

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمّار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT Sciences de la Matière



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie organique appliquée

Par :

BELHADJ Naciria

DJELLIKH Meriem

THEME

Effet de quelques colorants alimentaires sur l'activité de l' α -amylase pancréatique porcine

Soutenu publiquement le 16 Mai 2018 devant le jury composé de :

M^r. Mohamed BENALIA

MCB

Président

M^{me}. Chahrazed HAMIA

MCB

Examinatrice

M^{elle}. Fatima Zohra BATANA

MAA

Examinatrice

M^r. Amar DJERIDANE

Pr.

Encadreur

M^{elle}. Reguia MAHFOUDI

MCB

Co-encadreur

Année Universitaire 2017- 2018

Dédicaces

A mon père

Puisse ce travail faire honneur à ton courage et aux valeurs que tu m'as transmises. Puisse-t-il te rendre fier de moi de là-haut.

A ma mère

Qui m'a toujours apporté amour et affection et m'a soutenu dans mes études.

A tous mes frères et mes sœurs

Mohamed et Bachir, Naïma, Amina, et Khadidja

Merci pour vos encouragements pendant les moments difficiles.

A

SOUFFI Ismail Qui m'a encouragé durant cette année et son soutien et ses remarques impressionnant

A Hiba. Ch, et mon binôme Meriem .D

Merci pour tous les moments passés et pour les longues journées heureuses ...

Naciria

Dédicace

A mes chères parents : Ben chohra et Fatîha

Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer mon respect, mon amour éternel et que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de me donner depuis ma naissant ce, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Je vous dédie ce travail en témoignage d'amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur.

A mes très cher frère : Mustapha, Boufateh Mohamed

A mes très chère sœurs : Fatna et Hanane et leurs époux Saïd et Amar

A mes adorables nièces et neveux : Ibtihal, Alaa, Mohamed, Mouad

Aucune dédicace ne serait exprimer assez ce que je ressens envers vous dirais tout simplement merci pour votre encouragement je vous aime

Pour mon cher fiancé : Guibeche.k et sa famille :

Pour son soutien moral sa gentillesse sans égal, son profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans son aide, ses conseils et ses encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que Dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mes très chères amies

Bouchra.B ; Hiba.CH ; Kheira.B ; Hanaa.B et mon binôme Naciria.B

En témoignage de l'amitié sincère qui nous a liés et des bons moments passé ensemble je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux

A toutes ma famille pour l'amour et le respect qu'ils m'ont toujours accordé

A tous nos collègues de la promotion A tous nos professeurs de l'enseignement qui nous ont enseigné A tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, et qui ont contribué à la réalisation de ce travail

MERTEM

Remerciements

Nos remerciements s'adressent d'abord à ALLAH le tout puissant et à son prophète MOHAMED (paix et salut sur lui) pour les chances qui nous ont été offertes pour réaliser ce travail

Toute œuvre qui résulte d'un effort humain est explicitement ou implicitement toujours le fruit d'une vaste collaboration. Ainsi, que tous ceux qui ont pris une part active dans la réalisation de ce mémoire puissent trouver dans ces lignes l'expression de notre profonde gratitude. En nous exprimant de la sorte,

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire des sciences fondamentales à l'université Amar Telidji de Laghouat. Ainsi, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à monsieur le professeur, YOUSFI Mohammed directeur du laboratoire des sciences fondamentales, pour nous avoir accueillie durant la réalisation de ce travail et nous a permis de le mener dans de bonnes Conditions.

Nous pensons tout particulièrement à notre encadreur

Pr. DJERIDANE Amar

Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude, vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Nous exprimons notre gratitude à notre co-promotrice, M^{lle}. Mahfoudi Reguia pour son aide et pour tous les efforts qu'elle a consentis tout au long de l'élaboration de ce travail, par sa gentillesse, sa disponibilité et son immense savoir-faire.

Il nous est particulièrement agréable d'exprimer notre gratitude et reconnaissance à M^r TAHRI Djillali pour ses précieux conseils et remarque

A nos chers professeurs et jury

Nous vous remercions pour vos soutiens, vos remarques et conseils, pour vos encouragements veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude.



Liste des sigles et abréviations

A ₀	: Absorbance en absence de fraction.
A ₁	: Absorbance en absence de l'inhibiteur.
Asp	: Acide aminé Asparagine.
CBM	: Module de liaison aux glucides (<i>Carbohydrates Binding Module</i>).
EC	: Commission des enzymes (<i>Enzyme commission</i>).
GLC	: Glucose.
Glu	: Acide Glutamique
Gly	: Acide aminé Glycine.
GOL	: Glycérol.
His	: Acide aminé Histidine.
HOMO	: Orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée (<i>highest occupied molecular orbital</i>).
IC ₅₀	: Concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse enzymatique jusqu'à 50 % de sa valeur maximal non-inhibée.
IDDM	: Diabète insulino-dépendant (<i>Insulin –Dependent Diabets Mellitus</i>).
Ile	: Acide aminé Isoleucine.
KDa	: Kilo Dalton.
Leu	: Acide aminé Leucine.
LUMO	: Orbitale la plus basse en énergie non occupée (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>).
M	: Molaire.
MVD	: Molegro virtuel Docker
NDDM	: Diabète non insulino-dépendant (<i>Non insulin –Dependent Diabets Mellitus</i>).
NPO	: P-nitrophénol
PCA	: Acide Pyroglutamique (<i>Pyroglutamic Acid</i>).
PDB	: Banque de Données des Protéines (<i>Protein Data Bank</i>).
PI	: Pourcentage d'inhibition.
PLP	: Potentiel linéaire par morceaux (<i>PiecewiseLinearPotential</i>).

- Pr : Paramètre.
- QSAR : Relation Quantitative Structure-Activité (*Quantitative Structure Activity Relationship*).
- R^2 : Coefficient de corrélation.
- RLM : Régression linéaire multiple.
- RMSD : Déviation quadratique moyenne (*root-mean-square deviation*).
- RMSE : Erreur quadratique moyenne (*root-mean-square error*).
- Trp : Acide aminé Tryptophane.
- Tyr : Acide aminé Tyrosine.
- UI : Unité Internationale.
- UV-Vis : Ultraviolet-Visible.
- Val : Acide aminé Valine.
- 3L2L : Code structurales de l' α -amylase pancréatique de porc.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Complexe entre amylase pancréatique porcine (en blanc), molécules d'eau (en bleu ; seul l'atome d'oxygène est repéré) et trois fragments d'amidon (coloration par type d'atome). 5
- Figure 2 : Pouvoir d'inhibition de l' α -amylase des colorants et acarbose. 12
- Figure 3 : Corrélation entre les valeurs des IC_{50} expérimentales et prédites. 17
- Figure 4 : Représentation des interactions SIN102-3L2L : les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+). 21
- Figure 5 : Représentation des interactions SIN104-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+). 22
- Figure 6 : Représentation des interactions SIN124-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+). 22
- Figure 7 : Représentation des interactions SIN127-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+). 23
- Figure 8 : Représentation des interactions SIN131-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+). 23
- Figure 9 : Représentation des interactions acarbose-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+). 24

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Colorants alimentaires et l'acarbose utilisés dans cette étude.	4
Tableau 2 : Réactifs utilisés dans ce travail.	5
Tableau 3 : Descripteurs moléculaires 2D utilisés pour construire le modèle de QSAR.	8
Tableau 4 : Informations structurales de α -amylase pancréatique de porc.	9
Tableau 5 : Valeurs des IC_{50} mesurées par le test d'inhibition de l' α -amylase.	12
Tableau 6 : Matrice de corrélation des 5 descripteurs impliqués dans le modèle QSAR.	14
Tableau 7 : Les paramètres du modèle QSAR obtenu .	15
Tableau 8 : Valeurs expérimentales et prédites des IC_{50} (mM).	16
Tableau 9: Résultats du docking moléculaire des cinq colorants alimentaires et l'acarbose avec l'enzyme α -amylase (3L2L) .	20
Tableau 10 : Coefficient de corrélation (R^2) entre les descripteurs et leurs IC_{50}	24

Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Introduction générale	1
II. Matériels et méthodes	4
II.1. Produits chimiques	4
II.1.1. Colorants alimentaires utilisés	4
II.1.2. L'enzyme α -amylase pancréatique de porc	5
II.1.3. Réactifs chimiques	5
II. 2. Méthodes	6
II.2.1. Test d'inhibition de l' α -amylase	6
II.2.2. Etude de la Relation Quantitative Structure-Activité Inhibitrice de l' α -amylase	7
II.2.3. Docking moléculaire	8
III. Résultats et discussion	10
III.1. Evaluation de l'activité anti- α -amylasique	10
III.2. Etude QSAR de l'inhibition de l' α -amylase	13
III.3. Docking moléculaire	17
IV. Conclusion générale	26
V. Références Bibliographiques	27

I. Introduction générale

Au cours des dernières décennies, notre vie a très rapidement changé. En effet, la croissance de la population mondiale et l'augmentation du niveau de vie exigent un approvisionnement accru en denrées alimentaires. Celui-ci peut être obtenu non seulement par une augmentation de la production, mais également par une amélioration de la protection et de la conservation des aliments et par l'emploi de meilleures techniques de traitement, de pair avec les progrès de la technologie alimentaire. Ces méthodes impliquent une utilisation accrue des additifs alimentaires (**Liska D.J., 1998; Heymann E., 1982**).

Les additifs alimentaires sont les « substance non nutritives ajoutés intentionnellement aux aliments, le plus souvent en faible quantité pour en améliorer l'apparence, la saveur, la consistance ou la propriété de conservation », on y a injecté des arômes et des exhausteurs de goût. Pour allonger leur durée de vie, on y a ajouté des conservateurs. Puis, pour les rendre plus attrayants, on y a ajouté des colorants (**Gouget C., 2011**).

Les additifs alimentaires ont des origines variées (additifs alimentaires naturels, additifs alimentaires obtenus par modification de produits naturels et additifs alimentaires de synthèse). Les additifs alimentaires sont classés industriellement selon deux nomenclatures différentes : le **CEE** (Commission Economique Européenne) et le **Codex** (Comité de Développement Extérieur). La nomenclature **CEE** a été établie par la directive européenne 89/107/CEE avec 25 catégories et un code a été utilisé au niveau européen : Il se compose de la lettre "E" suivie d'un numéro permettant d'identifier facilement la catégorie « Exxx »... allant de E100 a E1520 (**directives du parlement européen, 1994**). Tandis que, la nomenclature Codex est un système international de numérotation (SIN ou INS ; *International Numbering System*) permettant l'identification des additifs alimentaires et, entre autres, les colorants alimentaires dans la liste d'ingrédients (**Codex Stan, 1995**). Par ailleurs, en Algérie la codification des additifs alimentaires est fixée par l'arrête interministérielle du 14 février 2002 paru au journal officiel algérien n°31, est plus restreinte par rapport à celle de la CEE ou du Codex (**Codex Stan, 1995**).

Ainsi, l'industrie alimentaire mondiale utilise une quantité de plus en plus importante de colorants naturels ou artificiels surtout dans les conserves, les confiseries, les boissons, mais aussi dans la charcuterie, les fruits et légumes, les matières grasses (huile, beurre, fromage) et le sucre. Les colorants alimentaires synthétiques ont pris une place de plus en plus importante et ont fini par

supplanter les colorants naturels. Ces derniers sont sensibles à la lumière, à l'oxygène ou à l'action des micro-organismes.

Ainsi, les colorants de synthèse, qui sont plus stables, ont une durée de vie plus longue et ont une coloration plus forte, ce qui permet de les utiliser à des quantités relativement faibles. Un autre avantage, c'est qu'ils sont moins coûteux et peuvent être fabriqués en grande quantité. Toutefois, le fait de trouver communément une substance dans un aliment ne constitue pas une garantie de son absence totale de toxicité (**Chloé B., 2011**). De ce fait, la loi impose que la présence de colorants soit mentionnée sur le conditionnement. Mais beaucoup de ces produits sont vendus en vrac ou sans emballage, ils sont le plus employés dans: les gâteaux de pâtisseries, les gommes colorées et autres sucreries dont les enfants raffolent (**Béatrice R. et Multon J.L., 2009**). Les colorants alimentaires sont testés par différents organismes à travers le monde qui donnent parfois des avis différents sur leur innocuité, menant à des réglementations différentes. La réglementation évolue aussi avec le temps : certains colorants autrefois autorisés ont été interdits lorsque leur nocivité a été avérée. Ils ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes, mais de nombreux constituants des aliments n'ont pas encore été testés (**N L 237, 1994**).

Le diabète sucré est la maladie non infectieuse la plus fréquente. Il a été estimé que 347 millions de personnes ont été touchées globalement en 2011 et il sera doublé jusqu'en 2030. C'est un trouble complexe causé par une augmentation de la production hépatique de glucose, une diminution de l'insuline et aucune production d'insuline, conduisant à augmenter le niveau de glucose dans le sang. Il est classé en deux types: le diabète de type 1 (IDDM) et le diabète sucré de type 2 et la forme la plus prévalent de cette maladie est le diabète sucré non insulino-dépendant (NIDDM 2), lié à une hyperglycémie postprandiale élevée (**Goldenberg R. et Punthakee Z., 2013**). Toutefois, les tentatives thérapeutiques sont très intenses dans ce domaine et diverses approches pharmacologiques sont utilisées pour améliorer le traitement du diabète par différents modes d'action. Parmi ces stratégies est de réduire ou ralentir la digestion et l'absorption des glucides alimentaires par l'intermédiaire de l'inhibition des principales enzymes hydrolysant les glucides ingérés l' α -amylase et l' α -glucosidase dans les organes digestifs (**Alice Y.Y. et Chengm D., 2013**). Cependant, il existe de nombreuses enzymes digestives chez l'homme dont la plus importante est l'alpha-amylase pancréatique (EC 3.2.1.1), qui hydrolyse les liaisons alpha-1,4 glycosidiques de l'amidon, l'amylopectine, l'amylose, le glycogène et de nombreuses maltodextrines (**Eichler G. et al, 1984**).

La quantification de la relation existante entre la structure moléculaire et l'activité biologique (QSAR : *Quantitative Structure Activity Relationship*) est devenue, actuellement, un outil

indispensable et performant pour combler les lacunes des études *in vivo* et *in vitro* et limiter le recours aux tests biologiques.

C'est une méthode qui tente à identifier une relation quantitative entre l'activité mesurée expérimentalement et des descripteurs théoriques ou empiriques liés à la structure moléculaire (Pericet B. et al., 2015 ; Liet F. et al., 2012). Techniquement, cette approche se base principalement sur quatre piliers : le choix de la structure de base ; le choix des paramètres physico-chimiques (descripteurs moléculaires) ; la méthode de sélection des descripteurs et l'algorithme d'apprentissage. La découverte d'une telle relation permet de prédire les propriétés physiques et chimiques ainsi que l'activité biologique des composés, de développer de nouvelles théories ou de comprendre les phénomènes observés (Liet F. et al., 2012). Cependant, dans la plupart des modèles de QSAR construits, la régression linéaire multiple est très utilisée comme algorithme d'apprentissage. Néanmoins, plusieurs travaux de recherche, traitant de la modélisation de l'inhibition de l' α -amylase par la méthode QSAR, ont été rapportés récemment dans la littérature (Saihi Y., 2015; Nocairi H. et al., 2005). D'autre part, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire (assemblage ou arrimage moléculaire) a rapidement investi le domaine de la recherche en biologie. Le docking moléculaire a pour objectif essentiel de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable du ligand au sein de son récepteur comme il peut servir à l'optimisation de molécules et au criblage de bases de données. Il concerne l'étude des interactions entre l'enzyme et divers ligands, pour but de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette enzyme afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs (Chaquin P., 2000).

C'est dans ce contexte que se situe notre travail de mémoire qui s'attèle à l'étude de l'activité antidiabétique *in vitro* de cinq colorants alimentaires commercialisés à savoir ; la tartrazine (SIN102), le jaune de quinoléine (SIN104), le Ponceau 4R (SIN124), l'érythrosine (SIN 127) et le colorant Bleu patenté V (SIN 131). En revanche, aucune étude de l'inhibition de l' α -amylase de cette famille de substances chimiques n'a été réalisée à ce jour. Le travail s'articule autour de trois parties. La première partie porte sur l'examen de l'activité antidiabétique des colorants alimentaires par la mesure *in vitro* de leur pouvoir inhibiteur de l' α -amylase pancréatique de porc. La seconde partie porte sur l'élaboration des modèles QSAR pour expliquer et prédire l'activité anti-amylasique en utilisant des descripteurs ciblés et pertinents. Tandis que, la troisième partie, "docking moléculaire" a été utilisée pour déterminer la configuration structurale de ces colorants dans le vide afin de connaître les relations structure-activité enzymatique.

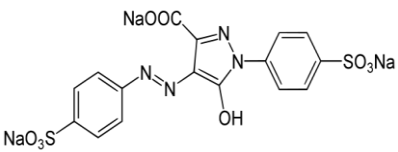

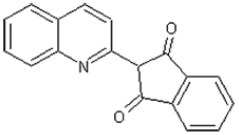

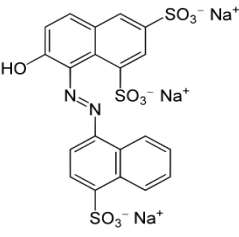

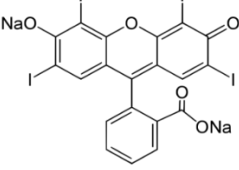

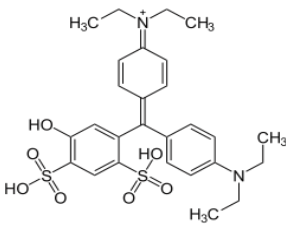

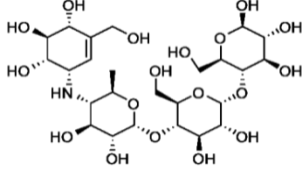
II. Matériel et méthodes

1. Produits chimiques

1.1. Colorants alimentaires utilisés

Les colorants utilisés dans ce travail sont achetées d'après un magasin de fournitures de gâteaux qui se trouve dans le quartier Maamoura à Laghouat (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Colorants alimentaires et l'acarbose utilisés dans cette étude.

Code	Nom	Structure chimique	Photo	Masse molaire (g/mol)
SIN 102	Tartrazine			534,30
SIN 104	Jaune quinoléine de			477,38
SIN 124	Rouge ponceau			604,47
SIN 127	Erythrosine			879,80
SIN 131	Bleu patenté V			560,70
	Acarbose			645,60

1.2. L'enzyme α -amylase pancréatique de porc

L'amylase est formée de deux domaines principaux : un domaine catalytique et un domaine dit de liaison aux glucides (CBM pour "*Carbohydrates Binding Module*") dont le rôle est encore discuté. L' α -amylase pancréatique de porc (Sigma-Aldrich) utilisée dans notre travail est caractérisée par un poids moléculaire de 51–54 kDa et une activité enzymatique spécifique de 10 units/mg solid (Figure 1).

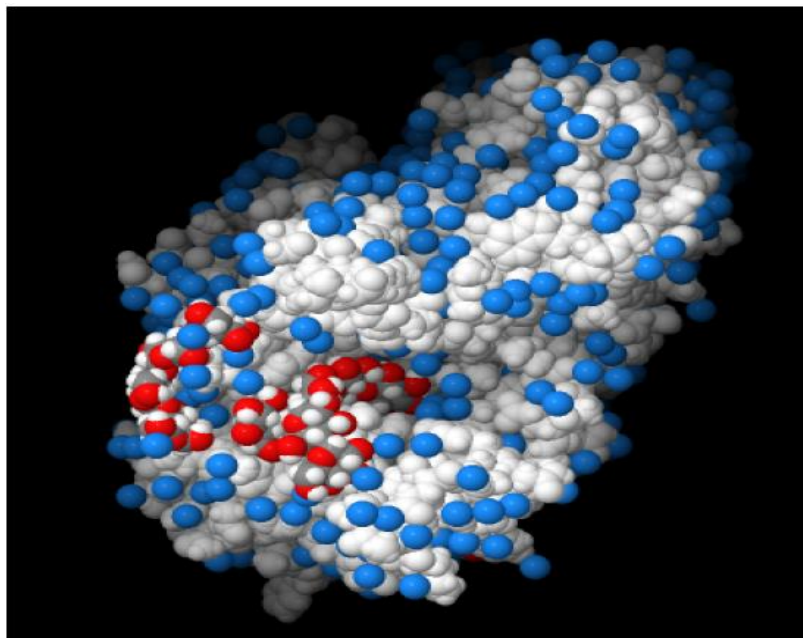


Figure 1: Complexe entre amylase pancréatique porcine (en blanc), molécules d'eau (en bleu; seul l'atome d'oxygène est repéré) et trois fragments d'amidon (coloration par type d'atome). (Larson S.B. et al., 2010).

1.3. Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail sont d'un grade analytique élevé (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Réactifs utilisés dans ce travail.

Produit	Firme
Amidon soluble, Carbonate de sodium (Na_2CO_3), Glycine ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Riedel-de Haën (Allemagne)
Néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline), acarbose ($\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_{18}$), méthanol, sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), dihydrogénophosphate de sodium dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hydrogénophosphate de sodium dihydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),	Sigma-Aldrich (Allemagne)
Chlorure de sodium (NaCl)	VWR-PROLABO (France)

2. Méthodes

2.1. Test d'inhibition de l' α -amylase

Dans la présente étude on s'intéresse à l'évaluation des capacités de cinq colorants alimentaire pour l'inhibition d'activité de l' α -amylase de pancréas de porc (EC 3.2.1.1) en adoptant la méthode de **Dygart J. et al. (1965)**. L'activité enzymatique de cette enzyme est dosée sur l'amidon comme substrat. Elle catalyse l'hydrolyse de ce substrat qui libère le maltose et d'autres produits. Le maltose libéré est dosé spectrophotométriquement grâce à son pouvoir réducteur. Il réagit avec une solution basique de la glycine-cuivrique, en développant une coloration jaune-orangé en présence de la néocuproïne. Cette coloration est mesurable à 456 nm et son intensité est proportionnelle à la quantité du produit libéré.

Dans des tubes à essai, on a introduit 100 μ l d'amidon, 100 μ l de chaque colorant alimentaire à différentes concentrations et 200 μ l du tampon phosphate salé. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, 100 μ l de la solution enzymatique (10 UI/ml) est ajoutée. La réaction est stoppée après 2 minutes en ajoutant 1ml de la solution cuivrique A [(la glycine (0,21 M), Na₂CO₃ (0,38 M) et le CuSO₄ (1,8 mM)] et 1ml de la solution B [(Néocuproïne (4.9 mM)]. Ensuite, le mélange est porté à l'ébullition à 100°C pendant 10 min. Après l'ajout de 3 ml d'eau distillée, la lecture de la densité optique à 456nm a été effectuée immédiatement sur un spectrophotomètre UV/Visible (Shimadzu 1800). Le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé selon la relation suivante :

$$PI = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Avec ;

A₀ : Absorbance en absence du colorant (control négatif),

A₁ : Absorbance en présence du colorant (control positif).

Cependant, l'activité anti- α -amylasique a été exprimé par le paramètre IC₅₀ qui représente la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse enzymatique jusqu'à 50 % de sa valeur maximale non-inhibée. Les valeurs des IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des colorants. Nous avons également, testé l'acarbose comme inhibiteur de référence de cette enzyme. Les essais ont été réalisés en triplicatas au minimum pour chaque concentration du colorant testé.

2.2. Etude de la Relation Quantitative Structure-Activité Inhibitrice de l' α -amylase

Le principe des méthodes QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) consiste comme leurs noms l'indiquent à mettre en place une relation mathématique à l'aide de méthodes d'analyse de données, reliant des propriétés moléculaires microscopiques appelées descripteurs, à un effet expérimental (activité biologique, toxicité, affinité pour un récepteur), pour une série de composés chimiques similaires. Le point de départ de telles méthodes se construit sur la définition des descripteurs moléculaires empiriques ou théoriques. Ces dernières prennent en compte des informations sur la structure et les caractéristiques physico-chimiques des molécules, comme dans ce cas présent, les perturbateurs endocriniens (Devillers J., et al., 2006). Par ces relations nous pouvons développer des modèles prédictifs de la forme générale suivante :

$$\text{Activité} = f(\text{descripteurs moléculaires})$$

Il existe différentes classes de descripteurs moléculaires théoriques qui peuvent être structuraux, énergétiques, électroniques, stériques et hydrophobiques. Les descripteurs moléculaires les plus étudiés, qui peuvent être corrélés aux propriétés des colorants alimentaires et qui sont calculés par le logiciel XLSTAT 2018 sont les suivants :

- ϵ_{LUMO} : énergie de l'orbitale moléculaire la plus basse vacante, mesurée en eV, est le niveau d'énergie le plus bas dans la molécule qui ne contient pas d'électrons, il est directement lié à l'affinité d'électron ;
- AlogP : Lipophilie atomique calculée selon Ghose et Crippen ;
- APol: Somme des polarisabilités atomiques ;
- nHeavyAtom : Nombre d'Atome lourds ;
- ω : Electrophilicité globale, utilisée pour caractériser la capacité d'une molécule à engendrer un transfert d'électron.

Dans cette étude, nous faisons intervenir les résultats expérimentaux obtenus dans l'évaluation des propriétés inhibitrice des colorants alimentaires. Dans ce modèle, nous avons incorporé dans un premier temps l'ensemble des composés pour lesquels nous avons déterminé une IC_{50} .

Afin de déterminer la qualité d'un modèle, différents indicateurs statistiques sont employés. Le plus répandu d'entre eux est le coefficient de corrélation R^2 qui évalue la part de la

variance expliquée par le modèle. Plus la valeur de R^2 sera proche de 1 (cas idéal) et plus les valeurs prédites et observées sont corrélées.

L'application 'QSAR-Contingency' du programme PaDEL-descriptor est mis en œuvre pour déterminer à partir des 63 descripteurs de départ, un nombre de descripteurs moindre mais bien corrélés avec l'activité biologique. A partir de l'ensemble des matrices de corrélation obtenues, seuls les descripteurs qui possèdent une valeur $R^2 > 0,95$ entre eux, sont considérés comme trop inter corrélés et devront donc être éliminés.

Le tableau 3 montre les 5 descripteurs retenus pour construire le modèle de QSAR. Les descripteurs moléculaires ont été ensuite utilisés dans des analyses statistiques par régressions multilinéaires à l'aide du logiciel XLSTAT 2018.

$$IC_{50} = pr_1 - pr_2 * ALogP + pr_3 * apol - pr_4 * nHeavyAtom + pr_5 * \epsilon_{lumo} + pr_6 * \omega$$

Tableau 3 : Descripteurs moléculaires 2D utilisés pour construire le modèle de QSAR.

Colorants	ALogP	Apol	nHeavyAtom	ϵ_{lumo} (eV)	ω
SIN102 (Tartrazine)	-4,254	51,579	31	0,225	3,356
SIN104 (Jaune de quinoléine)	-0,672	41,718	21	-2,192	2,192
SIN124 (Ponceau 4R)	-4,086	61,454	35	1,333	0,337
SIN127(Érythrosine)	3,562	64,610	29	-3,282	3,447
SIN131 (Bleu patenté V)	-2,809	81,804	38	-2,718	2,723
Acarbose	-7,226	88,208	44	0,154	1,087

2.3. Docking moléculaire

La modélisation moléculaire implique l'utilisation des méthodes de calcul théoriques (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, mécanique quantique *ab initio* ou semi-empirique,...) permettant de déterminer la représentation graphique de la géométrie ou de la configuration des atomes d'une molécule et d'évaluer les propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée (Mahfoudhi R., 2018; Kristiansen K., 2004).

Parallèlement, la modélisation moléculaire permet de prédire les conformations, d'anticiper les interactions ligand/récepteur, d'étudier les chemins conformationnels liés à l'activité de

macromolécules complexes et de mener des études structure/activité des complexes ligands-récepteurs (Mahfoudhi R., 2018; Kristiansen K., 2004).

Le fichier du récepteur utilisé, l'enzyme α -amylase pancréatique porcine, est téléchargé sous forme PDB via la banque de la protéine (<http://www.pdb.org>). *Protein Data Bank* où PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

Par ailleurs, il existe environ 364 de structures cristallographiques d' α -amylase dans la " Protein Data Bank " (PDB). Ces derniers se différencient par (i) La source de l' α -amylase : humaine, *Sus scrofa*, *Homo sapiens*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Hordeum vulgare*, (ii) Le métal présent au niveau du site actif : Na^+ , Cl^- , ... et (iii) La nature du ligand intervenant dans le complexe : Acétate, Ca, Cl, GLC, GOL, PCA, NPO....

Parmi plusieurs structures tridimensionnelles proposées de l' α -amylase, nous avons choisi la structure de l' α -amylase avec l'entrée PDB 3L2L pour l'amarrage moléculaire, car il s'agit des structures correctement définies avec une bonne résolution (2,11Å). Ainsi, toutes les informations disponibles de l'enzyme (code : 3L2L) à partir de la PDB sont illustrées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Informations structurales de α -amylase pancréatique de porc (Larson S.B. *et al.*, 2010)

Code	Triade catalytique	Les acides aminés de l'interaction avec les ligands	Résolution (Å)	Cofacteurs
3L2L	Asp197, Glu233, Asp300.	Thr52, Asn53, Asp197, Gln63, Gly106, Asp206, Lys140	2,11	Ca, Cl

Pour identifier les déterminants moléculaires responsables du mode de liaison des composés étudiés avec l' α -Amylase, tous les colorants étudiés ont été soumis à des études de modélisation moléculaire. Nous avons choisi les cinq colorants et l'acarbose comme des ligands.

Au préalable, les structures 3D des colorants étudiés et l'acarbose ont été obtenues à partir de la base de données ZINC (<http://zinc.docking.org/>). Ensuite, toutes les structures ont été assemblées avec le logiciel *Discovery Studio visualizer* v 4.5. Dans notre étude, les calculs de docking moléculaire ont été effectués avec la version 2.2 du logiciel *Molegro Virtual Docker*.

Ce logiciel utilise différentes méthodes de recherche : *MolDock Optimizer* et MolDock SE (Simplex Evolution). Nous avons utilisé *MolDock Optimizer* qui est un algorithme évolutionnaire inspiré de la théorie darwinienne de l'évolution. A partir d'un site de liaison théorique, défini de différentes manières (volume sphérique, détection de cavités, sélection de résidus ...), cet outil explore un nombre important de positions et de conformations pour conduire aux résultats énergétiquement les plus favorables (Thomson R. et Christensen M.H., 2006; Gehlhaar D.K. et al., 1998).

Pour initialisé les études du docking, la protéine a été préparée en enlevant les ligands (GLC-GLC-GLC-GLC, GLC-GLC-GLC-GLC-GLC-GLC et GLC). Le docking était fait avec une sphère de 10Å de rayon centré sur le centre de masse du ligand dans la structure cristalline de la protéine avec des coordonnées de $x = 33,96$; $y = 41,30$; $z = 53,49$. Le ligand a été toujours utilisé en tant que molécule flexible. Lors de notre étude, seules les 10 poses les plus favorables ont été conservées et analysées. La méthode de score utilisée pour classifier l'ensemble des poses est MolDock Score qui fait des calculs par une interpolation des paramètres d'énergie sur chaque point d'une grille cubique englobant le site de liaison théorique et des calculs de liaisons hydrogènes sans directionnalité.

Les résultats du docking produits ont été directement chargés et traités avec le logiciel *Molegro Virtual Docker*. Les interactions hydrogène avec leurs distances interatomiques exactes ont été déterminées avec le logiciel LigPlot+.

III. Résultats et discussion

1. Evaluation de l'activité anti- α -amylasique

L'alpha-amylase pancréatique (E.C. 3.2.1.1) est une enzyme clé dans le système digestif et catalyse l'étape initiale d'hydrolyse de l'amidon en maltose et finalement en glucose. La dégradation de cet amidon alimentaire se fait rapidement et conduit à une hyperglycémie postprandiale élevée. Il a été démontré que l'activité de l' α -amylase pancréatique humaine dans l'intestin grêle est corrélée à une augmentation des taux de glucose postprandial, dont le contrôle est donc un aspect important dans le traitement du diabète (Bennacer H., 2017 ; Eichler G. et al., 1984).

L' α -amylase est largement distribuée dans les plantes, les tissus de mammifères et les microorganismes. Cependant, chez les mammifères, l' α -amylase est présente dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Il catalyse l'hydrolyse des liaisons α -D-(1,4)

glucosidiques des composants de l'amidon (amylose et amylopectine), le glycogène et divers oligosaccharides pour donner du glucose et du maltose. Pour la grande majorité des α -amylases, l'ion calcium Ca^{2+} a un effet positif sur leur activité enzymatique en contrôlant la géométrie du site actif de ces enzymes. Le rôle de l' α -amylase dans le clivage des glucides est complété par l'action de l' α -glucosidase, présente dans la bordure de la brosse de l'intestin grêle et responsable de l'hydrolyse des liaisons α -(1 \rightarrow 4), libérant du glucose pour l'absorption des entérocytes (**Buisson G. et al., 1987**).

Par ailleurs, l'inhibition des deux enzymes peut retarder la digestion des oligosaccharides et des disaccharides, et retarder l'absorption du glucose ainsi que réduire les taux de glucose dans le plasma, aboutissant finalement à la suppression de l'hyperglycémie postprandiale. Les inhibiteurs de l' α -amylase sont diversifiés et généralement synthétiques utilisés comme médicaments contre le diabète comme l'acarbose, mais toujours on s'intéresse à la recherche d'autres inhibiteurs de cette enzyme (**Bennacer H., 2017**).

D'autre part, si l'effet d'un grand nombre de molécules naturelles ou synthétiques sur l'activité de l' α -amylase a fait l'objet d'un nombre important de travaux (**Mahsa R. et al., 2014; Tsujita T. et al., 2008 ; Komaki E. et al., 2003**), aucune étude n'a été consacrée sur l'effet des colorants alimentaires vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique de porc.

Ceci nous a incité à étudier les propriétés anti- α -amylasique de cinq colorants alimentaires utilisés dans la préparation pâtissière afin de proposer un mécanisme d'inhibition et de comprendre les modes d'interaction entre ces colorant vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique de porc.

De ce fait, les activités inhibitrices de l' α -amylase pancréatique de porc par les colorants choisis, ont été déterminées par une méthode spectrophotométrique en utilisant l'amidon comme substrat de l'enzyme. Ainsi, l'activité de l' α -amylase pancréatique de porc a été dosée spectrophotométriquement à 456 nm en suivant l'apparition du maltose. Le temps de la réaction (2 minutes) et le domaine de dépendance de l'enzyme avec la concentration de substrat a été déterminé par l'étude d'apparition de produit en fonction du temps pour une concentration fixe de substrat (1,2 g/l).

Les valeurs des IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des colorants testées (**Figure 2**).

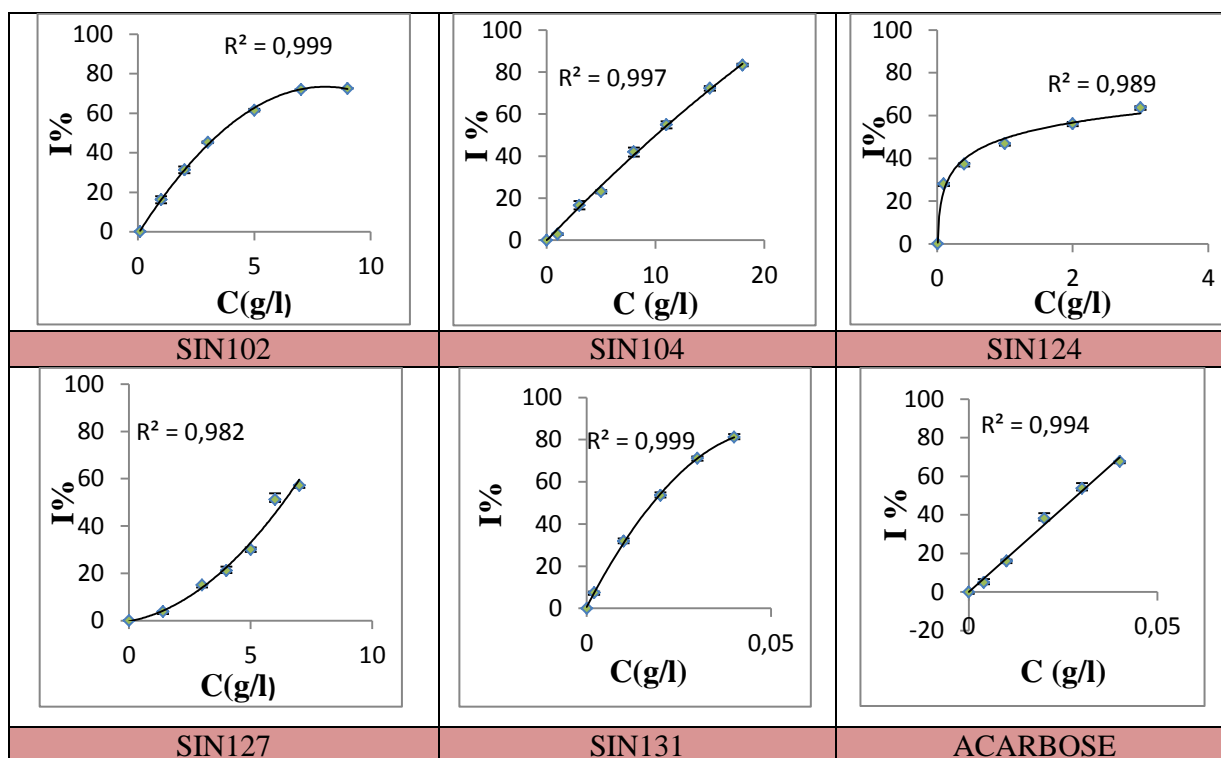


Figure 2 : Pouvoir d'inhibition de l' α -amylase des colorants et de l'acarbose.

Les résultats obtenus sont enregistrés dans le **Tableau 5**. Ils représentent la moyenne de trois essais réalisés en parallèle \pm l'écart-type.

Tableau 5 : Valeurs des IC_{50} mesurées par le test d'inhibition de l' α -amylase.

Colorant et Standard	IC_{50} (mM)
SIN 102 (Tartrazine)	4,491 \pm 0,304
SIN104 (Jaune de quinoléine)	19,471 \pm 1,385
SIN124 (Rouge ponceau 4R)	1,758 \pm 0,025
SIN 127(Erythrosine)	7,319 \pm 0,394
SIN131 (Bleu patenté V)	0,032 \pm 0,001
Acarbose	0,043 \pm 0,000

L'ensemble des résultats obtenus de ce test montre que tous les colorants testés présentent des propriétés inhibitrices de l' α -amylase pancréatique avec des valeurs d' IC_{50} inférieures à 20mM (**Tableau 5**). Ainsi, les valeurs calculées sont comprises entre 0,032 \pm 0,001et

19,471±1,385mM. En revanche, le colorant Bleu Patenté (SIN131) a montré une meilleure activité anti-amylasique par rapport à tous les autres colorants. Mais comparativement à l'inhibiteur de référence (acarbose), on remarque que seul le colorant Bleu Patenté (SIN131) a donné un pouvoir anti-amylasique supérieur à l'acarbose.

D'autre part, on remarque que l'activité inhibitrice de colorant SIN127 (Erythrosine) (7,319±0,394mM) est moins efficace que celle de colorant SIN102 (Tartrazine) (4,491±0,304mM). Aussi le colorant SIN124 (Rouge ponceau 4R ; IC₅₀ = 1,758 ± 0,025mM) est plus efficace que le colorant SIN 102 (Tartrazine ; IC₅₀ = 4,491±0,304mM).

D'autre part, il est possible de distinguer trois catégories de colorants étudiés selon leur pouvoir anti-amylasique. Le premier groupe renferme le colorant le plus actif avec une valeur d'IC₅₀ inférieur à 0,05mM. Le deuxième groupe a regroupé les colorants qui ont exprimé une activité intermédiaire (1 ≤ IC₅₀ ≤ 10 mM). Le plus actif était SIN124 (Rouge ponceau 4R). L'érythrosine et la tartrazine ont également montré des inhibitions comparables.

Dans le dernier groupe (IC₅₀ > 10), seul le colorant SIN104 (jaune de quinoléine) a exposé l'effet inhibiteur le plus faible vis-à-vis de l'α-amylase pancréatique par rapport aux autres colorants sélectionnés.

En conclusion, il ressort du présent travail que le colorant Bleu Patenté (SIN131) est un produit fort intéressant et riche en possibilités thérapeutiques. Nos résultats sont pour nous remarquables car ils ouvrent dans le futur des perspectives expérimentales qui devraient nous permettre d'étudier clairement l'effet hypoglycémique de ce colorant et d'avancer vers une meilleure connaissance du (des) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans l'effet pharmacologique observé.

2. Etude QSAR de l'inhibition de l'α-amylase

Bien que l'étude des relations structure-activité ait commencé à la fin du 19^{ème} siècle, ce n'est qu'au début des années 60 que les travaux de Corwin Hansch ont proposé un modèle mathématique pour corréler l'activité biologique et la structure chimique. Pendant ces quarante dernières années, ce domaine a largement été étudié et les données bibliographiques disponibles sur cette approche sont maintenant importantes (**Debnath K., 2001**).

La méthode QSAR inclut toutes les méthodes statistiques par lesquelles des activités biologiques sont reliées avec les éléments structuraux, les propriétés physico-chimiques ou

différents paramètres liés à la notion de champ. Les informations extraites à partir des résultats d'étude de QSAR peuvent être utilisées pour obtenir une meilleure connaissance des structures moléculaires et probablement le mode d'action au niveau moléculaire. Ces informations peuvent alors être utilisées pour prévoir les propriétés physicochimiques et les activités biologiques de nouveaux composés ainsi que pour concevoir de nouvelles structures (Grover B. et al., 2000).

La réalisation d'une matrice des corrélations permet une analyse deux à deux des corrélations entre variables explicatives. Il est d'usage de considérer que l'obtention de coefficients de corrélations supérieurs à 0,5 est révélatrice d'un problème de multi colinéarité entre les variables concernées. Dans notre étude, la matrice de corrélation est présentée dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Matrice de corrélation des 5 descripteurs impliqués dans le modèle QSAR

Variable	ALogP	Apol	nHeavyAtom	ϵ_{lumo}	ω	IC ₅₀
ALogP	1					
Apol	-0,402	1				
nHeavyAtom	-0,680	0,916	1			
ϵ_{lumo} (eV)	-0,770	0,011	0,398	1		
ω	0,586	-0,237	-0,413	-0,672	1	
IC ₅₀	0,527	-0,791	-0,913	-0,399	0,241	1

L'étude de corrélation entre les descripteurs deux à deux ont conduit à classer les descripteurs entre deux extrêmes. Les descripteurs moins corrélés $R^2 < 0,50$, et cela signifie qu'ils ne donnent pas la même information sur la propriété à estimer. Ainsi, ces descripteurs peuvent être importants pour le modèle. Les descripteurs possédants une grande corrélation entre eux $R^2 > 0,50$, et cela signifie qu'ils vont donner des informations plus proches sur la propriété à estimer.

Les corrélations respectives des valeurs d'IC₅₀ et les cinq descripteurs sélectionnés de ce modèle sont en générale inférieures à 0,5. Ce qui est acceptable, et le modèle est suffisamment stable pour supposer que les descripteurs sont indépendants dans le modèle QSAR élaboré.

Lors notre étude, cinq descripteurs ont été sélectionnés en tant que facteurs ayant une influence significative sur l'inhibition de l' α -amylase. Les résultats des paramètres statistiques obtenus, à l'aide du logiciel XLSTAT 2018, sont rassemblés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Les paramètres du modèle QSAR obtenu.

Paramètre	Désignation	Valeur	Ecart-type
pr₁	Constante	58,069	9,822
pr₂	ALogP	-1,201	0,497
pr₃	Apol	1,114	0,445
pr₄	nHeavyAtom	-3,851	1,105
pr₅	ϵ_{lumo} (eV)	2,946	1,804
pr₆	ω	0,000	0,000

L'équation décrivant le modèle QSAR par rapport à ces descripteurs, en utilisant la régression linéaire multiple (RLM), est représentée avec ses paramètres statistiques comme suit :

$$IC_{50} = 58,069 - 1,201A\text{LogP} + 1,114A\text{pol} - 3,851n\text{HeavyAtom} + 2,946\epsilon_{\text{lumo}}$$

Dans un modèle QSAR basé sur une régression, la ou les variables à expliquer sont quantitatives. En se basant sur les entrées du jeu d'apprentissage, le modèle va prédire cette variable pour celles du jeu de test. Il est alors possible d'estimer sa performance en comparant les valeurs prédites et les valeurs expérimentales. Deux paramètres sont alors couramment calculés. Il s'agit du coefficient de détermination (R^2) et de l'erreur quadratique moyenne (RMSE). La valeur de R^2 ne peut excéder 1 qui est sa valeur optimale, tandis que plus le RMSE sera faible et plus le modèle sera performant. Ainsi, nous notons que le modèle à 4 paramètres présente des données statistiques satisfaisantes, coefficient de corrélation $R^2 = 0,986$, coefficient de corrélation ajusté $R^2_{\text{adj}} = 0,928$; test de Fisher $F = 17,16$; $RMSE = 1,97$.

L'absence d'énergie d'HOMO dans la corrélation du QSAR obtenu suggère que l'activité anti-amylasique des colorants ne dépend pas de leur caractère électrodonneur. Par contre, il est évident que l'activité inhibitrice soit associée à une grande contribution du paramètre LUMO (affinité électronique), ainsi les contributions relatives dans cette équation est (2,946eV) par rapport aux autres paramètres.

Pour le coefficient de partage eau/n-octanol est très largement utilisé dans des études de QSAR dans les sciences pharmaceutiques, biochimiques, toxicologiques et dans les sciences de l'environnement. La lipophilie s'intéresse donc tout autant la communauté qui étudie les

problèmes de santé humaine que celle qui est impliquée dans les problèmes de l'environnement (Rouahna Y., 2016). Ainsi, le coefficient négatif d'ALogP indique qu'il y a une corrélation négative entre IC₅₀ des colorants et la lipophilie (-1,201). Par contre, on constate un effet positif du paramètre Apol des colorants et leur pouvoir inhibiteur de l' α -amylase (+1,114). Cela suggère que l'importance des polarisabilités atomiques de ces colorants peut être due à l'abondance de groupes chromophores et auxochromes (C=C et N=N) où la polarisation permanente est due vu à la différence d'électronégativité entre les atomes. L'azote des colorants peut impliquer des interactions avec les acides aminés de l'enzyme par la donation d'un électron ou deux. D'autre part, le nombre des atomes lourds à un effet négatif sur l'inhibition de l' α -amylase pancréatique de porc (-3,851).

Les valeurs des IC₅₀ expérimentales et prédites sont présentées dans le **Tableau 8** obtenues avec l'équation de model trouvé.

Tableau 8 : Valeurs expérimentales et prédites des IC₅₀ (mM).

Observation	IC ₅₀	Préd(IC ₅₀)	Résidu
SIN102 (Tartrazine)	4,400	3,733	0,667
SIN104 (Jaune de quinoléine)	19,400	19,489	-0,089
SIN124 (Ponceau 4R)	1,700	2,741	-1,041
SIN127 (Érythrosine)	7,300	6,689	0,611
SIN131 (Bleu patenté V)	0,032	1,101	-1,069
Acarbose	0,043	3,733	0,667

La **Figure 3** confirme l'accord entre les valeurs calculées et expérimentales pour chaque molécule. Ainsi, le coefficient de corrélation trouvé ($R^2= 0,986$), indique que 98,6 % des paramètres obtenus sont expliqués par le modèle.

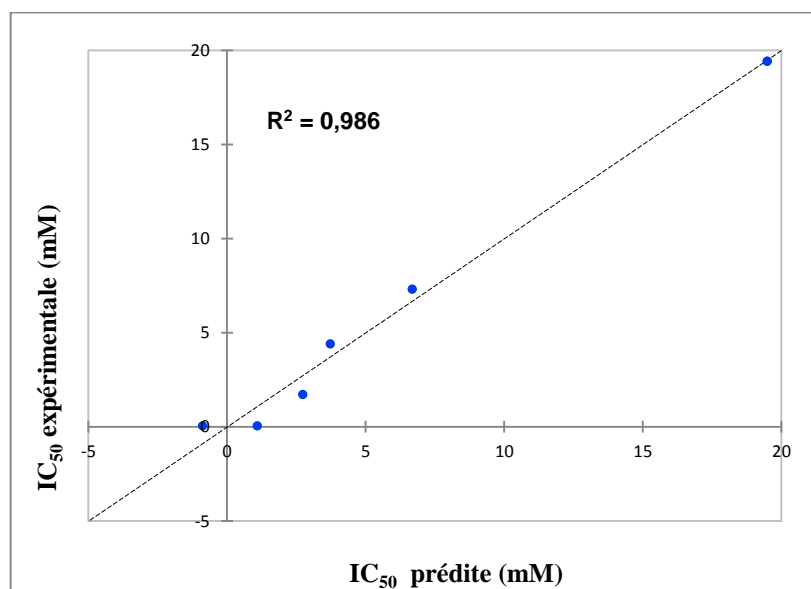


Figure 3 : Corrélation entre les valeurs des IC₅₀ expérimentales et prédites

En conclusion, la présente étude montre que le modèle QSAR élaboré est défini avec quatre descripteurs moléculaires et qui sont essentiellement de types électrostatiques et topologiques. Par conséquent, le modèle pourrait être utilisé pour prédire l'IC₅₀ des autres colorants ou inhibiteur de l' α -amylase pancréatique de porc.

Les résultats de cette application montrent que les modèles proposés peuvent prédire l'activité anti-amylasique avec une bonne précision et que les paramètres sélectionnés (**Apol** et ϵ_{lumo}) sont pertinents.

3. Docking moléculaire

Les méthodes *in silico* sont complémentaires des études *in vivo* et *in vitro* et ne peuvent remplacer l'expérience. Elles apportent des informations sur la nature des interactions chimiques entre les ligands et les récepteurs et sont nécessaires à la bonne compréhension de ces mêmes mécanismes. De ce fait, l'un des enjeux du travail effectué au cours de ce mémoire est d'apporter une meilleure compréhension du système de fixation des ligands (colorants) au récepteur (α -amylase). Cependant, les techniques d'arrimage moléculaire permettent de prédire, par des méthodes de calcul, les structures de complexes ligand-protéine en partant d'un ensemble variable de conformations et d'orientations du ligand (flexible ou non flexible) et parfois du récepteur (chaînes latérales, des résidus et « *backbone* » flexible ou non).

Pour cela, le logiciel «*Molegro Virtual Docker*» (MVD) a été utilisé pour les calculs du docking scoring. Le choix de ce logiciel est basé non seulement sur sa disponibilité dans le laboratoire, mais aussi sur sa capacité à gérer les molécules d'eau présentes dans le site et les

cofacteurs qui coexistent avec le ligand dans quelques structures (**Yang J.M., et Chen, C.C., 2004**). En plus, nous avons utilisé le logiciel Ligplot⁺ pour repérer les liaisons et les distances des ponts hydrogènes entre l'inhibiteur et l'enzyme.

Tous les programmes de "docking" peuvent se décomposer en deux étapes, la partie de recherche des conformations possibles du ligand et la partie d'évaluation de ces conformations ou fonction de score. Celle-ci doit permettre d'attribuer le meilleur score au complexe le plus réaliste déterminé expérimentalement. Pour effectuer ce choix la fonction de score est basée classiquement sur la complémentarité stérique des fonctions et des groupements chimiques (**Chikhi A., 2007**). Ainsi, le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe (**Teniou S., 2012**).

Cependant, le nombre de fonctions de score existant est élevé (de l'ordre d'une centaine), ce qui veut dire qu'il y a toujours des arguments en faveur de l'une ou de l'autre.

D'autre part, la fonction de score doit être paramétrée de manière à ce que les calculs reproduisent au mieux les géométries (RMSD minimum entre la conformation cristallographie et la conformation calculée du ligand) et le «*ranking*» (ordonnancement) des ligands (corrélation entre score et une grandeur expérimentale rendant compte de l'affinité du ligand pour la protéine). Ceci signifie que les ligands avec le meilleur score (en général la valeur la plus négative possible) correspondent aux ligands ayant la meilleure affinité vis-à-vis de la protéine, et que cette corrélation prédiction-expérience sera la plus linéaire possible (**Arrault A., 2007**).

Compte tenu de ces incertitudes, il est nécessaire de disposer d'un outil d'arrimage qui accède à un paramétrage des différents composants (*docking, scoring, clustering*). Le logiciel *Molegro Virtual Docker* (MVD) utilisé correspond à cette définition, avec au moins une trentaine de paramètres ajustables, permettant ainsi d'élaborer des procédures d'arrimage très spécifiques en fonction de chaque système étudié (**Monge A. et al., 2006**).

Avant d'engager les colorants dans les expériences d'arrimage moléculaire, la première étape de l'étude consiste à optimiser les paramètres de calcul sous MVD, de manière à modéliser le mieux possible ce système. Tout d'abord, nous avons défini une zone bien précise englobant tous les sites de fixation des substrats possibles. Ainsi, l'espace de recherche est une sphère centrée sur le domaine de calcul englobant largement toutes les boucles hypervariables et

permettant la libre orientation de tous les ligands. Le choix de cette zone est lié au fait que les résidus impliqués se retrouvent dans l'ensemble des conformations de sites de liaison des conformations canoniques.

Le site de liaison des colorants étant constitué d'un grand nombre d'acides aminés. La sélection des acides aminés qui composent ce site est critique car ce choix orientera les calculs et les résultats d'arrimage moléculaire. Cependant, le domaine catalytique présente un sillon caractéristique au sein duquel se trouvent les acides aminés impliqués dans l'hydrolyse: Asp197, Asp300, Glu233. Ce sont tous trois des acides aminés à chaîne latérale acide.

Le substrat est maintenu dans le site actif par des liaisons hydrogènes (impliquant éventuellement des molécules d'eau) et par des liaisons hydrophobes (interactions avec les acides aminés aromatiques en particulier).

Différentes études, portant en particulier sur des inhibiteurs compétitifs de l'amylase, ont montré l'existence d'au moins 5 sites de liaison pour des unités glucose dans ce sillon du site actif, 3 précèdent les acides aminés catalytiques et deux leurs succèdent.

L'analyse des résultats a été réalisée suivant les valeurs des scores correspondent à des contributions énergétiques et la valeur du RMSD qui représente la valeur de l'écart moyen de la distance entre deux atomes du ligand contenu dans le cristal et ceux des molécules arrimées. Subséquemment, les meilleures poses sélectionnées correspondent aux meilleurs scores et à des bonnes valeurs du RMSD.

Or, les fonctions des scores utilisées dans notre travail sont le Mol Dock Score. La fonction d'amarrage "MolDock Score" employée par MVD est une dérivée de la fonction PLP (*Piecewise Linear Potential*). Cette fonction contient des termes additifs des énergies des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, et des interactions hydrophobiques. Alors que, le Rerank score fournit une estimation des forces d'interaction, il n'est pas exprimé en unités chimiques et ne prend pas en compte les contributions de complexation (telle que l'entropie) (Chikhi A., 2007). Les résultats obtenus du virtuel de cinq colorants et l'acarbose sont regroupés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Résultats du docking moléculaire des cinq colorants alimentaires et l'acarbose avec l'enzyme α -amylase (3L2L).

Ligand	Mol Dock Score ^a	Rerank Score ^b	RMSD	Interaction ^c	nHeavyAtoms ^d	Nombre de liaisons hydrogènes
SIN102	-105,34	-92,24	0	-111,53	31	1
SIN104	-67,96	-61,55	0	-81,52	21	0
SIN124	-125,72	-85,37	0	-104,69	35	2
SIN127	-94,23	-70,64	0	-92,69	29	0
SIN131	-109,49	-79,96	0	-102,13	38	1
Acarbose	-195,82	-31,40	0	-142,79	44	3

^aMolDock score calculée par la somme d'interaction externe et interne du ligand. ^bRerank Score donne une estimation des forces d'interaction. ^cEnergie d'interaction totale entre la pose et la molécule cible.

^dNombre des atomes lourds.

Tout d'abord, les résultats de la modélisation de l'interaction colorants- α -amylase simulé par le docking moléculaire nous ont permis d'obtenir des complexes stables avec des énergies d'interaction résultant de la mise en place de liaisons hydrogène et plusieurs interactions hydrophobiques. Toutefois, les résultats suggèrent que les colorants étudiés peuvent se lier à l' α -amylase d'une manière que leurs groupes sulfonâtes, spécifiques interagissent avec les acides aminés du site catalytique.

Par ailleurs, l'évaluation des performances du programme de docking MVD a été déterminée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (*root-mean-square deviation*) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal. Ce paramètre mesure l'aptitude d'un algorithme à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à son récepteur. Habituellement, la valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate (Vieth M., et al., 1998). Les valeurs du test RMSD obtenus avec (MVD) sont mentionnées dans le **Tableau 9**. La valeur de la déviation quadratique moyenne ou RMSD du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal est égale à zéro (0) pour tous les complexes de l' α -amylase étudiée. Par conséquent, nous pouvons conclure que le programme MVD est suffisamment performant puisqu'ils reproduisent assez bien les résultats expérimentaux. Il est généralement plus efficace en présence du ligand moins flexible.

D'autre part, la modélisation de l'énergie d'interaction entre tous les colorants étudiés et le site actif de l' α -amylase donne lieu à des MolDock Score qui varient entre -67,9633 et -125,346. Tandis que celle de l'acarbose est de -195.82, ce qui indique que ces composés pourraient être d'une affinité comparable à celle de la référence ce qui confère une stabilité meilleure dans le site actif. Ainsi, les complexes formés qui possèdent des énergies les plus basses par rapport aux autres complexes seront probablement les plus stables. Par ailleurs, l'interaction du meilleur inhibiteur (SIN124) avec les acides aminés du site actif a montré la plus forte affinité de liaison (-104,96).

D'autre coté, il est possible de distinguer deux groupes de colorants étudiés selon leur pouvoir inhibiteur de la 3L2L mesuré *in silico*. Le premier groupe renferme les colorants les plus actifs avec des MolDock scores supérieurs à -100,00.

Ces composés sont SIN124, SIN131 et SIN102. Ils possèdent également des énergies d'interaction totale avec leurs poses importantes (> -100). Le deuxième groupe rassemble les deux autres colorants qui ont un effet inhibiteur plus faible vis-à-vis de la 3L2L par rapport aux autres colorants sélectionnés (MolDock score et Interaction < -100).

Les résultats du docking entre Sin102 et le site actif de la 3L2L donnent lieu à MolDock Score -67.963. Comme le montre la **Figure 4**, Sin102 est bien placée dans le site actif où elle est entourée par les acides aminés : Trp58, Tyr62, Asp300, Tyr151, Leu237, Gly306, Gly308, Gly309, His305 et Ala307.

Ce composé forme une liaison hydrogène distante de 3,10 Å entre l'atome de l'oxygène de groupe SO_3 de l'inhibiteur et l'atome de l'azote de l'acide aminé Gly308

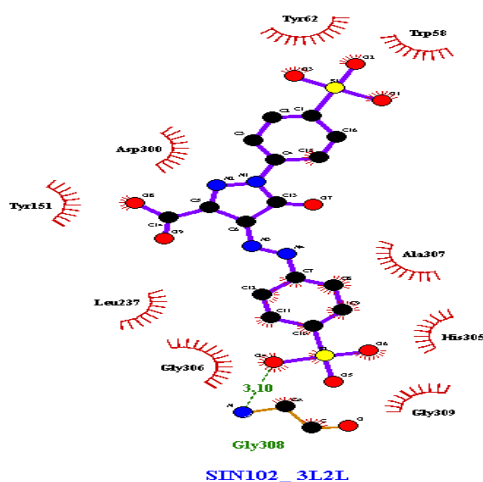


Figure 4 : Représentation des interactions SIN102-3L2L : les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+).

La visualisation des résultats du docking montre que SIN104 forme avec le site actif de la 3L2L est entourée par les acides aminés His305, Asp300, Asp197, Leu162, Glu233 et Ala198. Comme le montre la **Figure 5**, ce composé ne forme pas de liaisons hydrogènes.

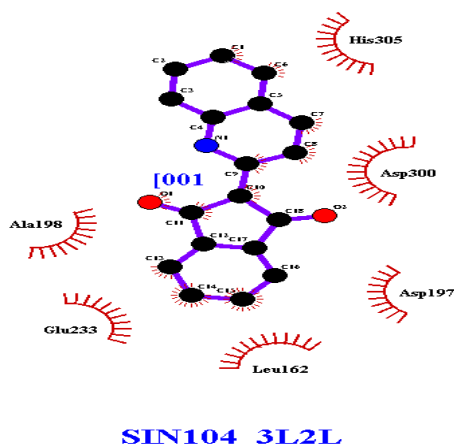


Figure 5 : Représentation des interactions SIN104-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+).

La présentation des résultats du docking montre que SIN124 forme avec le site actif de 3L2L est entourée par les acides aminés His101, Tyr62, Leu165, Leu162, Tyr151, Val163, His305, Asp356, Asp300 et Trp58 (Figure III.30). Deux ponts hydrogène se forment, le premier est d'une distance -2.46 Å se trouve entre l'atome d'azote de groupe N₂ et l'atome d'oxygène de l'acide aminé Asp300. la deuxième forme entre l'atome d'oxygène de groupe SO₃ et l'atome de l'acide aminé His305 avec une distance de 3.10 Å.

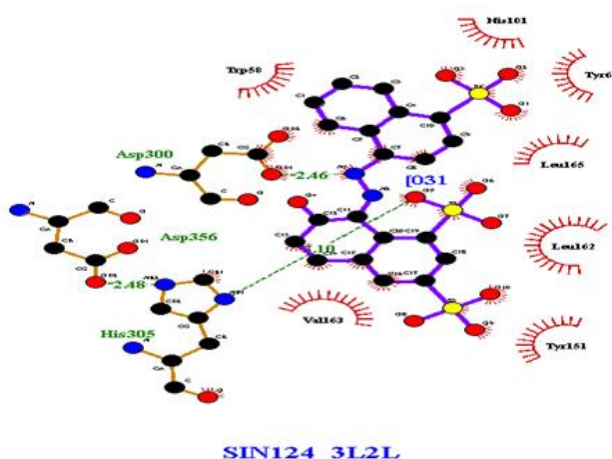


Figure 6 : Représentation des interactions SIN124-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+).

Comme le montre la **Figure 7**, SIN127 forme avec le site actif de la 3L2L est entourée par les acides aminés His305, Val163, Leu162, et Tyr151. Ce composé ne forme pas de liaisons hydrogènes.

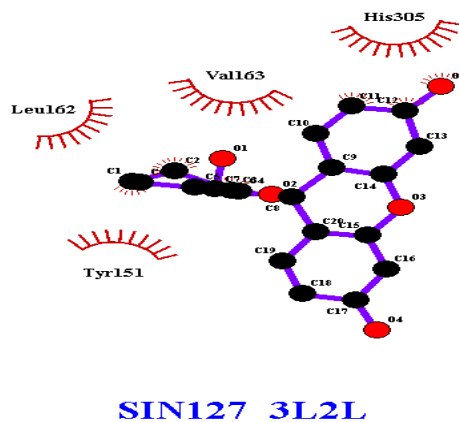


Figure 7 : Représentation des interactions SIN127-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+).

Les résultats du docking entre Sin131 et le site actif de la 3L2L donnent lieu à MolDock Score -157,346. Comme la montre la **Figure 8**, Sin131 est bien placée dans le site actif où elle est entourée par les acides aminés : Gly306, Glu233, Ala198, Leu162, Asp300, Trp58, Trp59, Asp356 et His305. Ce composé forme une liaison hydrogène distante de 3,17 Å entre l'atome de l'oxygène de groupe SO₃ de l'inhibiteur et l'atome de l'azote de l'acide aminé His305.

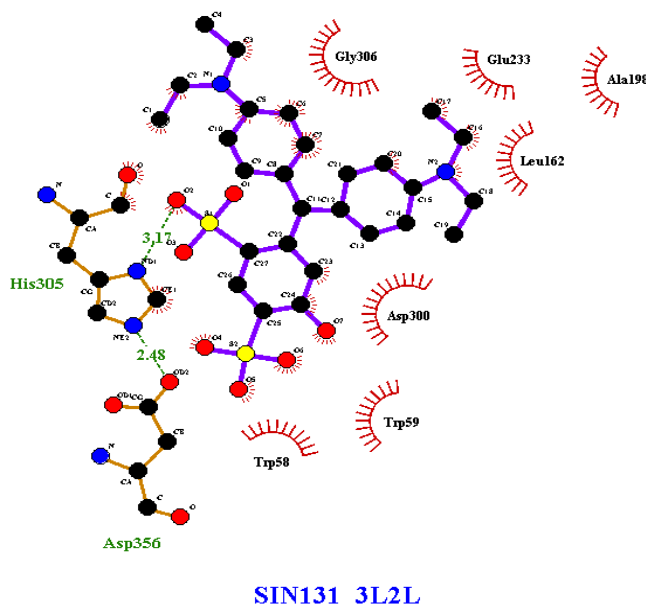


Figure 8 : Représentation des interactions SIN131-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+).

De son côté, l'acarbose se présente comme un inhibiteur puissant. Ce résultat s'exprime par la mise en place de nombreuses interactions entre l'enzyme et l'inhibiteur (**Figure 9**). Ce composé forme trois liaisons hydrogène, la première est avec l'hydrogène du fonction OH et l'atome d'oxygène de His305 avec une distance interatomique de 2,48 Å, la deuxième est aussi avec l'atome d'hydrogène du fonction OH et l'atome d'oxygène de Asp300 présentant une distance interatomique de 3,01 Å, et la troisième est avec l'hydrogène u fonction OH et l'atome d'oxygène de Glu233 avec une distance interatomique de 2,90 Å. On constate également de nombreuses interactions entre l'inhibiteur et les résidus Gly306, Leu165, Tyr151, Glu233, His101, Ala198, His201, Tyr62, Ile235, Asp300, Trp59, Trp58, Leu162, Val163, Asp356 et His305 stabilisant le complexe.

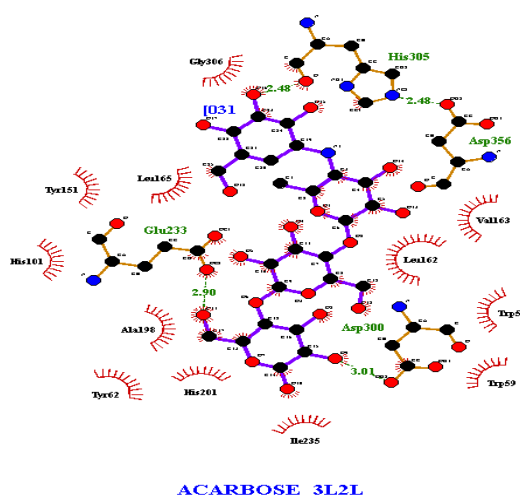


Figure 9 : Représentation des interactions Acarbose-3L2L: les liaisons hydrogène présentées par un trait vert discontinu (avec Ligplot+).

Par ailleurs, l'activité anti-amylasique des colorants mesuré *in silico* pourrait s'expliquer par leur pouvoir inhibiteur déterminé expérimentalement (valeurs d'IC₅₀). Pour cela, il est important de dévoiler la relation entre les différents paramètres mesuré par docking des colorants étudiés et leurs valeurs d'IC₅₀. Les résultats des coefficients de corrélation (R²) sont regroupés dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Coefficient de corrélation (R²) entre les paramètres du docking et leurs IC₅₀.

	Mol Dock Score	Interaction	Heavy Atoms	Nombre de liaisons hydrogènes
IC ₅₀	0,87	0,72	0,96	0,51

Tout d'abord, MolDock Score est parfaitement corrélée ($R^2 = 0,87$) à l'activité inhibitrice de ces composés mesurée expérimentalement comme il est indiqué dans le **Tableau 10**, ce qui est en parfait accord avec les résultats trouvés. En outre, l'activité anti- α -amylase des colorants étudiés s'est corrélée significativement ($R^2 = 0,72$) avec leur énergie d'interaction totale avec la pose. Ce résultat suggère que 72 % de l'activité d'inhibition des colorants déterminée *in silico* est directement liée à la formation des complexes stables, ce qui leur confère une meilleure fixation au niveau de site actif de l'enzyme. Cependant, une forte corrélation linéaire ($R^2 = 0,96$) a été trouvée entre le nombre des atomes lourds (nHeavy-atome) et les valeurs d'IC₅₀. Cela indique que 96 % de l'effet inhibiteur des colorants vis-à-vis de l' α -amylase est dû principalement à la contribution des atomes lourds y compris le carbone. En fin, la faible corrélation linéaire observée ($R^2 = 0,51$) entre le nombre de liaison d'hydrogène et les constantes d'inhibition IC₅₀ indique que les ponts hydrogènes participent au moins en partie (51 %) à l'effet inhibiteur de cette enzyme (3L2L).

Concrètement, le score est une estimation de l'affinité entre la macromolécule et la petite molécule organique. Un score ne prédit donc en rien une activité mais bien une affinité. Il n'est donc pas réaliste de corrélérer une activité mesurée avec la valeur d'un score. Une mauvaise corrélation entre les affinités expérimentales et les scores ne signifie pas pour autant que la fonction de *scoring* est mauvaise. En effet, les molécules dont on connaît les affinités mesurées expérimentalement ne couvrent qu'un très faible intervalle de score comparé au large intervalle proposé par une fonction de *scoring* (Seifert M.H.J., 2006).

En conclusion à cette étude *in silico*, nos ligands apparaissent comme des candidats prometteurs pour l'inhibition de la 3L2L en référence au ligand amidon. Toutefois, ce n'est, qu'une fois les activités anti-amylasique évaluées *in vitro*, que nous pourrions exploiter de manière plus approfondie les résultats théoriques accumulés au cours de cette étude.

Il sera alors intéressant de déterminer s'il y a une corrélation entre une méthode d'évaluation de score donnée et les résultats biologiques *in vitro*, l'objectif étant de disposer d'au moins une fonction de score suffisamment sensible et discriminante par rapport à nos séries de ligands. Ainsi, à partir de là, une nouvelle phase de conception *in silico* pourra démarrer sur des bases rationnelles nettement augmentées par rapport à cette étude préliminaire.

IV. Conclusion générale

Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité et d'une spécificité fonctionnelle remarquables. *In vivo*, elles interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction. En effet, l'étude cinétique des enzymes vis-à-vis de plusieurs composés peut améliorer les connaissances concernant leurs mécanismes réactionnels.

Dans ce contexte, notre travail a étudié *in vitro* l'effet de quelques colorants alimentaires vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique du porc. Nous avons également, testé l'acarbose comme inhibiteur de référence de cette enzyme. Les résultats obtenus montrent que le pouvoir anti-amylasique se différencie selon la structure du colorant. Le colorant Bleu Patenté (SIN131) a exposé une activité inhibitrice plus importante que les autres dont son pouvoir anti-amylasique est supérieur à l'acarbose, par contre le colorant SIN104 (jaune de quinoléine) a présenté la plus faible activité inhibitrice de cette enzyme.

Afin d'étudier la relation structure-activité anti- α -amylasique de cette série de colorants, nous avons effectué ensuite une étude QSAR en évaluant les relations entre les valeurs des IC_{50} mesurées expérimentalement avec cinq descripteurs moléculaires à savoir ; ϵ_{LUMO} , AlogP, Apol, nHeavyAtom et ω . Les résultats obtenus ont permis de donner certaines indications concernant les propriétés moléculaires des colorants impliquées dans les interactions avec l' α -amylase. Le meilleur modèle QSAR obtenu a montré non seulement une signification statistique, mais aussi une capacité prédictive (R^2 est élevé). Tout d'abord, la corrélation trouvée avec quatre descripteurs confirme qu'une forte polarité (Apol) et une faible hydrophobie (AlogP) favorisent l'effet inhibiteur de ces molécules vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique de porc. Egalement, une corrélation opposée a été détectée entre le paramètre nHeavyAtom et les valeurs de IC_{50} qui met en évidence le rôle négatif des atomes lourds dans le phénomène d'inhibition de cette enzyme. Enfin, ce meilleur modèle contient également le descripteur ϵ_{LUMO} ce qui suggère que l'affinité électronique, joue un rôle crucial sur le pouvoir inhibiteur de ces colorants vis-à-vis de cette enzyme par transfert d'électrons.

Les résultats de l'étude QSAR montre que l'activité inhibitrice de l' α -amylase est influencée significativement par l'effet électronique des colorants étudiés. Cela peut être en relation avec la taille et la structure du site actif de l' α -amylase. Ainsi, pour élucider le mécanisme d'inhibition et connaître le type d'interaction de l' α -amylase avec ces molécules, nous avons réalisé une étude complémentaire de modélisation moléculaire par docking *in silico*, en

utilisant Molegro Virtual Docker (MVD). Les résultats obtenus nous ont permis d'élucider les mécanismes d'interaction entre l' α -amylase pancréatique de porc étudiée et les différents inhibiteurs par visualisation des différents types de liaisons mis en jeu. Premièrement, le docking moléculaire de l'interaction colorants- α -amylase nous ont permis d'obtenir des complexes stables avec des énergies d'interaction résultant de la mise en place de liaisons hydrogène et plusieurs interactions hydrophobiques. Toutefois, les résultats suggèrent que les colorants étudiés peuvent se lier à l' α -amylase d'une manière que leurs groupes sulfonâtes, spécifiques interagissent avec les acides aminés du site catalytique. D'autre part, MolDock Score, l'énergie d'interaction totale avec la pose et le nombre des atomes lourds sont est parfaitement corrélée ($R^2 > 0,72$) à l'activité inhibitrice de ces colorants mesurée expérimentalement. Cela suggère que l'activité inhibitrice de ces colorants déterminée *in silico* est directement liée à la formation des complexes stables et à la contribution des atomes lourds y compris le carbone. En fin, les liaisons hydrogènes participent au moins en partie (51 %) à l'effet inhibiteur de cette enzyme (3L2L).

Pour conclure, au vu des résultats obtenus dans ce travail, qui consiste en l'élucidation de l'inhibition de l' α -amylase *in vitro* et *in silico* par quelques colorants alimentaires, nous proposons le colorant Bleu Patenté (SIN131) comme un nouvel inhibiteur potentiel de l'enzyme α -amylase pancréatique de porc.

En perspective, ce travail n'est cependant pas encore terminé, les prochaines étapes consisteront à étudier expérimentalement *in vitro* et/ou *in vivo* l'effet de ces colorants sur l'activité de l' α -glucosidase mais aussi l' α -amylase puis utiliser d'autres programmes de docking moléculaire, parmi les plus récents et les plus performants, pour vérifier ensuite les résultats expérimentaux obtenus.

V. Références

- **Alice Y.Y., Chengm D., 2013**, Introduction (comité d'experts des lignes directrices de pratique clinique de l'association canadienne du diabète). Canadian journal of diabète, 2013, 37, s361-s364.
- **Béatrice de Reynal et Jean-Louis Multon, 2009**, Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires ; 4^{ème} Edition Lavoisier, 2009.
- **Bennacer H., 2017**, Effet inhibiteur des extraits de *Zygophyllum*. Mémoire de Master. Université Abou BekrBelkaid – Tlemcen-Algérie.

- **Buisson G.**, Duee E., Haser R and Payan F., 1987, Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO Journal*, 1987 Dec 20;6(13):3909-16.
- **Chaquin P.**, 2000, Manuel de chimie théorique application à la structure et à la réactivité en chimie moléculaire, appartient à la collection : universités. Chimie, issn 1288-8788. Paris. Ellipses, cop.
- **Chikhi A.**, 2007, Calculs et modélisations des interactions peptide de formylase substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire, Thèse de doctorat d'état en microbiologie, université Mentouri Constantine-Algérie.
- **Chloé B.**, 2011, les colorants artificiels dans les denrées alimentaires destinées aux enfants.
- **Codex Stan 192-1995**, codex alimentarius.
- **Devillers J.**, Marchand-Geneste N, Carpy A, Porcher JM., 2006. Sar and QSAR modeling of endocrine disruptors. *Sar and QSAR environmental research*, 17 : 393-412.
- **Directives du Parlement Européen, 1994**, et du conseil N° 9434 modifiant la directive 89/107 Cee relative au rapprochement des législations des états membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine
- **Eichler G.**, Korna., and Gasic S., 1984, The Effect of a new specific α -amylase inhibitor on post-prandial glucose and insulin excursions in normal and type 2 (non-insulindependent) diabetic patients, *Diabetologia*; 26(4): 278–281.
- **Gehlhaar, D.K.**, Verkhivker, G., Rejto, P.A., Fogel, D.B., Fogel, L.J., Freer, S.T., 1995, Docking conformationally flexible small molecules into a protein binding site through evolutionary programming. In *Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary 72 Programming: 1-3 March 1995; San Diego* Edited by: John R McDonnell, Robert G Reynolds, David B Fogel. MIT Press.615-627.
- **Goldenberg R., punthakee Z**, 2013, Définition, classification et diagnostic du diabète, du Pr diabète et du syndrome métabolique. *Canadian journal of diabete*, 37, s369-s372.
- **Gouget C.**, 2011, Additifs alimentaires : dongern. 2008 Éditions Chariot d'Or – 8e édition Une marque du groupe éditorial Piktos , rue Gutenberg – Z.I. de Bogues – 31750 Escalquens Bureau parisien : 6, rue Régis – 75006 Paris.
- **Hansch G.**, 1969, Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Acc. Chem. Res*, 2, 232-239.
- **Heymann E.**, 1982, Hydrolysis of carboxylic ester and amides. *Metabolic basis of detoxification*, pp. 229-245.
- **Khacheba I.**, 2008, Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha-amylase. Mémoire d'ingénieur d'état en biologie. Université Amar Telidji – Laghouat-Algérie.
- **Komaki E.**, Yamaguchi S., Maru I., Kinoshita M., Kakehi K., Ohta Y., et al., 2003, Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. *Food Sci Technol Res*. 9(1):35-9.
- **Kristiansen K.**, 2004, Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of g-protein-coupled receptors : molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology&therapeutics*, 103,21-80.
- **Larson S.B.**, Day J.S., Mcpherson A., 2010, X-ray crystallographic analysis of pig pancreatic alpha-amylase with limit dextrin and oligosaccharide, *biochemistry*, 49, 3101-3115.
- **Lebovitz H.E.**, 1997, Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metabol Clin North Am*, 26(3):539-51.

- **Li F.,** Wu H., Li L., Li X., Zhao J., Peijnenburg W. J. G. M., **2012**, Docking and QSAR study on the binding interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and estrogen receptor. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012, 80, 273-279.
- **Liska, D.J., 1998**, The detoxification enzyme systems. *Alternative medicine review*, 3, 187-198.
- **Mahfoudi Reguia, 2018**, Contribution à l'étude de la relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes synthétisés, Thèse de doctorat 2018, Université Amar Telidji de Laghouat-Algérie.
- **Arrault A., 2007**, Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse Présentée A L'université D'Orléans-France.
- **Monge A.,** Arrault A., Marot C., and Morin-allory L., **2006**, ScreeningAssistant: a free software for managing chemical databases 16 th European Symposium on Quantitative Structure- Activity Relationships & Molecular Modelling (Euro QSAR), pp.9-2006.
- **N L 237, 1994**, Parlement Européen et Conseil de l'Europe, « directive 94/36/ce du parlement européen et du conseil, du 30 juin 1994, concernant les colorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires », journal officiel de l'union européenne, p. 13–29 (résumé, lire en ligne).
- **Nocairi H.,** M. Hanafi, E.M., **2005**, Approche continuum de la discrimination de type ridge, *Rev. Statistique Appliquée*, 2005, LIII (2), 29-41.
- **Peric B.,** Sierra J., Marti E., Cruañas R., Garau M.A., Arning J., Bottin-Weber U., Stolte S., **2015**, Quantitative structure-activity relationship (QSAR) prediction of (eco)toxicity of short aliphatic protic ionic liquids. *Ecotoxicol Environ Saf*, 115:257-262.
- **Mahsa R.,** Samaneh J., Soheila M., Mahmood R.M., **2014**, Evaluation of alpha- amylase inhibition by urticadioica and juglansregiaextracts. *Iranian journal of basic medical sciences*. 17(6): 465–469
- **Rouahna Y., 2016**, Etude multivariée de plusieurs séries de composés hétérocycliques à intérêt thérapeutique. Thèse doctorat en chimie informatique et pharmaceutique. Université Mohamed Khider Biskra-Algérie.
- **Saihi Y., 2015**, Etude de la Relation Quantitative Structure-Activité Inhibitrice des enzymes hydrolytiques : cas des alpha-glucosidases, Université Badji Mokhtar de Annaba- Algérie.
- **Seifert M.H.J., 2006**, Assessing the discriminatory power of scoring functions for virtual screening, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46, 1456-1465.
- **Teniou soumia, 2012**. Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la topoisomerase de cellules cancéreuses, Thèse de magistère en biochimie, Laboratoire de Biologie Appliquée et Santé, Département de Biochimie et Microbiologie, Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, Constantine, Algérie.
- **Thomson R.** et Christensen M.H., **2006**, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*, 49(11),3315-3321.
- **Tsujita T.,** Takaku T, Suzuki T., **2008**, Chestnut astringent skin extract, an alpha-amylase inhibitor, retards carbohydrate absorption in rats and humans. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 54: 82-8.
- **Vieth M., Hirstj D., Kolinski A., Brooks C.L., 1998**, Assessing energy functions for flexible docking, *Journal of Computational Chemistry*, 19 : 1612-1622.
- **Yang J.M., et** Chen, C.C., **2004**, GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins*. 2004 May 1;55(2):288-304.

المخلص: تم التطرق في هذا العمل إلى دراسة مخبرية و في السيليكو لفعل بعض الملونات الغذائية على إنزيم ألفا-أميلاز (α -amylase) مقارنة بالمشيط المرجعي (الأكربوز). أظهرت النتائج المتحصل عليها مخبريا أن قوة تثبيط ألفا-أميلاز (α -amylase) المعبر عنها بـ IC_{50} تختلف وفقا لبنية الملونات كما اظهر الملون الأزرق الوماض (SIN131) نشاطا تثبيطيا أكبر من الملونات الأخرى وكذا من المشيط المرجعي أكربوز. بينت الدراسة العلاقة البنية-النشاط المضاد لألفا-أميلاز لهذه الملونات من خلال QSAR، وجود علاقة قوية بين قيم IC_{50} مع أربعة واصفات جزئية. أثبتت هذه العلاقة الخطية أن الزيادة في القطبية ($Apol$) والانخفاض في الكراهية للماء ($Alog P$) تزيد فالفعال التثبيطي لهذه الملونات على هذا الإنزيم. من جهة أخرى تبين وجود دور سلبي لعدد الذرات الثقيلة على ظاهرة تثبيط هذا الإنزيم. في الأخير اظهر الواصف ϵ_{lum} (الألفة الإلكترونية) دورا مهما في تثبيط نشاط هذا الإنزيم عن طريق التبادل الإلكتروني. أتاح لنا الفحص الظاهري لتثبيط ألفا-أميلاز بواسطة هذه الملونات و باستخدام برنامج موليفروفيرتيال دوكر (MVD)، الحصول على معقدات مستقرة بطاقات ناتجة عن إنشاء جسور هيدروجينية والعديد من الروابط الكارهة للماء في المقابل تبين أن مجموعات السيلفونات لهذه الملونات قد تكون أهم العوامل الرئيسية في تثبيط هذا الإنزيم. في المقابل تبين وجود علاقة وطيدة بين كل من موليفروفيرتيال دوكر (MVD)، طاقة الربط الكلية مع الموضع وعدد الذرات الثقيلة والنشاط التثبيطي المقاس تجريبيا ($R^2 > 0.72$). في الأخير تحصلنا من خلال هذا العمل على نتائج مشجعة مشيرة إلى أن الملون (SIN 131) يمكن استعماله كمركب جديد ضد مرض السكري.

الكلمات المفتاحية: الملونات الغذائية، ألفا-أميلاز (3L2L)، QSAR، النمذجة الجزئية

Résumé : Pour la première fois, ce travail a étudié *in vitro* et *in silico* l'effet de quelques colorants alimentaires vis-à-vis de l' α -amylase pancréatique du porc. Nous avons également, testé l'acarbose comme inhibiteur de référence de cette enzyme. Les résultats obtenus *in vitro* montrent que le pouvoir anti-amylasique (exprimé en IC_{50}) se différencie selon la structure du colorant. Le colorant Bleu Patenté (SIN131) a exposé une activité inhibitrice plus importante que les autres dont son pouvoir anti-amylasique est supérieur à l'acarbose. La relation structure-activité anti- α -amylasique de cette série de colorants, par une étude QSAR, a permis de trouver une forte corrélation entre les valeurs d' IC_{50} avec quatre descripteurs moléculaires. Cette régression linéaire confirme qu'une forte polarité ($Apol$) et une faible hydrophobie ($AlogP$) favorisent l'effet inhibiteur de ces colorants vis-à-vis de cette enzyme. Egalement, un rôle négatif du nombre des atomes lourds a été mis en évidence dans le phénomène d'inhibition de cette enzyme. Enfin, le descripteur ϵ_{lum} (affinité électronique) joue un rôle crucial sur le pouvoir inhibiteur de ces colorants vis-à-vis de cette enzyme par transfert d'électrons. Le criblage virtuel de l'inhibition de l' α -amylase par ces colorants, en utilisant *Molegro Virtual Docker* (MVD), montre la présence des complexes stables avec des énergies d'interaction résultant de la mise en place de liaisons hydrogène et plusieurs interactions hydrophobiques. Ainsi, les liaisons hydrogènes participent au moins en partie à l'effet inhibiteur de cette enzyme. Toutefois, les groupes sulfonates de ces colorants peuvent être les facteurs majeurs à l'inhibition de cette enzyme. D'autre part, MolDock Score, l'énergie d'interaction totale avec la pose et le nombre des atomes lourds sont parfaitement corrélée ($R^2 > 0,72$) à l'activité inhibitrice de ces colorants mesurée expérimentalement. En conclusion, les résultats obtenus dans ce travail sont encourageants et suggèrent que le colorant Bleu Patenté (SIN131) pourra être utilisé comme un nouvel agent antidiabétique.

Mot clés : Colorants alimentaires, α -amylase (3L2L), QSAR, docking.

Abstract : For the first time, this work studied *in vitro* and *in silico* the effect of some food dyes on porcine pancreatic α -amylase. We have also used acarbose as a reference inhibitor of this enzyme. The *in vitro* results obtained show that the anti-amylase power (expressed as IC_{50}) is depending to the structure molecular of the dye. Patent blue dye (SIN131) displayed better activity than the others dyes whose inhibitory effect is greater than acarbose. The anti- α -amylase structure-activity relationship of this dyes series, by a QSAR study, shows a strong correlation between IC_{50} values with four molecular descriptors. This linear regression confirms that high polarity ($Apol$) and low hydrophobicity ($AlogP$) favours the inhibitory effect of these dyes on this enzyme. Also, a negative role of the heavy atoms number plays important role in inhibition of this enzyme. Finally, the ϵ_{lum} descriptor (electron affinity) plays a crucial role in the inhibitory effect of these dyes by electron transfer. The virtual screening of α -amylase inhibition by these dyes, using *Molegro Virtual Docker* (MVD), shows the presence of stable complexes with interaction energies resulting from hydrophobic and hydrogen bonding interactions. Thus, the hydrogen bonds participate at least in part to the inhibitory effect of this enzyme. However, the sulfonate groups of these dyes may be the major factors via the inhibition of this enzyme. On the other hand, MolDock Score, the total interaction energy with the pose and the number of heavy atoms are perfectly correlated ($R^2 > 0.72$) with the inhibitory activity of these dyes measured experimentally. In conclusion, the results obtained in this work are encouraging and suggest that the patent blue dye (SIN131) may be used as a new antidiabetic agent.

Keywords: Food dyes, α -amylase (3L2L), QSAR, docking