

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

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Biochimie des produits naturels*

### THEME

---

**Étude de l'effet inhibiteur de quelques médicaments  
antihistaminiques sur la lipase de *Candida rugosa***

---

**Présenté par : GHIBECHE Abderrahmane**

**Devant le jury :**

**Président(e) : Dr KHACHEBA IHCEN (MCB)**

**Rapporteur : Dr BENAROUS KHEDIDJA (MCB)**

**Co-Rapporteur : Dr BENGUECHOUA MADJEDA**

**Examinatrice : M<sup>elle</sup> BOUSSOUSSA HADJER (MAA)**

**Soutenu publiquement le : Jeudi 02 Juin 2016.**

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents, Mes frères et sœur, en reconnaissance de leur  
affection toujours constante*

*Tous mes proches*

*Mes chers amis*

*Mes camarades de promotion*

*Tous mes enseignants*

*Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.*

# REMERCIEMENTS

*Je remercie avant tout ALLAH- le tout puissant- de m'avoir guidé durant toute ma formation.*

*Je remercie sincèrement ma promotrice : Dr. Benarous Khadidja, Maitre de conférence à l'université Amar Thelidji de Laghouat pour son aide, son encouragement et pour ses conseils précieux pendant la période de la réalisation de ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier également, ma co-promotrice : Dr. Benguechoua Madjda, pour son aide précieux durant la réalisation de ce travail.*

*Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté de d'examiner ce travail.*

*Je ne pourrai pas terminer ces remerciements sans remercier ma famille pour l'aide et les encouragements qu'ils ont apporté le long de mes études et pour la patience qu'ils ont eu lors de longues soirées de travail.*

*Et enfin je tiens vivement à remercier tous mes chers amis.*

## RÉSUMÉ

Le présent travail a pour objectif, de mettre en évidence l'effet inhibiteur des dix médicaments connus comme des anti-histaminiques et anti-inflammatoires sur l'activité enzymatique de la lipase de *Candida rugosa* (LCR). Les résultats obtenus montrent que les médicaments ont un pouvoir inhibiteur contre la LCR avec un type compétitif pour sept médicaments et un seul est incompétitif. Les médicaments utilisés sont : le Restamine, Acide salicylique, Rifex, Histagan et Bétamétasone, Primalan, Zyrtec, Colchicine, Periactine et Kétotifène. Le médicament Restamine représente le meilleur effet d'inhibition avec une valeur d'IC50 de  $0,44 \pm 0,05$  mg/ml tandis que le médicament kétotifène a enregistré l'effet d'inhibition le plus faible avec une valeur de  $0,8 \pm 0,02$  mg/ml. Ces expériences ont montré que ces médicaments peuvent être utilisés pour traiter la candidose et l'acné.

**Mots clés :** lipase de *Candida rugosa* (LCR), inhibition, IC50, médicament, anti-histaminiques, anti-inflammatoires.

## ABSTRACT

This work aims to demonstrate the inhibitory effect of ten drugs known as antihistamines and anti-inflammatory on the enzymatic activity of *Candida rugosa* lipase (CRL). The results show that the seven drugs have inhibitory effects against the LCR with a competitive-type and only one is uncompetitive. The drugs used are: Restamine, salicylic acid, Rifex, Histagan, betamethasone, Primalan, Zyrtec, Colchicine, Periactine and Ketotifen. The Restamine drug represents the best effect of inhibition with an IC50 of  $0.44 \pm 0.05$  mg/ml while the drug ketotifen recorded the lowest inhibitory effect with a value of  $0.8 \pm 0.02$  mg/ml. These experiments showed that these drugs could be used to treat candidiasis and acne.

**Keywords:** *Candida rugosa* Lipase (CRL), inhibition, IC50, drug, antihistamines, anti-inflammatory.

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى إظهار تأثير التثبيط لعشرة من العقاقير المعروفة باسم مضادات الهيستامين والمضادة للالتهابات على النشاط الأنزيمي لليباز. وأظهرت النتائج أن سبعة من العقاقير لها تأثيرات مثبطة ضد الليباز مع نوع تنافسي ودواء واحد فقط هو ذو نوع لا تنافسي. الأدوية المستخدمة هي: الريستامين، حمض الساليسيليك، ريفاكس، الهيستاغان، بيتاميثازون، بريمالان، زيرتيك، الكولشيسين، البيريأكتين و الكيتوتيفين. اظهر الدواء الريستامين أفضل تأثير تثبيط مع قيمة ت، م =  $0.44 \pm 0.05$  ملغ / مل في حين سجل دواء الكيتوتيفين أدنى تأثير كمشبط بقيمة  $0.8 \pm 0.02$  ملغ / مل.

وأظهرت هذه التجارب أن هذه الأدوية يمكن أن تستخدم لعلاج داء المبيضات وحب الشباب

**الكلمات المفتاحية:** الليباز، تثبيط، التركيز المثبط (ت، م)، الادوية، مضادات الهيستامين، المضادة للالتهابات

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Le schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne.....	9
<b>Figure 2.</b> La courbe d'étalonnage réalisée par le p-nitrophénol .....	12
<b>Figure 3.</b> Représentation graphique de l'inhibition des médicaments de la réaction .....	16
<b>Figure 4.</b> La différence des radicaux latéraux (en rouge) des trois alcaloïdes naturels.....	18

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les antihistaminiques .....	5
<b>Tableau 2.</b> Les anti-inflammatoires .....	7
<b>Tableau 3.</b> Les paramètres cinétiques de la lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	12
<b>Tableau 4.</b> Les valeurs d'IC50, Ki et type inhibition des médicaments.....	17

## Liste des Abréviations

**C** : *Candida*

**H** : heure

**I%** : le pourcentage d'inhibition

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

**LCR** : lipase de *Candida rugosa*

**MeOH** : Méthanol

**p-NP** : Para nitrophénol

**p-NPL** : para nitrophényl-laurate

# Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	9
<i>MATÉRIELS ET MÉTHODES</i> .....	4
1. Médicaments .....	5
2. Activité enzymatique de la lipase .....	8
3. Protocole expérimental .....	9
3.1. Courbe d'étalonnage réalisée avec le p–nitrophénol .....	9
3.2 Tests d'inhibition de l'activité de la lipase .....	9
3.3. Étude de l'activité inhibitrice des extraits chimiques .....	10
3.4. L'analyse statistique.....	10
<i>RÉSULTATS ET DISCUSSION</i> .....	11
1. La courbe d'étalonnage de p-NP.....	12
2. Paramètres cinétiques déterminés pour la lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	12
3. Inhibition de la réaction catalysée par la lipase.....	12
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	20
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	22
ANNEXE .....	24

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

La découverte de nouveaux médicaments s'est longtemps limitée à l'observation empirique des effets produits par certaines substances naturelles sur le cours des maladies. C'est Paracelse au XVI<sup>e</sup> siècle qui prônera la nécessité d'un médicament spécifique pour chaque maladie. Avec la découverte du nouveau monde, les explorateurs rapporteront des grands principes actifs comme le quinquina, l'ipéca, le coca, le café etc. Grâce aux progrès de la chimie et de la physiologie, le XIX<sup>e</sup> siècle marque une étape nouvelle avec l'isolement des principes actifs : de l'opium, on isole la morphine puis la codéine ; de l'ipécacuana, on extrait l'émétine ; du quinquina, la quinine. La colchicine supplante le colchique et l'acide acétylsalicylique, l'écorce de saule. On dispose alors de la papavérine extrait du pavot, de la digitaline de *Law digitale* et de l'ergotonine de l'ergot de seigle. L'aspirine serait synthétisée en 1897 par Hoffman. Apparaîtront au début du XX<sup>e</sup> siècle la novocaïne en 1901, les antisiphilitiques en 1906 et les antipaludéens de synthèse en 1927. Mais l'ère moderne débute avec la découverte en 1937 de l'action antibactérienne des sulfamides (Chast, 1995).

Un médicament est un produit destiné à traiter une affection médicale grâce aux principes actifs qu'il contient. Un médicament peut être administré par voie orale, par injection, par voie rectale, par voie cutanée. Il peut se présenter sous forme de cachet, d'ampoule, de suppositoire, de pommade ou de sirop, entre autres. Le médicament peut être utilisé pour détruire des bactéries, pour soulager une douleur, pour diminuer un symptôme ou pour pallier une carence. Certains médicaments nécessitent une prescription médicale pour être délivrés, notamment en raison de leurs effets secondaires, de leur toxicité ou de leurs propriétés addictives (Hordé, 2015).

Il existe plus d'une dizaine de milliers de médicaments. Chaque médicament est utilisé dans un but précis et par des spécialités médicales différentes parmi les médicaments que nous avons utilisés : Les antihistaminiques, les anti-inflammatoires et un alcaloïde.

Les antihistaminiques sont des médicaments généralement administrés dans le cadre de traitement allergiques. Il en existe cependant deux types : les antihistaminiques H1 et H2.

Un antihistaminique est un médicament visant à réduire ou éliminer les effets de l'histamine. L'histamine est un médiateur chimique sécrété par l'organisme notamment lors de réactions allergiques. Sa principale fonction est de détruire les substances étrangères mais la molécule intervient aussi dans d'autres processus. L'antihistaminique est efficace contre certains symptômes de la crise allergique, parmi eux les démangeaisons, le nez qui coule, les yeux qui pleurent...etc

Les anti-inflammatoires sont 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.

Un alcaloïde dénomme de manière générique diverses molécules à bases azotées, le plus souvent hétérocycliques, très majoritairement d'origine végétale. En conséquence, les alcaloïdes peuvent se présenter sous forme de molécules organiques hétérocycliques azotées basiques. Associés à l'essor de l'industrie pharmaceutique, ils ont permis d'ouvrir le domaine des médicaments chimiques (Arshad et al., 2008 & Astulla et al., 2008).

La lipase de *Candida rugosa* (connues aussi sous le nom de *Candida cylindracea*) (LCR) est un biocatalyseur souple qui catalyse l'hydrolyse, l'alcoolyse, l'estérification et la transestérification des triacylglycérols et d'autres esters hydrophobes. Elle est largement appliquée dans une série d'applications biotechnologiques diverses comme la production des esters de carbohydrates des acides gras, la synthèse des produits pharmaceutiques et d'une multitude d'applications dans la production alimentaire (Pandey et al. 1999).

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 al, 1994).

L'inhibition de la lipase est un traitement de l'obésité et l'acné. L'obésité est l'un des facteurs de risque majeurs pour certain nombre de maladies chroniques, parmi lesquelles le diabète, les maladies cardio-vasculaires et le cancer. L'acné est une maladie de la peau qui touche principalement les adolescents.

Depuis 2007, nous travaillons sur l'inhibition de la lipase de *Candida rugosa* afin de traiter l'obésité et l'acné, par des extraits naturels et par des extraits isolés. Mais l'inconvénient se présente dans l'impossibilité d'utiliser ces molécules comme des médicaments vu le manque des études cliniques, *in vivo* et leur toxicité. De cette approche, nous avons pensé d'explorer des médicaments connus pour une activité bien déterminée et de savoir s'ils possèdent une activité inhibitrice de la lipase.

Dans notre étude, le choix des médicaments à étudier est effectué selon leurs structures chimiques, nous avons ciblé la présence des groupements fonctionnels comme hydroxyl et amine. Le choix s'est fixé sur les antihistaminiques à savoir : Restamine, Primalan, Zyrtec, Rifex, Periactine, Histagan, Kétotiféne, sur les anti-inflammatoires : Bétamétasone et Aspirin (Acide salicylique), et sur une anti-goutte : colchicine.

Notre mémoire commencera par une introduction générale. Deuxième, nous avons décrit tous le matériel et les méthodes utilisés et nous avons étudié le pouvoir inhibiteur des médicaments contre la lipase, suivies des résultats et leur discussion et se terminera par une conclusion générale.

L'objectif de ce travail se manifeste sur l'utilisation de ces médicament connus comme des anti-obésité et anti-acné.

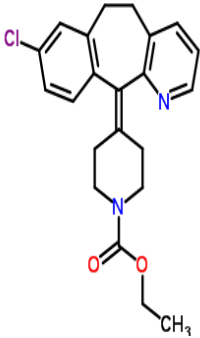
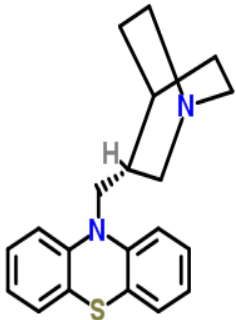
# *MATÉRIELS ET MÉTHODES*

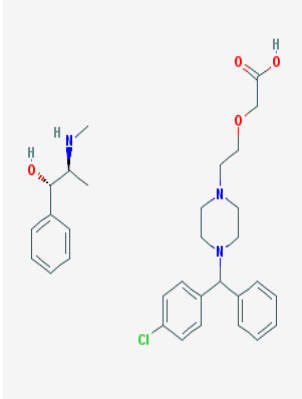
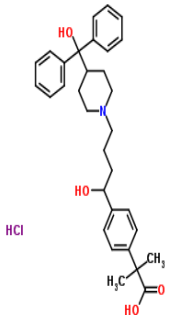
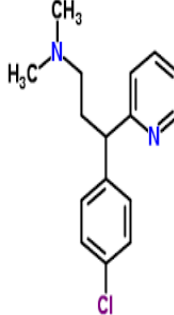
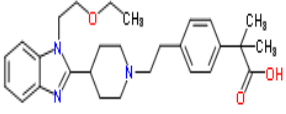
## 1. Médicaments

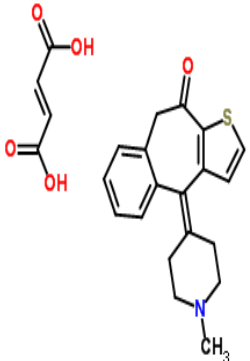
On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.

Les médicaments sont classés par familles dont chacune est associée à une spécialité médicale, les tableaux 1 et 2 regroupent les médicaments utilisés dans notre travail.

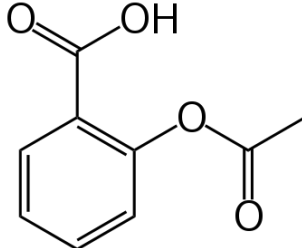
**Tableau 1.** Les antihistaminiques

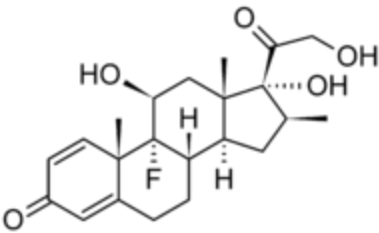
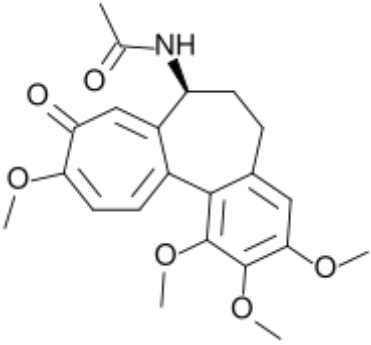
Médicaments, structure chimique du principe actif et Solubilité	Utilisation	Effets secondaires
<p>Restamine, Clarydine, loratidine, tirlor (comprimé de 10 mg).  <math>C_{22}H_{23}ClN_2O_2</math>; 382.88322 g/mol. Eau distillée</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Soulager les symptômes associés à la rhinite allergique tels que les éternuements, le nez qui coule ou qui démange, les yeux qui démangent ou larmoient.</li> <li>- Soulager les symptômes associés à l'urticaire chronique idiopathique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les plus fréquemment rapportés avec la restamine chez l'enfant de 2 à 12 ans sont les maux de tête, la nervosité et la fatigue.</li> <li>- les plus fréquemment rapportés chez l'adulte et l'adolescent sont la somnolence, les maux de tête, l'augmentation de l'appétit et des difficultés à dormir.</li> </ul>
<p>Primalan, <math>C_{20}H_{22}N_2S</math>;            322.46708 g/mol, MeOH</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Traiter les symptômes d'une rhinite allergique, d'une conjonctivite et/ou d'une urticaire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Arrêtez le traitement et consultez immédiatement un médecin si vous présentez des rougeurs cutanées, de l'eczéma, brusque gonflement du visage, signes d'excitation : agitation, nervosité, insomnie.</li> </ul>
<p>Zyrtec, <math>C_{31}H_{40}ClN_3O_4</math>; 554.12</p>	<p>Chez l'adulte et l'enfant à partir de 2 ans, Zyrtec est</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensations vertigineuses,</li> </ul>

<p>g/mol. Eau distillée.</p> 	<p>indiqué :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Traitement des symptômes nasaux et oculaires de la rhinite allergique saisonnière ou perannuelle.</li> <li>- Traitement des symptômes de l'urticaire.</li> </ul>	<p>maux de tête</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Diarrhée, nausées, sècheresse de la bouche.</li> <li>- Douleur abdominale.</li> <li>- Dépression, hallucinations, agressivité, confusion, insomnie.</li> </ul>
<p>Rifex 120 mg (fexofénadine), C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>ClNO<sub>4</sub> ; Eau distillée 538.1173 g/mol.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Traitement des symptômes tels que: éternuements, écoulement nasal et démangeaisons nasales, démangeaisons oculaires, larmoiement et rougeurs, typiquement associés au rhume des foins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maux de tête, somnolence, nausées, bouche sèche et vertiges.</li> <li>- La diarrhée, les troubles du sommeil, la nervosité, fatigue.</li> </ul>
<p>Histagan, C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub> ; Eau distillée (comprimé 2mg), MeOH, 274.78846 g/mol</p> 	<p>Traitement symptomatique des manifestations allergiques diverses : rhinite, conjonctivite, urticaire.</p>	<p>Effets neurovégétatifs :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Sédation ou somnolence.</li> <li>-sècheresse des muqueuses</li> <li>-palpitations cardiaques</li> </ul> <p>Réactions de sensibilisation</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Érythème, eczéma, prurit</li> </ul>
<p>Bilaxten 20 mg (bilastine), C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> ; MeOH 463.61168 g/mol,</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Soulage les symptômes de la rhinoconjonctivite allergique (éternuement, démangeaison nasale, écoulement nasal,...)</li> <li>- Soulager les symptômes de l'urticaire (démangeaisons cutanées).</li> </ul>	<p>Fréquents :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Maux de tête</li> <li>- Somnolence.</li> </ul> <p>Peu fréquents :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Modification du bilan sanguin hépatique</li> <li>- Sensations vertigineuses</li> <li>- Douleur au niveau de l'estomac</li> </ul>

<p>Kétotifène, Tiften, alerfene sirop (1mg/5ml) (comprimé 10mg), <math>C_{23}H_{23}NO_5S</math> ; Eau distillée. 425.49742 g/mol</p> 	<p>- Traitement de l'asthme, de la rhinite, des allergies de la peau, et l'anaphylaxie ;</p> <p>- Soulagement temporaire des démangeaisons de l'œil à cause de la conjonctivite allergique</p>	<p>- Maux de tête, - Injection conjonctivale - La rhinite</p>
--	--	---

**Tableau 2.** Les anti-inflammatoires

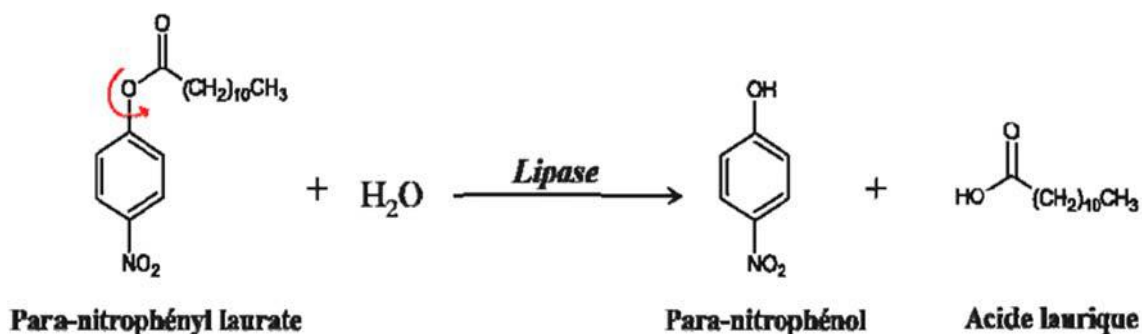
Médicaments, structure chimique du principe actif, Solubilité	Utilisation	Effets secondaires
<p>Aspirine = acide acétylsalicylique, <math>C_9H_8O_4</math> ; 180.15742 g/mol. Eau distillée.</p> 	<p>Chez l'adulte et à l'enfant à partir de 30 kg (environ 9 à 15 ans), l'aspirine est indiqué en cas de douleur et/ou fièvre tels que maux de tête, états grippaux, douleurs dentaires, courbatures.</p>	<p>- Réactions allergiques de type éruption cutanée - bourdonnements d'oreille, sensation de baisse de l'audition, maux de tête, vertiges : ces signes traduisent habituellement un surdosage de l'aspirine.</p>

<p>Celestene (betaméthazone) (0.5mg/1ml) liquide. <math>C_{22}H_{29}FO_5</math> ; Eau distillée 392.461063 g/mol</p> 	<p>Ce médicament est un corticoïde, il est indiqué dans certaines maladies, où il est utilisé pour son effet anti-inflammatoire.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les plus fréquemment rencontrés sont : gonflement et rougeur du visage, prise de poids</li> <li>- élévation de la tension artérielle</li> <li>- excitation et troubles du sommeil</li> <li>- modification de certains paramètres biologiques (sel, sucre, potassium), pouvant nécessiter un régime ou un traitement complémentaire.</li> </ul>
<p>Colchicine, <math>C_{22}H_{25}NO_6</math> ; 399.437 g/mol, Eau, MeOH</p> 	<p>Ce médicament est préconisé dans :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- le traitement et la prévention des crises de goutte,</li> <li>- la maladie périodique,</li> <li>- la maladie de Behçet,</li> <li>- autres accès aigus microcristallins.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Troubles digestifs (diarrhées, nausées, vomissements), urticaire, éruptions cutanées.</li> <li>- Azoospermie (absence de spermatozoïdes dans le sperme) et troubles neuro-musculaires réversibles à l'arrêt du traitement.</li> <li>Exceptionnellement troubles sanguins</li> </ul>

## 2. Activité enzymatique de la lipase

### 2.1. Principe de l'activité enzymatique de la lipase

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



**Figure 1.** Le schéma réactionnel de l'hydrolyse de p-NPL par la lipase microbienne

### 3. Protocole expérimental

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

À partir d'une solution préparée du p-nitrophénol de concentration 1mM, des solutions diluées ont été préparées avec des concentrations croissantes. Nous avons introduit 100µL de l'enzyme solubilisée dans un tampon de pH égale à 7, avec 100µL de méthanol ; et 900µL du p-NP des différentes concentrations et en fin, 100 µL de bicarbonate sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0,1M.

#### 3.2 Tests d'inhibition de l'activité de la lipase

Dans le but d'étudier l'effet de nos médicaments sur la LCR et de déterminer le paramètre d'inhibition IC<sub>50</sub>: la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50 % de l'activité enzymatique (IC<sub>50</sub>) nous avons procédé à la méthode décrite par Prim et *al.*, 2003 ; Ruiz et *al.*, 2006 (Benarous, 2010). Après avoir testé l'activité inhibitrice des médicaments pour deux concentrations (1 mg/ml et 2 mg/ml). On s'est intéressé par les médicaments qui ont donné une inhibition importante (> 50%) et pour lesquels nous avons procédé à la détermination du paramètre IC<sub>50</sub>.

Le milieu réactionnel contient 100 µl du médicament 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 concentrations différentes pendant 15 min, la réaction a été stoppée par l'addition de 100 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 0,1 M.

La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-1601 SHIMADZU à une longueur d'onde de 405 nm contre un blanc.

La valeur de IC<sub>50</sub> a été déterminée de la représentation graphique  $I \% = f(I)$  tel que I % est déterminée suivant cette relation :

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

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

- *A<sub>extrait</sub>* : l'absorbance de l'activité lipolytique en présence de l'extrait chimique.

- *A<sub>control</sub>* : l'absorbance de l'activité lipolytique en absence de l'extrait chimique.

### **3.3. Étude de l'activité inhibitrice des extraits chimiques**

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

$$K_i = \frac{IC50}{K_m/S + 1}$$

Pour cela, il faut varier la concentration en médicaments et en substrat. À partir de la courbe de la cinétique enzymatique, nous avons pu choisir trois concentrations du substrat (0,05mg/ml, 0,06mg/ml, 0,07mg/ml).

### **3.4. L'analyse statistique**

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

## *RÉSULTATS ET DISCUSSION*

### 1. La courbe d'étalonnage de p-NP

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

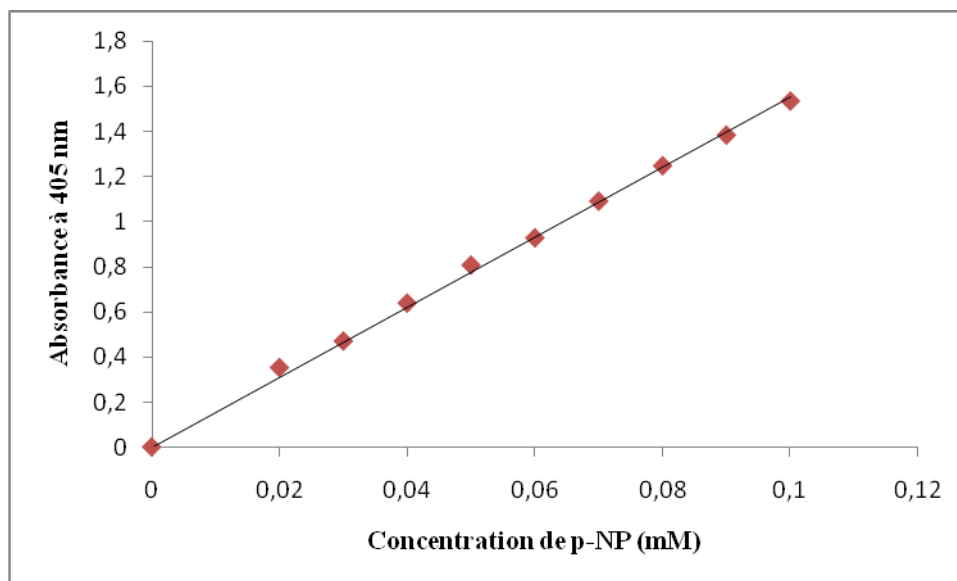


Figure 2. La courbe d'étalonnage réalisée par le p-nitrophénol

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

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

Les paramètres cinétiques de l'enzyme ( $K_{cat}$ ,  $K_m$ ) sont déterminés selon l'hypothèse d'une cinétique Michaelienne à l'aide de l'équation en double inverse de Lineweaver Burk [ $1/v=f(1/S)$ ]. D'après la représentation graphique de Lineweaver Burk, on peut alors déterminer la vitesse maximale  $V_{max}$ , la constante catalytique  $K_{cat}$  et la constante michaelienne  $K_m$ , et par conséquent on déduit l'efficacité de l'enzyme à partir du rapport  $K_{cat}/K_m$ . Le tableau suivant (Tableau 3) résume les valeurs obtenues de ces paramètres.

Tableau 3. Les paramètres cinétiques de la lipase de *Candida rugosa*.

$V_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$K_{cat}$ (Min <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$ (Min <sup>-1</sup> .mM <sup>-1</sup> )
0,08±0,01	0,50±0,26	13400±0,03	26800±0,05

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

### 3. Inhibition de la réaction catalysée par la lipase

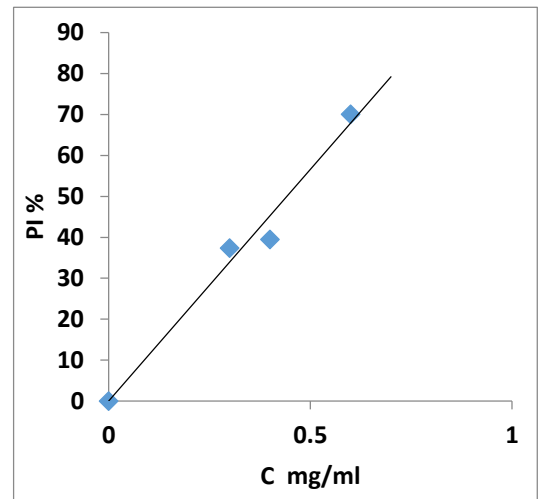
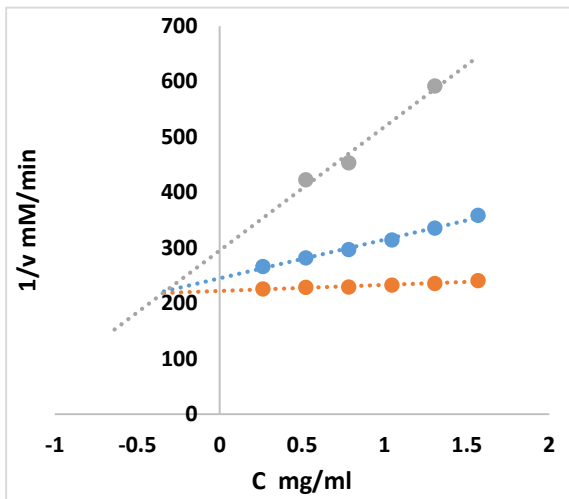
À partir de l'étude bibliographique sur la fonction physiologique de la lipase et le rôle de ses inhibiteurs dans le traitement de plusieurs maladies. Nous avons évalué le pouvoir inhibiteur de nos médicaments sur l'activité de cette enzyme dans le but de trouver des inhibiteurs de cet enzyme.

## ***Résultats et Discussion***

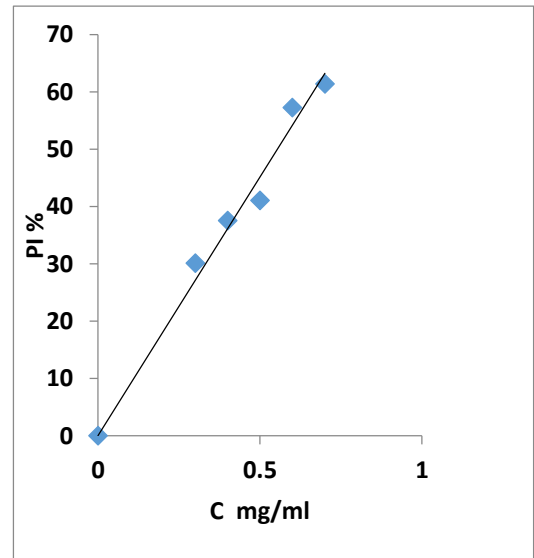
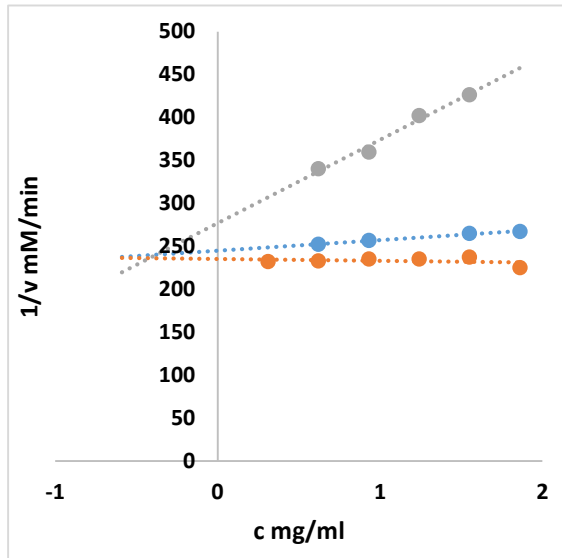
---

Les résultats obtenus montrent que les dix médicaments présentent un pouvoir d'inhibition vis-à-vis de la lipase avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 50%.

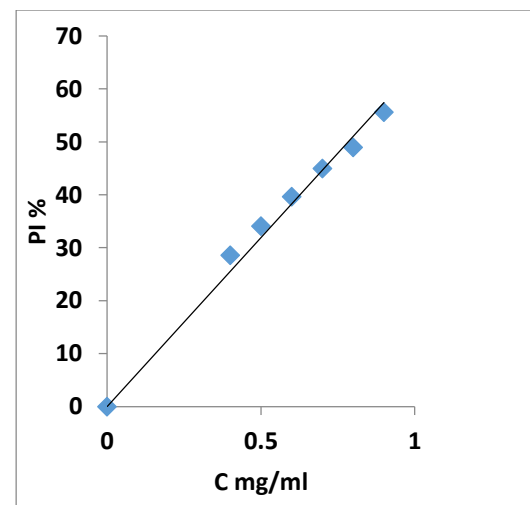
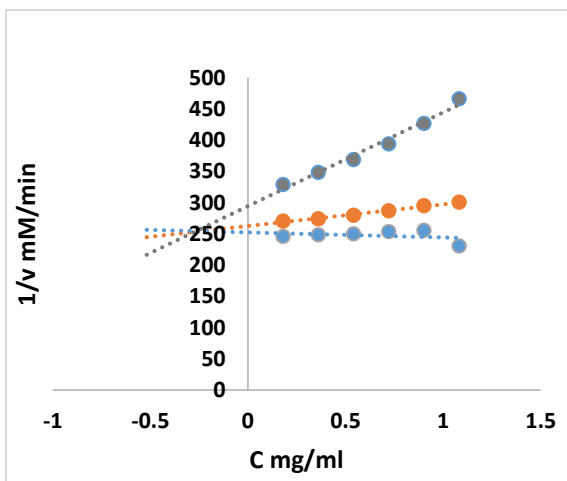
Restamine



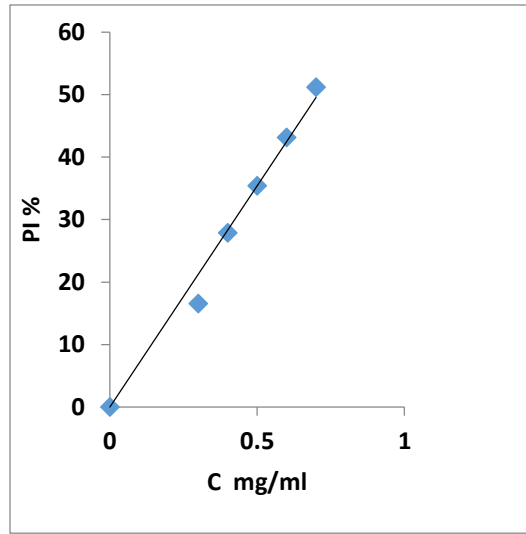
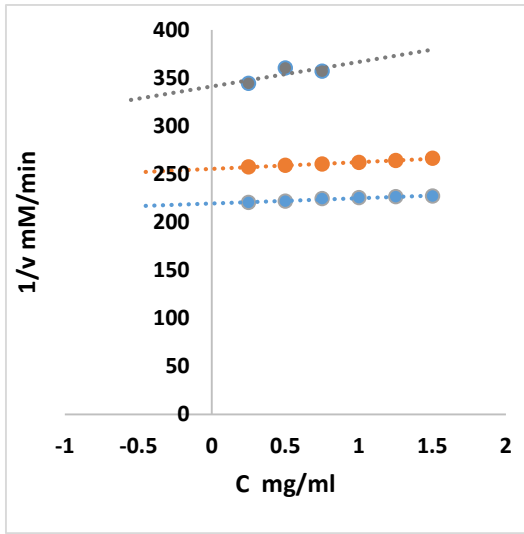
Primalan



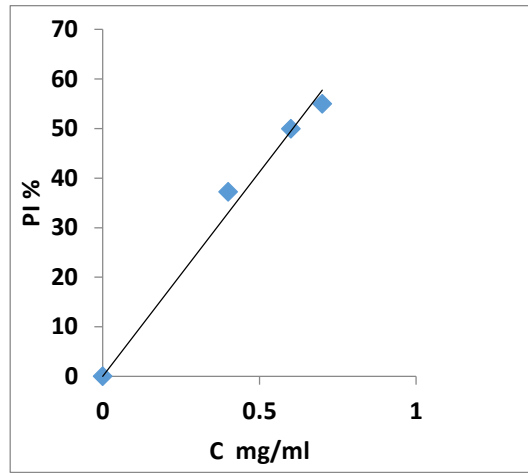
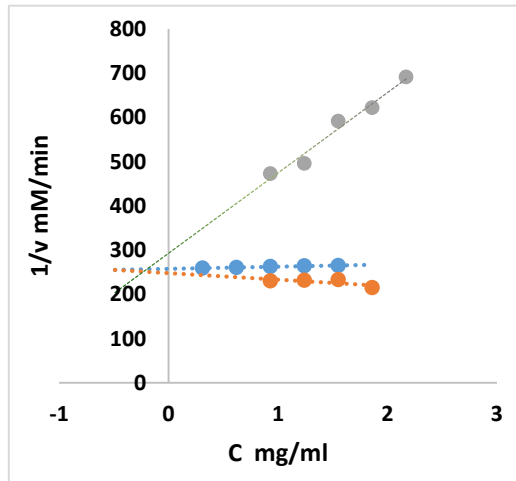
Zyrtec



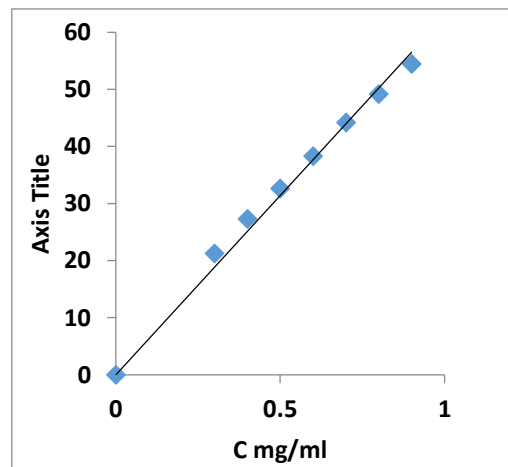
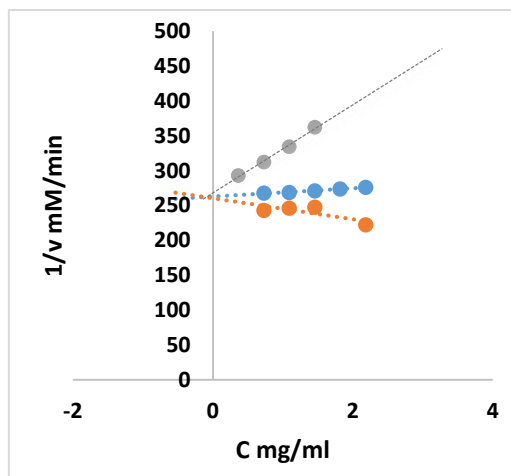
Colchicine



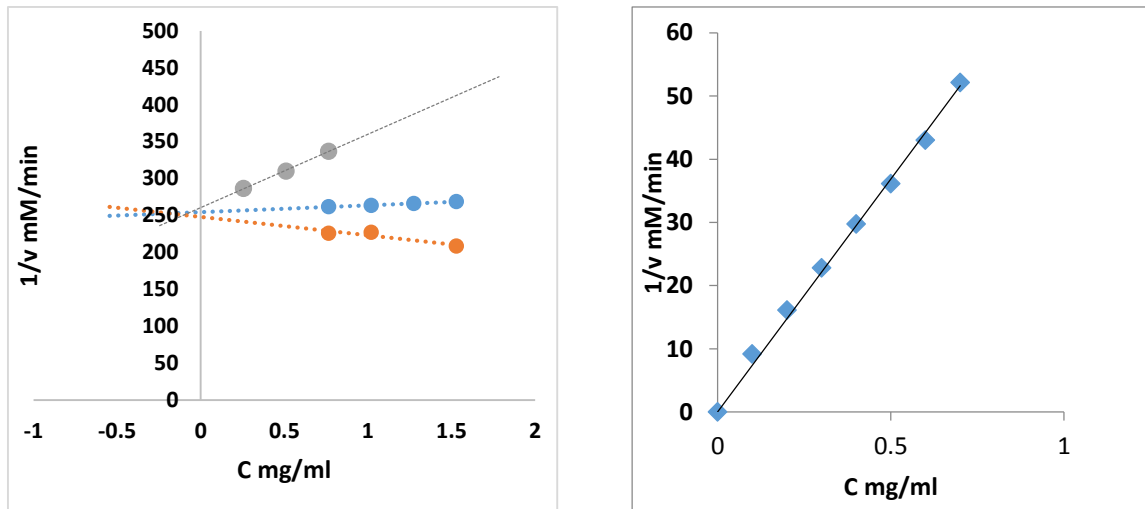
Périactine



Histagan



Bétamétazone



Kétotifène

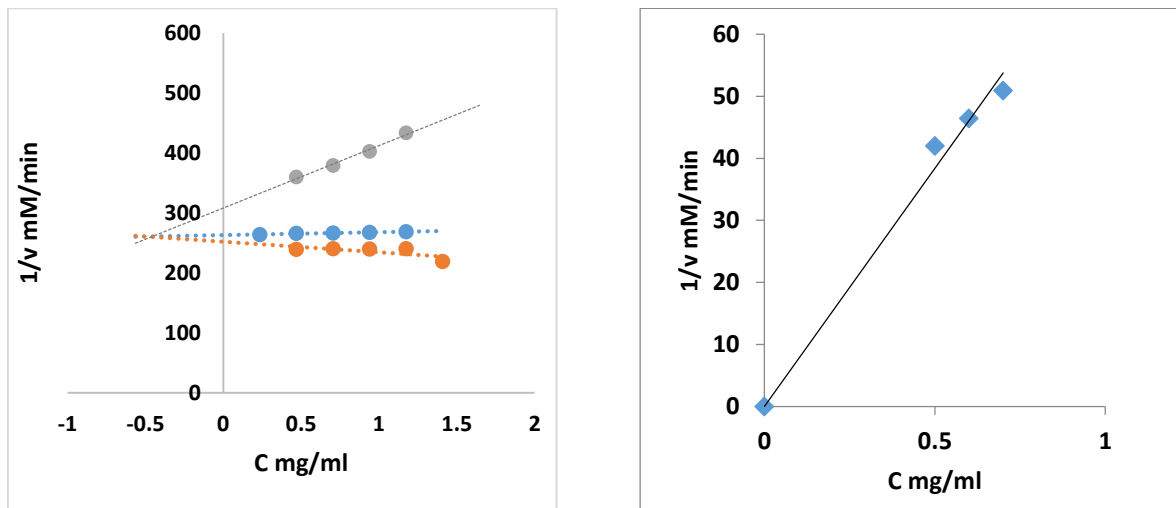


Figure 3. Représentation graphique de l'inhibition des médicaments de la réaction catalysée par lipase de *Candida rugosa*

Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition  $I\%$  en fonction des concentrations des médicaments exprimées en mg/ml pour une seule concentration de substrat (0,05 mM), nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de chaque échantillon (les courbes sont présentés dans la figure 3). Ces représentations graphiques nous permettent de déterminer les valeurs des IC50. Ainsi, nous avons calculé les  $K_i$  selon l'équation citée précédemment et à partir des représentations graphiques  $1/V=f(I)$  (figure 3). Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Les valeurs d'IC50, Ki et type inhibition des médicaments.

Médicaments	IC50 (mg/ml)	Ki (mg/ml)	Type d'inhibition
<i>Restamine</i>	0,441 ± 0,02	0,33 ± 0,03	Compétitive
<i>Primalan</i>	0,553 ± 0,05	0,20 ± 0,02	Compétitive
<i>Zyrtec</i>	0,783 ± 0,01	0,26 ± 0,00	Compétitive
<i>Colchicine</i>	0,706 ± 0,05	1,47 ± 0,01	incompétitive
<i>Periactine</i>	0,605 ± 0,03	0,20 ± 0,02	Compétitive
<i>Histagan</i>	0,796 ± 0,02	0,10 ± 0,03	Compétitive
<i>Bétamétasone</i>	0,677 ± 0,00	0,09 ± 0,00	Compétitive
<i>Kétotifène</i>	0,650 ± 0,04	0,47 ± 0,01	compétitive
<i>Acide acétylsalicylique</i>	/	/	/
<i>Rifex</i>	/	/	/

Les résultats obtenus montrent que tous les médicaments ont un pouvoir inhibiteur important de l'activité enzymatique de la lipase à l'exception de de l'acide acétylsalicylique et le rifex. Les valeurs des IC50 et Ki varient selon la nature et la structure chimique de chaque médicaments et les groupements fonctionnels que les constituent.

Le médicament le plus puissant inhibiteur est le restamine (IC50=0,441± 0,02 mg/ml), tandis que le plus faible se présente dans l'histagan. Les autres valeurs varient dans cet intervalle. D'une manière générale, ces médicaments sont des inhibiteurs puissants de la lipase de *Candida rugosa*.

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

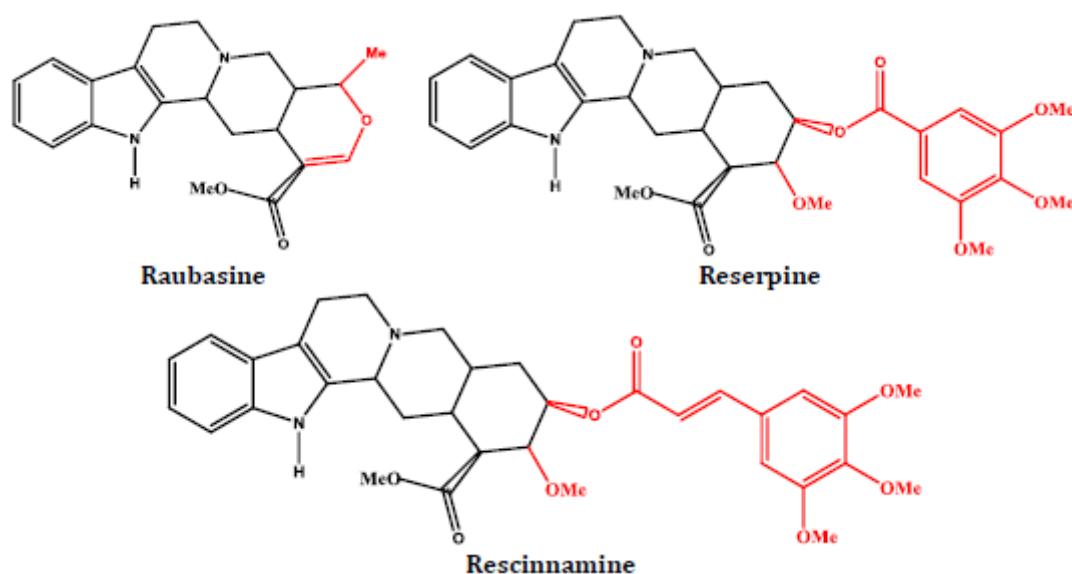
Beaucoup de recherches scientifiques ont été réalisées pour évaluer les effets anti-obésité, anti-acné et anti-candidose des extraits et des molécules isolées des plantes médicinales sur l'activité de la lipase, dans le but de trouver un nouveau médicament naturel traitant ces maladies sans effets secondaires. Dans cette étude, nous avons fait la même chose et nous voulons comparer nos médicaments par ces molécules isolées des extraits naturels par ces travaux antérieurs.

Les médicaments anti-acnés comme Chloramphénicol avec une valeur d'IC50= 0,2188 ± 0,0028 mg/ml (Batubara et al., 2009) est plus efficace que les médicaments étudiés. En revanche, le Tetracycline avec une valeur d'IC50 de 0,4713 ± 0,0055 mg/ml (Batubara et al., 2009) présente une efficacité similaire à celle du restamine (IC50=0,441± 0,02 mg/ml). Nous

proposons l'utilisation de restamine pour traiter l'acné en association avec d'autres médicaments.

Plusieurs molécules isolées des extraits naturels ont présenté leur pouvoir inhibiteur de la lipase à savoir : Vibralactone (b-lactone-type) isolé de *Boreostereum virans* (champignon) avec  $IC_{50} = 0,4$  mg/ml (Dong-Ze et al., 2006), cyclocariosides (dammarane saponines) isolé de *Cyclocarya paliurus* (*Juglandaceae*) avec  $IC_{50} = 9,10 \pm 0,00$  mg/ml (Kurihara, 2003), catéchine avec  $IC_{50} = 1,83 \pm 0,00$  mg/ml (Ruiz et al., 2006) et quercétine avec  $IC_{50} = 0,27 \pm 0,00$  mg/ml (Ruiz et al., 2006). Si nous comparons nos médicaments étudiés à ces molécules, nous pouvons dire que tous nos médicaments sont plus efficaces et présentent des effets inhibiteurs meilleurs que le cyclocariosides et la catéchine. Par contre, la quercétine a montré le meilleur effet inhibiteur par comparaison de nos médicaments.

Les alcaloïdes présentent des structures complexes et variées, cette complexité rend difficile de déterminer la famille des alcaloïdes possédant l'effet inhibiteur contre la lipase car il existe au sein de la même famille des indoles, un alcaloïde inhibiteur comme la rescinnamine et la reserpine et un autre qui ne possède aucun pouvoir inhibiteur comme la raubasine. Ces trois alcaloïdes portent le même noyau indole et ils se différencient dans les radicaux latéraux de chaque structure (figure 4), ces radicaux latéraux sont responsables à l'inhibition enzymatique (Ruiz et al., 2006, Benarous et al., 2013 et 2015).



**Figure 4.** La différence des radicaux latéraux (en rouge) des trois alcaloïdes naturels.

Les alcaloïdes déjà connus comme des inhibiteurs de la lipase sont : l'aspidospermine ( $IC_{50} = 0,35$  mg/ml), la rescinnamine ( $IC_{50} = 0,101$  mg/ml), la reserpine ( $IC_{50} = 0,24$  mg/ml), la trigonelline ( $IC_{50} = 2,74$  mg/ml), (les valeurs des  $IC_{50}$  ont été déterminées pour la lipase

## ***Résultats et Discussion***

---

de *Candida rugosa* et le p-nitrophényllaurate comme substrat) et la berbérine (Ruiz et al., 2006).

Si nous comparons ces valeurs des IC50 des alcaloïdes précédents avec celle de notre colchicine alcaloïdique, nous observons que notre médicament présente une inhibition moins importante avec une valeur de  $IC_{50} = 0,706 \pm 0,05$  mg/ml à l'exception de la trigonelline.

Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois *in vitro*, l'effet inhibiteur des médicaments anti-histaminiques et anti-inflammatoire sur la lipase de *Candida rugosa*.

En conclusion, tous ces tests d'activités sont insuffisants, car l'étude des mécanismes d'inhibition est nécessaire par l'outil bioinformatique.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

Par l'étendue des domaines de recherches impliqués actuellement, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'effet inhibiteur de quelques médicaments contre la lipase afin de les sélectionner pour une étude chimique approfondie. Le choix tactique de ces médicaments est basé sur quelques données pharmacologiques indiquant leur utilisation contre certaines maladies.

Le présent travail a porté sur l'étude des médicaments antihistaminiques et anti-inflammatoires suivants : Restamine, Primalan, Zyrtec, Colchicine, Rifex, Periactine, Histagan, Kétotifène, Bétamétasone et l'Acide salicylique.

Les résultats obtenus au travers de ce test montrent que tous les médicaments présentent des effets inhibiteurs très importants. Les valeurs des constantes d'inhibition ( $K_i$ ) ainsi obtenus, montrent que ces médicaments peuvent être investiguées dans des études bioinformatiques pour déterminer le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de la lipase.

Ces résultats importants nous ont encouragés de sélectionner ces médicaments pour les tester sur les différents autres types de lipases afin de voir leur effet inhibiteur. Ainsi, il y a un grand nombre de médicaments disponibles sur le marché dont nous les consommons pour certaines maladies, nous proposons de les tester contre la lipase afin d'étudier d'autres possibilités de leurs utilisations, en prenant en considération que toutes les études des effets indésirables et toxicité est déjà disponible sur leurs notices.

.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Arshad, N., Zitterl-Eglseer, K., Hasnain, S., Hess, M., 2008. Effect of Peganum harmala or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytother. Res.* 22, 1533–1538.

Astulla, A., Zaima, K., Matsuno, Y., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Cholies Zaini, N., Morita, H., 2008. Alkaloids from the seeds of Peganum harmala showing antiplasmodial and vasorelaxant activities, *J Nat Med.*, 62: 470–472.

Barros RJ1, Moura-Pinto PG, Franssen MC, Janssen AE, de Groot A. 1994. Regioselectivity and fatty acid specificity of *Chromobacterium viscosum* lipase. *Bioorg Med Chem.* 2(7):707-13.

Batubara, I., Mitsunaga, T., Ohashi, H., 2009. Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities, *J Wood Sci.* 55, 230-235.

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.

Chast. F., 1995. Histoire contemporaine des médicaments. Paris : Éd de la découverte, coll. Histoire des sciences, 1995.

Dong-Ze, L., Fei, W., Tou-Gen, L., Jian-Guo, T., Wolfgang, S., 2006. Vibralactone: a lipase inhibitor with an unusual fused lactone produced by cultures of the Basidiomycete *Boreostereum vibrans*, *Org. Lett.* 8: 5749-5752.

Hordé, P., 2015. Médecine-santé.fr. site web: ([www.sante-medecine.commentcamarche.net](http://www.sante-medecine.commentcamarche.net))

Kurihara, H., 2003. Hypolipemic effect of *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja in lipid-loaded mice, *Biol. Pharm. Bull.* 26: 383–385.

Pandey A1, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem.* 29 ( Pt 2):119-31.

Prim, N., Sánchez, M.M., Ruiz, C., Pastor, F.I.J., Díaz, P., 2003. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *J. Mol. Catal., B: Enzym.* 22: 339–346.

Rogalska E1, Ransac S, Verger R. 1993. Controlling lipase stereoselectivity via the surface pressure. *J Biol Chem.* 15;268(2):792-4

Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Villo, L., Nicolosi, G., Javier Pastor F.I., Diaz, P., Saso, L., 2006. inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids, *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic.* 40: 138-143.

# ANNEXE

## Les structures tridimensionnelles des médicaments étudiés

