

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

THEME

**Etude *in silico* et *in vitro* de l'effet inhibiteur de
quelques médicaments anti-inflammatoires et
antihistaminiques sur l'alpha amylase humaine**

Présenté par : LAKAS Manal

SADEKI Israa

Devant le jury :

Président(e) : YOUSFI Mohamed (Pr).

Rapporteur : Dr BENAROUS Khadidja (MCA).

Co-Rapporteur : NIYA Samira (MCB).

Examineur (rice)s : Nebeg Halima (MAA).

Soutenu publiquement le : 13/06/2019.

Dédicace

*Tout d'abord, merci **ALLAH** de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout de mon rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire « YA Rahim » ...*

Du fond de mon cœur et avec un énorme plaisir je dédie mon travail :

*A ma chère maman **Fatiha** qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite. Merci Maman parce que tu m'as toujours encouragée même quand je voulais tout laisser tomber, merci parce que je savais que si quelque chose m'arrivait tu seras là à mes côtés, Merci d'être toujours avec moi dans mes jours difficiles sans se plaindre ...
... Merci pour tout maman*

*A mon père **Brahim**, écolier de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études et mes jambes lorsque j'allais si mal, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, qui m'a toujours tendu la main sans se soucier... quelle chance j'en ai d'être ta fille !!
... Merci Papa*

*Mes adorables sœurs **Ilham, Chaima et Roufaïda** que Dieu les protège
A mon source de fierté, mon grand frère **Mohammed** et le petit chouchou
Imade*

*A ma très chère tante **Messaouda** qui m'a encouragé depuis que j'étais petit, qui nous a quitté et j'espère que dieu l'accueille dans son vaste paradis, qui aurait été fier de moi.*

*A mon âme sœur celui que j'aime beaucoup et qui était avec moi dans le doux et l'amer : mon amie **Anfel***

*A toute la famille **BENARFA** et **LAKAS***

*A tous mes collègues et en particulier ma plus chère binôme **Israa***

...Manal

Dédicace

Je tiens en premier lieu à remercier le bon dieu de m'avoir donné la fois, la force et le courage d'affronter toutes les difficultés.

*Je dédie ce travail : À Qui j'offre mon éducation et ma réussite, source de sagesse et de tendresse, A la lumière de mes jours, ma très chère maman, mon paradis : **Renane Naima**. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*À Mon cher père **Abdelrahman**, celui qui m'a appris le respect et le sens du devoir*

*A mes frères **Mohamed, Ali, Khalaf, Iyad***

*A Ma sœur **Samah**, mes jours passent, voici les années Les souvenirs nous reviennent..... Et pose sa main sur la vieille blessure qui n'a pas encore révélé la blessure de ton départ de moi, La miséricorde de Dieu sur vous*

Je demande à Dieu de me réunir avec vous dans l'au-delà au paradis

*À ma chère sœur **Hadjer***

*Sans oublier mon neveu **Ahmed** et ma nièce **Samah***

*A toute ma famille **Sadeki et Renane***

*A mon cher binôme **Lakas Manal** qui m'a partagé les difficultés de ce travail*

*A mes chers amis **Laggoun Imane, Khenifer Zineb, Mahtal Yasmine**
et **Amrani Rahma***

...Israa

Remerciements

*En premier lieu, louange à notre **DIEU** le tout puissant de nous avoir aidé à terminer ce modeste travail.*

*Nous exprimons nos remerciements à notre promotrice docteur **BENAROUS Khadidja** pour la confiance et les conseils qu'elle nous a accordés tout au long de ce travail. Nous n'oublierons jamais la disponibilité, la gentillesse, les encouragements et les qualités scientifiques exceptionnelles qu'elle a mis au service de nos apprentissages tout au long de notre collaboration.*

Merci également pour votre encadrement.

*Nos vifs et sincères remerciements à notre co-promoteur **Dr Nia Samira** pour son soutien.*

*Nous remercions également tous les membres du jury : Professeur **YOUSFI Mohamed** et M^{me} **NEBEG Halima***

D'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et Merci de l'attention que vous avez accordé à ce mémoire.

*Nous remercions également **M. Abderrahmane LINANI** pour son aide et sa disponibilité au niveau du CTS*

*Nous adressons un remerciement particulier à monsieur le responsable du laboratoire de biologie de **l'Université Amar Telidji** pour son aide, sans oublier le responsable du CTS de **l'hôpital Hmida Benadjila**.*

Nous présentons nos meilleurs remerciements aux enseignants de notre département qui nous ont aidés tout au long de notre cursus universitaire.

Notre derniers remerciements, vont à tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à l'aboutissement de ce travail

RÉSUMÉ

Notre travail s'inscrit dans le courant de la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'alpha amylase salivaire humaine cible thérapeutique validée pour le traitement des diabètes, pancréatite et obésité. À partir de ces approches, nous avons testé l'inhibition de l'alpha amylase salivaire humaine par quelques médicaments antihistaminiques et anti-inflammatoires. Nous avons évalué l'activité inhibitrice de nos médicaments en utilisant une nouvelle méthode de détection d'inhibition de l'alpha amylase humaine salivaire. Cette méthode a prouvé son efficacité, sa rapidité et sa sensibilité. Les résultats ont montré que Bétaméthasone présente une inhibition ($IC_{50} = 709 \pm 7 \mu\text{g/ml}$) nettement supérieure à celle de la Loratadine ($1033,1 \pm 1,20 \mu\text{g/ml}$), mais nettement inférieure à celle de l'Acarbose ($5,7 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats sont accompagnés par l'étude bio-informatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif des deux alphas amylases humaines (salivaire et pancréatique). Le docking moléculaire a donné les mêmes résultats que les études *in vitro* pour les molécules étudiées (Bétaméthasone, Loratadine).

Les mots clés : α -amylase salivaire humaine, α -amylase pancréatique, inhibition, anti-histaminiques, anti-inflammatoires, acarbose, Docking moléculaire.

Liste des abréviations

- PG** : Prostaglandine
- LT** : Leucotriène
- PLA2** : phospholipases A2
- Cox** : cyclo oxygénase
- AINS** : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AIS** : Les anti-inflammatoires stéroïdiens
- SNC** : système nerveux central
- DFG** : débit de filtration glomérulaire
- TXA2** : thromboxane A2
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- CNPG₃** : l'alpha maltorioside 2-chloro-4- nitrophényle
- CNP** : 2-chloro-4- nitrophénol
- CNPG₂** : altrioside-2- chloro-4- nitrophényle
- G₃** : maltriose
- G** : glucose
- IC₅₀** : la constante inhibitrice à 50%
- I %** : le pourcentage d'inhibition
- PDB** : banque de données de protéine

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : La physiopathologie des deux types de diabète (Type I et Type II)..... | 5 |
| Figure 2 : Schéma présente la relation entre les copies des gènes AMY1 et l'obésité | 8 |
| Figure 3 : Structure tridimensionnelle de l' α – amylase pancréatique humaine. | 10 |
| Figure 4 : Mécanisme catalytique de l' α -amylase..... | 12 |
| Figure 5 : Schéma récapitulatif de la synthèse des médiateurs chimiques de l'inflammation | 13 |
| Figure 6 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens..... | 13 |
| Figure 7 : Structures 2D des médicaments anti-inflammatoires utilisés (<i>ChemSpider</i>)..... | 17 |
| Figure 8 : Structures 2D des médicaments antihistaminiques utilisés (<i>ChemSpider</i>)..... | 18 |
| Figure 9 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse de l' α -maltotriose-2-chloro-4-nitrophényle (CNP3) par l' α - amylase humaine | 19 |
| Figure 10 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur de Bétaméthasone sur l'alpha-amylase salivaire humaine..... | 24 |
| Figure 11 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur de Loratadine sur l'alpha-amylase salivaire humaine | 24 |
| Figure 12 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur de l'Acarbose sur l'alpha-amylase salivaire humaine (contrôle positif)..... | 25 |
| Figure 13 : Alignement des acides aminés des deux amylases humaines : amylase salivaire et amylase pancréatique..... | 28 |
| Figure 14 : Représentation de la meilleure pose de docking de Bétaméthasone avec l'alpha amylase salivaire avec les acides aminés du site actif..... | 32 |
| Figure 15 : Représentation de la meilleure pose de docking de Loratadine avec l'alpha amylase salivaire avec les acides aminés du site actif..... | 32 |
| Figure 16 : Représentation des interactions de l'Acarbose avec l'alpha amylase salivaire avec les acides aminés du site actif obtenue de la structure cristalline (PDB ID : 3DHP). | 33 |
| Figure 17 : Représentation de la meilleure pose de docking de Bétaméthasone avec l'alpha amylase pancréatique avec les acides aminés du site actif coloré en vert..... | 33 |
| Figure 18 : Représentation de la meilleure pose de docking de Loratadine avec l'alpha amylase pancréatique avec les acides aminés du site actif | 34 |
| Figure 19 : Représentation des interactions de l'Acarbose avec l'alpha amylase pancréatique avec les acides aminés du site actif obtenue de la structure cristalline (PDB ID : 1B2Y)..... | 34 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : La différence entre les deux iso-enzymes de l' α -amylase | 9 |
| Tableau 2 : Pourcentages d'inhibition des médicaments utilisés..... | 23 |
| Tableau 3 : Evaluation des valeurs des IC_{50} de Loratadine, Bétamétasone et de l'Acarbose | 25 |
| Tableau 4 : Les valeurs IC_{50} des molécules pures..... | 27 |
| Tableau 5 : Résumé des études d'amarrage moléculaire des inhibiteurs (médicaments) dirigés contre le site actif de l'alpha amylase. | 36 |

Table des matières

| | |
|--|-------------|
| Dédicace | II |
| Dédicace | III |
| Remerciements | IV |
| <i>Liste des abréviations</i> | VI |
| <i>Liste des figures</i> | VII |
| <i>Liste des tableaux</i> | VIII |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 1 |
| RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES | 4 |
| I. Les maladies causées par l'alpha amylase | 5 |
| 1. Diabète | 5 |
| 1.1 Définition | 5 |
| 1.2 Les types de diabète | 5 |
| 1.2.1 Le diabète de type 1 | 6 |
| 1.2.2 Le diabète de type 2 | 6 |
| 1.2.3 Le diabète gestationnel..... | 6 |
| 2. Pancréatite | 7 |
| 2.1 Définition | 7 |
| 2.2 Les types de pancréatite | 7 |
| 2.2.1 Pancréatite aiguë | 7 |
| 2.2.2 Pancréatite chronique | 7 |
| 3. L'obésité | 8 |

| | |
|--|-----------|
| II. Alpha amylase..... | 8 |
| 1. Définition | 8 |
| 2. Nomenclature de l' α - amylase..... | 9 |
| 3. Les iso-enzymes de l' α -amylase | 9 |
| 4. Structure de l' α -amylase | 10 |
| 5. Mode d'action | 11 |
| 6. Mécanisme d'action | 11 |
| III. L'inflammation | 12 |
| 1. Les anti-inflammatoires..... | 13 |
| 1.1 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) | 14 |
| 1.2 Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) | 15 |
| IV. Allergie | 15 |
| 1. Antihistaminiques..... | 15 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES | 16 |
| 1. Matériels biologique..... | 17 |
| 2. Matériels chimiques | 17 |
| 3. Etude <i>in vitro</i>..... | 18 |
| 3.1. Test de l'activité de l' α - amylase | 18 |
| 3.2. Principe du réactif du dosage | 18 |
| 3.3. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysé par l' α -amylase | 19 |
| 3.4. Analyse statistique..... | 20 |
| 4. Etude <i>in silico</i>..... | 20 |
| 4.1. Alignement des séquences | 20 |
| 4.2. Docking moléculaire | 20 |
| Résultats et discussion | 22 |
| 1. Résultats <i>in vitro</i> | 23 |
| 1.1 L'activité inhibitrice de la réaction catalysée par l' α -amylase..... | 23 |
| 2. Résultats <i>in silico</i> | 27 |
| 2.1 Composition et alignement des séquences des acides aminés des deux amylases..... | 27 |
| 2.2 Docking moléculaire | 28 |

| | |
|--|----|
| <i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i> | 38 |
| <i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i> | 40 |
| RÉSUMÉ..... | 46 |

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Comme la majorité des organes, le pancréas peut être atteint par différentes pathologies. La plus commune d'entre elles est le diabète qui se caractérise par un défaut dans la régulation de la glycémie. Ceci peut être provoqué par un déficit en insuline (diabète de type 1) ou une diminution de la sensibilité à l'insuline (diabète de type 2). Le pancréas peut aussi être atteint par une inflammation, appelée alors pancréatite, qui peut être aiguë ou chronique (**Laverdet, 2013**).

Une approche thérapeutique efficace pour la gestion de ces maladies consiste à réduire l'hyperglycémie en retardant et en réduisant la digestion des glucides ingérés. L'inhibition des enzymes dégradant les glucides peut réduire de manière significative l'augmentation postprandiale du glucose dans le sang, l'une de ces enzymes est l' α -amylase humaine (**Ponnusamy et al., 2015**).

L'alpha-amylase est largement distribuée dans les plantes, les tissus de mammifères et les microorganismes (**Haq et al., 2003 et Srinivasa Rao et al., 2004**). Chez l'être humain, l' α -amylase est présente sous deux isoformes selon qu'elle est sécrétée par le pancréas, amylase pancréatique, ou par la glande parotide, amylase salivaire. 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 (**Keating et al., 1998**).

Les inhibiteurs de l' α -amylase ont un rôle thérapeutique et constituent un groupe de médicaments introduit dans la gestion du diabète et d'autres maladies. Parmi les inhibiteurs d' α -amylase actuellement utilisés en clinique « l'acarbose », qui empêche la digestion des glucides et permet un contrôle glycémique à court terme. L'inconvénient de cet inhibiteur est la non-spécificité dans le ciblage de différentes glycosidases ce qui aboutit également à l'apparition des effets secondaires (flatulence, déglutitions difficile, augmentation des transaminases... etc), qui limitent leur utilisation en tant que médicament thérapeutique (**Rahimzadeh et al., 2014**).

De cette approche, nous avons pensé d'explorer des anti-inflammatoires et antihistaminiques connus pour une activité bien déterminée et de savoir s'ils possèdent une activité inhibitrice sur l'alpha amylase dans le but d'explorer des remèdes efficaces avec moins d'effets indésirables.

Dans notre étude, le choix des médicaments à étudier est effectué selon leurs structures chimiques, nous avons ciblés la présence des groupements fonctionnels comme hydroxyles, amines et soufres. Le choix s'est fixé sur des médicaments antihistaminiques et anti-inflammatoires.

Les antihistaminiques sont des médicaments généralement administrés dans le cadre de traitement allergiques. Il en existe cependant deux types : les antihistaminiques H1 et H2. Alors que les anti-inflammatoires considérés comme des médicaments symptomatiques, qui n'agissent pas sur la cause. Ils sont indiqués quand l'inflammation, processus normal de défense contre les agressions, devient gênante, notamment à cause de la douleur **(Ghibeche, 2016)**.

L'objectif majeur de cette étude est de mettre en évidence pour la première fois *in vitro* et *in silico*, l'effet inhibiteur de quelques médicaments antihistaminiques et anti-inflammatoires sur l'alpha amylase salivaire humaine afin d'atteindre le but de trouver un traitement médical des syndromes métaboliques tels que le diabète de type 2, l'obésité et la pancréatite et de tester l'efficacité de la nouvelle méthode utilisée. Cette étude est achevée en utilisant une nouvelle méthode de détection d'inhibition, dont nous voulons prouver son efficacité, sa rapidité et sa sensibilité contre les différentes méthodes classiques déjà appliquées comme DNS.

Dans ce cadre, nous allons définir une stratégie de recherche commencera par une introduction générale. Dans la deuxième partie, nous avons décrit tous le matériel et les méthodes utilisés ainsi que l'outil bioinformatique et nous avons étudié le pouvoir inhibiteur de quelques médicaments contre l'amylase salivaire humaine. Ensuite, nous procédons à l'étude *in silico* de la fixation de l'inhibiteur dans le site actif des deux α -amylases humaines (salivaire et pancréatique), par le docking moléculaire de ces molécules pures, suivi des résultats et leur discussion et se terminera par une conclusion générale et perspectives.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Les maladies liées à l'alpha amylase

1. Diabète

1.1 Définition

Le diabète, c'est une maladie chronique due à une déficience, soit de la sécrétion, soit de l'action de l'insuline, ou des deux. Ce défaut provoque une augmentation de la glycémie (concentration de glucose dans le sang) qui conduit à son tour à des lésions affectant plusieurs appareils ou systèmes, en particulier les vaisseaux et les nerfs» (OMS, aide-mémoire no 139).

L'insuline est une hormone produite par le pancréas, indispensable à la pénétration du glucose sanguin dans les cellules. Lorsqu'elle fait défaut, le taux de sucre augmente dans le sang, or l'organisme est très sensible à ces variations : la chronicité de l'hyperglycémie est responsable de complications à long terme touchant de nombreux organes notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux (Dubourg, 2014).

1.2 Les types de diabète

Il existe deux principaux types de diabète : le diabète de type 1 et le diabète de type 2 (Zerrouki, 2014), l'autres cas de diabète est le diabète gestationnel défini comme une intolérance au glucose débutante ou découverte la première fois pendant la grossesse. (Dubourg, 2014).

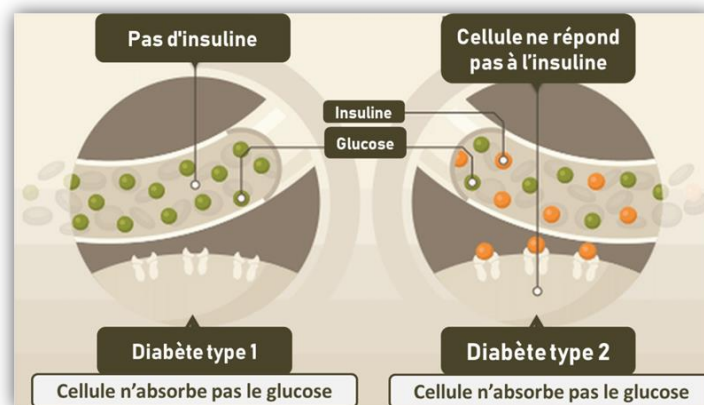


Figure 1 : La physiopathologie des deux types de diabètes (Type I et Type II) (Dubourg, 2014)

1.2.1 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune où le système immunitaire attaque les cellules du pancréas, en les détruisant ou en les détériorant. Il correspond à une production insuffisante, voire inexistante d'insuline par le corps, ce qui entraîne une carence insulinique qui conduit à son tour à l'hyperglycémie. L'étiologie exacte de cette maladie reste inconnue, mais une susceptibilité génétique combinée à des facteurs déclencheurs environnementaux, tels qu'une infection virale, des toxines ou certains facteurs alimentaires sont impliqués. Comme les cellules du pancréas qui sécrètent normalement l'insuline sont détruites, une personne atteinte de diabète de type 1 devra recevoir de l'insuline toute sa vie, grâce à des injections par stylo ou une pompe à insuline (Ribot, 2015).

1.2.2 Le diabète de type 2

Le diabète de Type 2 ou diabète non insulino-dépendant est la forme la plus courante de la maladie, se développe en général chez les adultes d'âge moyen ou les personnes âgées pouvant déjà souffrir d'un syndrome métabolique (obésité, dyslipidémie, hypertension...). Dans cette forme de diabète, l'hyperglycémie est le résultat d'une résistance accrue des tissus périphériques à l'action de l'insuline, on parle alors d'insulino-résistance, et une carence de sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. Son apparition est lente : il peut évoluer avec un degré d'hyperglycémie suffisant pour engendrer des atteintes organiques et fonctionnelles dans de nombreux tissus mais sans symptôme clinique et donc sans diagnostic pendant plusieurs années (Ribot, 2015).

Parmi les traitements médicaux des diabétiques type II, les inhibiteurs de l'alpha-glucosidases notamment l'acarbose, un pseudo tétra saccharide qui exerce entièrement son activité anti-hyperglycémiant grâce à l'inhibition des alpha-glucosidases digestives. Il en résulte une diminution de l'augmentation de la glycémie postprandiale, avec une moindre réponse insulinique (Creutzfeldt, 1982).

1.2.3 Le diabète gestationnel

Ce diabète apparaît lors d'une grossesse d'une manière temporaire et disparaît après l'accouchement. Il se développe une intolérance au glucose due à une sécrétion insuffisante d'insuline dans le cadre d'une résistance à l'action de celle-ci augmentée durant la grossesse (Grissa, 2010).

2. Pancréatite

2.1 Définition

La pancréatite est une inflammation du pancréas causée par un certain nombre de facteurs, notamment l'obstruction du canal pancréatique, l'alcoolisme et la mutation du gène trypsinogène cationique qui aboutit à la destruction progressive de pancréas. Le pancréas est une glande située derrière l'estomac, près du foie, qui produit des enzymes nécessaires à la digestion et des hormones qui aident à la régulation du sucre (glucose) dans le sang. (Klein *et al.*, 2002).

2.2 Types de pancréatite

2.2.1 Pancréatite aigue

La pancréatite aiguë est un processus inflammatoire aigu du pancréas, résultant d'une activation des pro-enzymes pancréatiques qui aboutit à une auto digestion glandulaire avec libération d'enzymes protéolytiques et lipolytiques dans la loge et les canaux pancréatique (Buscaïl et Escourroi, 2009). Sur le plan clinique, elle va se définir par une douleur abdominale en général de localisation épigastrique associée à des nausées et des vomissements. Sur le plan biologique, les trois enzymes sécrétées par les cellules acineuses pancréatiques (amylase, lipase et le pro-enzyme trypsinogène) ont été testées en tant que marqueurs biochimiques de la pancréatite aiguë (une élévation du taux sanguin de l'amylase ou de la lipase plus de trois fois la normale) (Benmeziane et Sekfali, 2017).

2.2.2 Pancréatite chronique

La pancréatite chronique se définit comme une inflammation chronique du pancréas aboutissant à une fibrose progressive du parenchyme pancréatique entraînant une destruction de la glande pancréatique. Ce processus affecte d'abord le tissu exocrine, responsable de la sécrétion enzymatique pancréatique, puis le tissu endocrine, responsable de la sécrétion d'hormones destinées à la glycorégulation. Au stade initial, la maladie est caractérisée par des poussées de pancréatite aiguë, et par des douleurs récidivantes et chroniques qui représentent la principale traduction clinique de la maladie (CDU- HGE, 2015).

3. L'obésité

L'obésité est une maladie chronique dans le monde entier principalement défini comme un état d'excès de graisse. Il survient lorsque nous avons un déséquilibre entre l'apport énergétique et l'énergie dépenses, c'est-à-dire quand une personne mange plus que le corps se dilate, Outre l'alimentation, l'activité physique et les prédispositions génétiques, peuvent évidemment jouer un grand rôle dans cet excès de poids. (**Benarous *et al.*, 2018**).

Pour ces derniers, ils se sont penchés sur le gène AMY1 de l'amylase salivaire qui présent de manière répétée chez l'espèce humaine et pouvant varier de une à vingt copies en fonction des individus. C'est ce gène qui détermine le taux d'amylase présent dans la salive. il aurait un impact important sur les risques de devenir obèse (**Jalinière., 2014**). Selon une étude internationale, plus le nombre de copies de gènes est faible et plus les risques de devenir obèse sont importants (**Jalinière., 2014**).

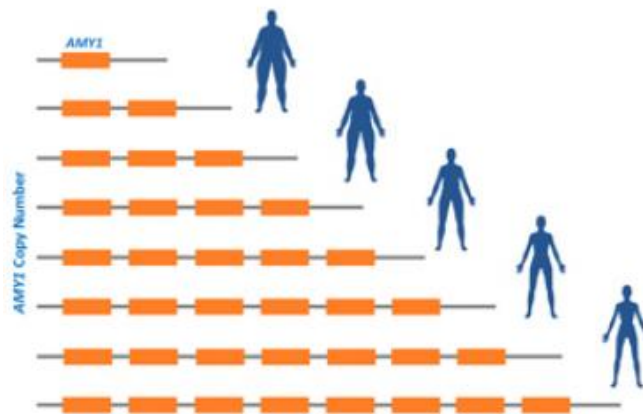


Figure 2 : Schéma présente la relation entre les copies des gènes AMY1 et l'obésité (**Jalinière., 2014**)

II. Alpha amylase

1. Définition

L'alpha amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie (**Janecek, 1994**). Elle appartient à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est de catalyser l'hydrolyse de l'amidon et du glycogène (**Scriban, 1993 ; Wallach, 1997**). Elle hydrolyse de façon aléatoire les liaisons alpha (1-4) D-glucose et conduit à la formation d'oligosaccharides linaires et dextrines. (**Janacek, 1994**).

2. Nomenclature de l' α - amylase

- **Nom codifié** : E.C.3.2.1
- **Nom commun** : α -amylase.
- **Nom systématique** : 1,4 - α - D-glucane-4-glucano hydrolase.
- **D'autres nom (s)**: glycogénase, endoamylase, Taka-amylase A, maxilase.
(Schamburg et Slzmann, 1991 et Dauter *et al.*, 1999)

3. Les iso-enzymes de l' α -amylase

Chez les mammifères, l' α -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Elles sont très homologues en termes de séquence primaire et ne diffèrent que par 15 résidus d'acides aminés sur 496, bien que certains se trouvent dans le site actif (Gaspar, 2015).

Tableau 1 : La différence entre les deux iso-enzymes de l' α -amylase

| | <i>α-amylase salivaire</i> | <i>α-amylase pancréatique</i> | <i>Références</i> |
|--------------------------|--|---|-----------------------|
| Organe producteur | Glandes salivaire | Pancréas | |
| Sécrétion | Salive | Suc pancréatique | |
| Lieu d'action | Cavité orale | Intestin grêle | |
| Substrat | amidon | Amidon, dextrines | Demers, 2010 |
| Produits obtenus | Disaccharides,dextrines | Maltose, Maltriose,dextrines | |
| Code génétique | AMY1A | AMY2A | DrugBank |
| Poids moléculaire | 57767 Da | 57707 Da | |
| pH optimum | pH= 7 | PH= 8 | Panchal, 1990) |
| T° optimal (C°) | 40 | 37 | |

4. Structure de l' α -amylase

L' α -amylase a une structure tridimensionnelle capable de se lier au substrat et assure la rupture des liaisons glycosidiques par l'action des groupes catalytiques hautement spécifiques (Mouas, 2016). Elle est composée de 496 acides aminés dans une seule chaîne polypeptidique (Gary *et al.*, 1995).

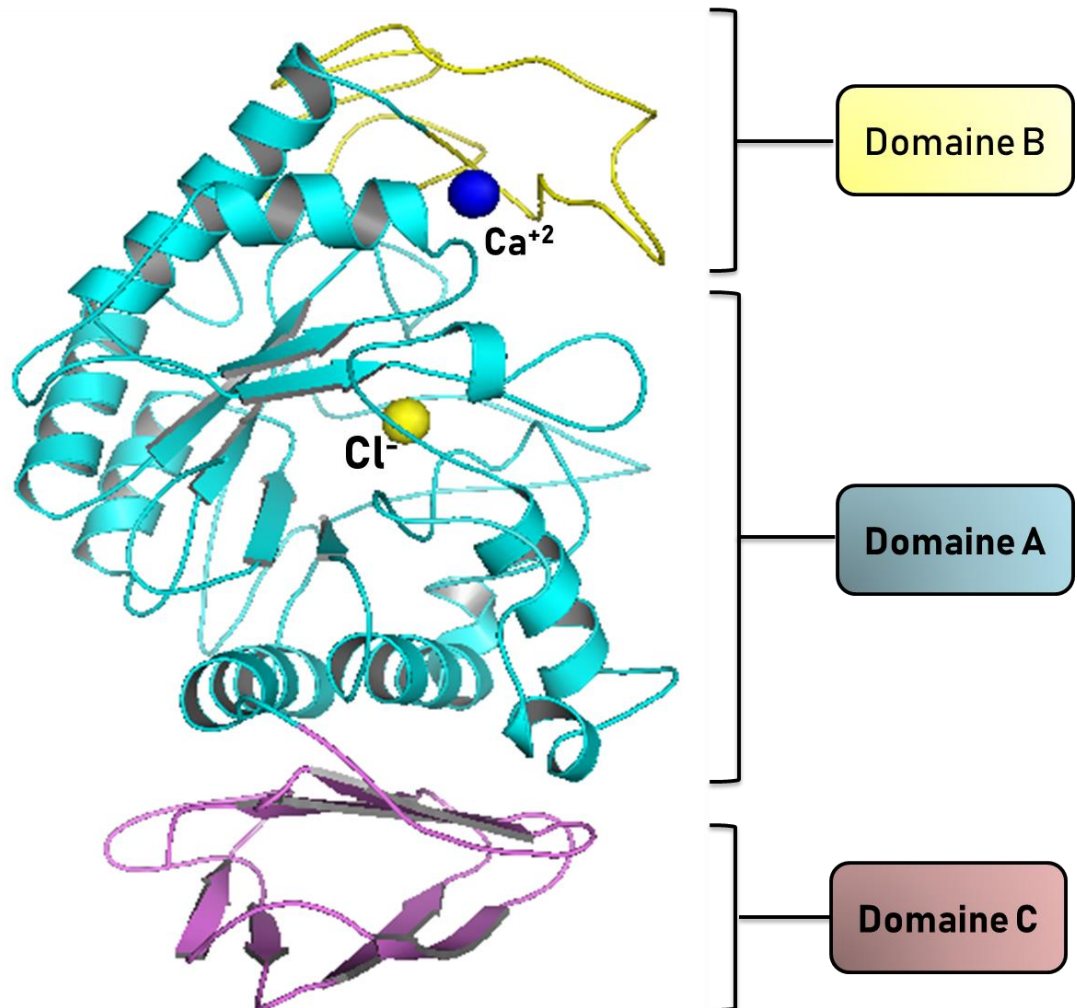


Figure 3. Structure tridimensionnelle de l' α – amylase pancréatique humaine réalisée par logiciel Pymol.

Les trois domaines, ainsi que les ions de calcium et de chlorure sont représentés : domaine A de couleur bleu cyan (site active des résidus Asp 197, Glu 233 et Asp300), domaine B en jaune (site de liaison du calcium) et domaine C en violet (structure β -antiparallèle associé de manière lâche aux domaines A et B). L'ion de calcium (sphère bleue) et l'ion de chlorure (sphère jaune).

L'α-amylase humaine composée de trois domaines structurels, dont le plus long est le domaine A qui renferment le site actif et le site de fixation du substrat. Il contient les résidus de site actif importants comprenant deux résidus d'Aspartate (Asp197, Asp300) et un résidu de glutamate (Glu 233). Le domaine A contient également un ion Cl⁻ lié (**Mobiniet, 2012**). Le domaine B borde la région du site actif et contient un ion Ca⁺² lié qui sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés d'enzyme. Le domaine C au niveau de la région N-terminale de la molécule semble peu susceptible de jouer un rôle direct dans le mécanisme catalytique. Il est moins fermement associé aux domaines A et B (**Brayer et Withers., 1995 et Gregor et al., 2001**).

5. Mode d'action

En générale, l'α-amylase peut agir par différents modes d'action. Selon les conditions (température, pH, taille et structure du substrat) (**Mazur et Nakatani., 1993 et Nielson et al., 2001**).

- **Attaque aléatoire ou au hasard** : hydrolyse aléatoire les liaisons glucosidiques (1-4), libérant deux fragments qui seront séparément attaqués. (**Scriban, 1999**).
- **Attaque préférée** : l'α-amylase montre une préférence pour certaines liaisons glucosidiques dans le substrat (**Berry et Paterson, 1990**).
- **Attaque multiple ou répétitive** : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat et l'enzyme hydrolyse les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (**Kandra et al., 1997**).

6. Mécanisme d'action

L'activité catalytique de l'α-amylase implique la participation des trois acides aminés du site actif (figure 4) Asp 197 (nucléophile catalytique), Glu 233 (donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp 300 (l'aide de catalyse).

En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes (Figure 4) :

- Protonation de l'oxygène glucosidique par le proton donneur de Glu 233 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par Asp 197 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat.
- Activation d'une molécule d'eau, vrai semblablement par le maintien du Glu 233 déprotonné.

- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'Asp 197 et le C1 de résidu du sucre en position 1 (Davies *et al.*, 1999 ; Nielson *et al.*, 2001)

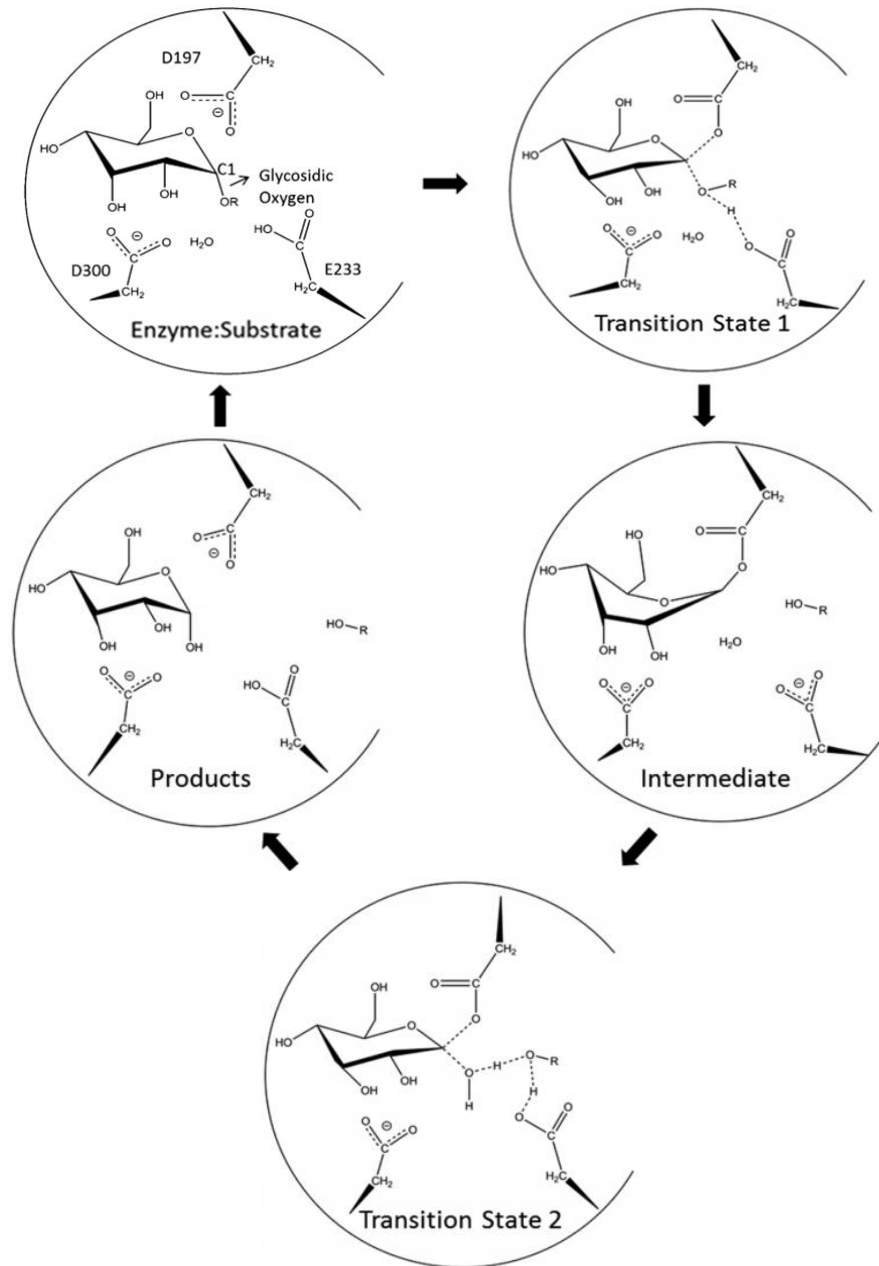


Figure 4: Mécanisme catalytique de l' α -amylase (Gaspar P. Pinto *et al.*, 2015)

III. L'inflammation

L'inflammation est un processus biologique de défense et de réparation tissulaire provoqués par des traumatismes physiques, produits chimiques nocifs ou agents microbiens (Gy *et al.*, 2008). Cependant, cette réaction se manifeste par des symptômes

plus ou moins pénibles comme : rougeur, chaleur, douleur et gonflement. Ces manifestations peuvent inciter le praticien à prescrire un anti-inflammatoire. La finalité d'un processus inflammatoire est triple : détruire l'agent agresseur, détruire les tissus lésés et réparer les dégâts. Sa mise en œuvre est le résultat d'une intervention coordonnée de cellules effectrices (polynucléaires, macrophages, lymphocytes cytotoxiques) et de substances solubles (médiateurs chimiques), sécrétées et chargées de téléguider les cellules sur le site de l'agression (**Muster, 2005**).

Les médiateurs chimiques les plus importants de la réaction inflammatoire sont : Les Prostaglandines (PG) et les Leucotriènes (LT). Ce sont des médiateurs lipidiques synthétisés à partir de l'Acide Arachidonique libéré des phospholipides membranaires sous l'action de la Phospholipase A2 (PLA2) (Figure 5). Ces médiateurs clés peuvent activer des cascades de signaux de transduction (**Bagora, 2015**). La prostaglandine est synthétisée par l'action des deux types de cyclo-oxygénases (COX1 et COX2) (**Grandin, 2013**).

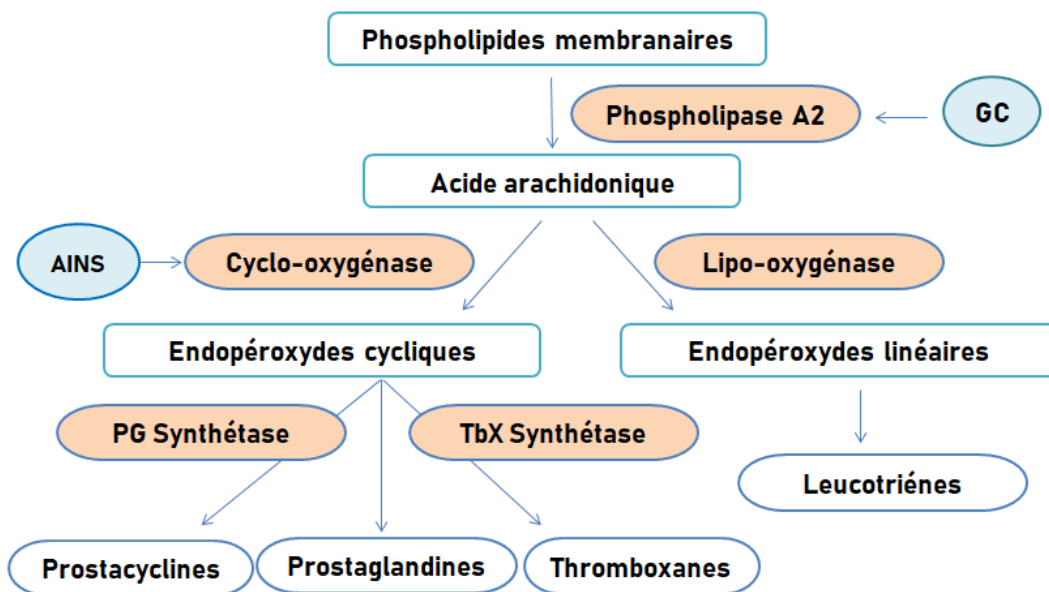


Figure 5 : Schéma récapitulatif de la synthèse des médiateurs chimiques de l'inflammation (**Grandin, 2013**)

1. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments symptomatiques, qui n'agissent pas sur la cause de l'inflammation. Ils appartiennent à des classes chimiques différentes les unes des autres et sont souvent doués en outre d'une activité antipyrétique et antalgique

périphérique (Muster, 2005). Ils sont répartis en deux groupes : les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les anti-inflammatoires stéroïdiens.

1.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont des inhibiteurs réversibles de l'activité des COX1 et/ou 2, ils ont des propriétés pharmacologiques différentes, notamment une action anti-inflammatoire par inhibition de la COX2, action antalgique, antipyrétique et anti-agrégante plaquettaire pour certains (Grandian, 2013).

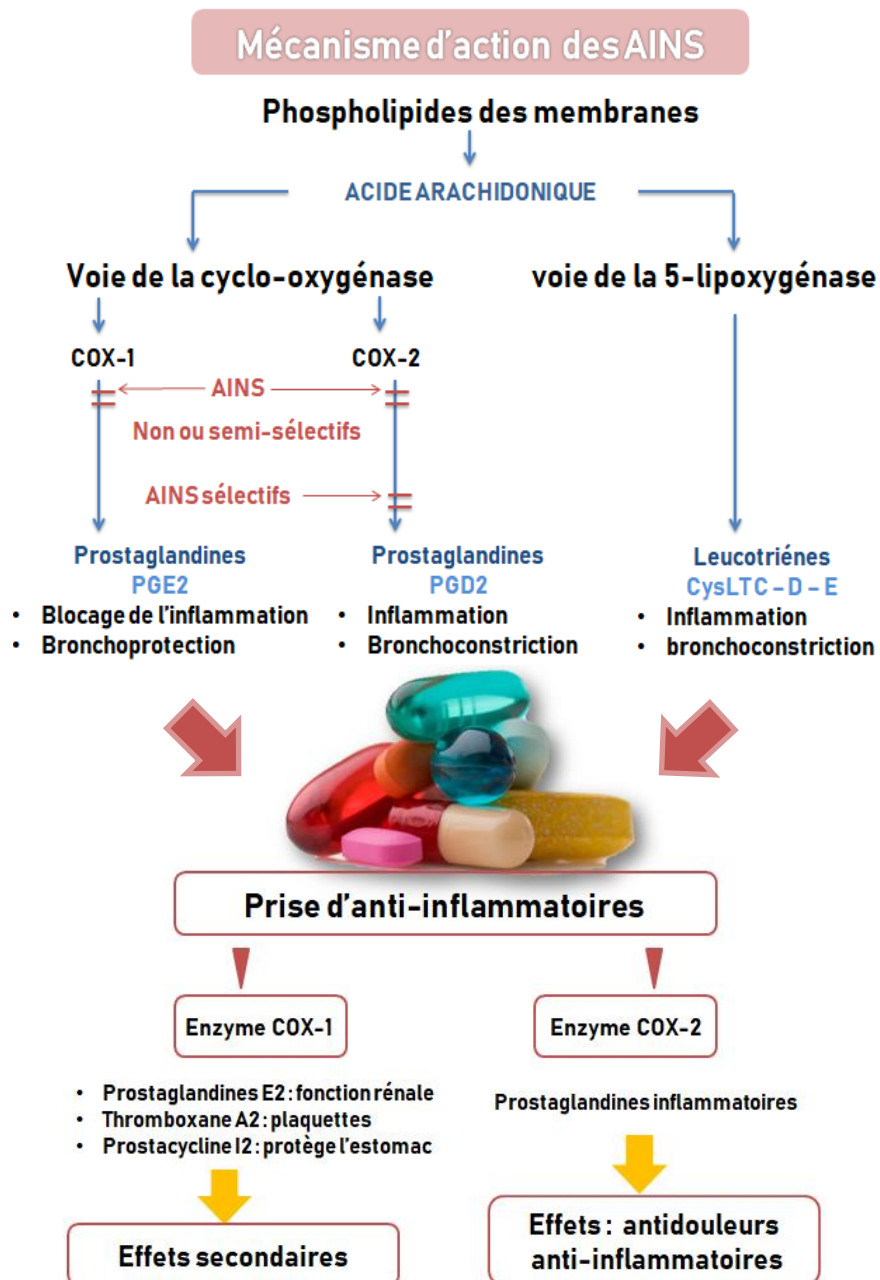


Figure 6. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Grandian, 2013)

3.1.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) sont des dérivés du cortisol, une hormone sécrétée par les glandes surrénales à partir du cholestérol (**Louis, 2010**). Le mode d'action de ces médicaments est assez complexe. Leurs effets sont perceptibles au niveau presque de tous les organes. Pour simplifier, après avoir pénétré dans les cellules, les AIS vont entrer dans le noyau pour se fixer directement sur l'ADN. Au niveau de cette molécule géante contenant notre patrimoine génétique, leurs actions sont très diverses, ils peuvent réduire la production des facteurs inflammatoires et immunitaires, une activité hormonale, concernant principalement les régulations métaboliques ou exercent un effet freinateur sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (**Muster, 2005**).

4. Allergie

L'allergie se définit comme une réaction de défense excessive du système immunitaire en réponse à des allergènes. Caractérisée par une libération de médiateurs due à une stimulation antigénique. Ces médiateurs sont principalement : l'histamine (**Monassier, 2001**). L'histamine est un médiateur chimique sécrété par l'organisme notamment lors de réactions allergiques. Sa principale fonction est de détruire les substances étrangères (**Ghibeche, 2016**).

4.1 Antihistaminiques

Les antihistaminiques sont des médicaments généralement administrés dans le cadre de traitement allergiques et des inhibiteurs des récepteurs de l'histamine. Ils n'affectent donc pas sa production, mais visant à réduire ou éliminer les effets de l'histamine. Il en existe cependant deux catégories de récepteurs spécifiques : les antihistaminiques H1 et H2 (**Monassier, 2001**).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériels biologique

La salive totale est prélevée le matin, 2 heures après le petit déjeuner à partir d'une personne saine. Le volontaire doit boire un verre d'eau 15 minute avant le prélèvement. 100 µl de salive totale sont prélevés dans un tube stérile. Cet échantillon salivaire est ensuite diluée 1000 fois avec un tampon phosphate salin de pH 7 (constitué de gomme arabique (1g), K_2HPO_4 (0,87g), KH_2PO_4 (0,68g) et KCl (9g) dans 1L d'eau distillée) pour les dosages de l'activité.

2. Matériels chimiques

Pour l'évaluation de l'effet inhibiteur sur l'alpha amylase salivaire humaine, nous avons utilisé quelques médicaments anti-inflammatoires et antihistaminiques. Les médicaments liquides sont utilisés directement alors que les médicaments solides sont dissous dans le tampon afin d'achever une concentration finale de 1g/L pour tous les échantillons.

Les médicaments sont classés par familles dont chacune est associée à une spécialité médicale, les figures (7) et (8) regroupent les structures 2D des médicaments utilisés dans notre travail.

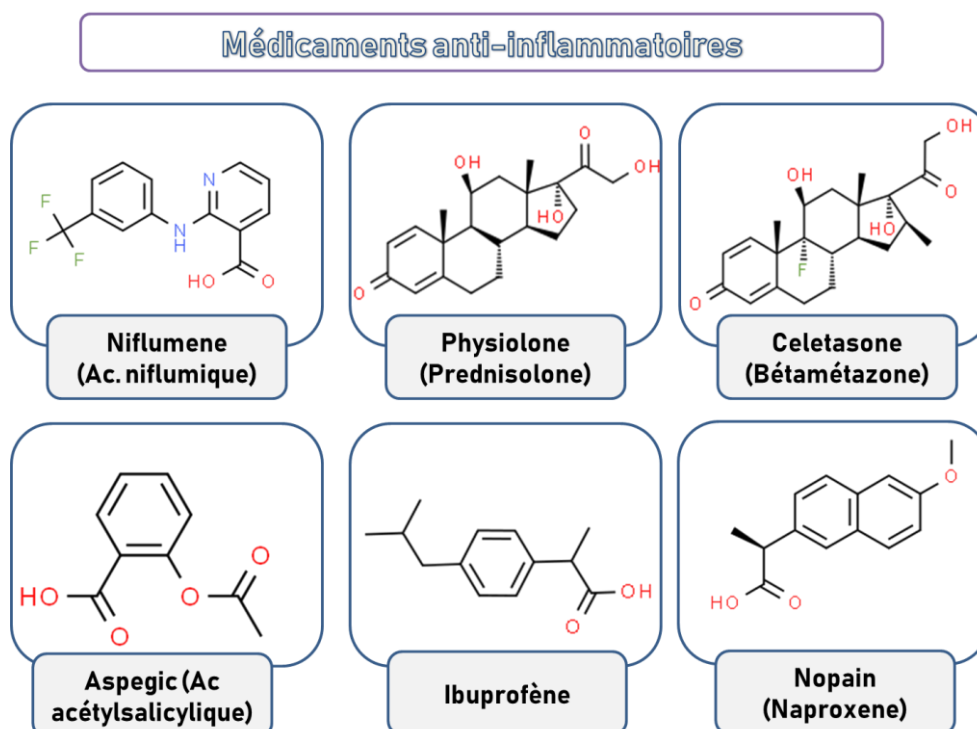


Figure 7. Structures 2D des médicaments anti-inflammatoires utilisés (*ChemSpider*)

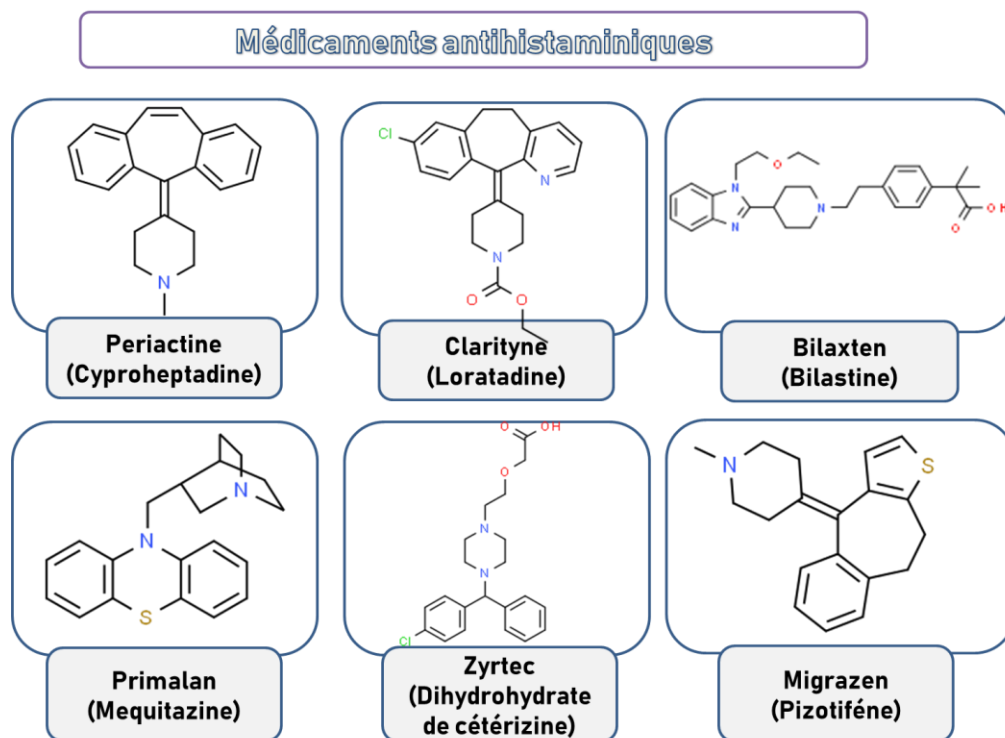


Figure 8. Structures 2D des médicaments antihistaminiques utilisés (*ChemSpider*)

3. Etude *in vitro*

3.1. Test de l'activité de l' α - amylase

L'activité de l' α - amylase salivaire humaine a été testée par l'ajout d'un volume de 20 μ l de substrat avec un volume de 20 μ l de l'enzyme dilué dans le tampon phosphate à pH 7. Après une incubation à 37 C° pendant 30 min, le facteur de dilution de l'extrait enzymatique brut a été fixé avec une absorbance équivalente proche du 1.

3.2. Principe du réactif du dosage

Nous avons utilisé un réactif de dosage employé dans les diagnostics cliniques des maladies du pancréas ou de la vésicule biliaire. Le dosage implique l'utilisation d'un substrat chromogène, le 2-chloro-4-nitrophénol lié avec du maltotriose, selon le schéma réactionnel qui est présenté dans la figure (9).

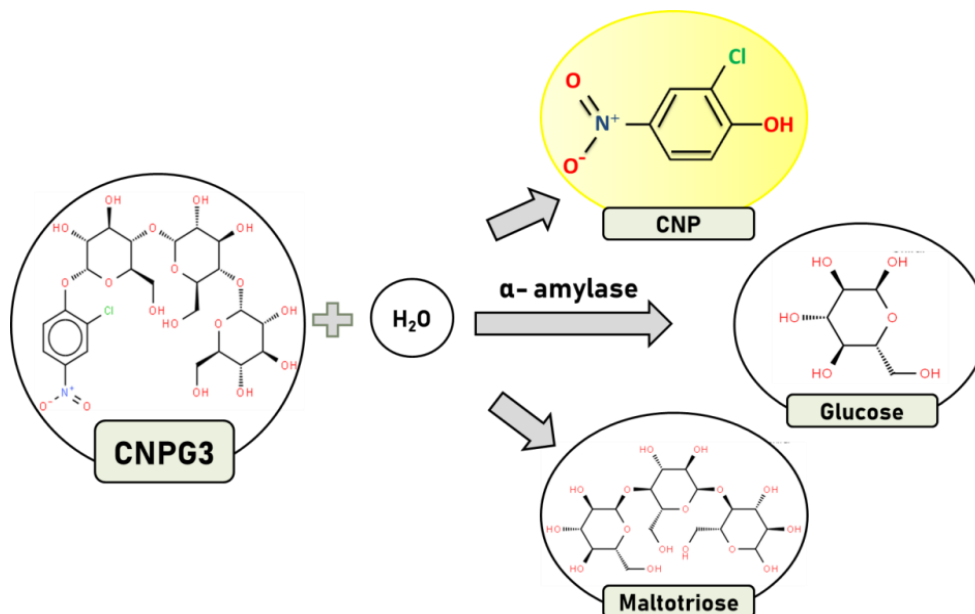


Figure 9. Schéma réactionnel de l'hydrolyse de l' α -maltotriose-2-chloro-4-nitrophényle (CNPG3) par l' α -amylase humaine

L' α -amylase hydrolyse l' α -maltotriose-2-chloro-4-nitrophényle (CNPG3) pour libérer le 2-chloro-4-nitrophénol (CNP) et former du 2-chloro-4-nitrophényl- α -D-maltoside (CNPG2), du maltotriose (G3) et du glucose (G). Le taux de formation de 2-chloro-4-nitrophénol peut être détecté par spectrophotomètre à 405 nm pour donner une mesure directe de l'activité de l' α -amylase dans l'échantillon.

3.3. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysé par l' α -amylase

Dans le but d'étudier l'effet de ces médicaments sur l' α -amylase salivaire humaine et de déterminer le paramètre d'inhibition IC_{50} : la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50% de l'activité enzymatique, nous avons adopté une nouvelle méthode optimisée pour la première fois et aucune étude préalable n'a été trouvée dans ce contexte.

Après avoir testé l'activité inhibitrice des médicaments utilisés pour une concentration (1 mg/ml). On s'est intéressé par les inhibiteurs qui ont donné une inhibition importante (> 50%) et pour lesquels nous avons procédé à la détermination du paramètre IC_{50} . Nous avons testé l'activité inhibitrice de nos médicaments à l'aide d'un lecteur à microplaque à 96 puits, après plusieurs essais afin de déterminer les concentrations nécessaires de l'inhibiteur, dont le volume final du milieu réactionnel égale à 190 μ l.

Un volume de 20 µl de l'enzyme diluée dans le tampon est ajouté à 20 µl de l'inhibiteur (les médicaments dilués avec 8 concentrations croissantes), ce mélange est pré-incubé pendant 15 min à 37°C. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de 150 µl de substrat (CNP3G) à 1g/l, le mélange est incubé à 37°C pendant 3 min, la lecture est effectuée à 405 nm dans le lecteur de microplaque (**ELx800uv**). Le blanc de la plaque est dépourvu du substrat et de l'inhibiteur.

La valeur de IC₅₀ a été déterminée de la représentation graphique I % = f (I) tel que I% est déterminée suivant cette relation :

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

Avec :

- $I\%$: le pourcentage d'inhibition.
- $A_{\text{médicament}}$: l'absorbance de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur.
- A_{control} : l'absorbance de l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur.

3.4. Analyse statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique Microsoft office Excel2013. Toutes les expériences ont été faites en triplet ou plus, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n=3 ou plus) pour chaque cas.

4. Etude *in silico*

4.1. Alignement des séquences

L'alignement est une opération qui consiste à comparer deux séquences (de nucléotides ou d'acides aminés) en maximisant la coïncidence des symboles qui les composent. Ce qui signifie qu'avec l'alignement on cherche à découvrir la similitude « biologique » des séquences. En plus, après l'alignement, on aura un pourcentage d'identité, un score d'alignement qui confirme si les séquences sont homologues ou non (**Benarous, 2014**)

4.2. Docking moléculaire

Toutes structures spatiales des molécules utilisées ont été obtenues de la base de données PubChem, elles ont été assemblées avec le logiciel Discovery Studio visualiser

v4.0. Les structures 3D de l'alpha amylase (α -amylase salivaire humaine avec PDB ID: 3DHP et α -amylase pancréatique humaine avec PDB ID: 1B2Y) ont été obtenues à partir de la banque de données sur les protéines (PDB). Pour effectuer le Docking, nous préparons les deux iso-enzymes de l' α -amylase humaine en éliminant toutes les molécules d'eau à l'exception de celles qui sont impliquées dans la réaction d'hydrolyse, et n'importe quels ligands à l'aide de logiciel Discovery Studio v4.0.

AutoDock Vina est un outil bioinformatique utilisé pour effectuer « *in silico* » la fixation de protéines avec un ligand. Pour réaliser l'amarrage avec ce logiciel, nous sommes besoins de : Fichiers Pdbqt de la protéine et du ligand, fichier de configuration et fichiers de grille. Les calculs d'amarrage ont été effectués avec le programme AutoDock Vina. Comme il utilise des boîtes rectangulaires pour le site de liaison, le centre de la boîte a été défini et la boîte d'ancrage affichée à l'aide d'AutoDock Tools. L'amarrage était spécifique avec une boîte de grille de 22 x 20 x 18 et des points de grille séparés de 1 Å, positionnés au centre de l'enzyme avec ces coordonnées x= 6,865; y= 46,779; z= 19,324 pour 3DHP. La boîte de grille de 1B2Y était de 22 x 22 x 24 avec des points de grille (x = 15,04; y = 6,124; z = 48,393).

Les paramètres par défaut ont été utilisés. Le nombre de tour de docking s'est fixé sur 50 tours. Le nombre des solutions obtenus est égal à 50 conformations. Toutes ces solutions sont très bien traitées. Les conformations privilégiées étaient celles de plus faible énergie de liaison au sein du site actif. Enfin, les résultats de docking générés étaient directement chargés dans Discovery Studio visualizer v 4.0.

Résultats et discussion

1. Résultats *in vitro*

1.1 L'activité inhibitrice de la réaction catalysée par l' α -amylase

D'après une étude bibliographique sur la fonction physiologique de l' α -amylase humaine et le rôle de ses inhibiteurs dans le traitement de plusieurs maladies notamment la pancréatite et le diabète non insulinique, nous avons évalué le pouvoir inhibiteur de nos médicaments sur l'activité de cette enzyme dans le but de trouver des nouveaux inhibiteurs efficaces avec moins effets indésirables.

Le tableau (2) exprime les pourcentages d'inhibition des médicaments (1 mg/ml) ayant une valeur positive, ceux qui ont des valeurs négatives sont éliminés.

Tableau 2. Pourcentages d'inhibition des médicaments utilisés

| Inhibiteurs | % d'inhibition |
|--------------------|-----------------------|
| Aspégic | 9,69 |
| Loratadine | 53,18 |
| Migrazéne | 17 |
| Physiolone | 13,96 |
| Nopain | 15,68 |
| Ibuprofène | 13,48 |
| Bétaméthasone | 36,91 |
| Acide niflumique | 10,21 |

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que seuls les deux inhibiteurs (Bétaméthasone et Loratadine) dont les concentrations 1 mg/ml et 0,5 mg/ml respectivement, présentent un pouvoir d'inhibition important vis-à-vis l' α amylase comparant aux autres médicaments et pour lesquels nous avons procédé à la détermination du paramètre IC50.

Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations des inhibiteurs exprimées en mg/ml, nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de chaque échantillon (les courbes sont présentés dans la figure (10), (11), (12). Ces représentations graphiques nous a permis de déterminer les valeurs des IC50 ou les valeurs sont enregistrés dans le tableau (3).

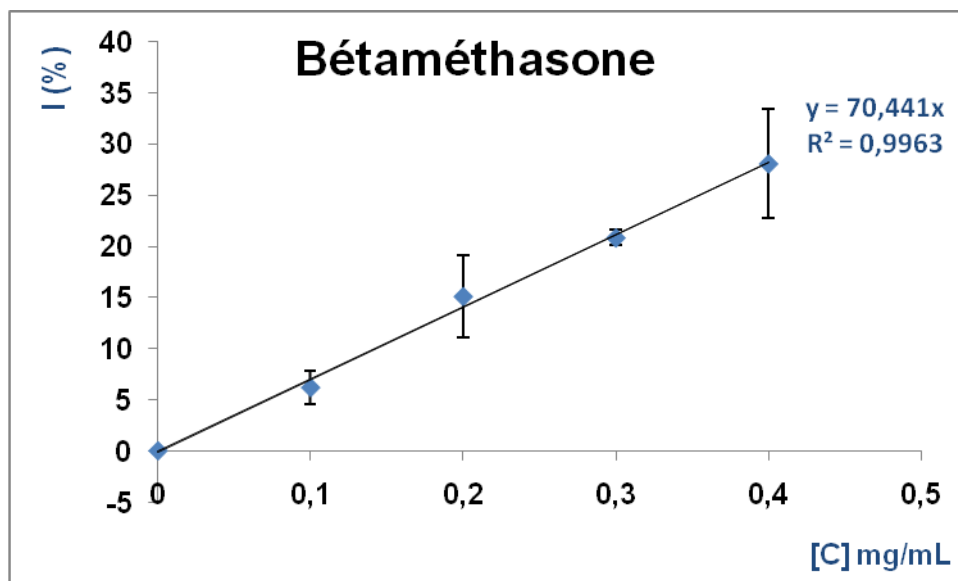


Figure 10 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur de Bétaméthasone sur l'alpha-amylase salivaire humaine

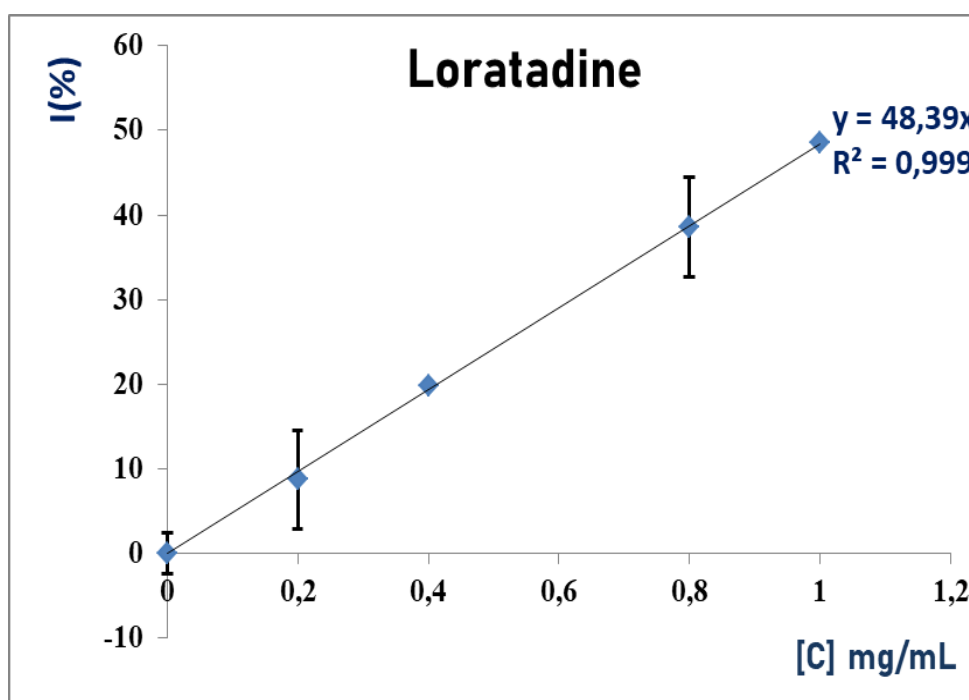


Figure 11 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur de Loratadine sur l'alpha-amylase salivaire humaine

L'Acarbose est utilisé comme molécule de référence pour contrôler l'inhibition de l'alpha amylase. Les pourcentages obtenus sont schématisés sur la figure (12). Cette molécule est plus efficace et elle présente des pourcentages élevés pour de très faibles concentrations.

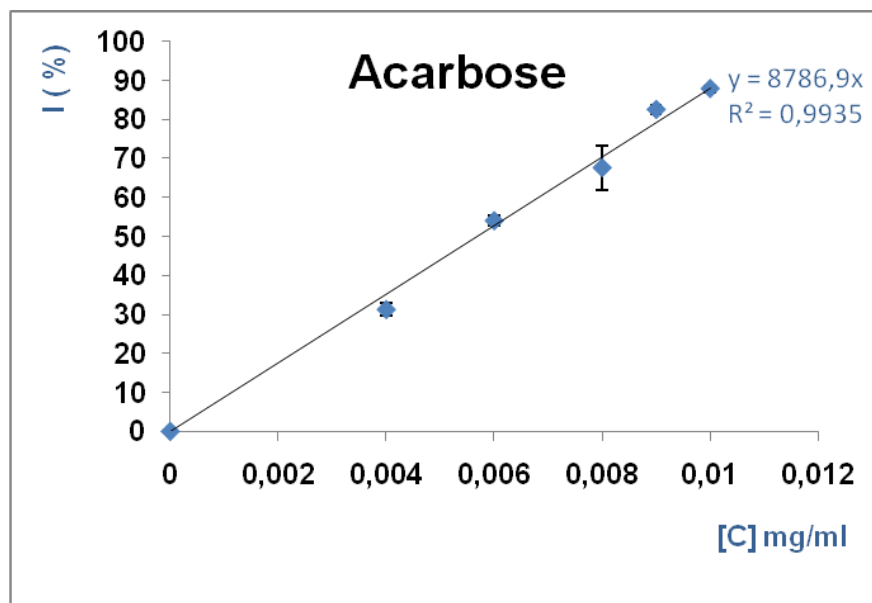


Figure 12 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur de l'Acarbose sur l'alpha-amylase salivaire humaine (contrôle positif)

Tableau 3 : Evaluation des valeurs des IC_{50} de Loratadine, Bétamétasone et de l'Acarbose

| Inhibiteurs | Loratadine | Bétaméthasone | Acarbose |
|-------------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| IC_{50} (mg/ml) | $1,0331 \pm 0,0012$ | $0,71 \pm 0,007$ | $0,0057 \pm 0,0001$ |
| IC_{50} (μ g/ml) | $1033,1 \pm 1,2$ | 709 ± 7 | $5,7 \pm 0,1$ |
| IC_{50} (μ M) | 2698,56 | 1806,54 | 8,828 |

Dans notre travail, nous avons testé l'activité inhibitrice des deux médicaments sur l'alpha-amylase salivaire humaine. Nous remarquons que Bétaméthasone présente une inhibition ($IC_{50} = 709 \pm 7 \mu\text{g/ml}$) nettement supérieure à celle de la Loratadine ($1033,1 \pm 1,20 \mu\text{g/ml}$), mais nettement inférieure à celle de l'Acarbose ($5,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$). Si nous comparons ces valeurs avec l'Acarbose qui est un médicament antidiabétique, nous pouvons dire que nos inhibiteurs sont beaucoup moins efficaces que l'Acarbose.

Des recherches scientifiques ont été réalisées pour évaluer les effets inhibiteurs de quelques médicaments afin d'atteindre le but de trouver un traitement médical des syndromes métaboliques sans effets secondaires. Dans cette étude, nous avons fait la même chose et nous voulons comparer nos médicaments avec des molécules pures par des travaux antérieurs qui sont regroupés dans le tableau (4).

Selon l'étude de (Taha *et al.*, 2019), le thiazole est plus efficace avec une valeur IC_{50} ($1.763 \pm 0.03 \mu M$) par rapport au Hésperidine, Lutéoline, Quercétine selon (Martinez *et al.*, 2018) avec des valeurs IC_{50} ($20.10 \pm 0.70 \mu M$), ($18.00 \pm 1.00 \mu M$), ($12.70 \pm 1.20 \mu M$) respectivement. Ces molécules ont une activité inhibitrice forte que la Catéchine de l'amylase salivaire humaine (Yilmazer *et al.*, 2015) avec une valeur ($160 \pm 67 \mu M$). Ces derniers sont plus efficaces que les molécules pures comme Quercétine, Curcumin, catéchine de la source *Bacillus sp* avec des valeurs d' IC_{50} ($500 \pm 2 \mu M$), ($130 \pm 7.7 \mu M$) et ($380 \pm 2.6 \mu M$) respectivement (Hung Jhong *et al.*, 2015).

Thiazole est le meilleur inhibiteur par rapport à nos inhibiteurs. Nous constatons que nos médicaments possèdent une inhibition moins importante que celle d'autres molécules pures vis-à-vis des alpha amylases des différentes sources : *Bacillus sp* (quercétine, catechine, Curcumin), salivaire humaine (catéchine), d'origine microbienne (thiazole) et l'alpha amylase pancréatique humaine (Hésperidine, Lutéoline, Quercétine). Rappelons que cette comparaison est faite juste pour savoir le pouvoir général de nos inhibiteurs mais il faut mentionner que notre méthode est nouvelle, sensible, rapide et efficace par rapport à méthodes utilisées *in vitro* dans ces travaux antérieurs qui se représentent principalement dans la réduction des sucres par l'acide dinitrosalicylique (DNS) ou la néocuproïne.

A partir du tableau (4), l'acarbose est l'inhibiteur de l'alpha amylase le plus puissant, rappelons que c'est la première fois en utilisant cette méthode. La valeur IC_{50} d'acarbose égale à **8,828 μM** , en comparant cette valeur avec d'autres méthodes utilisées dans ces références bibliographiques. En revanche, selon (Hung Jhong *et al.*, 2015) l'Acarbose reste le meilleur avec une valeur d IC_{50} (**1000 μM**) avec l' α -amylase de *Bacillus sp*, cette valeurs est nettement supérieure par rapport à celle trouvé par : (Taha *et al.*, 2019) avec une valeur d IC_{50} (**1.637 μM**), (Martinez *et al.*, 2018) avec une valeur d IC_{50} (**14.60 μM**) et celle trouvé chez (Yilmazer *et al.*, 2015) une valeur d IC_{50} (**10.68 μM**). Cette différence des valeurs des IC_{50} est due à l'origine de l'alpha amylase et la méthode utilisée dans l'étude.

A travers ces résultats, nous pouvons dire que nos inhibiteurs Loratadine et Bétaméthasone sont moins puissants que les molécules pures présentées dans des travaux antérieurs qui sont déjà mentionnées. L'Acarbose est connu comme un bon inhibiteur de l'alpha amylase. En se basant sur ce control positif, nous pouvons dire que notre méthode est la meilleure par rapport aux autres.

Tableau 4: Les valeurs IC₅₀ des molécules pures.

| Molécules pures | IC ₅₀ (µM) | Source d'amylase | Références |
|-------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------|
| Thiasole 1 | 1.763± 0.03 | microbienne | Taha et al., 2019 |
| Acarbose | 1.637±0.153 | | |
| Quercétine | 500± 2 | <i>Bacillus sp.</i> | Hung Jhong et al., 2015 |
| Acarbose | 1000 ± 1.0 | | |
| Curcumin | 130± 7.7 | | |
| Acarbose | 1000 ± 1.0 | | |
| Catéchine | 380± 2.6 | Pancréatique humaine | Martinez et al., 2018 |
| Acarbose | 1000 ± 1.0 | | |
| Héspertine | 20.10± 0.70 | Pancréatique humaine | Martinez et al., 2018 |
| Acarbose | 14.60± 1.70 | | |
| Lutéoline | 18.00± 1.00 | | |
| Acarbose | 14.60± 1.70 | | |
| Quercétine | 12.70± 1.20 | salivaire humaine | Yilmazer et al., 2015 |
| Acarbose | 14.60± 1.70 | | |
| Catéchine | 160 ± 67 | salivaire humaine | Yilmazer et al., 2015 |
| Acarbose | 10.68 | | |

2. Résultats *in silico*

2.1 Composition et alignement des séquences des acides aminés des deux amylases

Après le téléchargement des séquences protéiques des deux amylases (format FASTA), nous avons les étudié avec le logiciel BioEdit afin de déterminer la composition en acides aminés (AA) des deux protéines (figure 13). L'alignement des acides aminés des deux amylases (figure 14) montre une forte ressemblance en acides aminés, 8 acides aminés similaires avec un % de similarité 95,76%. L'amylase salivaire humaine se diffère de la pancréatique par la présence des résidus Ser4, Ala134, Cys171, Ala204, Glu244,

Ala276, Ala284, Ala316, Tyr347, Lys352, Thr367, Ala388 et Asn396 au lieu de Phe4, Trp134, Glu171, Trp204, Ala224, Tyr276, Trp284, Trp216, Gln347, Asn352, Ile367, Trp388 et Ile396, respectivement, tandis que les deux amylases partagent 476 résidus d'acides aminés identiques. Les deux enzymes se diffèrent seulement dans 13 AA de site de fixation et possèdent la même triade catalytique (Glu et deux résidus Asp), cette homogénéité est due à appartenance des deux protéines à la même source (humaine).



Figure 13: Alignement des acides aminés des deux amylases humaines : amylase salivaire et amylase pancréatique (acides aminés identiques en bleu, acides aminés similaires en jaune).

2.2 Docking moléculaire

Dans notre travail, le Docking moléculaire est utilisée pour modéliser l'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur au niveau atomique, ce qui nous permet de caractériser le comportement de ce dernier dans le site de liaison des protéines cibles ainsi d'élucider les processus biochimiques fondamentaux.

A cette approche, une simulation d'amarrage des médicaments étudiés a été réalisée en ciblant le site actif de la structure cristalline des deux amylases (PDB ID: 3DHP et 1B2Y) afin de définir la nature des interactions entre les inhibiteurs et les enzymes en utilisant le programme AutoDock Vina (**Benarous et al., 2018**). Nous avons sélectionné la meilleure pose d'amarrage pour chaque inhibiteur, en fonction du nombre de répétitions et du type d'interaction existant dans 50 solutions (**Serseg et Benarous, 2018**).

A travers cette étude, nous détaillerons le type d'interactions pour les médicaments inhibiteurs: Bétaméthasone et Loratadine et Acarbose avec l' α -amylase salivaire (**Figures 14, 15, 16**) et l' α -amylase pancréatique (**Figures 17, 18, 19**). Les résultats de Docking (**tableau 5**) liés au nombre de solutions obtenues montrent que les deux médicaments ont une activité d'inhibition de l'alpha amylase, ce qui confirme les résultats expérimentaux.

Rappelons que l'alpha amylase contient deux sites : un site catalytique et un site de fixation dont le site catalytique est constitué par : Glu233, Asp (300, 197) (colorés en vert), le site de fixation constitué par : Trp59, His299, Glu240, Arg195, Lys200 et His201 pour l'alpha amylase salivaire, Arg195, Lys200, Ile230, His305, Gln63, His299, His201 et Trp59 (colorés en bleu).

Les trois inhibiteurs testés ont été intégrés dans le site actif de l'enzyme Amylase salivaire cible (pdb: 3DHP).

Bétaméthasone ($C_{22}H_{29}FO_5$, 392.199 g/mol, 9-fluoro 11,17-dihydroxy-17-(2-hydroxyacetyl) -10,13,16-triméthyl-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 dodecahydro-3H-cyclopenta[a]phenanthren-3-one), est composé de trois cycles aromatiques et un groupe cyclopentyle. La conformation présentée dans la figure 15 est la plus répétée avec un taux de 86%. Il a été trouvé que l'inhibiteur avait des interactions hydrophobes de type π -alkyle avec les acides aminés His305, Tyr62, Trp58 et deux liaisons avec Trp59. De plus, une autre interaction de même type a été observé entre le groupe cyclopentyle et Ile235. Le Bétaméthasone présente des liaisons hydrogènes, l'une entre le cyclopentyle et His201 dont la distance interatomique égale à $3,72\text{\AA}$, et deux autres ont été observés cette fois avec les molécules d'eau HOH576 et HOH554.

Loratadine ($C_{22}H_{23}ClN_2O_2$, 382,888 g/mol, ethyl 4-(8-chloro-5,6-dihydrobenzo [1,2] cyclohepta[2,4-b]pyridin-11-ylidene)piperidine-1-carboxylate), dont sa structure est montrée dans la figure (16), est composé de benzyle, cycloheptyle, pyridol et pipéridyle avec des groupes carboxyle. Le mode de fixation adopté par cette molécule permet aux groupes benzène, pyridone et pipéridynede se déposer dans une cavité limité de résidus d'acides aminés hydrophobes représentés par Leu162, Trp59, His3015 et Leu165. Ces deux

derniers groupes interagissent avec les interactions hydrophobes face à alkyle. De plus, la Loratadine forme une autre interaction hydrophobe de type π -sigma entre le groupe pipéridine et Leu162, deux liaisons π - π T-shaped entre le groupe pyridone et Trp59. La conformation présentée est la plus répétée avec un taux de 96%. Aucune molécule d'eau n'a été détectée dans ces interactions.

Acarbose de la structure cristalline (ID : 3DHP), ($C_{25}H_{43}NO_{18}$, 645,608 g/mol, 3,4-dihydroxy-6-méthyl-5-[4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxyméthyl)cyclohex-2-en-1-yl]amino]oxan-2-yl]oxy-3,4-dihydroxy-6-(hydroxyméthyl)oxan-2-yl]oxy-6-(hydroxyméthyl)oxane-2,3,4-triol), composé de cyclohexanyl, chonduritol et trois unités de glucoses ce qui lui permet de former des interactions avec les acides aminés de site actif de l'alpha amylase (figure 17). Le mode de fixation adopté par cette molécule permet à l'oxygène de glucose (GLC) de former une liaison hydrogène avec Trp59 dont la distance interatomique est $2,82\text{\AA}$. De même, le glucose (AGL) forme trois liaisons hydrogènes, deux entre Glu233 et l'atome de l'oxygène ($2,67\text{\AA}$) et l'azote ($2,79\text{\AA}$), et une entre (O-His201) avec une distance égale à $2,7\text{\AA}$. L'autre glucose (GLC) permet de former 3 interactions hydrogènes qui sont (O2- Lys200= $2,98\text{\AA}$), (O3- Lys200= $2,92\text{\AA}$) et (O- Glu240= $2,7\text{\AA}$). Dans le cas de chonduritol (HMC), on observe cinq liaisons hydrogènes avec les atomes d'oxygènes de HMC, deux liaisons avec Asp300 ($2,65\text{\AA}$ et $2,62\text{\AA}$) et les trois avec His299 ($2,96\text{\AA}$), Arg195 ($2,87\text{\AA}$) et Asp197 ($2,75\text{\AA}$).

Le mécanisme catalytique de l'alpha amylase implique une réaction d'hydrolyse, ce qui nécessite l'intervention des molécules d'eau. L'orientation du mode de liaison de l'acarbose montre la formation d'une liaison hydrogène entre glucose (AGL) et HOH554 et quatre liaisons entre glucose (GLC) et HOH576, HOH717, HOH868 et HOH867.

L'Acarbose de l' α -amylase salivaire a prouvé un nombre d'interaction des liaisons hydrogènes atteint jusqu'à 17 liaisons (cinq d'entre eux avec les acides aminés de site actif, sept avec les résidus de site de fixation et le reste a été établis avec les molécules d'eau), par rapport au Bétaméthasone (une seule liaison) et Loratadine (aucune liaison). Donc l'Acarbose c'est le meilleur inhibiteur.

Les trois inhibiteurs testés ont été intégrés dans le site actif de l'enzyme Amylase pancréatique cible (pdb: 1B2Y).

Bétaméthasone prend une position bien observée au sein du site actif. Il est bien entouré par les acides aminés du site actif formant une cavité, ce qui lui permet de faire une liaison hydrogène avec Glu 233 avec des distances de $2,88\text{\AA}$ entre l'oxygène de Glu 233 et l'hydrogène de Bétaméthasone et une autre liaison a été observée avec la molécule d'eau

HOH 610. Notre inhibiteur forme cette fois 3 interactions hydrophobes de type π -alkyle avec Trp59, Trp 58, His305. La conformation présentée dans la (figure 18) est la plus répétée avec un taux de 100%.

La conformation de Loratadine présentée dans la figure (19). L'inhibiteur a fait des interactions avec les acides aminées du site actif de l'alpha amylase pancréatique. Le groupe benzyle interagit avec Leu 162 par interaction de type π -alkyl, et une liaison de type liaisons π - π T-shaped entre le groupe pyridone et Tyr 62. Une liaison hydrogène de 3,72 Å a été enregistré entre l'atome d'azote de la His305 et l'atome hydrogène du groupement carboxyle de l'inhibiteur et deux autres liaisons ont été observés cette fois avec les molécules d'eau HOH610 et HOH 930. La conformation est la plus répétée avec un taux de 100 %.

Acarbose de la structure cristalline (ID : 1B2Y), ($C_{25}H_{43}NO_{18}$, 645.608 g/mol, 3,4-dihydroxy-6-méthyl-5-[4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxyméthyl)cyclohex-2-en-1-yl]amino]oxan-2-yl]oxy-3,4-dihydroxy-6-(hydroxyméthyl)oxan-2-yl]oxy-6-(hydroxyméthyl)oxane-2,3,4-triol), est composé de cyclohexanyl, acide pyroglutamique et trois unités de glucoses ce qui lui permet de former des interactions avec les acides aminés de site actif. La figure 20 montre le mode de liaison de l'inhibiteur. Cinq liaisons hydrogènes ont été formés entre cyclohexanyle (AC1) et les acides aminés de site actif, le résidu Glu233 montre deux liaisons (O-Glu233=2,75Å) et (N-Glu233=2,92Å), alors que les résidus His201, Arg195 et His299 présentent des liaisons avec l'oxygène dont les distances sont de l'ordre de 2,63Å, 2,77Å et 2,7Å, respectivement. Il a été trouvé également des liaisons hydrogènes entre l'acide pyroglutamique (PCA) et Ile230 dont la distance est 2,90Å, entre Lys200 et les deux atomes d'oxygènes du glucose BGC (O2- Lys200= 2,45Å et O3- Lys200= 2,87Å) et aussi entre Gln63 et l'atome oxygène de glucose G6D avec une distance interatomique 2,96Å, ce dernier forme à son tour un contact hydrophobe de type π -alkyle avec Leu165.

D'autres interactions hydrogènes ont été établies cette fois avec le Glucose G6D et la molécule d'eau HOH800, ainsi les oxygènes O2, O3 de cyclohexanyle sont impliqués dans une liaison hydrogène avec la molécule HOH610, et O5 avec HOH930.

L'Acarbose de l' α -amylase pancréatique a prouvé un nombre d'interaction des liaisons hydrogènes égale à 18 liaisons (quatre d'entre eux avec les acides aminés de site actif, dix avec les résidus de site de fixation et le reste a été établies avec les molécules d'eau), par rapport au Bétaméthasone (une seule liaison avec un AA de site actif) et Loratadine (une liaison). Donc l'Acarbose est toujours le meilleur inhibiteur.

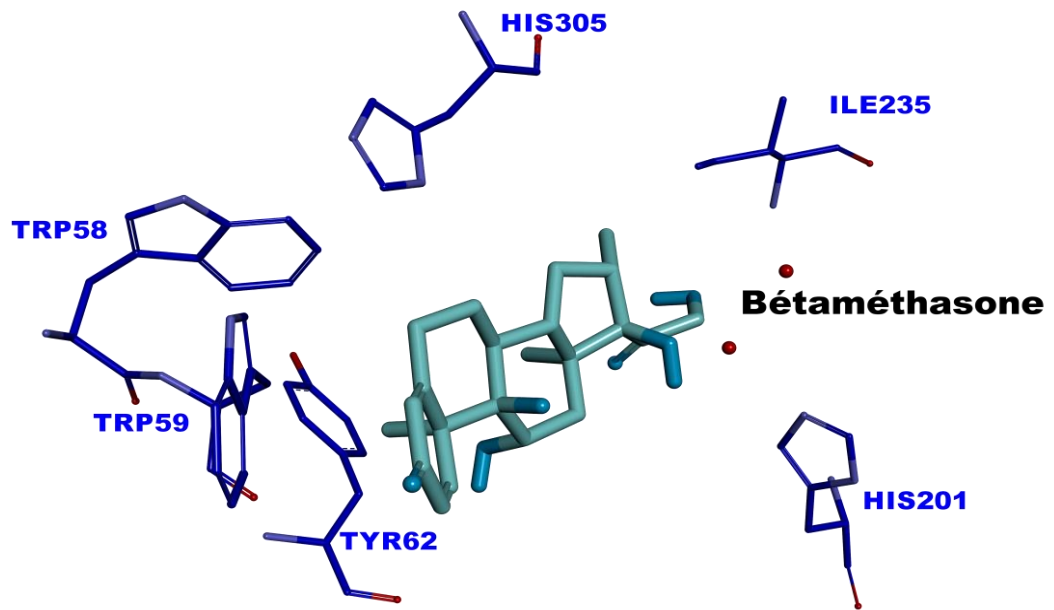


Figure 14. Représentation de la meilleure pose de docking de Bétaméthasone avec l'alpha amylase salivaire avec les acides aminés du site actif

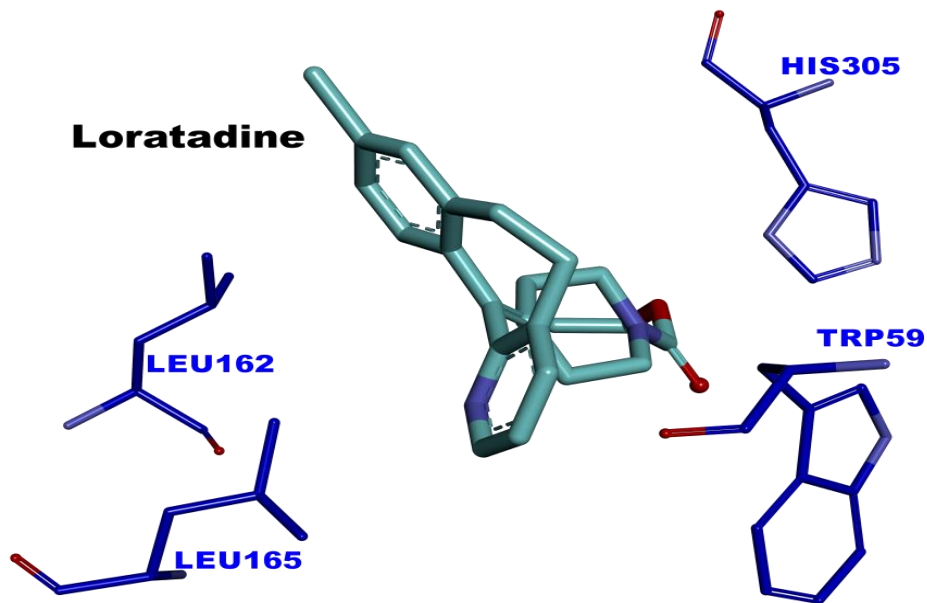


Figure 15 : Représentation de la meilleure pose de docking de Loratadine avec l'alpha amylase salivaire avec les acides aminés du site actif

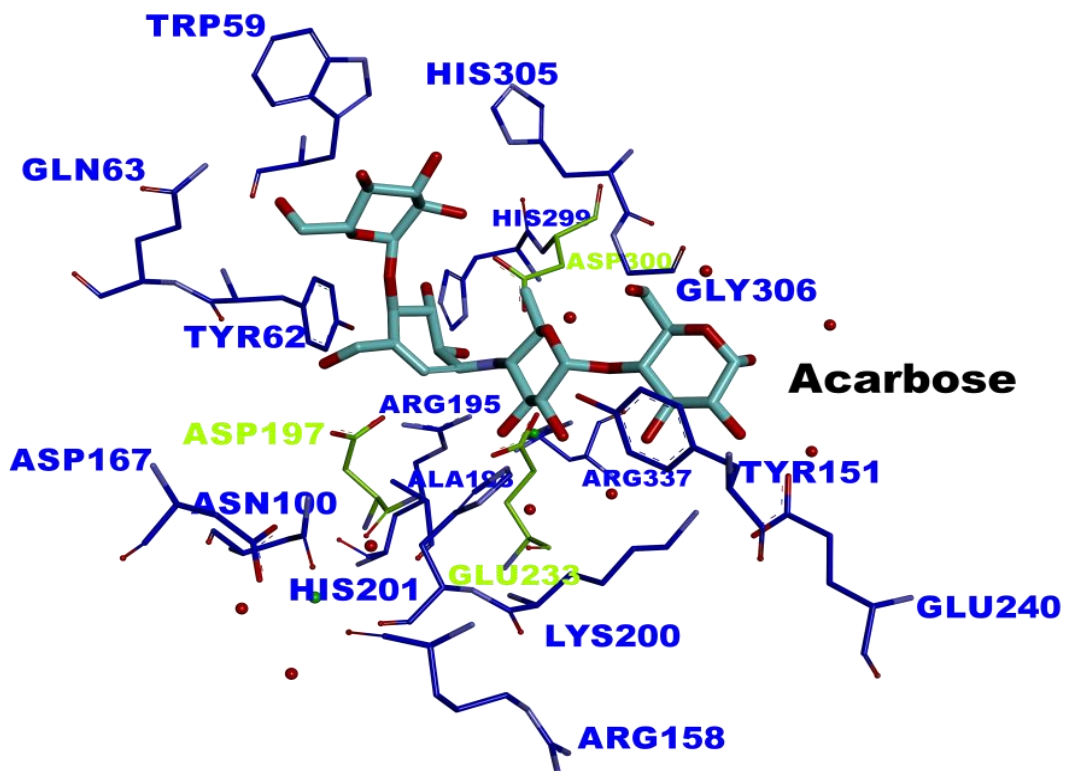


Figure 16 : Représentation des interactions de l'Acarbose avec l'alpha amylase salivaire avec les acides aminés du site actif obtenue de la structure cristalline (PDB ID : 3DHP)

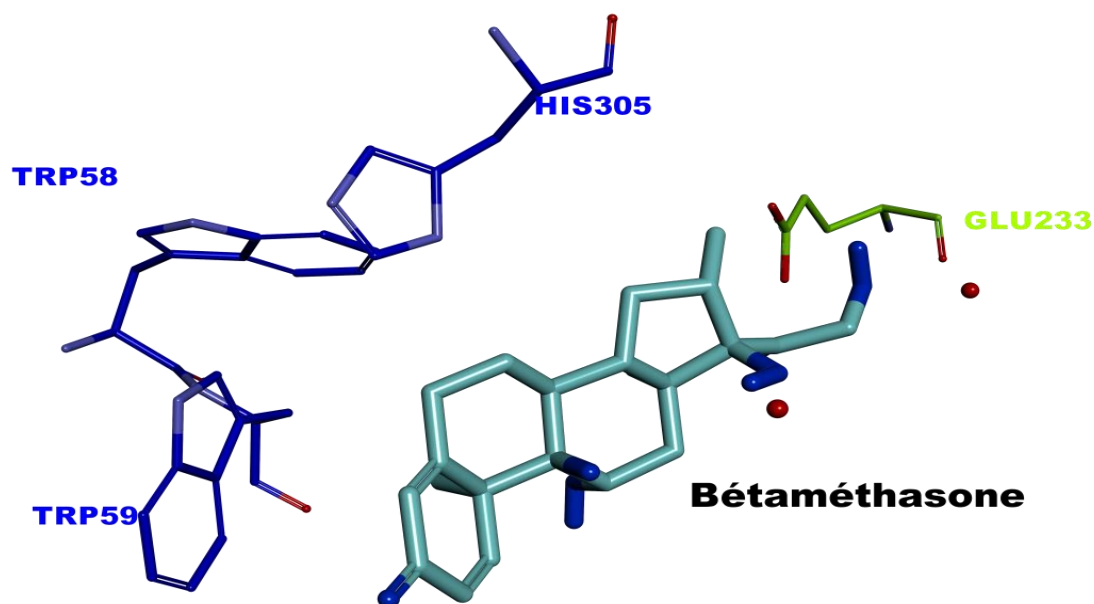


Figure 17 : Représentation de la meilleure pose de docking de Bétaméthasone avec l'alpha amylase pancréatique avec les acides aminés du site actif coloré en vert

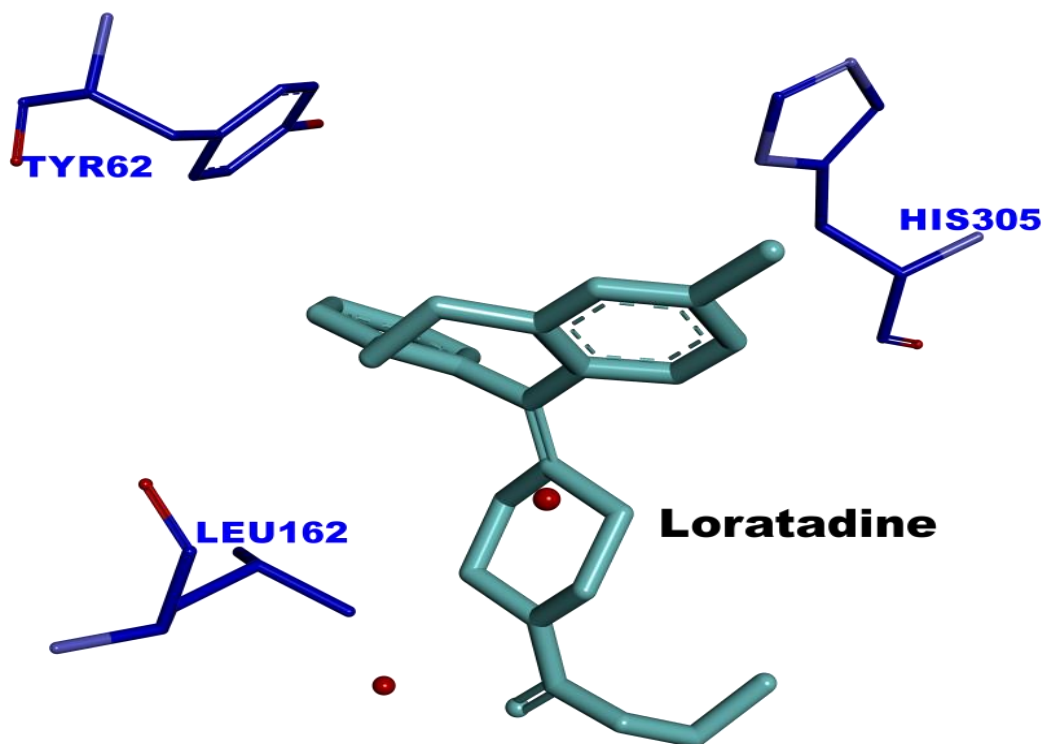


Figure 18 : Représentation de la meilleure pose de docking de Loratadine avec l'alpha amylase pancréatique avec les acides aminés du site actif

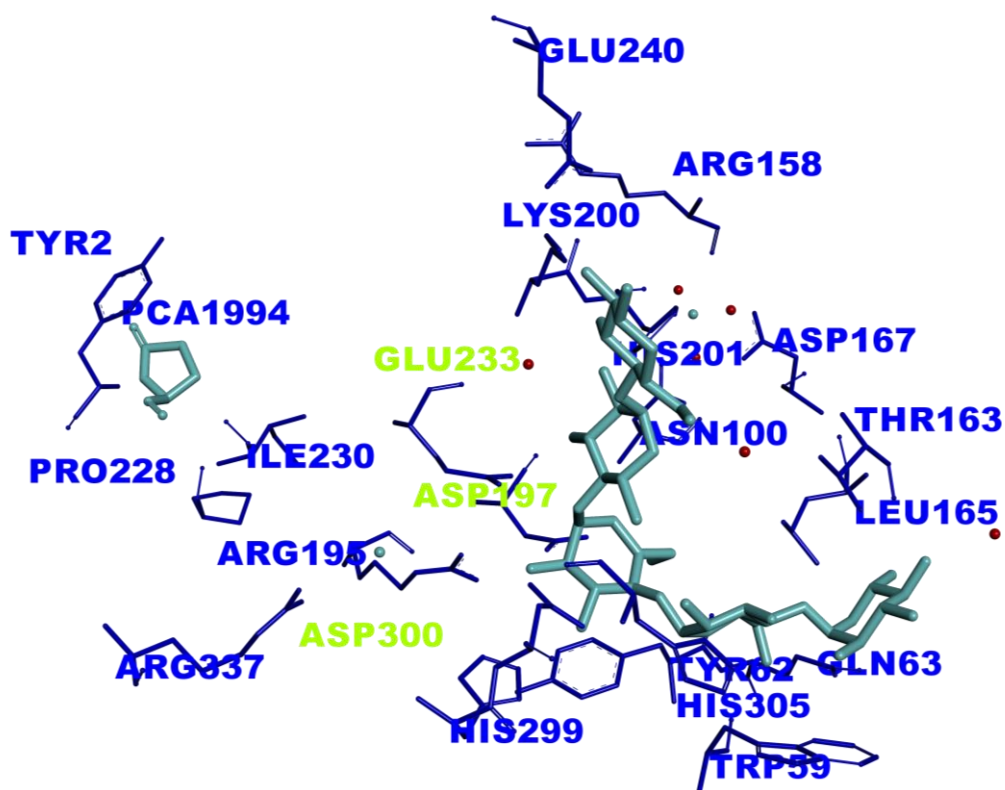


Figure 19 : Représentation des interactions de l'Acarbose avec l'alpha amylase pancréatique avec les acides aminés du site actif obtenue de la structure cristalline (PDB ID : 1B2Y)

Tableau 5 : Résumé des études d'amarrage moléculaire des inhibiteurs (médicaments) dirigés contre le site actif de l'alpha amylase.

| Enzymes | Inhibiteurs | % de répétition | L'énergie de liaison libre (kcal mol ⁻¹) | AA l'interaction | Interactions hydrophobiques | Liaisons hydrogènes | Longueur (Å) |
|---|----------------------|-----------------|--|---|--|---|--|
| α-amylase salivaire 3DHP | Bétaméthasone | 86 | -9.1 | His305 Trp58 Trp59 Tyr62 Ile235 | π -alkyle | His201 | 3.72 |
| | Loratadine | 96 | -8.3 | His305, Leu165 Leu162 Trp59 | π -alkyle π -sigma π - π -T-shaped | / | / |
| | Acarbose | / | / | / | / | Trp59 His299 Asp300 Glu240 Glu233 Asp197 Arg195 Lys200 His201 | 2.82 2.96 (2.65, 2.62) 2.70 (2.79, 2.67) 2.75 2.87 (2.98, 2.92) 2.70 |

| | | | | | | | |
|--|----------------------|-----|------|--------------------------|--|--|--|
| α-amylase pancréatique 1B2Y | Bétaméthasone | 100 | -9.5 | His305 Trp58 Trp59 | π -alkyle | Glu233 | 2.88 |
| | Loratadine | 100 | -7.8 | Leu162 Tyr62 | π -alkyle π - π -T- shaped | His305 | 3.72 |
| | Acarbose | / | / | Leu165 | π -alkyle | Arg195 Lys200 Ile230 His305 Asp300 Glu233 Asp197 Gln63 His299 His201 Trp59 | 2.77 (2.45, 2.87) 2.90 2.95 2.66 (2.92, 2.75) 2.83 (2.96, 2.92) 2.70 2.63 2.51 |

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La prévalence des maladies métaboliques ne cesse d'augmenter, surtout dans les dernières années. La prise en charge et le traitement de ces pathologies représentent un coût humain lié à l'augmentation de la mortalité associée à ces maladies. Des nombreux travaux sont dirigés dans le cadre de l'inhibition des enzymes qui sont impliqués dans la physiopathologie de ces maladies. L'inhibition de l'alpha amylase est considérée comme l'une des plus stratégies importantes pour traiter les patients atteints à des syndromes métaboliques notamment le diabète type II et la pancréatite.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'effet inhibiteur de quelques médicaments anti-inflammatoires et antihistaminiques contre l'alpha amylase afin de les sélectionner pour une étude chimique approfondie accompagnée d'une modélisation par un outil bioinformatique en utilisant une nouvelle méthode. Le choix tactique de ces médicaments est basé sur quelques données pharmacologiques indiquant leur utilisation contre certaines maladies, en utilisant pour la première fois une nouvelle méthode de détection d'inhibition.

À la lumière des résultats obtenus, seulement deux médicaments présentent un effet inhibiteur important qui sont confirmés par les valeurs des IC50. Nous avons enregistré que Bétaméthasone est le meilleur inhibiteur avec une valeur d'IC50 de $709 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ par rapport au Loratadine qui présente une valeur de $1033.1 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$ mais toujours moins efficace que l'Acarbose $5.7 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$. Après comparaison de la valeur d'IC50 du même alpha amylase humaine salivaire avec changement de méthode de détection, nous avons prouvé que cette nouvelle méthode est rapide, sensible et efficace.

Ces résultats sont accompagnés avec une étude bioinformatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de l'alpha amylase. Tous les résultats du Docking moléculaire ont confirmé l'étude *in vitro*.

L'ensemble de ce travail a permis donc de mieux connaître l'intérêt de l'étude des nouvelles substances biologiques. De même, la modélisation par amarrage moléculaire présente une actualité importante vis-à-vis sa rapidité en le comparant avec les tests *in vitro* ou *in vivo*.

L'objectif de cette étude ce n'est pas seulement de tester l'inhibition mais aussi de tester l'efficacité de la nouvelle méthode utilisée, Pour ce fait, on propose comme perspectives de ce modeste travail : De chercher et de tester autres médicaments, ainsi autres molécules extraites à partir des plantes qui peuvent inhiber l'alpha amylase ; et d'adopter cette méthode dans le cadre d'évaluer le pouvoir inhibiteur de ces molécules.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **A Stunkard(1986),J., Foch, T.T. & Hrubec, Z.** *A twin study of human obesity. J. Am. Med. Assoc, V256, P : 51–54*
- 2- **BagoraBayala. (2015).** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse de doctorat. UNIVERSITE BLAISE PASCAL. P : 27
- 3- **Benarous Khadidja. (2014).** Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de *Peganumharmala, Inonotushispidus, Marrubiumvulgare, Ziziphus lotus et Achilleasantolina* sur la lipase de *Candida rugosa*. L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE KOUBA-ALGER.P : 100
- 4- **Benarous Khedidja., Benguechoua Madjda and, Ghibeche Abderrahmane. (2018).** Anti-allergy Drugs as Potent Inhibitors of Lipase with StructureActivity Relationships and Molecular Docking. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry V17, P1-7*
- 5- **Benmeziane K, Sekfali B. (2017).** Pancréatite aigüe grave en réanimation. Université Abderrahmane Mira de Bejaia. P13
- 6- **Berry, D. R and Paterson .A.(1990).** Enzymes in food industry *In: Sucking C.J.(ed.), Enzymechemistry impact and application . Editions chapman and hall Lordon, 2nd edition.pp: 306-351.*
- 7- **B.L. Furman. (2017).** Acarbose. *Pharmacy and Biomedical Sciences. P: 1-3*
- 8- **Bogatcheva, N.V., Sergeeva, M.G., Dudek, S.M., and Verin, A.D. (2005).** Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvascular research V69, P : 107-127.*
- 9- **Brayer, G. D., Luo, Y., Withers, S. G. (1995).** The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci V4, P: 1730–1742.*
- 10- **BUSCAIL Louis., ESCOURROI Jean. (2009).** Pathologie pancréatique. [en ligne]. Toulouse : faculté de médecine. Disponible sur : <http://www.medecine.upstlse.fr/dcem3/module16/chap%204-Pancreas.2008-09.pdf> (consulté le 05.02.2019)
- 11- **Hung. C, .,J,hong.,J, Riyaphan.,S,Hung Lin .,Yi ,Chia., .,C,FengWeng.(2015).** Screening alpha-glucosidase and alpha-amylaseinhibitors from natural compounds by molecular docking in silico.

- 12-CDU-HGE, Collégiale Des Universitaires en Hépto- Gastro- Entérologie.** (2015).Hépto- gastro –entérologie Chirurgie digestif.,Chapitre 17 - Item 278 - UE 8.,Pancréatite chronique. 3^{ème}Editions Elsevier-Masson. P : 1
- 13-E Gonzalez . (2005). et al.** The influence of *CCL3L1* gene–containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* V307, P: 1434–1440.
- 14-Dauter, Z.et al., (1999).**Xary structure of the maltogenic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, novamyl, maltose and acarbose complexe at 1,7 Å resolution. *Biochem* V38, P : 8385-8392.
- 15-DAVIES, G.J., WILSON, K.S. ET HENRISSAT, B. (1999).** Nomenclature for sugar bindingsubsites in the glycosylhydrolases. *Biochem. J* V321,P: 557-559.
- 16-DEMERS, D. (2010).** Optimisation de méthodes chromogéniques pour l'évaluation d'enzymes pancréatiques en milieu pharmaceutique. Université du Québec à Montréal. P :5
- 17-Dubourg, A.G. (2014).** Etude des modifications structurales et fonctionnelles de l'albumine dans le diabète de type 2 : identification de biomarqueurs de glycoxydation et de facteurs de risque de complications vasculaires. Université de la Réunion. P23
- 18-GARY, D., BRAYER., YAOGUANG, LUO et STEPHEN, G. WITHERS. (1995).** The structure of human pancreatic a-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science* V4, P : 1730-1742.
- 19-Gaspar, P. Pinto., Natercia, F. Bras., Marta, A.S. Perez., Pedro, A. Fernandes., Nino Russo., Maria, J. Ramos, and MarirosaToscano. (2015).** Establishing the Catalytic Mechanism of Human Pancreatic α -Amylase with QM/MM Methods. *J. Chem. Theory Comput* V11, P : 2508-2516
- 20-GHIBECHE Abderrahmane. (2016).** Étude de l'effet inhibiteur de quelques médicaments antihistaminiques sur la lipase de *Candida rugosa*. P : 1-2
- 21-GRANDIN Matthieu. (2013).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Angers. P :17-21
- 22-Gregor, Mac E. A., Janacek, S and Svensson, B. (2001).**Relationship of sequence and structure to specificity in the a-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* V1546. P: 1–20.

- 23-GRISSA, Oussama. (2010).** Défenses antioxydants, inflammation et immunomodulation, au cours de diabète gestationnel, dans les compartiments maternel, fœtal et placentaire. Thèse de doctorat. L'Université de Bourgogne et de L'Université de Monastir. P :10
- 24-Gy S, Wélé A, Ndiaye M, Diatta W, Barbosa F S, Dièye A M, Touré M T, Bassène E, Faye B. (2008).** Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'Annonaréticulata (Annonaceae) sur l'œdème aigue de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, V15. P : 23 – 25
- 25-Haq I., Ahsraf H., Iabal J. and Qadeer M.A. (2003).** Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, *In: Behal A., Singh J., Sharama M.K., Pur P and Batra N., Characterisation of Alkaline α -Amylase from Bacillus sp AB 04. International Journal of Agriculture & Biology.*, **08**(1), p: 80-83.
- 26- Jalinière Hugo. (2014).** Obésité : la piste de la salive comme nouvelle cause génétique. Disponible sur https://www.sciencesetavenir.fr/sante/obesite-l-amylase-salivaire-une-nouvelle-cause-genetique_129770.(Consulté le 02 /02/1019)
- 27-Janecek, S. (1994).**Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal α -amylases. *Eur. J. Biochem* V224, P: 519–524
- 28-Jonathan Ribot. (2015).** Impact du diabète de type 2 sur la fonctionnalité et le potentiel angiogénique des cellules souches mésenchymateuses. Thèse de doctorat. Université Paris-Est. P :15-16
- 29-Kandra L., Gyemant G., Farakas E and Liptak A. (1997).** Action pattern of porcine pancreatic α -amylase on three different series of beta – maltooligosaccharide glycoside. *Carbohydr. Res* V289 (3), P: 237-242
- 30-Keating L., Kelly C. and Forgartry W. (1998).** Mechanism of action and the substrate dependant pH maximum shift of the α -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research.*, **309**, P: 311-318.
- 31-Klein AP, Beaty TH, Bailey-Wilson JE et coll. (2002).** Evidence for major gene influencing risk of pancreatic cancer, *Genet Epidemiol* V23 P: 133-49
- 32-L. Monassier .(2001).** Les antihistaminiques H1. Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie clinique.
- 33-Laoufi H., Benariba N*, Adjdir S., Djaziri R. (2017).** *In vitro* α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of *Ononis angustissima* extracts .V7 (02), pp. 191-198.

- 34-LAVERDET Betty. (2013).** Physiopathologie du pancréas : Rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse du pancréas exocrine. UNIVERSITE DE LIMOGES. P : 11
- 35-Louis Mathieu. (2010).** GESTION ET UTILISATION DES ANTI-INFLAMMATOIRES EN ODONTOLOGIE. Thèse de doctorant en chirurgie dentaire. UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY 1. P : 47
- 36-Mahsa Rahimzadeh., SamanehJahanshahi., SoheilaMoein and MahmoodRezaMoein. (2014).** Evaluation of alpha- amylase inhibition by *Urticadioica* and *Juglansregia*extracts. Iran J Basic Med Sci. 17(6), P: 465–469.
- 37-Martinez-Gonzalez A.I., Díaz-Sánchez Á.G., de la Rosa L.A., Bustos-Jaimes I., Alvarez-Parrilla E. (2018).** Inhibition of α -amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR). SpectrochimicaActa Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 206(2019), P : 437–447
- 38-Mazur, A. K etNakatani, H. (1993).** Multiple attack mechanisme in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine.Arch. Bioch. Biophysics. V306 (1), P: 29-38.
- 39-Mobini-Dehkordi Mohsen and JavanAfzalFahime.(2012).** Application of alpha-amylase in biotechnology. Journal of Biology and today's world V1, P: 39-50. molecular docking in silico. V41, P 242–251.
- 40-Mouas, Kamilia. (2016).** Extraction, purification et caractérisation d'une enzyme amylolytique issue de *Bacillus amylolique facien*. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P: 11
- 41-Muhammad Taha., Maryam Irshad., Syahrul Imran., Fazal Rahim., ManikandanSelvaraj., Noor Barak Almandil., AshikMosaddik., SrideviChigurupati., Faisal Nawaz., Nor Hadiani Ismailand Mohamed Ibrahim. (2019).** Thiazole Based Carbohydrazide Derivatives as α -Amylase Inhibitor and Their Molecular Docking Study. HeteroatomChemistry, V2019, 8 pages.
- 42-Muster, D., (Professeur associé, stomatologiste attaché consultant, pharmacien, docteur ès sciences physiques). (2005).** Médicaments de l'inflammation., Anti-inflammatorydrugs. EMC-Stomatologie V1, P : 21–29
- 43-Nielson, J. E., Borchert, T. V et Vriend. G. (2001).**The determinant of α -amylase pH-activity profiles. Protein Engineering. Oxford UniversityPress. V14 (7), P : 505-512.

- 44-OMS. (2002).** Diabète sucré. Aide-mémoire N°138, révisé avril 2002
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/fr/index.html>
- 45-Panchal C.J. (1990).** Yeasts strain selection. Marcel Dekker (ed) USA, pp: 189.
- 46-Pauline Pralong, (2017).** Les antihistaminiques. Service de dermatologie, photobiologie et allergologie CHU Grenoble-Alpes.
- 47- P. Pralong, (2017).** Les antihistaminiques. Service de dermatologie, photobiologie et allergologie CHU Grenoble-Alpes V9,P2-32
- 48-Schomburg, D and Salzmann, M. (1991).**Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases. Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg.Germany. pp: 1-12.
- 49-Scriban R. (1999).** Techniques et Documentation – Lavoisier. Biotechnologie. 5ème édition. (éd.). pp: 401-409
- 50-Scriban, R. (1999).** Techniques et Documentation-Lavoisier. Biotechnologies. 5^{ème} édition. pp: 149-157.
- 51-Srinivasa Rao M. Reddy G. Venkateswara Rao G and Sambasiva Rao K. R.S. (2004).**Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology.*, **4**, p: 289-291
- 52-Sudha Ponnusamy., Saikat Haldar., Fayaj Mulani., Smita Zinjarde., Hirekodathakallu Thulasiram., Ameeta RaviKumar.(2015).** Gedunin and Azadiradione: Human Pancreatic Alpha-Amylase Inhibiting Limonoids from Neem (*Azadirachta indica*) as Anti-Diabetic Agents. /journal.pone.0140113
- 53-Talia Serseg and Khedidja Benarous. (2018).** The Inhibitory Effect of Some Drugs on *Candida rugosa* Lipase and Human Pancreatic Lipase: *In vitro* and *In silico* Studies *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* **V18**, 000-000.
- 54- Wallach J. (1997).** Les enzymes. Sciences 128. Editions Nathan. P: 7-9
- 55-Wang, T.T., Lin, L.L. and Hsu, W.H. (1989).**Cloning and expression of *Schwanniomyces occidentalis*-amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **V55**(12), P: 3167-3172.
- 56-Zerrouki, Fodil. (2014).** Conception et réalisation d'une carte d'acquisition ambulatoire de transmission sans fil et de traitement de signaux biomédicaux. Mémoire de magister. UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU. P7

RÉSUMÉ

Notre travail s'inscrit dans le courant de la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'alpha amylase humaine cible thérapeutique validée pour le traitement des diabètes, pancréatite et obésité. À partir de ces approches, nous avons testé l'inhibition de l'alpha amylase salivaire humaine par quelques médicaments antihistaminiques et anti-inflammatoires. L'évaluation de l'activité inhibitrice de nos médicaments s'effectue en utilisant une nouvelle méthode qui a prouvé son efficacité, sa rapidité et sa sensibilité. Les résultats ont montré que Bétaméthasone présente une inhibition ($IC_{50} = 709 \pm 7 \mu\text{g/ml}$) nettement supérieure à celle de la Loratadine ($1033,1 \pm 1,20 \mu\text{g/ml}$), mais nettement inférieure à celle de l'Acarbose ($5,7 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats sont accompagnés par l'étude bio-informatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif des deux alphas amylases humaines (salivaire et pancréatique). Le docking moléculaire a donné les mêmes résultats que les études *in vitro* pour les molécules étudiées (Bétaméthasone, Loratadine). **Mots clés** : α -amylase salivaire humaine, α -amylase pancréatique, inhibition, anti-histaminiques, anti-inflammatoires, acarbose, Docking moléculaire.

Abstract

Our work is part of the search for new human alpha amylase inhibitors; Validated therapeutic target for the treatment of diabetes, pancreatitis and obesity. From these approaches, we tested the inhibition of alpha amylase by some anti-inflammatory and anti-allergy drugs. The evaluation of the inhibitory activity of our drugs is done using a new method this that has proved its sensitivity, quickness and effectiveness. The results showed that Betamethasone showed inhibition ($IC_{50} = 709 \pm 7 \mu\text{g/ml}$) clearly superior to that of Loratadine ($1033.1 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$) but significantly lower than that of Acarbose ($5.7 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$). These results are followed by the bioinformatics study by determining the mechanism of inhibition and the interactions performed with the amino acids of both active sites of both human alpha amylases (salivary and pancreatic). Molecular docking gave the same results as the *in vitro* studies for the studied molecules (Betamethasone, Loratadine).

Key words: Salivary α -amylase, pancreatic α -amylase, inhibition, antihistamine, anti-inflammatory, acarbose, molecular docking.

ملخص

يدخل عملنا هذا في سياق البحث عن مثبطات جديدة لأنزيم الألفا أميلاز البشري الذي يعتبر هدف علاجي مثبت في معالجة امراض السكري، التهاب البنكرياس و السمنة. من هذا المنطلق ، اختبرنا عملية تثبيط الألفا أميلاز اللعابي البشري باستعمال بعض الأدوية المضادة للهستامين والمضادة للالتهابات. تم تقييم النشاط التثبيطي لأدويتنا باستخدام طريقة جديدة التي أثبتت فعاليتها، سرعتها وحساسيتها. أظهرت النتائج أن البيتاميثازون قادر على تثبيط الانزيم بقيمة تصل الى (709 ± 7 ميكروغرام / مل) أعلى بكثير من اللوراتادين بقيمة (1033.1 ± 1.20 ميكروغرام / مل) ، ولكن أقل بشكل ملحوظ من الاكربوز ($5,7 \pm 0.10$ ميكروغرام / مل). ويرافق هذه النتائج دراسة بيومعلوماتية من خلال تحديد آلية التثبيط والتفاعلات التي أجريت مع الأحماض الأمينية الموجودة في الموقع الفعال للألفا أميلاز البشري (اللعابي والبنكرياسي). وقد اعطى الإرساء الجزيئي نفس النتائج كما هو الحال في الدراسات المخبرية للجزيئات المدروسة (بيتاميثازون و لوراتادين) .

الكلمات المفتاحية : الألفا أميلاز اللعابي؛ الألفا أميلاز البنكرياسي؛ تثبيط؛ مضادات الهستامين؛ مضادات الالتهاب؛ الأكاربوز؛ إرساء الجزيئي.