	2 marrons, 1jaune	
		Folin-Ciocalteu	2 spots bleus	Poly phénol
		AlCl ₃ 2%	1 Jaune foncé	Flavonoïdes
		DPPH	1 spot blanc	Poly phénol

II. Dosages des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait des deux plantes a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 23) et exprimée en milligrammes par un gramme de la matière végétale sèche équivalent en acide gallique.

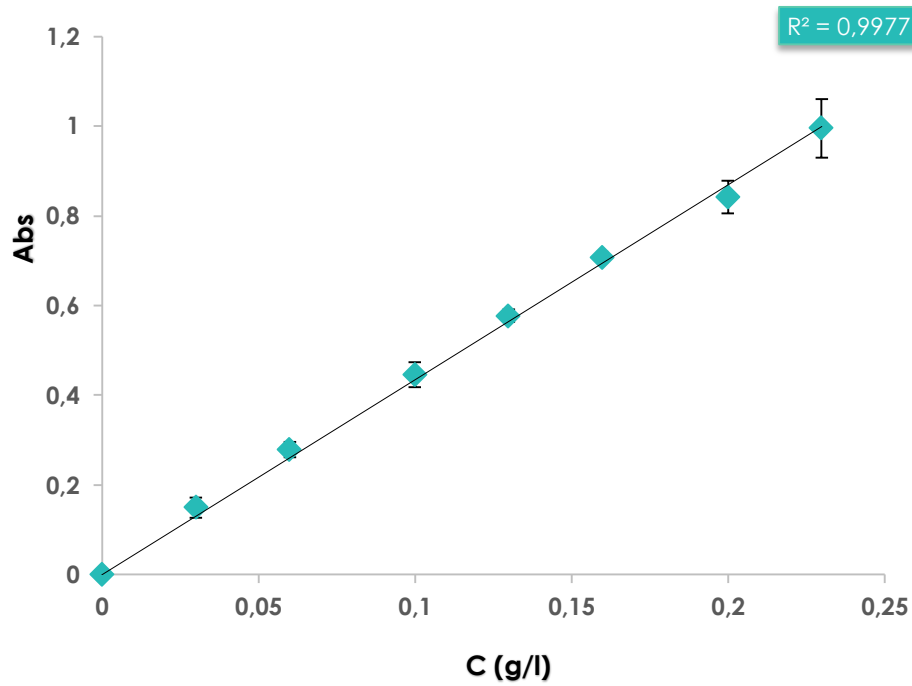


Figure 23. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

. Les résultats obtenus des teneurs en polyphénols sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11. Les teneurs en phénols totaux des plantes investiguées

Plante	Système	C : mg/g
<i>H.scoparium</i>	Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	256,25 ± 11,59
<i>Ac-o-et</i>	Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	367,361 ± 22,47
<i>P.crispa</i>	Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	390,277 ± 24,02
<i>Ac-o-et</i>	Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	333,564 ± 13,96

III. Dosages des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait des deux plantes a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 24) et exprimée en milligrammes par un gramme de la matière végétale sèche équivalent en Rutine. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 12.

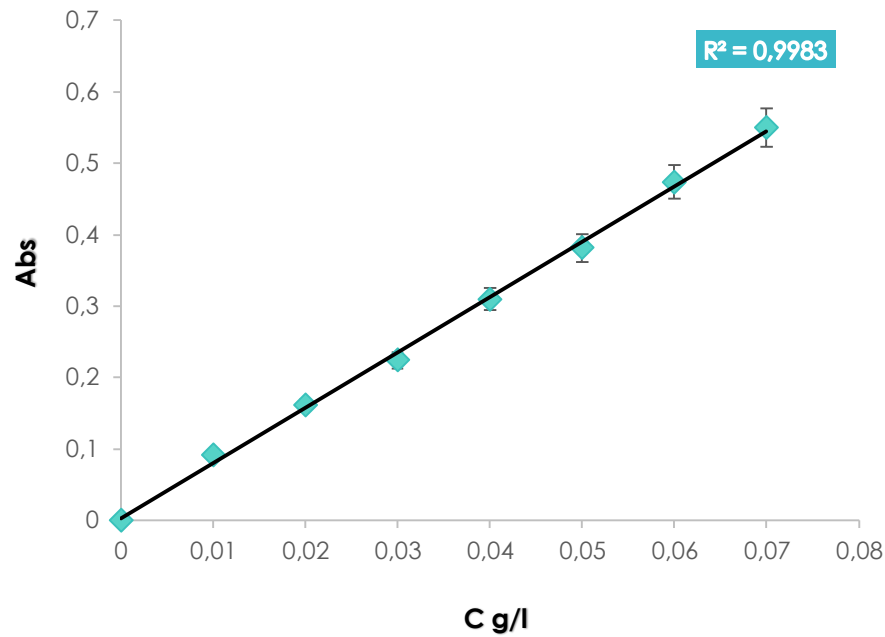


Figure 24. Courbe d'étalonnage de la rutine

. Les résultats obtenus des teneurs en flavonoïdes sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12. Les teneurs en flavonoïdes totaux des plantes investiguées

Plante	Système	C : mg/g
<i>H.scoparium</i> <i>Ac-o-et</i>	Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	342,857 ± 5,42
	Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	180,448 ± 17,54
<i>P.crispa</i> <i>Ac-o-et</i>	Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	307,692 ± 27,11
	Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	408,333 ± 11,53

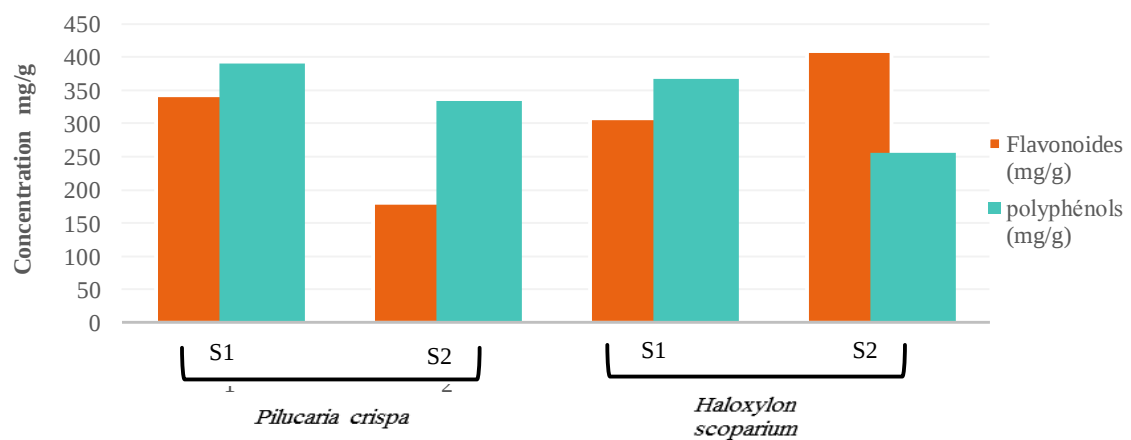


Figure 25. Les teneurs des fractions acétate d'éthyle en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits tel que S1 : système Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V), S2 : système Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)

A la lecture des résultats obtenus du tableau 11. Nous pouvons dire que nos plantes sont riches en composés phénoliques avec un étendu large, la teneur en polyphénols varie de $256,25 \pm 11,59$ mg/g à $390,277 \pm 24,02$ mg/g GAE. Ces résultats sont similaires aux résultats de l'étude réalisée par (Mohammedi, 2013), concernant la plante *HS*, mais pour *PC* ces résultats sont nouveaux car aucune étude de cette espèce de la région n'a été réalisée.

Les résultats obtenus du tableau 12 représentent les teneurs en flavonoïdes, nos extraits sont riches en flavonoïdes qui varie de $180,448 \pm 17,54$ mg/g à $408,333 \pm 11,53$ mg/g RE.

Si nous comparons notre résultat par celui trouvé par (Mohammedi, 2013), avec une teneur en flavonoïdes de *HS* est de $123,299 \pm 24,39$ mg/g RE, nous pouvons dire que cette dernière est nettement inférieure à notre travail, alors que pour *PC* aucune étude de cette espèce de la région n'a été réalisée. D'une manière générale, les teneurs de nos extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols qui sont les systèmes de solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant selon Bouguendoura, 2011.

IV. ETUDE DE L'INHIBITION ENZYMATIQUE

IV.1 La courbe d'étalonnage de *p*-nitrophénol (*p*-NP)

La courbe d'étalonnage de *p*-NP a été tracée à l'aide des lectures des absorbances des solutions diluées de *p*-NP en fonction de leurs concentrations (figure 26).

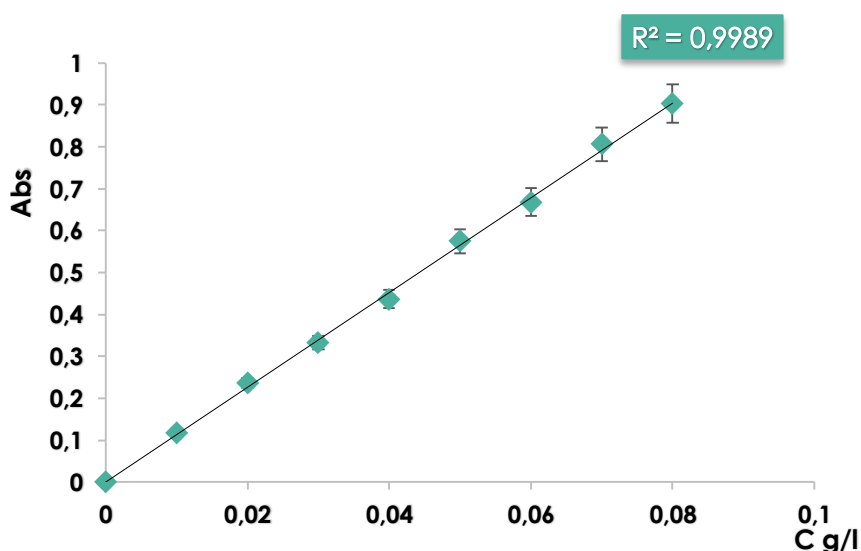


Figure 26. La courbe d'étalonnage de *p*-nitrophénol.

IV.2 Les tests d'inhibition

Des tests d'inhibition avec les concentrations 1 g/l et 2 g/l sont nécessaires avant de procéder à des calculs de l'IC 50, les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 13.

Tableau 13. Tests préliminaires d'inhibition des différents extraits des deux plantes

plante	Extrait <i>Ac-o-et</i>			
	S. Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)		S. Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	
	1 g/l	2 g/l	1 g/l	2 g/l
<i>H.scoparium</i>	29,04 %	86,23 %	39,72 %	96,70 %
<i>P.crispa</i>	32,81%	64,02 %	18,91 %	51,48 %

Sachant que : S = système. Ac-O-Et = Acétate d'éthyle.

L'étude préliminaire de l'activité inhibitrice des différents extraits des deux plantes vis-à-vis de la lipase de *Candida rugosa* a été réalisée avec des concentrations choisies 1 g/l et 2 g/l en utilisant le p nitrophenyl laurate comme un substrat, les résultats obtenus montrent présentent des pourcentages d'inhibition qui diffèrent d'un extrait à un autre de chaque plante étudiée, pour *Hs* le pourcentage d'inhibition varie entre 29 % et 96% et pour *Pc* c'est entre 17% et 64% voir tableau 13.

A travers les résultats préliminaires des pourcentages d'inhibition avec les concentrations 1 g/l et 2 g/l de chaque extrait, nous avons déterminé que les différents extraits des deux plante ont un pouvoir inhibiteur important et pour lequel ils sont opté pour la détermination des IC50.

IV.3 Détermination de l'IC50

Nous avons tracé la courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition (I %) en fonction des concentrations des extraits exprimées allant de 0,20 à 1,60 (g/l) et avec l'utilisation de (1 mM) comme concentration de substrat, nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de chaque extrait des deux plantes et le standard utilisé. Les résultats obtenus sont montrés dans les figures 27 à 35.

Les calculs des IC50 de différents extraits des deux plantes ont été réalisés à partir d'une série de concentrations allant de 0,20 g/l jusqu'à 2 g/l, les courbe obtenues tracées à l'aide de Microsoft Excel. Avec un $R^2=0.99$, les IC 50 sont calculés à partir de ces courbes. Nous avons obtenu un IC 50 de l'extrait acétate d'éthyle issue de l'extraction liquide-liquide du *Hs* macéré sous un système Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V) qui est de 1.29 g/l et l'IC 50 de l'extrait acétate d'éthyle issue de l'extraction liquide-liquide de *Hs* macéré sous un système hydroalcoolique binaire qui est de 1,71 g/l (voir tableau 14). Concernant la plante *Pc*, le premier extrait a un IC 50 de 1,77 g/l et le deuxième extrait est de 1.66 g/l.

IV.4 Détermination de la constante d'inhibition K_i

Afin de déterminer le type d'inhibition de chaque extrait obtenu des deux plantes, nous avons tracé les représentations graphiques de Dixon $1/V = f(I)$ qui nous permet de calculer la constante d'inhibition K_i , en utilisant quatre concentrations différentes de substrat $[S]$ allant de 0,05mM, à 0,08mM, les différents courbes obtenues avec les calcul de K_i de chaque extrait et le standard utilisé sont représentées dans les figures 26 à 34, les valeurs des IC_{50} , K_i et les types d'inhibition sont représentés dans le tableau 14.

Tableau 14. Les IC_{50} , K_i et les types d'inhibition des extraits

Plante	Extrait	IC_{50} (g/l)	K_i (g/l)	Type d'inhibition
H.s <i>Ac-o-et</i>	S. Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	$1,29 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$	compétitif
	S. Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	$1,71 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$	compétitif
P.c <i>Ac-o-et</i>	S. Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V)	$1,77 \pm 0,17$	$0,1 \pm 0,17$	compétitif
	S. Méthanol/Eau, 8/2 (V/V)	$1,66 \pm 0,028$	$0,35 \pm 0,028$	compétitif
Harmaline	Standard pur	$0,57 \pm 0,001$	$0,08 \pm 0,01$	compétitif

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits des deux plantes étudiées ont un pouvoir inhibiteur compétitif. Ce dernier est un mécanisme où la fixation du substrat et celle de l'inhibiteur est mutuellement exclusive formant un complexe binaire inactif enzyme-inhibiteur (EI), nous avons obtenu un K_i de l'extrait acétate d'éthyle issu de l'extraction liquide-liquide du **Hs** macéré sous un système Ethanol/Méthanol/Eau, 5/4/1 (V/V/V) est de $0,44 \pm 0,02$ g/l et le K_i de l'extrait acétate d'éthyle issu de l'extraction liquide-liquide du **Hs** macéré sous un système Méthanol/Eau, 8/2 (V/V) est de $0,35 \pm 0,01$ g/l (voir tableau 14). Concernant la plante **Pc**, il y a lieu de respecter la même démarche citée auparavant le premier extrait a un K_i de $0,1 \pm 0,17$ g/l et le deuxième extrait est de $0,35 \pm 0,028$ g/l.

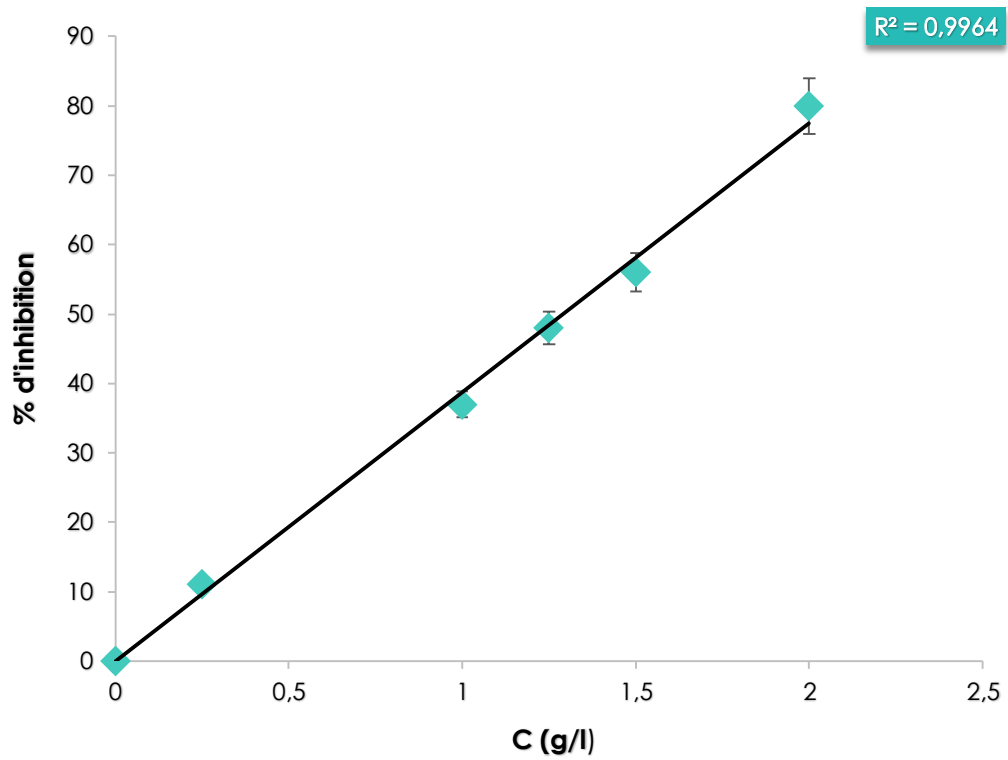


Figure 27. Courbe de l'IC 50 du système hydroalcoolique ternaire de la plante *Haloxylon scoparium*

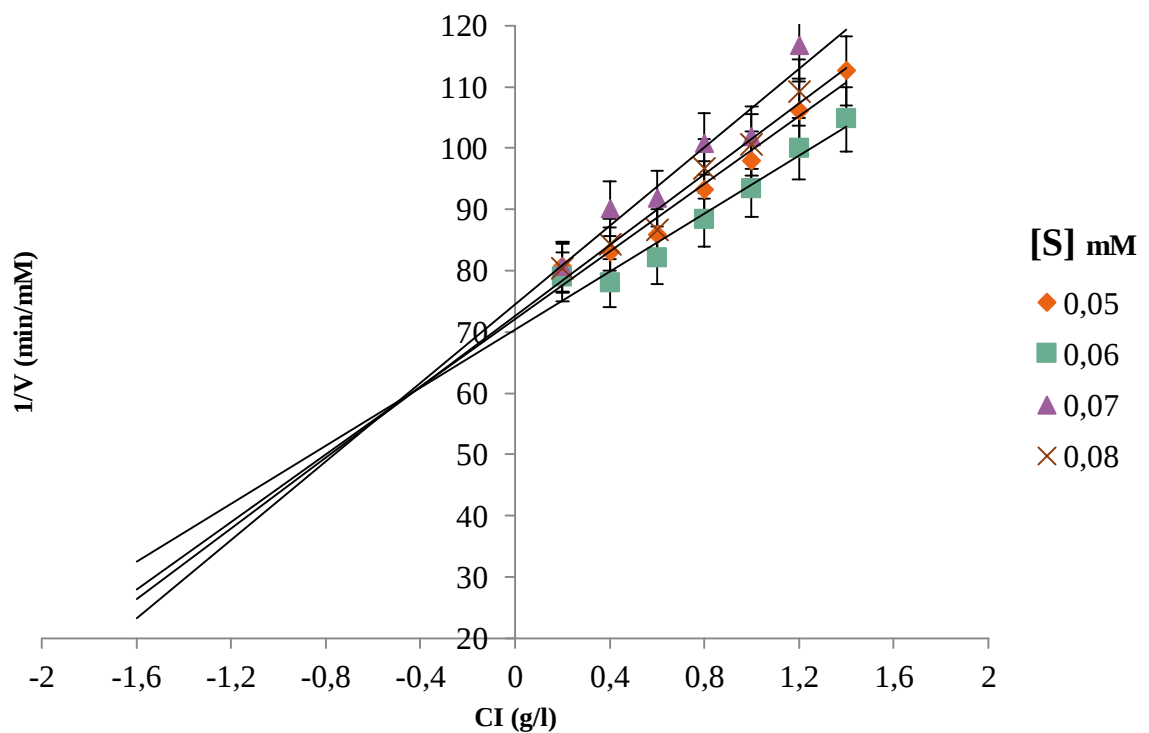


Figure 28. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique ternaire de la plante *Haloxylon scoparium*

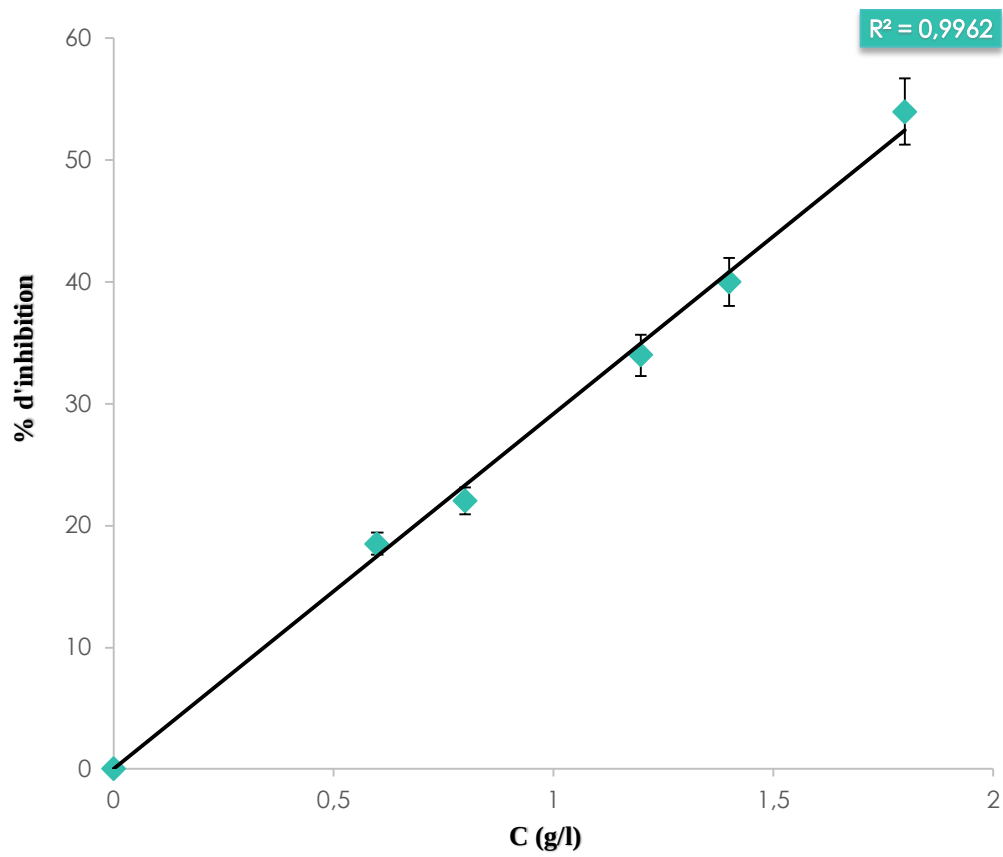


Figure 29. Courbe de l'IC 50 du système hydroalcoolique binaire de la plante *Haloxylon scoparium*

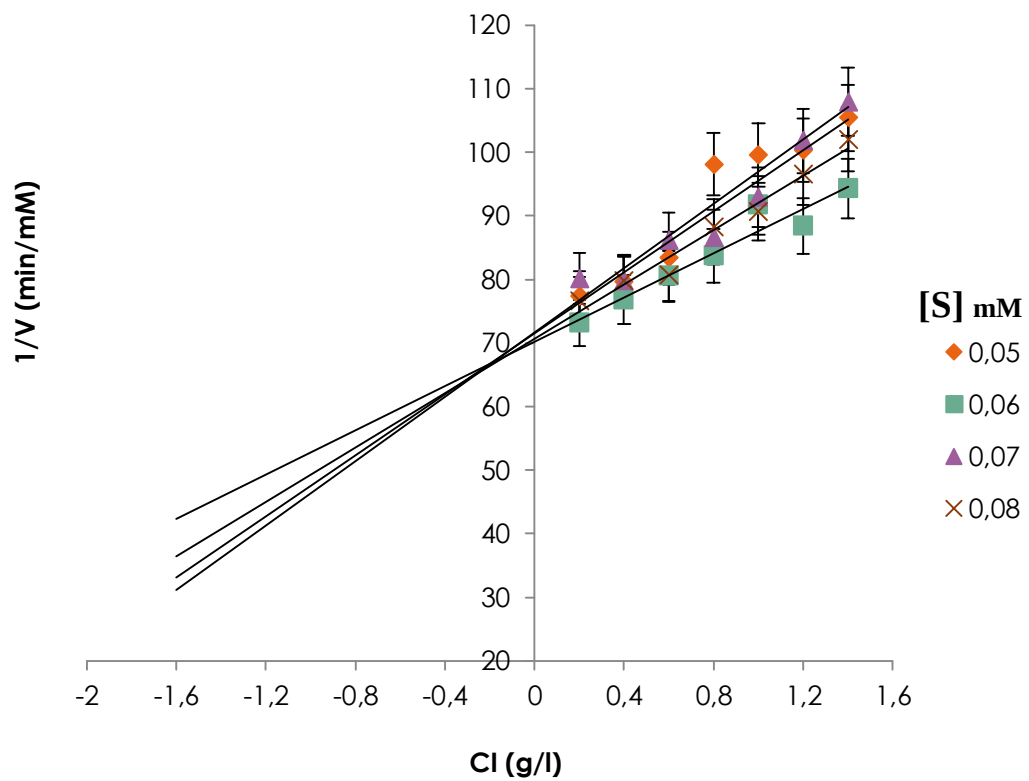


Figure 30. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique binaire de la plante *Haloxylon scoparium*

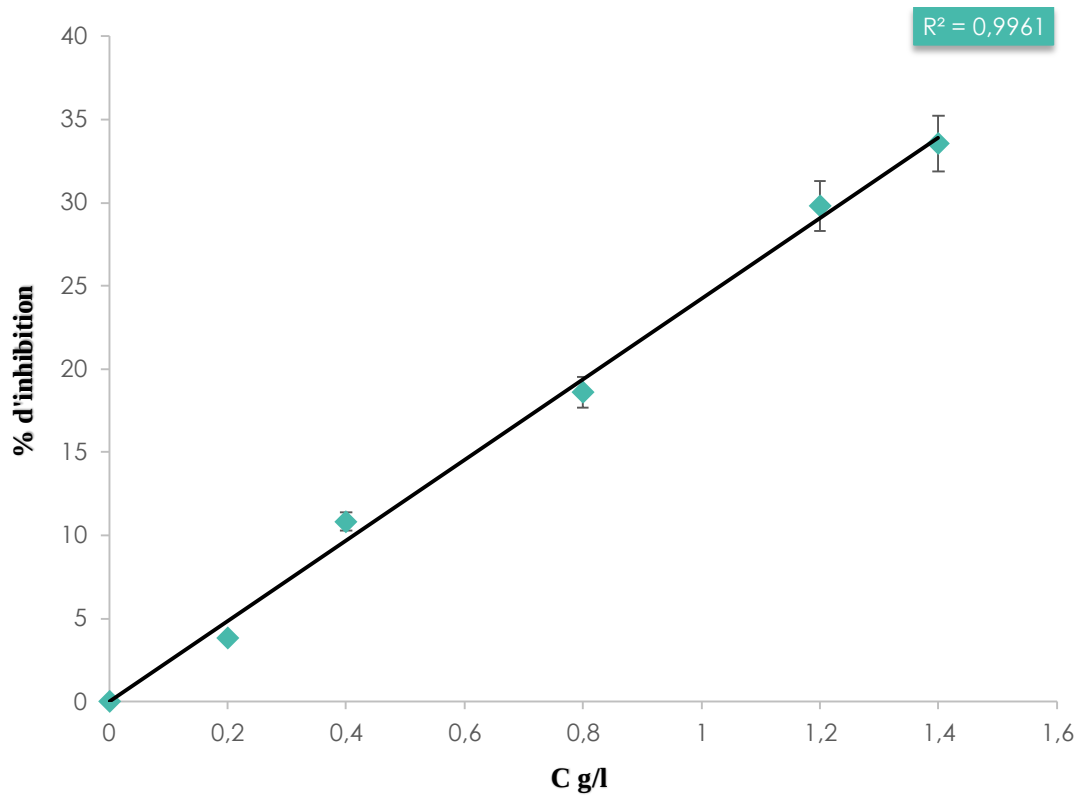


Figure 31. Courbe de l'IC 50 du système hydroalcoolique ternaire de la plante *Pilularia crispata*

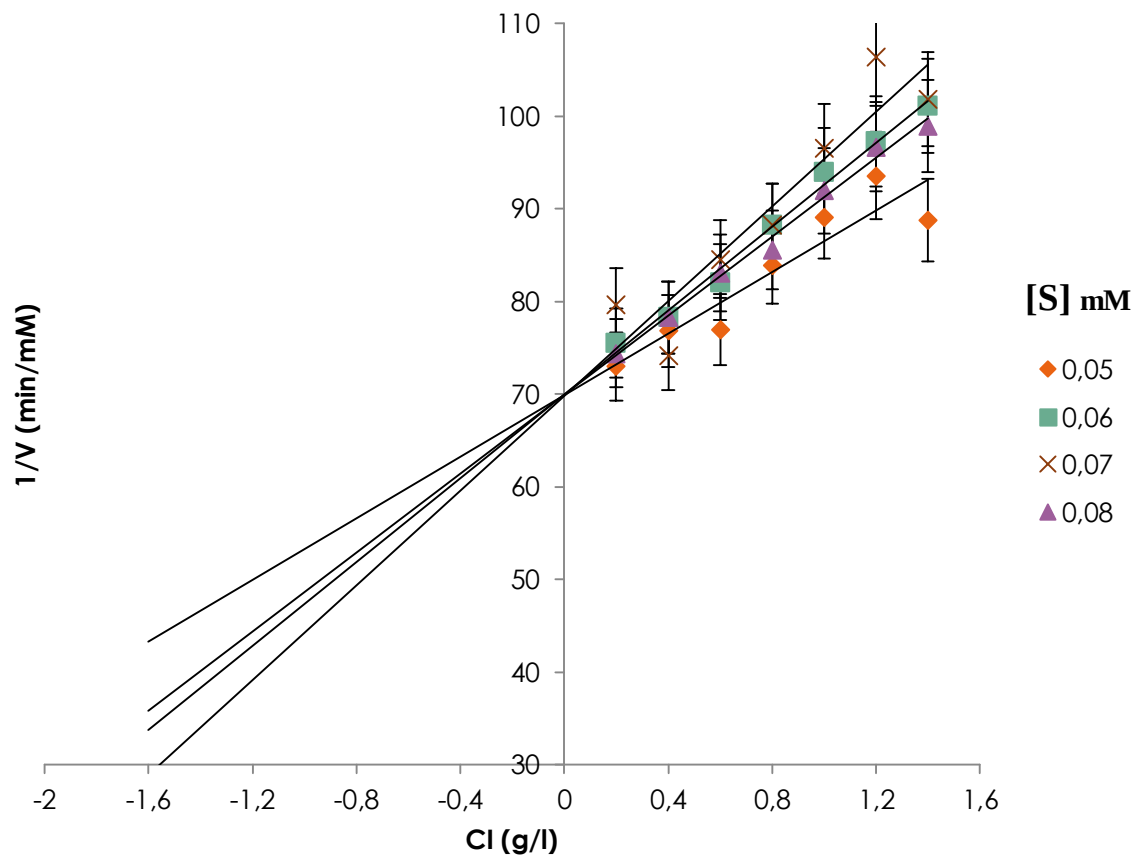


Figure 32. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique ternaire de la plante *Pilularia crispata*

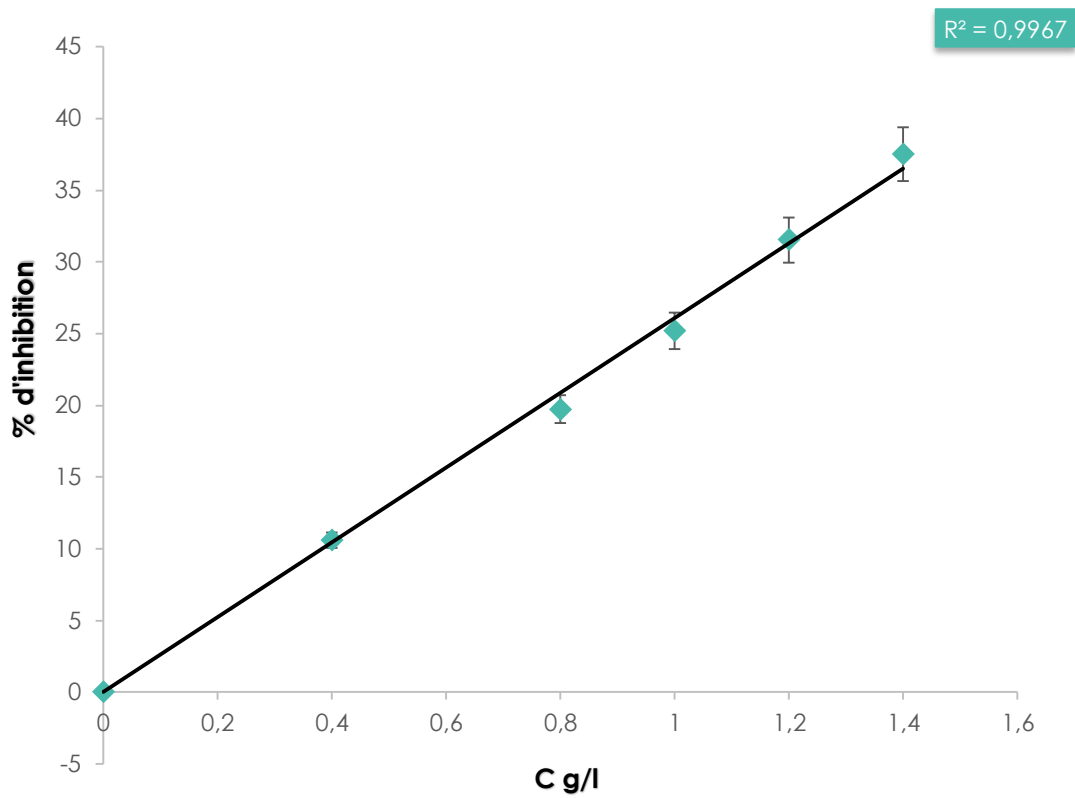


Figure 33. Courbe de l'IC 50 du système hydroalcoolique binaire de la plante *Pilucaria crispa*

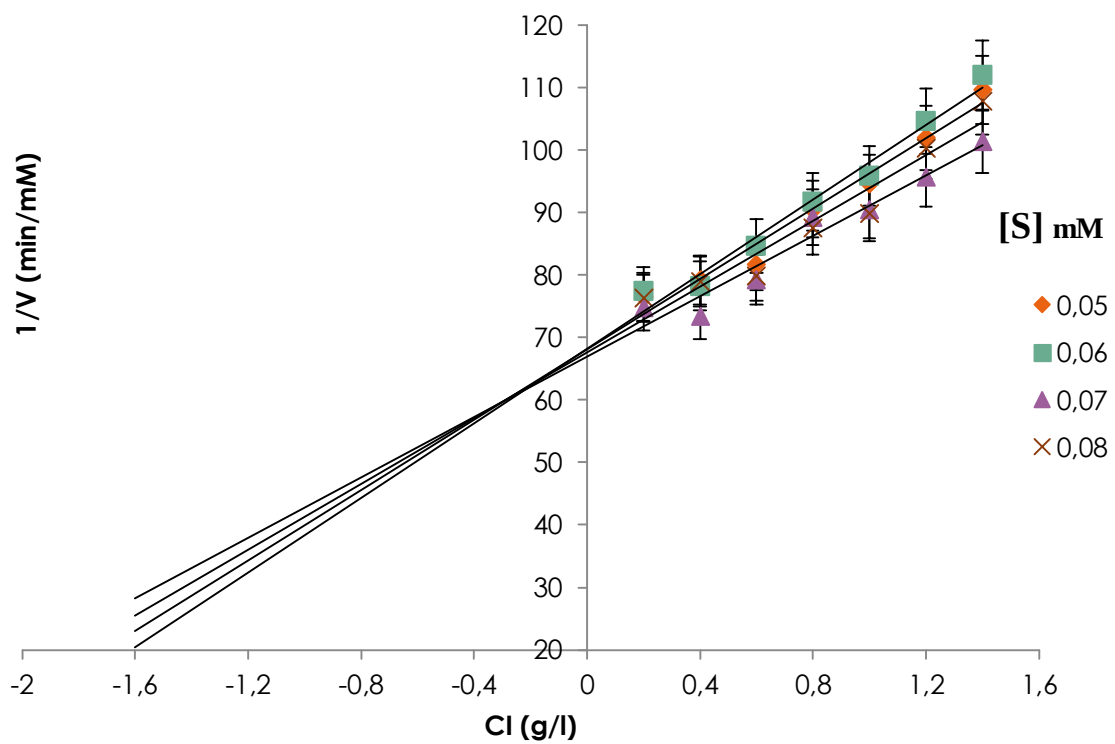


Figure 34. La représentation de Dixon du système hydroalcoolique binaire de la plante *Pilucaria crispa*

IV.5 Détermination d'IC₅₀ et K_i du standard pur

Les résultats obtenus d'IC₅₀ et de la constante d'inhibition de standard pur sont montrées dans les figures 35 et 36.

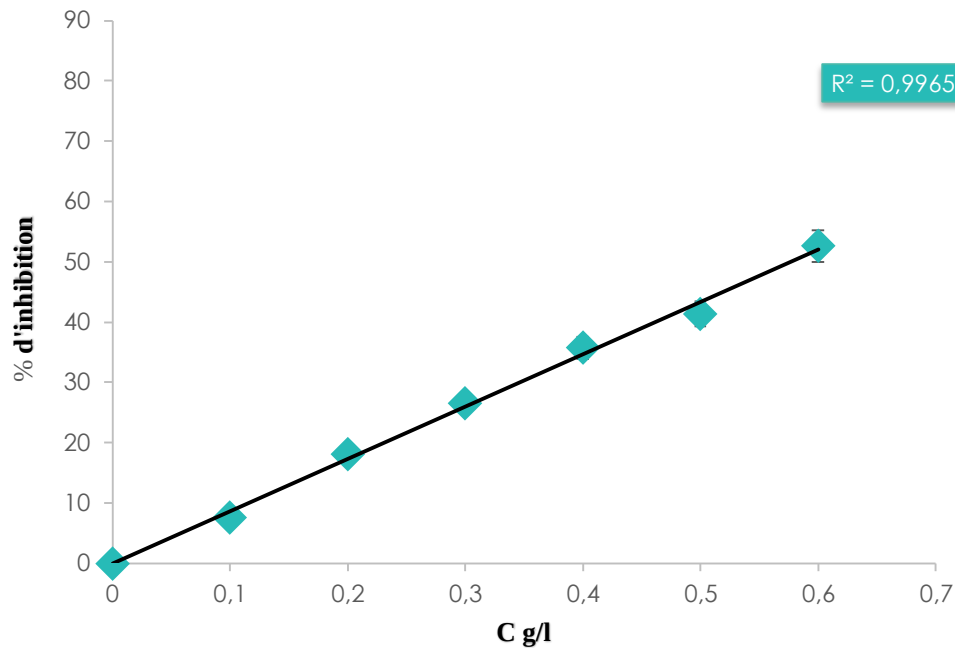


Figure 35. Courbe de l'IC 50 de Harmaline

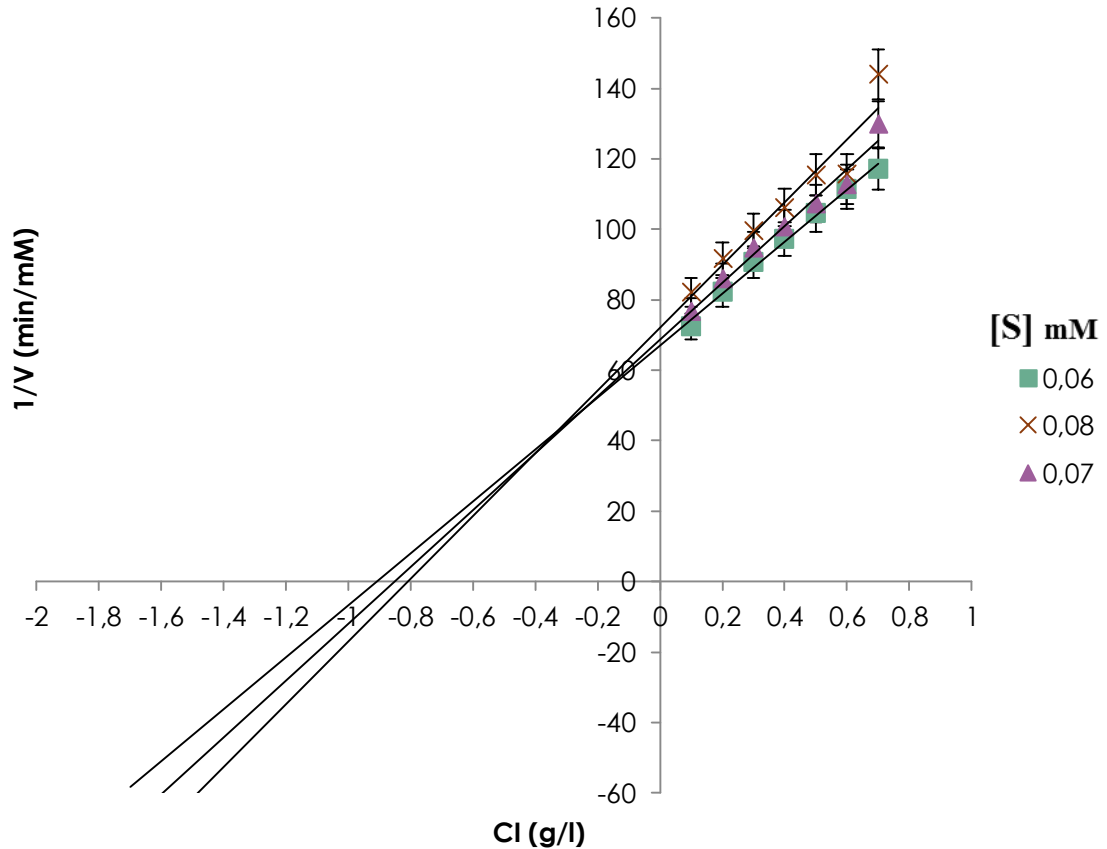


Figure 36. La représentation de Dixon de Harmaline

V. isolement par colonne chromatographique

Dans cette partie, nous avons procédé à l'isolement de la molécule responsable de l'inhibition par l'utilisation d'une colonne chromatographique ouverte la phase stationnaire c'est le gel de silice et la phase mobile c'est un mélange acétate d'éthyle acétone 6/4 VV, nous avons choisis l'extrait acétate d'éthyle issu de l'extraction liquide-liquide du **Hs** macéré sous un système hydroalcoolique ternaire en se basant à la petite valeur d'IC 50.

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 15.

Tableau 15. Les différentes fractions et leurs rendements

Les fractions	Rendement (%)	Nombre des spots
1	3,4	1
2	3,1	2
3	1,1	3
4	1,1	2
5	2,1	4
6	3	4
7	3	4
8	3,45	5
9	3,75	5
10	4,34	6

V.1. Test d'inhibition sur CCM analytique

Nous avons pulvérisé la plaque CCM avec l'enzyme LCR a plusieurs fois jusqu'à la saturation de la plaque et après le séchage à 37°C. Cette dernière est pulvérisé avec le substrat *p*-NPL, la plaque est révélée sous la lampe UV à 254nm les résultats obtenus sont présentés dans la figure 37.

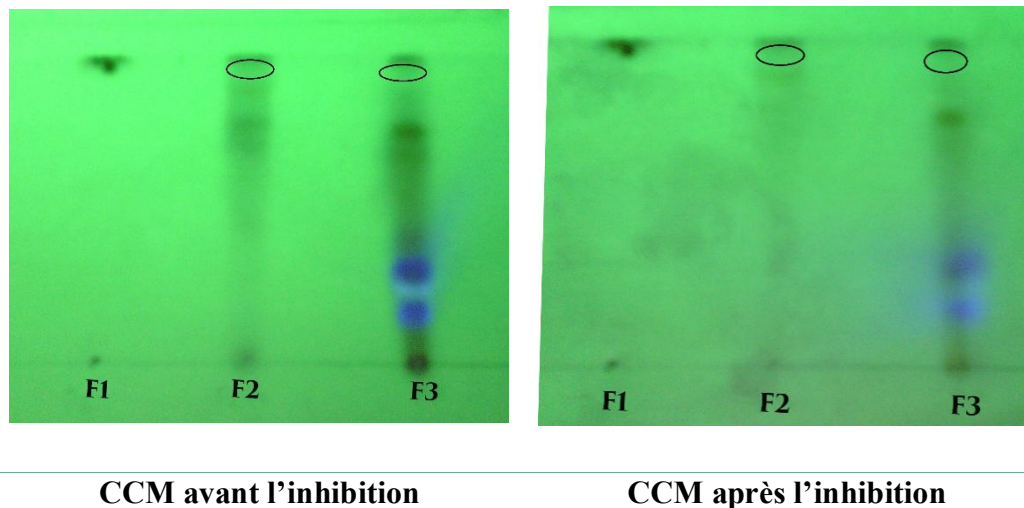


Figure 37. La plaque CCM avant et après la réaction enzymatique

Sachant que F : Fraction

V.2 Inhibition de la molécule isolée

Les représentations graphiques pour déterminer les constantes IC₅₀ et K_i sont représentées dans les figures 38 et 39.

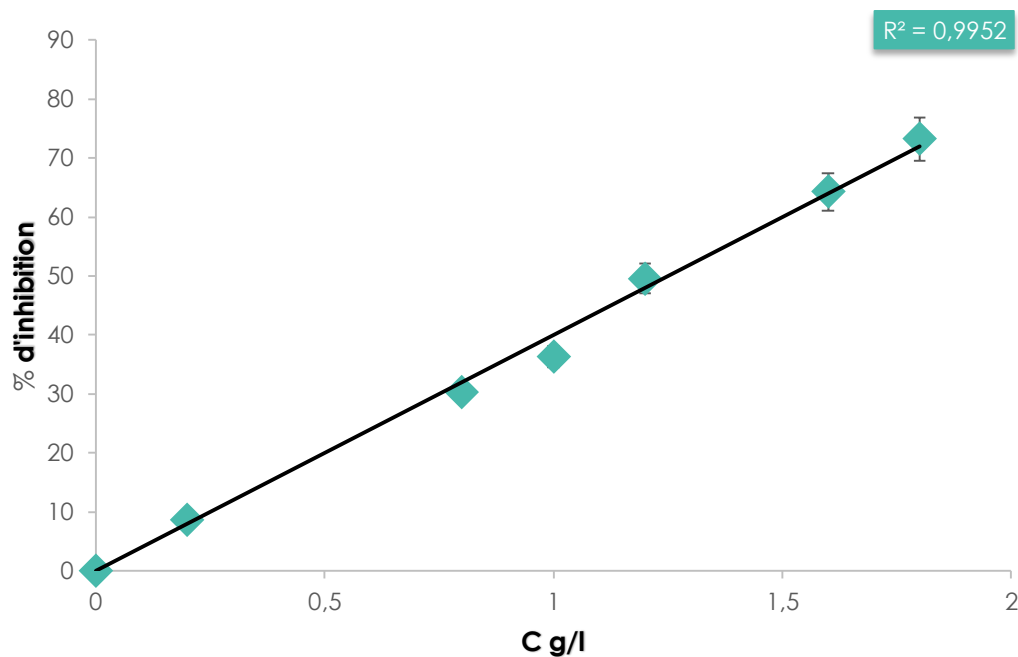


Figure 38. Courbe de l'IC₅₀ de la fraction Isolée

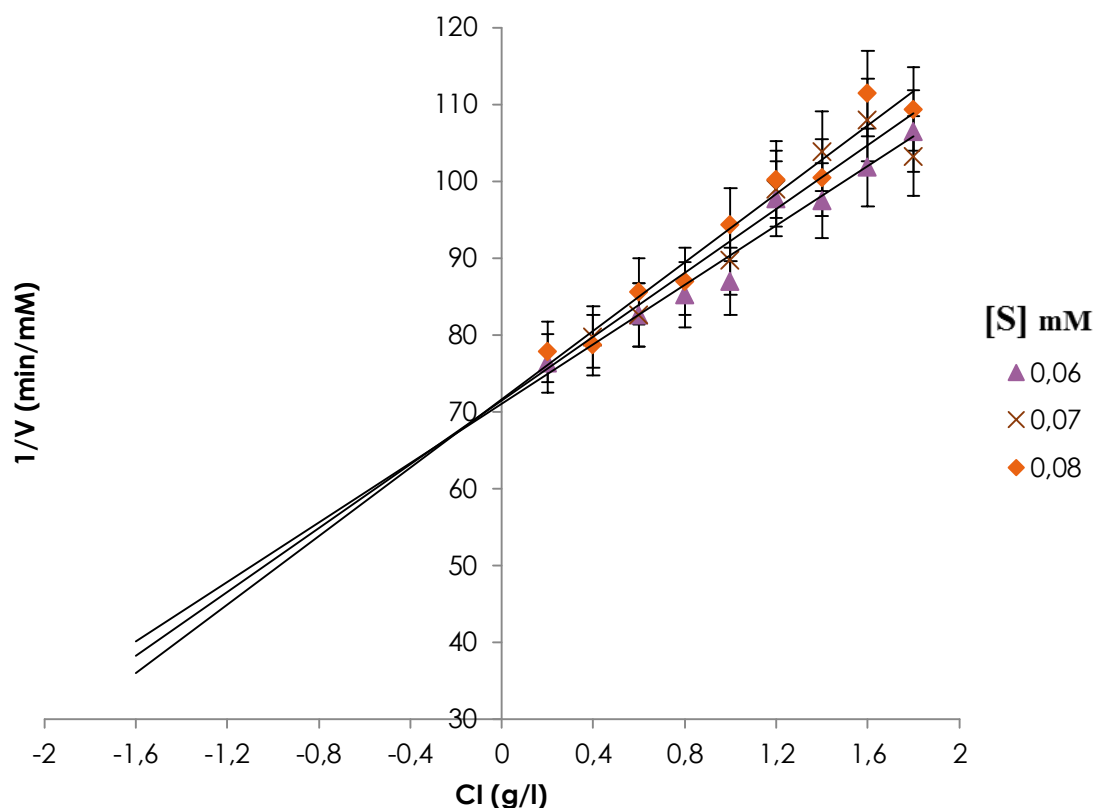


Figure 39. La représentation de Dixon de la fraction isolée

Les résultats d'inhibition de la fraction isolée sont montrés dans le tableau 16.

Tableau 16. L'IC₅₀, K_i et les type d'inhibition de la fraction isolée

	IC 50 (g/l)	Ki (g/l)	Type d'inhibition
Fraction isolée	1,25 ± 0,007	0,15 ± 0,03	compétitif

L'isolement par colonne préparative à donner plusieurs fractions allant de 1 jusqu'à 15 (selon le nombre du spot) et avec l'utilisation d'un seul système optimisé, toutes ces fraction ont été éluées et testées par CCM pour sélectionner les fractions pures ainsi que pour calculer leurs rendements, le contrôle des spots obtenus est montré dans le tableau 15. Afin de déterminer la fraction responsable de l'inhibition nous avons pulvérisé la plaque CCM par l'enzyme LCR à plusieurs fois jusqu'à la saturation de la plaque après séchage à 37°C, cette dernière est pulvérisée avec le substrat p-NPL, la plaque est révélée sous lampe UV à 254nm, la disparition du spot est la preuve de l'inhibition (voir la figure 37).

Après le test enzymatique réalisée sur la fonction isolée, nous avons pu déterminer sa valeur d'IC₅₀ de 1,25 g/l et sa constante d'inhibition avec une valeur de $0,2 \pm 0,07$ g/l et un type d'inhibition compétitif.

VI ETUDE BIO-INFORMATIQUE

VI.1. Le choix d'inhibiteur

Nous avons choisi plusieurs inhibiteurs à partir des différentes références bibliographiques pour faire le test préliminaire de docking, mais seulement une molécule pour chaque plante a été sélectionnée pour le docking final en se basant sur la faible distance entre les différentes fonctions de ces inhibiteurs avec la fonction hydroxyle de l'acide aminé serine du site actif de la lipase de *Candida rugosa*, (Benarous et Linani, 2011). Les molécules sont l'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside pour la plante *Haloxylon scoparium* et Apigenin-7-glucoside pour la plante *Pilularia crista*.

VI.2. Construction la structure des inhibiteurs

Nous avons sélectionné les inhibiteurs l'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside et Apigenin-7-glucoside à partir de la base de données Chempider dont leurs structures sont représentées dans les figures 40, figure 41.

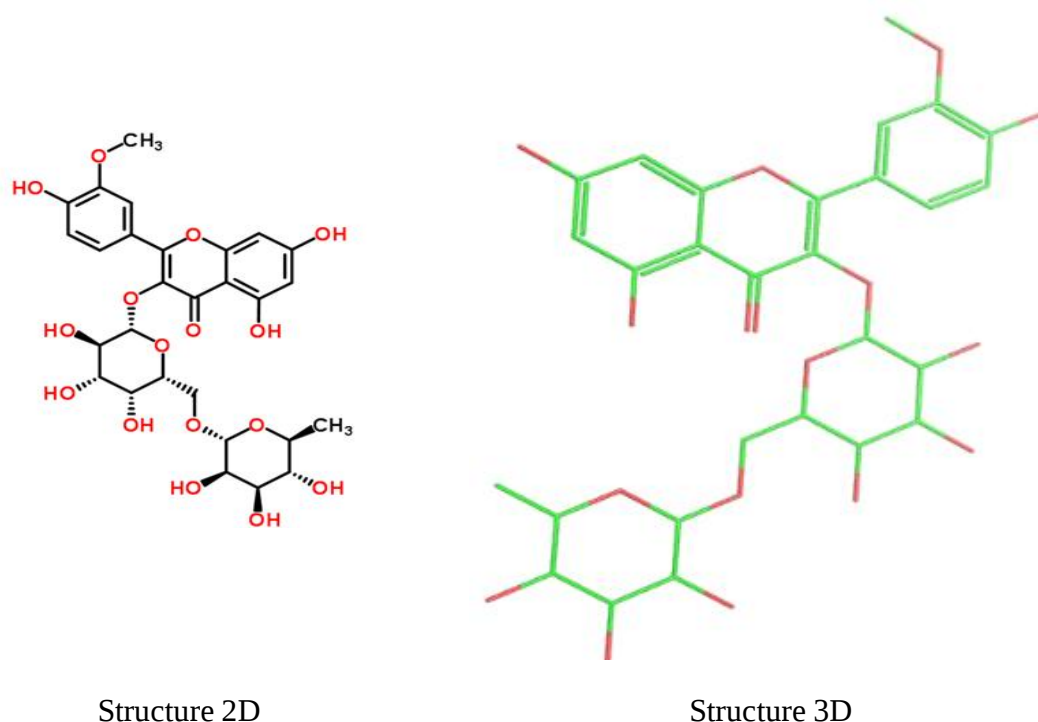
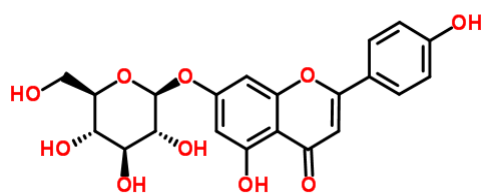


Figure 40. Les structures 2D et 3D d'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside



Structure 2D



Structure 3D

Figure 41. La structure 2D et 3D d'Apigenin-7-glucoside

VI.3. Calculs de l'énergie et du gradient et optimisation

Nous avons calculé l'énergie et le gradient des molécules CRL, HPL et les deux inhibiteurs en utilisant le logiciel Hyperchem dont les résultats sont représentés dans le tableau 17

Tableau 17. L'énergie et le gradient des différentes molécules

Calculs d'énergies et gradients	Avant/après	CRL	HPL	isorhamnetin-3-O-beta-D-robioside	Apigenin-7-glucoside
Energies (Kcal/mol)	Avant minimisation	14189.5173	17089,189	119,046	77,9244
	Après minimisation	-6123,1648	-1219,7861	48,0183	30,9701
Gradients	Avant minimisation	99,286300	70.73	27,6443	33,0041
	Après minimisation	0.089708	0.098154	0.0954	0,0983

Le résultat des calculs et de l'optimisation des différentes molécules (enzymes et inhibiteurs) en utilisant Hyperchem sont représentés dans les figures 42-49.

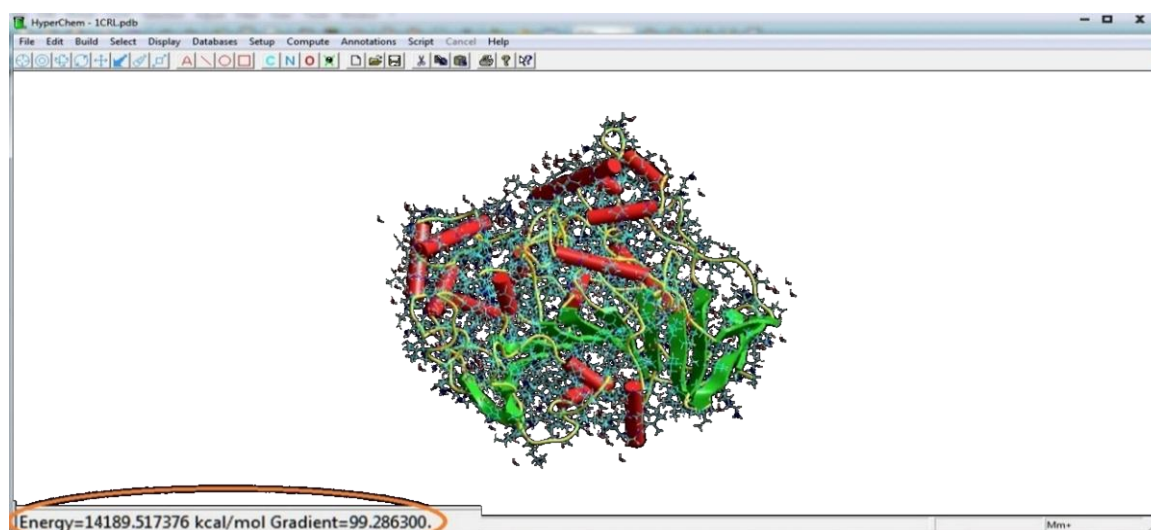


Figure 42. Calcul de l'énergie pour LCR

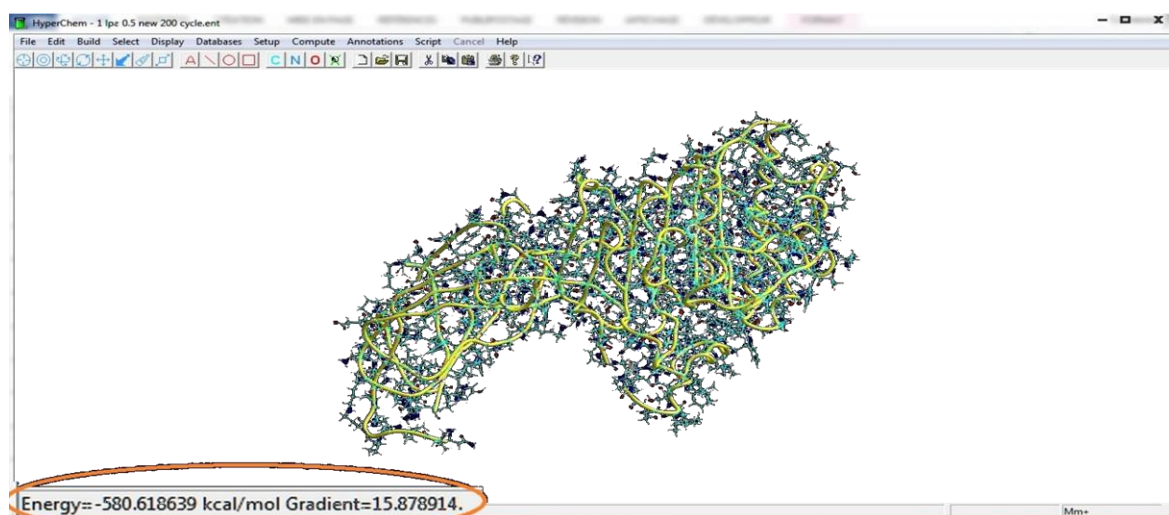


Figure 43. Calcul de l'énergie pour HPL

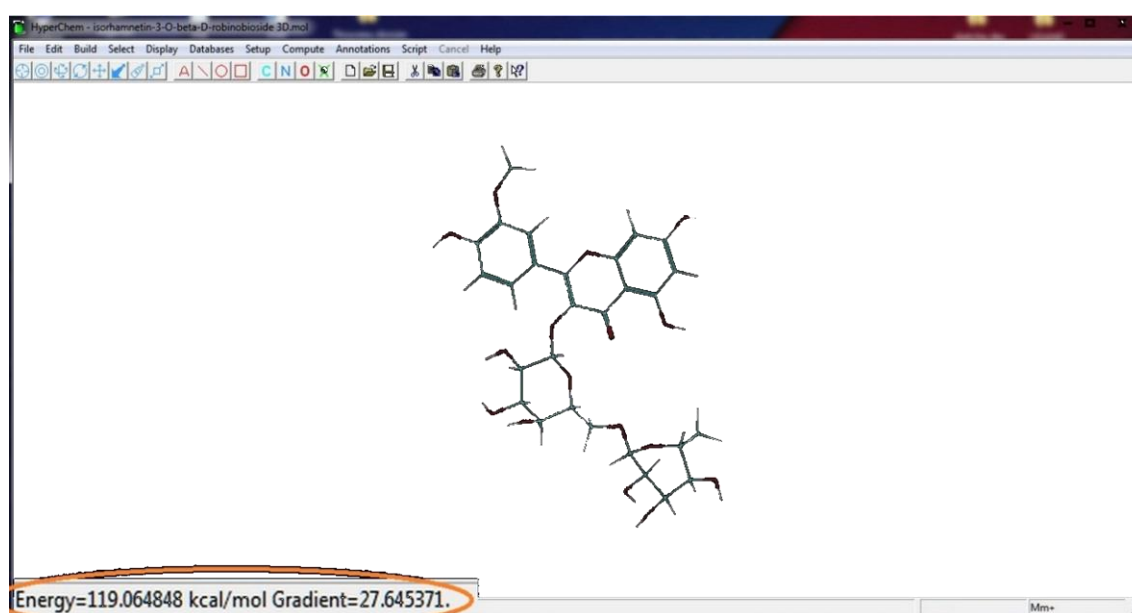


Figure 44. Calcul de l'énergie pour isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside

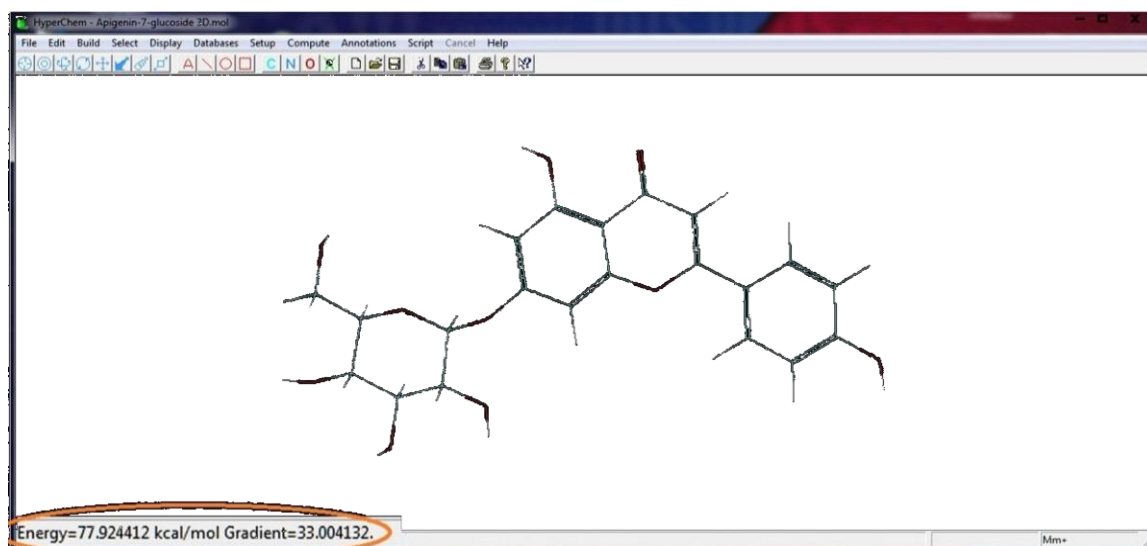


Figure 45. Calcul de l'énergie pour Apigenin-7-glucoside

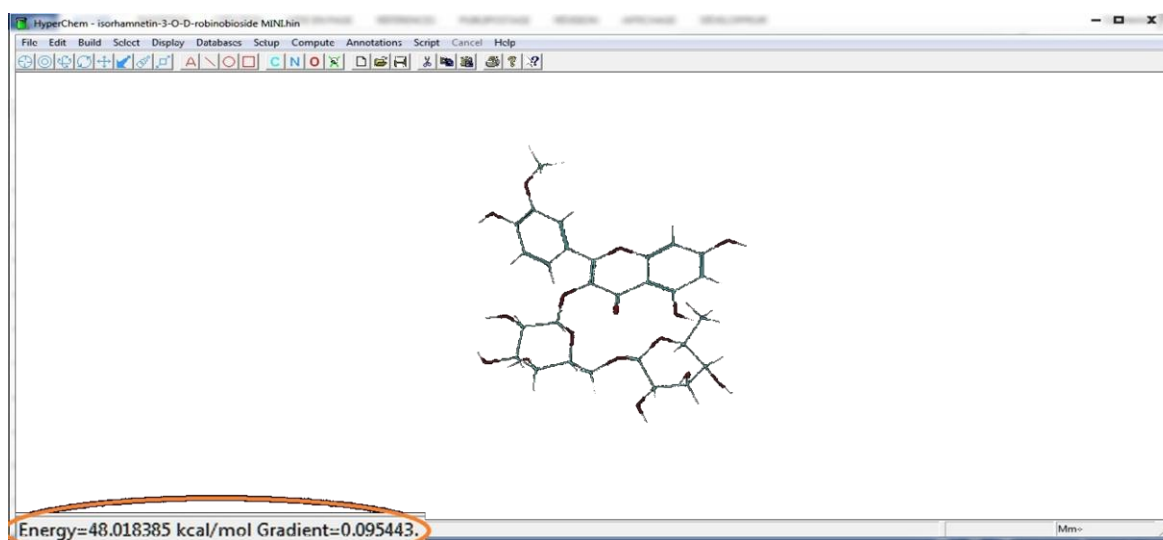


Figure 46. Minimisation de l'énergie pour isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside

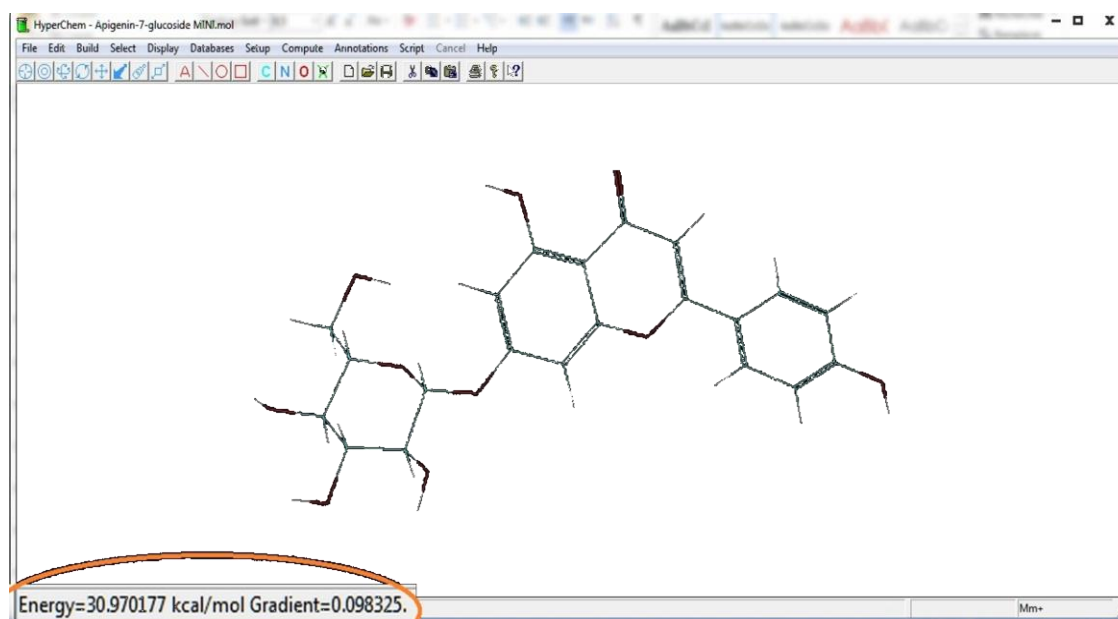


Figure 47. Minimisation de l'énergie pour apigenin-7-glucoside

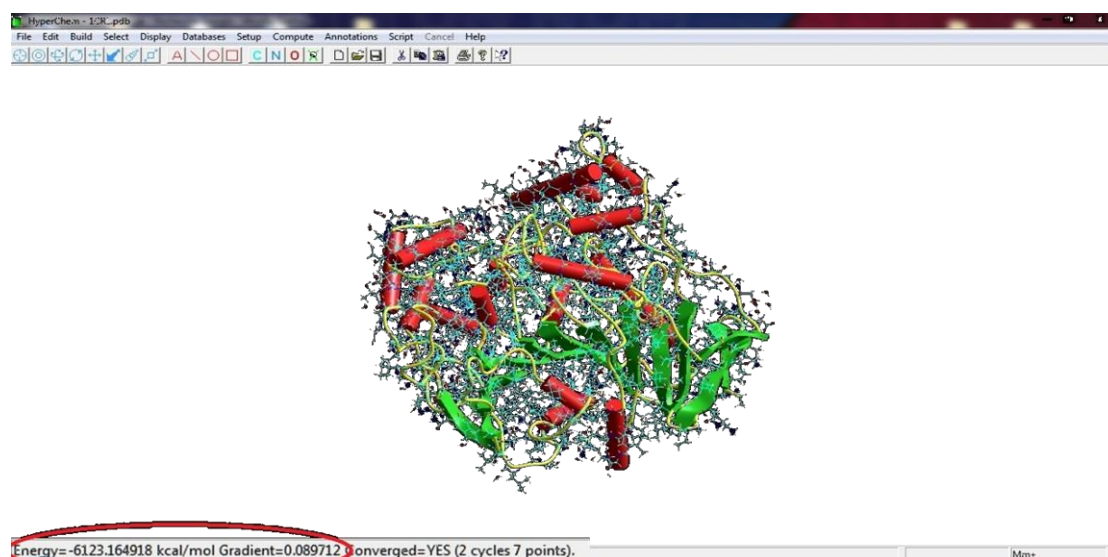


Figure 48. Optimisation de la structure de la LCR

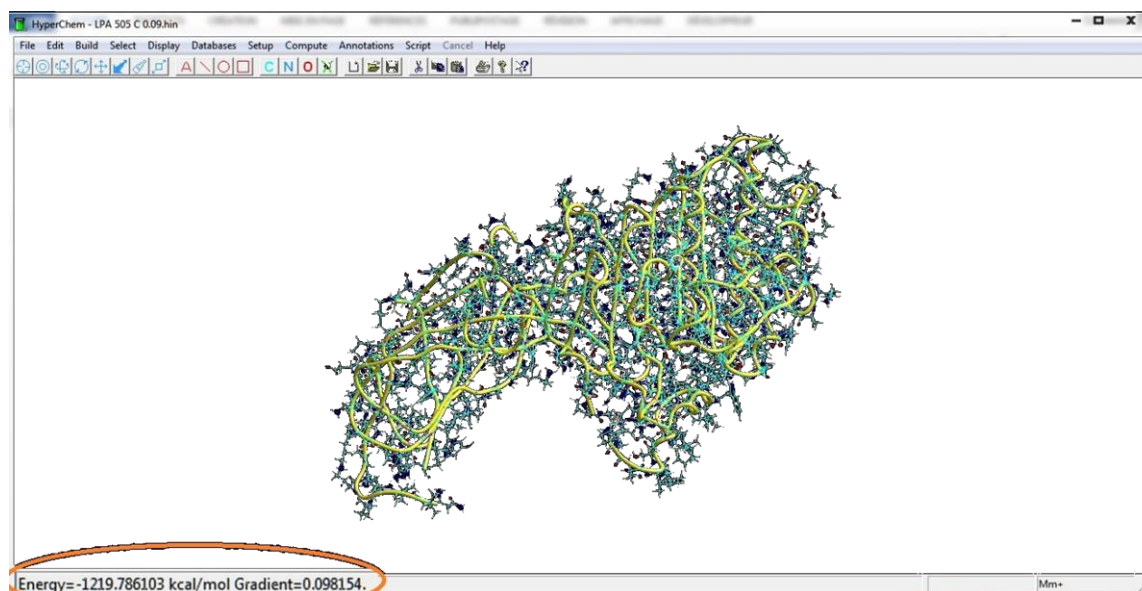


Figure 49. Optimisation de la structure de la HPL

VI.4. Le Docking des inhibiteurs

Nous avons fait le docking des deux inhibiteurs dans la LCR et aussi la HPL à l'aide du logiciel GOLD dont les résultats sont représentés dans les figures 50 à 53.

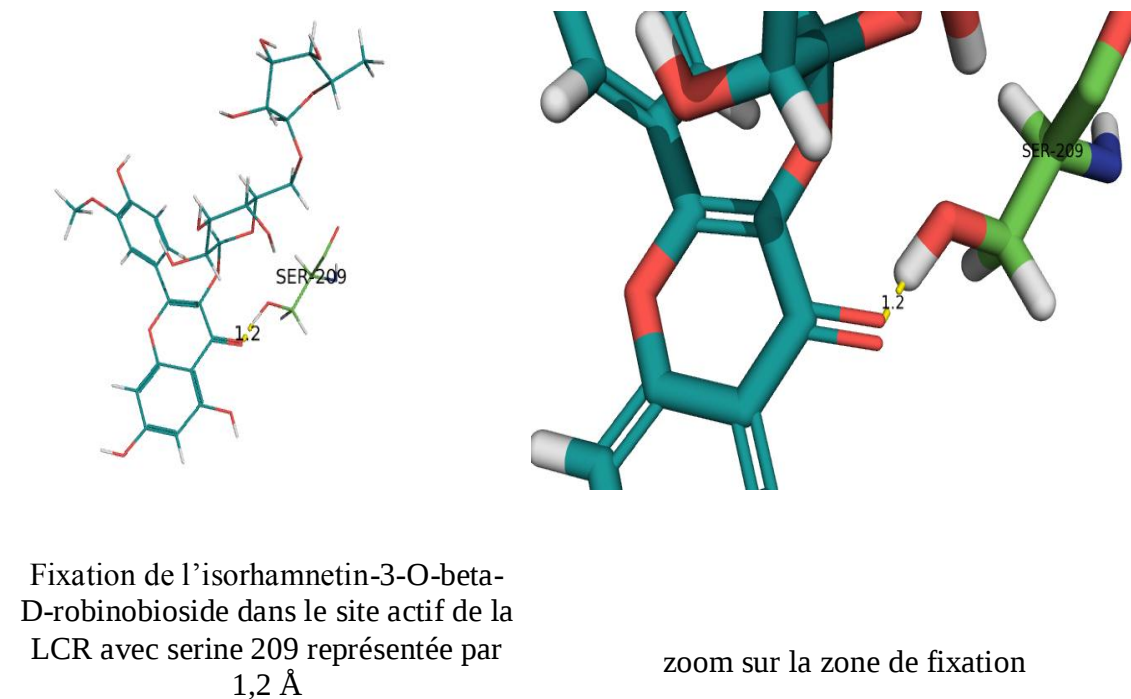


Figure 50. Docking de l'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside B dans la LCR

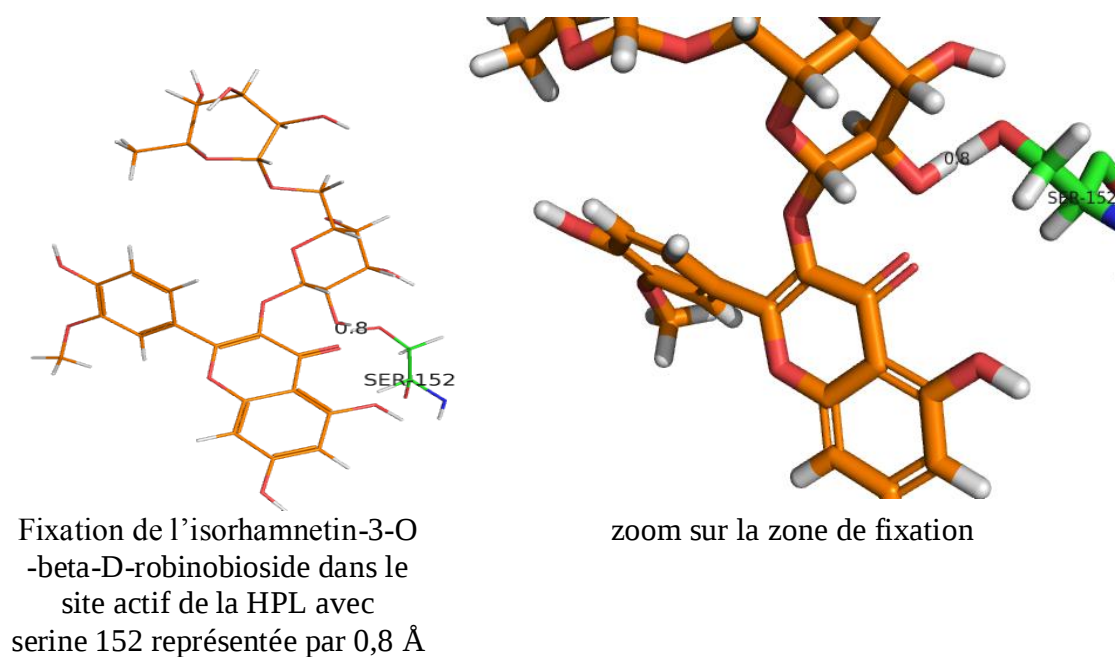
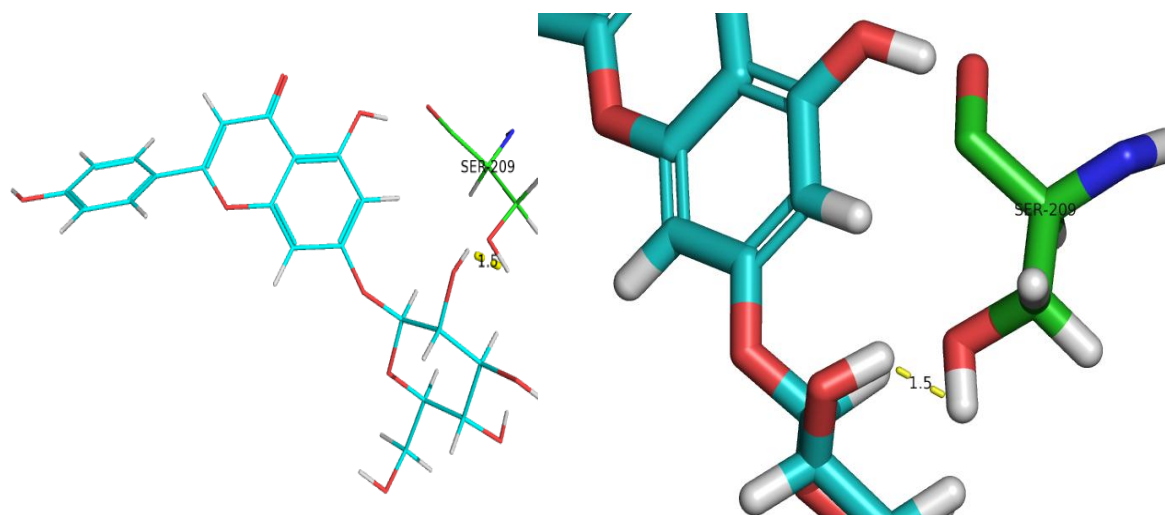


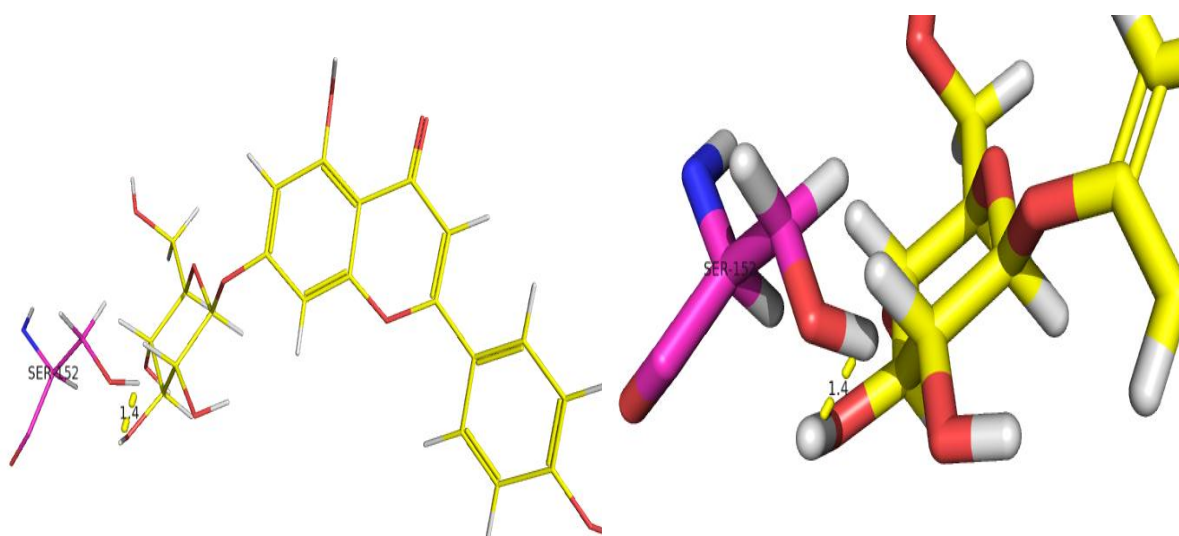
Figure 51. Docking de l'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside dans la HPL



Fixation d'Apigenin-7-glucoside
dans le site actif de la LCR
avec serine 209 représentée par 1,5 Å

zoom sur la zone de fixation

Figure 52. Docking de L'Apigenin-7-glucoside dans la LCR



Fixation de l'Apigenin-7-glucoside
dans le site actif de la HPL avec
serine 152 représentée par 1,4 Å

zoom sur la zone de fixation

Figure 53. Docking de l'Apigenin-7-glucoside dans la HPL

Les résultats obtenus du docking montrent que :

L'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside présente une distance de 1,2 Å entre la fonction cé-
tone de ce dernier et la fonction hydroxyle de l'acide aminé serine 209 de la LCR et une distance

de 0,8 Å entre les deux fonctions hydroxyle du serine 152 de la HPL et de l'inhibiteur. AL'Api-genin-7-glucoside présente une distance de 1,5 Å entre la fonction hydroxyle de ce dernier et la fonction hydroxyle de l'acide aminé serine 209 de la LCR et une distance de 1,4 Å à celui du serine 152 de la HPL.

- ✓ A partir de ces résultats, nous pouvons dire que l'affinité de ces inhibiteurs vis-à-vis la HPL est plus grande que la LCR

CONCLUSION

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. 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 une thérapie plus douce sans effets secondaires. Parmi les plantes, nous citons *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crispera*. Ces deux plantes sont très utilisées dans la thérapie traditionnelle pour traiter les ulcères, l'obésité et plusieurs infections.

Dans la chronologie de cette étude, nous avons entamé en premier lieu l'extraction des composés phénoliques, nous avons déterminé que les deux plantes sont très riches en composés phénoliques avec des teneurs qui varient de 256,25 mg/g à 390,277 mg/g GAE et spécialement les flavonoïdes avec des teneurs qui varient de 180,448 mg/g à 408,333 mg/g RE.

Les tests des effets inhibiteurs de différents extraits sur la lipase de *Candida rugosa*, montrent que les deux plantes sont riches en inhibiteur contre la LCR. Les calculs des constantes d'inhibition K_i , et IC_{50} ont montré que les extraits phénoliques de *Haloxylon scoparium* et *Pilularia crispera* sont des inhibiteurs compétitifs de la lipase.

La purification par colonne préparative montre la présence de plusieurs composés dans le même extrait, un seul composé inhibiteur a été sélectionné pour les tests d'inhibition contre la LCR. Nous avons obtenu une inhibition de 73 % avec une concentration de 1,8 g/l et un IC_{50} égale à $1,25 \pm 0,007$ de ce composé. Des analyses spectroscopiques de RMN et SM sont indispensables pour déterminer la structure finale de ce composé.

L'étude *in silico* de docking moléculaire de l'isorhamnetin-3-O-beta-D-robinobioside pour la plante *Haloxylon scoparium* et Apigenin-7-glucoside pour la plante *Pilularia crispera*, qui sont des molécules existant naturellement dans les deux plantes, sur le site actif de la lipase de *Candida rugosa* et dans le site actif de la lipase pancréatique humaine. Cette étude est précédée par plusieurs étapes de préparation des inhibiteurs et de l'enzyme caractérisés par des minimisations de l'énergie en utilisant plusieurs logiciels, les résultats obtenus exprimés par des calculs des distances entre le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine et la fonction cétone de l'inhibiteur, les résultats montrent que les deux inhibiteurs sont de bons inhibiteurs pour la HPL. Des études *in vivo* sont indispensables pour confirmer l'efficacité de ces inhibiteurs d'origine naturelle pour inhiber et plutôt pour traiter les infections causées par *Candida rugosa* et peut être traité d'autres infections causées par d'autres espèces de *Candida*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adlercreutz P., Gitlesen T., Ncube I. & Read J., 1997, *Veronia* lipase: a plant lipase with strong fatty acid selectivity. *Methods Enzymol.*, 284, 220-231.

Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. (1996). Advances in development of

B

Baba T., Downs D., Jackson KW., Tang J., Wang CS., 1991. Structure of human milk bile salt activated lipase. *Biochemistry*, 30: 500-510.

Beisson F. et al., 2001, Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1531, 47-58.

Benarous K., Linani A., (2011). Selection of orlistat as a potential inhibitor for lipase from *Candida* species, *Bioinformation* 7(3): 125-129.

Benarous K., Djeridane A., Kameli A., and Yousfi M., (2013), Inhibition of *Candida rugosa* Lipase by Secondary Metabolites Extracts of Three Algerian Plants and their Antioxydant Activities . *Enzyme Inhibition*, 9, 75-82

Benarous K., (2010). Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de *Candida rugosa*, Mémoire de magistère, université Amar Tleldj, Laghouat, p 64.

Benkrief R., Brum-Bousquet M., Tillequin F., Koch M. (1990), Alkaloids and a flavonoid from aerial parts of *Hammada articulata* ssp. *scoparia* . *Ann Pharm*1994, 48, 219-224.

Bodey G., Mardan P., Hanna., Boktour A., Abbas M., Girgawy J., Hachem E., Y., , (2002). II, The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med*. 112: 380- 385.

Bouguendoura N., (2011). Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calaminthasspnepta* (nabta) et *Ajuga iva* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie.(Mémoire de Magister), Faculté des Sciences. Université Abou BakrBelkaid-Tlemcen. p125.

Bourogaa E., Mezghani Jarraya R., Nciri R., Damak M., Elfeki A. (2012). Protective effects of aqueous extract of *Hammada scoparia* against hepatotoxicity induced by ethanol in the rat. *Toxicol Ind Health*. 32(9): 739-49.

Bossokpi., (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloides* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, p 133.

Borrelli F., Izzo A., (2002). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res*. Dec;14(8):581-91.

Bonnaillie C ., Mathieu Salacs., Elena Vassilova., & Ilonka, Saykova. (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 7(35- 45).

Bruneton J., (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales 3^{ème} édition. Tec&doc.Paris. mechanisms in fruit and vegetables. In: les polyphenols en agroalimentaire. Sarni- Manchado, P., Cheynier, V., 2006., Tec et Doc Lavoisier-Paris.

Brzozowska J., Hanower, P., Tanguy, J. (1973). Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12: 2353-2357.

C - D - E - F

Corrosion engineering. (1987). McGraw Hill International Edition. New- York.

Castle E., (2012). L'orlistat dosé à 60mg premier médicament vent pour traiter le surpoids , Mémoire de Doctorat, université UFR de médecine Rouen, p 14.

Cowan M., (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564-582.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

Center for Disease Control and Prevention 2011, Overweight and Obesity – Data and Statistics, CDC. [Consulté le 25 juillet 2011]. www.cdc.gov.

Dalziel, J.M. (1937). The useful plants of W.Tropical Africa, pp18-22. Crown agents for the colonies, London.

Dendouguia H., Samir B., Fadila B., Joseph D. Connoly (2006).

Dubois, G.E., Grosbay, G.A., Saffron, P. (1977). Non-nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. Science, 195: 397-399.

Edenharder, R., Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimuriumTA102. Mutat. Res, 540: 1–18.

El darra, N., Grimi, N., Vorobiev, Eugène., Louka, Nicolas., & Maroun, Richard. (2011). Intensification de l'extraction des composés phénoliques pendant la macération pré fermentaire à froid des raisins rouges. 1.

Elayyachy, A. El Idrissi, B. Hammouti, (2006). Corros. Sci. 48 2470.

Fiaud.C., (2006). Inhibiteurs de corrosion, Techniques de l'ingénieur, COR1005.

G

Giner-C., Bertha I., (1996). Condensed tannins in tropical forages. (Doctoral Thesis), Cornell University, Ithaca, NY.

Guignard, J., (1974). Abergé de Biochimie végétale à l'usage des étudiants en pharmacie :

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J., Cygler M., 1994, Two conformational states of Candida-rugosa lipase. Protein Sci., 3: 82-91.

Grosdider A., (2003). Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Mémoire .de Doctorat , p15-24.

Guignard, J.L. 2000, Biochimie végétal 2ème edition Dunod. 188 p.

Guignard, J.L., Cosson, L., et Henry, M. 1985, Abérgé de phytochimie, Masson. Paris, Pp 138.

H

Harbone, J.B., (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press: London.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Therapeut, 96: 67– 202

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. (2007). Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. Biochem. Syst. Ecol, 35: 624-626.

Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M., Amine Serghini, M. (2004). Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). Reviews in Biology and Biotechnology, 3 (1): 37-42.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. Chem. Biol. Interact, 139: 1–21.

J-K-L

Janssen, A. E.M., Halling, P.J., 1994, Specificities of enzymes corrected for solvation depend on the choice of the standard state. J. Am. Chem. Soc. 116: 9827-9830.

Kitagawa, I., (2002). Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. Pure Appl. Chem. 74: 1189–1198.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant. Physiol Bioch, 45: 244-249.

Lagane C., (2007). role de l'il-13 et des ligands de ppar- γ dans la reponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-a-vis de *candida albicans*. implication de ppar- γ . Mémoire de doctorat, université Toulouse III – Paul Sabatier, France, p 14.

Lamaison, J.L. and A. Carnat, 1991, Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC., en fonction de la végétation. *Plants Med. Phytother.*, 25: 12-16.

Leong, L.P., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.

Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem*, 53 : 1990-1995.

Loche, J., (1966). Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). Ann de la direction des études et de l'équipement, France, 3 : 15.

Linani A., (2013). Etude de l'effet inhibiteur des extraits de la plante *Inonotus hispidus* sur la lipase de *Candida rugosa* , thèse de Master, université Amar Tleldj Laghouat

M

Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B., (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. *Springer-Verlag*. New York, U.S.A.

Mabry T J, Markham K R. (1968). Flavonoids from Bauhinia species. *Tetrahedron.*;24:823–826.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839

Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M. (1998). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).

Mohammedi Z., (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie, Mémoire de Doctorat, université Abou bekre belkaid, Tlemcen, p 14.

Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.

N-O

Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1961). Synergistes naturels des auxinex et des giberellines. Bull. Soc. Fr, 26: 2237-2240.

Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin Nutr, 74 : 418–425.

ObÉpi-Roche (2009), Cinquième édition de l'enquête nationale sur la prévalence de l'obésité et du surpoids en France.

Oleszek, W.A., (2002). Chromatographic determination of plant saponins. J. Chromatogr. A. 967 : 147–162.

Organisation Mondiale de la Santé. (2003). Rapport Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale, Genève. Rapport disponible à l'adresse suivante :<http://whqlib-doc.who.int>. [Consulté le 18 juillet 2011].

Osada, K., Takahashi, K., Hatano, M., 1990, Modification of sardine oil by immobilized bacterial lipase, J. Jpn. Oil Chem. Soc. 39: 467–471.

P-Q

Patkar, S., Björkling, F., (1994). Lipase inhibitors. In Lipases: their structure, biochemistry and application (Woolley, P. and Petersen, S.B., Eds.). *Cambridge University Press*, pp 207–224. Cambridge.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T., (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **29** (2): 119-131

Pourbaix, P., (2000). Electrochimica Acta Volume 45, Issues 15-16, 3 XIII-XVI.

Quettier-Deleu, C., B. Gressier, J. Vasseur, T. Dine and C. Brunet et al., (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Pagopyrum esculentum moench*), hulls and flour. J. Ethanopharmacol., 72: 35-42.

R-S-T

Ruiz C., Serena F., Entela X, H. (2006). Inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Volume 40, Issues 3–4, Pages 138–143

Stolley, M. R., Fitzgibbon, M. L., Schiffer, L., Sharp, L. K., Singh, V., Van Horn L., Dyer, A., (2008). Obesity Reduction Black Intervention Trial (ORBIT): Six-month Results. Obesity, 17:100–106.

Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R. D., Pleiss, J., 2002, Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity, Protein Engineering, 15 (7): 595–601.

Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4' -hydroxy substituted members. Innovat Food Sci Emerg Tech, 7: 140-146.

Tizki., M. Lehlimi, A. Habzi, S. Benomar,, Saso, L., (2012). Candidose cutanée congénitale : à propos d'un cas Congenital cutaneous candidiasis: A case report and review of the literature, Journal de Pédiatrie et de Puériculture Volume 25, Issue 5, October 2012, Pages 271–274

V-W-Y-Z

Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F. (1996). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. Biochem. Pharmacol, 56 : 935– 943.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. Plant. Food Hum. Nutr, 59 : 113-122.

Www.saharanature.com consulté le 25 mars 2014.

Www.statistique mondiale.com consulté le 19 mars 2014.