

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LAGHOUAT



DEPARTEMENT : SCIENCES NATURELLES

MEMOIRE DE MAGISTER

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option : Valorisation des bio-ressources végétales

THEME DU PROJET :

Études *in vitro* et *in silico* de l'inhibition de la lipase par quelques molécules et extraits naturels de plantes pour le traitement de l'obésité

Présenté par :
Talia SERSEG

Dirigé par :
Dr Khedidja BENAROUS

DEVANT LES MEMBRES DU JURY

M. Mohamed Yousfi	Pr	Université de Laghouat	Président
M. Amar Djeridane	Pr	Université de Laghouat	Examineur
M ^{me} Ihcen Khacheba	M.C.A	Université de Laghouat	Examineur
M ^{me} Khedidja Benarous	M.C.A	Université de Laghouat	Directeur de mémoire

Année universitaire 2017/2018

À mes parents

À mes frères et mes sœurs

À chaque personne qui m'inspire

Remerciements

En premier lieu je tiens d'abord à remercier dieu tout puissant de m'avoir permis de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma promotrice Madame *Dr. Khedidja BENAROUS* pour avoir accepté la direction de ce mémoire, et pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé, et avec qui j'ai établi une relation de confiance.

Je tiens également à remercier Monsieur *Pr Mohamed YOUSFI*, directeur du laboratoire des sciences fondamentales, Université Amar Telidji de Laghouat pour pour m'avoir accueillir au sein du laboratoire des sciences fondamentales de l'université Amar Telidji Laghouat.

J'adresse aussi mes vifs remerciements au président du jury, Monsieur *Pr Mohamed YOUSFI*, vous me faites l'honneur d'avoir bien voulu présider ce jury. Un grand merci s'adresse aux Monsieur *Pr Amar Djeridane* et Madame *Dr Ihcen Kacheba* ; Je vous adresse mes plus vifs remerciements pour avoir accepté d'être mes examinateurs.

Je tiens également à remercier mes parents, mes frères et mes sœurs pour leur aide et soutien.

Je tiens également à remercier Monsieur *Mostapha Hadjoudja*, responsable des laboratoires de département de biologie, Université Amar Teliji de Laghouat, ainsi tous les ingénieurs des laboratoires pour leur aide inestimable.

J'aimerais également remercier vivement et infiniment mes chers collègues et amies Fatiha HEFAID, LINANI Fatna Narimane et BOUAZARA Safia pour ses aide et soutien, ainsi, ses bienveillance et ses humour auront été fort utiles.

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé de loin ou de près.

Résumé

La recherche des principes actifs à partir des différentes sources font l'objet de plusieurs des recherches scientifiques et médicales. À partir de cette perspective, nous avons testé l'inhibition de la lipase par plusieurs extraits naturel des plantes médicinales : *Globularia alypum*, *Teucrium polium*, *Ajuga iva*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, des molécules provenant d'une source synthétique : l'acide folique, febuxostat, l'acide ascorbique, l'acide benzoïque, l'acide citrique, l'acide gallique, l'acide oxalique et les huiles essentielles : l'huile de la menthe, l'huile de la Cannelle, l'huile de giroflier. Dans la première partie, nous avons estimé la quantité des composés phénoliques et flavonoïdes dans ces extraits des plantes. Les résultats ont montré que ces plantes contiennent une quantité considérée des composés phénoliques dont les teneurs dans les extraits d'acétate d'éthyle varient entre $0,52 \pm 0,04$ mg/g et $1,87 \pm 0,07$ mg/g équivalent de l'acide gallique, pour les flavonoïdes, les teneurs dans les extraits d'acétate d'éthyle varient entre $0,26 \pm 0,02$ mg/g et $1,40 \pm 0,01$ mg/g équivalent de la quercétine. Dans la deuxième partie, nous avons étudié leurs effets inhibiteurs de l'activité de la lipase de *Candida rugosa*, les résultats ont confirmé la capacité de ces plantes à inhiber l'enzyme avec des valeurs varient de IC₅₀ de $1,33 \pm 0,10$ mg/ml à $2,50 \pm 0,01$ mg/ml, à l'exception de la plante *Ajuga iva* qui ne possède aucune activité inhibitrice. Les médicaments dérivés des composés naturels avaient la meilleure activité inhibitrice, suivis par les huiles essentielles avec des valeurs de IC₅₀ de 0,64 mg/ml à 1,78 mg/ml. Les acides organiques possèdent une activité inhibitrice plus faible que les autres molécules. Nous avons confirmé ces résultats avec les expériences *in silico*. Le docking moléculaire a donné les mêmes résultats que les études *in vitro*. Toutes les molécules étudiées possèdent la capacité d'inhiber les deux enzymes, sauf que la colchicine ne présente aucune activité d'inhibition sur la lipase pancréatique humaine. Dans la dernière partie, nous avons pu isolé une molécule à partir de *J. phoenicea*, et nous avons confirmé qu'elle a un bon pouvoir d'inhiber la lipase de *Candida rugosa* avec une valeur de IC₅₀= $0,71 \pm 0,07$ mg/ml.

Les mots clés : *Juniperus phoenicea* ; les huiles essentielles ; les composés phénoliques ; inhibition ; lipase de *Candida rugosa* ; lipase pancréatique humaine; *in vitro* ; *in silico*.

Abstract

The search for active components from different sources is the subject of many scientific and medical researches. From this perspective, we proposed several molecules from a natural source: the folic acid, febuxostat, ascorbic acid, benzoic acid, citric acid, gallic acid, oxalic acid, and essential oils: mint oil, cinnamon oil, clove oil, and medicinal plants: *Globularia alypum*, *Teucrium polium*, *Ajuga iva*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, in the first part we estimated the amount of phenolic compounds and flavonoids in these plants. The results showed that these plants contain a considered amount of phenolic compounds whose contents in ethyl acetate extracts vary between $0,52 \pm 0,04$ mg / g and $1,87 \pm 0,07$ mg / g equivalent of gallic acid, in the case of flavonoids, the levels in the extracts of ethyl acetate extracts vary between $0,26 \pm 0,02$ mg / g and $1,40 \pm 0,01$ mg / g equivalent of quercetin. In the second part, we studied its inhibitory effect on the activity of bacterial lipase, the results confirmed the capacity of these plants to inhibit the enzyme with a value of IC_{50} $1,33 \pm 0,10$ mg / ml and $2,50 \pm 0,01$ mg / ml, with the exception of *Ajuga iva* which has no inhibitory activity. We investigated the inhibitory effect of other molecules on *Candida rugosa* lipase. Drugs derived from natural compounds had the best inhibitory activity, followed by essential oils with an IC_{50} value of 0,64 mg / ml to 1,78 mg / ml. Organic acids have lower inhibitory activity than other molecules. We confirmed these results with in silico experiments. Molecular docking gave the same results as in vitro studies. All the molecules studied have the ability to inhibit both enzymes, except that the colchicine has no inhibitory activity on human pancreatic lipase, in the end we have isolated a molecule from *J. phoenicea*, and we have confirmed that it has a good ability to inhibit *Candida rugosa* lipase with a value of $0,71 \pm 0,07$ mg / ml.

Keywords: *Juniperus phoenicea*; essential oils ; phenolic compounds; Inhibitory activity; lipase of *Candida rugosa*; human pancreatic lipase; in vitro; in silico.

المخلص

البحث عن الأدوية الفعالة من المصادر المختلفة يأخذ اهتماما كبيرا في البحوث الطبية والعلمية من هذا المنطلق اقترحنا دراسة الفعالية التثبيطية لعدة جزيئات ذات مصادر طبيعية: حمض الفوليك، فيبوكسات، حمض الأسكوربيك، حمض البنزويك، حمض الستريك، حمض الغاليك، حمض الأوكزاليك. والزيوت العطرية: زيت النعناع، زيت القرفة، زيت القرنفل والنباتات الطبية: تسلغة، جعيدة، شندقورة، تاقا والعرعار، في الجزء الأول قمنا بتقدير كمية المركبات الفينولية والفلافونويدات في هذه النباتات. أظهرت النتائج أن هذه النباتات تحتوي على كمية معتبرة من المركبات الفينولية حيث تتراوح قيمها في مستخلصات خلاصات الايثيل بين 0.04 ± 0.52 مغ/غ و 0.07 ± 1.87 مغ/غ مكافئ حمض الغاليك، أما بالنسبة للفلافونويدات فتتراوح قيمها في مستخلصات خلاصات الإيثيل بين 0.02 ± 0.26 مغ/غ و 0.01 ± 1.40 مغ/غ مكافئ الكيرسيتين. في الجزء الثاني تم دراسة تأثيرها التثبيطي لنشاط الليباز الفطري وقد أثبتت النتائج امتلاك النباتات المدروسة القدرة التثبيطية للإنزيم بنسبة بين 0.10 ± 1.33 مغ/مل و 0.01 ± 2.50 مغ/مل ما عدا الشندقورة التي لا تملك نشاط تثبيطي. كما قمنا بدراسة التأثير التثبيطي لجزيئات أخرى على نشاط الليباز الفطري. أفضل نشاط تثبيطي كان للأدوية المشتقة من مركبات طبيعية، ثم الزيوت العطرية بقيمة تثبيط نصفي 0.64 مغ/مل - 1.78 مغ/مل. تملك الأحماض العضوية نشاط تثبيطي أضعف من الجزيئات الأخرى. أثبتنا هذه النتائج بالتجارب في السيليكون حيث تبين تطابق النتائج التجريبية مع الإرساء الجزيئي. تمتلك كل الجزيئات المدروسة القدرة على تثبيط الإنزيم، إلا أن الكولشسين لا يملك نشاط تثبيطي لليباز البنكرياسي وفي الأخير تمكنا من عزل جزيئة من العرعار وتم اثبات امتلاكها قدرة جيدة على تثبيط إنزيم الليباز البكتيري بقيمة 0.71 ± 0.07 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: الزيوت العطرية، المركبات الفينولية، التثبيط الإنزيمي، الليباز الفطري، الليباز البنكرياسي، الإرساء الجزيئي، السمنة.

Liste des travaux scientifiques achevés dans le cadre de ce mémoire

- **Communications internationales**

- 1- **Talia SERSEG**, Khedidja BENAROUS; Inhibitory effects of some drugs on Lipase for Obesity treatment. 4th International Conference On Computational And Experimental Science And Engineering (ICCESEN-2017) 4-8 October 2017, ANTALYA-TURKEY.
- 2- **Talia SERSEG**, Khedidja BENAROUS; Inhibition of Candida rugosa Lipase by Teucrium polium L: In silico and in vitro studies. Séminaire International sur : Phytodiversité et Plantes d'intérêt écologique et économique en Algérie Inventaire, Conservation et Valorisation (SIPA.ICV17) 29-30 October 2017, M'SILA-ALGERIA.

Liste des abréviations

AA : acide aminé

AI : *Ajuga iva*

Ac-O-Et : acétate d'éthyle

Acét : acétone

CCM : chromatographie sur couche mince

EtOH : éthanol

Fv tot : flavonoïdes totaux en équivalent de la quercétine

GA: *Globularia alypum*

Hex: hexane

I % : le pourcentage d'inhibition

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

IR : infrarouge

JO : *Juniperus oxycedrus*

JP : *Juniperus phonicea*

LCR : Lipase de *Candida rugosa*

LPA : lipase pancréatique humaine

MeOH: méthanol

ND : non déterminé

phé tot : phénols totaux

phé : phénols

p-NP : p-nitrophénol

p-NPL : para nitrophényl-laurate

TP : *Teucrium polium*

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification botanique de <i>Globularia alypum</i>	6
Tableau 2. Classification botanique de <i>Teucrium polium</i>	10
Tableau 3. Classification botanique de <i>Ajuga iva</i>	13
Tableau 4. Classification botanique de <i>Juniperus oxycedrus</i>	16
Tableau 5. Classification botanique de <i>Juniperus phoenicea</i>	19
Tableau 6. Les parties utilisées des plantes et leur informations géographique, lieu de récolte.	27
Tableau 7. la masse et la teneur de chaque extrait végétal.....	30
Tableau 8. Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits.....	31
Tableau 9. Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits de la littérature.....	34
Tableau 10. Les classes et types des flavonoïdes en se basant sur la couleur et les valeurs de Rf des spots obtenus à partir de la chromatographie des extraits.....	37
Tableau 11. Les Couleurs caractéristiques et Rf des spots et les Composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Globularia alypum</i> identifiés par CCM.....	39
Tableau 12. Les Couleurs et caractéristique et Rf des Spot et les Composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Teucrium polium</i> (TP) identifiés par CCM.	41
Tableau 13. les Couleurs et caractéristique et Rf des spots et les composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Ajuga iva</i> (AI) identifiés par CCM.	43
Tableau 14. Les couleurs, caractéristiques et Rf des spots et les composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Juniperus oxycedrus</i> (JO) identifiés par CCM.	45
Tableau 15. les couleurs, caractéristiques et Rf des spots et les composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Juniperus phoenicea</i> (JP) identifiés par CCM.	48
Tableau 16. Les varleus de Rf des quelque molécules, selon la littérature la phase mobile (Ac-O-Et/MeOH/Eau 10:1,35:1).....	51
Tableau 17. les différents cas d'IMC selon la gravité de chaque cas ((. WHO 2000).....	60
Tableau 19. Valeurs IC50 pour divers extraits et molécules étudiées sur la lipase LCR.....	72
Tableau 20. Les valeurs de IC50 de quelques extraits selon la littérature.....	79
Tableau 21. Les résultats du docking et le nombre des répétitions (<i>C. rugosa</i> lipase)	91
Tableau 22. Les résultats du docking et les nombre des répétitions pour la lipase pancréatique humaine	92

Liste des figures

Figure 1. Les parties aériennes de la plante <i>Globularia alypum</i> . (Jean 2002)-----	7
Figure 2. Répartition géographique de <i>Globularia alypum</i> -----	8
Figure 3. Les parties aériennes : les feuilles et les fleurs de la plante <i>Teucrium polium</i> (Jean 2002)-----	11
Figure 4. Répartition géographique de <i>Teucrium polium</i> -----	11
Figure 5. Les parties aériennes : les feuilles et les fleurs de la plante <i>Ajuga iva</i> (Jean 2002)-----	13
Figure 6. Répartition géographique de la plante <i>Ajuga iva</i> -----	14
Figure 7. Les parties aériennes de la plante <i>Juniperus oxycedrus</i> (Jean 2002)-----	16
Figure 8. Répartition de <i>Juniperus oxycedrus</i> -----	17
Figure 9. Les parties aériennes de la plante <i>Juniperus phoenicea</i> (Jean 2002)-----	19
Figure 10. Répartition géographique de <i>Juniperus phoenicea</i> -----	20
Figure 11. La relation entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire (Abed 2007)-----	22
Figure 12. Structure chimique du phénol-----	23
Figure 13. Production des phénylpropanoïdes à partir de la phénylalanine (Naczek et Shahidi 2004)-----	24
Figure 14. Classification générale des composés phénoliques (Naczek et Shahidi 2004) (Vermerris et Nicholson 2006)(Benarous2010) (Khoddami, Wilkes et Roberts 2013)-----	25
Figure 15. Structure générale des flavonoïdes-----	26
Figure 16. Les régions de la récolte-----	27
Figure 17. Les courbes d'étalonnage réalisé avec : la quercétine (à droite), acide gallique (à gauche)-----	31
Figure 18. CCM préliminaires de l'extrait de <i>Globularia alypum</i> (GA) développement AcOEt / MeOH / H ₂ O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm) avant et après l'ajout le réactif.-----	38
Figure 19 CCM préliminaires de l'extrait de <i>Teucrium polium</i> (TP) développement AcOEt / MeOH / H ₂ O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm) avant et apres l'ajout le reactif.-----	41
Figure 20. CCM préliminaires de l'extrait d' <i>Ajuga iva</i> (AI) développement AcOEt / MeOH / H ₂ O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm) avant et apres l'ajout le réactif.-----	43
Figure 21. CCM préliminaires de l'extrait de <i>Juniperus oxycedrus</i> (JO) développement AcOEt / MeOH / H ₂ O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm) avant et après l'ajout le réactif.-----	45
Figure 22. CCM préliminaires de l'extrait de <i>Juniperus phoenicea</i> (JP) développement AcOEt / MeOH / H ₂ O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm) avant et après l'ajout le réactif.-----	47
Figure 23. CCM préliminaires des extraits de GA, TP, JO, JP et AI développement en AcOEt / MeOH / H ₂ O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm) avant et après l'ajout de AlCl ₃ -----	50
Figure 24. La répartition de l'obésité dans le monde (Pearce et Witten 2010)-----	59
Figure 25. La structure chimique de l'orlistat-----	61
Figure 26. La dégradation des triglycéride dans le tube gastrique (de la Garza, et al. 2011)-----	62
Figure 27. La structure de la lipase (Leticia, et al. 2012)-----	63
Figure 28. Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester-----	64
Figure 29. Les structures chimiques des médicaments-----	67
Figure 30. Les structures chimiques des acides étudiés-----	68
Figure 31. Hydrolyse de p-NPL par lipase <i>Candida rugosa</i> (Benarous 2014)-----	69
Figure 32. La courbe d'étalonnage de p-NP-----	71
Figure 33. Représentations graphiques de l'inhibition des extraits de la lipase de <i>Candida rugosa</i> -----	73
Figure 34. Représentations graphiques de l'inhibition des molécules de la lipase de <i>Candida rugosa</i> -----	74
Figure 35. Les acides aminés du site actif de la lipase de <i>Candida rugosa</i> (PDB ID: 1CRL) et de la lipase humaine pancréatique (PDB ID: 1LPA)-----	89
Figure 36. Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide folique et les acides aminés de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).-----	94
Figure 37. Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide folique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).-----	95

Figure 38. Représentation des interactions 2D et 3D entre le Febuxostat et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	98
Figure 39. Représentation des interactions 2D et 3D entre le Febuxostat et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	99
Figure 40. Représentation des interactions 2D et 3D entre la colchicine et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	100
Figure 41 Représentation des interactions 2D et 3D entre Menthol et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	102
Figure 42. Représentation des interactions 2D et 3D entre Carvacrol et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	103
Figure 43. Représentation des interactions 2D et 3D entre Eugénol et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e). -----	105
Figure 44. Représentation des interactions 2D et 3D entre Eugénol et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	106
Figure 45. Représentation des interactions 2D et 3D entre Cinnamaldéhyde et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	107
Figure 46. Représentation des interactions 2D et 3D entre Apéginine et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	110
Figure 47 Représentation des interactions 2D et 3D entre Lutéoline et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	111
Figure 48 Représentation des interactions 2D et 3D entre Quercétine et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	112
Figure 49 Représentation des interactions 2D et 3D entre Quercétine et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	113
Figure 50 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide ascorbique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	115
Figure 51 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide ascorbique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	116
Figure 52 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide benzoïque et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	119
Figure 53 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide citrique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	120
Figure 54 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide citrique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	121
Figure 55 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide gallique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de <i>C. rugosa</i> obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f). -----	123

<i>Figure 56 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide gallique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).</i>	124
<i>Figure 57 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide oxalique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de C. rugosa obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).</i>	126
<i>Figure 58 : Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide oxalique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f)</i>	127

Table des matières

Introduction générale	
Références Bibliographiques	4
Chapitre I Analyse phytochimique des Plantes étudiées	
Rappels Bibliographiques	6
1. Plantes médicinales étudiées	6
1.1. Globularia alypum L	6
1.2. Teucrium polium L	10
1.3. Ajuga iva	13
1.4. Juniperus oxycedrus	16
1.5. Juniperus phoenicea	19
2. Métabolites secondaires :	22
2.1. Composants phénoliques :	23
2.2. Les flavonoïdes :	25
Matériel et Méthodes	27
1. Matériel végétal	27
2. Extraction des composés du composées phénoliques :	28
2.1. La délipidation et la dépigmentation :	28
2.2. Extraction des composées phénoliques :	28
3. Dosage et quantification des métabolites secondaire :	28
3.1. Dosage des phénols totaux :	28
3.2. Dosage des flavones et flavonols :	29
4. Chromatographie sur couche mince (CCM)	29
5. Étude statistique :	29
Résultats et discussion	30
1. Extraction des métabolites secondaires	30
2. Dosage et quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes	31
3. Screening chimique général par CCM	37
3.1. Interprétation des CCM de Globularia alypum	38
3.2. Interprétation des CCM de Teucrium polium	41
3.3. Interprétation des CCM d'Ajuga iva	43
3.4. Interprétation des CCM de Juniperus oxycedrus	45
3.5. Interprétation des CCM de Juniperus phoenicea	47
Références Bibliographiques	52
Chapitre II Inhibition de la réaction enzymatique de la lipase de Candida rugosa	

Rappels Bibliographiques -----	59
1. L'obésité -----	59
2. Indice de Masse Corporelle (IMC) : -----	59
3. Orlistat -----	60
4. Lipases -----	61
5. Huiles essentielles -----	65
5.1. Usages médicaux -----	65
Matériel et Méthodes -----	66
1.1. Extraits des plantes -----	66
1.2. Huiles essentielles -----	66
1.3. Médicaments -----	66
1.4. Acides organiques -----	68
2. Le principe de l'activité enzymatique de la lipase -----	69
3. Étapes expérimentales -----	69
3.1. Courbe d'étalonnage de p-NP -----	69
3.2. L'activité d'inhibition enzymatique de la lipase Candida rugosa -----	70
Résultats et discussion -----	71
1- La courbe d'étalonnage de p-NP -----	71
2- L'activité d'inhibition enzymatique de la lipase Candida rugosa -----	71
Références Bibliographiques -----	80
Chapitre VI Docking Moléculaire "In silico"	
Rappels Bibliographiques -----	85
1. Importance biologique de l'outil bioinformatique -----	85
2. Docking moléculaire -----	85
3. Les liaisons non-covalentes -----	85
Matériel et Méthodes -----	87
1. Choix des structures des lipases -----	87
2. Choix des structures des ligands -----	87
3. Docking moléculaire -----	87
Résultats et discussion -----	89
Références Bibliographiques -----	128
Conclusion générale -----	129

Introduction générale

De nombreux composés naturels dérivés des plantes ont montré leur activité biologique (Neffati, et al. 2009). Les chercheurs essaient à trouver et à développer un traitement pour prévenir l'obésité et à la traiter sans effets secondaires et sans danger pour une utilisation prolongée, car les travaux se concentrent récemment sur la recherche dans les extraits végétaux de produits chimiques naturels pour lutter contre les maladies (Jung, et al. 2012).

Les médicaments contre l'obésité utilisés actuellement réagissent de trois manières différentes, peuvent stimuler le métabolisme des lipides, réduisent la consommation d'aliments par la manipulation (réduction) de l'appétit de l'individu envers ces aliments, ou limiter l'absorption des lipides au niveau des intestins (Hasani-Ranjbar et al. 2009). Les inhibiteurs de la lipase sont utilisés comme des médicaments pour traiter l'obésité et les problèmes d'acné (Leticia, et al. 2012).

Les lipases sont des enzymes (EC 3.1.1.3) qui stimulent la dégradation des triglycérides en acides gras et en glycérol. Ils sont largement répandus dans les plantes, les animaux et les microorganismes (Cygler et D. Schrag, 1997).

En biologie moléculaire, il existe un problème vieux de plus d'un siècle qui n'a toujours pas trouvé de solution optimale. Ce problème, la modélisation par l'amarrage ou docking moléculaire, consiste à comprendre comment des molécules peuvent s'assembler spécialement dans un complexe enzyme-inhibiteur. Les biologistes ont associé l'intelligence de l'humain à la puissance de traitement des algorithmes au sein du processus de recherche. C'est avec la réalité virtuelle que les biologistes accèdent à la manipulation des molécules avec l'aide de logiciels de visualisation, de moteurs de simulations ou encore de périphériques d'interaction. Puis, la complexité du docking moléculaire amène les biologistes à proposer des solutions collaboratives (Simard, 2012 : *in* Benarous 2014).

Dans ce travail, nous essayerons d'apporter une contribution à la valorisation des ressources végétales locales par une meilleure connaissance des données phytochimiques relatives à ce patrimoine et par la mise en évidence des principes actifs issus du métabolisme secondaire de ces plantes et l'évaluation de leurs pouvoirs inhibiteurs de l'activité de la lipase microbienne étudiée (de *Candida rugosa*). Ainsi l'application des médicaments connus pour traiter certaines maladies à l'inhibition de la lipase avec quelques molécules synthétiques.

A travers cette étude, nous allons mettre en place une stratégie de recherche, en commençant par le premier chapitre qui s'intéresse à l'étude phytochimique de cinq plantes locales appartenant à différentes familles botaniques à savoir: *Globularia alypum*, *Teucrium*

polium, *Ajuga iva*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*; et par la suite à l'extraction et le dosage des différents métabolites extraits (composés phénoliques et flavonoïdes). Dans le deuxième chapitre, nous étudions l'effet inhibiteur de chaque extrait obtenu, ainsi des huiles essentielles: huile de menthe, huile de la Cannelle, huile du giroflier, et des autres molécules synthétiques : Acide folique, febuxostat, colchicine, acide ascorbique, acide benzoïque, acide citrique, acide gallique et acide oxalique sur la lipase microbienne de *Candida rugosa*. Dans le troisième chapitre, nous isolons et caractérisons par la combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques les molécules responsables de l'effet inhibiteur de la lipase de *Candida rugosa*. A l'aide de logiciels de traitement des structures, nous réalisons dans le dernier chapitre le docking moléculaire des molécules inhibitrices dans les sites actifs des deux lipases : celle de *Candida rugosa* et la lipase pancréatique humaine.

Nous rappelons que cette étude est une continuité des travaux précédents sur l'inhibition de la lipase de *Candida rugosa* afin de traiter l'obésité, la candidose, l'acné et l'ulcère par des extraits naturels et des molécules bioactives isolées, dans le laboratoire des sciences fondamentales depuis 10 ans (Benarous 2006, Benarous 2010, Benarous et al. 2013, Benguechoua et al. 2014, Nia et al. 2014, Benarous et al. 2015). Aucune étude n'a été réalisée sur les effets des extraits des espèces : *Globularia alypum*, *Teucrium polium*, *Ajuga iva*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea* sur l'activité enzymatique de la lipase microbienne de *Candida rugosa*. Nous ajoutons que l'étude *in silico* sur les deux lipases avec ces ligands est effectuée pour la première fois.

Références Bibliographiques

- Benarous, K. 2006. *Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase*. Mémoire d'Ingénieur d'état.
- Benarous, Khedidja. 2010. *Mémoire de Magister: Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de Candida rugosa*. LAGHOUAT: UNIVERSITÉ AMAR TELIDJI – LAGHOUAT.
- Benarous, K., Djeridane, A., Kameli, A., & Yousfi, M. (2013). *Inhibition of Candida rugosa lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxydant activities*. *Current Enzyme Inhibition*, 9(1), 75-82
- Benarous, Khedidja. 2014. *Thèse de Doctorat: Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de Peganum harmala, Inonotus hispidus, Marrubium vulgare, Ziziphus lotus et Achillea santolina sur la lipase de Candida rugosa*. ALGER: L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE KOUBA.
- Benarous, K., Bombarda, I., Iriepa, I., Moraleda, I., Gaetan, H., Linani, A., ... & 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, 1-7.
- Benguechoua, M., Nia, S., Benarous, K., Khachba, I., & Yousfi, M. (2014). *Inhibition of candida rugosa lipase by different extracts of five algerian plants and their antioxidant activities*. *Current Enzyme Inhibition*, 10(2), 121-128.
- Cygler, Roslaw, et Joseph D. Schrag. 1997. «*Structure As Basis For Understanding Interfacial Properties Of Lipases*.» Dans *Methods in ENZYMOLOGY*, Lipases part A, de Byron Rubin et Edward A. Dennis. Academic Press.
- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B., & Abdollahi, M. (2009). *A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(25), 3073.
- Jung, C.H., J. Ahn, T. Jeon, T.W. Kim, et T.Y Ha. 2012. «*Syzygium aromaticum ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice through downregulation of adipogenic and lipogenic gene expression*.» *Experimental And Therapeutic Medicine* 409-414.
- Leticia, Casas- Godoy, Duquesne Sophie, Bordes Florence, Sandoval Georgina, et Marty Alain. 2012. «*Lipases: An Overview*.» Dans *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, de Sandoval Georgina. New York: Springer Science+Business Media.
- Nia, S., Benguechoua, M., Benarous, K., Khacheba, I., K Cherif, J., Trabelsi-Ayadi, M., & Yousfi, M. (2014). *Screening of Two Algerian Spontaneous Plants for Anti-lipase and Antioxidant Activities*. *Current Enzyme Inhibition*, 10(2), 113-120.

Chapitre I

Analyse phytochimique des Plantes étudiées

Rappels Bibliographiques

1. Plantes médicinales étudiées

1.1. *Globularia alypum* L

Nom commune local:

AR : «Tasselgha», «Aselgha», «Zerga», «zeriga», «Chebra», «Ein larneb»; EN :Crown friar - Shrubby Globularia ; FR : Globulaire buissonnante –Turbith - sene arabe, turbith, sene de Provence (Quezel P. , Santa S. 1963); (IUCN 2005); (Khlifi, et al. 2011); (Amessis-Ouchemoukh, et al. 2014)(Bellakhdar, et al. 1991)

Synonyme :

- *Alypum salicifolium*
- *Alypum solandri*
- *Globularia alypum* var. *murbeckii*
- *Alypum monspeliensium*
- *Globularia alypum* subsp. *murbeckii*
- *Globularia turbith*
- *Globularia virgata*
- *Globularia alypum* subsp. *alypum* L.

((Chappuis 2014); (A.Tela Botanica 2014) ; (MNHN 2017) ; (Roskov et al. 2017) ; Hassler M. (2017).

Taxonomie:

Toutes classifications botaniques des plantes étudiées ont été obtenue à partir de (MNHN 2017 : <https://inpn.mnhn.fr>).

Tableau 1. Classification botanique de *Globularia alypum*

CLASSIFICATION	REPARTITION SYSTEMATIQUE
DOMAINE	Biota
REGNE	Plantae
SOUS-REGNE	Viridaeplantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASSE	Equisetopsida
SOUS-CLASSE	Magnoliidae
SUPER-ORDRE	Asteranae
ORDRE	Lamiales
FAMILLE	Plantaginaceae
GENRE	<i>Globularia</i>
ESPECE	<i>Globularia alypum</i> L.

Description botanique



Figure 1. Les parties aériennes de la plante *Globularia alypum*. (Jean 2002)

Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec *alypon* qui signifie calmer la douleur (Boutiti, et al. 2008). Les plantes du genre *Globularia* sont vivaces arbustes rameux de 30 à 60 cm de hauteur, (Boussoualim 2014) (Boutiti, et al. 2008) (IUCN 2005) à tiges érigées (Quezel P. , Santa S. 1963) à feuilles alternes, dont les fleurs groupées en capitules plus ou moins globuleux entourés de bractées.

Les feuilles toutes éparses sur les rameaux, simples, sans Stipules (Quezel P. , Santa S. 1963) (IUCN 2005) coriaces, persistantes, glauques, de forme ovale ou oblongue, atténuées en court pétiole et disposées le long et au sommet des tiges très rameuses en buisson et ordinairement dressées (Boussoualim 2014), entières ou bi-tridentées, mucronées, uninervées (A.Tela Botanica 2014) se terminant en une petite pointe (Boutiti, et al. 2008).

Les fleurs réunies en capitules denses à bractées ciliées (Boutiti, et al. 2008) atteignant près de 15 mm, disposées au sommet des tiges. Calice velu à 5 dents aigues. Elles ont une corolle à deux lèvres (bilabiée), la supérieure bilobée souvent atrophiée, l'inférieure trilobée. Elles sont en général bleues, à quatre étamines à anthères d'un bleu violacé (Boutiti, et al. 2008) (Boussoualim 2014). Ovaire uniloculaire uniovulé. Rocailles, garrigues. Écailles du réceptacle et calices faiblement velus.

Fruits akéniens (Boutiti, et al. 2008)

La période de la floraison se situe en hiver au début du printemps (janvier à mars/avril). (Boutiti, et al. 2008).

Répartition géographique

Cette plante originaire de sud de l'Europe sur le pourtour méditerranéen (Albanie, Baléares, Corse, France, Espagne, Italie, ex-Yougoslavie, Portugal, Sardaigne, Sicile) jusqu'en Grèce, Turquie (W-Anatolie), Crète, Turquie européenne), le nord d'Afrique: Libye, Tunisie, Algérie, Tassili n'Ajjer, Tefedest, Maroc jusqu'au Sahara, Chad (Tibesti)) et l'Asie mineure (Égypte, Arabie Saoudite) en forêts, dans les terrains rocaillieux (Boutiti, et al. 2008) (Roskov et al. 2017) ; (Hassler M. 2017)

Toutes les figures de répartition des plantes étudiées ont été obtenue à partir de (<http://www.discoverlife.org/mp>)

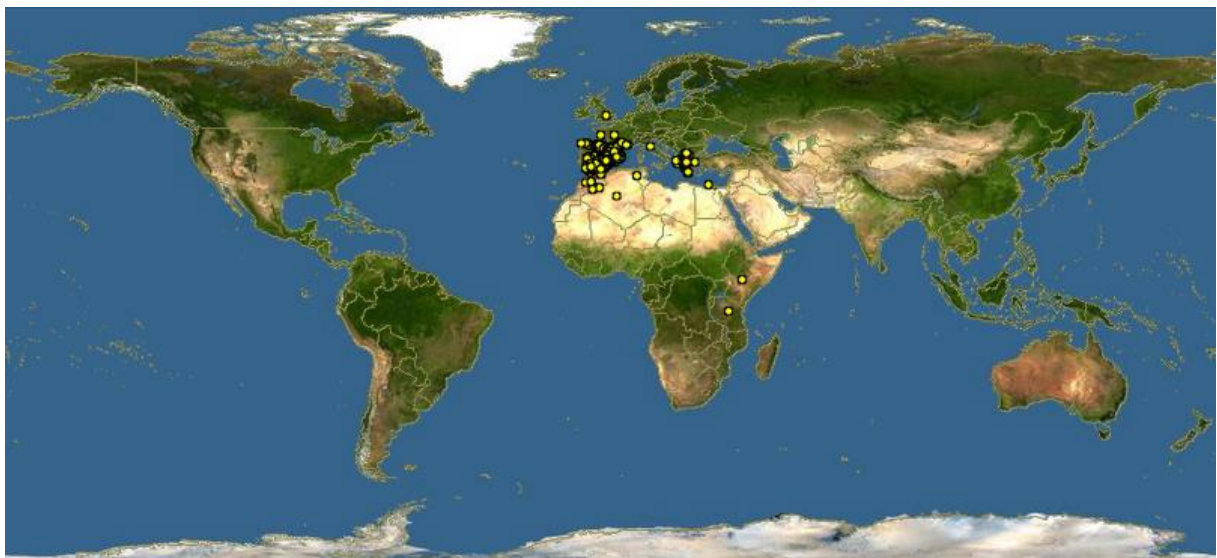


Figure 2. Répartition géographique de *Globularia alypum*

La composition chimique et Activités biologiques

La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de plusieurs composés de genre *Globularia*. Ce sont essentiellement des flavonoïdes (Apigénine, Luteolin), des polyphénols, des tannins, des anthocyanines, lignan diglucoside, syringin, quatre phenylethanoids, p- acide coumarique, et l'acide cinnamique (ES-SAFI, et al. 2006) (Boutiti, et al. 2008) (Zennaki, et al. 2009) (Khlifi, et al. 2011).

Utilisations traditionnelles et médicales

G. alypum s'utilise comme laxatif, agent hypoglycémiant, agent diurétique, cholagogue, purgatif, sudorifique, antiseptique, antiacide. Elle utilise dans le traitement des furoncles, les rhumatismes, l'arthrite, ulcères, coliques, maux de tête, les hémorroïdes, la goutte, le diabète, la fièvre typhoïde, la fièvre intermittente, les maladies renales les maladies Cardiaques et Vasculaires. *G. alypum* diminue des Lipides plasmatiques (Caldes et al. 1975, Bellakhdaret et

al. 1991, Fehri et al. 1996, Elbetieha et al. 2000, bello et al. 2002, l'UICN 2005, Es-Safi et al. 2006, Boutiti et al. 2008, Zennaki et al. 2009, Khlifi et al. 2011, Amessis-Ouchemoukh et al. 2014). anti-inflammatoire (Djeridane et al. 2006), anti-microbienne (Elbetieha et al. 2000), anti-tuberculose (Khlifi et al. 2011), antipaludiques (Fehri et al. 1996, Es-Safi et al., 2006), anti-tumereux (Oran et al. 1999, Elbetieha et al. 2000), anti-leucémique, anti-cancérogène (bello et al. 2002,2014), inhiber la formation d'embryons (Khlifi et al. 2011, Elbetieha et al., 2000). Et ne rien aucun effet toxique des extraits de cette plante (Es-Safi et al., 2006).

1.2. *Teucrium polium* L

Nom commun local :

Ar : Djaida, Dja'da ; Fr : Germandrée tomenteuse, Germandrée polium, Herbe de Marie ;
Eng : Ezovion, Felty Germander ; Spa : Poleo montano, Tomillo terrero. (Jean 2002),
(Quezel P. , Santa S. 1963);

Synonyme

- *Chamaedrys polium* (L.)
- *Monochilon tomentosus* Dulac
- *Teucrium commune* Rouy
- *Teucrium polium* var. *gnaphalodes*
- *Teucrium teuthrion* Schreb.,
- *Teucrium tomentosum* Lam.
- *Teucrium virescens* Pomel
(A.Tela Botanica 2014)

Taxonomie

Tableau 2. Classification botanique de *Teucrium polium*

CLASSIFICATION	REPARTITION SYSTEMATIQUE
DOMAINE	Biota
REGNE	Plantae
SOUS-REGNE	Viridaeplantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASSE	Equisetopsida
SOUS-CLASSE	Magnoliidae
SUPER-ORDRE	Asteranae
ORDRE	Lamiales
FAMILLE	Lamiaceae
GENRE	<i>Teucrium</i>
ESPECE	<i>Teucrium polium</i> L.

Description botanique

C'est une espèce très variable, possédant de nombreuses sous espèces. C'est une plante herbacée vivace à odeur poivrée par frottement. Les tiges sont de 10 à 30 cm de hauteur, blanches tomenteuses portant des feuilles opposées sessiles, linéaires, lancéolées ou oblongues, en coin et entières à la base et à dents arrondies en haut. Ces feuilles, blanches-tomenteuses sur les deux faces ont les bords enroulés. Les fleurs forment des inflorescences compactes globuleuses ou ovoïdes serrées. Le calice brièvement tomenteux, à des dents courtes, la supérieure obtuse. Corolle à lèvre supérieure tronquée et à lobes supérieurs pubescents. (Belmekki 2009 ; Rached 2009 ; Kerbouche 2010 ; Krache 2010 ; Djabou 2012 ; Bencheikh 2015 ; Bendif 2017)



Figure 3. Les parties aériennes : les feuilles et les fleurs de la plante *Teucrium polium* (Jean 2002)

Répartition géographique

ou pouliot de montagne, est originaire du sud-ouest d'Asie, d'Europe et d'Afrique du nord, Elle pousse dans les pelouses arides, les rocailles de basse altitude, collines et les déserts arides (Abdollahi et al., 2003 : in Krache 2010).

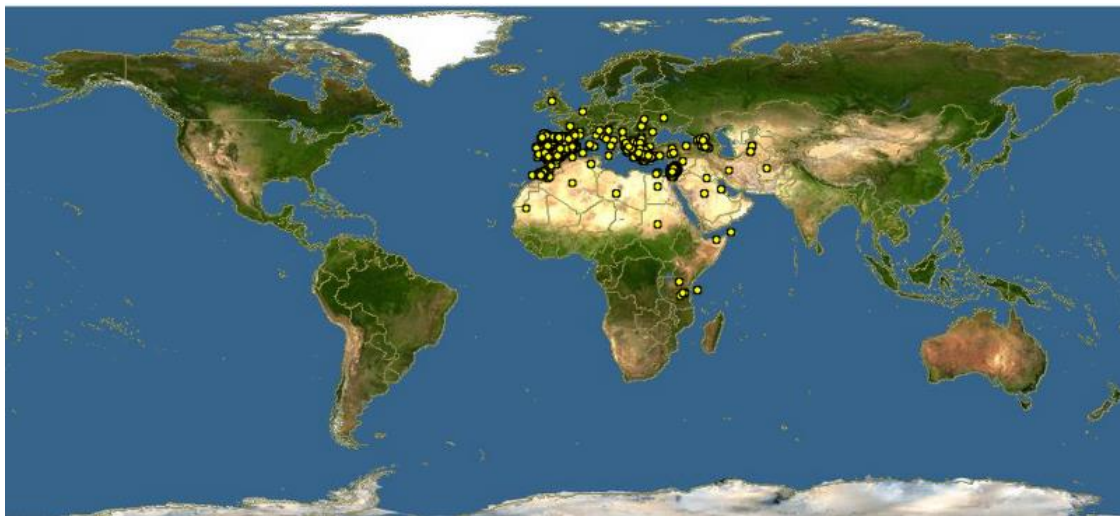


Figure 4. Répartition géographique de *Teucrium polium*

Utilisations traditionnelles et médicales:

Les espèces de *Teucrium polium* ont été employées en tant qu'herbes médicinales pendant plus de 2000 ans comme diurétique, inotropique et chronotropique, tonique, antipyrétique, cholagogue et anorexiques. Le feuillage de *T. polium* légèrement poivré, était couramment utilisé pour relever les salades ou parfumer les fromages de chèvres. Une infusion des feuilles et des fleurs était ainsi consommée comme boisson régénératrice.

En médecine traditionnelle, cette espèce est employée comme analgésique, antispasmodique et hypolipidémique. Cette plante peut avoir quelques intérêts d'ordre cliniques: cas de désordres stomacaux (Dehghani et al., 2005; Kaileh et al., 2007 : in Krache 2010) et gastro-intestinaux tels que la colite. Ces résultats le soutiennent également pour son emploi folklorique pour soulager ces douleurs (Abdollahi et al., 2003 : in Krache 2010).

L'utilisation de l'extrait éthanolique de *T. polium* sur des milieux de culture de *Saccharomyces, in vitro*, a mené à diminuer le taux des acides gras et bloquent la peroxydation au niveau des érythrocytes, ainsi il a montré des effets antibactériens et antifongiques. Cette plante est largement distribuée comme agent hypoglycémiant. Sa décoction dispose un effet hypoglycémiant chez les rats normoglycémiques par rapport aux modèles hyperglycémiques induits par le streptozotocine (Gharaibehet al., 1988 : in : Bendif 2017) (Shahraki et al., 2006 : in Krache 2010). Cependant, des épreuves de sûreté sont exigées pour confirmer son action hypoglycémiant.

Données pharmacologiques

Plusieurs recherches ont démontré certains effets pharmacologiques attachés à l'utilisation de Germandrée tomenteuse, parmi lesquelles on invoque l'action antibactérienne, anti-inflammatoire, anti-ulcerogène, anti-nociceptive, antispasmodique, antidiabétique, diurétique, hypolipidémique, antifongique, antagoniste du calcium et cytotoxique (Autore et al., 1984; Suleiman et al., 1988; Abdollahi et al., 2003; Esmaeili et Yazdanparast, 2004 : in Krache 2010).

Récemment, quelques rapports dans la littérature dévoilent des effets antioxydants des extraits bruts de *T. polium* (Ljubuncic et al., 2006 in : Bendif 2017). Par conséquent, d'autres investigations sont nécessaires maintenant pour élucider le mécanisme de l'action pharmacologique et identifier les composants bioactifs responsables de telles actions afin d'expliquer leur efficacité thérapeutique.

1.3. *Ajuga iva*

Nom commune local

Ar : Chendgoura, Shandgoura, Touf et-toulba; Fr : Ivette musquee, Bugle ivette; Eng : Bugle iva , Herb ivy, Musky bugle . (Quezel P. , Santa S. 1963); (Jean 2002) ; (IUCN 2005).

Synonyme

- *Abiga cistifolia* St.-Lag
- *Ajuga moschata* Schreb.
- *Bugula moschata* Bubani
- *Bulga iva* (L.) Kuntze
- *Moscharia arabica* Vitman
- *Moscharia asperifolia* Forssk
- *Moscharia forsskalii* J.F.Gmel
- *Teucrium iva* L
- *Teucrium moschatum* Lam.
- *Teucrium moschatum* Mill

(A.Tela Botanica 2014)

Taxonomie

Tableau 3. Classification botanique de *Ajuga iva*

CLASSIFICATION	REPARTITION SYSTEMATIQUE
DOMAINE	Biota
REGNE	Plantae
SOUS-REGNE	Viridaeplantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASSE	Equisetopsida
SOUS-CLASSE	Magnoliidae
SUPER-ORDRE	Asteranae
ORDRE	Lamiales
FAMILLE	Lamiaceae
GENRE	<i>Ajuga</i>
ESPECE	<i>Ajuga iva</i> L.

Description botanique

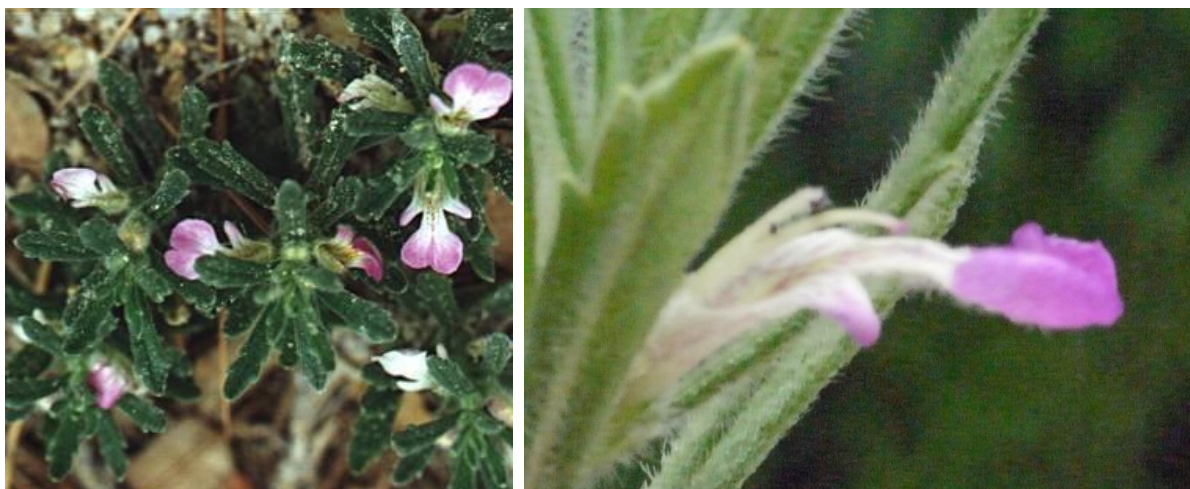


Figure 5. Les parties aériennes : les feuilles et les fleurs de la plante *Ajuga iva* (Jean 2002)

L'ivette est une petite plante vivace aromatique, de goût amer, et à odeur de musc, de 5 à 20 cm de long, à tiges vertes rampantes et velues, à feuilles vertes de 14 à 25 mm de longueur, linéaires, denses et couvertes de duvets. Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20 mm de longueur ; la lèvre supérieure de la corolle est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus. Les lobes latéraux sont petits, alors que le lobe central est relativement plus large décoré dans sa base par un axe central jaunâtre. (Rached 2009 ; Boudjelal 2013 ; Bechiri-abbes 2016 ; Bendif 2017)

Répartition géographique

L'ivette se développe dans le sol profond des terres friches, dans la période étendue du printemps jusqu'à la fin de l'été. Cette plante est largement distribuée dans les régions arides d'Europe, d'Asie, d'Australie et d'Afrique (Elle est très répandue dans les pelouses et les forêts du tell algérien).



Figure 6. Répartition géographique de la plante Ajuga iva

La composition chimique et Activités biologiques

La plante est riche en composés polyphénoliques, qui sont les meilleurs antioxydants, flavonoïdes et tanins. Elle contient aussi des anthocyanes et d'autres substances en particulier l'ajugarine. Les études phytochimiques ont montré que l'ivette contient aussi des ecdystéroïdes, des diterpénoïdes, des iridoïdes et des saponosides (Boudjelal 2013 ; Bendif 2017).

Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques

Des études pharmacologiques ont montré que cette plante à des propriétés antiulcéreuse, hypoglycémiant, anti-inflammatoire, antihelminthique, antibactérienne, antispasmodique, diurétique, antimalarique. Elle est indiquée également pour les troubles intestinaux, contre le froid, les maux de tête et les maux de dents et comme cicatrisant (Boudjelal 2013 ;Bendif 2017).

1.4. *Juniperus oxycedrus*

Nom commun local

Ar : Taga, taka, tiqqi; Fr : Oxycèdre, Cade, genévrier oxycèdre, cadier; Eng : prickly cedar, medlar tree, juniper bush, juniper bark, juniper berry, sharp cedar (Quezel P. , Santa S. 1963); (Jean 2002) ; (IUCN 2005).

Synonymie

- *Juniperus glauca* Salisb (A.Tela Botanica 2014)

Taxonomie

Tableau 4. Classification botanique de *Juniperus oxycedrus*

CLASSIFICATION	REPARTITION SYSTEMATIQUE
DOMAINE	Biota
REGNE	Plantae
SOUS-REGNE	Viridaeplantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASSE	Equisetopsida
SOUS-CLASSE	Pinidae
ORDRE	Cupressales
FAMILLE	Cupressaceae
GENRE	Juniperus
ESPECE	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.

Description botanique



Figure 7. Les parties aériennes de la plante *Juniperus oxycedrus* (Jean 2002)

Juniperus oxycedrus est un petit arbre ou arbuste de 10 à 15m d'hauteur, à bourgeons écailleux, à ramules obtusément triangulaires; feuilles très étalées, verticillées par 3 et disposées sur 6 rang, toutes linéaires en alène à pointe fine et piquante, articulées, non décurrentes, marquées de deux sillons blanchâtres séparées par la nervure médiane en dessous, à carène obtuse et non sillonnées en dessous; fleurs dioïques; fruits rouges et luisants à la maturité, subglobuleux, assez gros (8-10 mm), dépassés ou égalés par les feuilles. (Mohammed 2010 ; Siboukeur 2013 ; Abbassen 2015 ;Bouyahyaoui 2017)

Répartition géographique

Juniperus oxycedrus est thermophile qui vit à l'état natif dans la région méditerranéenne, autour de la mer noire et le moyen-orient. Il pousse dans les régions secs des côtes et les terrains bas sous les conditions du climat de la méditerranée. Mais il est également trouvé dans les élévations supérieures dans les forêts humides avec un environnement plus continental. Il est convenable comme un arbuste ornemental; des huiles essentielles peuvent être extraites et utilisées pour des fins thérapeutiques. Le "juniper" est abondant et ses populations sont stables. (Mohammed 2010 ; Siboukeur 2013 ; Abbassen 2015 ;Bouyahyaoui 2017).

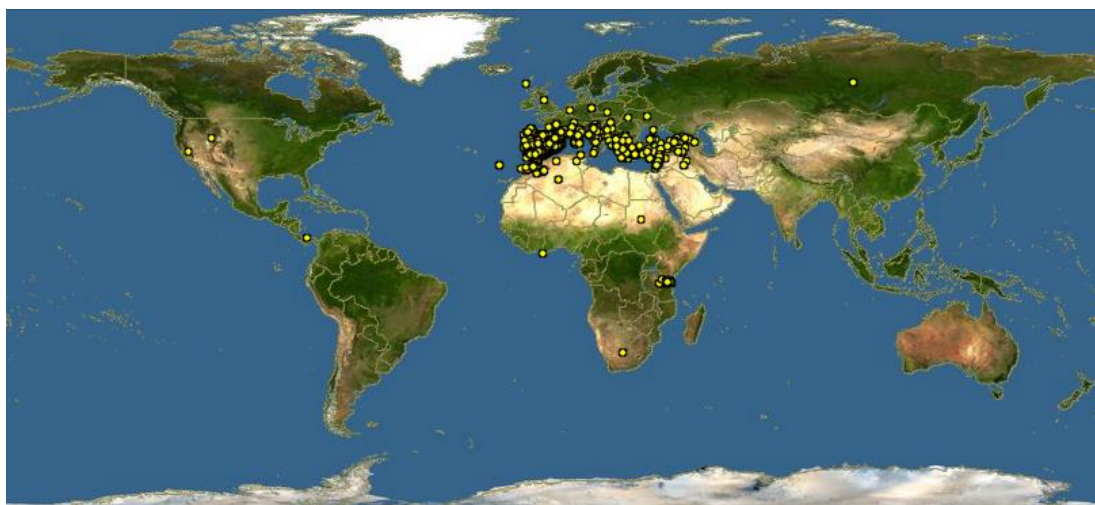


Figure 8. Répartition de *Juniperus oxycedrus*

Juniper est natif dans la région méditerranéenne, qui se distribue du Maroc et le Portugal à Liban, Syrie et l'Iraq. Il existe 4 sous-espèces acceptées : *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus* est la plus répandue dans les terrains intérieurs et également au côtes. *Juniperus oxycedrus subsp. macrocarpa* généralement aux côtes de la méditerranée et la mer noire. *Juniperus oxycedrus subsp. badia* au nord de l'Algérie et la péninsule ibérique. *Juniperus oxycedrus subsp. transtagana* dans les terrains bas et les côtes du -Portugal central et le sud-ouest de l'Espagne.

La composition chimique et Activités biologiques

La plante est constituée des flavonoides, flavones, terpenoides, monoterpénoides, sesquiterpénoides, huile volatile, résine, tannine et extractive (Acide acétique, acide pyrroligéneux, acetone, methanol, etc.). Les feuilles contiennent des terpenoides, monoterpénoides et un acide gras: sabinique. Les huiles de la feuille étaient généralement composées de l' α -pinène (40-57%) et l'oxyde manoyl (5-10%). L'infructescence et fruits contiennent : des terpenoides, sesquiterpénoides, monoterpénoides and diterpénoides.

L'huile de Cade contient des phénols 17 à 26% (généralement guaiacol presque 12%), cadinene (sesquiterpénoides), carburs et un alcool (cardinol). Le composant principal du *Juniperus Oxycedrus Tar* est la cadinene, un sesquiterpène, mais on trouve également la crésol et guaiacol. Les huiles de baies immatures sont dominées par l' α -pinène (65%) avec des taux modérés de myrcène, limonène, germacrène D ou gamma-murolène. Elles peuvent ainsi contenir de canfène, junène, terpinole et cadinene. (Mohammed 2010 ; Siboukeur 2013 ; Abbassen 2015 ; Bouyahyaoui 2017)

Importance et usage:

Les huiles essentielles sont extraites des branches et des feuilles par la distillation destructive, en particulier en France et en Turquie. Cette huile de cade est utilisée pour des fins médicales, pour la préparation de l'huile empyreumatique comme exemple. Elle possède des propriétés antiseptiques et antiparasitaires. L'huile essentielle rectifiée est ainsi utilisée comme parfum dans les savons, détergents, crèmes, lotions. (Mohammed 2010 ; Siboukeur 2013 ; Abbassen 2015 ; Bouyahyaoui 2017)

1.5. *Juniperus phoenicea*

Nom commun local

Ar : Araar; Fr : Genévrier de Phénicie; Eng : Phoenician juniper. (Quezel P. , Santa S. 1963); (Jean 2002) ; (IUCN 2005).

Synonyme

Aucune synonymie (A.Tela Botanica 2014)

Taxonomie

Tableau 5. Classification botanique de *Juniperus phoenicea*

CLASSIFICATION	REPARTITION SYSTEMATIQUE
DOMAINE	Biota
REGNE	Plantae
SOUS-REGNE	Viridaeplantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASSE	Equisetopsida
SOUS-CLASSE	Pinidae
ORDRE	Cupressales
FAMILLE	Cupressaceae
GENRE	Juniperus
ESPECE	<i>Juniperus poenicea</i> L.

Description botanique



Figure 9. Les parties aériennes de la plante *Juniperus phoenicea* (Jean 2002)

C'est un arbuste à feuilles persistantes de 4 à 8 mètres d'hauteur, il possède des rameaux épais, gris brun, couverts de feuilles en aiguilles bleutées avec des raies blanches, squamiformes, fortement appliquées sur les rameaux, généralement en 4 rangs, longues et larges de 1mm environ. Les feuilles ont une extrémité obtuse et une glande dorsale, il n'y a pas de bourgeons apparents. Le tronc est droit, l'écorce gris rose, se détache en lanières. Le système racinaire est profond. Les fleurs mâles, petites, sont situées à l'extrémité des rameaux. Les fleurs femelles, également petites, sont globuleuses avec des écailles opposées, soudées à la base. *Juniperus phoenicea* caractérisés par des petits fruits rouges à marrons qui est formé d'écailles soudées, opposées en croix, de 8 à 15mm. Les écailles sont charnues. La pulpe est jaune, fibreuse et résineuse. Le fruit contient de quatre à neuf graines, ovales aux extrémités aigues avec une enveloppe dure qui retarde la germination. (Rached 2009 ;Kerbouche 2010 ; Mohammed 2010; Bouyahyaoui 2017)

Répartition géographique

Se trouve dans des populations isolées autour de la méditerranée du Portugal aux côtes de l'Atlantique, sur les falaises et les dunes côtières, et même sur les montagnes de moins de 2400m d'hauteur. Il peut pousser dans les terrains de sable ou de roches. En Afrique du Nord, l'espèce couvrait 450 000 ha, dont 290 000 ha en Algérie, 1 52 000 ha au Maroc et 8 000 ha en Tunisie. Il se développe également en Cyrénaïque. Mondial: on la trouve des îles de Madère à l'Arabie ; (IUCN 2005);



Figure 10. Répartition géographique de *Juniperus phoenicea*

Utilisations traditionnelles :

Cette espèce est très utilisée en médecine traditionnelle. Les feuilles sont utilisées sous forme de décoction comme hypoglycémiantes, anti-diarrhéiques, antirhumatismales et

antiseptiques et pour traiter les maladies broncho-pulmonaires, urinaires et gastriques. Les fruits peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Rached 2009) La baie de genévrier est traditionnellement utilisée pour favoriser la digestion grâce à ses propriétés tonique et apéritive. (Kerbouche 2010)

2. Métabolites secondaires :

Les métabolites sont des composants organiques d'origine naturelle, produits par les plantes. Ils sont divisés en deux classes, les métabolites inclus dans les réactions métaboliques primaires et qui sont issue des acides carboxyliques simples, acides aminés, glucides, protéines et des acides nucléaires. Ces composants sont considérés comme les curseurs des molécules qui sont entièrement la deuxième classe des métabolites secondaires)Abed 2007(, La figure montre la relation entre le métabolisme primaire et secondaire (figure 10).

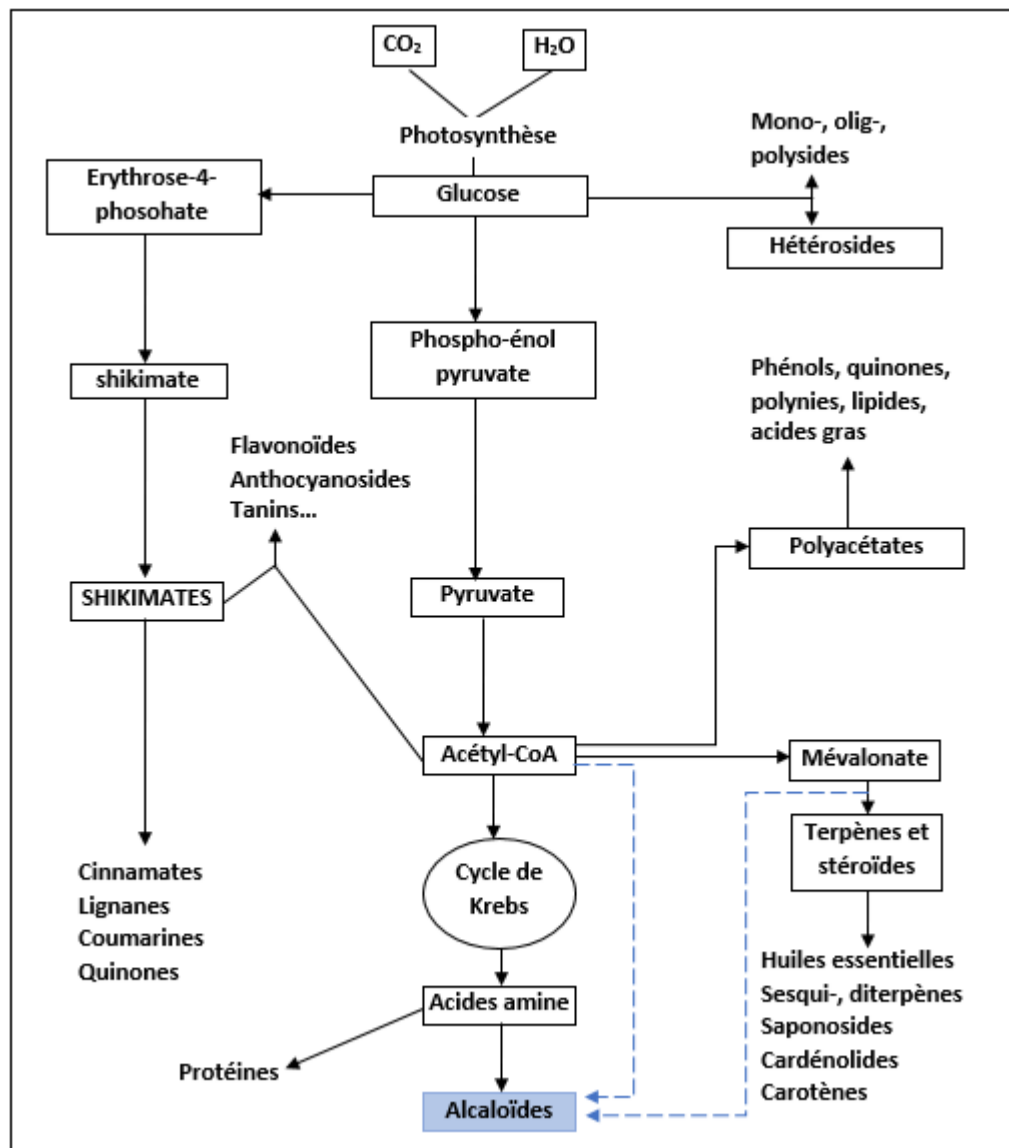


Figure 11. La relation entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire (Abed 2007)

2.1. Composants phénoliques :

Molécules naturelles issues du métabolisme secondaire. Les phénols sont connus comme les molécules qui possèdent un groupement hydroxyle liées directement à un cycle aromatique de type benzène, le phénol (figure 12) constitue la structure fondamentale de tous les composants phénoliques (Vermerris et Nicholson 2006), ces derniers regroupent un grand groupe de molécules dérivées de la phénylalanine et la tyrosine (figure 12) (Naczk et Shahidi 2004), qui possèdent des fonctions diverses et qui interviennent dans les différentes fonctions des plantes comme la croissance, développement, et la défense. Les composants phénoliques regroupent ainsi les molécules que la plante produit destinées à la défense contre les insectes, champignons, bactéries, et virus, les molécules de signal, pigments, et arômes qui peuvent attirer ou repousser les autres organismes vivants. (Vermerris et Nicholson 2006)

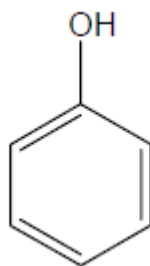


Figure 12. Structure chimique du phénol

Les composants phénoliques sont produits dans les plantes pendant leur développement (Naczk et Shahidi 2004), comme réponse au stress environnemental et fonctionnel comme l'exposition aux facteurs pathogènes, attaque des insectes, les rayonnements UV et les blessures, (Naczk et Shahidi 2004) (Khoddami, Wilkes et Roberts 2013) (Benarous 2014), par exemple : la production de l'isoflavone et d'autres flavonoïdes, sous l'effet de l'infection ou des blessures, ou sous l'effet du stress de la diminution de la température ou les nutriments. (Sajewicz, et al. 2012)

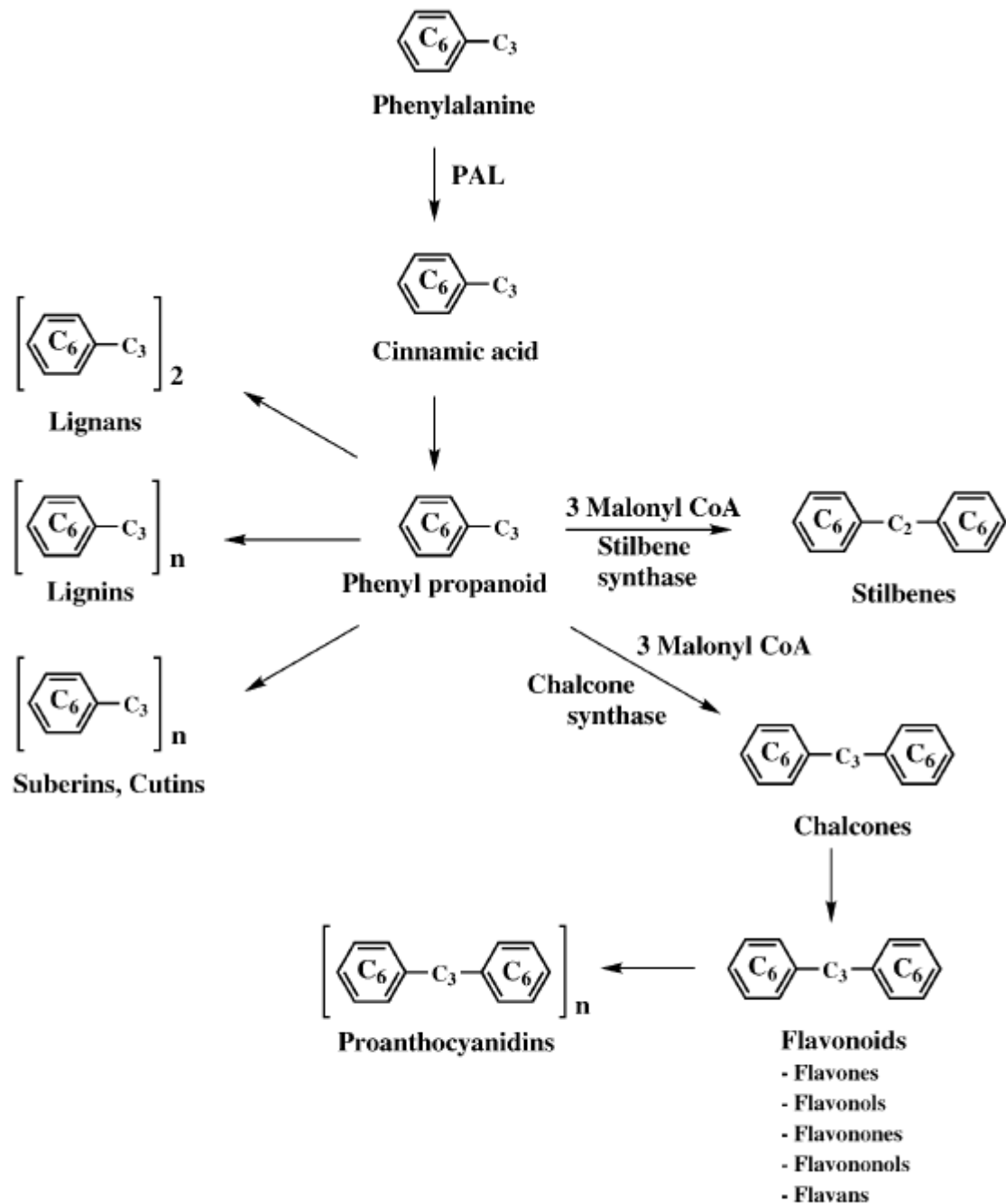


Figure 13. Production des phenylpropanoïdes à partir de la phénylalanine (Naczka et Shahidi 2004)

Ces composants se trouvent fréquemment sous forme d'ester ou glucosides et moins libre. (Vermerris et Nicholson 2006)

On peut les diviser en plusieurs classes (figure 13) en se basant sur des critères comme :

- La complexité de la structure de base
- Le degré de la modification sur la structure de base

- Les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules. (Benarous 2010)

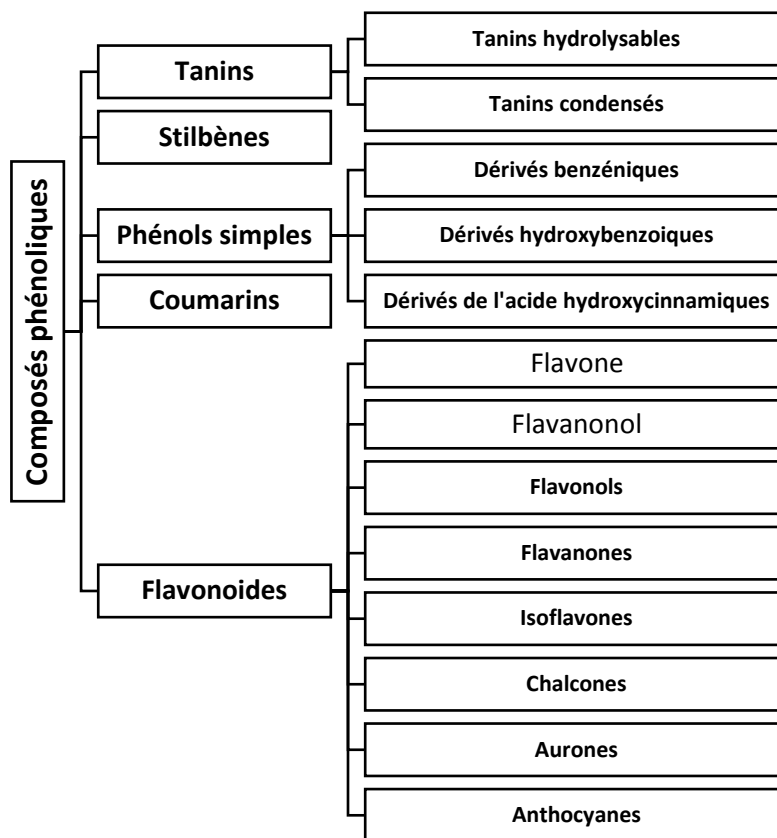


Figure 14. Classification générale des composés phénoliques (Naczka et Shahidi 2004) (Vermerris et Nicholson 2006)(Benarous2010) (Khoddami, Wilkes et Roberts 2013)

2.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent la plus grande classe des composés phénoliques de la règne végétale (Khoddami, Wilkes et Roberts 2013)(El-taouil 2009), car elle représente deux tiers de ces composants (Robbins 2003), on a identifié près de 9000 structures (Williams et Grayer 2004), leur structure chimique est dérivé d'un noyau Flavan (Benguerba 2008)(El-taouil 2009) (figure 14) qui se construit de deux cycles benzène A et B liés par un cycle hétérogène C, dans laquelle il existe 3 atomes de carbone (Vermerris et Nicholson 2006) (Marín, et al. 2015))Benmerache 2011(

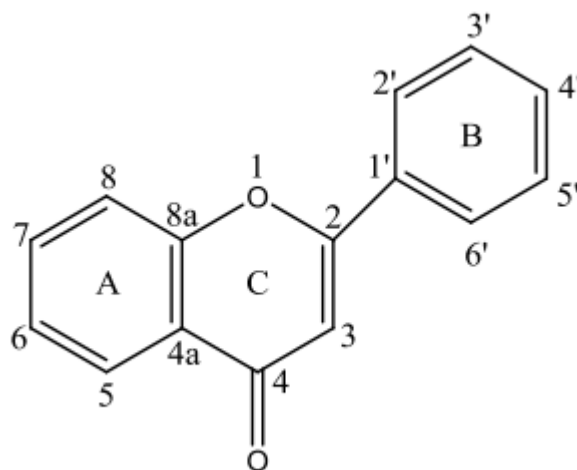


Figure 15. Structure générale des flavonoïdes

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté dans différentes régions de la wilaya de Djelfa en Mars-Mai 2016, la figure 15 montre les régions et le tableau 7 donne leurs informations géographiques. Les plantes ont été identifiées par notre part, la partie utilisée de la plante a été séchée à une température ambiante, puis broyée pour obtenir une poudre fine, qui a été conservée jusqu'au jour de l'utilisation.

Tableau 6. Les parties utilisées des plantes et leur informations géographique, lieu de récolte.

Plante	Partie utilisée	Lieu de récolte	Latitude	Longitude	Altitude
<i>Globularia alypum</i>	Feuilles	Haouas	34.697	3.152	1186 m
<i>Teucrium polium</i>	Parties aériennes	Djelfa	34.695	3.243	1152 m
<i>Ajuga iva</i>	Parties aériennes	Ain Fekka	35.417	3.640	835 m
<i>Juniperus oxycedrus</i>	Feuilles épineuses	Dar Chiokh	34.940	3.443	1232 m
<i>Juniperus phoenicea</i>	Feuilles	Chikh bakhti	35.346	3.482	991 m

Source des données géographiques : <http://www.coordonnees-gps.fr>



Figure 16. Les régions de la récolte

2. Extraction des composés du composées phénoliques :

L'extraction a été réalisée en deux étapes :

2.1. La délipidation et la dépigmentation :

Les graisses et pigments ont été extraits par l'hexane, pour se débarrasser. On a utilisé 25g de la poudre fine du matériel végétal qui a été macérée dans 100ml de l'hexane pendant 24h et filtrée, et l'hexane a été évaporé, et le rendement de l'échantillon sec a été calculé.

2.2. Extraction des composées phénoliques :

La poudre restante après la filtration, a été macérée dans 100ml de l'acétate d'éthyle, laissée pendant 24h et filtrée et séchée en utilisant le rota vapeur et le rendement en matière sèche a été calculée.

3. Dosage et quantification des métabolites secondaire :

3.1. Dosage des phénols totaux :

Ce dosage est basé sur une technique dont la quelle on utilise le réactif de Folin-Ciocalteu proposé en 1965 par Singleton et Rossi. Qui est devenu largement utilisé pour doser les phénols dans les extraits végétaux. L'évaluation quantitative des phénols est réalisée par un spectrophotomètre l'UV-visible (Benarous 2014).

Principe : le principe de cette technique proposée par Singleton et Rossi en 1965 par le réactif coloré Folin-Ciocalteu, se base sur la coloration en bleue issue de sa réduction par les phénols existants dans l'extrait, deux couleurs sont issues : Blue de tungstène (W_8O_{23}), et le bleu de Molybdène (Mo_8O_{23}), l'absorption est mesurée à 760nm. L'indicateur est composé par un mélange de l'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$), et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). On a utilisé l'acide gallique comme phénol standard pour réaliser la courbe d'étalonnage (Benarous 2014).

Protocole : Pour réaliser la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, une série de solution de concentration croissante de l'acide gallique est préparée. 250µl de réactif Folin-Ciocalteu 10%, ajoutée à 50µl de chaque solution diluée de l'acide gallique ou l'extrait végétal dilué de concentration pondéral 2 mg/ml. après 2 minutes, 1 ml de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3) 4% est ajoutée. Le mélange est conservé à l'obscurité et à température ambiante pour une durée de 30 minutes. L'absorbance est donc mesurée pour chaque échantillon à 760nm par un spectrophotomètre UV-visible de type Shimadzu 1800.

3.2. Dosage des flavones et flavonols :

Principe : Ce dosage est basé sur la technique modifiée par Lamaison et Carnat (1991), qui utilise le trichlorure d'aluminium comme réactif (Quettier-Deleu, 2000 : in Banarous 2014). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe stable avec un groupement carbonyle C4 Et les groupements hydroxyles C3 et C5 des flavones et flavonols, et composants non stables avec des groupement dihydroxyles ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (Mabry et al., 1970) : in Banarous 2014). La couleur de ce complexe est jaune, la meilleure absorbance est à 430nm. La quercétine est utilisé comme étalon pour réaliser la courbe d'étalonnage (Banarous 2014).

Protocole : On a ajouté 500µl de chaque échantillon diluée de la solution étalon, ou l'extrait végétal dilué (0,2mg/ml) à 500µl de trichlorure d'aluminium 2% AlCl₃ puis, les échantillons sont conservés à l'obscurité à température ambiante à 25°C. Après 15 minutes, l'absorbance de chaque échantillon est lue en utilisant le spectrophotomètre UV-visible de type Shimadzu 1800 à une longueur d'onde de 430nm.

4. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses sur couche mince sont réalisées sur des plaques d'aluminium Silica gel 60 F254 . Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant. la phase mobile est constituée d'un mélange tertiaire de solvants AcOEt/MeOH/H₂O (10:1.35:1). L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm), avant et après révélation par le réactif AlCl₃. (Lhuillier 2007)

$$Rf = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

5. Étude statistique :

Tous les essais ont été répétés trois fois. Les résultats ont été exprimés par une moyenne avec un écart-type p=3 pour chaque cas et calculés par le logiciel Microsoft Office Excel 2016.

Résultats et discussion

1. Extraction des métabolites secondaires

Les résultats de l'extraction sont montrés dans le tableau 8

Tableau 7. la masse et la teneur de chaque extrait végétal

Plante	Extrait	masse (g)	Teneur (%)
<i>G. Alypum</i>	Hex	0,445	1,78
	Ac-O-Et	0,343	1,371
<i>T. Polium</i>	Hex	0,504	2,016
	Ac-O-Et	0,768	3,073
<i>A. iva</i>	Hex	0,596	2,384
	Ac-O-Et	0,472	1,888
<i>J. oxycedrus</i>	Hex	0,311	1,244
	Ac-O-Et	0,469	1,877
<i>J. phoenicea</i>	Hex	0,726	2,904
	Ac-O-Et	0,578	2,314

Le tableau 7 montre que le rendement est compris entre 1,2% et 3,07% dans les différents extraits des plantes. Bien que le rendement des extraits soit faible dans les 10 extraits, mais celles d'hexane sont élevés pour chacune des plantes : *Globularia alypum*, *Teucrium polium* par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle (Et-O-AC) pour la même plante. Alors, l'hexane fait extraire des composés non-polaires, comme les lipides, les pigments végétaux, les terpènes et certains métabolites secondaires non polaires et à faible polarité, pour sa nature non polaire (Benarous 2014). Nous notons également que le rendement le plus élevé dans les extraits d'acétate d'éthyle est celui de la plante *Teucrium polium* avec un pourcentage de 3,07% ; En ce qui concerne l'extrait d'hexane, le rendement des feuilles de la plante *Juniperus oxycedrus* est le plus élevé parmi les extraits d'hexane d'un pourcentage de 1,2%. En comparant les résultats de l'étude avec les résultats des chercheurs de différentes régions, il y a une différence dans la rentabilité des extraits pour la même plante. L'extrait d'acétate d'éthyle pour la plante étudiée *Ajuga iva* est de 1,88% plus élevé que l'extrait d'acétate d'éthyle du même type étudié par (Baghiani, et al. 2011) qui a été estimé à 0,89% et inférieur aux extraits d'éthanol de (Bouyahya, et al. 2016) estimés à 14,62%. Ces différences de rentabilité des métabolites s'expliquent par la méthode d'extraction et le type de solution utilisée, ainsi que la date et la région de récolte des plantes. Dont les facteurs externes affectent le type, la qualité et la quantité des métabolites de la plante.

2. Dosage et quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes

Le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes pour chaque extrait végétal était basé sur les courbes d'étalonnage réalisées par les deux standards : l'acide gallique et la quercétine, qui sont présentées dans la figure 16. Les résultats sont exprimés en nombre de milligrammes d'acide gallique par gramme de poids de plante sèche pour les phénols. Et en mg de quercétine par gramme de poids de plante sèche pour les flavonoïdes. Chaque point de la courbe représente la moyenne arithmétique de 3 mesures \pm écart-type ($M \pm SD$).

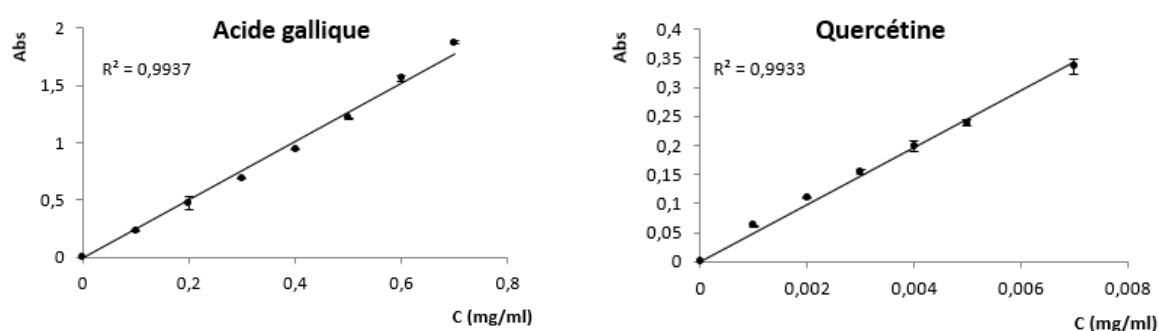


Figure 17. Les courbes d'étalonnage réalisé avec : la quercétine (à droite), acide gallique (à gauche)

Le tableau 8 montre les résultats de la quantification des phénols totaux et des flavonoïdes présents dans les extraits d'acétate d'éthyle de chaque plante.

Tableau 8. Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits

Plante	Phe tot (mg/g GAE)	Fv tot (mg/g QE)
<i>G. Alypum</i>	1,26 \pm 0,06	0,57 \pm 0,02
<i>T. Polium</i>	1,87 \pm 0,07	0,40 \pm 0,06
<i>A. iva</i>	0,52 \pm 0,04	0,26 \pm 0,02
<i>J. oxycedrus</i>	1,42 \pm 0,13	1,40 \pm 0,01
<i>J. phoenicea</i>	1,61 \pm 0,03	0,47 \pm 0,08

La plus grande quantité des phénols a été trouvée dans les extraits d'acétate d'éthyle de *Teucrium polium* avec 1,87 mg / g EAG, puis l'extrait de *Juniperus phoenicea* avec 1,61 mg / g.EAG et la plus faible quantité est pour l'*Ajuga iva* qui est estimé à 0,52 mg / g.EAG. Pour les

flavonoïdes la quantité la plus élevée est dans les extraits de *Juniperus oxycedrus* avec 98,59% des phénols totaux dans la même plante, tandis que *Globularia alypum*, *Teucrium polium*, *Juniperus phoenicea* contient des quantités proches de flavonoïdes allant de 0,4 à 0,57 mg / g. Et la plus faible quantité a été enregistrée dans les extraits d'*Ajuga iva* avec une quantité de 0,26 mg/g QE.

Ces résultats diffèrent des résultats obtenus dans les références indiquées dans le tableau 9, qui sont différents également entre eux. Avec la valeur la plus élevée de phénols dans les extraits de l'acétate d'éthyle des plantes *Teucrium polium* avec une valeur de 268,2 mg / g (selon les expériences de (Ardestani et Yazdanparast 2007) ce qui est différent des résultats de (Djeridane, et al. 2006) Estimé à 4,92 mg / g, et qui est proche de celles de (Esmaili, Zohari et Sadeghi 2009), estimés à 257,23 mg / g. Alors que les résultats de cette étude étaient inférieurs aux trois cas avec 1,87 mg / g.EAG. La même observation est enregistrée pour les flavonoïdes, dont les résultats de (Ardestani et Yazdanparast 2007) et (Esmaili, Zohari et Sadeghi 2009) ont été les plus élevés avec 197,4 et 189,74 mg / gEQ, respectivement, et les résultats de (Djeridane, et al. 2006) sont estimés à 4,69 mg / gEQ, plus que les résultats de cette étude estimés à 0,4 mg /gEQ.

En ce qui concerne la plante *Ajuga iva*, les concentrations les plus élevées d'extrait d'acétate d'éthyle dans le même échantillon étaient de 49,75 mg / g.EAG, selon (Bouyahya, et al. 2016), et 42 mg / g.EAG, selon (Baghiani, et al. 2011). Chez (Djeridane, et al. 2006), il a été estimé à 4,39 mg /g.EAG est faible par rapport aux résultats ci-dessus, mais supérieurs aux résultats obtenus dans cette étude et qui est estimé à 0,52 mg / g.EAG. La même observation a été enregistrée pour les flavonoïdes par les mêmes chercheurs dans la même étude.

Les résultats de cette étude montrent que la quantité des phénols est également faible dans l'extraits d'acétate d'éthyle de la plante *Globularia alypum* par rapport au travail de (Djeridane, et al. 2006) (21,54 mg / g EAG) et le travail de (Chogran, et al. 2012) (22,3 mg / g EAG) ; les résultats des deux études sont proches mais ils sont différents de ceux obtenus dans ce travail. Nous notons que le contenu des fleurs GA est très faible par rapport aux contenus des feuilles en flavonoïdes et qui est estimé à 1,55 mg / g EAG selon le travail de (Chogran, et al. 2012).

La quantité de phénols et de flavonoïdes est faible dans l'extrait de *Juniperus oxycedrus* obtenu dans cette étude et elle estimée à 1,42 mg / g.EAG et à 1,40 mg / g. EQ, respectivement. Et ces valeurs sont moins que les résultats obtenus par (Djeridane, et al. 2006) qui était estimés à 12,6 mg/g. EAG et 3,4 mg/g. EQ, respectivement. Alors que dans le *Juniperus phoenicea*,

(Keskes, et al. 2014) ont trouvé des quantités élevées des phénols dans les extraits d'hexane, d'acétate d'éthyle et de méthanol, estimés à 162,3, 180,8 et 265 mg / g.EAG, respectivement, ainsi que des quantités élevées de flavonoïdes dans les mêmes extraits, estimés à 96, 104 et 176 mg / g. EQ, respectivement. Ces résultats sont plus élevés par rapport aux résultats obtenus dans cette étude, qui sont estimés à 1,61 mg / g.EAG pour les phénols et 0,47 mg / g.EQ pour les flavonoïdes.

Lors de la comparaison de la quantité des phénols dans les plantes étudiées : *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus*, avec des plantes appartenant à la même famille étudiées par des recherches antérieures, nous avons constaté que la quantité des flavonoïdes obtenue est élevée, estimée à 1,4 et 0,47 mg / g.EQ chez la plante *Juniperus oxycedrus* et la plante *Juniperus phoenicea*, respectivement. Par rapport à celles trouvées pour ces plantes : *Cupressocyparis × leylandii* et *Juniperus drufacea Labill*, 0,24 et 0,007 mg /g.EQ, (Miceli, et al. 2011) (Pustahija, Subašić et Bašić 2014).

Cette différence est due aux conditions environnementales de chaque plante, ce qui ressort de l'étude réalisée par (Innocenti, et al. 2007) sur *Juniperus communus*, récoltée de trois régions différentes d'Italie, où ils ont constaté que le contenu du même type de flavonoïdes végétaux varie selon la localisation géographique. *Juniperus communus* de La verina contient plus du double des flavonoïdes trouvés à Monte Benichi.

Ces résultats et leur comparaison avec celles de différentes sources montrent que le contenu végétal des métabolites secondaires varie d'une plante à l'autre selon la méthode d'extraction utilisée dans l'étude et la solution utilisée dans le processus d'extraction et conformément au biotope dans lequel se trouve la plante. Le type et la concentration des composés métaboliques sont le résultat de l'interaction des plantes avec leur environnement et ses êtres vivants (biocénose) dans leur environnement. Une plante ne peut pas être étudiée séparément de son écosystème.

Tableau 9. Les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits de la littérature

Famille de la plante	Plante	Région	Partie	Extrait	Phe tot (mg/g GAE)	Fv tot (mg/g Q R* C** E)	Référence
<i>Globulariaceae</i>	<i>Globularia alypum</i>	Nord de Laghouat	parties aériennes	Éthanol	21,54 ± 0,81	04,54 ± 0,09	(Djeridane, et al. 2006)
	<i>Globularia alypum</i>	Korbous Jebel Mountain (Cap Bon Region - Tunisie)	feuilles	Méthanol	22,30 ± 1,20	04,72 ± 0,32*	(Chogran, et al. 2012)
	<i>Globularia alypum</i>	Korbous Jebel Mountain (Cap Bon Région - Tunisie)	fleurs	Méthanol	01,55 ± 1,22	03,63 ± 0,25*	(Chogran, et al. 2012)
<i>Lamiaceae</i>	<i>Teucrium polium</i>	Nord de Laghouat	parties aériennes	Éthanol	04,92 ± 0,21	04,69 ± 0,10	(Djeridane, et al. 2006)
	<i>Teucrium polium</i>	Iran	parties aériennes	Éthanol Ac-O-Et	180,20 ± 7,50 268,20 ± 8,80	135,20 ± 4,90** 197,40 ± 10,4**	(Ardestani et Yazdanparast 2007)
	<i>Teucrium polium</i>	Iran	parties aériennes	Méthanol	257,23 ± 5,10	189,74 ± 7,43**	(Esmaeili, Zohari et Sadeghi 2009)
	<i>Teucrium polium</i>	Le sud-est de la Serbie	parties aériennes	Méthanol	14,57-157	6,48 – 139,87 *	(Stankovic, et al. 2012)
	<i>Ajuga iva</i>	Nord de Laghouat	parties aériennes	Éthanol	04,39 ± 0,00	01,00 ± 0,00	(Djeridane, et al. 2006)

	<i>Ajuga iva</i>	-		Éthanol	49,75 ± 2,08	11,97 ± 0,42	(Bouyahya, et al. 2016)
	<i>Ajuga iva</i>	Biskra, Algérie		Chloroforme Ac-O-Et	30,46 ± 3,72 42,00 ± 1,67	18,42 ± 1,93 12,38 ± 0,87	(Baghiani, et al. 2011)
	<i>Ajuga iva</i>	Sidi Bouzid	feuilles	Chloroforme Meth	02,52 ± 0,80 25,69 ± 2,60	ND 03,00 ± 0,30	(Makni, et al. 2013)
	<i>Mentha spicata</i>		feuilles	Méthanol	012,00 ± 0,30	02,45 ± 0,02	(Brahmi, et al. 2015)
	<i>Mentha pulegium</i>	Bejaia, Algérie	feuilles	Méthanol	06,10 ± 0,50	0,85 ± 0,01	(Brahmi, et al. 2015)
	<i>Mentha rotundifolia L huds</i>		feuilles	Méthanol	04,60 ± 0,10	03,30± 0,10	(Brahmi, et al. 2015)
	<i>Lavandula stoechas</i>	-			34,64 ± 1,16	09,28 ± 1,37	(Bouyahya, et al. 2016)
Cupressaceae	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Nord de Laghouat	parties aériennes	Éthanol	12,60± 0,41	03,5 0± 0,50	(Djeridane, et al. 2006)
	<i>Juniperus pheonicea</i>	Ain		Hexane	162,3 ± 3,2	96,00 ± 0,48	
		Silislal El Oyoune Tunisie	feuilles	Ac-O-Et Méthanol	180,8 ± 3,6 265 ± 5,8	104,00 ± 0,80 176,00 ± 0,52	(Keskes, et al. 2014)
	<i>Cryptomeria japonica</i>	Sarajevo	Aiguilles	Méthanol	14,93	0,47	(Pustahija, Subašić et Bašić 2014)
	<i>Cupressocyparis × leylandii</i>	Sarajevo	Aiguilles	Méthanol	08,47± 0,00	0,24± 0,00	(Pustahija, Subašić et Bašić 2014)

<i>Sequoiadendron giganteum</i>	Sarajevo	Aiguilles	Méthanol	08,18± 0,00	0,55± 0,00	(Pustahija, Subašić et Bašić 2014)
<i>Juniperus drupacea Labill</i>	Turquie	Baies	Méthanol	48,00 ± 0,99	0,007 ± 0,00*	(Miceli, et al. 2011)
<i>Juniperus communus var communus</i>	Turquie	Baies	Méthanol	59,17 ± 1,65	25,94 ± 0,00*	(Miceli, et al. 2011)
<i>Juniperus communus var saxalilis</i>	Turquie	Baies	Méthanol	17,64 ± 0,09	05,38 ± 0,00*	(Miceli, et al. 2011)
<i>Juniperus communus de l'Italie</i>	Italie (Reggello)	-	EtOH/H ₂ O	ND	03,17 ± 0,00*	(Innocenti, et al. 2007)
	Bucine, Arezzo (Monte Benichi)	-	EtOH/H ₂ O	ND	01,46 ± 0,00*	(Innocenti, et al. 2007)
	Arezzo (La verna)	-	EtOH/H ₂ O	ND	03,79 ± 0,00*	(Innocenti, et al. 2007)

Q R* C E : Quercétine, Rutine*, Catéchine** équivalent ; ND : non déterminé**

3. Screening chimique général par CCM

Pour chacune des plantes investiguées de cette étude : *Globolaria alypum*, *Teucrium polium*, *Ajuga iva*, *Juniperus oxycedrus* et *Juniperus phoenicea*, nous avons calculé les valeurs de Rf pour chaque spot apparu dans les plaques CCM, après la migration des extraits d'acétate d'éthyle, ensuite nous avons observé les couleurs de ces spots avant et après l'ajout le réactif chimique le trichlorure d'aluminium. Les informations recueillies ont ensuite été confrontées aux données bibliographiques collectées (des couleurs et Rf). La fluorescence du produit soumis à la lumière UV (264 et 366nm) joue un rôle important pour l'identification structurale, c'est l'étape primaire de l'analyse. Tous les flavonoïdes apparaissent noirs dans la lumière UV 264nm, cependant sous UV 366nm, chaque classe de flavonoïdes est caractérisée par une ou deux couleurs qui donnent une idée sur la structure (Rahmouni 2013) (Waksmundzka-Hajnos, Sherma et Kowalska 2008). Le tableau 10 résume les structures possibles de chaque spot à partir de la fluorescence et la valeur de Rf.

Tableau 10. Les classes et types des flavonoïdes en se basant sur la couleur et les valeurs de Rf des spots obtenus à partir de la chromatographie des extraits

Spot	Rf	GA	TP	AI	JO	JP	Type du Phénol/ Flavonoïde possible
1	0,935	✓	✓	✓	✓	✓	Anthraquinones (c-glycosides)
2	0,877	✓			✓	✓	Flavonol 3-0-monoglycoside or 3-0-diglycoside.
3	0,877		✓				Isoflavone 7-0 diglycoside or 7-0 monoglycoside
4	0,754	✓	✓	✓	✓	✓	Anthocyanidine-3-glycosides
5	0,677	✓			✓		Phénol avec groupement hydroxyle libre
6	0,651					✓	Phénol avec groupement hydroxyle libre
7	0,651			✓			flavonols, flavones, isoflavones, flavonone
8	0,554	✓					ND
9	0,529				✓		ND
10	0,458	✓					ND
11	0,531		✓			✓	ND

3.1. Interprétation des CCM de *Globularia alypum*

Après observation des plaques CCM dans la chambre CAMAG sous UV ($\lambda=254$ et 366nm) et avec le réactif chimique (AlCl_3), les résultats sont présentés dans la figure 18.

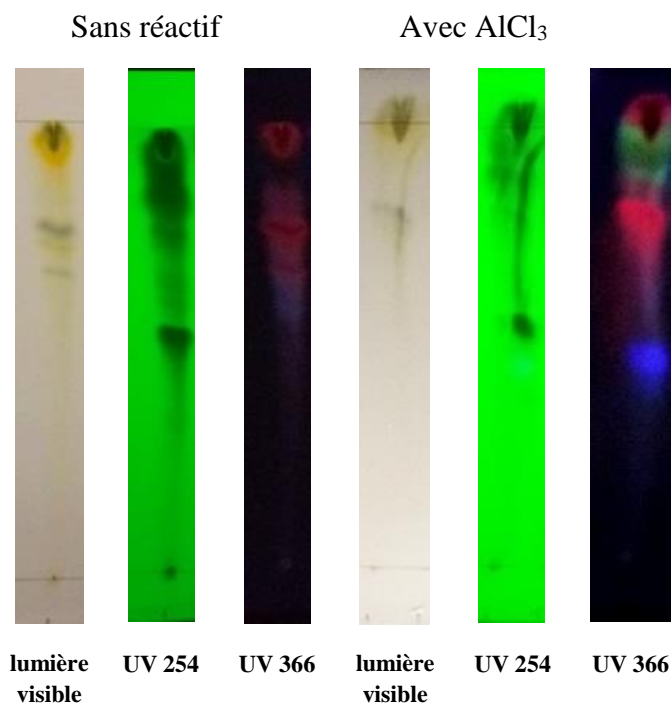


Figure 18. CCM préliminaires de l'extrait de *Globularia alypum* (GA) développement AcOEt / MeOH / H_2O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm) avant et après l'ajout le réactif.

En s'appuyant sur les données de la bibliographie quant à la séparation des composés phénoliques par CCM et leur observation sous l'UV, on peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent entrer dans la composition de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Globularia alypum*, l'ensemble des observations et des résultats sont regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11. Les Couleurs caractéristiques et Rf des spots et les Composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Globularia alypum* identifiés par CCM

Les spots	Rf	Visible	UV 254	UV 366	AlCl ₃ UV 254	AlCl ₃ UV 366	Nom/ classe
SG1	0,935	Jaune	Noir	Rouge	Noir	Rouge	Anthraquinones (c-glycosides)
SG2	0,877	-	Noir	-	Noir	Vert	Flavonol 3-0-monoglycoside or 3-0-diglycoside.
SG3	0,754	Vert	Noir	Rouge	-	Rouge	Anthocyanidine-3-glycosides
SG4	0,677	Vert	-	Rouge	-	Rouge	Phénol avec groupement hydroxyle libre
SG5	0,554	-	-	Cyan	-	-	ND
SG6	0,458	-	Noir	-	Noir	Blue +	ND

D'après les résultats de ce tableau, le système a séparé l'extrait d'acétate d'éthyle de *Globularia alypum* en 06 taches de couleurs différentes :

- **SG1** : le spot à Rf= 0,935, est en couleur jaune, apparait comme une tache noire sous l'UV 254nm, et rouge sous l'UV 366 nm, elle ne change pas après l'ajout du réactif AlCl₃ soit sous l'UV à 254 ou 366 nm. Nous pouvons indiquer la présence des Anthraquinones (c-glycosides), ces composés ont une valeur Rf=0,937, 0,962, 0,975 par le même système de solvant AcOEt-MeOH-Eau (100 :13,5 :10) et ont une couleur rouge sous l'UV 366 nm (El Yahyaoui, et al. 2017).

- **SG2** : le spot à Rf=0,877, ne possède aucune couleur dans la lumière visible et sous l'UV 366 nm, cependant il a une couleur noire sous UV à 254 nm. Après l'ajout de l'AlCl₃, le spot reste noir sous UV à 254nm, et la couleur vire au vert sous l'UV 366nm. Selon (Jacqueline 1984) le composé qui est invisible sous l'UV366nm est coloré en vert avec AlCl₃ est un flavonol probable le Flavonol 3-0-monoglycoside or 3-0-diglycoside.

- **SG3** : le spot à Rf=0,754, a une couleur verte en lumière visible et noire sous l'UV254 et rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l'AlCl₃. Selon (Mamyrbékova-Békro, et al. 2008), le composé ayant ces caractéristiques est un flavonoïde de type anthocyanidine-3-glycosides.

- **SG4** : le spot à Rf=0,677, a une couleur verte en lumière visible sous l'UV 254nm et rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l'AlCl₃. Cette molécule n'est pas un flavonoïde car tous les flavonoïdes apparaissent comme tache noire sous l'UV 254nm. C'est un composé phénolique à un groupement hydroxyle libre à cause de la couleur rouge sous l'UV 366nm (Waksmundzka-Hajnos, Sherma et Kowalska 2008).

•SG5 et SG6 : On n'a pas trouvé d'information concernant ces deux composés, il nécessite l'utilisation d'autres réactifs pour visualiser et confirmer les résultats.

Globularia alypum L. est chimiquement riche en composés phénoliques : acide cinnamique ; acide pyrocatechuique ; globularine ; catalpol ; rutine ; luteoline 7-glucoside ; acide chlorogénique ; acide caffeique ; acide ferulique ; acide p-coumarique ; globularimine ; globularinine ; globularidine ; liriiodendrine ; globularicisine ; syringine ; 4',7-dihydroxyflavone ; apigénine-7-glucoside ; quercétol ; luteoline-7-glucoside ; 8-C-glucosyl-4',7-dihydroxyflavone ; rutoside ; cyanidine ; peonidine ; acide vanillique ; acide syringique ; acide caffeique ; acide sinapique ; acide p-coumarique ; acide ferulique ; acide b-resorcylique ; Globularicisin ; Globularioside ; Apigénin ; Luteolin ; acide coumarique ; 6-hydroxyluteolin 7-O-laminaribioside ; eriodictyol 7-O-sophoroside ; 6'-O-coumaroyl-1'-O-[2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl]- β -Dglucopyranoside ; acteoside ; isoacteoside ; forsythiaside ; 6-hydroxyluteolin 7-O- β -D-glucopyranoside ; luteolin 7-O-sophoroside (Rahmouni 2013).

3.2. Interprétation des CCM de *Teucrium polium*

Les plaques sont observées dans la chambre CAMAG sous UV ($\lambda=254$ et 366nm) et avec le réactif chimique (AlCl_3), les résultats sont présentés dans la figure 19.

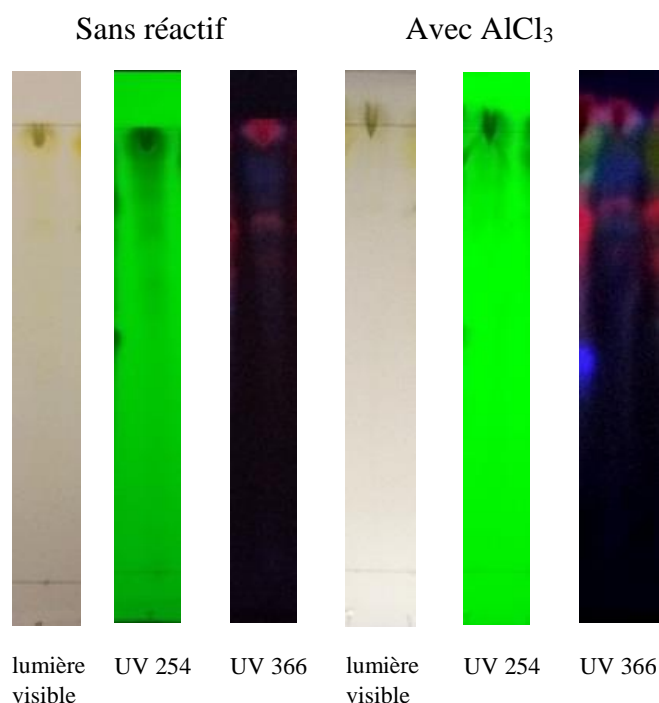


Figure 19 CCM préliminaires de l'extrait de *Teucrium polium* (TP) développement AcOEt / MeOH / H_2O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm) avant et après l'ajout le réactif.

En se basant sur les données de la bibliographie quant à la séparation des composés phénoliques par CCM et leur observation sous UV, on peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent entrer dans la composition de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Teucrium polium*, l'ensemble des observations et des résultats sont regroupés dans le tableau 12.

Tableau 12. Les Couleurs et caractéristique et Rf des Spot et les Composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Teucrium polium* (TP) identifiés par CCM.

Spots	Rf	Visible	UV 254	UV 366	AlCl_3 UV 254	AlCl_3 UV 366	Nom/ classe
SP1	0,935	Jaune	Noir	Rouge	Noire	Rouge	Anthraquinones (c-glycosides)
SP2	0,877	-	Noir	Bleu	-	Bleu+	Isoflavone 7-0 diglycoside ou 7-0 monoglycoside
SP3	0,754	Vert	Noir	Rouge	-	Rouge	Anthocyanidine-3-glycosides
SP4	0,531	-	-	/	/	/	-

D'après les résultats de ce tableau, l'éluent a permis l'extrait d'acétate d'éthyle de *Teucrium polium* de séparer en 4 taches de couleurs différentes :

• **SP1**: Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG1 à $R_f = 0,935$, est en couleur jaune, apparaît comme une tache noire sous l'UV 254nm, et rouge sous l'UV 366 nm, elle ne change pas après l'ajout du réactif $AlCl_3$ soit sous l'UV 254 ou UV 366 nm. Nous pouvons indiquer la présence des Anthraquinones (c-glycosides), ces composés ont une valeur $R_f = 0,937, 0,962, 0,975$ par le même système de solvant AcOEt-MeOH-Eau (100 :13.5 :10) et ont une couleur rouge sous l'UV 366 nm (El Yahyaoui, et al. 2017).

• **SP2**: le spot à $R_f = 0,877$, n'a pas de couleur sous lumière visible, mais noir sous l'UV 254nm, bleu sous l'UV 366 nm. Après visualisation par l' $AlCl_3$, le spot disparaît sous l'UV 254nm, et la couleur devient plus bleuâtre sous l'UV 366nm. Selon (Jacqueline 1984) le composé qui est invisible sous l'UV 366nm et coloré en Blue avec l' $AlCl_3$ est un Isoflavone probable de type Isoflavone 7-0 diglycoside or 7-0 monoglycoside.

• **SP3**: Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG3 à $R_f = 0,754$, a une couleur verte en lumière visible et noire sous l'UV 254 et rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l' $AlCl_3$. Selon (Mamyrbékova-Békro, et al. 2008), le composé ayant ces caractéristiques est un flavonoïde de type anthocyanidine-3-glycosides.

• **SP4**: le spot à $R_f = 0,531$, invisible sous lumière visible et sous l'UV 254. Mais avec l' $AlCl_3$ apparaît blanc brillant (blanc contre fond vert). Il n'y a pas des informations trouvées, il faut utiliser autres réactifs pour visualiser et confirmer les résultats.

Plusieurs chercheurs ont évalué la composition chimique de *T. polium* et ils ont indiqué la présence de plusieurs composés incluant principalement les flavonoïdes, polyphénols, iridoïdes, tannins, cardénolides, anthraquinones libres, stéroïdes et dérivés de stéroïdes, huiles essentielles et alcaloïdes, les molécules trouvées dans cette plante sont : luteoline ; apigénine ; diosmétine ; cirsimaritrine ; cirsilole ; cirsilinoléol, 5-hydroxy-6,7,3',4'- tétraméthoxy flavone ; salvigénine ; apigénine-5-galloylglucoside ; apigénine-7-glucoside ; vicénine ; luteoline-7-glucoside (Krache 2009) (Bendif 2017).

3.3. Interprétation des CCM d'*Ajuga iva*

La figure ci-dessous présente les résultats de l'observation des plaques CCM dans une chambre Camag avec les mêmes réactifs chimiques.

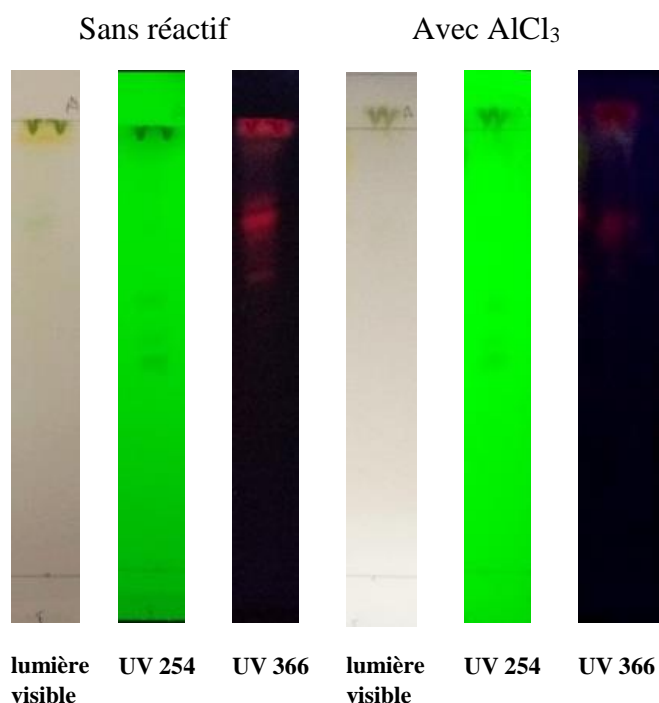


Figure 20. CCM préliminaires de l'extrait d'*Ajuga iva* (AI) développement AcOEt / MeOH / H₂O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm) avant et après l'ajout le réactif.

On peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent entrer dans la composition de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Ajuga iva*, l'ensemble des observations et les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 13.

Tableau 13. les Couleurs et caractéristique et Rf des spots et les composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Ajuga iva* (AI) identifiés par CCM.

Spots	Rf	Visible	UV 254	UV 366	AlCl ₃		Nom/ classe
					UV 254	UV 366	
SA1	0,935	Jaune	Noire	Rouge	Noire	Rouge	Anthraquinones (c-glycosides)
SA2	0,754	Vert	Noire	Rouge	-	Rouge	Anthocyanidine-3-glycosides
SA3	0,651	-	-	Rouge	-	-	flavonols, flavones, isoflavones, flavonone

D'après les résultats de ce tableau, l'éluant a permis l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Ajuga iva* se séparer en 4 taches de couleurs :

- **SA1** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG1 à Rf= 0,935, est en couleur jaune, apparait comme une tache noire sous l'UV 254nm, et rouge sous l'UV 366 nm,

elle ne change pas après l'ajout du réactif AlCl_3 soit sous l'UV 254 ou UV 366 nm. Nous pouvons indiquer la présence des Anthraquinones (c-glycosides), ces composés ont une valeur $R_f=0,937, 0,962, 0,975$ par le même système de solvant AcOEt-MeOH-Eau (100 :13.5 :10) et ont une couleur rouge sous l'UV 366 nm (El Yahyaoui, et al. 2017).

• **SA2** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG3 à $R_f=0,754$, a une couleur verte en lumière visible et noire sous l'UV254 et rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l' AlCl_3 . Selon (Mamyrbékova-Békro, et al. 2008), le composé ayant ces caractéristiques est un flavonoïde de type anthocyanidine-3-glycosides.

• **SA3** : le spot à $R_f=0,651$, est invisible sous lumière visible et UV254nm, et possède une couleur rouge sous l'UV 366 nm. Cette couleur disparaît après l'ajout de l' AlCl_3 , il n'existe pas d'information disponible pour ce résultat mais selon (Mamyrbékova-Békro, et al. 2008), nous croyons que ce composé appartient aux flavonols, flavones, isoflavones ou flavonone.

Dans les littératures, (Bendif 2017) a rapporté la présence des polyphénols, tanins, flavonoïdes, stérols, stéroïdes, les huiles volatiles et les saponosides, les anthocyanes, les acides phénoliques, l'ajugarine. (Boudjelal 2013) a trouvé que l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* est composé de : apigénine hexoside-pentoside ; apigénine hexoside-pentoside (isomère) ; apigénine di-hexoside ; methyl-apigéninedi-hexoside ; naringénine rutinoside ; apigénine rutinoside ; cinnamoyl-gluco iridoïdes (comme harpagide et harpagoside) (Boudjelal 2013).

3.4. Interprétation des CCM de *Juniperus oxycedrus*

Les plaques sont visualisées dans une chambre CAMAG et observées sous UV avec les mêmes réactifs, la figure 21 représente les résultats de l'observation de ces plaques.

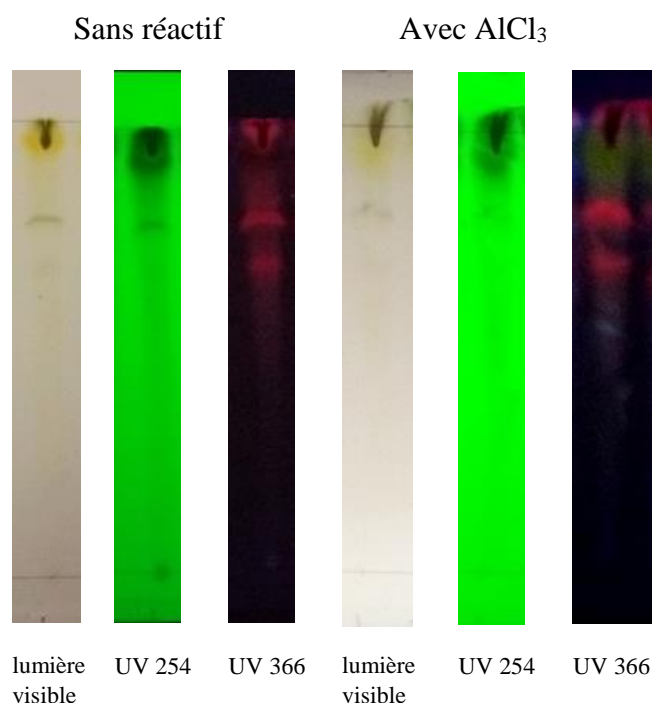


Figure 21. CCM préliminaires de l'extrait de *Juniperus oxycedrus* (JO) développées AcOEt / MeOH / H₂O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm) avant et après l'ajout le réactif.

On peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent entrer dans la composition de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Juniperus oxycedrus*, l'ensemble des observations et des résultats sont regroupés dans le tableau 14.

Tableau 14. Les couleurs, caractéristiques et Rf des spots et les composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Juniperus oxycedrus* (JO) identifiés par CCM.

Spots	Rf	Visible	UV 254	UV 366	AlCl ₃ UV 254	AlCl ₃ UV 366	Nom/ classe
SO1	0,935	Jaune	Noire	Rouge	Noire	Rouge	Anthraquinones (c-glycosides)
SO2	0,877	-	Noire	Invisible	Noire	Vert	Flavonol 3-0-monoglycoside or 3-0-diglycoside.
SO3	0,754	Vert	Noire	Rouge	-	Rouge	Anthocyanidine-3-glycosides
SO4	0,677	Vert	-	Rouge	-	Rouge	Phénol avec groupement hydroxyle libre
SO5	0,529	-	-	-	-	Cyan	ND

D'après les résultats de ce tableau, l'éluent a permis l'extrait d'acétate d'éthyle de *Juniperus oxycedrus* se sépare en 5 taches des couleurs :

• **SO1** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG1 à $R_f = 0,935$, est en couleur jaune, apparaît comme une tache noire sous l'UV 254nm, et rouge sous l'UV 366 nm, elle ne change pas après l'ajout du réactif $AlCl_3$, soit sous l'UV 254 ou UV 366 nm. Nous pouvons indiquer la présence des Anthraquinones (c-glycosides), ces composés ont une valeur $R_f = 0,937, 0,962, 0,975$ par le même système de solvant AcOEt-MeOH-Eau (100 :13.5 :10) et ont une couleur rouge sous l'UV 366 nm (El Yahyaoui, et al. 2017).

• **SO2** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du SG2 spot à $R_f = 0,877$, ne possède aucune couleur sous la lumière visible et l'UV 366 nm, cependant il a une couleur noire sous UV 254nm. Après sa visualisation par l' $AlCl_3$, le spot reste noir sous UV 254nm, et la couleur vire au vert sous l'UV 366nm. Selon (Jacqueline 1984), le composé qui est invisible sous l'UV366nm est coloré en vert avec $AlCl_3$ est un flavonol probable le flavonol 3-0-monoglycoside or 3-0-diglycoside.

• **SO3** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du SG3 à $R_f = 0,754$, a une couleur verte en lumière visible et noire sous l'UV254 et rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l' $AlCl_3$. Selon (Mamyrbékova-Békro, et al. 2008), le composé ayant ces caractéristiques est un flavonoïde de type anthocyanidine-3-glycosides.

• **SO4** : le spot à $R_f = 0,677$, a une couleur verte en lumière visible sous l'UV 254nm et rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l' $AlCl_3$. Cette molécule n'est pas un flavonoïde car tous les flavonoïdes apparaissent comme tache noire sous l'UV 254nm. C'est un composé phénolique à un groupement hydroxyle libre à cause de la couleur rouge sous l'UV 366nm (Waksmundzka-Hajnos, Sherma et Kowalska 2008).

• **SO5** : nous n'avons pas trouvé d'information concernant ce composé, il nécessite l'utilisation d'autres réactifs pour visualiser et confirmer les résultats.

3.5. Interprétation des CCM de *Juniperus phoenicea*

Après observation des plaques dans une chambre noire CAMAG, les résultats sont présentés par la figure 22.

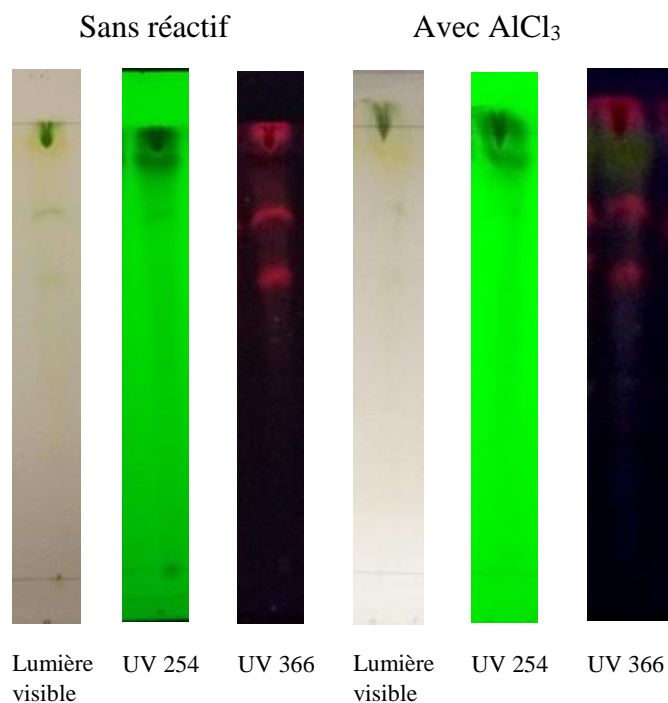


Figure 22. CCM préliminaires de l'extrait de *Juniperus phoenicea* (JP) développement AcOEt / MeOH / H₂O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm) avant et après l'ajout le réactif.

En utilisant les données de la bibliographie quant à la séparation des composés phénoliques par CCM et leur observation sous UV, on peut éventuellement prédire les composés ou les familles de composés les plus probables qui peuvent entrer dans la composition de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Juniperus phoenicea*, l'ensemble des observations et des résultats sont regroupés dans le tableau 15.

Tableau 15. les couleurs, caractéristiques et Rf des spots et les composés phénoliques probables dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Juniperus phoenicea* (JP) identifiés par CCM.

Spots	Rf	Visible	UV 254	UV 366	AlCl ₃ UV 254	AlCl ₃ UV 366	Nom/ classe
SJ1	0,935	Jeun	Noire	Rouge	Noire	Rouge	Anthraquinones (c-glycosides)
SJ2	0,877	-	Noire	-	Noire	Vert	Flavonol 3-0-monoglycoside or 3-0-diglycoside. Class: Flavonol
SJ3	0,754	Vert	Noire	Rouge	-	Rouge	Anthocyanidine-3-glycosides (ejsr_24
SJ4	0,651	Vert	-	Rouge	-	Rouge	Phénol avec groupement hydroxyle libre
SJ5	0,531	-	-	ND	ND	ND	ND

D'après les résultats de ce tableau, l'éluant a permis l'extrait d'acétate d'éthyle d' *Juniperus phoenicea* se sépare en 5 taches :

- **SJ1** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG1 à Rf= 0,935, est en couleur jaune, apparait comme une tache noire sous l'UV 254nm, et rouge sous l'UV 366 nm, elle ne change pas après l'ajout du réactif AlCl₃ soit sous l'UV 254 ou UV 366 nm. Nous pouvons indiquer la présence des Anthraquinones (c-glycosides), ces composés ont une valeur Rf=0,937, 0,962, 0,975 par le même système de solvant AcOEt-MeOH-Eau (100 :13.5 :10) et ont une couleur rouge sous l'UV 366 nm (El Yahyaoui, et al. 2017).

- **SJ2** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG2 à Rf=0,877, ne possède aucune couleur sous la lumière visible et l'UV 366 nm, cependant il a une couleur noire sous UV 254nm. Après sa visualisation par l'AlCl₃, le spot reste noir sous UV 254nm, et la couleur vire au vert sous l'UV 366nm. Selon (Jacqueline 1984), le composé qui est invisible sous l'UV366nm est coloré en vert avec AlCl₃ est un Flavonol probable le Flavonol 3-0-monoglycoside or 3-0-diglycoside.

- **SJ3** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SG3 à Rf=0,754, a une couleur verte en lumière visible et noire sous l'UV254 et rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l'AlCl₃. Selon (Mamyrbékova-Békro, et al. 2008), le composé ayant ces caractéristiques est un flavonoïde de type anthocyanidine-3-glycosides.

- **SJ4** : le spot à Rf=0,651, a une couleur verte sous lumière visible et est invisible sous l'UV254. Et il a une couleur rouge sous l'UV 366 nm avant et après l'ajout de l'AlCl₃. Cette molécule n'est pas un flavonoïde car tous les flavonoïdes apparaissent comme tache noire sous l'UV 254nm. C'est un composé phénolique à un groupement hydroxyle libre à cause de la couleur rouge sous l' UV 366nm (Waksmundzka-Hajnos, Sherma et Kowalska 2008).

- **SJ5** : Ce spot possède les mêmes caractéristiques du spot SP4 à $R_f=0,531$, invisible sous lumière visible et sous l'UV254. Mais avec l' $AlCl_3$ apparait blanc brillant (blanc contre fond vert). Il n'y a pas des informations trouvées, il faut utiliser autres réactifs pour visualiser et confirmer les résultats.

En Conclusion, la majorité des composés ont une fluorescence sous l'UV366nm, tous les alcaloïdes ont une couleur bleue, verte ou violette. Les coumarines ont une couleur bleue, verte, jaune ou marron. Les flavonoïdes ont une couleur Bleue, verte, rouge ou jaune. Le cardia glycoside a une couleur noire sous l'UV 254nm mais aucune couleur sous l'UV366nm. Les huiles essentielles possèdent une couleur très claire sous UV254nm et invisible sous UV366nm. Les saponines n'ont pas de couleur sous UV 254nm et UV366nm. (El Yahyaoui, et al. 2017) (Waksmundzka-Hajnos, Sherma et Kowalska 2008) (Mamyrbékova-Békro, et al. 2008). Mais on ne peut pas confirmer la présence de tous ces composés par un seul réactif. Pour les détecter, il faut utiliser d'autres réactifs.

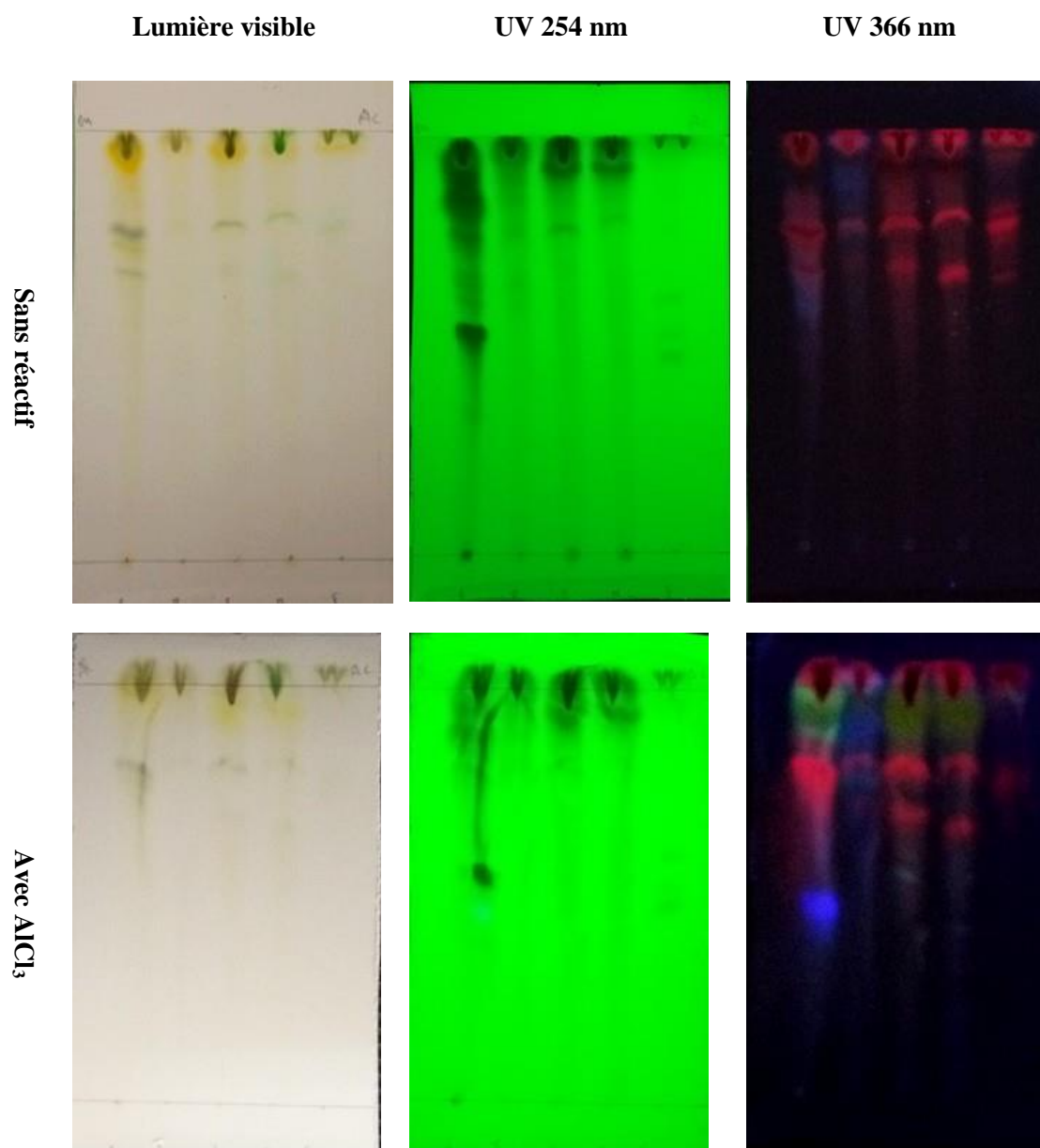


Figure 23. CCM préliminaires des extraits de GA, TP, JO, JP et AI développement en AcOEt / MeOH / H₂O (10 : 1.35 : 1) en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm) avant et après l'ajout de AlCl₃

Tableau 16. Les valeurs de Rf des quelques molécules, selon la littérature la phase mobile (Ac-O-Et/MeOH/Eau 10:1,35:1)

Rf	Les composées	référence
0,93	Anthraquinones (c-glycosides)	(El Yahyaoui, et al. 2017)
0,96	Anthraquinones (c-glycosides)	(El Yahyaoui, et al. 2017)
0,97	Anthraquinones (c-glycosides)	(El Yahyaoui, et al. 2017)
0,85	Acide férulique	(Tibor 2006)
0,83	Acide férulique	(Maleš et al. 2001)
0,80	Epigallocatechin gallate	(Yoko , et al. 2012)
0,80	Acide Caféique	(Tibor 2006)
0,81	Acide Caféique	(Maleš et al. 2001)
0,71	Acide phénolique	(Tibor 2006)
0,71	Flavonoïde (dérivé de la kaempferol)	(Maleš et al. 2001)
0,62	Tiliroside	(Maleš, et al. 1998)
0,58	Isoquercitrin	(Tibor 2006)
0,53	Hyperoside	(Tibor 2006)
0,51	Quercétine	(Maleš, et al. 1998)
0,49	Quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside	(Maleš, et al. 1998)
0,44	Myricitrin	(Maleš, et al. 1998)
0,44	Myricitrin-3-O- α -L-arabinopyranoside	(Maleš, et al. 1998)
0,41	Myricitrin-3-O- β -D-gluco-pyranoside	(Maleš, et al. 1998)
0,41	Myricitrin-3-O- β -D-galactopyranoside	(Maleš, et al. 1998)
0,41	Acide phénolique	(Tibor 2006)
0,37	Myricitrin-3-O- β -D-(6''-O-galloyl)-gluco-pyranoside	(Maleš, et al. 1998)
0,36	Chlorogenic acid	(Tibor 2006)
0,38	Chlorogenic acid	(Maleš et al. 2001)
0,31	Rutin	(Tibor 2006)
0,14	Flavonoïde	(Tibor 2006)
0,14	Flavonoïde (dérivé de la quercétine)	(Maleš et al. 2001)
0,56	Theaflavin	(Yoko , et al. 2012)
0,51	Acide phénolique	(Maleš et al. 2001)
0,48	Acide phénolique	(Maleš et al. 2001)
0,42	Flavonoïde (dérivé de la kaempferol)	(Maleš et al. 2001)
0,35	Flavonoïde (dérivé de la quercétine)	(Maleš et al. 2001)
0,33	Acide phénolique	(Maleš et al. 2001)
0,30	Flavonoïde (dérivé de la quercétine)	(Maleš et al. 2001)
0,25	Acide phénolique	(Maleš et al. 2001)
0,18	Flavonoïde (dérivé de la quercétine)	(Maleš et al. 2001)
0,06	Flavonoïde (dérivé de la quercétine)	(Maleš et al. 2001)
0,02	Flavonoïde (dérivé de la quercétine)	(Maleš et al. 2001)

Références Bibliographiques

- Convolvulus supinus* دراسة نواتج الأيض الثانوي الفلافونويدي والفعالية المضادة للأكسدة للنباتة. 2011. Abbas Benmerache Kral & Coss. جامعة منتوري قسنطينة: مذكرة ماجستير.
- ABBASSEN Razika. 2015. Mémoire de Magister: Diversité du peuplement entomologique de *Juniperus communis* ssp. *Hemisphaerica* & *Juniperus oxycedrus* ssp. *Rufescens* de la forêt de Tigounatine (Tikjda, Djurdjura, sud). TIZI-OUZOU: UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU.
- Abdollahi, A., Karimpour, H., Monsef-Esfehani H. (2003). Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacol. Res.* 48:31-35.
- Amessis-Ouchemoukh, Nadia, Ibrahim M. Abu-Reidah, Rosa Quirantes-Piné, Celia Rodríguez-Pérez, Khodir Madani, Alberto Fernández-Gutiérrez, et Antonio Segura-Carretero. 2014. «Tentative Characterisation of Iridoids, Phenylethanoid Glycosides and Flavonoid Derivatives from *Globularia alypum* L.(Globulariaceae) Leaves by LC-ESI-QTOF-MS.»
- Ardestani, Amin, et Raziéh Yazdanparast. 2007. «Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation.» *Food and Chemical Toxicology* 2402–2411.
- Association Tela Botanica. 2014. Le réseau de la botanique francophone. Available at: <http://www.tela-botanica.org/>. (Accessed: 31 January 2014).
- Autore, G., Capasso, F., De Fusco, R., Fasulo, M.P., Lembo, M., Mascolo N., Menghini A. (1984). Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* (L.) *Pharmacol. Res. Commun.* 1:16.
- BECHIRI-ABBES Asma. 2016. Thèse de Doctorat: Contribution à l'étude de l'effet de plantes médicinales sur l'hyperglycémie postprandiale chez le rat Wistar. TLEMCEN: UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAÏD -TLEMCEN-
- Baghiani, Abderrahmane, sabah Boumerfeg, Moufida Adjadj, Djamila Ameni, Meriem Djermouni, Fatima Khelifi-touhami, Nouredine Charef, Seddik Khennouf, et Lekhmici Arrar. 2011. «Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga reptans* L. Extracts.» *Free Radicals and Antioxidants* 21-30.
- Bellakhdar, Jamal, Renée Claisseb, Jacques Fleurentin, et Chafique Younos. 1991. «Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea.» *Journal of Ethnopharmacology* 35: 123-143.
- Bello, R., Moreno, L., Primo-Yúfera, E., & Esplugues, J. (2002). *Globularia alypum* L. extracts reduced histamine and serotonin contraction in vitro. *Phytotherapy Research*, 16(4), 389-392.
- BELMEKKI Nacéra TEBICHEK. 2009. Mémoire de Magister: Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de *Saccocalyx satureioides*, *Salvia verbenaca* et *Teucrium polium* de la région Ouest d'Algérie. TLEMCEN: UNIVERSITÉ ABOU BAKR BELKAÏD – TLEMCEN.
- Benarous, Khedidja. 2010. *Mémoire de Magister: Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de Candida rugosa*. LAGHOuat: UNIVERSITÉ AMAR TELIDJI – LAGHOuat.
- Benarous, Khedidja. 2014. *Thèse de Doctorat: Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de Peganum harmala, Inonotus hispidus, Marrubium vulgare, Ziziphus lotus et Achillea santolina sur la lipase de Candida rugosa*. ALGER: L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE KOUBA.

- BENCHEIKH Salah Eddine, Mohamed Bilal GOUDJIL, Souad ZIGHMI et Segni LADJEL. (2015). Effet du séchage sur le rendement des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp. *aurasianum* Labiatae. *Annales des Sciences et Technologie*. 7(1).
- Bendif, Hamdi. 2017. *Thèse de Doctorat: Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae: Ajuga iva (L.) Schreb., Teucrium polium L., Thymus munbyanus subsp. coloratus (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet*. L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE KOUBA-ALGER.
- Benguerba, Adlen. 2008. *Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espece Inula crithmoides L.* UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE: Mémoire de magister.
- Boudjelal, Amel. 2013. *Thèse de Doctorat: Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (Ajuga iva, Artemisia herba alba et Marrubium vulgare) de la région de M'Sila, Algérie: Université d'Oum-El-Bouaghi*.
- Boussoualim, Naouel. 2014. *Thèse: Activités biologiques de plantes médicinales: Anchusa azurea Mill. et Globularia alypum L.* Université Ferhat Abbas Sétif.
- Boutiti, A, A Benguerba, R Kitouni, M Bouhroum, S Benayache, et F Benayache. 2008. «SECONDARY METABOLITES FROM *Globularia alypum*.» *Chemistry of Natural Compounds* 44: 543 - 544.
- Bouyahya, Abdelhakim, Jamal Abrini, Aicha El-Baabou, Youssef Bakri, et Nadia Dakka. 2016. «Determination of Phenol Content and Antibacterial Activity of Five Medicinal Plants Ethanolic Extracts from North-West of Morocco.» *Plant Pathology & Microbiology* 4.
- BOUYAHYA OUI AHMED. 2017. *Thèse de Doctorat: Contribution à la valorisation des substances naturelles :Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de l'Atlas algérien. MOSTAGANEM: UNIVERSITÉ ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM*
- Brahim Abed .2007. *دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القويدات الخام لنبات الضمران Traganum nudatum*. ورقة: جامعة قاصدي مرياح ورقلة.
- Brahmi, Fatiha, Didier Hauchard, Naima Guendouze, Khodir Madani, Martin Kiendrebeogo, Léocadie Kamagaju, Caroline Stévigny, et Mohamed Chibane. 2015. «Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinaseinhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae).» *Industrial Crops and Products* 722-730.
- Caldes, G., Prescott, B., & King, J. R. (1975). A potential antileukemic substance present in *Globularia alypum*. *Planta medica*, 27(01), 72-76
- Chappuis, E. 2014. «*Globularia alypum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014.» Accès le may 12, 2017.
- Chogran, Hnia, Leila Riahi, Yosr Zaouali, et Mohamed Boussaid. 2012. «Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae).» *Afr. J. Ecol* 343–347.
- Dehghani, F., Khozani, T.T., Panjehshahin, M.R., Karbalaedoost, S. (2005). Effect of *Teucrium polium* on histology and histochemistry in rat stomach. *Indian J Gastroenterol*. 24:126-127.
- Djabou N. 2012. *Caractérisation et variabilité des plantes à parfum aromatiques et médicinales de Corse et de l'Ouest algérien*. Chimie organique. Université Pascal Paoli; Université de Tlemcen.

- Djeridane, A., M. Yousfi, B. Nadjemi, N. Vidal, JF. Lesgards, et P. Stocker. 2006. «Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity.» *Eur Food Res Technol* 801–809.
- Elbetieha, A., Oran, S. A., Alkofahi, A., Darmani, H., & Raies, A. M. (2000). Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1), 215-219.
- El-taouil Ahmed .2009. دراسة نواتج التابوليزم الثانوي لبعض نباتات منطقة الهقار قسنطينة: جامعة منتوري - قسنطينة.
- El Yahyaoui, Ouafae, Nabil AIT Ouaziz, Ilias Guinda, Amal Sammama, Saloua Kerrouri, Bahia Bouabid, Mohamed El Bakkall, Ali Quayou, Aicha Lrhorfi, et Rachid Bengueddour. 2017. «Phytochemical screening and thin layer chromatography of two medicinal plants: *Adansonia digitata* (Bombacaceae) and *Acacia raddiana* (Fabaceae).» *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6: 10-15.
- Esmaili, M.A., Yazdanparast, R. (2004). Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *J Ethnopharmacol*. 95:27-30.
- Esmaili, Mohammad Ali, Fereshteh Zohari, et Heibatollah Sadeghi. 2009. «Antioxidant and Protective Effects of Major Flavonoids from *Teucrium polium* on β -Cell Destruction in a Model of Streptozotocin-Induced Diabetes.» *Planta Med* 1418–1420.
- ES-SAFI, Nour-Eddine, Samira KHLIFI, Albert KOLLMANN, Lucien KERHOAS, Ahmed EL ABOUYI, et Paul-Henri DUCROT. 2006. «Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae).» *Chem. Pharm. Bull* 85-88.
- Fehri, B., Tebbett, I. R., Freiburger, B., & Karlix, J. (1996). The immunosuppressive effects of *Globularia alypum* extracts. *Phytotherapy Research*, 10(6), 539-540.
- Hassler M. (2017). World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version May 2017). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2017). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 30th June 2017. Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- Innocenti, Marzia, Marco Michelozzi, Catia Giaccherini, Francesca Ieri, Franco Francesco Vincieri, et Nadia Mulinacci. 2007. «Flavonoids and Biflavonoids in Tuscan Berries of *Juniperus communis* L.: Detection and Quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS.» *J. Agric. Food Chem* 6596-6602.
- IUCN. 2005. *A Guide to Medicinal Plants*. Malaga, Spain: IUCN Centre for Mediterranean Cooperation.
- Jacqueline, M. Wade. 1984. «The Isolation and Identification of Flavonoids in ZYGOCACTUS.» *Retrospective Theses and*.
- Kaileh, M., Berghe, W.V., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *J. Ethnopharmacol*. 113:510-516.
- Keskes, Henda, Kais Mnafigui, Khaled Hamden, Mohamed Damak, Abdelfattah El Feki, et Noureddine Allouche. 2014. «In vitro anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea* L. leaves from Tunisia.» *Asian Pac J Trop Biomed* S649-S655.
- KERBOUCHE LAMIA. 2010. Mémoire de Magister: Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de quelques plantes des familles de Labiacées et de Cupressacées .EL-

HARRACH - ALGER: ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE- EL-HARRACH - ALGER.

- Khelifi, Daycem, Moktar Hamdi, Akrem El Hayouni, Sylvie Cazaux, Jean Pierre Souchard, François Couderc, et Jalloul Bouajila. 2011. «Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves.» *Molecules* (Molecules).
- Khoddami, A, M.A. Wilkes, et T.H. Roberts. 2013. «Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds.» *Molecules* 2328-2375.
- Khoddami, Ali, Meredith A. Wilkes, et Thomas H. Roberts. 2013. «Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds.» *Molecules* 2328-2375.
- Krache, Imane. 2009. *Memoire de Magister: Evaluation des effets toxiques des extraits methanoliques de tamus communis l. et teucrium polium l. sur des rats blancs albino wistar*. UNIVERSITE DE FARHAT ABBAS SETIF.
- LHULLIER Amélie. 2007. Thèse de Doctorat: *Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : agauria salicifolia hook.f ex oliver, agauria polyphylla baker (ericaceae), tambourissa trichophylla baker (monimiaceae) et embelia concinna baker (myrsinaceae)*. Toulouse: Faculté de Pharmacie.
- Makni, Mohamed, Anissa Haddar, Walid Kriaa, et Najiba Zeghal. 2013. «Antioxidant, Free Radical Scavenging, and Antimicrobial Activities of *Ajuga iva* Leaf Extracts.» *International Journal of Food Properties* 756–765.
- Maleš, Željani, et Marica Medić-Šarić. 2001. «Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit.» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24: 353-359.
- Maleš, Željani, Marica Medić-Šarić, et Franz Bucarc. 1998. «Flavonoids of *Guiera senegalensis* J. F. GMEL. -Thin-layer Chromatography and Numerical Methods.» *Croatica chemica acta* 71: 69-79.
- Mamyrbékova-Békro, Janat Akhanovna, Koffi Marcel Konan, Békro Yves-Alain, Djié Bi Marc Gabin., Zomi Bi Tra Jérôme, Mambo Véronique, et Boua Boua Benson. 2008. «Phytochemicals of the Extracts of Four Medicinal Plants of Côte D'ivoire and Assessment of their Potential Antioxidant by Thin Layer Chromatography.» *European Journal of Scientific Research* 24: 219-228.
- Marín, Laura, Elisa M. Miguélez, Claudio J. Villar, et Felipe Lombó. 2015. «Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties.» *BioMed Research International* 18.
- Miceli, N., A. Trovato, A. Marino, V. Bellinghieri, A. Melchini, P. Dugo, F. Cacciola, et al. 2011. «Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey.» *Food and Chemical Toxicology* 2600–2608.
- MNHN : Muséum national d'Histoire naturelle [Ed]. 2003-2017. Inventaire National du Patrimoine Naturel, Site web : <https://inpn.mnhn.fr>. Le 26 octobre 2017
- Mohammed Jamleddine. 2010. Mémoire de Master: EXTRACTION ET CARACTERISATION DE LA COMPOSITION DES HUILES ESSENTIELLES DE *Juniperus phoenicea* & *Juniperus oxycedrus* Du Moyen Atlas. LAGHOUAT: UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH – LAGHOUAT.

- Naczki, M., et F. Shahidi. 2004. «Extraction and analysis of phenolics in food.» *Journal of chromatography* 95-111.
- Oran, S. A., & Raies, A. (1999). Micropropagation of two endangered species of *Globularia* L. In 6. *International Conference on the Development of Dry Lands*, Cairo (Egypt), 22-27 Aug 1999. ICARDA.
- Pustahija, Fatima, Mirel Subašić, et Nedžad Bašić. 2014. «Phenolic content in the needles of *Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L. f.) D. Don, *Cupressocyparis × leylandii* (A.B. Jacks. & Dallim.) Dallim. “Castlewellan Gold“ and *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) J. Buchholz.» *Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo* 41-51.
- Quezel P. , Santa S. 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Vol. 2. Paris: éditions du centre national de la recherche scientifique.
- Rached Wahiba. 2009. Mémoire de Magister: Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. ORAN: UNIVERSITÉ D'ORAN ES-SÉNIA – ORAN.
- Rahmouni, Naima. 2013. *Memoire de Magister: Investigation phytochimique de l'extrait n-butanol du Globularia alypum L (Globulariaceae)*. UNIVERSITE CONSTANTINE I.
- Robbins, Rebecca J. 2003. «Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology.» *J. Agric. Food Chem.* 2866-2887.
- Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2017). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2017 Annual Checklist*. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2017. Species2000:Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.
- Sajewicz, Mieczyslaw, Dorota Staszek, Monika Waksmundzka-Hajnos, et Teresa Kowalska. 2012. «COMPARISON OF TLC AND HPLC FINGERPRINTS OF PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS FRACTIONS DERIVED FROM SELECTED SAGE (SALVIA) SPECIES.» *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1388-1403.
- Shahraki, M.R., Arab, M.R., Mirimokaddam, E., Palan, M.J. (2007). The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats. *Iranian Biomedical Journal*. 11(1): 65-68.
- SIBOUKEUR HADJI-Warda. 2013. Mémoire de Magister: Valorisation des huiles essentielles : Cas de l'utilisation de l'huile de cade dans les eaux. OUARGLA: UNIVERSITÉ KASDI MERBAH-OUARGLA.
- Stankovic, Milan S., Neda Niciforovic, Vladimir Mihailovic, Marina Topuzovic, et Slavica Solujic. 2012. «Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*.» *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 117-122.
- Suleiman, M. S., Abdul-Ghani, A.S., Al-khalil, S., AMIN, R. (1988). Effect of *Teucrium polium* boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure. *Journal of Ethnopharmacology*, 22: 111-116.
- Tibor, Cserhádi. 2006. *Liquid Chromatography of Natural Pigments and Synthetic Dyes*. Édité par Elsevier. Vol. 71. *Journal of Chromatography Library*.
- Vermerris, Wilfred, et Ralph Nicholson. 2006. *Phenolic compound biochemistry*. Netherlands: Springer.
- Waksmundzka-Hajnos, Monika, Joseph Sherma, et Teresa Kowalska. 2008. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. London: CRC Press.

- Williams, C. A., et R. J. Grayer. 2004. «Anthocyanins and other flavonoids.» *Nat. Prod. Rep.* 539-573.
- Yoko , Oshima-Franco, Luana de Jesus Reis Rosa, Gleidy Ana Araujo Silva, Jorge Amaral Filho, Magali Glauzer Silva, Patricia Santos Lopes, José Carlos Cogo, Adélia Cristina Oliveira Cintra, et Maria Alice da Cruz-Höfling. 2012. «Antibothropic Action of Camellia sinensis Extract Against the Neuromuscular Blockade by Bothrops jararacussu Snake Venom and Its Main Toxin Bothropstoxin-I.» *Pharmacology*.
- Zennaki, S, D Krouf, D Taleb-Senouci, et M Bouchenak. 2009. «Globularia alypum L. Lyophilized Methanolic extract decreases Hyperglycemia and improves antioxidant status in various tissues of Streptozotocin-Induced diabetic rats.» *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 6 (1): 34.

Chapitre II

Inhibition de la réaction enzymatique de la lipase de *Candida rugosa*

Rappels Bibliographiques

1. L'obésité

L'obésité est l'une des maladies les plus graves ces dernières années (Jung, et al. 2012). Le nombre de personnes en surpoids est estimé à 1,9 milliard d'adultes, selon les statistiques réalisées en 2014, dont plus de 600 millions sont obèses (WHO 2016). Elle est associée à de nombreuses maladies chroniques, ainsi qu'à des problèmes psychologiques et sociaux, d'où sa gravité (Jung, et al. 2012).

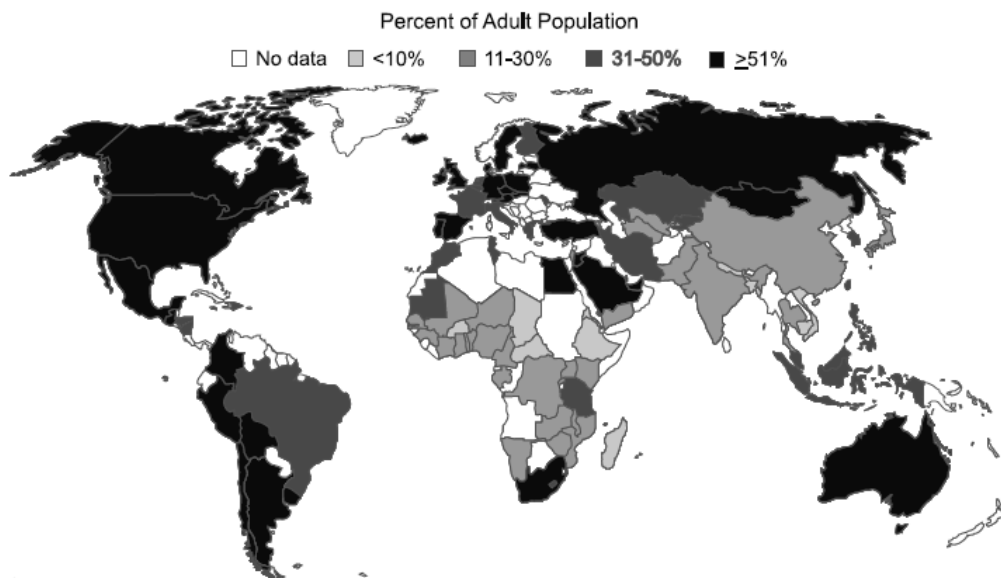


Figure 24. La répartition de l'obésité dans le monde (Pearce et Witten 2010)

L'incidence de l'obésité est estimée à 80% des patients diabétiques de type 2, 70% des maladies cardiovasculaires, 42% du cancer du sein et du colon (Debasis et Harry 2007).

En médecine, l'obésité est définie comme une accumulation anormale de la graisse dans le tissu adipeux. Il existe de nombreux facteurs qui conduisent à l'obésité, tels que la prédisposition génétique et les facteurs environnementaux et psychologiques (Boris et Robert 1997). Cependant, leur cause principale est le déséquilibre entre l'apport énergétique sous forme de nourriture et de capacité corporelle pour brûler de graisses, car le corps conserve l'excès d'énergie sous forme de graisse (IOM 2012). L'obésité est diagnostiquée par l'IMC.

2. Indice de Masse Corporelle (IMC) :

Il est également connu sous le nom de l'indice Quetelet, par rapport à son créateur belge Adolphe Quetelet, datant du milieu du 19ème siècle (Kathleen 2008). Une norme reconnue

internationalement comme le meilleur outil pour diagnostiquer les différents cas d'obésité et déterminer le poids idéal et exprime est le rapport du poids (en kg) sur la taille (en mètre) élevée au carré, selon l'équation suivante :

$$IMC = \frac{Poids(Kg)}{Taille(m^2)}$$

L'Organisation de la santé a évalué les différents cas d'IMC selon la gravité de chaque cas (tableau 17).

Tableau 17. les différents cas d'IMC selon la gravité de chaque cas ((. WHO 2000)

Classification		IMC en Kg/m ²		
Insuffisance pondérale		<18.5		
Normale poids		18.5 à 24.9		
Excès de poids		≥ 25.00		
avant l'obésité		25.00	à	29.99
Obésité	I (modérée)	30.00	à	34.99
Obésité	II (sévère)	35.00	à	39.99
Obésité III (majeure)		≥ 40.00		

Les médicaments pour traiter l'obésité et les hypothèses proposées pour ça fonctionnent selon 03 méthodes : tout d'abord, en réduisant la consommation d'aliments par la manipulation (réduction) de l'appétit de l'individu envers ces aliments, dans ce cas, les médicaments fonctionnent au niveau du système nerveux en inhibant les récepteurs Catécholamines Alpha 1 et Beta 2, le médicament le plus important utilisé dans ce cas est la sibutramine. Deuxièmement, en inversant l'équilibre des calories stockées et consommées dans le corps en arrêtant et en réduisant la digestion et l'absorption de la graisse au niveau de l'intestin en utilisant des inhibiteurs de la lipase tels que l'orlistat. Troisièmement, grâce à l'augmentation de l'exercice de combustion des graisses (Karl, Ulrich et Olivier 2005).

3. Orlistat

Un composé dérivé de l'extrait de lipstatine du champignon *Streptomyces toxytricini*, sa formule chimique C₂₉H₅₃NO₅ (figure 25).

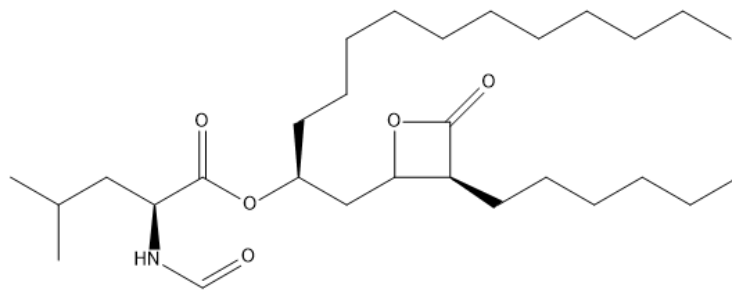


Figure 25. La structure chimique de l'orlistat

C'est le seul inhibiteur de l'enzyme lipase utilisé dans le traitement de l'obésité. Il réduit la dégradation et l'absorption des triglycérides dans l'intestin de 30%. La prise de ce médicament avec un régime alimentaire et une activité physique réduit le poids de 10%. Il a comme effets indésirables et secondaires : apparition des verrues, ballonnements, incontinence fécale, lésions hépatiques, insuffisance hépatique subaiguë (Karl, Ulrich et Olivier 2005) (Sellami, et al. 2016). Les chercheurs cherchent à trouver et à développer un traitement pour prévenir l'obésité et à la traiter sans effets secondaires et sans danger pour une utilisation prolongée, car la recherche se concentre récemment sur la recherche dans les extraits végétaux de produits chimiques naturels pour lutter contre l'obésité. Cette recherche a été renforcée par des rapports publiés récemment qui ont démontré avec succès l'efficacité des extraits végétaux dans la réduction du gain de poids (Jung, et al. 2012).

4. Lipases

Enzymes qui dégradent les triglycérides (EC 3.1.1.3) qui stimulent la dégradation des triglycérides en acides gras et en glycérol. Ils sont largement répandus dans les plantes, les animaux et les microorganismes (Cygler et D. Schrag 1997). Elles dissocient la liaison ester du bi, tri ou monoglycéride (Cygler et D. Schrag 1997) (Derewenda 1994) (Leticia, et al. 2012).

Le corps humain contient quatre types de lipases : lipase gastro-intestinale, lipase pancréatique, lipase ester-carboxylique et phospholipase A2. La décomposition de la graisse dans l'estomac commence par la stimulation de la lipase gastro-intestinale, qui est active dans le milieu acide, en désintégrant 10 à 20% de la graisse, puis la dissolution du reste au niveau du duodénum est complétée à l'aide de lipases pancréatiques (figure 26). Les autres types de lipases jouent un rôle faible dans la décomposition des triglycérides et remplacent la lipase pancréatique en cas de disparition ou d'inhibition (Karl, Ulrich et Olivier 2005).

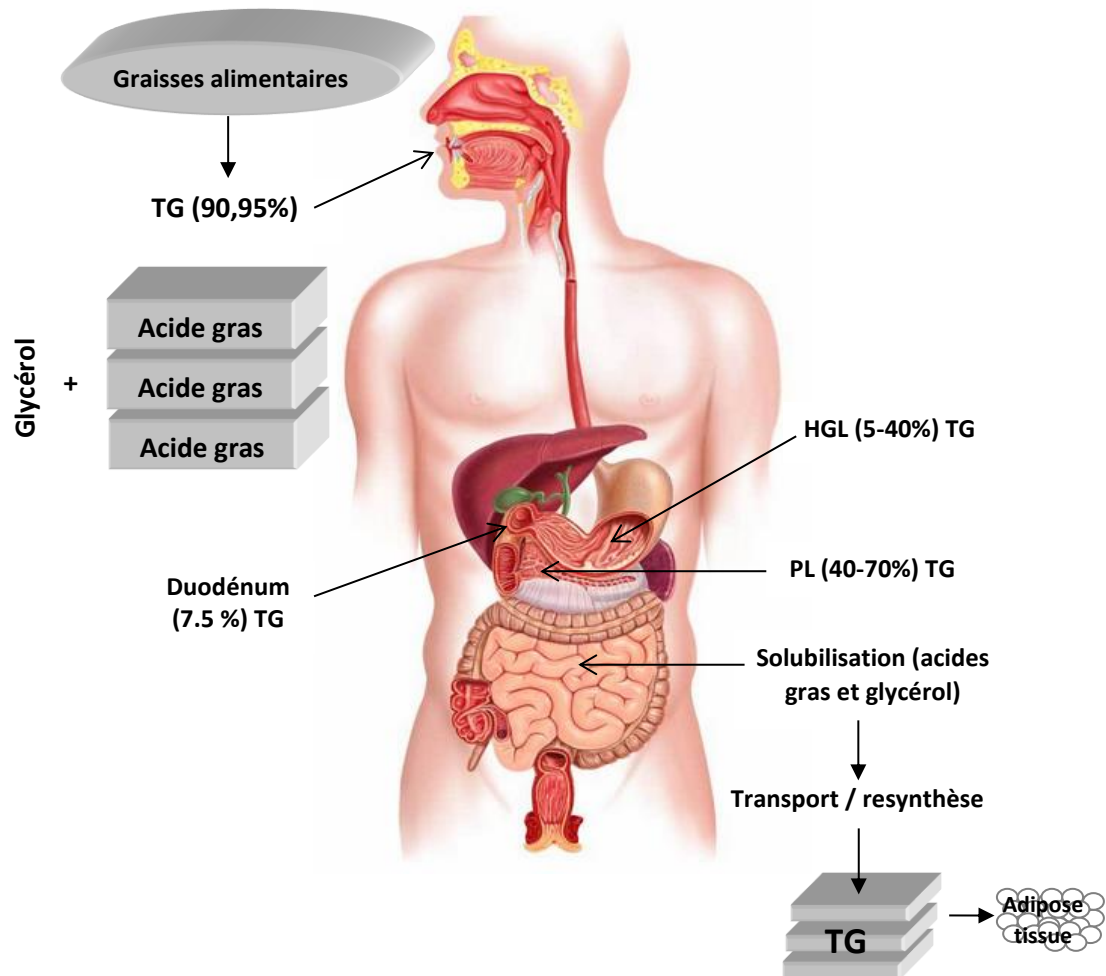


Figure 26. La dégradation des triglycéride dans le tube gastrique (de la Garza, et al. 2011)

TG : triglycérides, HGL : lipase gastrique humaine, PL : lipase pancréatique

La lipase pancréatique se compose de 449 acides aminés, qui partagent avec le reste de l'espèce lipase dans une structure uniforme (figure 27), qui se caractérise par un trou de l'oxyanion (oxyanion hole) et un site catalytique.

- le trou de l'oxyanion : la première partie de ce site est proche de l'extrémité amine entre l'hélice α et la structure β , et sa séquence varie selon l'organisme dont nous l'avons trouvé GGGX dans les lipases de *Candida rugosa*, la deuxième partie est présentée après le B5 et elle est appelée X2, qui partage avec le site catalytique par succession GX1SX2G (Leticia, et al. 2012).
- la triade catalytique : est constitué d'acide aminé "sérine" après la structure B5, et l'aspartate / glutamate après B7 et l'histidine près de l'extrémité carboxylique, représentée par des cercles sur la figure.

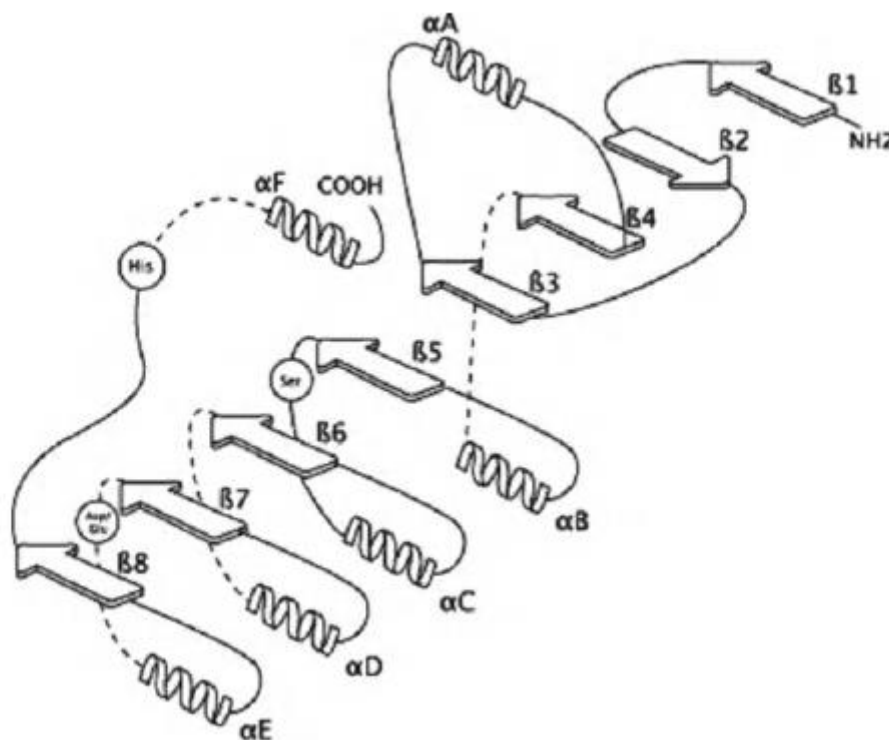


Figure 27. La structure de la lipase (Leticia, et al. 2012)

L'hydrolyse d'un ester carboxylique par la triade catalytique peut se décomposer en six grandes étapes (Figure 28). Tout d'abord, le carbone de la fonction carboxylique du substrat subit une attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine dont le caractère nucléophile est augmenté par le résidu histidine suite à la formation d'une liaison hydrogène. L'anneau imidazole de l'histidine devient alors protoné et chargé positivement. Cette charge positive est stabilisée par une charge d'un résidu acide (Asp ou Glu) (1). Il en résulte la formation d'un premier intermédiaire tétraédrique, stabilisé par deux liaisons hydrogènes avec des résidus du trou de l'oxyanion (2). Par la suite, il y a libération d'une molécule d'alcool, formation de l'acyl-enzyme (3) et attaque nucléophile de l'acyl-enzyme par une molécule d'eau (4). Cette seconde attaque nucléophile aboutit à la formation d'un second intermédiaire tétraédrique, stabilisé par le trou de l'oxyanion (5). Finalement, il y a libération de l'acide gras et retour de l'enzyme dans sa conformation initiale (6) (Jaeger et al., 1994 ; Wrinkler et al., 1994 ; Beer et al., 1996, in : Benarous 2014).

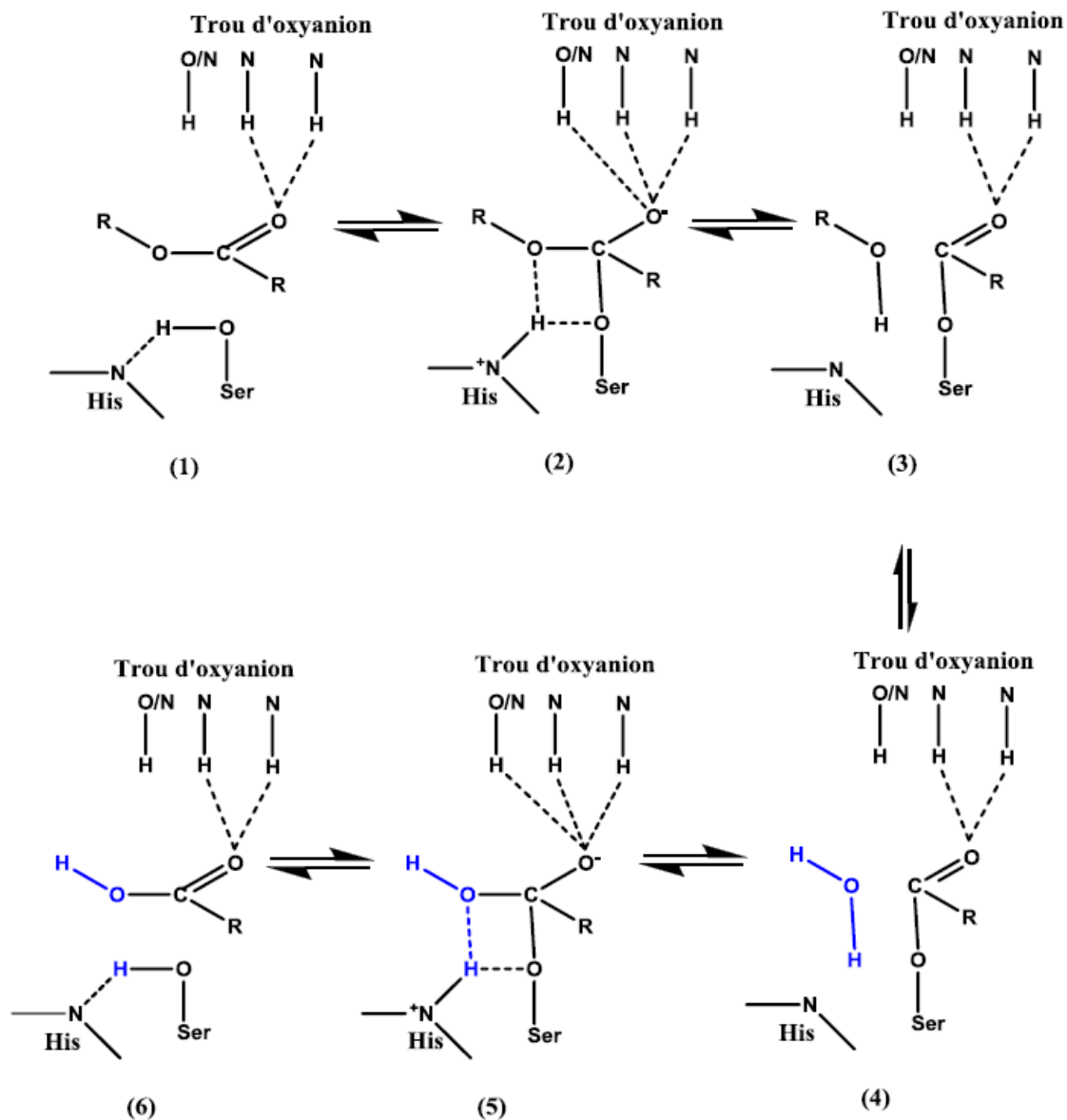


Figure 28. Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester (Beer et al., 1996, in : Benarous 2014). (1) complexe de Michaelis non-covalent; (2) intermédiaire tétraédrique 1; (3) acylenzyme et libération de l'alcool; (4) attaque nucléophile de la molécule d'eau; (5) intermédiaire tétraédrique 2; (6) libération de l'acide gras.

La lipase pancréatique est excrétée du pancréas sous une forme inactive qui doit être activée par la présence de colipase et de sels biliaries. La liaison de la lipase pancréatique à la co-lipase modifie la structure tridimensionnelle de la lipase en facilitant son association avec le substrat de réaction (Karl, Ulrich et Olivier 2005). Alors que la lipase CRL ne nécessite pas d'assistance.

Le trou de l'oxyanion des lipases de *Candida rugosa* est représenté par les acides aminés : Gly 123, Gly124 et Ala 210.

Les inhibiteurs de la lipase sont utilisés pour élaborer des médicaments pour traiter l'obésité et les problèmes d'acné. En général, les inhibiteurs d'enzymes sont classés comme réversible ou irréversible dans leur actions (Leticia, et al. 2012). La plupart des inhibiteurs approuvés sont réversibles car elles présentent moins d'effets secondaires que les inhibiteurs irréversibles. Les inhibiteurs réversibles sont classés comme compétitifs, non concurrentiels, non compétitifs par rapport à leur liaison à l'enzyme et à leur effet sur l'affinité de l'enzyme pour la substance de réaction et l'interaction (Cygler et D. Schrag 1997).

5. Huiles essentielles

5.1. Usages médicaux

De nombreux composés naturels dérivés de plantes ont montré leur activité biologique (Neffati, et al. 2009). Les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques ont une attention particulière (Neffati, et al. 2009), car elles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle comme agents antimicrobiens depuis l'antiquité (Pinto, et al. 2009).

L'huile de Menthe extrait des feuilles de menthe est considérée comme la plus productif et la plus consommée, généralement utilisée localement comme désinfectant et antiseptique. Elle sert à traiter les démangeaisons, les douleurs nerveuses et musculaires, les maux de tête et les migraines et elle est utilisée comme agent antimicrobien (İşcan, et al. 2002).

En raison de l'arôme de l'huile de cannelle forte et fine, il a été utilisé à des causes médicales et nutritionnelles, car il s'agit d'une substance efficace dans la prévention des maladies (Wang, Wang et Yang 2009).

L'eugénol est le composé principal dans l'huile essentiel du giroflie, où il est utilisé comme antiseptique, antibactérien et antalgique en médecine traditionnelle. De nombreuses études ont montrées l'efficacité antivirale comme : l'herpès virus HSV et le virus de l'hépatite C (Dwivedi, et al. 1989), utilisé dans les pays asiatiques pour traiter les douleurs dentaires, des maux de tête et des troubles respiratoires, et constaté qu'il a des propriétés antimicrobiennes et antioxydant efficace, anti-cancer, anti-inflammatoire et insecticide, elle est utilisée aussi comme antiseptique et anesthésique, il est largement utilisé en médecine dentaire (Pinto, et al. 2009).

Matériel et Méthodes

Nous avons étudié dans cette partie l'effet inhibiteurs des extraits obtenus du chapitre précédent, en plus, nous avons choisi quelques molécules synthétisées et 3 huiles essentielles.

1.1. Extraits des plantes

Les extraits obtenus à partir de l'hexane et l'acétate d'éthyle ont une concentration 10 mg/ml. La solution standard a été utilisée pour réaliser une chromatographie sur couche mince (CCM). Des dilutions de l'acétate d'éthyle d'une concentration entre 0,5 et 2 mg/ml ont été préparées pour être utilisées dans l'expérience d'inhibition de la lipase.

1.2. Huiles essentielles

Trois huiles essentielles obtenues à partir d'un magasin local ont été utilisées : l'huile de menthe, l'huile de cannelle et l'huile de giroflier. Ce choix est dû à leur utilisation commune et l'existence des rapports précédents sur leur effet contre l'obésité traditionnellement ou expérimentalement. Les extraits de ces trois plantes ont été essayés *in vitro* et *in vivo* sur la lipase pancréatique (l'être humain et les souris) mais l'effet de leurs huiles essentielles n'a jamais été étudié.

1.3. Médicaments

Deux types de médicaments utilisés dans le traitement des maladies liées à l'obésité ont été utilisés : l'acide folique consommé par les femmes enceintes pour éviter les cas d'anomalies congénitales dans le système nerveux des embryons (NTD). Febuxostat et colchicine utilisés dans le traitement de la goutte. Leurs structures chimiques sont représentées dans la figure 29.

Ces deux cas sont liés à l'obésité, les femmes ayant un BMI ≥ 30 sont deux fois plus susceptibles d'obtenir des distorsions NTD pendant la grossesse que les femmes ayant un poids normal.

La goutte est souvent associée à l'obésité, le risque de la maladie augmente avec l'augmentation de l'indice de masse. L'effet de ces médicaments sur l'obésité et l'inhibition de la lipase n'a jamais été étudié directement.

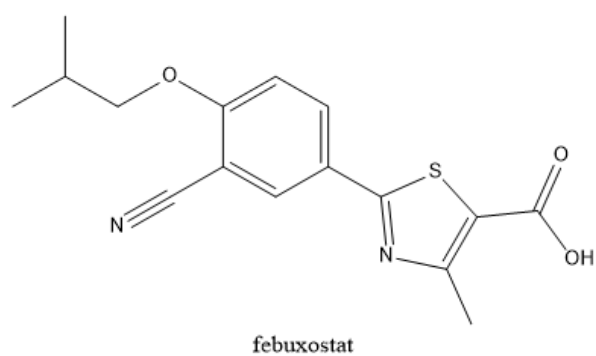
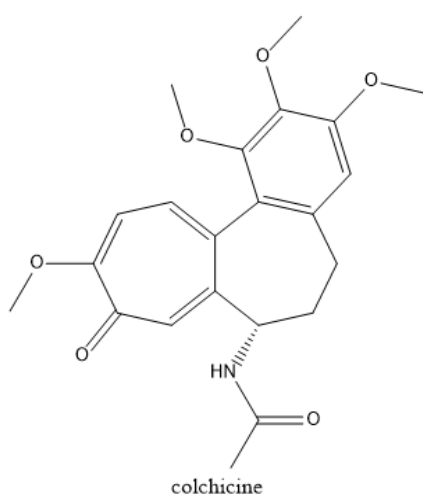
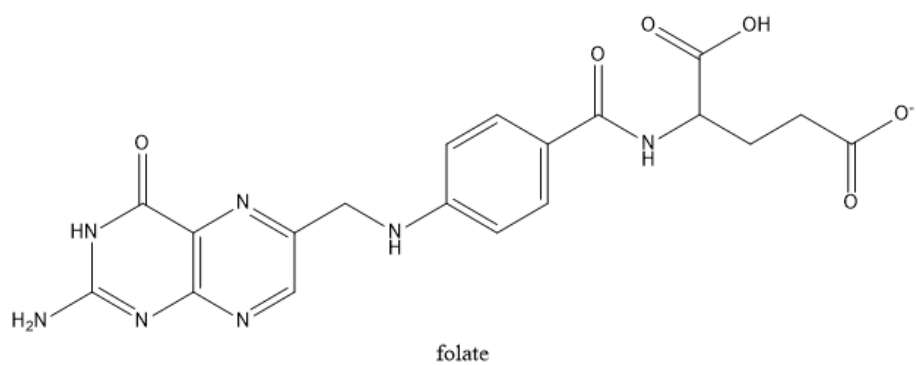
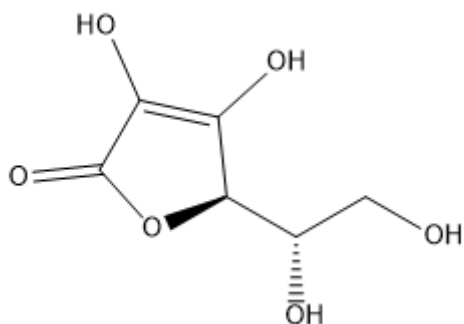


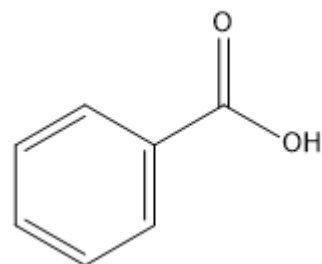
Figure 29. Les structures chimiques des médicaments

1.4. Acides organiques

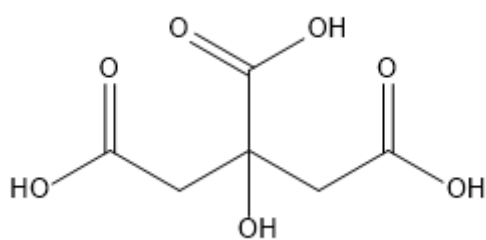
Pour étudier l'effet de la toxicité de certains acides sur la lipase LCR. L'effet de certains acides dont leurs structures sont représentées dans la figure 30 sur l'activité de la lipase a été étudié.



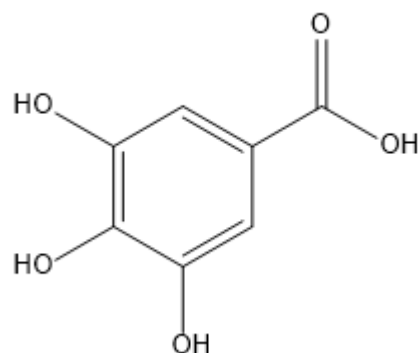
Acide ascorbique



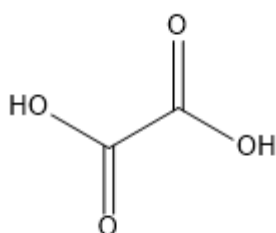
Acide benzoïque



Acide citrique



Acide gallique



Acide oxalique

Figure 30. Les structures chimiques des acides étudiés

2. Le principe de l'activité enzymatique de la lipase

Le p-NPL (p-nitrophényllaurate) est un substrat de la lipase. La lipase hydrolyse de la liaison ester formée entre le groupe alcool (OH) du p-NP (p-nitrophénol) et le groupe carboxyle (COOH) de l'acide laurique en libérant ces deux molécules suivant le schéma réactionnel présenté dans la figure 31.

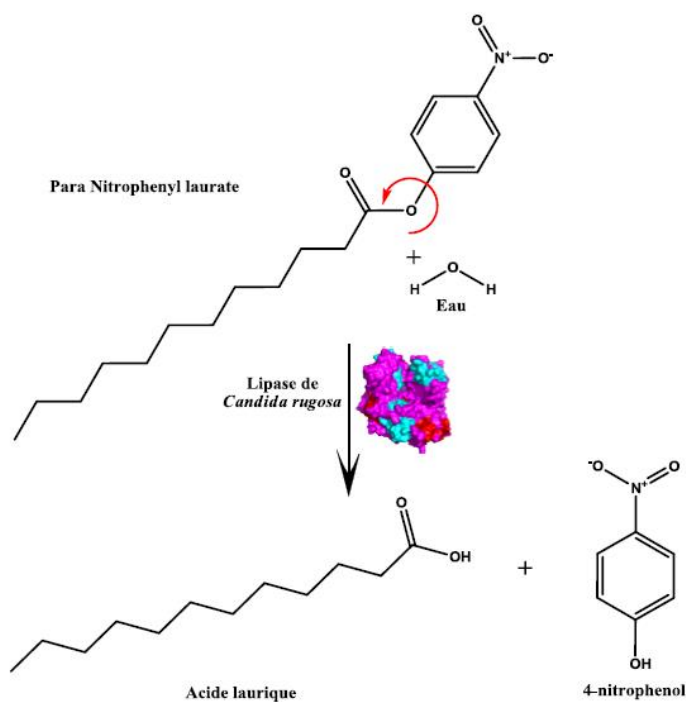


Figure 31. Hydrolyse de p-NPL par lipase *Candida rugosa* (Benarous 2014)

Le produit (p-NP) a une couleur jaune, qui nous aide à suivre la réaction à l'aide de la spectrophotométrie UV-Visible.

3. Étapes expérimentales

3.1. Courbe d'étalonnage de p-NP

Des dilutions différentes de la solution de p-NP ont été préparées à partir d'une solution mère d'une concentration 1 mM. On a ajouté 20 µl de LCR dissous dans tampon avec un pH = 7 à 20 µl d'éthanol et 180 µL de p-NP de différentes concentrations. L'absorption a ensuite été lue à une longueur d'onde de 405 dans un lecteur de microplaques de type BiotekELX 800 UV à 96 puits. Les résultats permettent de tracer la courbe d'étalonnage.

3.2. L'activité d'inhibition enzymatique de la lipase *Candida rugosa*

La méthode de Benarous, 2014 a été adoptée avec quelques modifications dans la détection de l'activité inhibitrice de la lipase par des extraits de plantes, des molécules pures et des huiles essentielles. L'activité d'inhibition a été exprimée dans la valeur d'IC₅₀ pour chaque échantillon, IC₅₀ représente la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique. Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible, plus la capacité inhibitrice de l'inhibiteur est forte et plus efficace.

Le milieu réactif contient 20 µl d'échantillons (inhibiteurs) à différentes concentrations pour étudier leur effet inhibiteur et 20 µL de LCR avec une concentration de 0,5 mg/ml, on incube le milieu dans l'étuve à 37 °C pendant 15 minutes. Ensuite, nous ajoutons 180 µL de substrat p-NPL avec une concentration de 0,1 mM, puis, nous l'incubons dans l'étuve à 37 °C pendant 15 minutes. Après, la lecture est effectuée dans le lecteur de microplaques de type BiotekELX 800 UV à une longueur d'onde de 405 nm.

Les valeurs IC₅₀ ont été calculées à partir des graphes I % = f (C). I% est le pourcentage de l'inhibition a été calculé à partir de l'équation :

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

Où

I% : le pourcentage de l'inhibition.

A_{extrait} : Absorbance nette en présence de l'extrait ou de la molécule inhibitrice.

A_{control} : Absorbance du témoin en absence de l'extrait ou de la molécule inhibitrice.

Résultats et discussion

1- La courbe d'étalonnage de p-NP

La courbe d'étalonnage de pNP qui est montré dans la figure 32, représente la variation d'absorbance en fonction des concentrations de p-NP, réalisée à l'aide du logiciel Excel 2016.

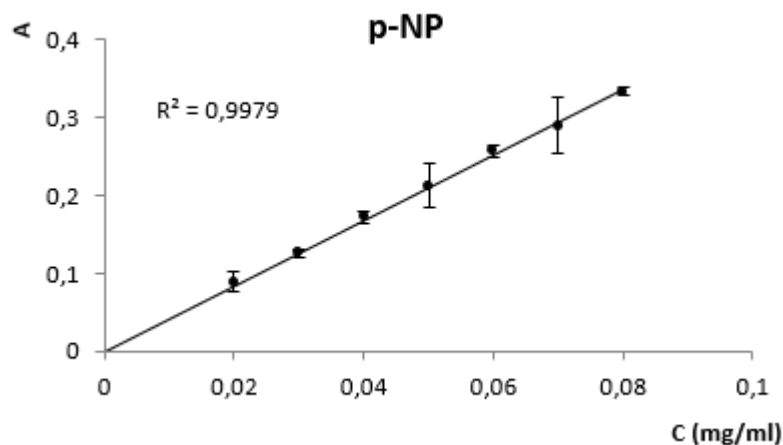


Figure 32. La courbe d'étalonnage de p-NP

2- L'activité d'inhibition enzymatique de la lipase *Candida rugosa*

Nous avons tracé des courbes (figures 33 et 34) qui représentent les variations des proportions d'inhibition de l'enzyme I% en fonction de concentrations des extraits des plantes, des huiles essentielles, des médicaments, et des acides organiques. Par la suite, nous avons identifié l'IC₅₀ pour chaque échantillon, indiqué dans le tableau 19.

Tableau 18. Valeurs IC₅₀ pour divers extraits et molécules étudiées sur la lipase LCR

	Les extraits/ Les molécules	IC₅₀ (mg/ml)
Les extraits	<i>Globularia alypum</i>	2,29 ± 0,29
	<i>Teucrium polium</i>	2,44 ± 0,20
	<i>Ajuga iva</i>	-
	<i>Juniperus oxycedrus</i>	2,50 ± 0,01
	<i>Juniperus phoenicea</i>	1,33 ± 0,10
Les huiles essentielles	Huile essentielle de menthe	1,09 ± 0,25
	Huile essentielle de cannelle	1,78 ± 0,57
	Huile essentielle de giroflier	1,13 ± 0,19
	La molécule isolée	0,71 ± 0,07
Les med	Acide folique	0,64 ± 0,00
	Febuxostat	0,66 ± 0,00
Les acides organiques	Acid citrique	4,59 ± 0,33
	Acide ascorbique	3,51 ± 0,17
	Acide benzoïque	3,11 ± 0,05
	Acide oxalique	3,63 ± 1,47
	Acide gallique	1,06 ± 0,04
	Acide caféique	-
	Orlistat	0,06 ± 0,004

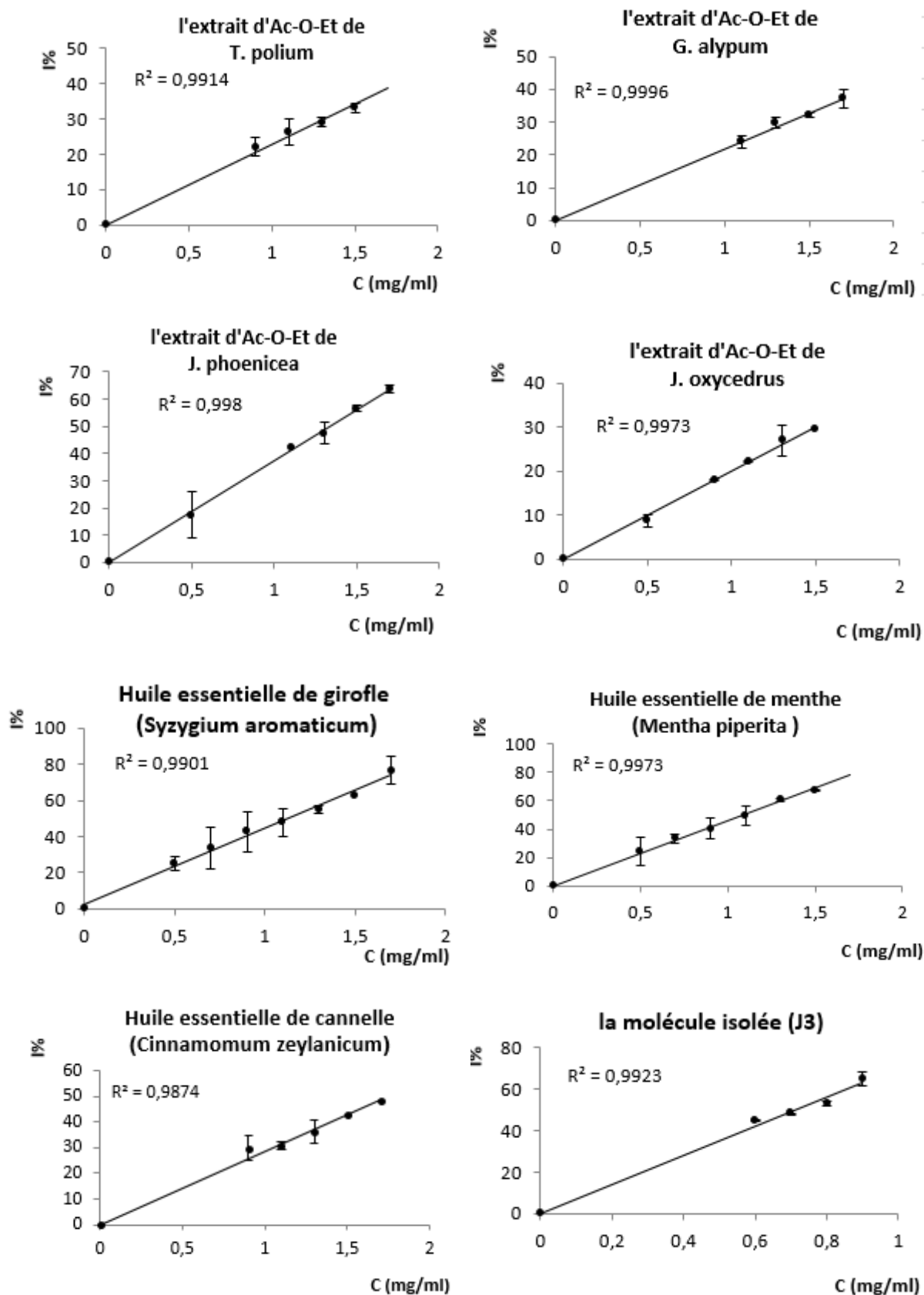


Figure 33. Représentations graphiques de l'inhibition des extraits de la lipase de *Candida rugosa*

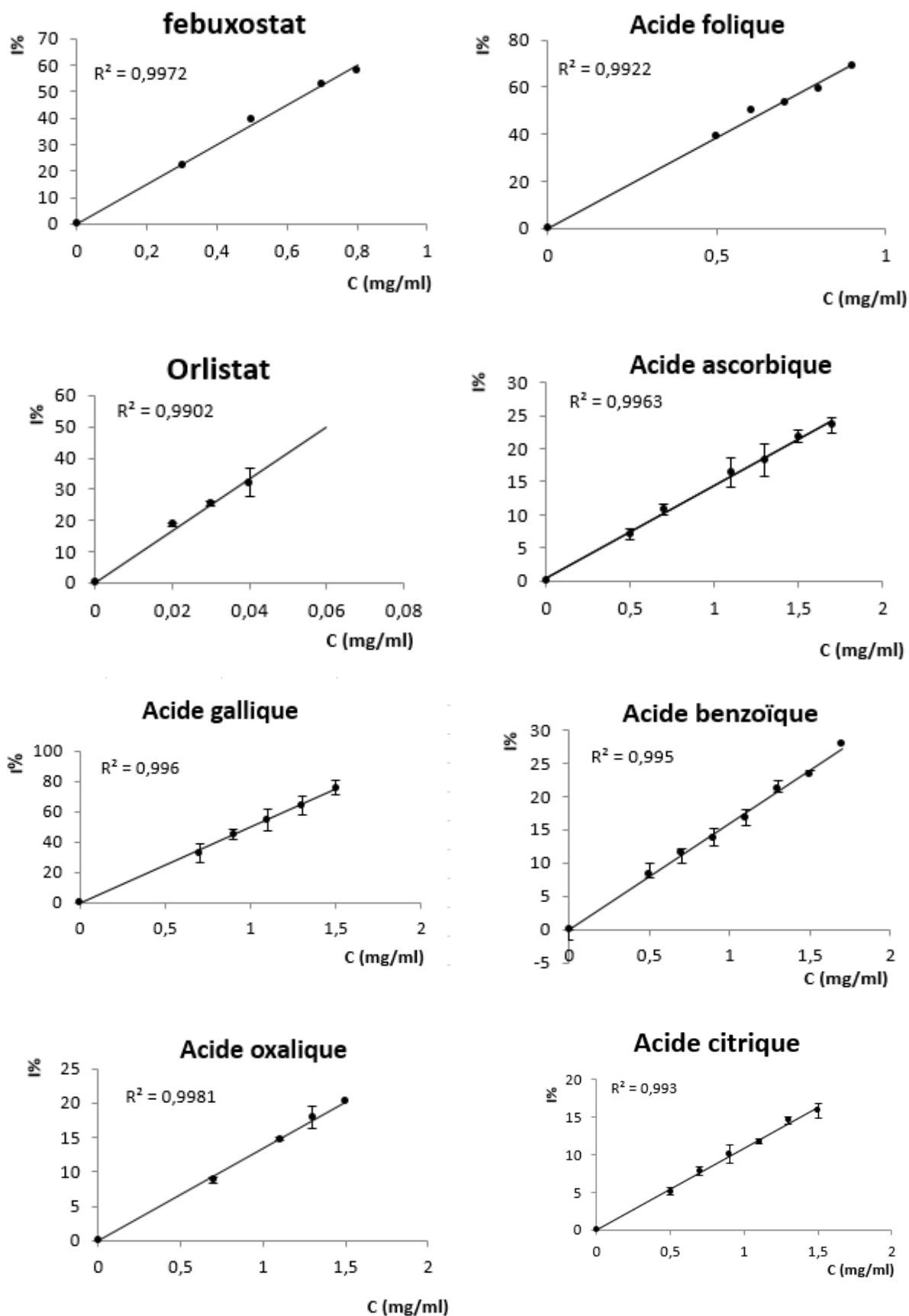


Figure 34. Représentations graphiques de l'inhibition des molécules de la lipase de *Candida rugosa*

Les médicaments contre l'obésité utilisés actuellement réagissent de trois manières différentes, peuvent stimuler le métabolisme des lipides, réduire la consommation d'aliments par la manipulation (réduction) de l'appétit de l'individu envers ces aliments, ou limiter l'absorption des lipides au niveau des intestins (Hasani-Ranjbar et al. 2009). Dans notre étude, nous nous concentrons sur la réduction de l'absorption des lipides au niveau des intestins en évaluant l'activité inhibitrice des extraits végétaux, des huiles essentielles et de certaines molécules chimiques sur l'enzyme lipase.

Nous notons à partir des résultats que la plupart des échantillons étudiés ont une activité inhibitrice sur la lipase LCR, à l'exception de l'extrait de AI, nous n'avons détecté aucune activité inhibitrice, de même pour l'acide caféique.

L'orlistat a été utilisé comme test pour comparer le taux d'inhibition de tous les échantillons étudiés avec son taux d'inhibition, étant donné que c'est le médicament le plus fiable et efficace dans le traitement de l'obésité.

Les résultats indiqués dans le tableau 19 ont montré que l'extrait de *Juniperus phoenicea* a donné le meilleur effet inhibiteur avec un IC_{50} de 1,33 mg/ml, suivi par des extraits de *Globularia alypum*, de *Teucrium polium* et de *Juniperus oxycedrus* avec des valeurs de IC_{50} de 2,29, 2,44 et 2,50 mg/ml, respectivement, par contre, nous n'avons détecté aucune activité inhibitrice pour les extraits d'*Ajuga iva*.

En comparant les résultats obtenus de l'étude avec les résultats des références et des études antérieures qui sont regroupés dans le tableau 20, nous constatons qu'ils sont compatibles. Selon Chenni et al. 2006, Il n'y a eu aucun changement dans le poids des rats traités avec les extraits d'*Ajuga iva* 10,5% mélangé dans un repas riche en matières grasses 10%, Il y a également eu une légère augmentation du poids du foie et du tissu gras. Shahriari et al. 2017 ont remarqué une diminution de l'efficacité de l'enzyme lipase après l'addition d'huile essentielle d'*Teucrium polium*, et une diminution de la quantité des triglycérides dans le sang. *In vivo*, le poids des souris n'a pas changé après un traitement avec des extraits d'acétate d'éthyle de la plante *Teucrium polium* et un repas sucré de 10% de saccharose sans graisse. Cela prouve que nos résultats concernant l'effet des extraits de *Teucrium polium* sur la lipase et la réduction de l'absorption des acides gras sont conformes avec ceux cités ci-dessus.

L'effet inhibiteur de l'extrait de *Globularia alypum* sur la lipase n'a pas été étudié *in vitro* et *in vivo* pour tester son effet sur l'absorption des lipides, mais Merghache et al. 2013 ont étudié l'effet de l'injection de l'extrait de *Globularia alypum* chez les souris atteintes de diabète à

différentes doses pour étudier son effet toxique sur l'organisme et les taux de triglycérides dans le sang et ses organes de stockage (Foie et muscles). Il a été observé qu'il n'y a aucun effet toxique pour toutes les concentrations injectées dans l'organisme et il a été observé une diminution des taux de glycérides et de cholestérol après injection des molécules isolées de *Globularia alypum*. Ces résultats et nos résultats prouvent que *Globularia alypum* a un effet double et multiple contre l'obésité, le premier consiste à réduire l'absorption de lipides au niveau intestinal avec une inhibition de la lipase, et le deuxième en influençant le métabolisme des graisses.

L'effet inhibiteur élevé de la plante de *Juniperus phoenicea* obtenu dans cette étude est conforme aux conclusions de Keskes, et al. 2014. Il a noté que l'extrait de l'hexane, l'extrait de l'acétate d'éthyle et l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* récolté des montagnes de Tunisie avaient une activité inhibitrice élevée de la Lipase pancréatique avec IC_{50} estimées respectivement à 68,74, 60,22 et 66,15 $\mu\text{g/ml}$. Une forte activité inhibitrice de l'extrait éthanol de la plante *Juniperus rigida* de la même famille (Cupressaceae) a été observée avec un IC_{50} de 8,63 $\mu\text{g/ml}$ par Lee et al. 2010. Kim et al. 2005 ont trouvé des extraits d'écorces et de feuilles de la plante qui ont une activité d'inhibitrice avec IC_{50} égale à 20,4, 219 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Des études *in vivo* comprennent une plante appartenant à la même famille, où Kim et al. 2008 ont constaté que le traitement par des extraits d'eau bouillie de *Juniperus hinensis* conduit à une réduction de poids de 10%. Alors que l'extrait de *Juniperus oxycedrus* est faible, bien qu'il soit fréquent dans le traitement de l'obésité par rapport au *Juniperus phoenicea*, l'effet inhibiteur du *Juniperus oxycedrus* sur la lipase ou sur l'obésité n'a jamais été étudié.

D'autre part, Sharma et al. 2005 ont constaté que les concentrations de 0,2 mg / ml de trois plantes *Eriochloa villosa* (Thunb.) Kunth, *Orixa japonica* Thunb et *Setaria italica* (L.) Palib ont une activité inhibitrice élevée de plus que 80%, avec des pourcentages respectivement : 83%, 81,3% et 80,3%, sachons que ces trois plantes appartiennent à la même famille Poaceae. Mais les extraits de plantes ayant l'activité inhibitrice la plus élevée sont les extraits aqueux de la plante *Ginkgo biloba* de la famille (Ginkgoaceae), Adisakwattana et al. 2012 ont estimé l' IC_{50} de 0,05 + 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

Les huiles essentielles montrent que l'huile de menthe a le meilleur effet inhibiteur, avec la valeur de IC_{50} égale à 1,09 mg/ml suivi par l'huile de Giroflier (EOZ) et de l'huile de Cannelle avec les valeurs de IC_{50} égale respectivement à 1,13 mg/ml et 1,78 mg/ml. L'effet inhibiteur de

l'huile de menthe (EOM) est meilleur que l'effet inhibiteur de l'huile essentielle d'*Origanum syriacum* de la même famille (Lamiaceae), estimée par (Afifi, et al. 2017).

Les huiles essentielles de ces trois plantes (menthe, Cannelle et Giroflier) n'ont pas été testées auparavant, mais dans des études antérieures d'autres chercheurs, l'effet inhibiteur de leurs extraits sur la lipase pancréatique a été étudié. (Sellami, et al. 2016) ont constaté que les extraits aqueux de Cannelle et de menthe avaient un effet inhibiteur élevé avec un IC_{50} égale à 45 ± 2 et $62 \pm 3,5$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement, et la valeur de l' IC_{50} pour l'extrait aqueux de Giroflier était de 87 ± 3 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats sont proches de ceux de (Moss-Pierce, Tu et Jiang 2013), ils ont trouvé un effet inhibiteur de l'éthanol:H₂O de Cannelle avec une valeur de IC_{50} égale à 47,8 $\mu\text{g/ml}$. Les extraits d'éthanol ont donné un taux d'inhibition de 51,10%, 21,64% et 20,27%, respectivement pour chacun des Girofliers, des menthes et de la cannelle. L' IC_{50} de l'extrait d'hexane de giroflier a été estimé de 46,22%, cependant, les extraits d'hexane de menthe et de cannelle n'ont aucune activité inhibitrice. (Slanc, et al. 2009) ont trouvé un effet inhibiteur de 40 à 70% pour le Giroflier par rapport à l'orlistat de concentration 25 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats sont plus élevés que les résultats obtenus dans notre étude, bien que, nous avons utilisé la lipase LCR, qui n'a jamais été testé sur des extraits de ces plantes.

Dans les expériences *in vivo*, (Said, et al. 2011) ont observé une perte de poids d'environ 1 kg par semaine pendant toute la période d'étude sur un groupe de 66 volontaires, où il les a traités avec des extraits de feuilles de menthe, des olives, d'*Alchemilla mollis*, et des graines de cumin pendant 3 mois. Une perte de poids progressive a été observé pendant la durée de l'étude chez les personnes traitées, cette diminution est de $90,5 \pm 1,2$ à $78,5 \pm 1,4$ kg après trois mois. Dans une autre étude réalisée par (Soliman, et al. 2012), ils ont remarqué une diminution du poids des souris de laboratoire lorsqu'elles étaient traitées avec des extraits aqueux de cannelle d'une concentration 200 mg/kg par jour prise par voie orale pendant deux mois. D'autre part, (Khan, et al. 2003) ont noté que l'augmentation de la dose de 1, 3 ou 6 g de cannelle par jour pendant 40 jours réduit le glucose dans le plasma sanguin, les triglycérides, le cholestérol des lipoprotéines de basse densité et le cholestérol total dans le sang, chez les personnes atteintes de diabète de type 2, de 18 à 29%, de 29 à 30%, de 7 à 27% et de 12 à 26%, respectivement.

Tous ces résultats démontrent que la consommation sûre de menthe, de cannelle et de giroflier en forme brute ou comme un thé et l'application topique d'huiles essentielles peut être un moyen utile et sécurisé de traiter les maladies liées à la lipase telles que l'obésité et la candidose.

Les molécules chimiques ont donné des faibles valeurs des IC_{50} par rapport à la molécule isolée, son effet inhibiteur est plus élevé par rapport aux acides organiques étudiés mais moins que les huiles essentielles. La comparaison de l'activité inhibitrice de cette molécule avec l'activité inhibitrice de l'orlistat obtenu au cours de cette étude montre qu'elle est inférieure de 10%. C'est un effet important et bon, étant donné que l'orlistat est le médicament le plus efficace pour inhiber la lipase.

(Zheng, et al. 2010) ont étudié l'effet de certaines molécules d'origine végétale, ils ont trouvé une bonne inhibition de quercétine et lutéoline, où le taux d'inhibition était de 27,4% et de 17,3% à une concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ comparativement à 87,1% pour l'orlistat à une même concentration, ce qui indique que l'inhibition de la quercétine est 7 fois inférieure à l'effet de l'orlistat et l'effet de la lutéoline est 10 fois inférieur à l'effet de l'orlistat, qui est la proportion de la molécule dans notre étude.

L'acide folique et febuxostat ont une grande capacité à inhiber la lipase, nous avons observé que leurs IC_{50} étaient estimés à 0,7 et 0,6 mg/ml , respectivement. Il n'y a jamais eu de test préalable pour l'efficacité de ces composés dans le traitement de l'obésité ou d'une maladie liée à la lipase, mais ils sont utilisés dans le traitement des maladies liées à l'obésité, ce qui nous fait croire que leur consommation peut avoir un effet multiple, le premier, c'est la réduction des causes de la maladie d'origine et le deuxième, c'est traité de l'obésité, qui est un facteur clé, augmentant le risque de la maladie d'origine.

En revanche, nous avons remarqué que l'activité inhibitrice la plus faible est enregistrée dans les acides organiques avec des valeurs des IC_{50} élevées par rapport aux molécules extraites de plantes telles que l'apéginine, lutéoline, quercétine, et les médicaments tels que l'acide folique et le febuxostat, à l'exception de l'acide gallique qui a une activité d'inhibitrice plus élevée avec une valeur de $IC_{50} = 1,06 \text{ mg/ml}$.

Tous ces résultats ont été démontrés par étude *in silico* (chapitre IV), où les résultats étaient conformes avec celles obtenus *in vitro*, nous avons montré comment chaque molécule interagit avec la lipase, ce qui donne une idée sur la composition chimique des meilleurs inhibiteurs de la lipase, et donne plus de crédibilité aux résultats obtenus lors du processus de Docking.

Tableau 19. Les valeurs de IC50 de quelques extraits selon la littérature

Famille	Plante	L'extrait	IC50 (mg/ml) * µg/ml	Référence
Lamiaceae	<i>Marrubium vulgare</i>	MeOH/Ac/Eau	1,46	Benguechoua, et al. 2014
	<i>Thymus serpyllum</i>	Ac/Eau	1,60	Benguechoua, et al. 2014
Cupressaceae	<i>Juniperus phoenicea</i>	Hexane	68,74*	(Keskes, et al. 2014)
		MeOH	60,22*	(Keskes, et al. 2014)
		Huile essentielle	66,15*	(Keskes, et al. 2014)
	<i>Juniperus communis</i> (écorces)	Eau ch	20,4*	Kim, et al. 2005
		(Feuilles)	Eau ch	219*
<i>Juniperus rigida</i>	EtOH	8,63*	Lee, et al. 2010	
Fabaceae	<i>Caesalpinia sappan</i>	MeOH	0,15	Batubara, et al. 2009
	<i>Intsia palembanica</i>	MeOH	0,004	Batubara, et al. 2009
Asteraceae	<i>Achillea santolina</i>	BuOH	2,32	Benaous, et al. 2013
		Ac-O-Et	0,37	Benaous, et al. 2013
	<i>Pulicaria crispa</i>	MeOH/Eau	1,41	Nia, et al. 2014
Rhamnaceae	<i>Ziziphus lotus</i>	Ac-O-Et	0,45	Benaous, et al. 2013
		BuOH	0,06	Benaous, et al. 2013
Zygophyllaceae	<i>Peganum harmala</i>	Chloroforme	1,74	Benaous, et al. 2015
Rosaceae	<i>Pyrus pyrifolia bark</i>	EtOH/Eau	44,7*	Kim, et al. 2005
Cruciferae	<i>Oudnaya africana</i>	MeOH/Eau	1,65	Nia, et al. 2014
Saxifragaceae	<i>Bergenia. crassifolia</i> (racines)	Ac-O-Et	3,6*	Ivanov, et al. 2010
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i>	EtOH	0,05*	Adisakwattana, et al. 2012
Hymenochaetaceae	<i>Inonotus hispidus</i>	Ac-O-Et	1,79	Benaous, et al. 2015
	(+)-Catechin 3,5-di-O-gallate	/	0,42*	Ivanov, et al. 2010
	Orlistat	/	0,75*	Kim, et al. 2005

Références Bibliographiques

- Adisakwattana, S., Intrawangso, J., Hemrid, A., Chanathong, B., & Mäkynen, K. (2012). Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 11.
- Afifi, F. U., V. Kasabri, A. Abuhammad, I. F. Abaza, O. Ganado, et A. H. Al-Gabbiesh. 2017. «comparison of different methods in determination of essential oil composition of origaun syriacum l. from jordan and its modulation of pancreatic enzymes.»; *revue roumaine de chimie* 15-21.
- Batubara, I., Mitsunaga, T., & Ohashi, H. (2009). Screening antiacne potency of Indonesian medicinal plants: antibacterial, lipase inhibition, and antioxidant activities. *Journal of wood science*, 55(3), 230-235.
- Beer, H. D., Wohlfahrt, G., Mccarthy, J. E. G., Schomburg, D., Schmid, R. D., 1996. Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Eng.*, 6: 507-517.
- Benarous, K., Djeridane, A., Kameli, A., & Yousfi, M. (2013). Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxydant activities. *Current Enzyme Inhibition*, 9(1), 75-82.
- Benarous, Khedidja. 2014. *Thèse de Doctorat: Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de Peganum harmala, Inonotus hispidus, Marrubium vulgare, Ziziphus lotus et Achillea santolina sur la lipase de Candida rugosa*. ALGER: L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE KOUBA.
- Benguechoua, M., Nia, S., Benarous, K., Khachba, I., & Yousfi, M. (2014). Inhibition of *candida rugosa* lipase by different extracts of five algerian plants and their antioxidant activities. *Current Enzyme Inhibition*, 10(2), 121-128.
- Boris, Draznin, et Rizza Robert. 1997. *Clinical Research in Diabetes and Obesity*. New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Sharma Niti, Sharma Vinay K., Seo Sung-Yum, 2005, Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 97, Issue 3, Pages 453-456
- Chenni, A., Yahia, D. A., Boukortt, F. O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A., & Bouchenak, M. (2007). Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2), 207-213.
- Cortés-Rojas, Diego Francisco, Claudia Regina, Fernandes de Souza, et Wanderley Pereira Oliveira. 2014. «Clove (): a precious spice, Asian Pacific.» *Journal of Tropical Biomedicine* 90-96.
- Cygler, Roslaw, et Joseph D. Schrag. 1997. «Structure As Basis For Understanding Interfacial Properties Of Lipases.» Dans *Methods in ENZYMOLOGY, Lipases part A*, de Byron Rubin et Edward A. Dennis. Academic Press.
- de la Garza, Ana Laura, Fermín I. Milagro, Noemí Boque, Javier Campión, et J. Alfredo Martínez. 2011. «Natural Inhibitors of Pancreatic Lipase as New Players in Obesity Treatment.» *Planta Med* 77: 773–785.

- Debasis, Bagchi, et G. Preuss Harry. 2007. *Obesity: Epidemiology, Pathophysiology and Prevention*. CRC Press.
- Derewenda, Zygmunt S. . 1994. «Structure and function of lipases.» Dans *ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY: Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases*, de Verne N. Schumaker. united states of america: ACADEMIC PRESS, INC.
- Donald, G. Barceloux. 2009. «Cinnamon (Species).» *Disease-a-Month* 327-335.
- Dwivedi, Vinay, Richa Shrivastava, Showket Hussain, Chaiti Ganguly, et Mausumi Bharadwaj. 1989. «Comparative Anticancer Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) - an Indian Spice - Against Cancer Cell Lines of Various Anatomical Origin.» *Asian Pacific J Cancer Prev*.
- Hasani-Ranjbar, S., Nayebi, N., Larijani, B., & Abdollahi, M. (2009). A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(25), 3073.
- IOM, (Institute of Medicine). 2012. *Measuring Progress in Obesity prevention*:. Workshop Report, Washington, DC: The National Academies Press.
- İşcan, Gökalp, Neşe Kirimer, Mine Kürkcüoğlu, K. Hüsnü Can Başer, et Fatih Demirci. 2002. «Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 3943-3946.
- Ivanov, S. A., Nomura, K., Malfanov, I. L., Sklyar, I. V., & Ptitsyn, L. R. (2011). Isolation of a novel catechin from *Bergenia* rhizomes that has pronounced lipase-inhibiting and antioxidative properties. *Fitoterapia*, 82(2), 212-218.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O., 1994. Bacterial lipases. *Fems Microbiol. Rev.*, 15: 29-63.
- Jung, C.H., J. Ahn, T. Jeon, T.W. Kim, et T.Y Ha. 2012. «*Syzygium aromaticum* ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice through downregulation of adipogenic and lipogenic gene expression.» *Experimental And Therapeutic Medicine* 409-414.
- Karl, G.Hofbauer, Keller Ulrich, et Boss Olivier. 2005. *Pharmacotherapy of obesity: Options and Alternatives*. Washington, D.C.: CRC PRESS.
- Kathleen, Keller. 2008. *Encyclopedia of obesity*. California: SAGE Publications, Inc.
- Keskes, H., Mnafigui, K., Hamden, K., Damak, M., El Feki, A., & Allouche, N. (2014). In vitro anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea* L. leaves from Tunisia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S649-S655.
- Keskes, H., Belhadj, S., Jlail, L., El Feki, A., Damak, M., Sayadi, S., & Allouche, N. (2017). LC-MS–MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian *Juniperus phoenicea* leaves. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 88-95.
- Khan, Akam, Mahpara Safdar, Mohammad Muzaffar Ali khan, Khan nawaz Khattak, et Richard A. Anderson. 2003. «Cinnamon Improves Glucose and Lipids of People With Type 2 Diabetes.» *American Diabetes Association* 3215-3218.
- Kim, H. Y., & Kang, M. H. (2005). Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. *Phytotherapy Research*, 19(4), 359-361.

- Kim, S. J., Jung, J. Y., Kim, H. W., & Park, T. (2008). Anti-obesity effects of *Juniperus chinensis* extract are associated with increased AMP-activated protein kinase expression and phosphorylation in the visceral adipose tissue of rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(7), 1415-1421.
- Lee, Kwang-Geun, et Takayuki Shibamoto. 2001. « Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [(*L.*) Merr. et Perry].» *Food Chemistry* 443-448.
- Lee, Y., Kim, J., Kim, H., Sohn, E., Kim, C., Jeong, I., ... & Kim, J. (2010). Anti-lipase and lipolytic activities of EtOH extract from *Juniperus rigida*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 41(3), 216-220.
- Leticia, Casas- Godoy, Duquesne Sophie, Bordes Florence, Sandoval Georgina, et Marty Alain. 2012. «Lipases: An Overview.» Dans *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, de Sandoval Georgina. New York: Springer Science+Business Media.
- Merghache, S., Zerriouh, M., Merghache, D., Tabti, B., Djaziri, R., & Ghalem, S. (2013). *Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidemic activities of Globularin isolated from Globularia alypum L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats.*
- McKay, D.L., et J.B. Blumberg. 2006. «A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.).» *Phytotherapy research* 619-633.
- Moss-Pierce, Tijuana, Zheng Tu, et Alan Jiang. 2013. «Nutrition - Obesity: Carbohydrate Intake and Weight Management: In Vitro Digestive Enzyme Inhibitory Effects of Eight Common Spices and Herbs.» *FASEB*.
- Neffati, A., I. Bouhlela, M. Ben Sghaier, J. Boubaker, I. Limem, S. Kilani, I. Skandrani, et al. 2009. «Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oils.» *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27: 187-194.
- Nia, S., Benguechoua, M., Benarous, K., Khacheba, I., K Cherif, J., Trabelsi-Ayadi, M., & Yousfi, M. (2014). Screening of Two Algerian Spontaneous Plants for Anti-lipase and Antioxidant Activities. *Current Enzyme Inhibition*, 10(2), 113-120.
- Pearce, Jamie, et Karen Witten. 2010. *Geographies of Obesity: Environmental Understandings of the Obesity Epidemic*. England: Ashgate.
- Pinto, Eugénia, Luís Vale-Silva, Carlos Cavaleiro, et Lígia Salgueiro. 2009. «Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species.» *Journal of Medical Microbiology* 1454-1462.
- Ranasinghe, L., B. Jayawardena, et K. Abeywickrama. 2002. «Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana.» *Letters in Applied Microbiology* 208-2011.
- Ravindran, P. N., K Nirmal-Babu, et M Shylaja. 2003. «Cinnamon and Cassia: The Genus *Cinnamomum*, Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles.» *CRC Press*.
- Said, O., B. Saad, S. Fulder, K. Khalil, et E. Kassis. 2011. «Weight Loss in Animals and Humans Treated with “Weighlevel”, a Combination of Four Medicinal Plants Used in Traditional Arabic and Islamic Medicine.» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*.
- Sellami, Mohamed, Hanen Louati, Jannet Kamoun, Ali Kchaou, Mohamed Damak, et Youssef Gargouri. 2016. «Inhibition of pancreatic lipase and amylase by extracts, of different spices and plants.» *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.

- Shahriari, M., Sahebzadeh, N., & Zibae, A. (2017). Effect of *Teucrium polium* (Lamiaceae) essential oil on digestive enzyme activities and energy reserves of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *ISJ-INVERTEBRATE SURVIVAL JOURNAL*, 14, 182-189.
- Slanc, P., B. Doljak, S. Kreft, M. Lunder, D Janeš, et B. Štrukelj. 2009. «Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition.» *Phytother. Res.* 874-877.
- Soliman, Mohamed Mohamed, Hossam Fouad Attia, Samir Ahmed El-Shazly, et Osama Mesilhy Saleh. 2012. «Biomedical effects of cinnamon extract on obesity and diabetes relevance in wistar rats.» *American journal of biochemistry and molecular biology* 133-145.
- Wang, Rui, Ruijiang Wang, et Bao Yang. 2009. «Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions.» *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 289-292.
- WHO. 2016. «fact sheet No. 311: obesity and overweight.» *world health organization*. Jun. Accès le Jun 15, 2016. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- WHO, (World Health Organization). 2000. *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. report of a WHO consultation, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A. Hunziker, W., 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343: 771-774.
- Yadegarinia, Davod, Latif Gachkar, Mohammad Bagher Rezaei, Massoud Taghizadeh, Shakiba Alipoor Astaneh, et Iraj Rasooli. 2006. «Biochemical activities of Iranian L. and L. essential oils.» *Phytochemistry* 1249-1255.
- Zheng, CD1, YQ Duan, JM Gao, et ZG Ruan. 2010. «Screening for anti-lipase properties of 37 traditional Chinese medicinal herbs.» *J Chin Med Assoc* 319-324

Chapitre III

Docking Moléculaire

In silico

Rappels Bibliographiques

1. Importance biologique de l'outil bioinformatique

Le terme bioinformatique a été forgé en 1979 par Paulien Hogeweg de l'université d'Utrecht, Pays-Bas, conjointement avec Ben Hesper. La définition qu'ils lui ont donnée est la suivante : l'étude des procédés informatiques dans les systèmes biotiques. Cela va de l'analyse du génome à la modélisation de l'évolution d'une population animale dans un environnement donné, en passant par la modélisation moléculaire, l'analyse d'image, l'assemblage de génome et la reconstruction d'arbres phylogénétiques (phylogénie). Cette discipline constitue la «biologie *in silico*», par analogie avec *in vitro* ou *in vivo* (Claverie et al., 2013 in Benarous 2014).

2. Docking moléculaire

Dans la conception de médicaments basée sur la structure, l'interaction entre la drogue et la protéine cible peut guider la découverte de nouveaux médicaments. Une fois que les groupes d'acides aminés liés à l'inhibiteur sont identifiés, le pharmacophore de l'inhibiteur peut être construit à partir de leur interaction (Graham, 2005 in Jinghui, 2006).

Expérimentalement, il faut beaucoup de temps pour identifier les interactions de liaison qui maintiennent un ligand dans le site de liaison. L'ancrage moléculaire permet de simuler le mode de liaison de différents ligands *in silico* et peut être réalisé en peu de temps (Graham, 2005 : in Jinghui, 2006).

Pour l'évaluation d'amarrage, l'objectif devrait être la reproduction de la conformation entrante d'un ligand dans sa macromolécule cible. En utilisant l'évaluation énergétique basée sur la grille, comme la combinaison avec l'optimisation de Monte Carlo, la recherche de flexibilité conformationnelle et l'énergie libre heuristique, le programme Autodock est devenu le programme d'amarrage le plus populaire et le plus précis dans la conception de médicaments (Morris, et al. 1998 : in Jinghui, 2006)

3. Les liaisons non-covalentes

La liaison non-covalente entre molécules, telles que enzymes / substrats, ligands / récepteurs, ou protéines / acides nucléiques, est un élément important de la biochimie et de l'information dans les cellules. La spécificité est nécessaire pour préserver l'exactitude des voies biochimiques et l'intégrité de l'information. L'affinité et la spécificité de liaison sont souvent fournies par des interactions non covalentes entre groupes chimiques voisins, par des liaisons

hydrogènes, des ponts salins, un compactage de surfaces moléculaires complémentaires et des forces hydrophobes médiées par des solvants, bien que les interactions électrostatiques à longue portée jouent également un rôle dans la formation de complexes des ligands/macromolécules (Lodish, 2000).

Matériel et Méthodes

1. Choix des structures des lipases

Nous avons choisi les structures des lipases avec les entrées PDB ID : 1CRL et PDB ID : 1LPA pour le docking moléculaire selon ces critères (Benarous 2014) :

- ✓ une résolution élevée (2,06 et 3,04 Å) ;
- ✓ une conformation active de l'enzyme (open conformation)
- ✓ un faible nombre de ligands.

2. Choix des structures des ligands

Nous avons choisi les ligands comme suit :

- L'orlistat, un médicament antiobésité ;
- Les médicaments : acide folique, febuxostat, colchicine.
- Les composants majoritaires d'huile essentielle de menthe : Menthol
- Le composant majoritaire d'huile essentielle de giroflier : Eugénol
- Le composant majoritaire d'huile essentielle de cannelle : Cinnamaldéhyde
- Les acides organiques : acide ascorbique, acide benzoïque, acide citrique, acide gallique et l'acide oxalique.

3. Docking moléculaire

Toutes les molécules proviennent de base de données pubchem, ils ont été assemblés avec Discovery Studio visualizer v4.0. La structure 3D de la lipase de *C. rugosa* (PDB ID : 1CRL) et la lipase pancréatique humaine (PDB ID : 1LPA) ont été pris à partir de la base de données des protéines (PDB). Pour étudier le docking, initialement il faut préparer la protéine en éliminant toutes les molécules d'eau, hétéroatomes, n'importe quel ligands et solvant Co-cristallisé. Il est bien connu que les fichiers pdb sont dépourvus des atomes d'hydrogène. Par conséquent, les hydrogènes polaires et les charges partielles ont été ajoutés à la structure à l'aide de logiciel Autodock tools (ADT) (version 1.5.4). Le docking moléculaire était performé par le programme AutoDock Vina dans une station de 12 CPU. Puisque ce logiciel utilise des boîtes rectangulaires pour le site de liaison, le centre de la boîte a été défini et la zone d'accueil est affichée à l'aide d'ADT.

Le docking était aveugle « blind docking » avec une grille de boîte de 68 * 68 * 68 avec points de grille séparés de 1 Å a été positionné au milieu de la protéine (x = 72,33 ; y = 55,391

; $z = -20,425$) pour 1CRL. Pour 1LPA, une grille de boîte de $32 * 32 * 50$ avec points de grille séparés de 1 \AA a été positionné au milieu de la protéine ($x = 1,228$; $y = 34,072$; $z = 39,437$).

Les paramètres par défaut ont été utilisés, sauf que le nombre des conformations de sortie a été réglé à 40. Le nombre de tour de docking s'est fixé sur 50 tours. Le nombre des solutions obtenues est égal à 1000 conformations. Toutes ces solutions sont très bien traitées. Le « random seed » est aléatoire. 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

Nous pouvons prédire le type d'inhibition à partir du type d'interaction entre l'inhibiteur et les acides aminés du site actif, Ser209 et His 449 pour 1CRL et Ser152 et His263 pour 1LPA. D'autres acides aminés ne sont pas inclus directement dans la réaction, mais jouent un rôle important dans la stabilité du complexe ligand-enzyme à savoir : Gly123 et Gly124 forment le trou d'oxyanion et Phe344 qui est le premier acide aminé de la cavité tunnel de la lipase de *Candida rugosa*, ces acides aminés avec ceux des sites actifs des deux lipases sont présentés dans la figure 41.

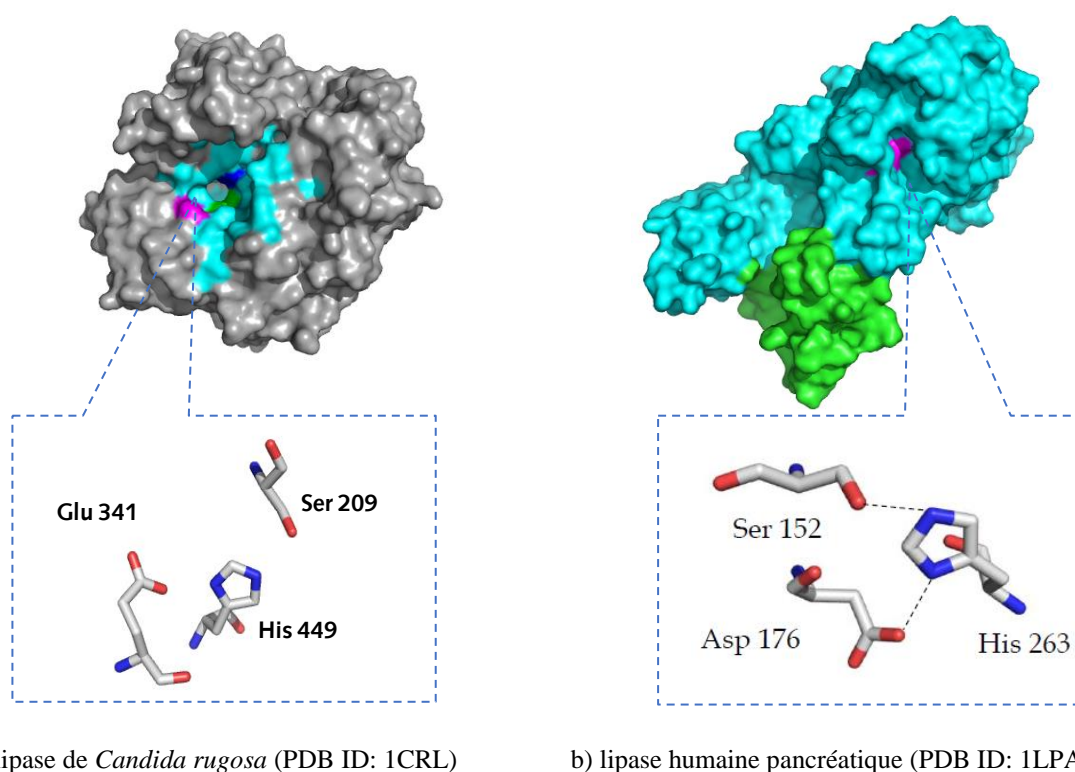


Figure 35. Les acides aminés du site actif de la lipase de *Candida rugosa* (PDB ID: 1CRL) et de la lipase humaine pancréatique (PDB ID: 1LPA)

Dans le but de prédire le type d'inhibition de chaque molécule et d'étudier les interactions entre les molécules et les enzymes, nous avons suggéré l'étude *in silico* en utilisant le Docking moléculaire. Nous avons déterminé les nombres de répétition des solutions qui ont l'interaction entre les acides aminés de site catalytique de l'enzyme et l'inhibiteur, les résultats sont présentés dans les tableaux 21 et 22. Toutes les 1000 solutions présentent les conformations de complexe inhibiteur-enzyme les plus stables avec l'énergie la plus faible -8 Kcal à -4 Kcal.

D'après le docking moléculaire, nous pouvons dire qu'un inhibiteur est compétitif s'il interagit avec deux acides aminés catalytiques du site actif, avec les deux interactions

hydrogène et hydrophobe. Un inhibiteur dit non-compétitif, s'il interagit avec un ou deux acides aminés catalytiques du site actif mais l'interaction est avec une des deux types d'interaction. Alors que pour l'inhibiteur incompétitif, s'il interagit avec un seul acide aminé catalytique du site actif et un seul type d'interaction (soit hydrogène ou hydrophobe), ce qui nous avons confirmé à travers cette analyse.

Le traitement des 1000 résultats pour toutes les 18 molécules se fait à l'aide de Discovery studio v4.0, nous avons sélectionné la meilleure solution pour chaque inhibiteur en fonction du nombre de répétitions et du type d'interaction existant dans cette solution à partir de 1000 solutions obtenues, les résultats sont présents dans les images « c, d et e » des figures 42-65. Nous avons utilisé le logiciel LigPlot pour mesurer les distances interatomiques entre les acides aminés de l'enzyme et l'inhibiteur, les résultats sont affichés dans les images « f » des Figures 42-65. Le logiciel PyMol est utilisé pour afficher comment l'inhibiteur se fixe dans le site actif de l'enzyme, les images sont enregistrées et présentées dans les photos « a et b » des figures 42-65.

Dépendant du nombre de solutions obtenues, nous montrons que les molécules : orlistat, acide folique, febuxostat, colchicine, menthol, carvacrol, Cinnamaldéhyde, Eugénol, β -phellandrène, α -pinène, apéginine, luteoline et quercétine ont enregistrées une bonne activité inhibitrice de la LCR, ce qui confirme les résultats expérimentaux obtenus (l'étude *in vitro*) des médicaments et des huiles essentielles.

L'acide gallique a un nombre de répétition faible mais le complexe acide gallique-LCR est plus stable que les autres acides étudiés avec $\Delta G = -6$ Kcal. Les acides ont une faible activité inhibitrice de la LCR. Ce qui est conforme aux résultats expérimentaux obtenus (l'étude *in vitro*).

Les résultats du docking montrent que la colchicine n'a pas d'activité d'inhibition sur la lipase pancréatique.

Tableau 20. Les résultats du docking et le nombre des répétitions (*C. rugosa lipase*)

Molécule	Ns%	Type d'interaction						Type d'inhibition
		Liaisons hydrogènes				Liaisons hydrogènes		
		Ser209	His449	Gly123	Gly124	His449	Phe344	
Acide folique	33,70%	9,49%	11,27%	-	35,07%	38,85%	22,30%	Compétitive
Febuxostat	22,80%	1,75%	3,50%	-	8,33%	26,04%	40,36%	Noncompétitive
Colchicine	33,00%	-	-	-	0,90%	0,74%	16,83%	Incompétitive
Menthol	38,4%*	4,91%	7,37%	-	0,98%	60,42%	97,66%	Compétitive
Carvacrol	40,4%	7,37%	6,63%	0,25%	0,49%	92,08%	100%	Compétitive
Cinnamaldéhyde	40,7%	1,72%	-	0,25%	14%	0,98%	51,60%	Incompétitive
Eugénol	27,8%	2,46%	4,42%	-	15,23%	44,24%	88,49%	Compétitive
Apéginine	48,8%	6,15%	4,92%	-	1,23%	3,28%	6,97%	Compétitive
Lutéoline	24,8%	9,68%	8,06%	-	4,03%	3,23%	3,23%	Compétitive
Quercétine	18,4%	13,04%	4,89%	-	2,72%	4,89%	3,26%	Compétitive
Acide ascorbique	16,00%	23,75%	6,25%	-	44,38%	-	2,5%	Noncompétitive
Acide benzoïque	27,7%	2,89%	7,58%	-	27,80%	23,10%	57,76%	Compétitive
Acid citrique	8,7%	9,20%	16,09%	-	21,84%	-	--	Noncompétitive
Acide gallique	13,3%	8,27%	10,53%	-	42,62%	78,20%	0,75%	Compétitive
Acide oxalique	5,7%	36,84%	8,77%	-	35,09%	-	-	Noncompétitive
Orlistat	84,1%	4,16%	-	-	58,86%	-	23,42%	-

% nombre des solutions contenant les interactions dans toutes les solutions obtenues

Ns % le nombre des solutions totales acceptées obtenus à partir de 50 tours.

Tableau 21. Les résultats du docking et les nombre des répétitions pour la lipase pancréatique humaine

Molécule	Ns%	Type d'interaction					Inhibition type
		Liaisons hydrogènes			Interactions hydrophobes		
		Ser152	His263	Phe77	His263	Phe77	
Acide folique	23,30%	24,89%	30,47%	-	23,60%		Compétitive
Febuxostat	16,70%	35,32%	-	-	52,09%		Non compétitive
Colchicine	0,60%	-	-	-	-		-
Eugénol	34,8%	19,54%	9,20%	5,46%	78,45%	58,62%	Compétitive
Quercétine	25,5%	49,21%	21,43%	21,03%	42,86%	84,13%	Compétitive
Acide ascorbique	24,4%	10,25%	10,25%	32,79%	-	-	Non compétitive
Acid citrique	18,2%	45%	25,27%	63,74%	-	-	Non compétitive
Acide gallique	39,2%	88,49%	50%	64,29%	20,92%	27,04%	Compétitive
Acide oxalique	34%	30,29%	25,29%	40%	-	-	Non compétitive

% nombre des solutions contenant les interactions dans toutes les solutions obtenues

Ns % le nombre des solutions totales acceptées obtenus à partir de 50 tours.

Nous avons observé que l'acide folique interagit avec Ser209 de la triade catalytique de LCR et Ser152 de la triade catalytique de LPA par des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 9,42% et 24,89%, respectivement, et avec His449 de triade catalytique de LCR et His263 de la triade catalytique de LPA par deux types d'interactions ; des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 11,27% et 30,47%, et des interactions hydrophobes avec des valeurs de 38,85% et 23,60%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour les deux lipases en interagissant avec "Ser, His" de la triade catalytique par deux types d'interactions. L'acide folique interagit avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe avec des valeurs de 22,30%. En LCR, L'acide folique forme une interaction hydrophobe de type « π - π T-shaped » avec His449 avec une valeur de 38,85%, « π - π stacked » et « π - π T-shaped » avec Phe344 avec des valeurs de 15,47% et 6,83%. Dans LPA, l'acide folique forme une interaction hydrophobe de type « π - π T-shaped » avec His263 avec une valeur de 23,60%.

Dans la LCR, trois distances sont mesurées par LigPlot la première est 2,75Å entre l'atome d'oxygène numéro 1 de l'acide folique et l'hydrogène de groupement hydroxyle OH de l'acide aminé Ser348, la deuxième est 2,85Å entre l'atome d'oxygène numéro 17 de l'acide folique et l'atome d'hydrogène du radical OH de Ser450. La troisième est 3,32 Å entre l'acide folique et l'acide aminé Gly122 (Figure 42 « f »). Les distances des interactions hydrophobes sont 3,85 Å entre les cycles de Phe344 et troisième cycle de l'acide folique, 4,33, 4,45 et 5,19 Å entre le radical CH-(CH₃)₂ de Leu297 et les trois cycles de l'acide folique.

Dans la LPA, une seule distance est mesurée par LigPlot, c'est 3,08Å entre l'atome d'hydrogène de l'acide folique et le nitrogène de l'acide aminé His263 (Figure 43 « f »). la distance des interactions hydrophobes sont 4,24 et 4,68 Å entre les cycles de Phe215 et Phe77, respectivement, et le troisième cycle de l'acide folique. Les valeurs 4,36, 4,80, 4,87 et 5,50 Å se trouvent entre les radicaux des acides aminés Ile209, Pro180 et Val210 et le premier et deuxième cycle de l'acide folique.

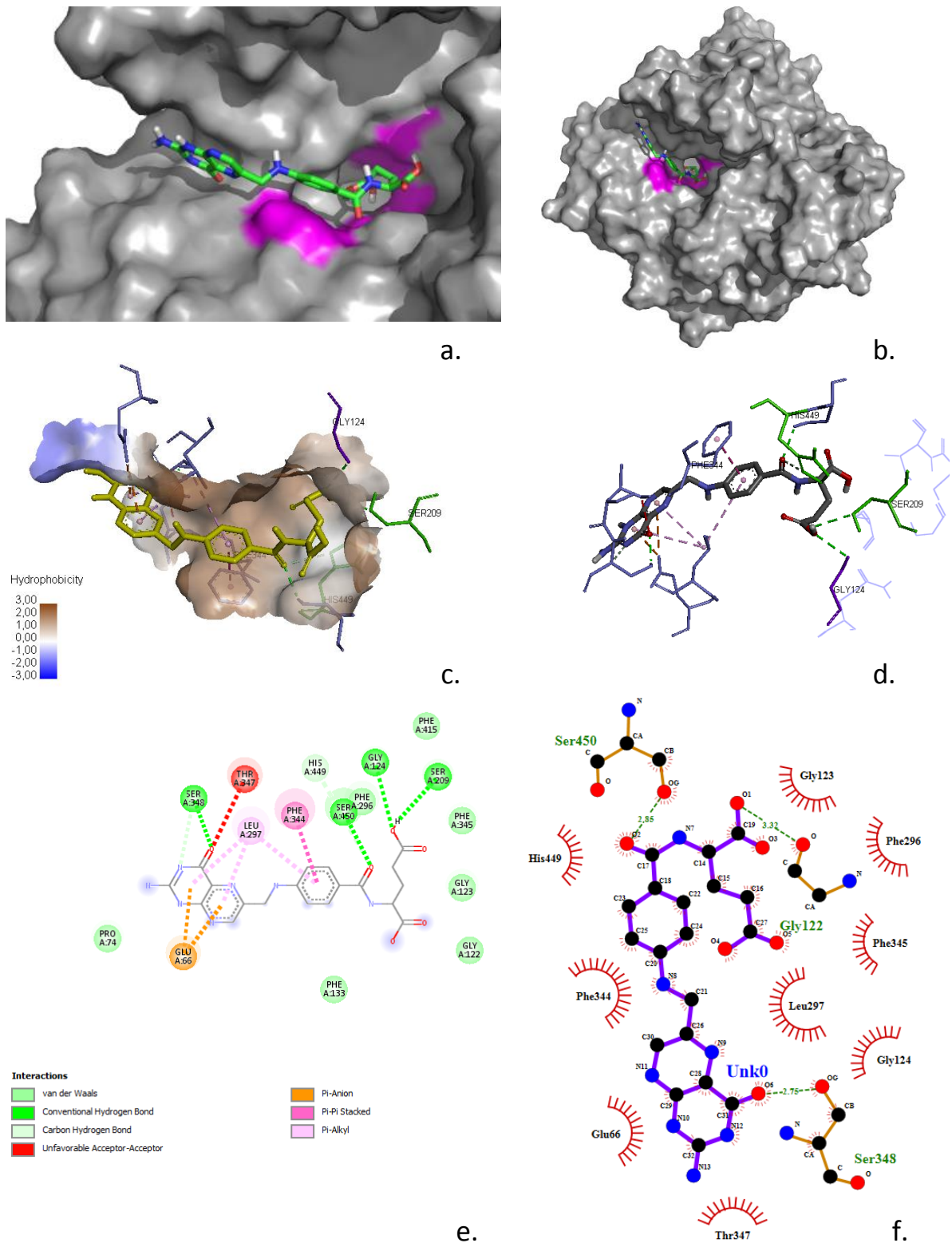


Figure 36. Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide folique et les acides aminés de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

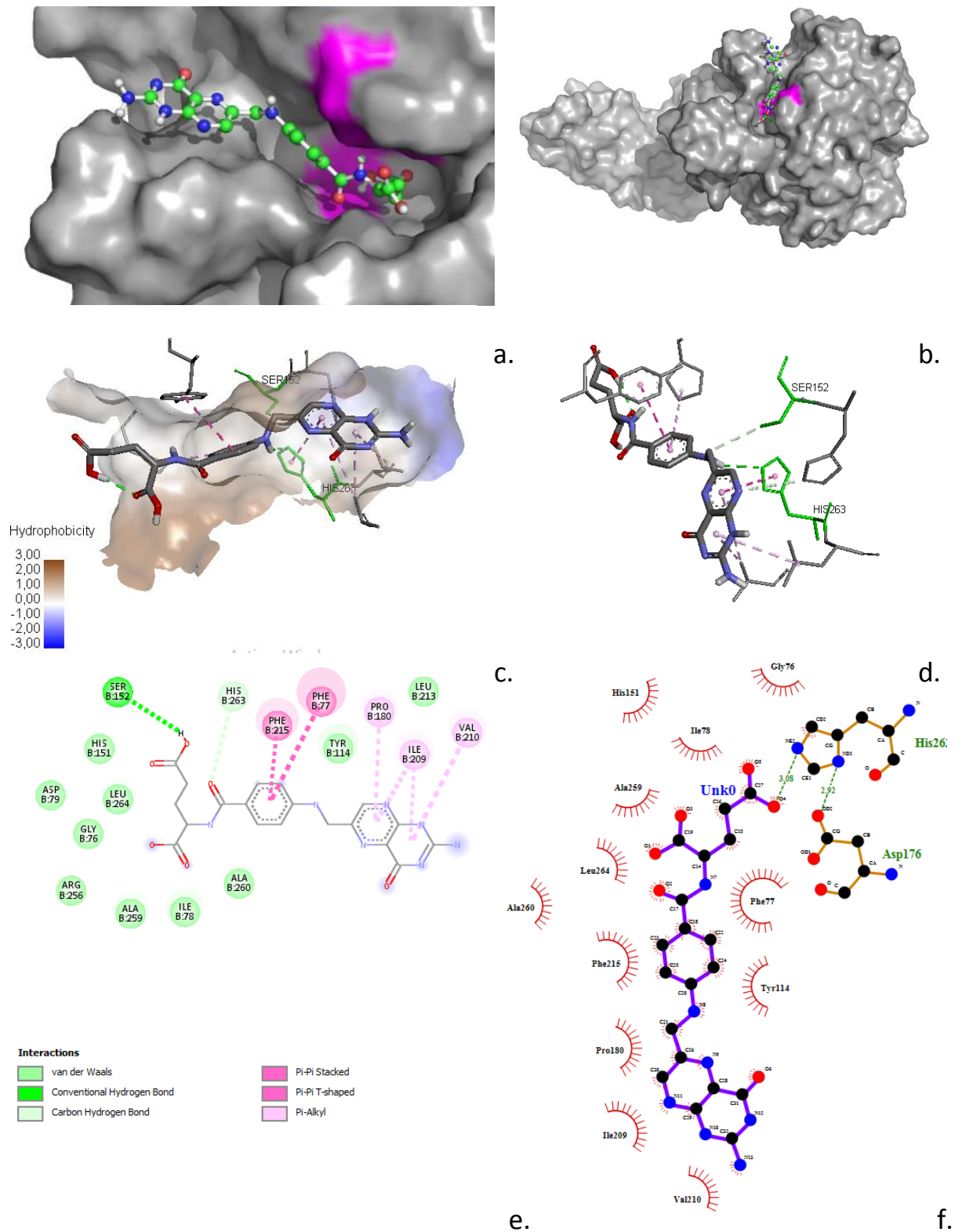


Figure 37. Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide folique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons noté que le febuxostat a une faible interaction avec Ser209 de la triade catalytique de LCR, il forme une liaison hydrogène avec une valeur de 1,75%, mais interagit fortement avec His449 de la triade catalytique de LCR, avec deux types d'interactions : liaison hydrogène avec une valeur de 3,50% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 26,04%. Nous avons observé que le febuxostat interagit avec Ser152 de la triade catalytique du LPA par une liaison hydrogène avec une valeur de 35,32%, et avec His263 de la triade catalytique du LPA par des interactions hydrophobes avec une valeur de 52,09%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur non compétitif pour les deux lipases en interagissant avec un acide aminé "Ser209 ou His449" pour LCR, et "Ser152 ou His263" pour LPA, avec deux types d'interactions. Le febuxostat interagit avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe avec des valeurs de 40,36%. Il forme des interactions hydrophobes de type « π alkyle » et « π - π T-shaped » avec His449 avec une valeur de 25,26% et 0,78%, « π alkyle », « π - π stacked », « π sigma » et « π - π T-shaped » avec Phe344 avec des valeurs de 22,40%, 9,64%, 5,47% et 2,86%. Le febuxostat forme également une interaction hydrophobe de type « π alkyle » et « π - π T-shaped » avec His263 avec des valeurs de 42,51% et 9,58%, respectivement.

Pour la LCR, deux distances sont mesurées par LigPlot, la première est 3,25Å entre l'atome d'hydrogène du groupement carboxylique de febuxostat et l'atome de nitrogène de l'acide aminé His449, la deuxième est 3,17Å entre l'atome d'oxygène du groupement carboxylique de febuxostat et l'atome d'hydrogène de NH de l'acide aminé Gly124 (Figure 44 « f »). Les distances des interactions hydrophobes sont 4,39, 5,45 et 5,81Å entre le cycle hexagonal du febuxostat et le radical (CH(CH₃)₂) de Leu297, le cycle de Phe344, et le cycle de Phe296 et de Phe344 et le troisième cycle de febuxostat. Les valeurs 4,18 et 5Å entre le groupement CH₃ de febuxostat et le radical CH-(CH₃)₂ de Leu297 et le cycle de Phe344.

Pour la LPA, une seule distance a été mesurée par LigPlot, c'est 3,10Å entre l'atome d'hydrogène du groupement carboxylique de febuxostat et l'atome de nitrogène de l'acide aminé His263 (Figure 45 « f »). Les interactions hydrophobes sont plusieurs, les distances sont à partir de 3,98 à 5,12Å entre les cycles et les groupement CH₃ de febuxostat et les cycles des Phe77, Tyr114, Pro180 et Phe215.

L'acide folique et le febuxostat ont un groupe hydroxyle et un atome d'oxygène, qui peuvent agir comme accepteurs ou donneurs de protons formant ainsi des liaisons hydrogènes avec les acides aminés du site actif de LCR "Ser209, His449, Gly123, Gly124" et LPA "Ser152, His263 ". De plus, il contient un cycle aromatique capable de faire des interactions hydrophobes de type : « π - π stacked », « π - π T-shaped », « π - π alkyle et π sigma » avec les acides aminés hydrophobes : "His 449, Phe344" de LCR et "His263" de LPA. La colchicine ne peut pas former des liaisons hydrogène avec les acides aminés de la LCR et de la LPA, car elle ne possède pas un groupe hydroxyle.

Nous proposons que la colchicine soit un inhibiteur incompétitif de la LCR car son interaction avec la triade catalytique est faible, elle forme une interaction hydrophobe avec His449 avec une valeur de 0,74% et ne fait aucune interaction avec Ser209 l'autre acide aminé du site actif. Mais nous observons une interaction hydrophobe avec Phe344 avec une valeur de 16,83%, ce qui confirme qu'il peut inhiber la LCR. En outre, la colchicine forme une interaction hydrophobe de type « π - π T-shaped » avec His449 avec une valeur de 0,78%, « π alkyle, π sigma et π - π T-shaped » avec Phe344 avec des valeurs de 12,62%, 2,72% et 1,49%, respectivement. Dans l'image de LigPlot, aucune distance n'est enregistrée entre la colchicine et les acides aminés de la LCR. Alors que la distance de l'interaction hydrophobe est 4,24 Å entre le deuxième cycle de colchicine et le cycle de l'acide aminé Phe344 (figure 46 « d »). La colchicine possède une structure cyclique complexe, ces cycles lui permettent d'interagir pour former les interactions hydrophobes avec les acides aminés de site catalytique de la LCR.

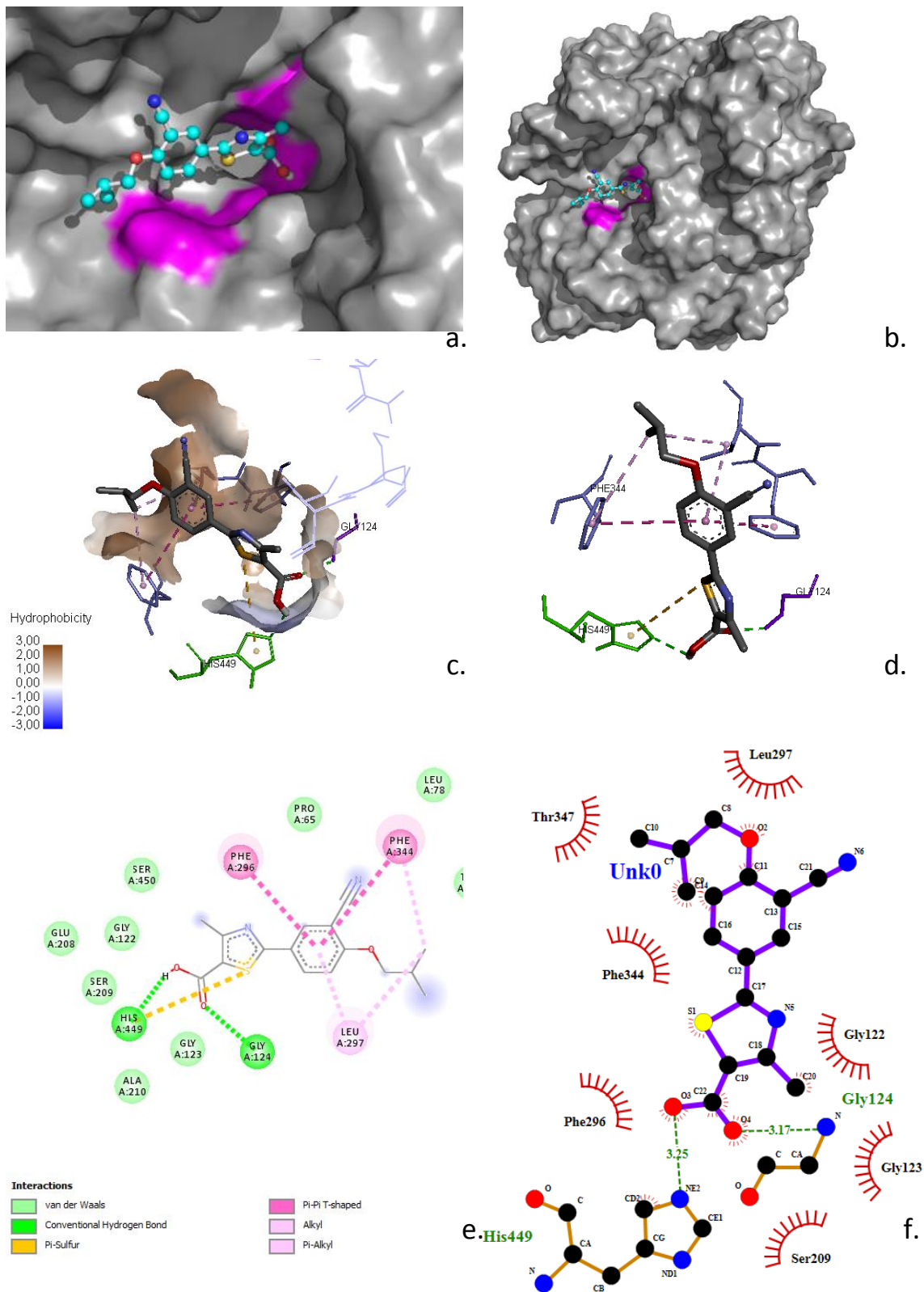


Figure 38. Représentation des interactions 2D et 3D entre le Febuxostat et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

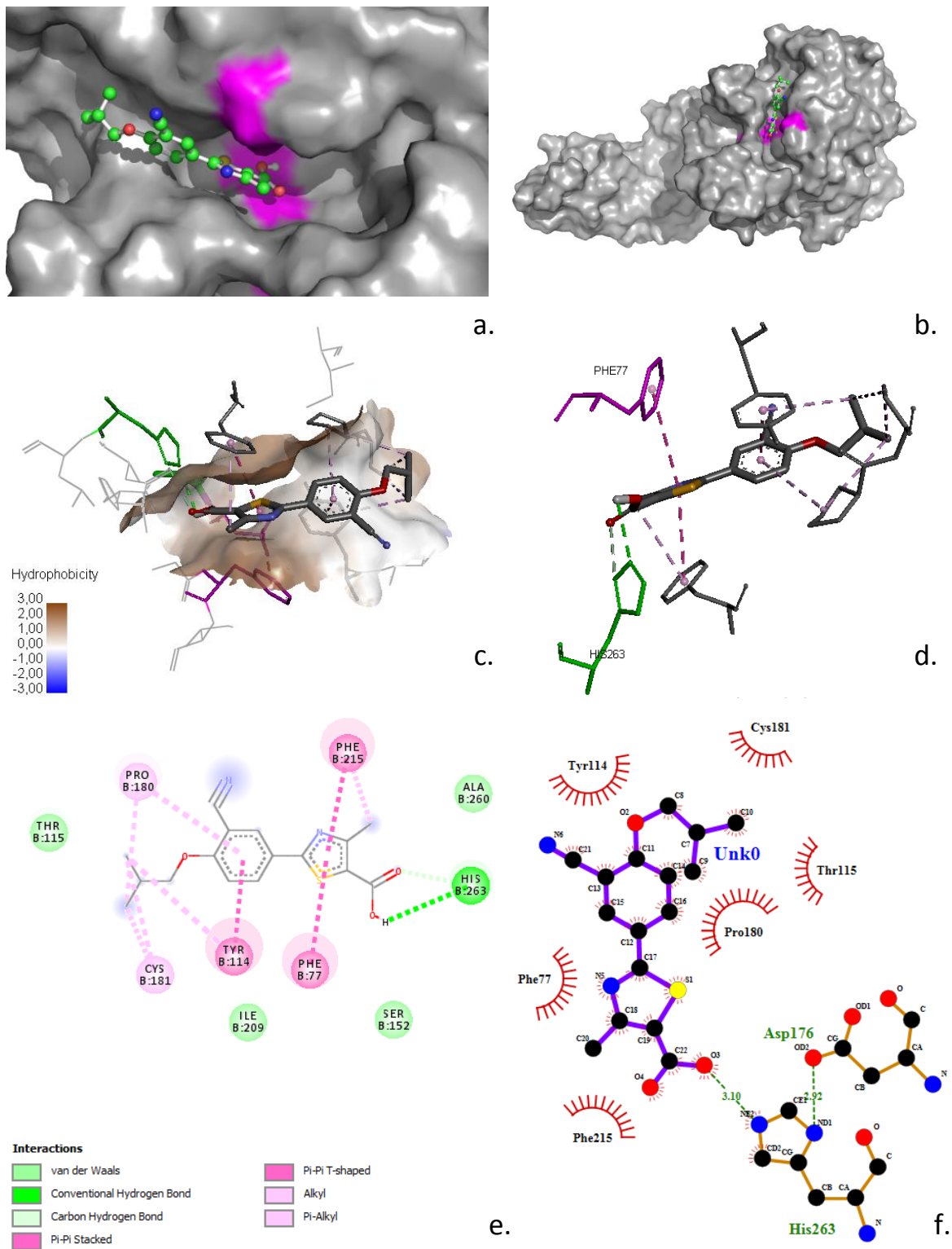


Figure 39. Représentation des interactions 2D et 3D entre le Febuxostat et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

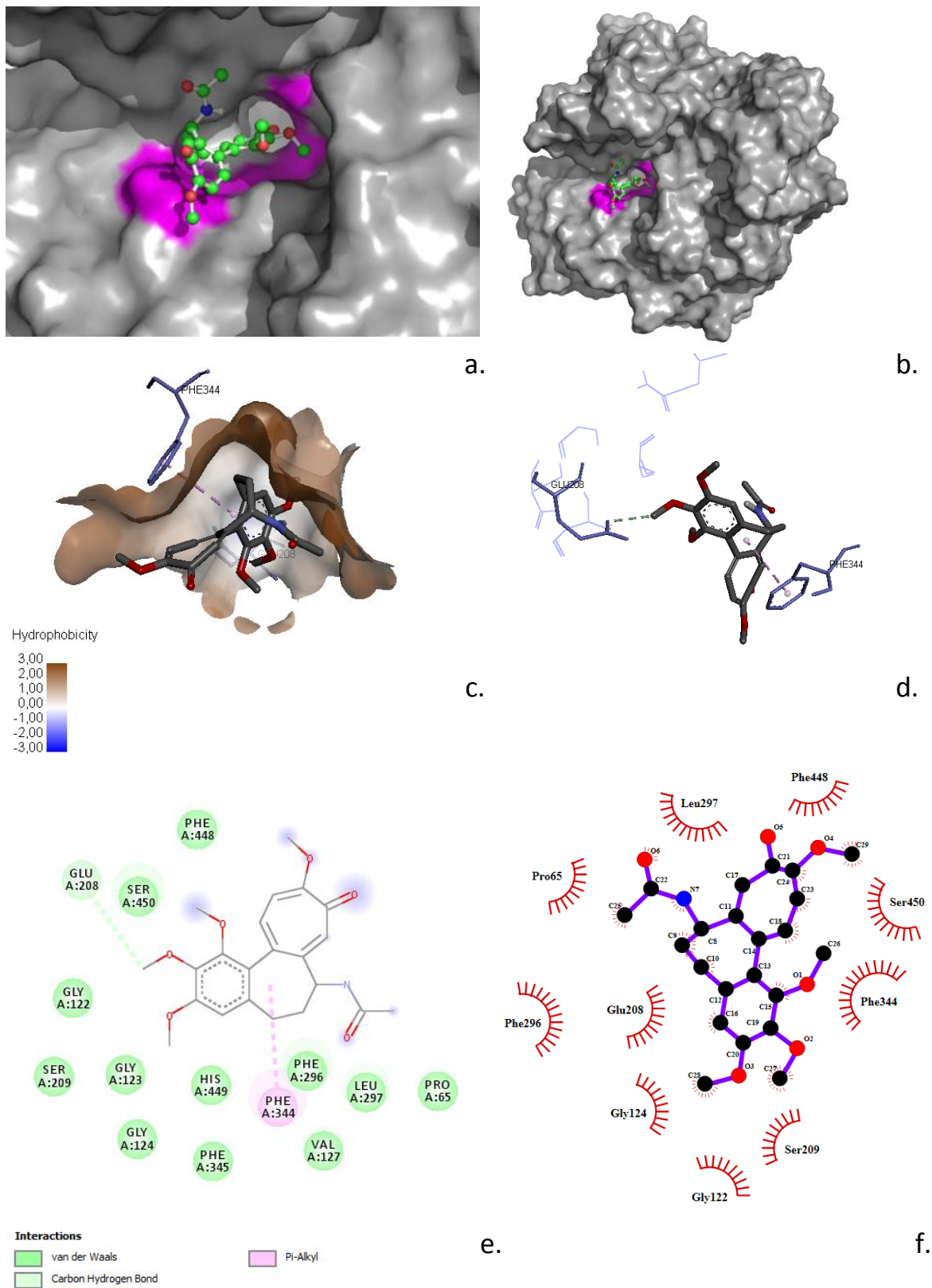


Figure 40. Représentation des interactions 2D et 3D entre la colchicine et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons observé que menthol, interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR par des liaisons hydrogènes avec une valeur de 4,91% et avec His449 de la triade catalytique de la LCR par deux types d'interactions : des liaisons hydrogènes avec une valeur de 7,37% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 60,42%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour la LCR (parce qu'il interagit avec "Ser209, His449" par les deux types d'interactions). Le menthol interagit avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe avec une valeur de 97,66%. Il forme aussi une interaction hydrophobe de type π alkyl avec His449 avec une valeur de 60,42%, π alkyl et π sigma avec Phe344 avec des valeurs de 79,95% et 17,71%, respectivement. Deux distances des liaisons hydrogènes sont mesurées par LigPlot, la première est de 3,04Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle OH du menthol et l'atome d'oxygène du radical de Ser209, la deuxième est de 3,25Å entre l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle OH numéro 3 du menthol et l'hydrogène de NH de Gly124 (Figure 47 « f »). Le groupement CH₃ numéro 7 de menthol interagit avec les acides aminés Phe296, Leu297, Phe344 et Phe345 par des interactions hydrophobes, les distances de ces interactions sont 5,13, 5,15, 4,5 et 4,16Å, respectivement. La distance de l'interaction entre les deux cycles du menthol et du Phe296 est 5,09Å. Le menthol est constitué d'un groupement hydroxylique OH et d'un cycle, ces fonctions sont responsables de la formation de différentes interactions avec les acides aminés de site actif de de l'enzyme LCR.

Nous avons observé que le carvacrol, interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR par une liaison hydrogène avec une valeur de 7,37%, avec His449 de la triade catalytique de la LCR par deux types d'interactions ; des liaisons hydrogènes avec une valeur de 6,63% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 92,08%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour la LCR. Il interagit aussi avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe avec une valeur de 100%. Le carvacrol forme des interactions hydrophobes de type π alkyl et π - π T-shaped avec His449 avec des valeurs de 83,66% et 8,42%, π alkyl, π sigma, π - π T-shaped et π - π staked avec Phe344 avec des valeurs de 79,21%, 34,16%, 22,52% et 21,04%, respectivement. Deux distances des liaisons hydrogènes sont mesurées par LigPlot, la première est 3,33Å entre l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle OH numéro 2 de carvacrol et l'atome d'oxygène du radical de Ser209, la deuxième est 3,35Å entre l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle OH numéro 2 du carvacrol et l'atome de nitrogène de His449 (Figure 48 « f »). Les groupement CH₃ numéro 7, 9 et 10 de carvacrol interagit avec les acides aminés Phe296, Leu297, Phe344, Phe345 et His449

par des interactions hydrophobes, les distances de ces interactions sont de 3,98 à 5,26Å. Le carvacrol est constitué d'un groupement hydroxyle OH et un cycle, ces fonctions sont responsables de la formation des différentes interactions avec les acides aminés du site actif de l'enzyme et les autres acides aminés.

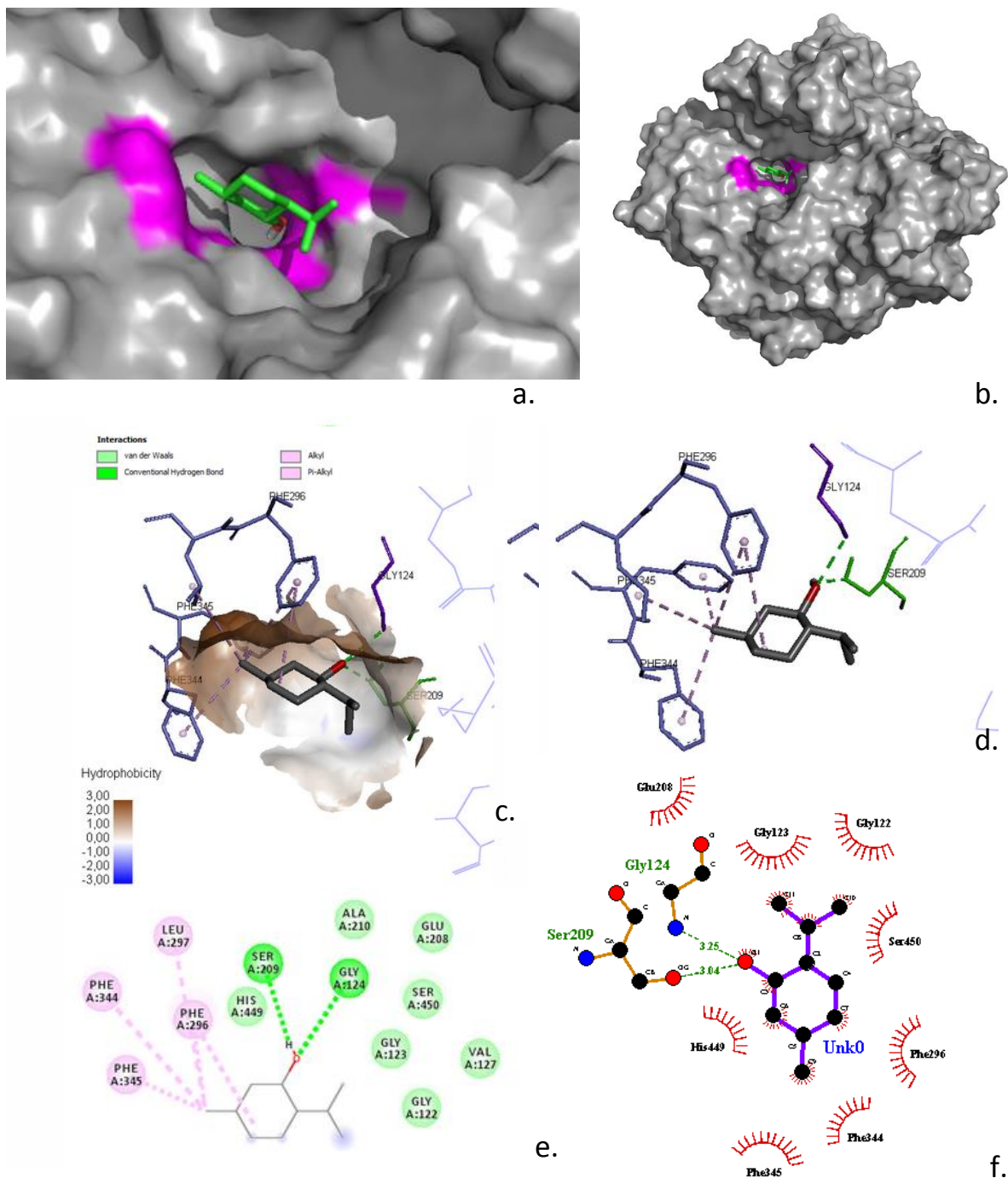


Figure 41 Représentation des interactions 2D et 3D entre Menthol et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

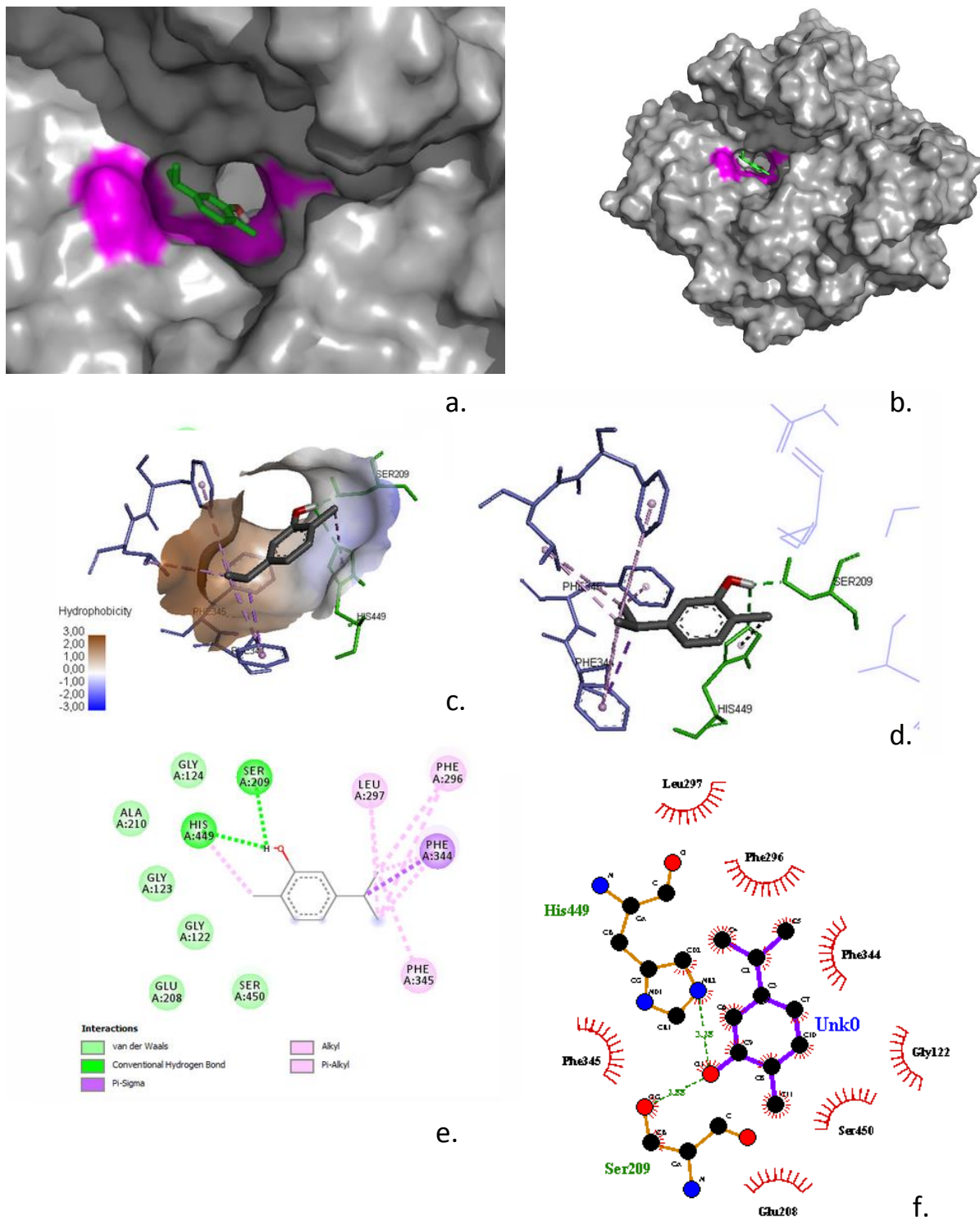


Figure 42. Représentation des interactions 2D et 3D entre Carvacrol et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons noté que l'eugénol interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR et Ser152 de la triade catalytique de la LPA par des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 2,46% et 19,54%, respectivement, et avec His449 de la triade catalytique de la LCR et His263 de la triade catalytique de la LPA par deux types d'interactions ; des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 4,42% et 9,20% et des interactions hydrophobes avec des valeurs de 44,24% et 78,45%, respectivement. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour les deux lipases. L'eugénol interagit avec Phe344 de la LCR par une interaction hydrophobe avec une valeur de 88,49%, et avec Phe77 de la LPA par deux types d'interaction ; des liaisons hydrogènes avec une valeur de 5,46% et des interactions hydrophobes avec des valeurs de 58,62%. L'eugénol forme aussi une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped et π alkyl avec His449 avec des valeurs de 31,65% et 12,59%. En addition, des interactions de type π alkyl, π - π staked, π - π T-shaped et π sigma sont enregistrées avec Phe344 avec des valeurs 59,71%, 16,91%, 9,35% et 2,52%. Deux distances sont mesurées par discovery studio, la première est 2,13Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle OH numéro 2 d'eugénol et l'atome d'oxygène du radical de Ser209, la deuxième est 2,43Å entre l'atome d'oxygène de groupement hydroxyle OH numéro 2 d'eugénol et l'atome d'hydrogène de NH de Gly124 (Figure 49 « f »). Le groupement CH₂ numéro 9 de l'eugénol interagit avec les acides aminés Leu297 et Phe344 par des interactions hydrophobes, les distances de ces interactions sont 4,15 et 4,40Å. Alors que la distance de l'interaction hydrophobe entre le cycle d'eugénol et le cycle de His449 est 4,83Å. Pour la LPA, trois distances sont mesurées par LigPlot, la première est 3,32Å entre l'atome d'hydrogène de l'eugénol et l'atome de nitrogène de l'acide aminé His263, la deuxième est 2,85Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle OH de l'eugénol et l'oxygène du radical OH de Ser152. la troisième est 3,24Å entre l'eugénol et l'acide aminé Phe215. (figure 50 « f »).

Nous avons proposé que le cinnamaldéhyde soit un inhibiteur incompétitif de la LCR car il interagit faiblement avec la triade catalytique, il forme des liaisons hydrogènes avec Ser 209 avec une valeur de 1,72% et il ne forme aucune interaction avec les autres acides aminés du site catalytique comme His449, Gly123 et Gly124. Mais nous avons observé des interactions hydrophobes avec Phe344 avec une valeur de 51,60%. Ce qui confirme qu'il peut inhiber la LCR. En outre, le cinnamaldéhyde forme une interaction hydrophobe de type π - π staked et π - π T-shaped avec Phe344 avec des valeurs 50,12% et 1,47%, respectivement. Une seule distance est mesurée par LigPlot avec une valeur de 2,95Å entre l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle OH numéro 9 de cinnamaldéhyde et l'atome d'hydrogène de NH de Gly124 (Figure

51 « f »). La distance de l'interaction hydrophobe entre le cycle de cinnamaldéhyde et le cycle de Phe344 est de 3,88Å.

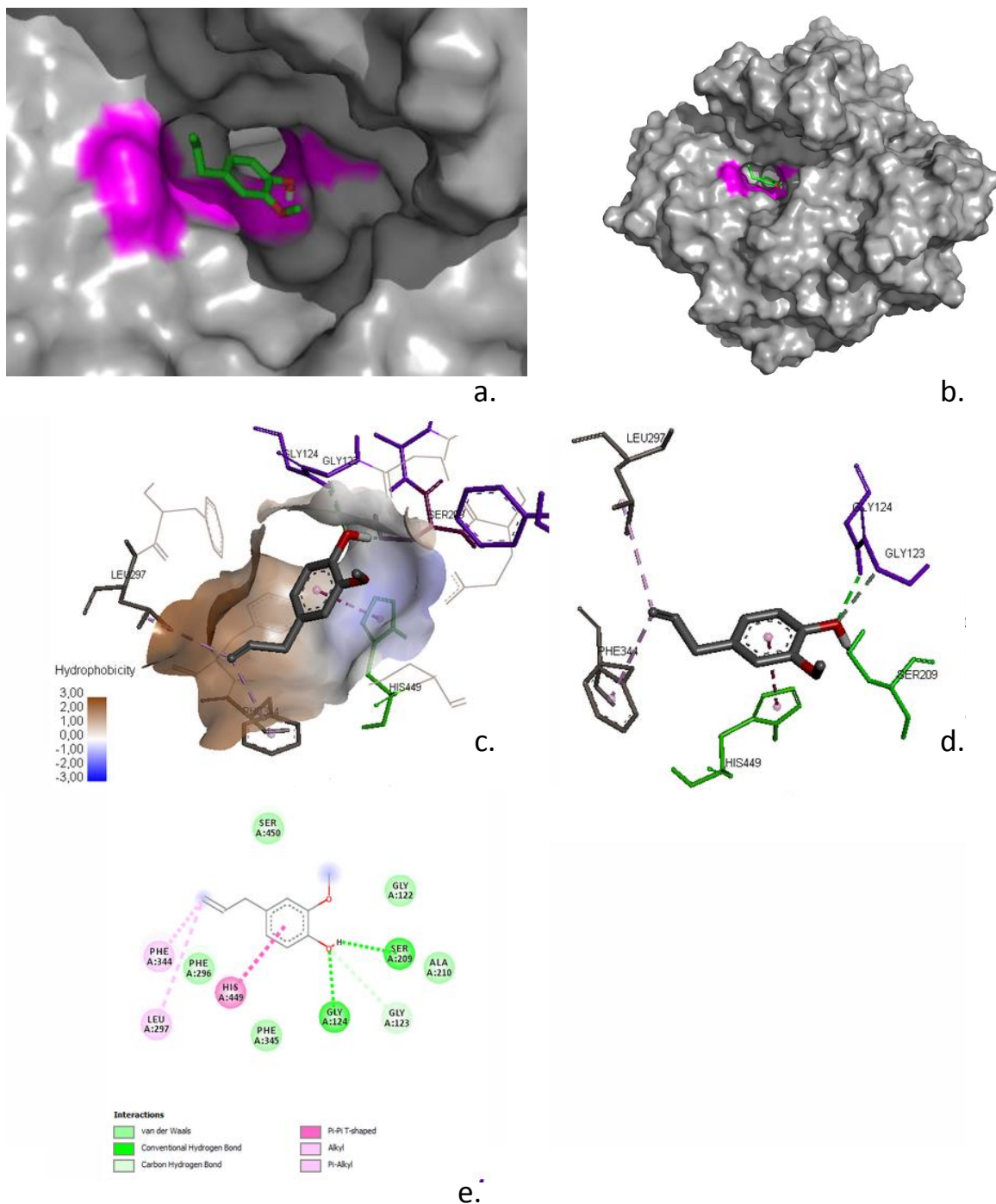


Figure 43. Représentation des interactions 2D et 3D entre Eugénol et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e).

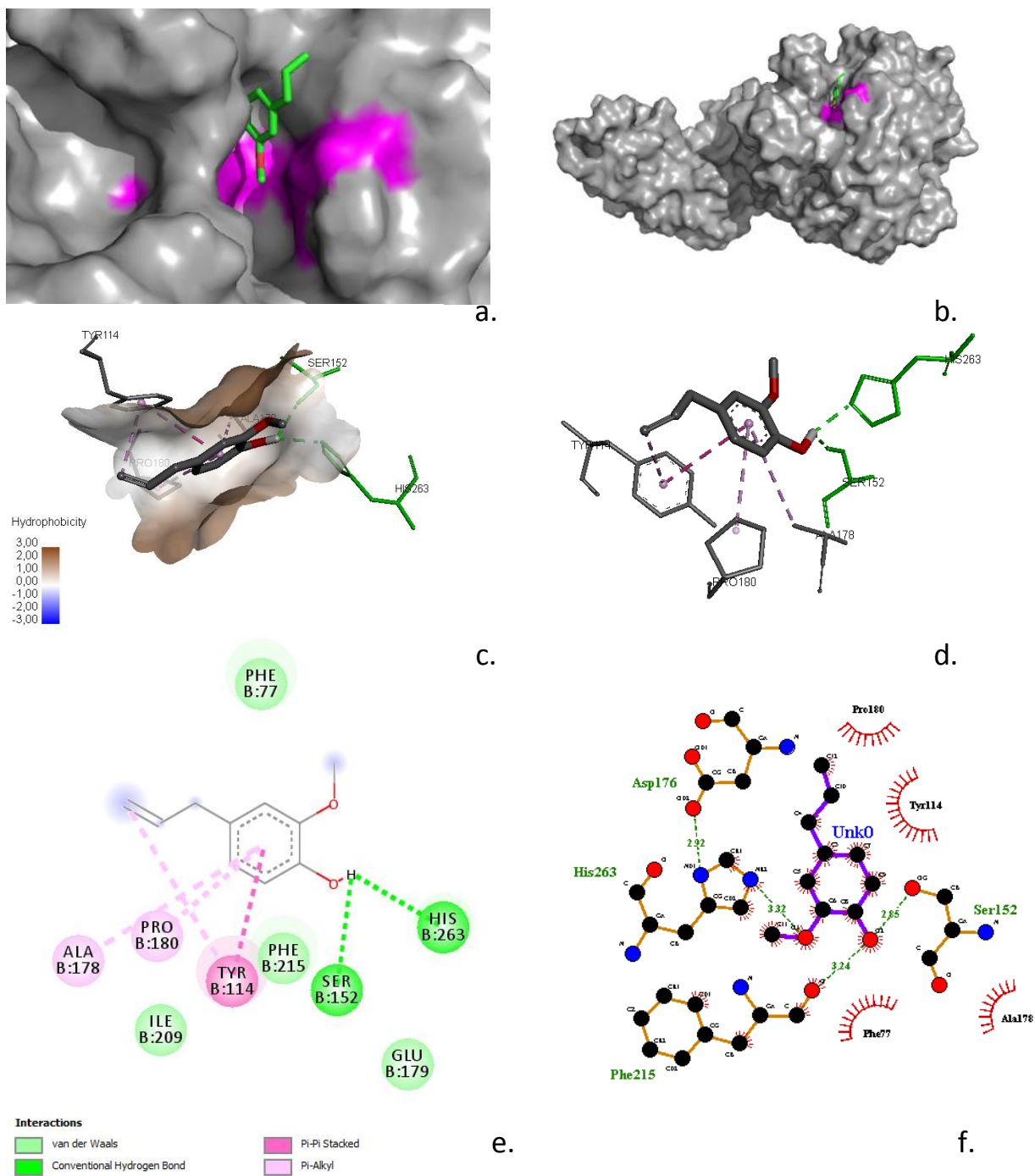


Figure 44. Représentation des interactions 2D et 3D entre Eugénol et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

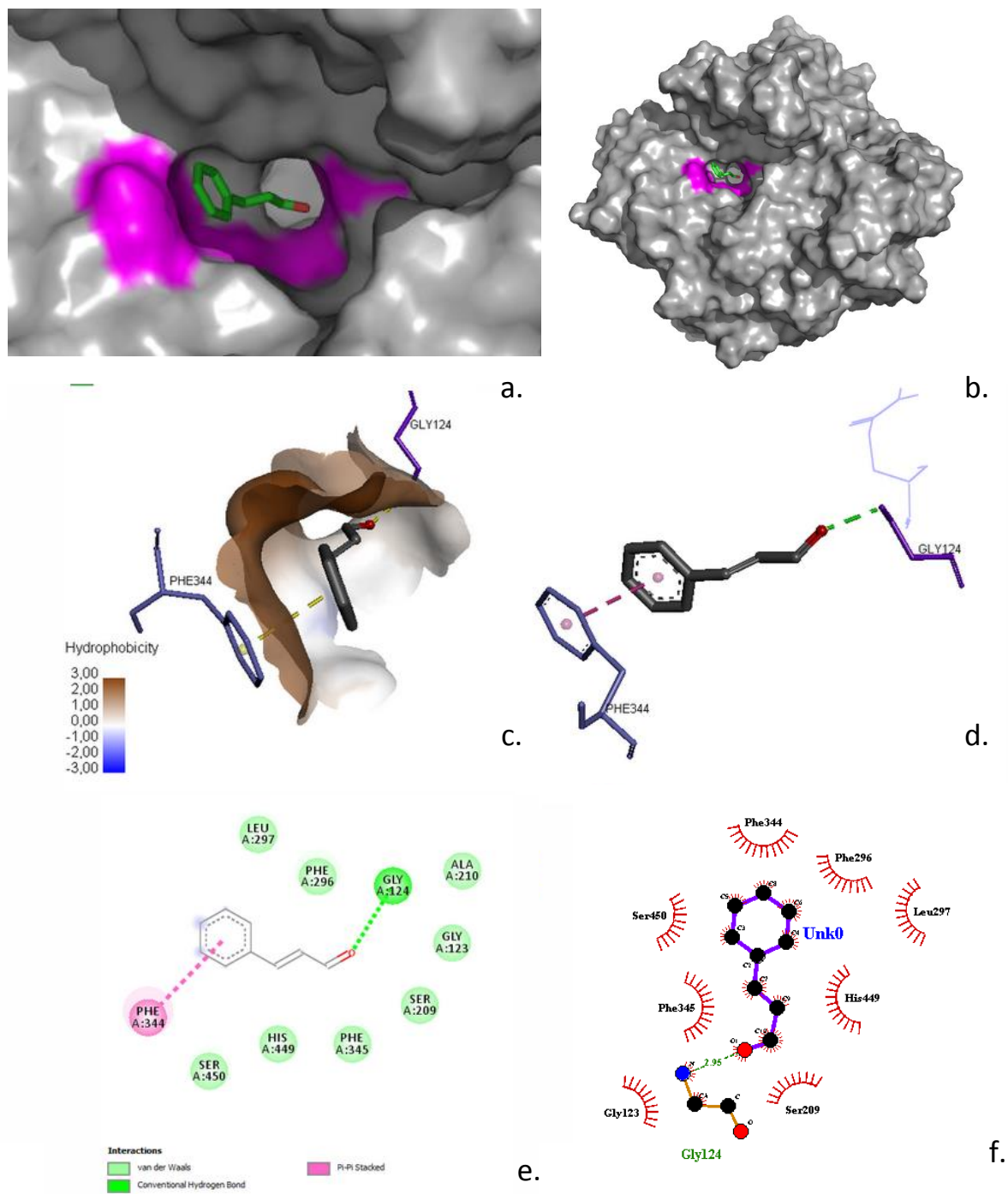


Figure 45. Représentation des interactions 2D et 3D entre Cinnamaldéhyde et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciels PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons observé que l'apéginine (qui est un flavonol, constitué de trois groupements hydroxyles OH, une fonction cétone et trois cycles) interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR par des liaisons hydrogènes avec une valeur de 6,15%, et avec His449 de la triade catalytique de la LCR par deux types d'interactions ; des liaisons hydrogènes avec une valeur de 4,92% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 3,28%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour la LCR en interagissant avec "Ser209, His449" par deux types d'interactions. L'apéginine interagit aussi avec Gly124 de la LCR par liaison hydrogène avec une valeur de 1,23% et avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe avec des valeurs de 6,97%. Il forme une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped avec His449 avec une valeur de 3,28%, π - π stacked et π - π T-shaped avec Phe344 avec des valeurs de 3,89% et 3,07%, respectivement. Deux distances sont mesurées par LigPlot, la première est 3,21Å, cette liaison hydrogène s'établit entre l'atome d'hydrogène numéro 5 de l'apéginine et l'oxygène de radical de l'acide aminé Ser209. La deuxième est 3,26Å entre l'atome d'hydrogène numéro 5 de l'apéginine et le nitrogène de l'acide aminé His449 (figure 52 « f »). Alors que les distances des interactions hydrophobes sont 4,66Å et 5,40Å entre les cycles d'Ile453 et Phe133 et le troisième cycle de l'apéginine.

Nous avons noté que la lutéoline (est un flavonol, constitué de quatre groupements hydroxyles OH, une fonction cétone et trois cycles) interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR par des liaisons hydrogènes avec une valeur de 9,68%, et avec His449 de la triade catalytique de la LCR par deux types d'interactions ; une liaison hydrogène avec une valeur de 8,06% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 3,23%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour la LCR en interagissant avec "Ser209, His449" par deux types d'interactions. Elle interagit aussi avec Gly124 de LCR par liaison hydrogène avec une valeur de 4,03% et avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe avec une valeur de 3,23%. Elle forme une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped avec His449 avec une valeur de 3,23%, π - π T-shaped avec Phe344 avec une valeur de 3,23%. Deux distances sont mesurées par LigPlot, la première est 3,38Å entre l'atome d'hydrogène numéro 5 de lutéoline et l'oxygène du radical de l'acide aminé Ser209. La deuxième est 3,37Å entre l'atome d'hydrogène numéro 5 de l'apéginine et le nitrogène de l'acide aminé His449 (figure 53 « f »). La distance des interactions hydrophobes sont 4,68Å et 5,40Å entre les cycles d'Ile453 et Phe133 et le troisième cycle de lutéoline.

Nous avons enregistré que la quercétine (qui est constitué de cinq groupements hydroxyles OH, une fonction cétone et trois cycles) interagit avec Ser209 de la triade

catalytique de la LCR et Ser152 de la triade catalytique de la LPA, par des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 13,04% et 49,21%, respectivement, avec His449 de la triade catalytique de la LCR et His263 de la triade catalytique de la LPA par deux types d'interactions ; des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 4,89% et 21,43%, et des interactions hydrophobes avec des valeurs de 4,89% et 42,86%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour les deux lipases. Elle interagit aussi avec Gly124 de la LCR par liaison hydrogène avec une valeur de 2,72%, avec Phe344 de la LCR par une interaction hydrophobe avec une valeur de 3,26%. En plus, elle interagit avec Phe77 de la LPA par deux types d'interactions, une liaison hydrogène avec une valeur de 2,03% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 84,13%. Dans la LCR, la quercétine forme une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped avec His449 avec une valeur de 4,89%, π - π T-shaped avec Phe344 avec une valeur de 3,26%. Alors que dans la LPA, elle forme une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped avec His263 avec une valeur de 42,86% et avec Phe77 de type π - π T-shaped et π sigma avec des valeurs de 81,75% et 2,38%.

Pour la LCR, quatre distances des liaisons hydrogènes sont mesurées par LigPlot, la première est 3,05Å entre l'atome d'hydrogène numéro 7 de quercétine et l'oxygène de l'acide aminé His449, la deuxième est 2,93Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle numéro 5' de quercétine et l'atome d'oxygène du radical OH de Ther132. La troisième est 2,97Å entre l'atome d'hydrogène numéro 7 de quercétine et l'oxygène de l'acide aminé Ser450. Tandis que la quatrième est 3,33Å entre l'atome d'oxygène de groupement hydroxyle numéro 5' de quercétine et l'atome d'hydrogène de NH de l'acide aminé Gly129 (figure 54 « f »). La distance de l'interaction hydrophobe est 5,20Å entre les cycles de Phe344 et premier cycle de quercétine, avec 5,24 Å entre le radical CH-(CH₃)₂ de Val127 et le troisième cycle de quercétine.

Pour la LPA, Une seule distance a été mesurée par LigPlot dont sa valeur vaut 3,58Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle numéro 5 de quercétine et l'atome de nitrogène de l'acide aminé His263 (Figure 55 « f »). La distance des interactions hydrophobes sont 4,75 et 4,77 Å entre le cycle de Phe77 et les deux cycles de quercétine.

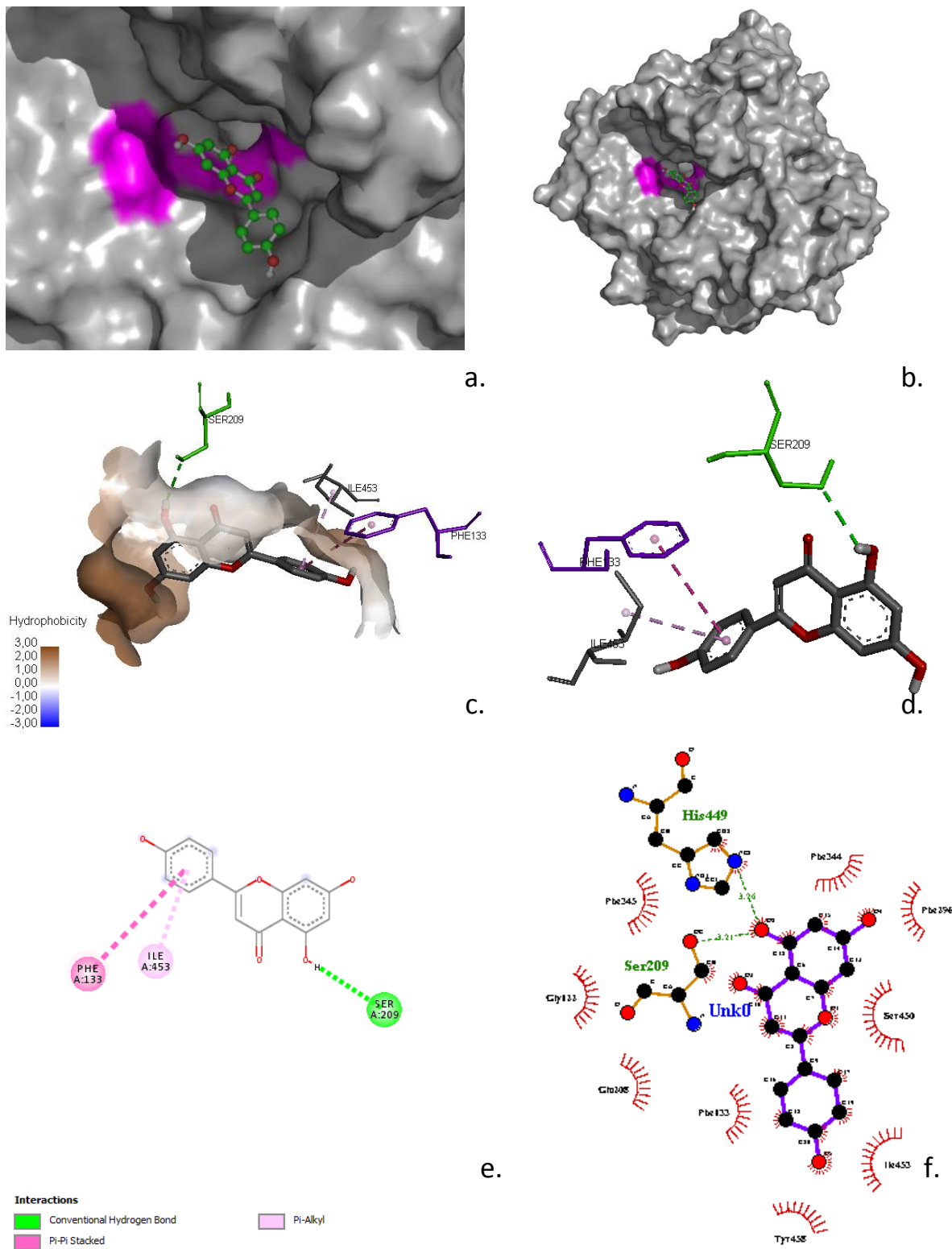


Figure 46. Représentation des interactions 2D et 3D entre Apéginine et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

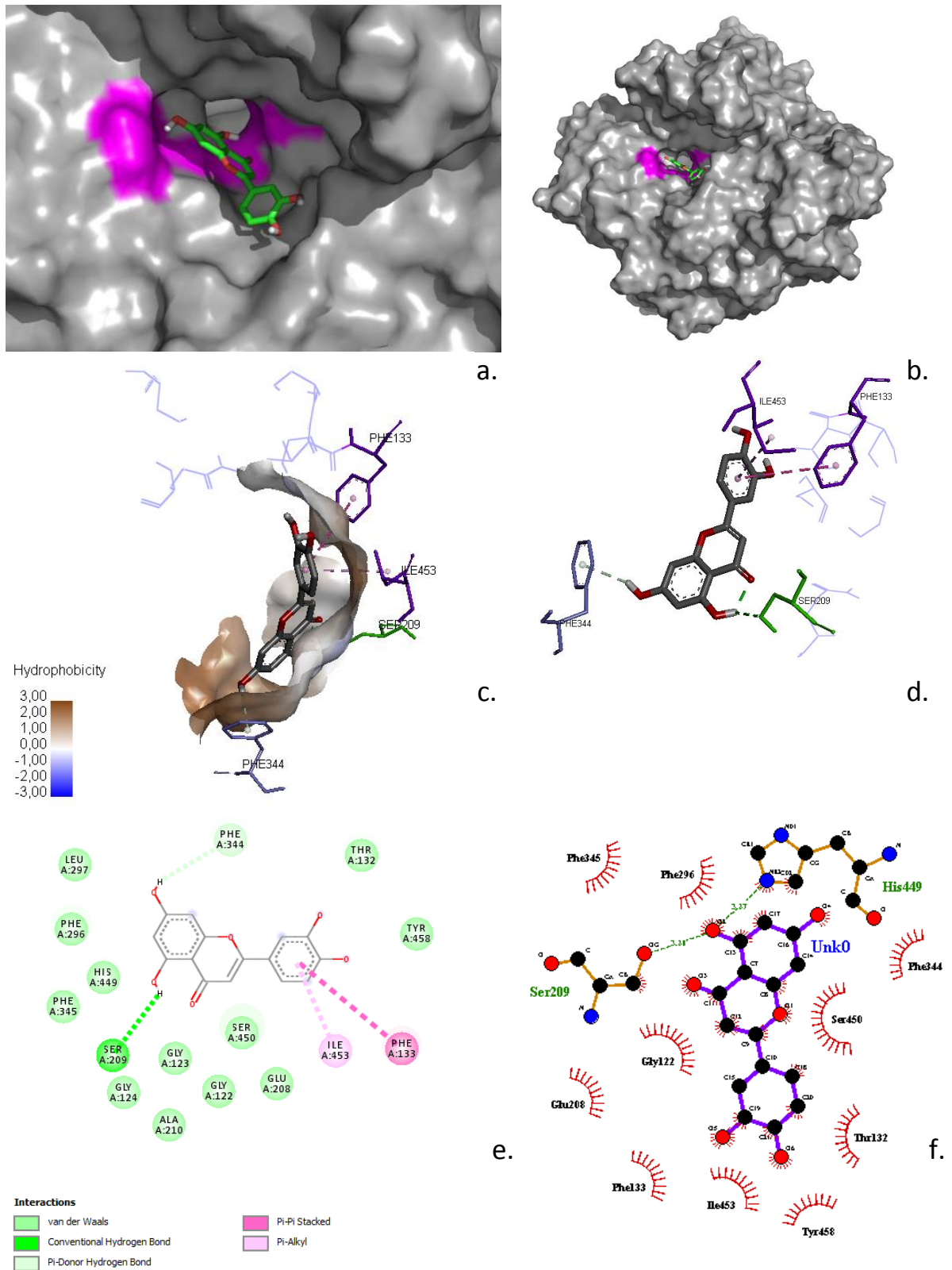


Figure 47 Représentation des interactions 2D et 3D entre Lutéoline et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciels PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

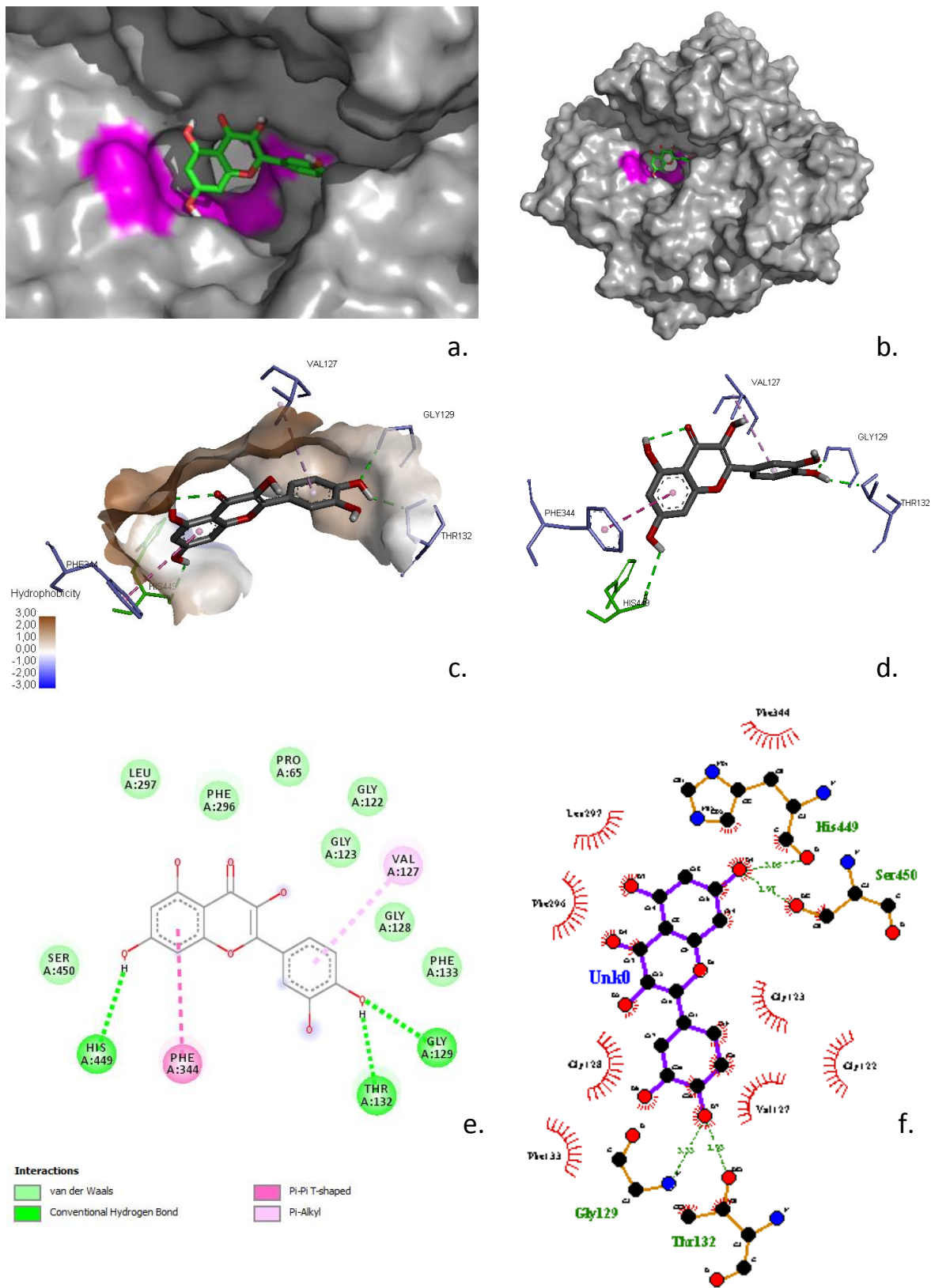


Figure 48 Représentation des interactions 2D et 3D entre Quercétine et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

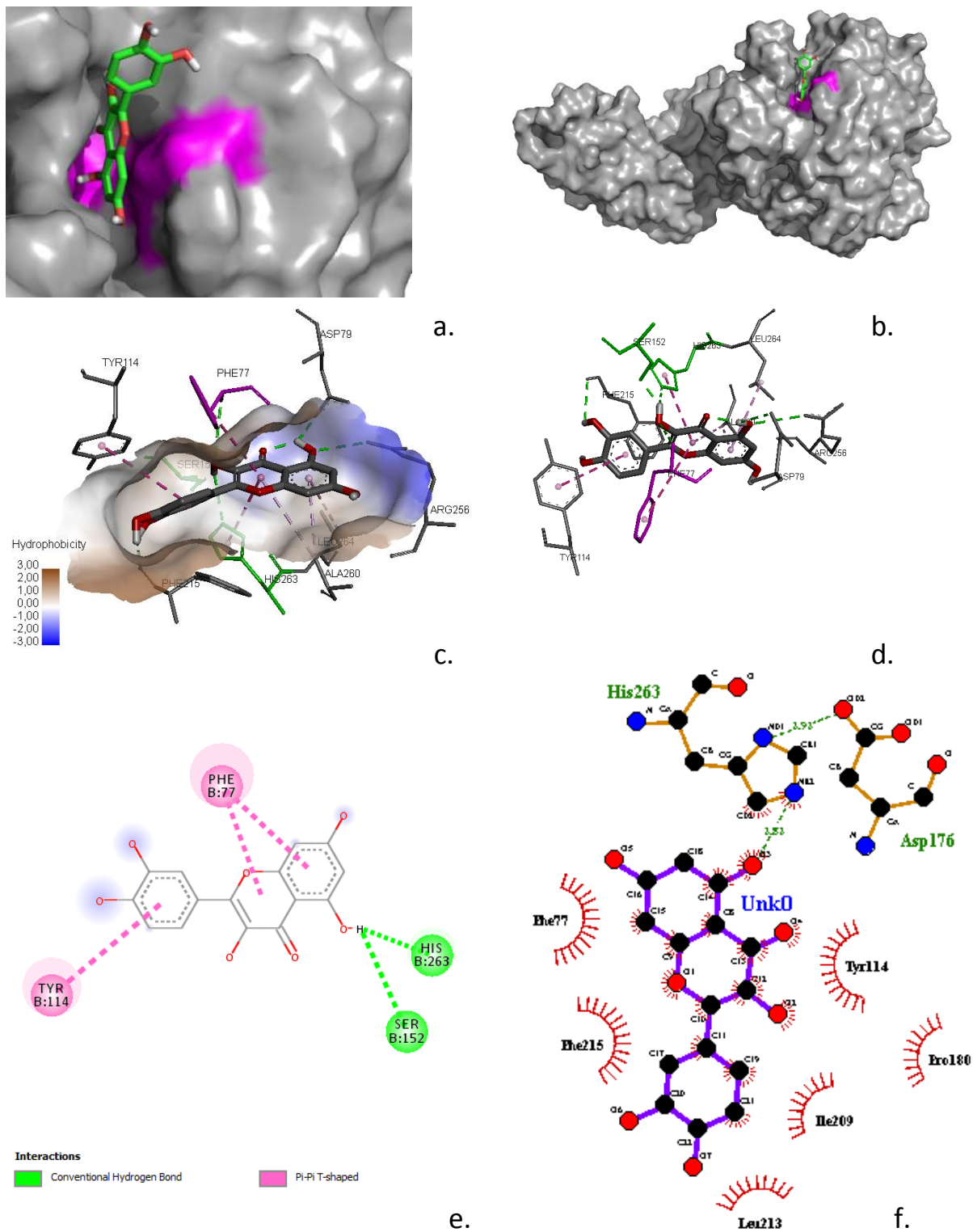


Figure 49 Représentation des interactions 2D et 3D entre Quercétine et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons noté que l'acide ascorbique (constitué quatre groupements hydroxyliques OH, une fonction cétone et un cycle) interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR, il forme des liaisons hydrogènes avec une valeur de 23,75%, et interagit avec His449 de la triade catalytique de LCR par liaisons hydrogène avec une valeur de 6,25%. Nous avons observé que l'acide ascorbique interagit avec Ser152 de la triade catalytique du LPA par une liaison hydrogène avec une valeur de 10,25%, et avec His263 de la triade catalytique du LPA par liaisons hydrogènes avec une valeur de 10,25% . À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur non compétitif pour les deux lipases en interagissant avec un acide aminé "Ser209 ou His449" pour LCR, et "Ser152 ou His263" pour LPA. L'acide ascorbique interagit avec Gly124 par liaison hydrogène avec une valeur de 44,38% et avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe de type π sigma avec des valeurs de 2,5%. Il interagit avec Phe77 de LPA par une liaison hydrogène avec des valeurs de 32,79%.

Pour la LCR, Une seule distance a été mesurée par LigPlot dont sa valeur vaut 2,92 Å entre l'atome d'hydrogène de Ser450 et l'atome d'oxygène du cinquième groupement hydroxylique OH de l'acide ascorbique (Figure 56 « f »).

Pour la LPA, aucune distance n'est enregistrée entre l'acide ascorbique et les acides aminés de la LPA (Figure 57 « f »).

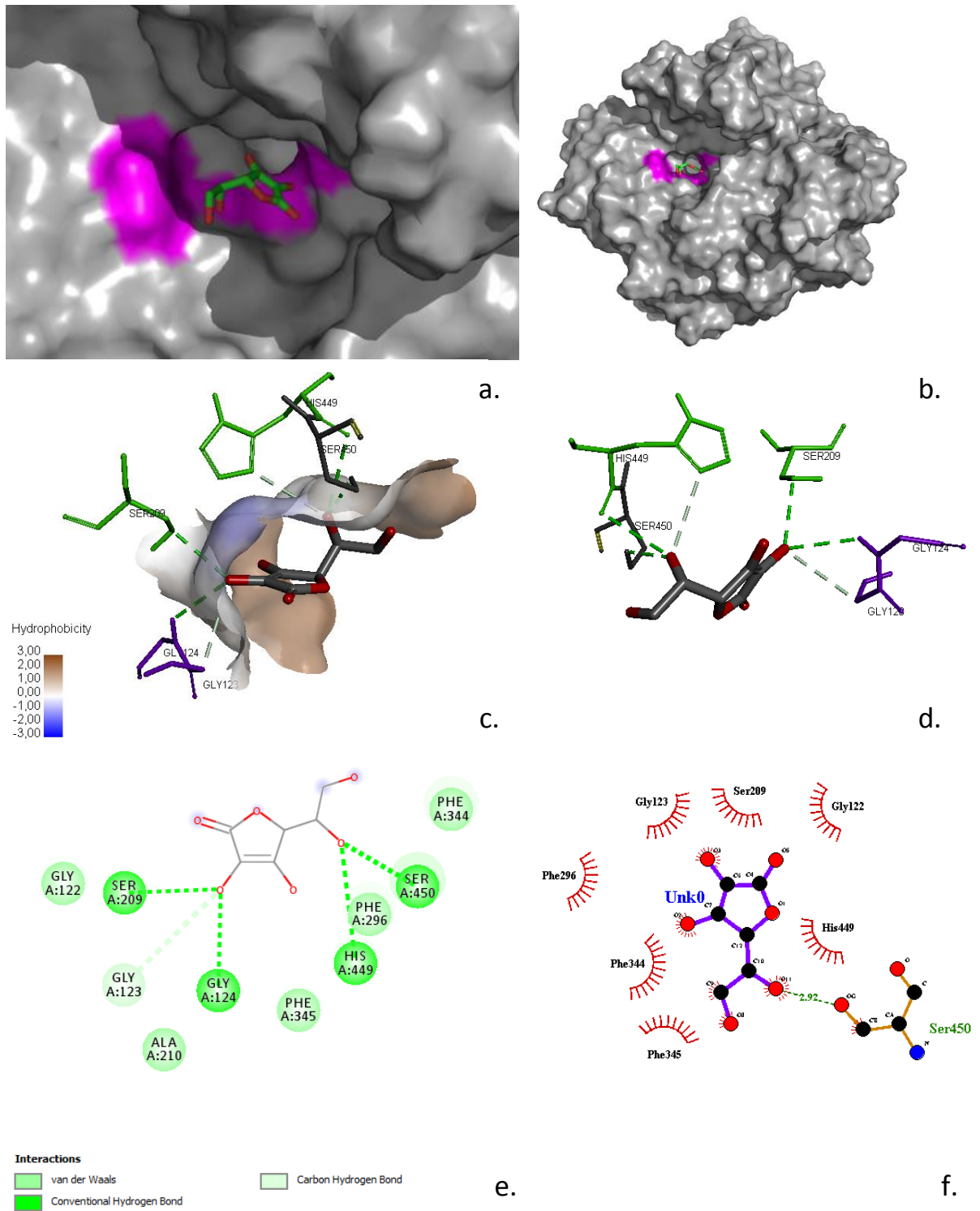


Figure 50 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide ascorbique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

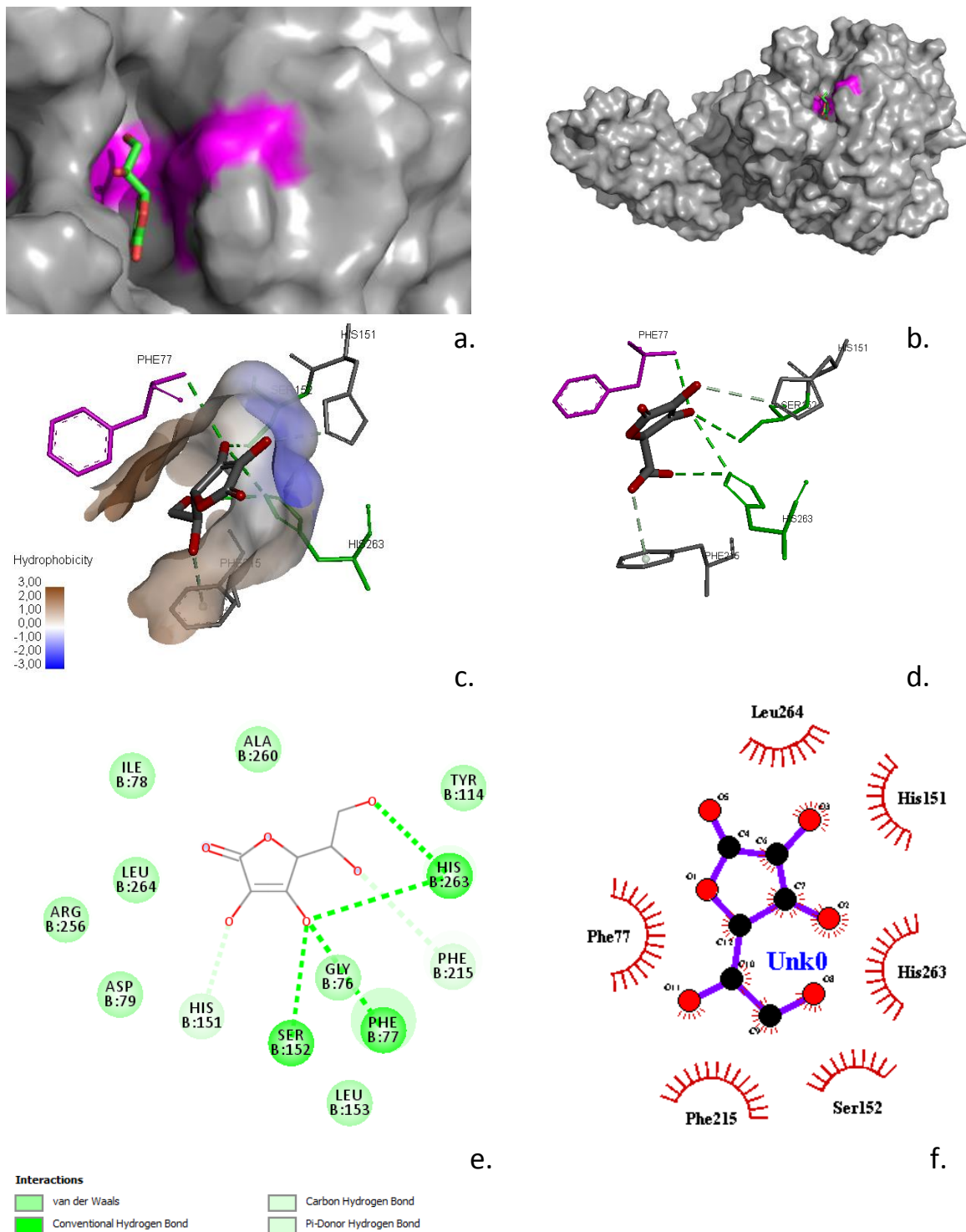


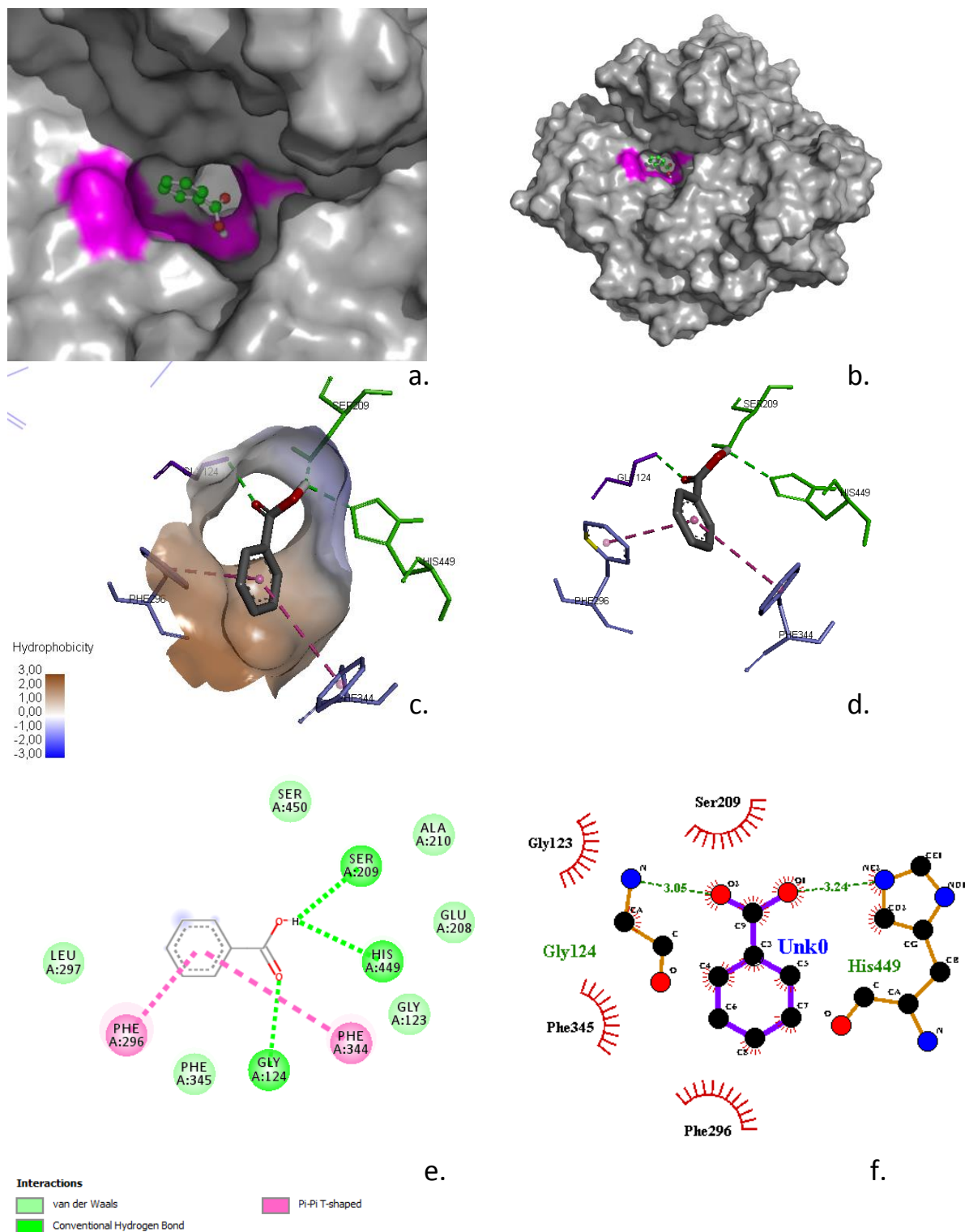
Figure 51 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide ascorbique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons observé que l'acide benzoïque (constitué d'un groupement carboxylique COOH et un cycle) interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR par une liaison hydrogène avec une valeur de 2,89%, et avec His449 de la triade catalytique de la LCR par deux types d'interactions ; des liaisons hydrogènes avec une valeur de 7,58% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 23,10%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour la lipase de LCR en interagissant avec "Ser209, His449" par deux types d'interactions. Il interagit avec Gly124 de LCR par liaison hydrogène avec une valeur de 27,80% et avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe avec une valeur de 57,76%. Il forme aussi une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped et π sigma avec His449 avec des valeurs de 5,42% et 17,69%, π - π stacked et π - π T-shaped avec Phe344 avec des valeurs de 30,69% et 27,08%, respectivement. Avec LigPlot, deux distances sont mesurées, la première est 3.05 Å entre l'atome d'oxygène numéro 7 de l'acide benzoïque et l'atome d'hydrogène de NH de l'acide aminé Gly 124. la deuxième est 3,24Å entre l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle OH numéro 7 de l'acide benzoïque et l'atome de nitrogène de His449 (Figure 58 « f »).

Nous avons noté que l'acide citrique (contient trois fonctions carboxyliques) interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR formant des liaisons hydrogènes avec une valeur de 9,20%, avec His449 formant des liaisons hydrogènes avec une valeur de 16,09%. Nous avons observé que l'acide citrique interagit avec Ser152 de la triade catalytique du LPA par liaison hydrogène avec une valeur de 45,60%, avec His263 de la triade catalytique du LPA par des interactions hydrophobes avec une valeur de 25,27%. Il forme avec Gly124 de LCR une liaison hydrogène avec une valeur de 21,84%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur non compétitif pour les deux lipases en interagissant avec un acide aminé "Ser209 ou His449" pour LCR, et "Ser152 ou His263" pour LPA.

Pour la LCR, quatre distances sont mesurées par LigPlot, la première est 2,89Å entre l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle OH numéro 6 de l'acide citrique et l'hydrogène de groupement hydroxyle de l'acide aminé Ser450, la deuxième est 2,76Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle OH numéro 1 de l'acide citrique et l'atome d'oxygène du radical OH de Ser209, la troisième est 3,19Å entre le groupement hydroxyle OH numéro 6 de l'acide citrique et l'acide aminé His449. La dernière vaut 3,23Å entre groupement hydroxyle OH numéro 1 de l'acide citrique et l'acide aminé His449 (Figure 59 « f »).

Pour la LPA, six distances sont mesurées par LigPlot, la première est 3,04Å entre l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle OH numéro 1 de l'acide citrique et l'hydrogène de NH de l'acide aminé His263, la deuxième est 3,25Å entre l'atome d'hydrogène de NH de l'acide aminé Arg256 et l'atome d'oxygène du cinquième groupement hydroxyle OH de l'acide citrique. la troisième est 2,98 Å entre l'acide citrique et l'acide aminé Phe77. La quatrième est 3Å entre l'acide citrique et l'acide aminé Ser152. La cinquième est 3,44Å entre l'acide citrique et l'acide aminé Phe77. La dernière vaut 3,7Å entre l'acide aminé Asp79 et l'acide citrique (Figure 60 « f »).



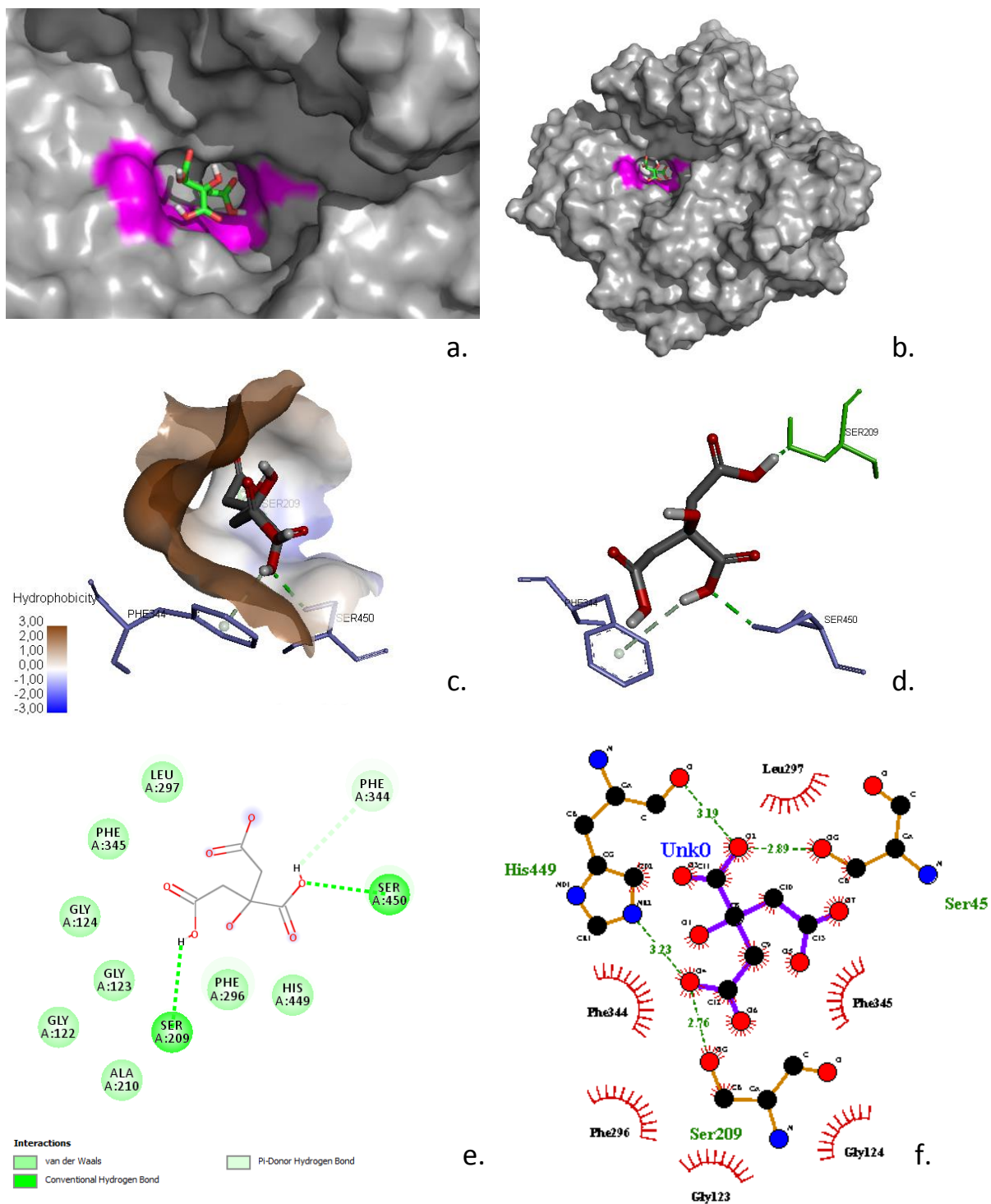


Figure 53 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide citrique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

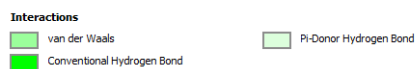
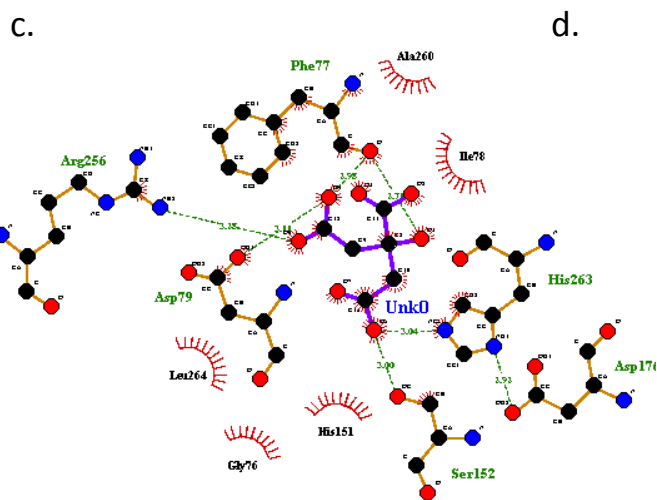
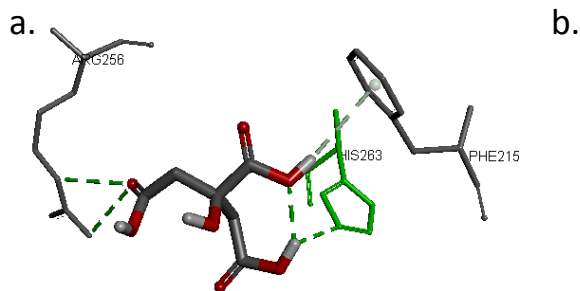
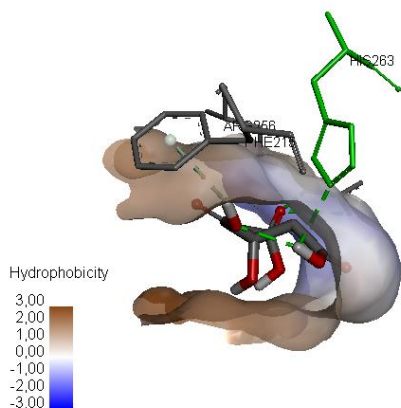
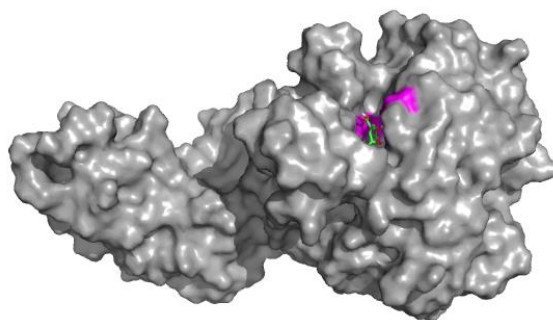
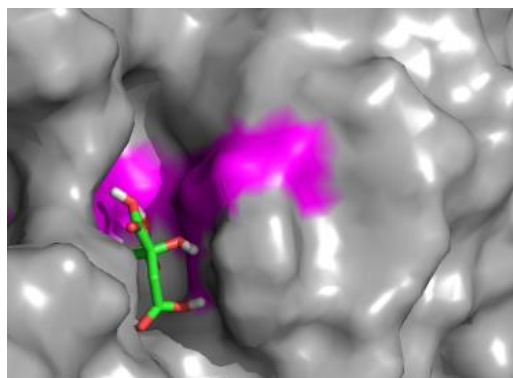


Figure 54 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide citrique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons observé que l'acide gallique (contient trois groupements hydroxyliques OH, une fonction carboxylique et un cycle aromatique) interagit avec Ser209 de la triade catalytique de la LCR et Ser152 de la triade catalytique de LPA par des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 8,27% et 88,49%, respectivement, avec His449 de la triade catalytique de LCR et His263 de la triade catalytique de LPA par deux types d'interactions à savoir des liaisons hydrogènes avec des valeurs de 10,53% et 50% et des interactions hydrophobes de type π - π T-shaped avec des valeurs de 78,20% et 20,92%, respectivement. L'Acide gallique interagit avec Gly124 de LCR par liaison hydrogène avec une valeur de 42,62% et avec Phe344 de LCR par une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped avec une valeur de 0,75%. Il interagit aussi avec Phe77 de LPA par deux type d'interactions, des liaisons hydrogène avec une valeur de 64,29% et des interactions hydrophobes avec une valeur de 27,04%. Il forme une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped et π sigma avec Phe77 de LPA avec des valeurs de 23,47% et 3,57%, respectivement. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur compétitif pour les deux lipases en interagissant avec "Ser209, His449" par deux types d'interactions.

Pour la LCR, deux distances sont mesurées par LigPlot, la première est 2,05 Å entre l'atome d'oxygène de groupement hydroxyle OH numéro 3 de l'acide gallique et l'hydrogène de NH de l'acide aminé Gly124, la deuxième est 2,94 Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle OH numéro 4 de l'acide gallique et l'atome d'oxygène du radical OH de Ser209. La distance de l'interaction hydrophobe de type T-shaped entre le cycle de His449 et le cycle de l'acide gallique est 4,82Å (Figure 61 « f »).

Pour la LPA, trois distances sont mesurées par LigPlot, la première est 3,07Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle OH numéro 7 de l'acide gallique et l'oxygène du radical OH de l'acide aminé Ser152, la deuxième est 3,15Å entre l'atome d'hydrogène de NH de l'acide aminé His263 et l'atome d'oxygène du septième groupement hydroxyle OH de l'acide gallique. La dernière vaut 3,79Å entre l'acide gallique et l'acide aminé Phe77 (Figure 62 « f »). Les distances des interactions hydrophobes entre le cycle de l'acide gallique et les cycles des acides aminés His263, Phe215, Phe77 et le groupement CH₃ de Ala260 sont: 4,48, 5,03, 5,32 et 5,19, respectivement.

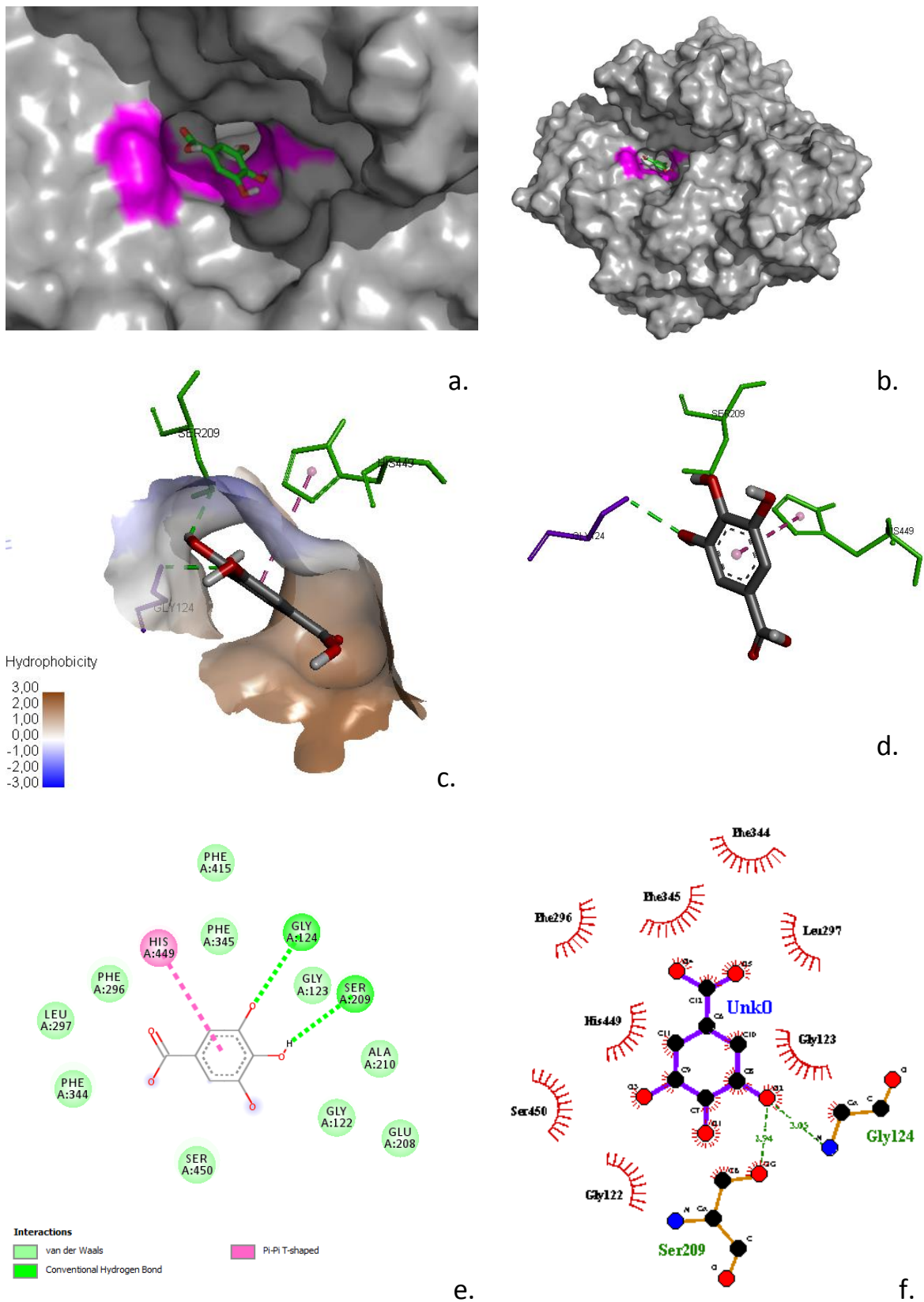


Figure 55 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide gallique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

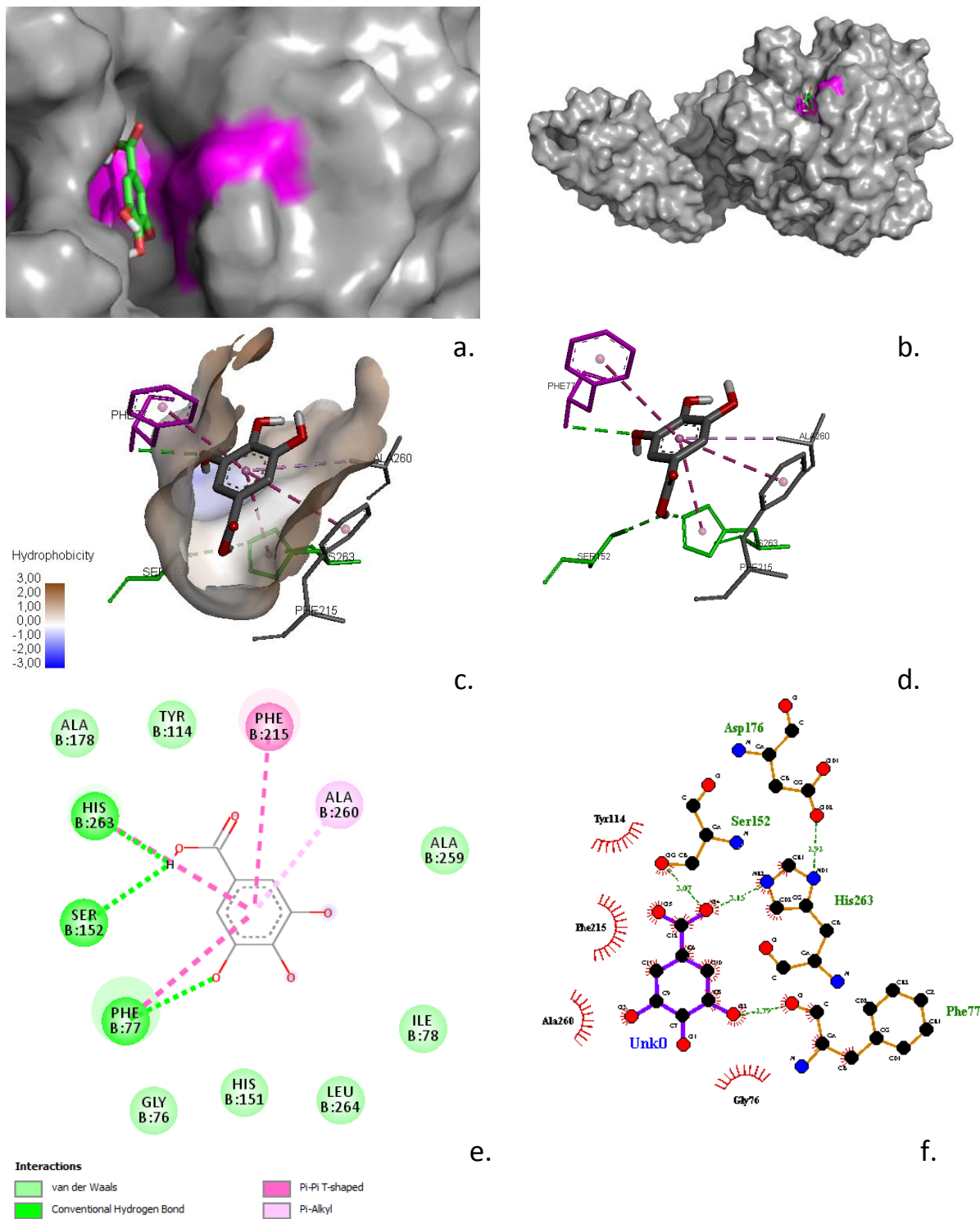


Figure 56 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide gallique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

Nous avons noté que l'acide oxalique a une faible interaction avec LCR, il forme des liaisons hydrogènes avec Ser209 et His449 de la triade catalytique de LCR avec une valeur de 36,84% et 8,77%, respectivement. Nous avons observé que l'acide oxalique interagit avec Ser152 de la triade catalytique du LPA par une liaison hydrogène avec une valeur de 30,29%, et avec His263 de la triade catalytique du LPA par des interactions hydrophobes avec une valeur de 25,29%. À partir de ces résultats, nous proposons que cette molécule soit un inhibiteur non compétitif pour les deux lipases en interagissant avec un acide aminé "Ser209 ou His449" pour LCR, et "Ser152 ou His263" pour LPA, avec un ou deux types d'interactions.

Pour la LCR, deux distances sont mesurées par LigPlot, la première est 2,87 Å entre un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle OH numéro 1 de l'acide oxalique et un atome du radical de l'acide aminé Ser209, la deuxième est 2,88 Å entre l'atome d'hydrogène de groupement hydroxyle OH numéro 2 de l'acide oxalique et l'atome d'hydrogène de SH de Ser209 (Figure 63 « f »).

Pour la LPA, cinq distances sont mesurées par LigPlot, la première est 3,07Å entre l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle OH numéro 1 de l'acide oxalique et l'oxygène de l'acide aminé Phe77, la deuxième est 2,91Å entre l'acide aminé Asp79 et l'acide oxalique. La troisième est 3,11Å entre l'acide aminé Ser152 et l'acide oxalique. La quatrième est 3,31Å entre l'acide aminé Gly76 et l'acide oxalique. La dernière est 3,33Å entre l'atome d'hydrogène de NH de l'acide aminé His151 et l'atome d'oxygène du deuxième groupement hydroxyle OH de l'acide oxalique (Figure 64 « f »).

On conclue de ce chapitre que les molécules inhibitrices étudiées ont un potentiel pouvoir d'inhibition de la lipase, ainsi, leurs effets ont été étudiés dans ce travail pour la première fois. La capacité à inhiber la lipase est due principalement aux cycles et aux atomes d'oxygène dans ces médicaments et molécules testées, qui peuvent former des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes avec les acides aminés du site catalytique Ser et His, et d'autres acides aminés du trou de l'oxyanion. Nos résultats de docking ont été confirmés par une étude expérimentale, ceux-ci garantit que le docking moléculaire est un outil puissant pour la découverte de nouveaux médicaments à partir de bases de données différentes, il peut prédire la structure du complexe ligand-récepteur et prédire le potentiel du ligand à inhiber les enzymes, et les types d'inhibition à partir d'étude des interactions formées entre l'enzyme et les ligands. Mais le docking ne peut jamais remplacer les études expérimentales in vitro ou in vivo, son but

principal est de gagner du temps en scannant les médicaments pour déterminer leur potentiel dans le traitement de nombreuses maladies.

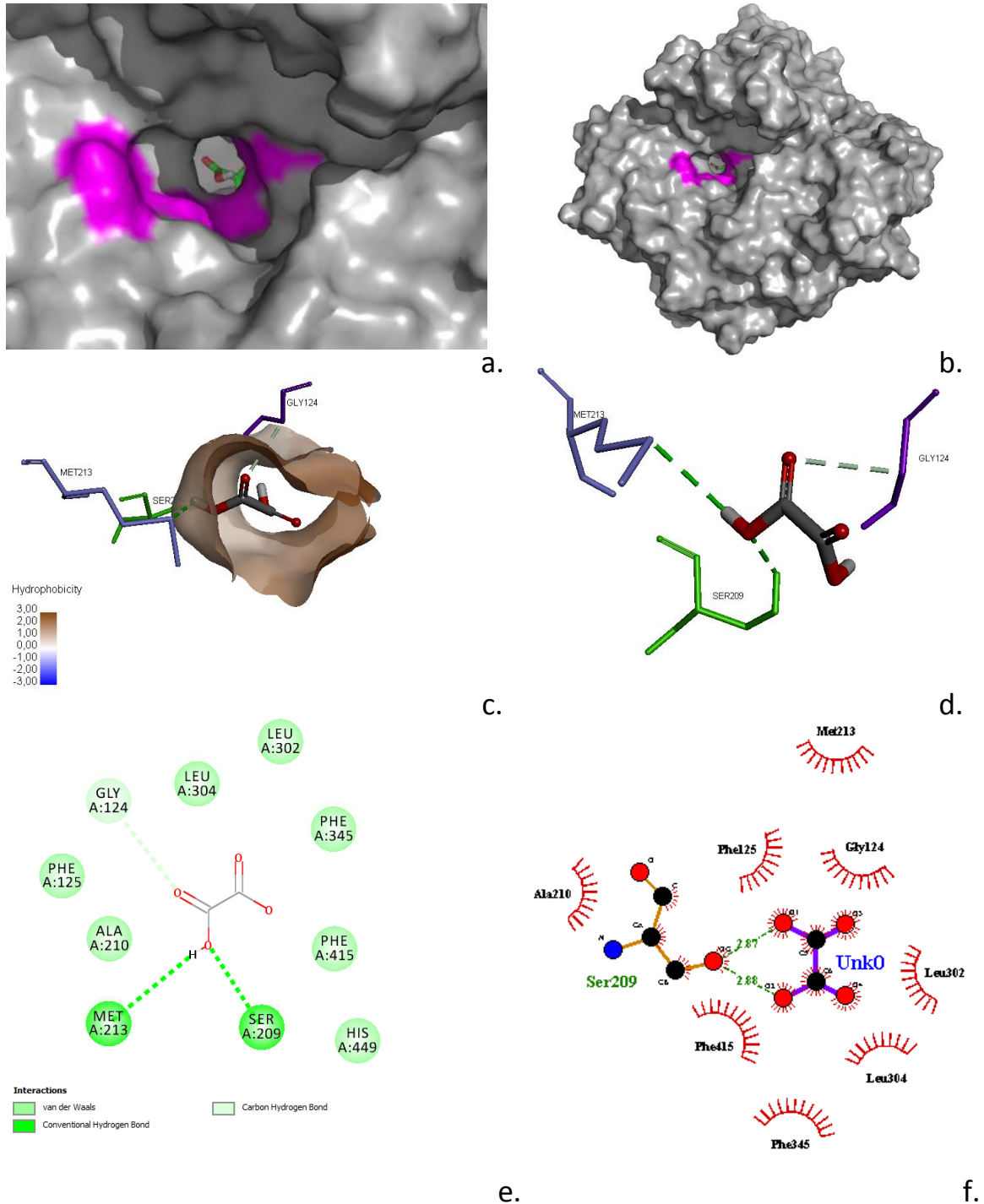


Figure 57 Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide oxalique et les acides aminés du site catalytiques de lipase de *C. rugosa* obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f).

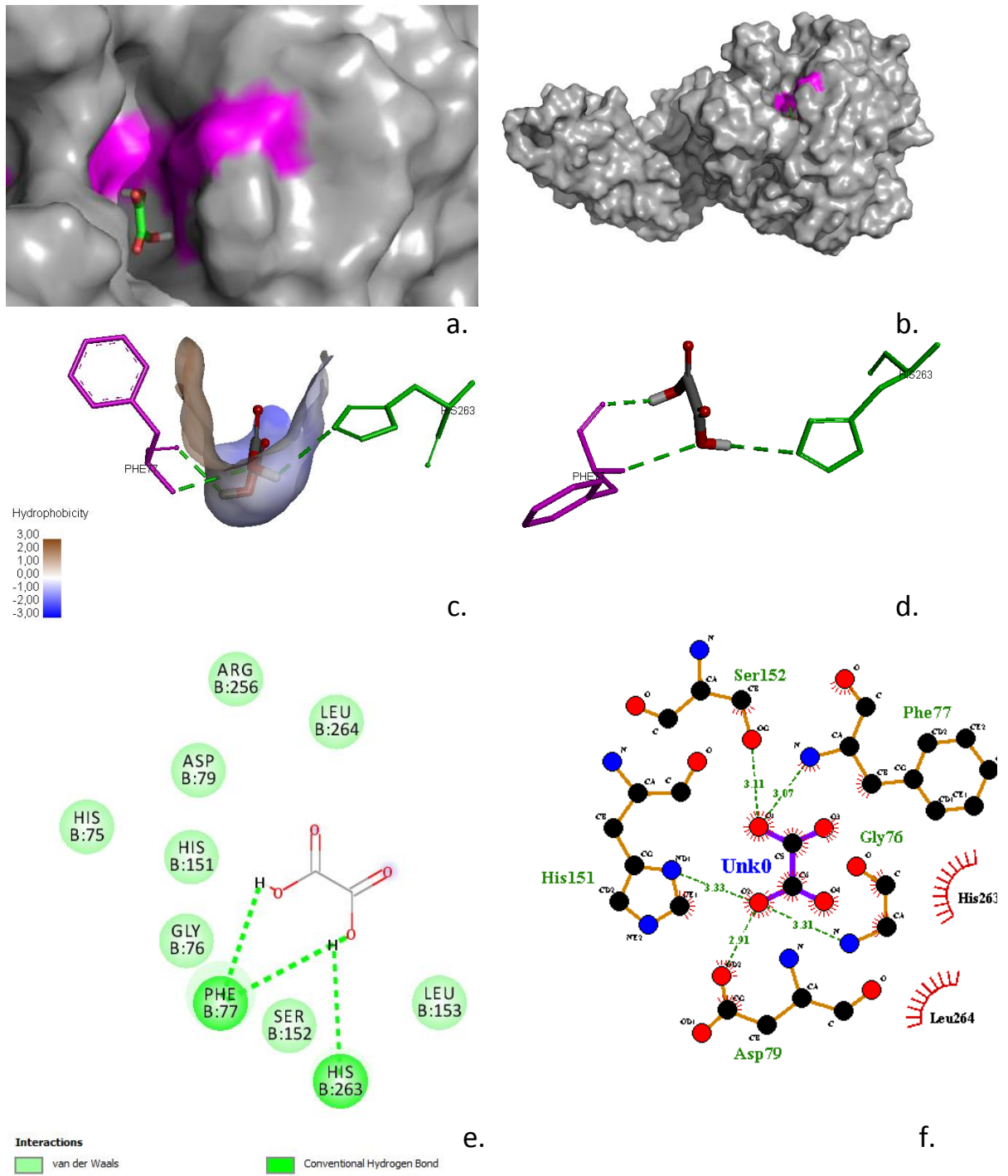


Figure 58 : Représentation des interactions 2D et 3D entre l'acide oxalique et les acides aminés du site catalytiques de la lipase pancréatique humaine obtenue par les logiciel PyMol (les images a et b), Discovery studio (les images c, d et e) et Ligplot (l'image f)

Références Bibliographiques

- Benarous, Khedidja. 2014. Thèse de Doctorat: Etude de l'activité antioxydante et de l'activité inhibitrice des extraits de *Peganum harmala*, *Inonotus hispidus*, *Marrubium vulgare*, *Ziziphus lotus* et *Achillea santolina* sur la lipase de *Candida rugosa*. ALGER: L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE KOUBA.
- Claverie, J. M., Audic, S., Abergel, C., 2013. La bioinformatique : une discipline stratégique, Information Génomique et Structurale - CNRS UMR7256. <http://www.igs.cnrs-mrs.fr/spip.php?article178>
- Graham. P. 2005. Computer in medicinal chemistry. An introduction to medicinal chemistry. pp.326-379. Oxford University Press. Oxford.
- Jinghui Luo. 2009. Experimental and Molecular Docking Studies of Inhibitor Mechanisms for Ribonucleotide reductase
- Lindahl, E. (2008). Molecular Dynamics Simulations. In A. Kukol, Molecular Modeling of Proteins. Humana Press
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 2.2, Noncovalent Bonds. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21726/>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. 1998. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comp Chem* 19: 1639-1662

Conclusion générale

Les plantes médicinales ont une grande importance dans la prévention et le traitement des maladies. On estime le nombre de la variété des espèces médicinales à environ 250 000 à travers le monde. Les humains ont seulement pu utiliser 70 000 espèces médicinales répertoriées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Pourmazaheri 2012). La croissance et les composantes des plantes sont adaptées en fonction de leurs biotopes au sein d'un écosystème. De ce point de vue, nous avons choisi cinq plantes médicinales locales utilisées localement, nous avons essayé d'évaluer la quantité des phénols totaux en adoptant la méthode de Singleton et Ross (1965), les résultats montrent que les plantes étudiées sont relativement riches en ces composés dont les teneurs varient de $0,52 \pm 0,04$ mg/g à $1,87 \pm 0,07$ mg/g dans les fractions d'acétate d'éthyle en équivalent d'acide gallique. De même nous avons évalué la quantité des flavonoïdes par la méthode de Lamaison et Carnat (1991), les résultats montrent que les flavonoïdes dans les extraits phénoliques sont relativement élevés avec des teneurs varient de $0,40 \pm 0,06$ mg/g à $1,40 \pm 0,01$ mg/g dans les fractions d'acétate d'éthyle en équivalent de la quercétine.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet inhibiteur de nos extraits et certaines molécules sur la lipase microbienne, nous avons trouvé que la plupart de ces extraits des plantes et molécules montrent des activités inhibitrices à l'exception de l'extrait de la plante *Ajuga iva* et l'acide caféique. Les valeurs des **IC₅₀** ont montré que l'extrait de *Juniperus phoenicea* possède la meilleure activité inhibitrice avec une valeur de **IC₅₀** égale $1,33 \pm 0,1$ mg/ml. Les autres extraits, les valeurs des **IC₅₀** varient de $2,29 \pm 0,29$ à $2,50 \pm 0,01$ mg/ml.

Suivant les résultats obtenus dans le deuxième chapitre, nous avons essayé d'isoler une molécule active à partir de l'extrait de *Juniperus phoenicea* par la chromatographie sur couche mince préparative et l'identifier en utilisant les techniques spectroscopiques (IR et RMN-¹H). Ainsi, nous avons testé l'inhibition de cette molécule isolée et elle a prouvé sa capacité inhibitrice de la lipase de *Candida rugosa*, mais elle est inférieure à celle de l'orlistat avec un **IC₅₀**= $0,7$ mg/ml. Après la caractérisation et l'identification structurale et en se basant sur plusieurs recherches effectuées, nous pouvons dire que nous avons pu isoler une nouvelle structure appartenant à la classe des eudesmanes (sesquiterpènes), où nous n'avons enregistré aucune étude préalable pour la molécule et l'extrait de l'acétate d'éthyle de la plante.

Dans le quatrième et le dernier chapitre, nous avons réalisé le docking moléculaire avec l'autodock vina, ses résultats nous permettent de proposer que les molécules : acide folique, menthol, carvacrol, eugénol, apéginine, lutéoline, quercétine, acide benzoïque et acide gallique sont des inhibiteurs compétitifs de la lipase, alors que febuxostat, acide ascorbique, acide citrique et acide oxalique sont des inhibiteurs non compétitifs. Les autres molécules : colchicine et cinnamaldéhyde sont des inhibiteurs incompétitifs.

À travers ces résultats obtenus, nous avons effectué une docking moléculaire afin de tester les inhibiteurs de la lipase de *Candida rugosa* sur la lipase pancréatique humaine, et prédire le type d'inhibition pour chaque inhibiteur. Nous avons trouvé une différence importante dans les affinités des inhibiteurs vis-à-vis les deux enzymes.

L'ensemble de ce travail a permis donc de mieux connaître l'intérêt de l'étude des plantes médicinales de la région de Djelfa et les caractéristiques chimiques de certaines de leurs substances d'intérêt bioactif. De même, la modélisation par amarrage moléculaire présente une actualité importante vis-à-vis sa rapidité en la comparant avec les tests *in vitro* ou *in vivo*.

Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les molécules isolées inhibitrices de la lipase nécessitent leurs tests *in vivo* afin d'étudier leurs potentialités comme des futures médicaments.

L'application des médicaments qui sont connus pour traiter certaines maladies dans d'autres activités biologiques à savoir l'inhibition de la lipase, a montré une utilité et une efficacité certaine, ce qui nous amène à profiter de leurs études cliniques et la détermination de leurs effets secondaires, pour les proposer comme médicament pour l'obésité.

Ces extraits ont montré une richesse potentielle en métabolites secondaires, qui n'ont été jamais exploré, ainsi, nous proposons d'autres techniques spectroscopiques pour s'assurer de la nouvelle structure obtenue à travers cette étude, et compléter l'isolement d'autres molécules bioactives de ces extraits. Le docking moléculaire de la molécule isolée est nécessaire après la détermination de son énantiomère afin de comprendre son mécanisme d'inhibition, ainsi les différentes interactions impliquées.