

Activité anti-acétylcholinestérasique *in vitro* de MAÏ-BAO et de sa fraction F₂, une boisson utilisée dans le traitement des maux de cœur et de l'hypertension artérielle, sur l'acétylcholinestérase du cœur de rat

Francis Adou YAPO^{1*}, Antoinette Claire Chayé YAPO-CREZOIT², Alain Dit-Philippe BIDIE¹, Félix Houphouët YAPO¹, Noël David Jonhson TRÉBISSOU¹ et Joseph Allico DJAMAN^{1,3}

¹ Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

² Pôle de biologie de l'immunité, Institut Pasteur, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

³ Département de Biochimie Médicale et Fondamentale Institut Pasteur, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

* Correspondance, courriel : fyapo@yahoo.fr

Résumé

MAÏ-BAO (MB) ou Kombucha est une boisson issue de la fermentation du the *Camela sinensis* sucré par le Champignon The-trésor. L'étude a pour but de montrer l'effet cardionhibiteur et antiacétylcholinestérasique de MB et de sa fraction F₂, le cœur de rat. En effet, la fraction F₂ a été obtenue par chromatographie sur gel sephadex G-50. MB et F₂ ont été utilisés pour perfuser le cœur isolé de rat dont les contractions sont enregistrées avec le dispositif de Langendorff. L'activité anti-acétylcholinestérasique de ces deux substances a été mesurée par dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) extrait du cœur de rat, en présence de l'éthiopropazine, un inhibiteur de la butyrylcholinestérase (BuChE) et réactif d'Ellman contenant le substrat. L'enzyme est préincubée à 38°C pendant 15 min, puis la lecture est faite à 412 nm. Les résultats ont montré que MB et F₂ ont induit une cardiodépression dose dépendante avec des concentrations inhibitrices 50 % (CI50) égale respectivement à 15 mg / kg pc et 5 mg / kg pc. Ces deux substances ont induit une diminution de l'activité catalytique de l'AChE à travers la réduction de ses paramètres cinétiques V_m (MB = 60 % et F₂ = 70 %) et K_m (MB = 58,33 % et F₂ = 38,33 %). Cependant, en présence de l'atropine (Atr 10⁻²mg / kg pc), la vitesse de l'activité anti-acétylcholinestérasique de MB et F₂ a été partiellement ralentie respectivement de 36 % et 52,50 %. En conclusion, la cardioinhibition induite par MB et F₂ est tributaire de l'inhibition de l'activité catalytique de l'acétylcholinestérase qui est plus forte pour F₂ que pour MB. Cependant, l'AChE a une forte affinité pour MB.

Mots-clés : MAÏ-BAO, cardioinhibition, activité antiacétylcholinestérasique, rat.

Abstract

***in vitro* acetylcholinesterase inhibitor activity of MAÏ-BAO and its fraction F₂, a drink used in the treatment of heart ailments and high blood pressure, on the acetylcholinesterase of rat heart**

MAÏ-BAO (MB) or Kombucha is a drink after the fermentation of the *Camela sinensis* sweet by The Mushroom-treasure. The aim of this study To show from cardionhibiteurs effects of MB and its fraction F₂,

their acetylcholinesterase activity of the heart from Wistar rat. The fraction F2 was obtained by gel chromatography with Sephadex G-50. MB and F2 were used to perfuse the heart isolated from rat whose contractions are recorded with the Langendorff device. The action of both substances was measured by assaying the activity of acetylcholinesterase (AChE) isolated rat heart in the presence of ethopropazine, an inhibitor of butyrylcholinesterase (BuChE) and Ellman reagent containing substrate. The enzyme is preincubated at 38° C for 15 min, then the reading is made at 412 nm. The results showed MB and F2 cardiodepression induced a dose dependent with 50 % inhibitory concentrations (IC50) respectively equal to 15 mg / kg body weight and 5 mg / kg bw. Both substances induced a decrease in the catalytic activity of AChE through reducing its kinetic parameters Vm (MB = 60 % and F2 = 70 %) and Km (MB = 58.33 % and F2 = 38.33 %). However, in the presence of atropine (Atr 10-2 mg / kg bw), the speed of the acetylcholinesterase activity of MB and F2 was partially slowed by 36 and 52.50 % respectively. The conclusion : cardioinhibition induced MB and F2 is dependent on the inhibition of the catalytic activity of acetylcholinesterase which is stronger than for F2 for MB. However, AChE has a strong affinity for MB.

Keywords : MAI-BAO, cardioinhibition, acetylcholinesterase inhibitor activity, rat.

1. Introduction

La boisson MAI-BAO (MB) ou Kombucha, est issue de la fermentation du thé sucré de *Camelia sinensis* (L) Kuntze, 1887) par le Champignon Thé-trésor [1]. Selon [2], le champignon est d'origine chinoise. C'est un amas de bactéries acétique et de levures [3 - 5]. Ce sont ces différents micro-organismes qui fermentent le thé sucré à 28° C pour donner une boisson. Ce breuvage est connu sous plusieurs noms à travers le monde que sont MAI-BAO [1], *Kombucha* [6, 7] ou "champignon de longue vie" [8] ou Tea Krass [4]. A cette boisson, plusieurs vertus thérapeutiques sont attribuées dont la guérison des maux de cœur, des troubles coronaires et de l'hypertension artérielle, des troubles respiratoires, des maux chroniques d'estomac et la régulation sanguine [4]. Aussi, lui sont accordées une vertu antibiotique [9, 10] et des propriétés antioxydante [11] et immunomodulatrice [12] hépatoprotectrice [13] et curative [14]. Des études faites par [7] sur le cœur isolé de rat ont montré que kombucha a des propriétés cardiodepressive et cholinergique. Cependant, il est à noter que plusieurs voies peuvent être à l'origine de la cardioinhibition induite par les substances. Il pourrait s'agir soit d'une activation de la pompe Ca²⁺-ATPase du réticulum sarcoplasmique et favorise le recaptage du Ca²⁺ par les SERCAs (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) entraînant donc la relaxation [15, 16]; soit d'une inhibition directe des canaux calciques voltage dépendant [17, 18]. Le mécanisme de l'action cardioinhibitrice de MAI BAO et sa fraction F2 reposant sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), il a été loisible de comparer leurs effets sur l'activité catalytique de cette enzyme.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

Le Champignon Thé-trésor utilisé se présente sous la forme d'une masse gélatineuse abritant levures et bactéries acétiques [3, 19 - 21]. Le matériel animal est essentiellement composé de rats de souches Wistar pesant 250 ± 50 g.

2-2. Méthodes

2-2-1. Préparation de MAÏ-BAO ou Kombucha

Le Champignon Thé-trésor est introduit dans un bocal en verre ou en plastique contenant le thé *Camela sinensis* sucré à la concentration de 90 g de sucre par litre [1]. L'ensemble est incubé à la température de 28°C pendant 12 jours durant lesquels, le champignon fermente le thé sucré [22, 23]. Le thé devient alors aromatisé, acidulé, rafraîchissant avec un goût de citronnelle : c'est le MAÏ-BAO. La boisson ainsi obtenue est centrifugée et lyophilisée pour donner une poudre jaunâtre très hydrophile et qui est conservée à 4°C.

2-2-2. Extraction de la fraction 2 de MAÏ-BAO (F₂)

Une quantité de lyophilisat de MAI-BAO de concentration 800 mg / mL est déposée sur une colonne chromatographique (30 x 3,3 cm) de gel séphadex G-50. L'élution est faite avec de l'eau distillée à raison de 0,05 mm toutes les trois secondes (3 s). Quatre fractions dont la F₂, ont été recueillies et lyophilisées.

2-2-3. Prélèvement du cœur et enregistrement de l'activité du cœur isolé de rat

Les rats utilisés sont anesthésiés par injection intra péritonéale d'éthyle uréthane 20 % à raison de 1 g / kg de PC. Le cœur est ensuite prélevé après une hémisection. Il est fixé rapidement au robinet du dispositif expérimental de Langendorff pour l'enregistrement de l'activité mécanique du cœur en fonction des substances à perfuser.

2-2-4. Extraction de l'ACHÉ

L'extraction de l'ACHÉ a été faite selon la méthode de [24] en utilisant le cœur de rat. Le cœur du rat est rapidement prélevé dans le tampon phosphate mono et disodique 0,5 M à pH 7,8 grâce à une thoracotomie médiane. Il est pesé et on le broyé avec un homogénéiseur (extra-turax T25) à 2 500 trs / min pendant 2 min dans le tampon phosphate à raison de 1 g pour 50 ml de tampon. Le broyat est ensuite centrifugé à 2 500 trs / min pendant une heure dans une centrifugeuse. Le surnageant obtenu constitue la préparation enzymatique.

2-2-4-1. Préparation du substrat de l'ACHÉ

2-2-4-1-1. Préparation des solutions d'ASCh et de DTNB

Le substrat est préparé en dissolvant 0,4 g d'iodure d'acétylthiocholine (ASCh) dans 100 mL d'eau distillée. Cette solution est conservée à 4°C pendant une semaine au plus. Quant à la solution de DTNB est obtenue par dissolution de 0,4 g de ce produit dans 100 mL de tampon phosphate 0,5 M à pH 7,8 dilué au 1 / 5^e. On obtient alors une solution de DTNB de concentration égale à 0,01 M. Elle est aussi conservée à 4°C.

2-2-4-1-2. Préparation du réactif d'Ellman

Le réactif d'Ellman est préparé extemporanément. Il est un mélange de 100 µL de la solution de DTNB (0,01 M), 100 µL de la solution d'iodure d'acétylthiocholine (0,014 M), 20 µL de tampon phosphate (0,5 M) à pH 7,8 et 780 µL d'eau distillée. Ce mélange conduit à un volume final de 1000 µL contenant 0,0014 M d'acétylthiocholine qui est le substrat de l'ACHÉ.

2-2-4-2. Dosage de l'activité de l'AChE

Pour l'étude de l'action de MAI-BAO à 15 mg / mL, de F₂ à 5 mg / mL et de l'atropine à 10⁻² mg / mL sur l'activité catalytique de l'AChE, le milieu réactionnel est constitué de 900 µL de tampon phosphate 0,5 M à pH = 7 ainsi que 100 µL de M-B ou F₂ ou Atr préparé dans du tampon et de 75 µL de la solution enzymatique. Après préincubation à 38°C, on ajoute 50 µL de réactif d'Ellman au milieu réactionnel. Le mélange est ensuite homogénéisé et incubé à 38°C pendant 15 min. La lecture est faite à 412 nm et l'absorbance est déterminée en fonction de l'intensité de la coloration jaune.

2-2-5. Méthode d'analyse statistique

Le logiciel GraphPad.Prism.V5.01 a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Les données ont été analysées avec ANOVA One-Way et non paramétrique. Le test de comparaison multiple de Tukey a été utilisé pour la comparaison de la variance entre les moyennes de MAI-BAO, F₂ et Atr aussi bien au niveau des contractions cardiaques que sur l'activité de l'AChE. La différence entre deux variances était significative si $p < 0,05$.

3. Résultats

3-1. Effets sur l'activité mécanique des contractions cardiaques

3-1-1. Effets sur l'amplitude des contractions

Selon la **Figure 1**, Les deux produits (M-B et F₂) entraînent une diminution progressive de l'amplitude des contractions cardiaques dans l'intervalle de concentrations de 10⁻⁴ mg / mL à 15 mg / mL. Cependant, l'effet inotrope négatif induit par F₂ est significativement plus fort ($p < 0,001$) que celle de M-B avec des CI₅₀ respectives de 5 ± 0,86 mg / mL et 15 ± 2,01 mg / mL.

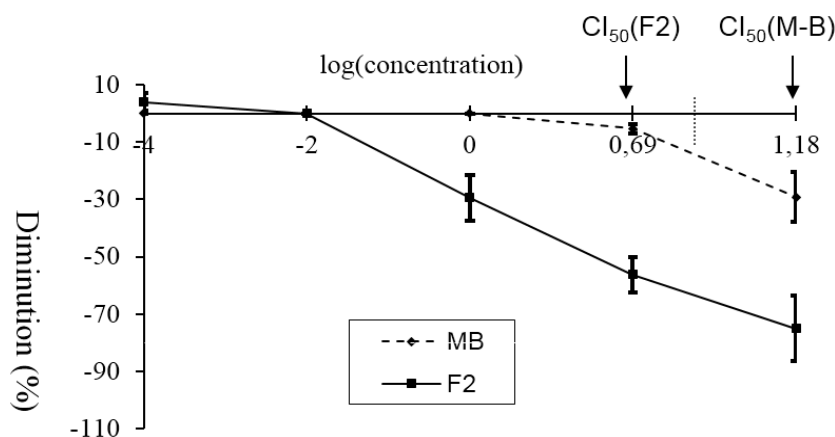


Figure 1 : Comparaison des effets F₂ et M-B sur l'amplitude des contractions du cœur isolé de rat
Nombre de rats utilisés $n = 5$

3-1-2. Effet sur la fréquence des contractions

Les deux produits (M-B et F₂) ont induit un effet chronotrope négatif dans l'intervalle de concentrations 10⁻⁴ mg / mL à 15 mg / mL (**Figure 2**). Cependant, la diminution de la fréquence cardiaque induite par F₂ reste constante à partir de 1 mg / mL. La diminution induite par F₂ est non significative par rapport à celle induite par MB.

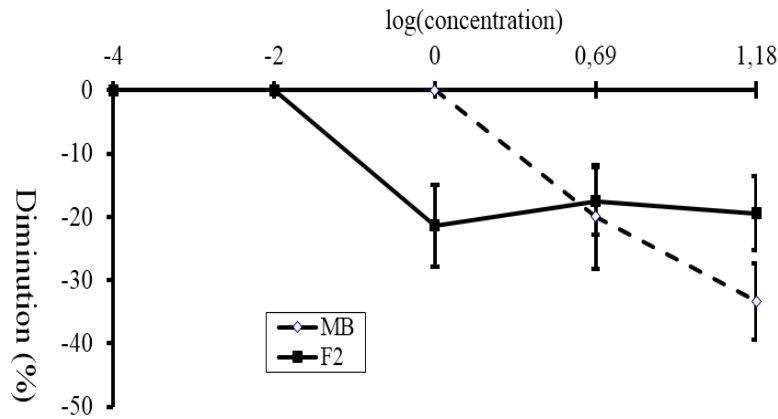


Figure 2 : Comparaison des effets F2 et M-B sur la fréquence des contractions du cœur isolé de rat
Nombre de rats utilisés $n = 5$

3-2. Influence de M-B et de F₂ sur l'activité de l'AChE

Selon la **Figure 3**, MAÏ-BAO et F₂ ont inhibé l'activité catalytique de l'AChE. En effet, au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de M-B et F₂ (de 10⁻² à 50 mg / mL), l'activité enzymatique a diminué significativement ($p < 0,0001$) respectivement de $84,00 \pm 13,23$ % à $27,00 \pm 4,02$ % pour M-B et de $62,00 \pm 12,14$ % à $12,00 \pm 6,20$ % pour F₂ (**Figure 3**).

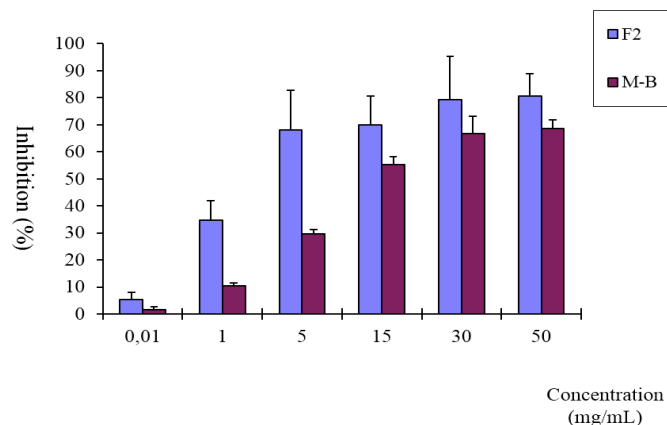


Figure 3 : Pourcentage d'inhibition de l'AChE en fonction des concentrations de M-B et F2
Nombre d'essais $n = 3$

3-3. Influence de MAÏ-BAO (15 mg / mL), de F₂ (5 mg / mL) et de l'atropine (10⁻² mg / mL) sur l'activité de l'AChE

3-3-1. Action de M-B (15 mg / mL) sur l'activité de l'AChE

En présence de M-B (15 mg / mL) la vitesse de catalyse de l'enzyme a été diminuée (**Figure 4**). Donc, M-B exerce une action inhibitrice sur l'AChE. En effet, la représentation de Lineweaver et Burk (**Figure 5**) a permis de constater que M-B fait varier à la fois V_m de l'AChE de $0,40 \pm 0,01$ à $0,16 \pm 0,02$ $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$; soit une diminution significative ($p < 0,0001$) de 60,00 % et la K_m de $0,60 \pm 0,03$ à $0,25 \pm 0,07$ nM; soit une diminution significative ($p < 0,0001$) de 58,33 % (**Tableau**). M-B exerce donc sur l'AChE une inhibition non compétitive mixte.

3-3-2. Action de F_2 (5 mg / mL) sur l'activité de l'AChE

La fraction F_2 a inhibé aussi l'AChE en diminuant son activité catalytique (**Figure 4**). Par ailleurs, selon la représentation de la **Figure 5**, F_2 a diminué la V_m de l'ACh de $0,40 \pm 0,01$ à $0,12 \pm 0,03 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$; soit une diminution significative ($p < 0,0001$) de 70,00 % (**Tableau**). La constante d'affinité de l'AChE a également diminué de $0,60 \pm 0,03$ à $0,37 \pm 0,01 \text{ nM}$; soit une diminution significative ($p < 0,0001$) de 38,33 % (**Tableau**). La fraction F_2 exerce une inhibition non compétitive mixte sur l'AChE.

3-3-3. Action de l'Atropine 10^2 mg / mL sur l'activité de l'AChE

Selon la représentation de Mickaelis-Menten (**Figure 4**), l'Atr a augmenté l'activité catalytique de l'AChE. Ainsi, selon la **Figure 5**, l'Atr augmente significativement ($p < 0,0001$) la vitesse de catalyse de l'AChE en faisant passer V_m de $0,40 \pm 0,01$ à $0,56 \pm 0,05 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$ tout en maintenant la K_m intacte (**Tableau**). Par conséquent, l'Atr exerce une activation sur l'AChE.

3-3-4. Influence de l'interaction M-B - Atr et F_2 - Atr sur l'activité de l'AChE

3-3-4-1. Action de M-B (15 mg / mL) + Atr (10^2 mg / mL)

La **Figure 4** montre que le mélange MB - Atr a inhibé l'activité catalytique de l'AChE. Cette inhibition a entraîné une diminution significative ($p < 0,0001$) de 37,50 % de la V_m de l'AChE en passant de $0,40 \pm 0,01$ à $0,25 \pm 0,03 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$. L'Atr a donc levé partiellement l'inhibition induite par M-B sur l'AChE de 36 % (**Figure 5**). Quant au K_m , il passe de $0,25 \pm 0,07$ à $0,27 \pm 0,04 \text{ nM}$. Soit une augmentation non significative de 07,40 % (**Tableau**). Le mélange MAÏ-BAO-Atr a exercé une inhibition incompétitive sur l'enzyme.

3-3-4-2. Action de F_2 (5 mg / mL) + Atr (10^2 mg / mL)

Le mélange F_2 (5 mg / mL) + Atr (10^2 mg / mL) a inhibé l'activité de l'enzyme (**Figure 4**). En effet, la V_m de l'AChE induite par F_2 (5 mg / mL) a diminué de façon non significative de 36,84 % en passant de $0,19 \pm 0,03$ à $0,12 \pm 0,03 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$. Cependant, la K_m a augmenté de façon non significative de 07,50 % passant de $0,37 \pm 0,01$ à $0,40 \pm 0,02 \text{ nM}$ (**Tableau**).

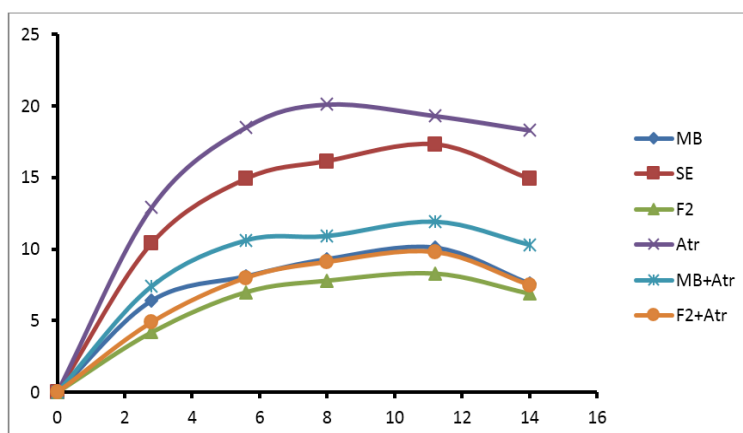


Figure 4 : Influence des solutions pharmacologiques sur l'AChE selon la représentation Mikaelis-Menten
Nombre d'essais : $n = 3$

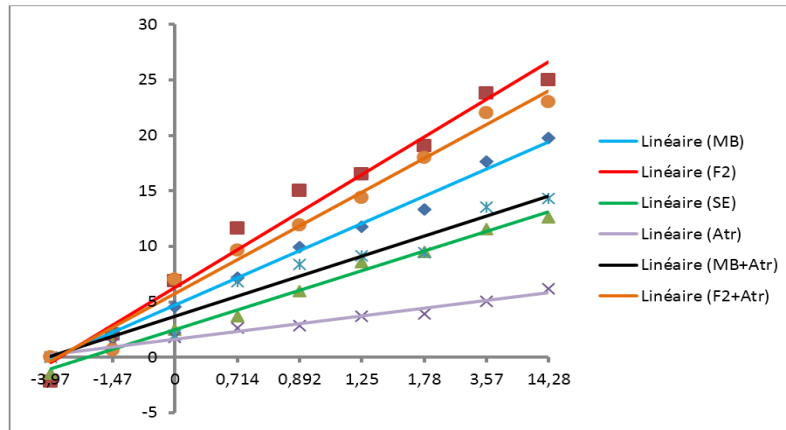


Figure 5 : Détermination de V_m et de K_m de AChE par la représentation Lineweaver-Burk
 Nombre d'essais : $n = 3$

Tableau : Récapitulation des V_m et des K_m de l'AChE en présence des différents produits pharmacologiques utilisés

Produits	SE	Atr (10^{-2} mg / mL)	MAÏ-BAO (15 mg / mL)	M-B + Atr	F ₂ (5 mg / mL)	F ₂ + Atr
V_m ($\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}$)	$0,40 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,05^{***}$	$0,16 \pm 0,02^{***}$	$0,25 \pm 0,03^{***}$	$0,12 \pm 0,03^{***}$	$0,19 \pm 0,03^{***}$
K_m (nM)	$0,60 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,07^{***}$	$0,27 \pm 0,04^{***}$	$0,37 \pm 0,01^{***}$	$0,40 \pm 0,02^{***}$
% de variation de V_m		+40	-60	-37,50	-70	-52,50
% de variation de K_m		0	-58,33	-60,29	-38,33	-33,33

Nombre d'essais $n = 3$

Significativité par rapport à SE ; $*** = p < 0,0001$

4. Discussion

MAÏ-BAO ou kombucha et sa fraction F₂ ont induit une cardioinhibition. Les effets de M-B et F₂ sur le cœur sont semblables à ceux de l'ACh qui, selon [25 - 28], conduit à des effets inotrope et chronotrope négatifs sur le cœur. Ces différents résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle MAÏ-BAO et F₂ contiendrait des substances cholinomimétiques. En effet, la cardioinhibition persistante induite par M-B est comparable à celle de F₂ qui reste plus intensifiée. Ceci montre que le fractionnement a permis de concentrer plus les substances cardioinhibitrices dans la fraction F₂. Pour ce qui concerne les substances cholinergiques, leur actions cardioinhibitrice serait due à leur fixation sur les récepteurs muscariniques du cœur [29, 30] freinant ainsi l'entrée du Ca⁺⁺ dans la cellule. En effet, l'action de MB et F₂ sur l'activité mécanique du cœur isolé, pourrait résulter de l'inhibition de l'AChE qui est l'enzyme spécifique de l'élimination de l'ACh dans l'espace synaptique [31 - 33]. Dans les différentes expériences menées et selon la représentation de Mickaelis-Menten, l'AChE est inhibée par son substrat, MAÏ-BAO et la fraction F₂ de M-B. L'excès de substrats a exercé une inhibition sur l'AChE. Selon [34], l'explication de cette inhibition découlerait de la liaison d'une seconde molécule de substrat au complexe enzyme-substrat (E-S) formant ainsi, un complexe ternaire inactif. L'inhibition de l'AChE par son substrat pourrait avoir l'explication subséquente. L'effet inhibiteur exercé par M-B et F₂ sur l'AChE qui corrobore l'action cardioinhibitrice de ces deux produits (M-B et F₂), est similaire à l'action inhibitrice des

plantes médicinales de la famille des Lamiaceae sur l'AChE [35]. Les inhibiteurs de l'AChE pourraient être bénéfiques dans le traitement des désordres neurodégénératives [36]. Au vu de l'inhibition de l'AChE induite par les organophosphates [37, 38] et les carbonates [39], on pourrait penser que M-B et F₂ contiendraient des organophosphates et des carbonates. L'inhibition induite par F₂ est plus forte que celle de M-B avec une affinité plus élevée de F₂ pour l'AChE. La F₂ étant issue du fractionnement de M-B, son action sur l'AChE a été plus renforcée. Ce qui a permis à F₂ d'inhiber plus l'activité de l'enzyme par rapport à M-B, en augmentant le taux d'ACh dans la jonction neuromusculaire. Par conséquent, la cardioinhibition induite par F₂ est plus accentuée que celle de MAÏ-BAO. La représentation de Lineweaver et Burk a montré que F₂ et M-B exercent une inhibition incompétitive sur l'AChE. Ainsi, selon l'interprétation moléculaire de cette inhibition, F₂ et M-B se fixeraient sur le complexe E-S afin d'induire l'inhibition. A l'issue des expériences, on a constaté que l'Atr augmente la vitesse catalytique de l'AChE du cœur. Il résulte de cette expérience que l'Atr active l'AChE comme l'ont montré [40] sur certains cations tels que Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ et Mn⁺⁺. En effet, l'antagonisme créé par l'Atr sur l'ACh au niveau des récepteurs muscariniques du cœur, résulte de l'activation de l'AChE par l'Atr. Dans cet état conformationnel, l'AChE hydrolyse rapidement l'ACh et annule son action cardiovasculaire. Cette hypothèse expliquerait aussi l'action antagoniste partielle exercée par l'Atr sur M-B et F₂, en relevant en partie leurs effets cardioinhibiteur et hypotensif.

5. Conclusion

MAÏ-BAO et sa fraction F₂ sont cardioinhibitrices à effet cholinomimétique. Cette cardiodépression induite par MAÏ-BAO et F₂ serait due à leur effet anticholinérasique en inhibant de façon incompétitive l'AChE. Toutefois, l'AChE a une affinité plus élevée pour F₂ que pour MAÏ-BAO. Par conséquent, F₂ inhibe plus l'activité catalytique de l'AChE que M-B. Le fractionnement a donc permis d'améliorer l'action inhibitrice de MAÏ-BAO. Quant à l'Atr, elle active l'AChE. Elle exerce donc une action opposée à celle de M-B et F₂ sur l'AChE. Cela justifierait d'une part les effets antagonistes de l'Atr et MAÏ-BAO et d'autre part, les effets antagonistes de l'Atr et F₂ sur le système cardiovasculaire.

Références

- [1] - A. YAPO, D. A. OTOKORE, K. J-C. ABO, Y. J. DATTE et F. GUEDE-GUINA, *Ethnopharmacologia*, 38 (2006) 71 - 76.
- [2] - T. SRIHARI and U. SATYANARAYANA, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(11) (2012) 1978 - 1981.
- [3] - D. A. BALENTINE, *Critical reviews in food Science and Nutrition*, 8 (1997) 691 - 692.
- [4] - C. DUFRESNE, and FARNWORTH, *Food research international*, 33 (2000) 409 - 421.
- [5] - R. JAYABALAN, R. V. MALBAÏSA, E. S. LONÏCAR, J. S. VITAS, and M. SATHISHKUMAR, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4) (2014) 538 - 550.
- [6] - V. M. RADOMIR, S. L. EVA and A. K. LJILJANA, *BIBLID*, 35 (2004) 199 - 205.
- [7] - A. YAPO, H. F. YAPI, H. AHIBOH, J. A. DJAMAN, J C ABO, D. A. OTOKORE and F. G-GUINA FREDERIC, *The Tropical journal of Health sciences*, 17 (2010) 15 - 19.
- [8] - M. M. KRAFT, *Nova Hedwigia*, 1 (1959) 297 - 304.
- [9] - R. J. S. JUNIOR, BATISTA, R. A. RODRIGUES, L. X. FILHO and A. SILVA LIMA, *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 1(1) (2009) 72 - 78.
- [10] - N. KABIRI, M. SETORKI, and M. A. DARABI, *World Applied Sciences Journal*, 27(4) (2013) 524 - 532.

- [11] - R. V. MALBAˆSA, E. S. LONˆCAR, J. S. VITAS and J. M. CANADANOVIˆC-BRUNET, *Food Chemistry*, 127(4) (2011) 1727 - 1731.
- [12] - P. DIPTI, B. YOGESH, A. K. KAIN et al., *Biomedical and Environmental Sciences*, 16(3) (2003) 276 - 282.
- [13] - J. ABSHENAS, A. DERAKHSHANFAR, M. H. FERDOSI, and S. HASANZADEH, *Comparative Clinical Pathology*, 21(6) (2012) 1243 - 1248.
- [14] - G. S. MURUGESAN, M. SATHISHKUMAR, R. JAYABALAN, A. R. BINUPRIYA, K. SWAMINATHAN and S. E. YUN, *J Microbiol Biotechnol.*, 19 (2009) 397 - 402.
- [15] - M. PICARD, *HAL-Archives* (2006) <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00011390>
- [16] - S. BANZET, N. KOULMANN et L. BOURDON, *médecine et armées*, 40(3) (2012) 207 - 216.
- [17] - J. NARGEOT et E. BOURINET, *La Lettre du Pharmacologue*, 19(4) (2005) 110 - 116.
- [18] - N. WEISS et M. D.WAARD, *Med Sci.*, 22(4) (2006) 396 - 404.
- [19] - J. REISS, *Zeitsch. für Lebensmittel-Untersuchung undforschung*, 198 (1994) 258 - 261.
- [20] - P. MAYSER, S. FROMME, C. LEITZMANN and K. GRÜNDER, *Mycoses*, 38 (1995) 289 - 295.
- [21] - A. J. MARSH, O. O'SULLIVAN, C. HILL, R. P. ROSS and P. D. COTTER, *Food Microbiology*, 38 (2014) 171 - 178.
- [22] - W. N. GOH, A. ROSMA, B. KAUR, A. FAZILAH, A. A. KARIM and R. BHAT, *International Food Research Journal*, 19(1) (2012) 109 - 117.
- [23] - I. W. MINDANI, J. NILAKSHI, B. G. CHAMINIE and Y. W. VIDURANGA, *Journal of Chemistry*, 2015 (2015) 1 - 11. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/591869>
- [24] - B. KHOA and R. F OCHILLO, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1 (1987) 107 - 111.
- [25] - J. B. GALPER, W. KLEIN and W. CATTERALL, *J. biological. Chem.*, 252 (1977) 8692 - 8699.
- [26] - T. B. BOLTON, In smooth muscle. Edited by BÜLDING, E., NRADING, A. F., JONES, A. W. Et TIMOTA, T., EDWARD ARNOLD, London, (1981) 199 - 217.
- [27] - B. C. YANG, W. W. NICHOLS and J. L. MEHTA, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 264(5) (1993) H1388 - H1393.
- [28] - V. OBERHAUSER, S. ECKHARD, R. TOBIAS, B. FRIEDHELM and C. R. LARS, *Circulation*, 103 (2001) 1638 - 1643.
- [29] - R. HAMMER, E. GIRALDO, G. B. SCHIAVI, E. MONFERINI, E. and H. LANDISKY, *Life Sci.*, 38 (1986) 1653 - 1662.
- [30] - D. ROBERTSON, *Pharmacology*, 501 (2005) 1 - 30.
- [31] - I. SILMAN and J. L. SUSSMAN, *Current Opinion in Pharmacology*, 5 (2005) 293 - 302.
- [32] - C. G. BALLARD, N. H. GREIG, A. L. GUILLOZET-BONGAARTS, A. ENZ and S. DARVESH, *Curr. Alzheimer Res.*, 2 (2005) 307 - 318.
- [33] - M. POHANKA, M. HRABINOVA, K. KUCA and J-P. SIMONATO, *Int. J. Mol. Sci.*, 12 (2011) 2631 - 2640.
- [34] - H. C. FROEDE, J. B. WILSON and H. KAUFMAN, *Arch. Biochem and Biophys.*, 247 (2) (1986) 420 - 423.
- [35] - S. VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, B. BLAŽEKOVIĆ, M. KINDL, J. VLADIĆ, D. AGNIESZKA, LOWER-NEDZA and H. B. ADELHEID, *Molecules*, 19 (2014) 767 - 782.
- [36] - K. DASTMALCHI, H. J. D. DORMAN, H. VIORELA and R. HILTUNEN, *Int. J. Biomed. Pharmaceut. Sci.*, 1 (2007) 83 - 104.
- [37] - E. BARTELS and D. NACHMANSOHN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 133 (1969) 1 - 6.
- [38] - Y. ASHANI, P. WINS and I. B. WILSON, *Biophys. Acta*, 284 (1972) 427.
- [39] - B. HETNARSKI, and R. D. O'BRIEN, *J. Agr. Food. Chem.*, 23 (1975) 709 - 715.
- [40] - G. TOMLINSON, B. MUTUS, I. MCLENNAN, and M. OOIBROEK, *Biochemica et Biophysica Acta*, 703 (1982) 142 - 148.