

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

**Étude de l'effet inhibiteur de quelques extraits
polaires de *Thapsia garganica* sur la lipase de
*Candida rugosa***

Présenté par : HASSANI Hafida Hanane

LAZREG Asmaa

Devant le jury :

Président(e) : Dr NIA Samira (MCB)

Rapporteur : Dr BENAROUS Khedidja (MCB)

Co-Rapporteur : M^{me} NBEG Halima

Examinatrice : Dr BENGUECHOUA Madjeda (MCB)

Soutenu publiquement le Mai 2017

*Nos Chers parents,
Nos Chers frères,
Nos chères sœurs,
Et nos chères personnes.*

Asmaa- Hafida

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre promotrice Dr : BENAROUS Khedidja, Maitre de conférences A à l'université Amar Telidji de Laghouat pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être menée au bon port. Qu'elle trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos sincères remerciements iront également à Mme NBEG Halima, Copromotrice de ce mémoire.

On n'oublie pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui sont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

RESUME

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la plante *Thapsia garganica* ainsi l'étude de l'effet inhibiteur de ses extraits contre la lipase de *Candida rugosa* (LCR). Les résultats obtenus dans la première partie montrent que les extraits ont un pouvoir inhibiteur contre la LCR pour les 3 parties (graines, feuilles, racines), ainsi pour la molécule pure l'acide galique. Les graines représentent le meilleur effet d'inhibition avec une valeur d'IC₅₀ de 1,194 mg/ml tandis que les feuilles ont enregistré l'effet d'inhibition le plus faible avec une valeur de 1,961 mg/ml. Ces expériences ont montré que cette plante *Thapsia garganica* peut être utilisée pour traiter l'obésité. Le docking moléculaire effectué en utilisant autodock vina pour cinq molécules, déjà connues dans cette plante, nous a permis de comprendre les interactions et leurs mécanismes d'inhibition de la lipase.

Mots clés: Lipase de *Candida rugosa*, inhibition, IC₅₀, *Thapsia garganica*, docking, autodock vina, obésité.

ABSTRACT

In this work, we were interested to the plant *Thapsia garganica* and the study of their inhibiting effect of lipase of *Candida rugose* (CRL). The obtained results in the first part show that the extracts have an inhibiting power against the CRL for the 3 parts (seeds, leaves, roots) and for the pure molecule (galic acid). The seeds represent the best effect of inhibition with a value of IC₅₀ of 1.194 mg/ml while the leaves recorded the weakest inhibition effect with an IC₅₀ value of 1.961mg/ml. These experiments showed that this plant *Thapsia garganica* could be used to treat obesity. In the second part, Molecular docking of the five molecules, already known in this plant, has been carried out using autodock vina program which allow us to understand the inhibition mechanism of these molecules and interaction types.

Keywords: *Candida rugose* lipase, inhibition, IC₅₀, *Thapsia garganica*, docking, autodock vina, obesity.

المخلص

في هذا العمل قمنا ببحث علمي حول نبتة الدرياس ودراسة أثرها التثبيطي على إنزيم الليباز. النتائج المحصل عليها في الجزء الأول أثبتت أن المستخلصات لها قدرة تثبيطية ضد الانزيم مع مختلط للجذور والأوراق والبذور وحمض الغاليك. سجلت البذور أعلى أثر تثبيطي مع قيمة (ت، م) = 1,194 مغ/مل في حين سجلت الأوراق أدنى أثر تثبيطي مع قيمة (ت، م) = 1,96 مغ/مل هاته النتائج أثبتت أن نبتة الدرياس يمكن أن تستخدم لعلاج السمنة. في الجزء الثاني قمنا بدراسة البنية الثلاثية الأبعاد للجزيئات الخمس وذلك باستعمال أنظمة العلام الآلي التي تدرس المعقد إنزيم-مثنبط وذلك يتحقق بعملية الدمج.

الكلمات المفتاحية: إنزيم الليباز، تثبيط، تركيز تثبيطي (ت.م)، الدرياس، إرساء، السمنة.

Liste des tableaux

Tableau 1: Le rendement et la masse du résidu sec des extraits de l'hexane et l'acétate d'éthyle ..	21
Tableau 2 : Les valeurs d'IC ₅₀ <i>Thapsia garganica</i>	23
Tableau 3 : Les valeurs d'IC ₅₀ de quelques extraits naturels selon les références.....	24
Tableau 4: Type d'interaction et le nombre de répétition	27

Liste des figures

Figure 1 : <i>Thapsia garganica</i> et ses différentes parties	18
Figure 2 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne	19
Figure 3 : Les représentations graphiques I % = f (C) de chaque extrait.	22
Figure 4 : Docking de Thapsigargin sur la lipase de <i>Candida rugosa</i>	28
Figure 5 : Docking de Thapsigargin sur la lipase de <i>Candida rugosa</i>	28
Figure 6 : Docking de Thapsivillosin C sur la lipase de <i>Candida rugosa</i>	29
Figure 7 : Docking de Tribolid sur la lipase de <i>Candida rugosa</i>	29
Figure 8 : Docking de Nortrilobolid sur la lipase de <i>Candida rugosa</i>	30
Figure 9 : Docking d'Acide gallique sur la lipase de <i>Candida rugosa</i>	30

Liste des abréviations

	<i>P</i>
	P-NP : p-nitrophénol
	P-NPL : para nitrophényl-laurate
<i>I</i>	
I % : Pourcentage d'inhibition	
I : inhibiteur	
IC₅₀ : Concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'activité enzymatique	
	<i>G</i>
	Glu : glutamate
	<i>S</i>
<i>C</i>	Ser : serine
C° : Degré Celsius	
CI : Concentration de l'inhibiteur	
	<i>T</i>
	Trg : Triglycéride
<i>L</i>	TGg : <i>Thapsia garganica</i> graines
LCR : Lipase de <i>Candida rugosa</i>	TGf : <i>Thapsia garganica</i> feuilles
	TGr : <i>Thapsia garganica</i> racines
	<i>H</i>
<i>D</i>	h : heure
3D : Tridimensionnelle	His : histidine
	<i>U-V</i>
<i>M-N</i>	UV : ultra-violet
Min : Minute	
Nm : Nanomètre	

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	10
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	12
1. Les plantes médicinales	12
2. Les enzymes	12
3. Spécificité enzymatique	13
4. Classification des enzymes	13
5. La biochimie, la fonction et l'expression des lipases	13
6. L'obésité : qu'est-ce que c'est	15
7. Les causes et conséquences de l'obésité	15
8. Lutter contre l'obésité	16
MATERIEL ET METHODES	17
1. Matériel végétal	17
2. Matériels chimiques.....	18
3. Protocole expérimental	18
i. Extraction des métabolites secondaires.....	18
ii. Activité enzymatique de la lipase <i>Candida rugosa</i>	18
iii. Tests d'inhibition de l'activité de la lipase.	19
4. Analyse statistique	20
5. Docking moléculaire	20
RESULTATS ET DISCUSSION	21
1. Extraction des métabolites secondaires du <i>Thapsia garganica</i> :	21
2. Inhibition de la réaction catalysée par la lipase.....	22
3. Docking des inhibiteurs sur la lipase de <i>Candida rugosa</i> :	26
CONCLUSION GENERALE	31
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	32

INTRODUCTION GENERALE

La médecine alternative ou la phytothérapie est l'art de guérir par les plantes, elle est aussi la connaissance et l'utilisation de leur propriété thérapeutique. La phytothérapie suscite actuellement un renouveau d'intérêt, son efficacité est prouvée et elle est toujours vue comme un remède surtout utilisé par la population rurale à travers le monde (Siannoau, 2006).

Les plantes médicinales sont douées de cette efficacité à cause de ses métabolites secondaires : composés phénoliques, alcaloïdes, huile essentielles...notre pays est riche de ce type des plantes qui sont utilisés en médecine traditionnelle.

Thapsia, *Thapsia garganica* est la plante utilisé dans cette recherche qui est récolté de la région de Laghouat, elle est de la famille des Apiacés et riche en composés terpéniques comme les lactones sesquiterpéniques : Thapsigarin, Thapsigargin, Tribolid, Notrilolid et Thapsivillosin C (Makunga et al. 2003).

En médecine populaire Algérienne, l'usage de cette plante toxique est réservé au traitement externe, généralement sous forme de décoction aqueuse ou de macération huileuse de racine, en applications locales contre les douleurs rhumatismales, ou quelques fois sur le thorax pour traiter les bronchites (Aissa, 2000).

L'enzyme qui sera étudié dans ce travail est la lipase de *Candida rugosa*, qui dégrade les triglycérides en acides gras ce qui permet leur stockage dans les tissu adipeux causant l'obésité (May faraj et al, 2004).

La lipase de *Candida rugosa* connue 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 ; Benarous, 2010).

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) (Barros et al, 1994) avec une

préférence distincte pour les acides gras de la longueur C4, le C8, le C10 et le C12 (Barros et al, 1994 ; Benarous, 2010).

Notre travail commencera par une introduction générale. Deuxièmement, nous avons décrit tous le matériel et les méthodes utilisés et nous avons étudié le pouvoir inhibiteur des extraits contre la lipase, suivies des résultats et leur discussion, dans cette partie nous avons réalisés le docking moléculaire, et se terminera par une conclusion générale.

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'effet inhibiteur des extraits (graines, feuilles racines) de *Thapsia garganica* en faible concentration sur l'activité de l'enzyme lipase et cette plante est utilisé comme une cure de certaines maladies.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Les plantes médicinales

Depuis la nuit des temps, les hommes ont su développer les extraordinaires vertus médicinales que recèlent les plantes, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique basée sur l'analyse et l'observation s'appellent la phytothérapie (Delille, 2007).

La phytothérapie est l'emploi de médicaments végétaux pour soigner les différents maux dont nous pouvons être victime. A travers les siècles, les hommes ont su développer la connaissance des plantes et de leurs propriétés thérapeutiques. Aujourd'hui, l'efficacité prouvée et les bienfaits incontestables de la phytothérapie pour notre santé lui ont permis d'entrer dans nos vies de tous les jours (Pastor, 2006).

La phytothérapie occupe une place très importante dans l'art médical de notre époque, qu'elle soit prescrite par un médecin phytothérapeute ou prise spontanément en automédication sur les conseils de votre pharmacien ou après lecture d'un guide sérieux et documenté. Il est évident que l'automédication est toujours risquée car chacun d'entre nous n'est peut-être pas le mieux placé pour diagnostiquer avec précision le mal dont il est victime et le médicament adéquat (Scimeca et Tétou, 2006).

2. Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant.

Les réactions essentielles pour le fonctionnement d'un être vivant sont trop lentes et sans la présence de ces catalyseurs, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible. Qu'il s'agisse de réaction simples comme la formation de bicarbonate à partir d'eau et de dioxyde de carbone ou de réactions complexes comme la réplication de l'ADN, chaque réaction chimique se déroulant au sein d'un être vivant est catalysé par un ou plusieurs enzymes spécifiques. Les enzymes sont des macromolécules, des protéines, des ARN (les ARN catalytiques sont plus correctement dénommés ribozymes), qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme. Un second rôle essentiel joué par les enzymes est d'assurer le couplage physique entre réactions endergoniques et réactions exergoniques et permettre ainsi de maintenir les systèmes

biologiques dans des états hors d'équilibre, également indispensable pour le maintien de la vie (Athel Cornish-Bowden et al, 2005).

3. Spécificité enzymatique :

Le problème de la spécificité de l'enzyme pour son substrat est au centre de l'enzymologie. C'est en effet la particularité la plus fondamentale et la plus remarquable de cette catalyse. Les enzymes sont étroitement spécifiques d'une réaction chimique donnée, réalisée sur un type de substrat défini. La configuration spatiale du substrat est donc en quelque sorte reconnue par l'enzyme ; ce fait est particulièrement bien mis en évidence par la spécificité d'action vis-à-vis des isomères optiques. Très généralement, les enzymes sont capables de métaboliser l'un et non pas l'autre. Une hypothèse simple regroupe ces données : le site réactionnel d'une enzyme possède, au moins formellement, une conformation spatiale complémentaire de celle du substrat (Athel Cornish-Bowden et al, 2005).

4. Classification des enzymes :

Les enzymes sont classées et nommées en fonction de la nature des réactions chimiques qu'elles catalysent. Il y a six classes principales de réactions catalysées par les enzymes, ainsi qu'un certain nombre de sous-classes et de sous-sous-classes à l'intérieur de chaque classe. Chaque enzyme se voit assignée deux noms et une classification à quatre chiffres (Donald Voet et Judith G. Voet, 1998).

5. La biochimie, la fonction et l'expression des lipases :

Les lipases sont des enzymes omniprésentes dans tous les types des organismes vivants. Dans les eucaryotes elles peuvent être confinées dans une organelle (c'est-à-dire le lysosome), ou elles peuvent être trouvées dans les espaces extracellulaires pour jouer leurs rôles dans le métabolisme, l'absorption et le transport des lipides. Dans les eucaryotes inférieurs et les bactéries, les lipases peuvent être intracellulaires afin de dégrader des substrats lipidiques présents dans l'environnement cellulaire, et dans les organismes pathogènes comme *Candida albicans*, *Staphylococcus sp*, *Pseudomonas sp* et *Helicobacter pylori*, ils peuvent même agir en tant que facteurs de virulence (Müller et Petry, 2004) dans les maladies contagieuses et d'autres dans les maladies inflammatoires comme la lipase de *Propionibacterium acnes* (Ruiz et al., 2006). Les enzymes des bactéries et des mycètes ont le plus grand potentiel en tant que

biocatalyseurs industriels puisqu'elles sont habituellement robustes, faciles à produire par la fermentation et facile à récupérer le bouillon de culture. Par conséquent, un grand nombre d'enzymes microbiennes peuvent être obtenu à partir des producteurs commerciaux (Müller et Petry, 2004). Les lipides constituent pour les mammifères une source énergétique essentielle et avantageuse par leur faible densité. 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. Les lipases de mammifères peuvent être classées en trois groupes. Le premier est constitué par les lipases associées à la digestion, telles que les lipases linguale, pharyngale, gastrique et pancréatique. 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 et al., 1991 ; Fickers et al., 2008). Les triacylglycéról acyl-hydrolases, ou lipases (E. C.3.1.1.3), sont des enzymes atypiques de par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycéról.

La lipase de *Candida rugosa* (*C. cylindracea*)

La lipase de *Candida rugosa* (connus 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 appliqué 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, 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 (Grochulski et al., 1994 ; Schmitt et al., 2002).

6. L'obésité : qu'est-ce que c'est

L'obésité est un problème de santé publique important dans de nombreux pays. Elle a des conséquences très lourdes pour la santé, puisqu'elle est à l'origine de diabète, de maladies cardiovasculaires, de la réduction de l'espérance de vie, etc. D'ici à 2025, les estimations prédisent que l'obésité affectera la moitié des hommes et un tiers des femmes. Selon l'OMS, le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé. L'indice de masse corporelle (IMC) est une mesure simple du poids par rapport à la taille couramment utilisée pour estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte. Il correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimé en kg/m^2 . Une personne est ainsi considérée en surpoids lorsque son IMC est égal ou supérieur à 25, et on parle d'obésité lorsque son IMC est égal ou supérieur à 30. Pour combattre l'obésité, il faut comprendre l'origine de sa prise de poids. Pour cela, consulter un médecin est essentiel pour mettre en place un régime personnalisé et bénéficier de conseils adaptés. Cependant, d'une manière générale, un régime pour lutter ou diminuer l'obésité repose sur des principes alimentaires de base : une alimentation équilibrée (poissons, viandes, laitages, légumes, fruits, etc.) et une hygiène de vie saine (activité sportive régulière, pas de grignotage).

7. Les causes et conséquences de l'obésité

Les causes de l'obésité sont nombreuses, mais c'est en les identifiant que l'on peut combattre la maladie. Parmi les origines les plus fréquentes, on peut citer les causes comportementales (alimentation et sédentarité), les causes médicales (hérédité, prise de médicaments et troubles psychologiques) ou encore les personnes à risque (obésité infantile, grossesse, boulimie et homme obèse). L'obésité augmente le risque d'atteinte d'un certain nombre de maladies, y compris l'hypertension, le diabète de type 2, la dyslipidémie, l'artère coronaire, l'arthrose et le cancer de sein post-ménopausique. La prédominance de l'obésité a été significativement augmentée au cours des 30 dernières

années et environ 32% des adultes dans les états unis sont actuellement obèses (Stolley et al. 2008).

8. Lutter contre l'obésité

Le surpoids, l'obésité modérée et l'obésité infantile peuvent être traités grâce à la mise en place d'un nouveau mode de vie alliant une bonne alimentation (plan de nutrition ou régime), une activité physique (sport, cure thermale ou séjour en centre pour obèses) et un soutien psychologique. En cas d'obésité sévère et morbide, l'importante surcharge pondérale du patient met sa vie en danger, c'est pourquoi les traitements sont plus radicaux. Le patient peut alors suivre un traitement médicamenteux ou opter pour une chirurgie bariatrique : gastroplastie (pose d'un anneau gastrique ou création d'une sleeve gastrique), ballon gastrique ou by-pass gastrique. Quoi qu'il en soit, les médicaments et/ou la chirurgie seront inefficaces s'ils ne sont pas accompagnés d'une alimentation équilibrée, de la pratique d'une activité physique et d'un soutien psychologique. L'obésité est une maladie grave qui a des répercussions sur la santé physique et psychologique des patients. Pour se faire aider, ces derniers peuvent consulter leur médecin traitant, mais aussi faire appel à l'une des nombreuses associations luttant contre la discrimination des obèses et les aidant dans leur combat contre l'obésité.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal :

Classification botanique (Selon la classification de Drude's, 1898).

Règne : Plantae

Famille : Umbelliferae (Ombellifères)

Sous famille : Apiodeae

Genre : *Thapsia*

Espèce : *Thapsia garganica* L

Noms habituels en Arabe : Bou nâfaa, Drias [9].

Thapsia garganica L est une plante toxique, son aire de répartition est méditerranéenne, présente en Algérie, au Maroc, en Tunisie, et en Libye. Elle s'agit d'une plante herbacée vivace.

- Sa racine possède une écorce qui se présente sous forme de fragments, leur face externe est de couleur jaune brunâtre très claire, leur face interne est blanche, l'odeur de l'écorce de racine est presque nulle alors que sa saveur est à la fois piquante et caustique.
- Sa tige est glabre et striée.
- Les feuilles sont glabres ou à peine pubescentes en dessous, elles sont de couleur verte, leur forme diffère selon leur place.
- L'inflorescence est en ombelle.
- Le fruit est de forme elliptique, comprimé à sa face dorsale, possède des marges fortement ailées : ces ailes latérales, très développées, sont cordiformes à leurs extrémités, et sont finement striées ; elles ont une couleur jaune brillante.

Les fruits de *Thapsia garganica* sont collectés le mois de juin 2015, les feuilles mars et les racines janvier 2016.



Figure 1 : *Thapsia garganica* et ses différentes parties

2. Matériels chimiques

Acétate d'éthyle, 2-Isopropanol, Méthanol, Ethanol, Hexane, Gomme arabique, hydrogène phosphate dipotassium, dihydrogène diphosphate de potassium, chlorure de potassium.

3. Protocole expérimental :

i. Extraction des métabolites secondaires

Une quantité (30-60 g) de chaque poudre de différente partie (racines, feuilles, graines) de la plante est macérée dans un volume approprié (150-200 ml) d'un solvant apolaire : hexane pendant 24 h à température ambiante et à l'obscurité. Après filtration, le résidu sur le papier filtre obtenu est ensuite macéré avec un volume (200-300 ml) d'acétate d'éthyle pendant 48 h à température ambiante et à l'obscurité. La phase organique obtenue est évaporé à sec sous pression réduite à 55°C.

ii. Activité enzymatique de la lipase *Candida rugosa* :

La technique physico-chimique utilisée pour étudier la cinétique de l'hydrolyse de l'ester par la lipase microbienne est la spectrophotométrie UV-Visible (405nm). Dans cette étude, nous nous intéressons à l'apparition du produit d'une coloration jaune. p-NP en suivant l'évolution de

sa densité optique. Le p-NP se produit de l'hydrolyse de p-NPL en présence de la lipase microbienne selon l'équation de la réaction suivante :

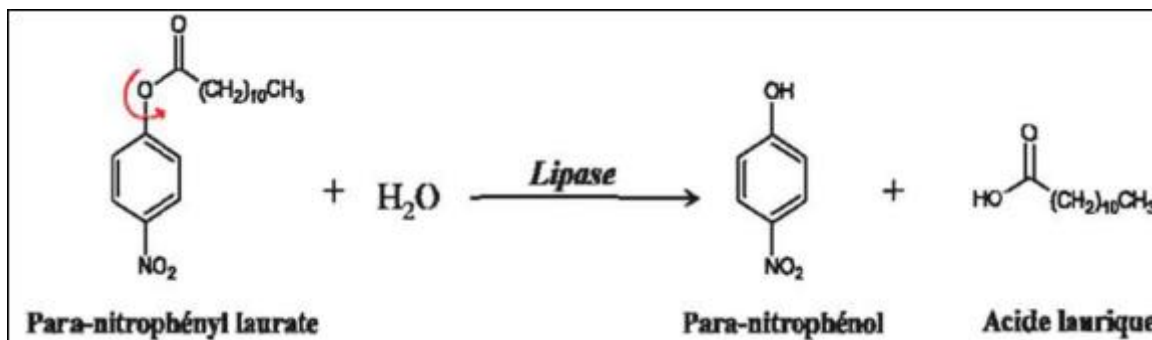


Figure 2 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne (Benarous, 2010)

iii. Tests d'inhibition de l'activité de la lipase.

Dans le but d'étudier l'effet de notre plante *Thapsia garganica* sur la LCR et de déterminer le paramètre d'inhibition IC₅₀ : la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50 % de l'activité enzymatique IC₅₀, nous avons procédé à la méthode décrite par Benarous et al., 2013. Après avoir testé l'activité inhibitrice des extraits pour sept concentrations (0,5 - 0,75 - 1 - 1,25 - 1,5 - 1,75 mg/ml et 2 mg/ml). Nous avons testé les trois parties de *Thapsia garganica* qui ont donné une inhibition importante (> 50%) et pour lesquels nous avons procédé à la détermination du paramètre IC₅₀. Ainsi, l'acide galique est utilisé comme inhibiteur pur.

Le milieu réactionnel contient 100 µl de l'extrait dilué et 100 µl de la LCR de 0,5 mg/ml 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 0,05mM pendant 15 min. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un UV/Vis spectrophotomètre, modèle SP_3000 nano, à une longueur d'onde de 405 nm contre un blanc. Les valeurs des IC₅₀ ont été déterminées de la représentation graphique I % = f (c) tel que I % est déterminée suivant cette relation :

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

Avec : I % : le pourcentage d'inhibition.

A_{extrait} : l'absorbance de l'activité lipolytique en présence de l'extrait chimique.

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

4. Analyse statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le Microsoft office Excel 2013. Les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n=3) pour chaque cas.

5. Docking moléculaire

La bio-informatique est constituée par l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation de l'information génétique (séquences) et structurale (repliement 3D). C'est le décryptage de la bio-information. Son but, comme tout volet théorique d'une discipline, est d'effectuer la synthèse des données disponibles et d'énoncer des hypothèses généralisatrices.

Dans ce travail, des expériences d'amarrage ont été effectuées pour gagner une compréhension plus profonde des aspects structuraux principaux de ces inhibiteurs. Les programmes utilisés sont : Autodock vina, Discovery Studio 2016 et Autodock tools.

Les fichiers des molécules : acide galique, Thapsigarin, Thapsigargin, Tribolid, Notrilobolid et Thapsivillosin C sont téléchargé à partir de la base de données PubChem. Le fichier de la LCR est téléchargé de la PDB (Protein Data Bank) avec ce code pdb : 1CRL. Tous les ligands ont été éliminés avec le discovery studio ainsi les molécules d'eau, les hydrogènes polaires ont été ajoutés. Le nombre de tour effectué dans le docking est égale à 50 avec l'obtention de 20 solutions dans chaque tour ce qui nous donne 1000 solutions. Toutes ces solutions sont bien traitées et nous avons accepté que les conformations avec une faible énergie de liaison ainsi qui se trouve dans le site actif. Les paramètres de docking utilisés avec la boites sont les mêmes publiés dans Benarous et al. 2015.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Extraction des métabolites secondaires du *Thapsia garganica* :

Le rendement et la masse de chaque extrait sont montrés dans le tableau 1.

Tableau 1: Le rendement et la masse du résidu sec des extraits de l'hexane et l'acétate d'éthyle

Partie de la plante	Masse du résidu sec (g)		Rendement %	
	Hexane	Acétate d'éthyle	Hexane	Acétate d'éthyle
Feuilles	0,5721	0,7185	1,907	2,395
Racines	0,5755	0,3484	0,959	0,58
Graines	1,3454	2,1297	4,484	7,099

Les rendements des extraits varient de 0,58 à 7,099 % dans les différentes parties de la plante. Le rendement le plus élevé est enregistré pour les graines, par contre les racines sont les plus pauvres.

Si nous comparons les valeurs des teneurs des extraits de l'hexane aux extraits de l'acétate d'éthyle, nous remarquons que l'extrait de l'acétate d'éthyle renferme des teneurs en composés secondaires plus élevées par rapport à l'extrait de l'hexane pour les feuilles et les graines. En revanche, nous avons enregistré le contraire pour les racines.

D'une manière générale, les teneurs trouvés pour les extraits hexaniques sont faibles par rapport aux travaux publiés dans Benarous, (2014). Si nous comparons les extraits hexaniques des trois plantes, nous pouvons dire que la teneur la plus élevée est observé chez le *Peganum harmala* avec une valeur de 14,41%, hors que la plus faible est de 1,3 % de la plante *Marrubium vulgare*. Nous connaissons que l'hexane est un solvant apolaire, c'est-à-dire les composés extractible par ce solvant sont apolaire comme les lipides, les pigments, les terpènes et autres métabolites apolaires. Ainsi, la nature de ces constituants dépend de la partie végétale utilisée, par exemple les lipides sont des réserves des graines ce qui explique la teneur la plus élevée de *Peganum harmala* (Benarous, 2014).

Les valeurs des teneurs atteintes sont très variables selon la plante, la partie végétale utilisée, la méthode d'extraction suivie et le solvant d'extraction, en effet, nous ne pouvons pas prévoir une hypothèse générale pour déterminer la meilleure méthode d'extraction (Benarous, 2014).

2. Inhibition de la réaction catalysée par la lipase

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

Les résultats obtenus montrent que les trois parties de *Thapsia garganica* et l'acide gallique présentent un pouvoir d'inhibition vis-à-vis de la lipase. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des inhibiteurs exprimées en mg/ml pour une seule concentration de substrat (0,05 mM), les courbes sont présentés dans la figure 3. Ces représentations graphiques permettent de déterminer les valeurs des IC_{50} . Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 2.

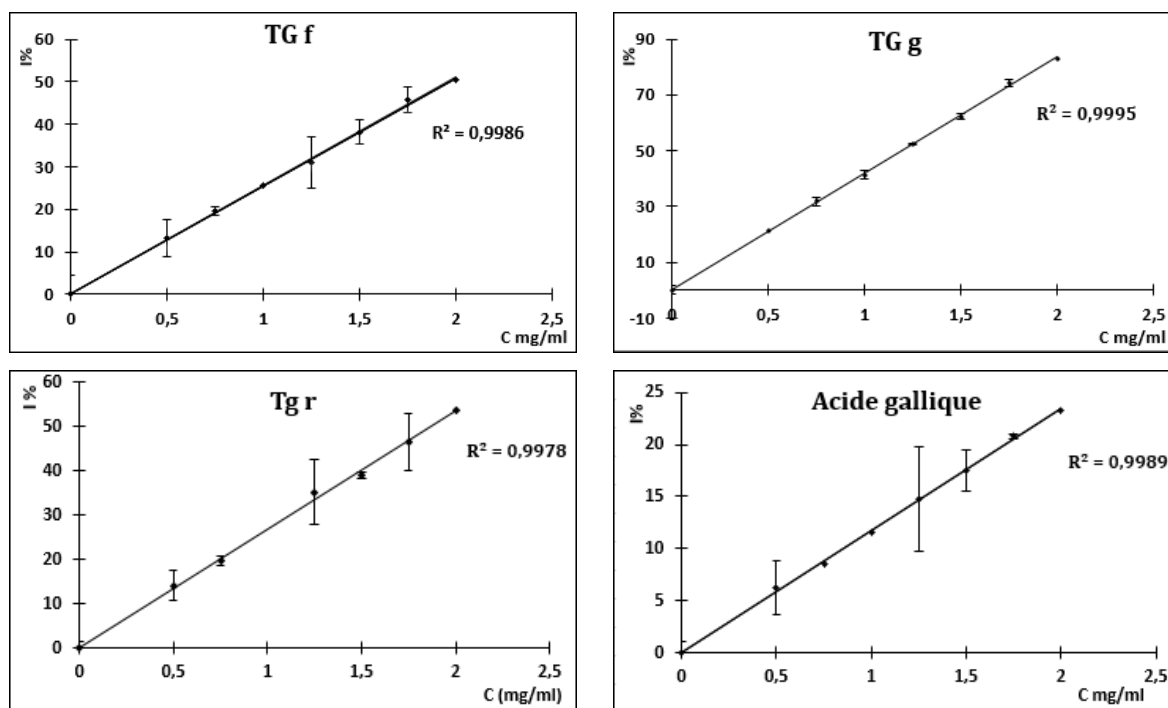


Figure 3 : Les représentations graphiques $I \% = f(C)$ de chaque extrait.

Tableau 2 : Les valeurs d'IC₅₀ *Thapsia garganica*

Partie de la plante	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mM)
Graines	1,194	2,389
Racines	1,868	3,923
Feuilles	1,961	3,736
Acide gallique	4,268	8,537

Les résultats obtenus montrent que les différentes parties de la plante étudiée *Thapsia garganica* ont un pouvoir inhibiteur important de l'activité enzymatique de la lipase. Les valeurs des IC₅₀ calculées en mM en tenant compte que la masse molaire moyenne des composés phénoliques égale à 500g/mol.

Les valeurs des IC₅₀ varient selon la nature et la structure chimique de chaque partie de cette plante et les groupements fonctionnels que les constituent.

Dans l'acétate d'éthyle, La partie la plus puissante inhibitrice présente dans les graines IC₅₀=1,194 mg/ml, tandis que la plus faible se présente dans les feuilles IC₅₀=1,961 mg/ml. Les racines ont une valeur IC₅₀=1,868 mg/ml.

Tableau 3 : Les valeurs d'IC₅₀ de quelques extraits naturels selon les références.

Plante	extrait	IC ₅₀	référence
<i>Inonotus hispidus</i>	EtOAc	1,79 mg/ml	Benarous et al. 2015
<i>Peganum harmala</i>	CH ₂ Cl ₂	1,74 mg/ml	
<i>Eucalyptus globulus</i>	Méthanol	1,29 mg/mL	Belfeki et al. 2016
<i>Mentha viridis</i>	Méthanol	1,44 mg/mL	Belfeki et al. 2016
<i>Camellia sinensis</i>			
<i>theaflavin-3-gallate</i>		3µmol/L	
<i>theaflavin-3'-gallate</i>		4,2µmol/L	
<i>theaflavin-3,3'-digallate</i>	L'eau	1,9µmol/L	Glisan et al. 2016
<i>Calotropis procera</i> (Aiton)	Méthanol	0,00947 mg/mL	patil et al. 2015
<i>Aronia melanocarpa L</i>	Méthanol	83,45 mg/ml	Worsztynowicz et al. 2014
<i>Cudrania tricuspidata</i>	Acétate d'éthyle	6,5 µM	Hee Jo et al. 2015
<i>Morus alba</i>	Ethanol	6,2 µM	Jeong et al. 2015
<i>Alisma orientalis</i>	Ethanol	64,4-45,5µM	Cang et al. 2016
oolong tea			
EGCG		54,97	
GCG	L'eau	57,68	Zhu et al.2014

ECG		38,22 μ M	
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Méthanol	229,3 -161,0 μ M	Luyen et al. 2013
<i>Tribulus terrestris</i>	n-Butanol	0,0153 mg/ml	
<i>Chickpea</i>	Méthanol	0,00974 mg/ml	Ercan et al. 2016
<i>Xestospongia testudinaria</i>	Et ₂ O- n-BuOH	3,11 μ M	Ling et al. 2014
<i>Tecoma stans</i>	Hydroalcoholic	63-158 μ M	Guillermo et al. 2016
<i>Morus alba L.</i>	/	0,09 – 0,92 μ M	Tuan Ha et al. 2016
<i>Cudrania tricuspidata</i>	Ethanol	65 μ M	Ji Yeon et al. 2014
<i>Achillea santolina</i>	Ac-O-Et	0,37mg/ml	
<i>Zizyphus lotus</i>	Ac-O-Et	0,45 mg/ml	Benarous et al. 2013
<i>Annona crassiflora Mart</i>	Ethanol	0,00835mg/ml	Pereira et al. 2017

Dans le but de comparer nos résultats avec les travaux antérieurs, nous avons groupé dans le tableau 3 les résultats publiés. Plusieurs molécules isolées des extraits naturels ont présenté leur pouvoir inhibiteur de la lipase à savoir : *Inonotus hispidus* avec $IC_{50}= 1,79$ mg/ml (Benarous et al. 2015), *Eucalyptus globulus* avec $IC_{50}= 1,29$ mg/ml (Belfeki et al. 2016), *Nelumbo nucifera* avec $IC_{50}= 1,38$ mg/ml (Song et al. 2013), *Mentha viridis* avec $IC_{50}=1,44$ mg/ml (Belfeki et al. 2016), *Aronia melanocarpa L* avec $IC_{50}=83,45$ μ g/ml (Worsztynowicz et al. 2014). Si nous comparons notre plante étudié à ces molécules, nous pouvons dire que les racines et les feuilles sont moins efficaces $IC_{50}=1,868$ et $1,961$ mg/ml respectivement et présentent des effets inhibiteurs faible que les extraits isolés par contre les graines présentent un meilleur effet inhibiteur avec une valeur de $IC_{50}= 1,194$ mg/ml.

Les extraits naturels comme : *Cudrania tricuspidata* avec une valeur d' $IC_{50}= 6,5$ μ M (Hee Jo et al. 2015), *Morus alba* avec une valeur d' $IC_{50}=6,2$ μ M (Jeong et al. 2015). *Alisma orientalis* à une valeur d' $IC_{50}= 64,4$ μ M (Cang et al. 2016), *Tecoma stans* avec une valeur d' $IC_{50}= 63$ μ M (Guillermo et al. 2016), *Xestospongia testudinaria* sa valeur d' $IC_{50}=3,11$ μ M (Ling et al. 2014), et *Cudrania tricuspidata* avec une valeur d' $IC_{50}= 65$ μ M (Ji Yeon et al. 2014) sont plus efficaces que les extraits étudiés, ainsi l'acide galique. Alors que le plus efficace que nos extraits est *Morus alba L* avec une valeur d' $IC_{50}= 0,92$ μ M (Tuan Ha et al. 2016).

3. Docking des inhibiteurs sur la lipase de *Candida rugosa* :

Docking ou amarrage est l'insertion d'un ligand au niveau d'un site récepteur d'une macromolécule en utilisant des logiciels bio-informatique en collaboration avec l'algorithme génétique, ce phénomène est utilisé pour l'étude des réactions de complexation généralement dans le domaine pharmacologique afin de déterminer les différents paramètres de cette fixation ainsi que son mécanisme catalytique, à titre d'exemple l'étude du complexe inhibiteur-lipase du l'obésité afin de trouver un traitement contre cette maladie chronique (Seal et al., 2011).

Avant de passer au docking, nous allons étudier et identifier les différents acides aminés ainsi que la topologie du site actif de la lipase de *Candida rugosa* « LCR ». Dans cette enzyme, le site de liaison des acides gras est situé dans un tunnel à l'intérieur de la protéine avec une large entrée dans le côté droit. Le tunnel est formé par des acides aminés hydrophobes et se termine avec la triade Ser209, Glu 341 et His 449.

Le docking des molécules étudiée et leur traitement nous permet de représenter la nature des interactions, les acides aminés impliqués ainsi le nombre de répétitions dans le tableau 4.

Tableau 4: Type d'interaction et le nombre de répétition

Molécule	Type d'interaction	AA impliqué	Nombre de répétition	%
Notrilobolid	Carbone hydrogène	His 449	56/57	98,24
Thapsivillosin C	Pi-alkyle	His 449	219/219	100
Thapsigargin	Pi-alkyle	His 449	41/41	100
Thapsigargin	Pi-alkyle	His 449	47/47	100
Tribolid	Carbone hydrogène	His 449	37/37	100
Acide gallique	Hydrogène Pi-Pi T- shaped	His 449	09/119	7,56
		Ser 209	12/119	10,08
		His 449	98/119	82,35

Après le docking, nous avons obtenu de nombreuses solutions, nous allons accepter et refuser les solutions selon des critères bien déterminées qui se manifeste dans l'énergie de liaison la plus faible correspondant à la conformation la plus stable ainsi l'insertion des molécules dans le site actif de l'enzyme.

Pour le docking de l'inhibiteur Thapsigargin sur la lipase de *Candida rugosa* :

Nous avons obtenu 1000 solutions, parmi lesquelles nous avons accepté 47 solutions représentant 100% de répétitions de la même interaction, l'acide aminé His 449 forme une liaison Pi-alkyle avec l'un des extrémités carboxylés de l'inhibiteur Thapsigargin. Selon ces résultats cette molécule est un inhibiteur compétitif.

Pour le docking de l'inhibiteur Thapsigargin sur la lipase de *Candida rugosa* :

Nous avons accepté 41 solutions avec un taux de répétitions égales à 100%, His 449 forme une liaison Pi-alkyle avec l'un des extrémités carboxylés de l'inhibiteur Thapsigargin.

Pour les autres molécules, nous avons remarqué le même type d'interactions avec un taux élevé de répétition, le type d'inhibition proposé est non compétitif mixte.

Les interactions déterminées pour toutes les molécules sont montrés dans les figures 4 à 9 avec légende détaillée.

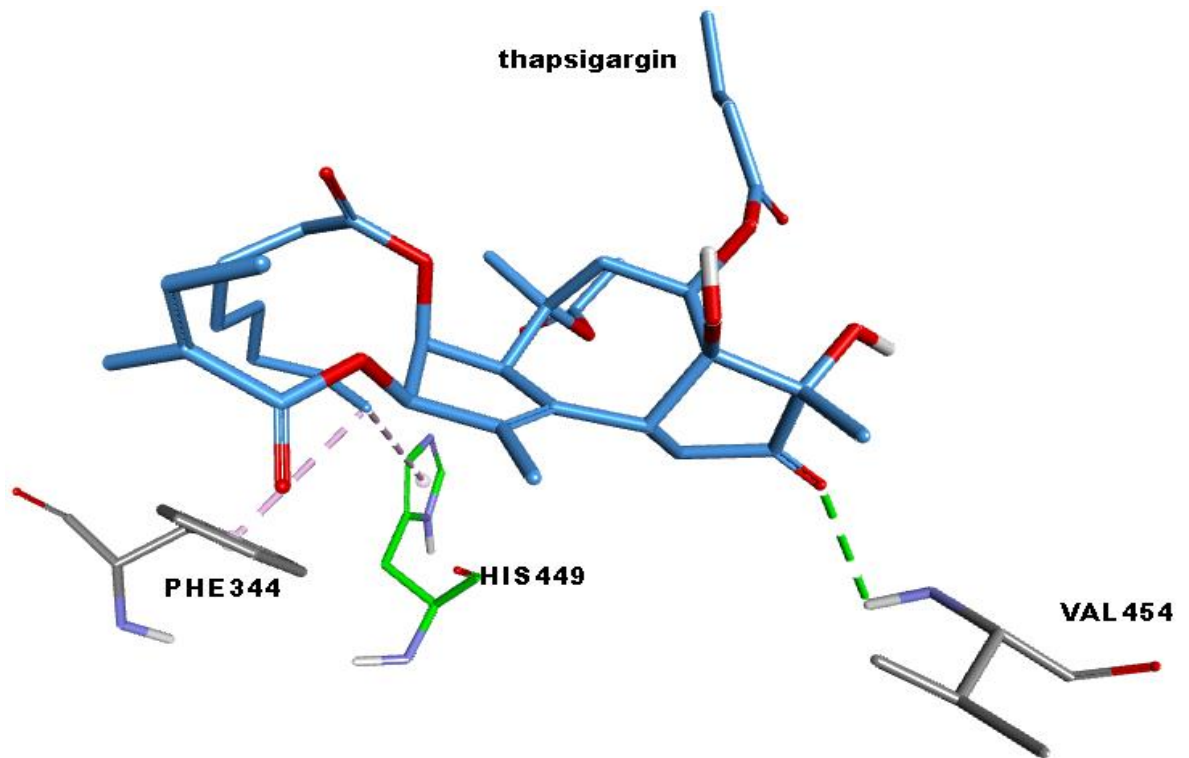


Figure 4 : Docking de Thapsigargin sur la lipase de *Candida rugosa*

Les acides aminés du site actif sont colorés en vert

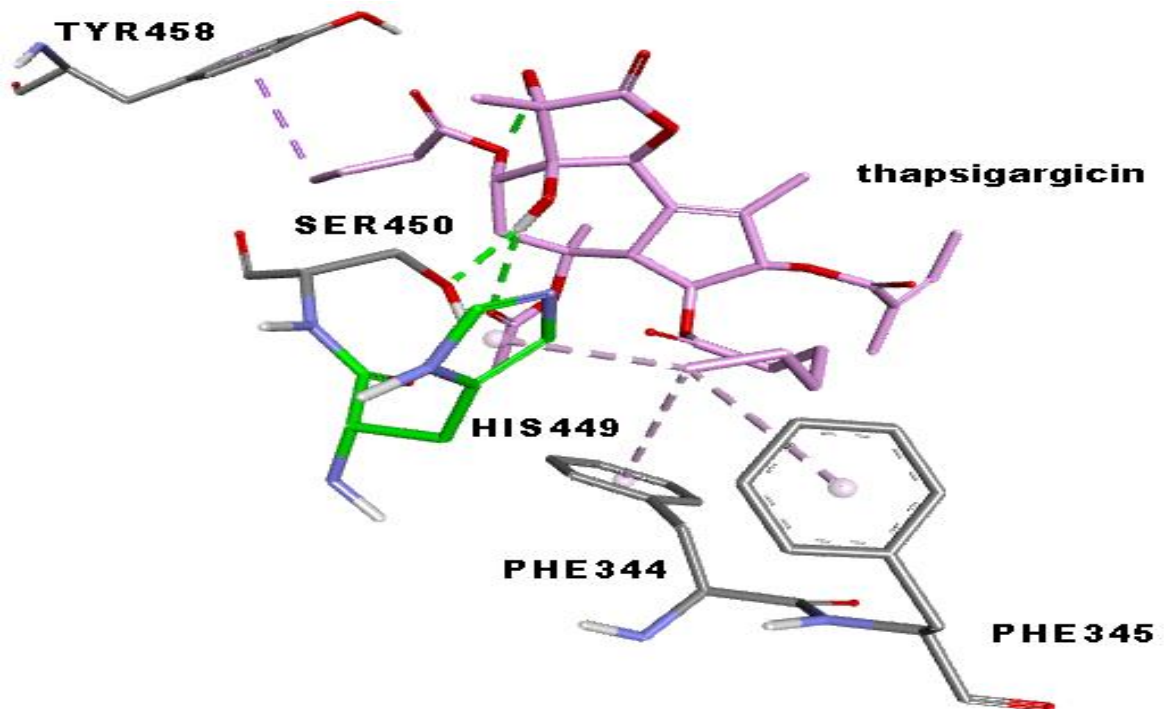


Figure 5 Docking de Thapsigargin sur la lipase de *Candida rugosa*

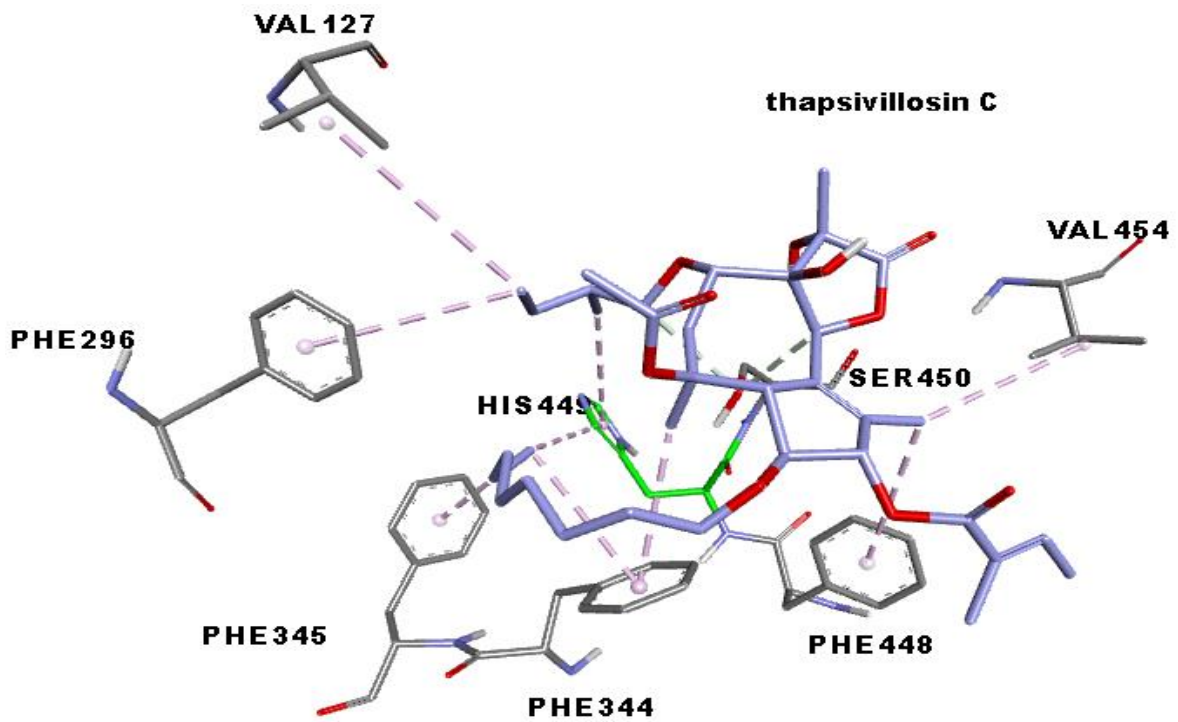


Figure 6 : Docking de Thapsivillosin C sur la lipase de *Candida rugosa*

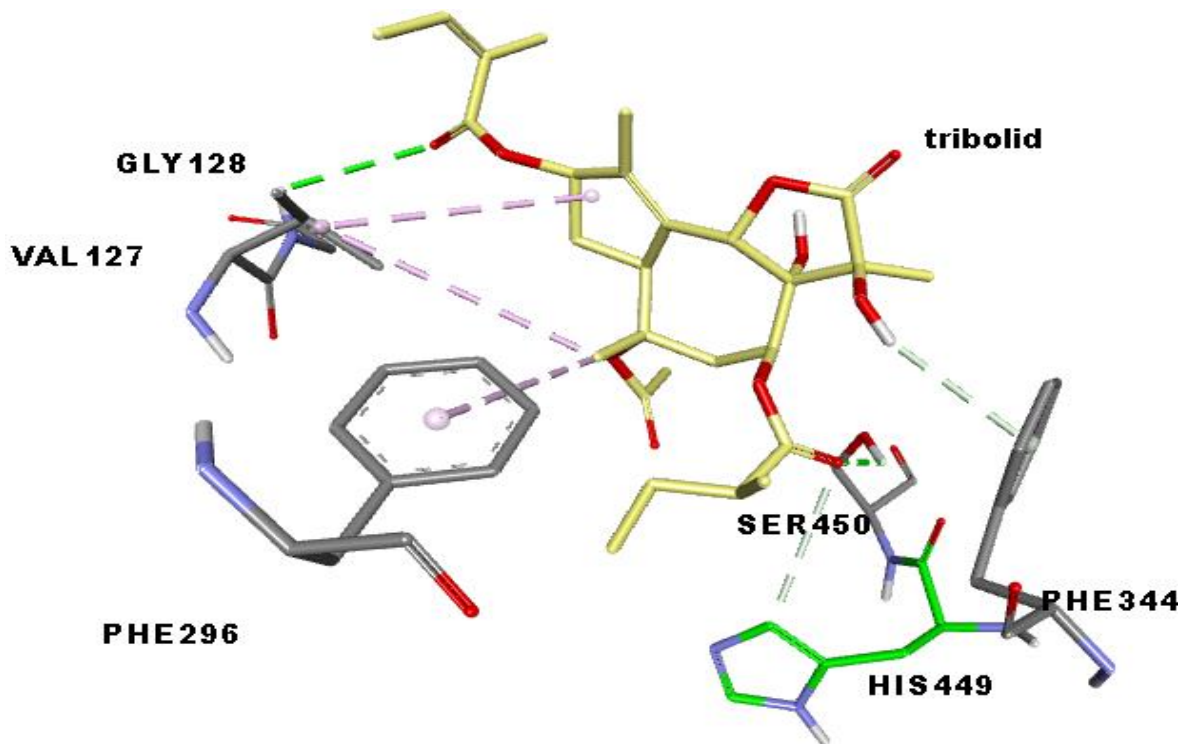


Figure 7 : Docking de Tribolid sur la lipase de *Candida rugosa*

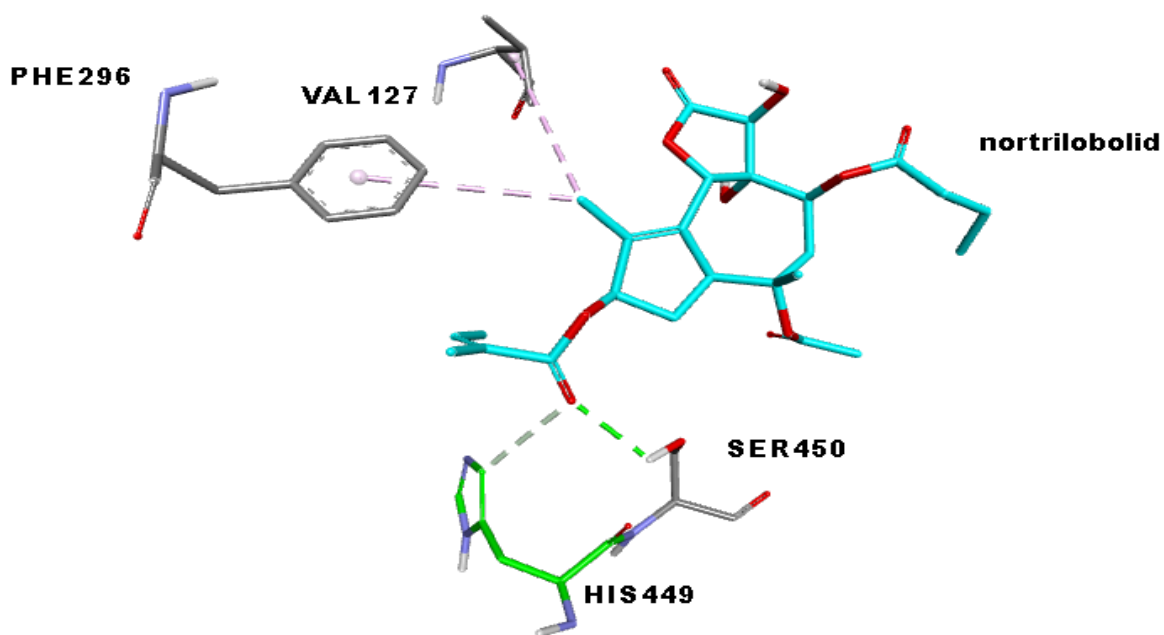


Figure 8 : Docking de Nortrilobolid sur la lipase de *Candida rugosa*

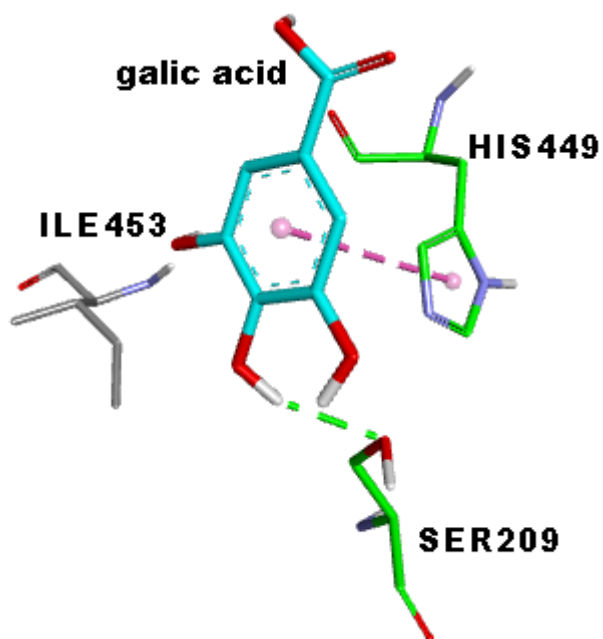


Figure 9 : Docking d'Acide gallique sur la lipase de *Candida rugosa*

CONCLUSION GENERALE

Depuis quelque temps, il a eu un intérêt croissant pour la nourriture, l'industrie pharmaceutique, et dans les soins préventifs pour la santé, pour le développement et l'évolution d'inhibiteurs d'enzymes naturelles dérivés des plantes médicinales. En Algérie, la liste des plantes qui rentrent précisément dans le cadre exhaustive est nombreuse d'entre elles sont considérés comme antidiabétique, anti-obésité ...

Dans le présent travail, nous avons étudié l'effet inhibiteur des extraits obtenus de solvant polaire (acétate d'éthyle) de polarité croissante. Les résultats obtenus présentent des effets inhibiteurs très importants. Après le docking moléculaire, le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de la lipase ont été déterminés.

L'ensemble de ce travail a permis donc de mieux connaître l'intérêt de l'étude des plantes médicinales de la région de Laghouat et les caractéristiques chimiques de certaines de leurs substances d'intérêt bioactif. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Elles se présentent principalement l'isolement des molécules inhibitrices de la lipase et les tester in vivo. Il reste encore beaucoup de plantes utiles locales qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de l'être afin de déterminer leurs potentialités dans les domaines étudiés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aissa; 2000. Benarous, K., Bombarda, I., Iriepa, I., Moraleda, I., Gaetan, H., Linani, A., Tahri, D., Sebaa M., Yousfi, M., 2015. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies, *Bioorganic Chemistry*, 62, Pages 1–7.

Benarous, K., Djeridane, A., Kameli, A., Yousfi, M., 2013. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxidant activities, *Current enzyme inhibition*, 9: 75-82.

Benarous, K., 2014. Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de *Peganum harmala*, *Inonotus hispidus*, *Marrubium vulgare*, *Ziziphus lotus* et *Achillea santolina* sur la lipase de *Candida rugosa*. Thèse de Doctorat. ENS-Kouba-Alger, p173.

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 Telidji, Laghouat, p120. Barros et al, 1994

Belfeki a H., Mejri b, M., Hassounac, M., 2016. Antioxidant and anti-lipases activities in vitro of *Mentha viridis* and *Eucalyptus globulus* extracts, *Industrial Crops and Products*, 89, Pages 514–521.

Canga, J. , Wanga, C., Kui Huoa , X. , Ge Tiana, X, Peng Suna, C., Denga , S., Jing Zhanga ,B., Li Zhanga ,H. ,Xin Liua ,B., Chi Ma,X. ,2017. Sesquiterpenes and triterpenoids from the rhizomes of *Alisma orientalis* and their pancreatic lipase inhibitory activities, 19, page 83–88.

Ercan. P., Nehir El, S., 2016. Inhibitory effects of *chickpea* and *Tribulus terrestris* on lipase, α -amylase and α -glucosidase, *Food Chemistry* (2016).

GHIBECHÉ, A., 2016. Étude de l'effet inhibiteur de quelques extraits et molécules sur la lipase de *Candida rugosa*, mémoire de Master, Université Amar Telidji, Laghouat.

Glisan, S., Grove, K., Yennawar, N., Lambert,J., 2016. Inhibition of Pancreatic Lipase by Black Tea Theaflavins: Comparative Enzymology and In silico Modeling Studies, *Food Chemistry* (2016).

Hee Jo,Y., Beom Kim,S., Liu,Q., Woo Lee, J., Yeon Hwang,B., Kyeong Lee ,M.,2015. Benzylated and prenylated flavonoids from the root barks of *Cudrania tricuspidata* with pancreatic lipase inhibitory activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25 page 3455–3457.

Jeong a ,J., Hee Jo a,Y. , Lee b ,K., Gil Do c ,S., Yeon Hwang a ,B., Kyeong Lee,M., 2014. Optimization of pancreatic lipase inhibition by *Cudrania tricuspidata* fruits using response surface methodology, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24 page 2329–2333.

Ji Yeon Jeong, Yang Hee Jo, Seon Beom Kim, Qing Liu, Jin Woo Lee, Eun Jin Mo, Ki Yong Lee, Bang Yeon Hwang, Mi Kyeong Lee,2015. Pancreatic lipase inhibitory constituents from *Morus Alba leaves* and optimization for extraction conditions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2015).

Liang a,L., Wang a,T., Sheng Cai a,Y., Fei He a ,W., P., Sun a , Fen Li a , Y., Huang a ,Q., Tagliatalata-Scafati d,O., Yao Wang a,H., Y.,Guo a,W.,2014. Brominated polyunsaturated lipids from the Chinese sponge *Xestospongia testudinaria* as a new class of pancreatic lipase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79 page 290–297.

LINANNI, A., 2011. Comparaison entre les isozymes de la lipase en utilisant l’outil informatique, mémoire de licence, Université Amar Telidji, Laghouat.

Makunga et al. 2003. May faraj et al, 2004.

luyen,N., Tram, l., Thi Hong Hanh, T. ,Thanh Binh, P., Hai Dang,N., Van Minh, C., Tien Dat,N.,2013. Inhibitors of α -glucosidase, α -amylase and lipase from *Chrysanthemum morifolium*, *Phytochemistry Letters*, 6 page 322–325.

Patil a, S., Patil a, M., Maheshwari b, V., Patil, R., 2015. In vitro lipase inhibitory effect and kinetic properties of di-terpenoid fraction from *Calotropis procera* (Aiton), *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

Pereiraa,M., Benatti Justinoa,A., Machado Martins , M., Gomes Peixotoa,L., Diniz Vilelaa,D., Souza Santos a, P., Lara Teixeirac, T., Vieira da Silvac,C., Ricardo Goulart a,L., Pivatto b,M., Salmen Espindolaa,F., 2017. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora Mart*, *Industrial Crops and Products*, page 324–329. Pandey et al. 1999.

Rogalska et al, 1993. Siannoau, 2006.

Tuan Ha ,M., Hung Tran a ,M., Jeong Ah c ,K., Jin Jo d ,K. , Kim d ,J., Dong Kim e ,W., Jae Cheon e , W., Hee Woo a , M., Ho Ryu d ,S., Sun Mina ,S., 2016. Potential pancreatic lipase inhibitory activity of phenolic constituents from the root bark of *Morus Alba L*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.

Worsztynowicz, P., Napierała, M., Białas,W., Grajek ,W., Olkowicz,M.,2014. Pancreatic - Amylase and Lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry *Aronia melanocarpa L*, Process Biochemistry.

Zhu T., Yun Ren a, X., Yuan a, L., Ming Liu, Y., Liang a, J., Liao,J., 2015. Fast identification of lipase inhibitors in oolong tea by using lipase functionalised Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coupled with UPLC–MS/MS, Food Chemistry, 173 page 521–526.