

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I

Frères Mentouri Constantine I University

Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie et BMC

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : *Biochimie appliquée*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Biomolécules à intérêt pharmaceutique de la propolis : Etude expérimentale et *in silico*

Présenté par : ALLAM Aridj

Le 23/06/2022

ZELLAGUI Dina Raouane

Jury d'évaluation :

Encadrant : MOKRANIE-H

(MCB – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : BENSEGUENI. A

(Pr – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : DEMMAK.R.G

(MCA–Université Salah Boubnider, Constantine 3).

Année universitaire

2021 - 2022

Remerciements

Nous tenons à remercier d'abord Dieu de nous avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de science.

Nous exprimons d'abord notre profond remerciement et notre vive connaissance à Mr. **MOKRANI. E.H** Maitre de conférence B à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour avoir encadré et dirigé ce travail, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qui nous avons été accordée nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements au professeur **BENSEGUENI. A**, pour avoir accepté de présider le jury.

Nous tenons à remercier Mme **DEMMAK, R.G.** maitre de conférence A, pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

Un remerciement particulier à Mr **BENSOUICI Chawki**, Maitre de recherche classe B au centre de Recherche en Biotechnologie, de la nouvelle ville Ali mendjeli, qui malgré ses nombreuses occupations, a accepté de nous avoir accueilli au sein de son laboratoire, nous le remercions pour sa bienveillance et ses conseils.

Un grand merci également à Mr **AKAL Salah**, professeur à université Mentouri, pour son accueil chaleureux au sein du son laboratoire de Phytochimie et analyses Physico-chimiques et Biologique, pour nous avoir permis de réaliser quelques analyses de notre travail.

Nous remercions tout spécialement l'ensemble des doctorantes **HADJEB Wided, MOKRANI Meryem** et **BOUKLOUL Ines** que nous avons côtoyées au laboratoire de biomolécules végétale et amélioration des plantes, et qui nous ont apporté leur aide par leur compétence. Nous leur souhaitons un avenir plein de succès.

Nous exprimons nos sincères reconnaissances à Mr **OZTURK mehmet** du laboratoire de chimie de l'université de Mugla. Pour sa disponibilité et son aide surtout pour le test de chromatographie liquide à haute performance.

Afin de Ne pas oublier personne, nos vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui nous ont aidé à la réalisation de ce modeste mémoire.

The page is framed by a decorative border featuring several bees in flight, clusters of yellow and orange flowers, and green leaves with small yellow blossoms. The background is white with scattered small brown dots.

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à

A ma chère Mère Hamida

A mon père Amar

A mes deux frères Louai et Koussai

Et ma petite sœur Thiziri Aridj

A mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A tous les cousins, et les amies que j'ai connu jusqu'à maintenant.

A mon âme-sœur Hazar qui est toujours là à mes coté

A ma chère binôme Aridj pour son soutien moral, Sa patience et sa

compréhension tout au long de ce projet

Dina rawen

Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste mémoire à mes chers parents ma mère Atika et mon père Sayah ; qui ont sacrifié leurs vies pour ma réussite et m'ont éclairé le chemin par leurs prières et conseils judicieux.

J'espère qu'un jour, je pourrai leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie.

Je dédie aussi ce travail à mes chères sœurs Halla, Dorsaf et Chihaz ;

Ma chère binôme Raouane et son père,

Mes meilleures amies Wissal et Khouloud, pour leurs aides et supports dans les moments difficiles ;

A tous les Professeurs qui m'ont enseigné tout au long mon parcours universitaire

A tous ceux qui m'aiment ...

Aridj Allam

TABLE DES MATIERE

Introduction générale.....	1
Partie Bibliographique	
<i>CHAPITRE I : Généralités sur la propolis</i>	
I.1. Définition et étymologie.....	3
I.2. Utilisation de la propolis par les abeilles.....	3
I.3. Utilisation de la propolis par l'Homme.....	3
I.4. Propriétés physico-chimiques de la propolis.....	4
I.4.1. Caractéristiques organoleptiques.....	4
I.4.2. Consistance.....	4
I.4.3. Solubilité.....	4
I.5. Toxicité de propolis.....	4
I.6. Conservation.....	5
I.7. Propriétés pharmacologiques de la propolis.....	5
I.7.1. Propriétés antioxydants.....	5
I.7.2. Propriétés anti-inflammatoires.....	5
I.7.3. Propriétés antimicrobiennes.....	5
I.7.4. Propriétés antifongiques.....	5
I.7.5. Propriétés antivirales.....	6
I.7.6. Propriétés anticancéreux et cytotoxiques	6
I.7.7. Propriétés cicatrisantes.....	6
I.7.8. Propriétés anesthésiques.....	6
I.7.9. Propriétés antiparasitaires.....	6
<i>CHAPITRE II : Composition de la propolis</i>	
Introduction.....	7
II.1. Composition de la propolis brute.....	7
II.2. Composition de la propolis purifiée.....	8
II.2.1. Flavonoïdes	8
1. Flavanols et Flavones.....	9
2. Chalcones et dihydrochalcones.....	9
3. Flavonone.....	9
II.2.2. Acides aliphatiques.....	10
II.2.3. Acides aromatiques.....	11
1. Dérivés de l'acide benzoïque.....	11
2. Dérivés de benzaldéhydiques.....	13
3. Dérivés de l'acide cinnamique.....	13
II.2.4. Esters aromatiques.....	13
II.2.5. Sucres de la propolis.....	14
II.3. Composition de la propolis algérienne.....	14
<i>CHAPITRE III : Docking moléculaire</i>	
Introduction.....	15
III.1. Principe du docking moléculaire.....	15
III.2. Evolution des méthodes du docking moléculaire.....	15
1. Docking rigide.....	15
2. Docking semi-flexible.....	16
3. Docking flexible.....	16

III.3. Outils du docking moléculaire.....	16
1. Récepteur.....	16
2. Ligand.....	16
Programmes du docking.....	17
III.4. Programme de docking moléculaire.....	17
III.4.1. Programme Surflex.....	17
Partie Pratique	
<i>CHAPITRE I : Matériel et méthode</i>	
Etude expérimentale.....	
I.1. Présentation de la matière première.....	18
I.2. Préparation des échantillons.....	18
I.2.1. Broyage.....	18
I.2.2. Préparation des extraits éthanoliques.....	19
I.2.3. Extraction.....	19
I.3. Détermination du rendement.....	21
I.4. Tests qualitatif.....	21
I.4.1. Test qualitatif des flavonoïdes.....	21
I.4.2. Test qualitatif des coumarines.....	21
I.4.3. Teste qualitatif des tannins.....	22
I.5. Analyse chromatographique (Chromatographie sur couche mince)	22
I.6. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	23
I.7. Activité anti-oxydante.....	24
I.7.1. Activité anti radicalaire au DPPH.....	24
I.7.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS....	24
I.7.3. Activité de phenanthroline.....	24
I.7.4. Activité du reducing power.....	24
I.7.5. Activité Silver nanoparticle (SNP)	25
I.7.6. Analyses statistiques.....	25
I.8. Activité anti-enzymatique.....	25
I.8.1. Activité Acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase.....	25
I.9. Activité antimicrobienne.....	26
Etude <i>in silico</i>	
II. 1. Matériel.....	27
II.1.1. Programmes.....	27
II.1.2. Sites et serveurs en ligne.....	27
II.2. Méthode.....	28
II.2.1. Préparation des molécules pour le docking moléculaire.....	28
1. Préparation d'enzyme.....	28
2. Préparation des ligands.....	28
II.2.2. Calculs de docking moléculaire.....	28
II.2.3. Test RMSD.....	29
II.2.4. Analyse visuelle.....	29
<i>CHAPITRE II : Résultats et discussion</i>	
I.1. Rendement d'extraction.....	30
I.2. Screening phytochimique.....	31
I.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)	31
I.4. Identification des composés par HPLC.....	36
I.5. Les activités antioxydantes.....	39
I.5.1. Activité antiradicalaire DPPH.....	39
I.5.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS.....	40
I.5.3. Activité de phénanthroline.....	41

I.5.4. Activité du reducing power (FRAP)	42
I.5.5. Activité Silver nano particle (SNP)	43
I.6. Activité anti-enzymatique.....	44
I.6.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase.....	44
I.6.2. Inhibition de la butyrylcholinestérase.....	45
I.7. Activité antimicrobienne.....	46
II. Etude <i>in silico</i>	
II. 1. Test de fiabilité du programme surflex.....	50
II.1.1 Analyse visuelle.....	50
II.2. Docking moléculaire des composés de la propolis.....	51
II.2.1. Etude des interactions du complexe acide chlorogénique-AChE.....	56
II.2.2. Etude des interactions du complexe Cynarine-BChE.....	59
Conclusion.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
Résumé	

Liste Des Abréviations

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

2D : Deux Dimensions.

3D : Trois Dimensions

Å : Angström.

A_{0.5} : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance

AA : Acide Aminé

ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

AChE : Acétylcholinestérase.

AlCl₃: Chlorure d'Aluminium

BChE : Butyrylcholinestérase.

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CI₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%

DMSO : Di-Méthyl Sulf-Oxide

DPPH : 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

DTNB : Acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)

EEP : Extrait Ethanolique de la Propolis

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

GN : Milieu Gélose Nutritive

HPLC : Chromatographie Liquide de Haute Performance

Na₂CO₃ : Carbonate de Sodium

PDA : Milieu Dextrosé à la Pomme de terre

PDB: Protein Data Bank

PRO ATH: Propolis provenant d'Oued Athmania

PRO TAH: Propolis provenant d'El Tahir

PRO Z: Propolis provenant d'Oued Zehour

RMSD: Root Mean Square Dérivation

TIC: Total Ion Chromatogram

UV: Ultra Violet

Liste des figures

Figure N°1 : Propolis brute.....	3
Figure N°2 : Principaux composés chimiques de la propolis brute.....	8
Figure N°3 : Structure de base des flavonoïdes.....	9
Figure N°4 : Structure de quelques flavonoïdes identifiés par HPLC/SM dans la propolis.....	10
Figure N°5 : Structures chimiques des principaux acides cinnamiques de la propolis.....	13
Figure N°6 : Modèle clé-serrure.....	15
Figure N°7 : Echantillons après broyage.....	19
Figure N°8 : Etat finale des extraits après évaporation.....	21
Figure N°9 : Chromatographie sur couche mince sur des plaques de type GF 254.....	22
Figure N°10 : Méthode utilisée pour l'activité antibactérienne.....	26
Figure N°10 : Rendement d'extraction.....	30
Figure N°11 : Chromatographie sur couche mince.....	32
Figure N°12 : Chromatogramme d'HPLC de PRO ATH.....	38
Figure N°13 : Chromatogramme d'HPLC de PRO TAH.....	38
Figure N°14 : Chromatogramme d'HPLC de la PRO Z.....	38
Figure N°15 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH)	39
Figure N°16 : Profil de la microplaque de dosage du test ABTS.....	40
Figure N°17 : Profil de la microplaque de dosage du test Phenanthroline.....	41
Figure N°18 : Profil de la microplaque de dosage du test.....	42

Figure N°19 : Profil de la microplaque de dosage du test SNP.....	43
Figure N°20 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité inhibitrice de l'Acétylcholinestérase.....	45
Figure N°21 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité inhibitrice de la Butyrylcholinestérase...	46
Figure N°22 : Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche M.Luteus.....	48
Figure N°23 : Effet antifongique de l'échantillon PRO Z sur la souche Candida.....	48
Figure N°24 : Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche S.aureus.....	48
Figure N°25 : Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche P. aeruginosa.....	48
Figure N°26 : Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche E.coli.....	49
Figure N°27 : Pourcentages des valeurs de RMSD générés par Surfex.....	50
Figure N°28 : Superposition de l'inhibiteur de référence (coloré en bleu) et du finale-0 calculé par Surfex (coloré en rouge) du complexe 1AMN (RMSD =1.57 Å).....	51
Figure N°29 : Positionnement de l'acide chlorogénique dans le site actif de l'AChE.....	57
Figure N°30 : Positionnement de la galantamine dans le site actif de l'AChE.....	58
Figure N°31 : Diagramme des interactions AChE- acide chlorogénique.....	58
Figure N°32 : Diagramme des interactions AChE- Galantamine.....	59
Figure N°33 : Positionnement de la cynarine dans le site actif de la BChE.....	60
Figure N°34 : Positionnement de la galantamine dans le site actif de la BChE.....	61
Figure N°35 : Diagramme des interactions BChE-Cynarine.....	61
Figure N°36 : Diagramme des interactions BChE-Galantamin.....	62

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Flavonoïdes identifiés dans la propolis.....	11
Tableau N°2 : Structure de l'acide benzoïque de la propolis et ces dérivés.....	12
Tableau N°3 : Structure des composés benzaldéhydiques.....	13
Tableau N°4 : Composition de la propolis en esters aromatiques.....	14
Tableau N°5 : Sucres et les sucres alcooliques de la propolis.	14
Tableau N°6 : Pourcentages des composés de la propolis algérienne.....	14
Tableau N°7 : Présentation de la matière première.....	18
Tableau N°8 : Caractéristiques des structures cristallographiques de l'AChE et la BChE.....	28
Tableau N°9 : Screening phytochimiques des extraits de propolis.....	31
Tableau N°10 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV dans le système solvant 1	33
Tableau N°11 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV par le système solvant 2	34
Tableau N°12 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV par le système solvant 3	35
Tableau N°13 : Composition chimiques des trois échantillons par HPLC.....	37
Tableau N°14 : Pourcentage d'inhibition et l'IC ₅₀ du test DPPH.....	40
Tableau N°15 : Pourcentage d'inhibition et l'IC ₅₀ du test ABTS.....	41
Tableau N°16 : Pourcentage d'inhibition et l'IC ₅₀ du test Phenanthroline.....	42
Tableau N°17 : Pourcentage d'inhibition et l'A _{0,5} du test FRAP.....	43
Tableau N°18 : Pourcentage d'inhibition et l'A _{0,5} du test SNP.....	44
Tableau N°19 : Pourcentage d'inhibition et l'IC ₅₀ du test anti-acétylcholinestérase.....	45
Tableau N°20 : Pourcentage d'inhibition et l'IC ₅₀ du test anti-Butyrylcholinestérase.....	46

Tableau N°21 : Diamètres d'inhibition des propolis pour les souches étudiées.	47
Tableau N°22 : Nom, Structure et affinité calculé par Surflex des 25 molécules issues de la propolis.....	52
Tableau N°23 : Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par l'acide chlorogénique et la galantamine.....	57
Tableau N°24 : Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'BChE par la Cynarine et la galantamine.....	60

The page features decorative blue lines in the corners. In the top-left corner, there is a thick horizontal line extending from the left edge, a vertical line extending from the top edge, and a thin crosshair. In the bottom-right corner, there is a thick horizontal line extending from the right edge, a vertical line extending from the bottom edge, and a thin crosshair.

Introduction générale



Introduction générale

La propolis est une substance résineuse produite par les abeilles, de consommation courante. Elle a été largement utilisée dans la médecine alternative comme remède naturel [1]. Généralement, elle est constituée de résine de baume (composée de flavonoïdes et d'acides phénoliques ou de leurs esters), de cire (mélange de cire verte d'origine végétale et de cire d'abeille), d'huiles essentielles, de pollen et de matières diverses (organiques et minérales) [2, 3].

De nombreux travaux se sont intéressés à la composition chimique et aux activités biologiques de la propolis. Ces travaux ont prouvé que cette substance peut s'avérer une source intéressante de nouveaux produits biologiquement actifs tel que les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes auxquels sont attribués de nombreuses activités biologiques à savoir : antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, antioxydante, anticancéreuse...etc. [4-8]. Cette composition varie en fonction de l'origine de la propolis, de l'espèce d'abeille et du temps de la récolte. Son efficacité une fois prouvée lui a valu un intérêt particulier par l'ensemble des chimistes, biochimistes, et pharmacologues, qui essaient d'identifier de nouveaux principes actifs susceptibles d'être utilisés en thérapeutique.

C'est sur la base de ce constat que repose cette étude, dédiée à l'investigation de la composition chimique et des activités biologiques de trois échantillons de la propolis issus des régions de l'est algérien : OUED ZEHOUR (wilaya de Skikda), EL TAHIR (Wilaya de Jijel) et OUED ATHMANIA (Wilaya de Mila). Ce travail met en œuvre trois étapes complémentaires :

Dans une première partie, il serait utile de procéder à l'extraction des composés phénoliques à partir des trois échantillons de la propolis en utilisant un système solvant hydroéthanolique. Par la suite, des tests qualitatifs (screening phytochimique) sont indispensables en vue de mettre en évidence les différentes familles des métabolites secondaires existants à partir de la propolis. Ces tests seront suivis par une étape d'identification structurale en faisant appel à la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette dernière étape devra permettre d'identifier les différents composés chimiques présents dans les trois extraits de la propolis étudiés.



Dans une deuxième partie, il serait intéressant de valoriser les extraits de la propolis en évaluant expérimentalement leurs activités biologiques telles que : l'activité antioxydante (par les tests des DPPH, ABTS, Phenanthroline, Reducing power et SNP), l'activité antibactérienne (sur quatre souches bactériennes dont deux à Gram + : *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* ATCC 4698 ; et deux à Gram - : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), l'activité antifongique sur *Candida albicans* et l'activité anticholinestérasique sur l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Dans une troisième partie, les résultats obtenus de cette dernière activité seront confortés par une étude *in silico* par docking moléculaire permettant de mieux appréhender les mécanismes d'interactions mis en jeu dans l'inhibition de ces deux enzymes par les différents composés présents dans les extraits de la propolis étudiés.

Partie bibliographique

CHAPITRE I
Généralité sur la propolis



Chapitre I : Généralités sur la propolis

I.1. Définition et étymologie

La propolis est une matière résineuse complexe produite par les abeilles à partir de plusieurs exsudats végétaux. Les abeilles obtiennent leur propolis par addition de cires, de sécrétions salivaires ou de matières gommeuses et balsamiques recueillies auprès de diverses espèces végétales [9]. Elles l'utilisent à l'entrée de leur ruche pour en protéger l'accès, c'est ce qui indique son étymologie Grecque [pro] signifiant devant ou défense, et [polis] signifiant la cité. Une autre étymologie latine a également été avancée venant de l'adverbe [pro] qui veut dire dans le but et le verbe [polis] qui signifie enduire. Ainsi, la propolis est une substance visqueuse et fortement adhésive qui couvre les bourgeons et la résine des conifères [10].



Figure N°1 : propolis brute.

I.2. Utilisation de la propolis par les abeilles

En raison de sa nature cireuse et de ses propriétés mécaniques, les abeilles utilisent la propolis pour la construction et la réparation de leurs ruches. Lorsque cette substance se solidifie dans les fissures et les ouvertures, elle agit pour contrôler l'environnement interne tout en renforçant et protégeant contre des intrus, plus important encore, pour empêcher la décomposition des créatures qui ont été tuées après une invasion [11].

I.3. Utilisation de la propolis par l'Homme

En médecine, l'utilisation de la propolis n'est pas récente. Les Egyptiens utilisaient ses propriétés anti-putréfactrices pour embaumer leurs morts. Les médecins romains et grecs l'utilisaient pour ses propriétés cicatrisante et antiseptique. Les Incas l'utilisaient pour son caractère antipyrétique. Aujourd'hui, la propolis est utilisée en médecine traditionnelle, en apithérapie, comme bio cosmétique ou encore comme alicament [10, 11].



I.4. Propriétés physico-chimiques de la propolis

I.4.1. Caractéristiques organoleptiques

Les propriétés physicochimiques de la propolis peuvent varier selon la flore, les conditions saisonnières d'une région géographique déterminée, l'heure et la date de récolte et la technique employée [12] :

-Couleur : allant du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir en passant par toute une gamme de brun extrêmement riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.)

-Odeur : en général arôme agréable et douceâtre mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille).

-Saveur : souvent âcre et parfois amère [12, 13].

I.4.2. Consistance

La propolis est une substance de consistance variable en fonction de la température. Dure et friable à 15°C, elle devient molle et malléable aux alentours de 25 à 45 °C et collante ou gluante en dessus, jusqu'à fondre vers 60 – 70°C en moyenne. Mais le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C [14].

I.4.3. Solubilité

Elle est soluble partiellement dans l'alcool (éthanol, méthanol) l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, le glycol ...etc. Seul, un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants. Elle est peu ou pas soluble dans l'eau [15].

I.5. Toxicité de propolis

Les études en rapport avec la toxicité de la propolis sont rares. Ghisalberti signale qu'elle n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si elle est consommée en quantités raisonnables. Avrouest-Grand et al 1994 ont reporté une DL₅₀ de 7340 mg/kg. Par contre, Hrytsenko et al 1977 ont reporté une DL₅₀ de 2050 mg/kg et une DL₁₀₀ de 2750 mg/kg.

Cette différence peut être expliquée par une différence au niveau de l'extraction de cette substance (choix du solvant et pourcentage utilisé). L'administration orale de 200 à 1220 mg/kg/J d'extrait éthanolique de propolis (EEP) pendant 7-10 jours, n'entraîne aucun effet nocif selon une étude de Higashi et De Castro en 1995 [16-19].



I.6. Conservation

La propolis se conserve assez facilement, dans de bonnes conditions, sans précautions. Cependant, il est préférable de la stocker dans des récipients opaques afin qu'elle soit à l'abri de la lumière. Ces récipients doivent être fermés et à l'abri de la chaleur [20]. Le stockage de longue durée ne semble pas diminuer sa teneur en composants actifs ni son action antibactérienne [21].

I.7. Propriétés pharmacologiques de la propolis

La propolis possède un large spectre d'activité biologique, citons à titre d'exemple :

I.7.1. Propriétés antioxydantes

La propolis possède un effet antioxydant dû à la présence de benzyl-cafféate ; flavonoïdes qui ont un énorme pouvoir antioxydant par l'inhibition de la lipoperoxydation de l'acide linoléique [22, 23].

I.7.2 Propriétés anti-inflammatoire

La propolis possède des propriétés anti-inflammatoires qui accélèrent le processus de guérison. Elle est largement utilisée dans les remèdes populaires. Ces effets sont associés à ses composants chimiques. L'acide caféique est l'un des composés responsables de l'action anti-inflammatoire et de l'accélération de la cicatrisation [24].

I.7.3 Propriétés antimicrobiennes

De nombreuses études ont démontré l'effet d'inhibition de la propolis sur les souches Gram+, Gram- et les bactéries anaérobies. Cet effet dépend de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé [25, 26]. Les composants actifs de la propolis ayant cet effet sont principalement la pinocembrine, la galangine, l'acide caféique et l'acide férulique.

I.7.4. Propriétés antifongiques

La propolis possède des propriétés antifongiques importants, c'est ce qui permet aux cadavres présent dans la ruche dont les abeilles ne peuvent se débarrasser de ne pas moisir. Elle a un effet antimycosique, contre les germes appartenant au genre *candida* et contre les levures. Elle s'est montrée efficace dans l'infection à la *Giardia Lamblia* comme les métronidazoles. [27, 28]. Les composants antifongiques sont : la pinocembrine, la pinobanksine, l'acide caféique, l'ester benzylique et le ptérostilbène [29].



I.7.5. Propriétés antivirales

La propolis possède une activité significative contre les virus. Cette activité est bien démontrée et basée sur les flavonoïdes majeurs de la propolis, plus spécifiquement les flavonols et les flavones [30]. En effet, l'efficacité de la propolis a été observée sur des virus à ADN comme à ARN, en agissant sur leur réplication, notamment les macrovirus, les poliovirus, les coronavirus, les adénovirus, les rota virus HSV 1 et 2, l'hépatite B, Les composants antiviraux incluent l'acide caféique, la lutéoline et la quercétine [31, 32].

I.7.6. Propriétés anticancéreuses et cytotoxiques

La propolis serait un outil thérapeutique remarquable dans les traitements de chimiothérapie, permettant d'augmenter leur efficacité mais pas leurs effets secondaires, tout en réduisant la cytopénie induite, qui est un effet secondaire majeur de la chimiothérapie Les composants anticancéreux incluent les flavonoïdes, terpènes et l'acide caféique [33].

I.7.7. Propriétés cicatrisantes

La propolis possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire, la circulation, et la formation du collagène. En effet, la propolis accélère la régénération de plusieurs tissus abimés : c'est le cas notamment au niveau de tissus osseux, tissus dentaires ou tissus hépatiques

Les différents composants de la propolis favorisent son action cicatrisante, certains acides aminés jouent un rôle également : la proline qui intervient dans la synthèse du collagène et d'élastine et ayant un rôle majeur dans la structure architecturale du derme, l'arginine est fortement impliqué dans le renouvellement cellulaire. De plus, la propolis soutien en parallèle le métabolisme cellulaire avec les apports qualitatifs en acides aminés [15, 34].

I.7.8 Propriétés anesthésiques

L'action anesthésique de la propolis est très curieuse et vraisemblablement liée à l'activité des huiles volatiles de la propolis. En effet, la propolis est utilisée en anesthésie lors d'interventions chirurgicales au niveau du nez et de l'oreille, en chirurgie dentaire et stomatologie [35].

I.7.9 Propriétés antiparasitaires

Monzote *et al.* [36] ont observé une activité antiparasitaire d'un extrait éthanolique de la propolis contre des Leishmania, des trypanosomes et des plasmodiums.

CHAPITRE II
Composition de la propolis



Chapitre II : Composition de la propolis

Introduction

La composition chimique complexe de la propolis est fréquemment mise à jour en raison de nombreuses variations régionales. Plus de 300 constituants de propolis ont été identifiés à l'aide de différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques [37].

Les flavonoïdes, les acides aromatiques, les acides diterpéniques et les composés phénoliques semblent être les principaux composants des échantillons de propolis. Les propriétés et le contenu réel de la propolis dépendent de l'emplacement de collecte des abeilles, de la période de l'année et de la source végétale [38]. De plus, divers mono et sesquiterpènes (composés volatiles) se trouvent dans la propolis. Les autres constituants des huiles volatiles comprennent les alcools, principalement les alcools aromatiques, les phénols, les aldéhydes, les cétones, les acides (de l'acétique à l'acide stéarique), les esters, une série d'alcane, les benzènes alkylés et le naphthalène [39].

La grande variabilité de la composition chimique de la propolis provenant de différentes régions s'explique par le fait que les abeilles extraient des matières premières de différentes plantes dans différents écosystèmes pour leur production de propolis [40]. L'origine végétale de la propolis détermine sa diversité chimique et dépend de la spécificité de la flore locale au site de collecte et donc des caractéristiques géographiques et climatiques de ce site [41].

II.1. Composition de la propolis brute

Généralement, elle est constituée de 40 à 50 % de résine, de baume composé de flavonoïdes et d'acides phénoliques ou de leurs esters, [38, 41, 42] 20 à 30 % de cire (mélange de cire verte d'origine végétale et de cire d'abeille) [43], 5 % de pollen [44], 5 % de matières diverses (organiques et minérales) [38, 45] et 5 à 10 % d'huiles essentielles [46].

La liste des principales classes des composés chimiques de la propolis est illustrée dans le diagramme circulaire suivant :

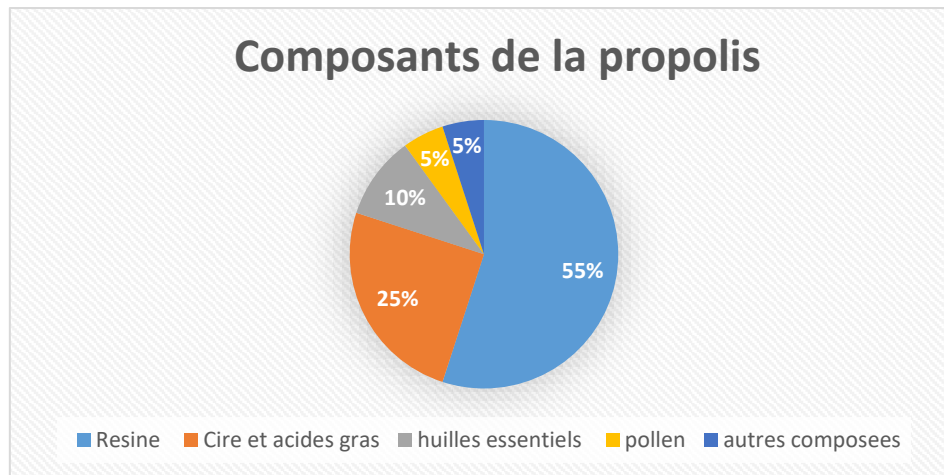


Figure N°2 : Principaux composés chimiques de la propolis brute.

II.2. Composition de la propolis purifiée

À l'heure actuelle, 150 composés ont été identifiés faisant de la propolis une véritable source de produits chimiques [47]. En effet, dans la propolis se trouve plus de quarante flavonoïdes (flavones, flavonoles, et flavanones), des acides aromatiques, des esters aromatiques, terpanoïdes, acides aliphatique, autres matières organiques et minérales et de nombreuses vitamines (dont la vitamine A et les vitamines du groupe B [46]. Les composés phénoliques (appelés aussi polyphénols) semblent les plus dominants dans la composition de la propolis. En plus, ce sont les principaux composés responsables des activités biologiques de la propolis tels que l'activité antibactérienne [25], antivirale [31], et antioxydant [22]. La composition en polyphénols de la propolis diffère d'une région à une autre et d'une race à l'autre [48].

II.2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes de la propolis possèdent de nombreuses propriétés tels que l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, inhibitrice de quelques enzymes, antioxydante et antiallergique. Il est connu que la plupart des effets biologiques des flavonoïdes sont reliés à leur activité antioxydante [49]. Ils peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant [50], par capture directe des radicaux, par chélation des métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Sous certaines conditions, les flavonoïdes sont cependant susceptibles de se comporter comme des agents prooxydants et d'engendrer une altération des protéines, de l'ADN ou encore des lipides membranaires et des glucides [51].

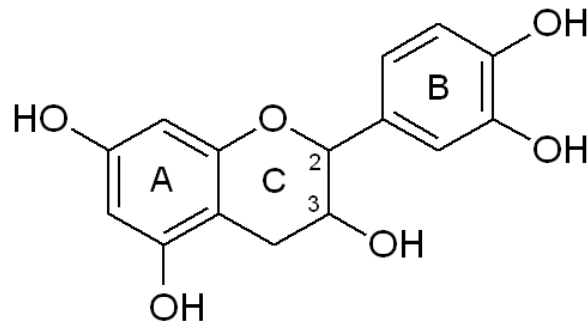


Figure N°3 : Structure de base des flavonoïdes.

La plupart des flavonoïdes identifiés dans la propolis sont englobés en trois groupes :

1. Flavanols et Flavones

Les flavanols se différencient des flavones par l'existence d'un OH en position 3. Le flavanole le plus répandu dans la propolis est le Pinocembrine. De plus, environ 30 flavones ont été également révélés dans la propolis dont : la Chrysin, la Galangine, le Kaempferole, l'Apiginine, l'Apiginine-7-ether méthylique, l'Izalpinine, Kaempfiride, le Kaempferole, la Quercétine, etc... [52].

2. Chalcones et dihydrochalcones

Les plus répandues sont les Pinocembrineschalcone, le 2, 4,6trihydroxydihydrochalcone, la 2,4-dihydroxy-4-methoxydihydrochalcone, le pinobanksine-3acetate chalcone, l'Alpinenichalcone, pinostrobinechalcone, Sakuranetinechalcone, etc... [52].

3. Flavonone

Les flavanones ou dihydro-2,3-flavones dérivent des flavones par disparition de la double liaison de l'hétérocycle central. Les plus répandus dans la propolis d'abeille sont : la Narginine, la Pinobanksine, le Pinobankcine-3-acétate, le Pinobankcine-3-butirate, le Pinobankcine-3-hexanoate, le 3,7-dihydroxy-5methoxyflavanone, le 2,5-dihydroxy-7-methoxyflavanone, etc... [52].

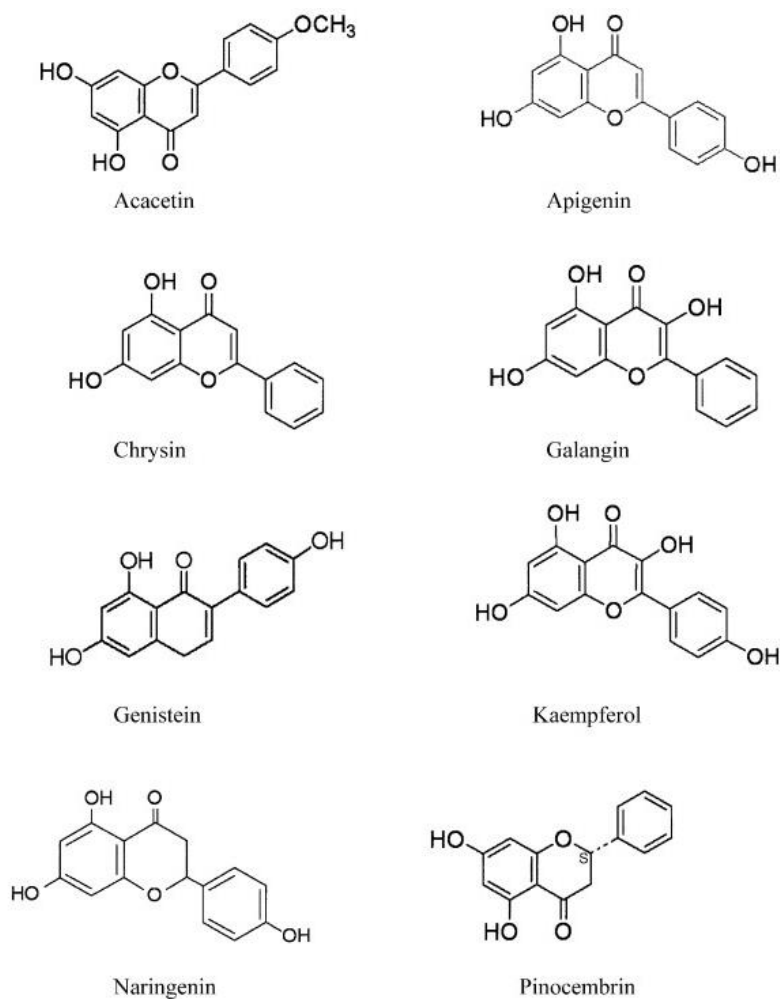


Figure N°4 : Structure de quelques flavonoïdes identifiés par HPLC/SM dans la propolis [53]

II.2.2. Les acides aliphatiques

Plus de vingt acides aliphatiques ont été identifiés dans la propolis. Ces acides sont reportés dans le tableau N°1 [54, 52].

**Tableau N°1** : Flavonoïdes identifiés dans la propolis

Nom des composés	% Total Ion Chromatogram (TIC)
Acide 2-hydropropanoïque (acide lactique)	0,08
Acide 2- hydroxybutanedioïque (acide maleïque)	0,31
Acide trans butan-1,4-dioïque (acide fumarique)	0,01
Acide butanedioïque (acide succinique)	0,29
Acide nonaoïque (acide pelargonique)	0,01
Acide decanoïque (acide caprique)	0,02
Acide dodecanoïque (acide laurique)	0,02
Acide hexadecanoïque (acide palmitique)	0,54
Acide oléique	0,86
Acide octadecanoïque (acide stéarique)	0,28
Acide 2-hydroxy acétique	0,01
Acide 2, 3-dihydroxypropanoïque (acide glycérique)	0,01
Acide tetradecanoïque (acide myristique)	0,04
Acide heptadecanoïque	0,06
Acide octanoïque	0,01
Acide linoléique	-

TIC : c'est une valeur qui caractérise chaque composé, mais elle ne permet pas de les quantifier (CG/MS).

II.2.3. Les acides aromatiques

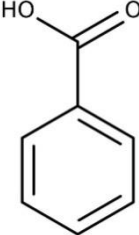
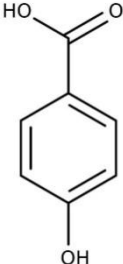
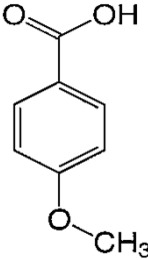
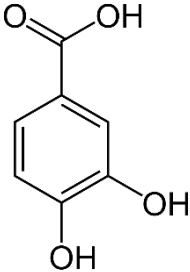
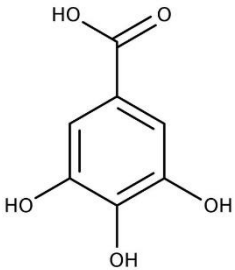
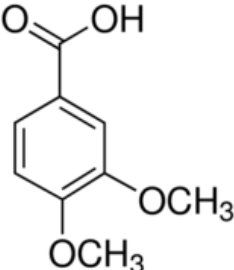
Cette catégorie se subdivise en trois groupes [55] :

- Les dérivés de l'acide benzoïque ;
- Les dérivés de l'acide benzaldéhydrique ;
- Les dérivés de l'acide cinnamique.

1. Dérivés de l'acide benzoïque

Les acides benzoïques ont une structure générale de C₆-C₁ dérivant directement de l'acide benzoïque [55, 56]. Les variations des structures de différents acides benzoïques se situent dans les hydroxylations et les méthylations du noyau aromatique [57].

**Tableau N°2 : Structure de l'acide benzoïque de la propolis et ces dérivés**

	Structure
Acide benzoïque	
Acide 4-hydroxybenzoïque	
Acide 4-méthoxy benzoïque	
3,4dihydroxy benzoïque (protocatéchique)	
3, 4,5trihydroxy benzoïque (acide gallique)	
3,4 diméthoxide benzoïque	



2. Dérivés de benzaldéhydiques

K. Dietrich détecta des traces de vanilline et d'iso vanilline dans la composition de la propolis récolté dans les régions apicoles d'U.R.S.S en 1911.

Tableau N°3 : Structure des composés benzaldéhydiques

	Structure
Vanilline	
Iso vanilline	

3. Dérivés de l'acide cinnamique

Les acides cinnamiques possèdent une structure générale de C₆-C₃, les plus répandus chez les végétaux sont l'acide p-coumarique, caféïque (2) et férulique (3) [57].



Figure N°5 : Structures chimiques des principaux acides cinnamiques de la propolis [58].

II.2.4. Esters aromatiques

D'après la littérature, plusieurs travaux ont été réalisés sur les Esters aromatiques de la propolis dont les plus importants sont cités dans le tableau N°4.

**Tableau N°4 : Composition de la propolis en esters aromatiques**

1. Ethyl palmitate	10. 3-methyl-3-butenyl-trans caffeate
2. Diethylphthalate	11. 2-methyl-2-butenyl-trans caffeate
3. Benzyl-trans-4-coumarate	12. 3-methyl-2-butenyl-trans caffeate
4. 1-phenylethyl transcaffeate	13. 2-methyl-2-butenyl-trans-4-coumarate
5. Cinnamylcaffeate	14. 3-methyl-2-butenyl-trans-4-coumarate
6. 3-methyl-3-butenyl-trans ferulate	15. Phenylethyl trans-4-coumarate
7. 3-methyl-2-butenyl-trans ferulate	16. Ethyle linoleate
8. 3-methyl-3-butenyl-trans-iso- ferulate	17. Ethyl oleate
9. 3-methyl-3-butenyl-trans ferulate	18. Ethyl stearate

II.2.5. Sucres de la propolis

Les sucres qui ont été identifiés dans la propolis sont illustrés dans le tableau N°5 [54] :

Tableau N°5 : Sucres et les sucres alcooliques de la propolis.

1. Inositol	6. D-glucetole
2. Saccharose	7. D-glucose
3. D-fructose (isomère1)	8. α -D-xylopyranose
4. D-fructose (isomère2)	9. Acide gluconique
5. Sorbose	10. Galactose

II.3. Composition de la propolis algérienne

D'après une étude réalisée dans quatre régions différentes du pays (Tlemcen, Guelma, M'sila et Tizi-Ouzou) [10], la propolis algérienne est constituée de Cinq familles principales : les acides aliphatiques, les acides aromatiques, les terpènes les flavonoïdes et les esters [59].

Tableau N°6 : Pourcentages des composés de la propolis algérienne

Famille	Tlemcen	Guelma	M'sila	Tizi-Ouzou
Acide aliphatique	2,80	4,90	4,20	4,30
Acide aromatique	3,70	3,60	2,70	8,80
Terpènes	6,60	19,90	26,80	12,60
Flavonoïdes	42,30	37,40	23,10	3,90
Esters	17,20	9,00	26,80	12,60



CHAPITRE III
Docking moléculaire



Chapitre III : Le docking moléculaire

Introduction

Le docking moléculaire est une approche théorique permettant la simulation du mode de positionnement et de liaison d'un ligand au sein de son récepteur. L'étude des interactions protéine-protéine ou bien protéine-ligand est très importante pour le développement des nouveaux médicaments [60].

III.1. Principe du docking moléculaire

Le docking décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace tridimensionnel (3D). Il se déroule en deux étapes principales :

La première étape dite de **Docking**, consiste à rechercher et à générer toutes les conformations possibles entre la protéine et le ligand.

La deuxième étape dite de **Scoring**, est une donnée numérique dite fonction de score capable de déterminer la conformation qui représentera le mode d'interaction le plus juste pour chaque ligand par rapport à son récepteur [61, 62].

III.2. Evolution des méthodes du docking moléculaire :

Les méthodes de docking peuvent être classées en trois catégories selon la prise en compte de la flexibilité du ligand [63].

1. **Docking rigide** : La protéine et le ligand sont tous deux considérés complètement rigides. Par conséquent, seuls les degrés de liberté de translation et de rotation du ligand par rapport au récepteur sont discutés. C'est le docking le plus simple et le plus rapide, basé sur le concept « Clé-serrure ».

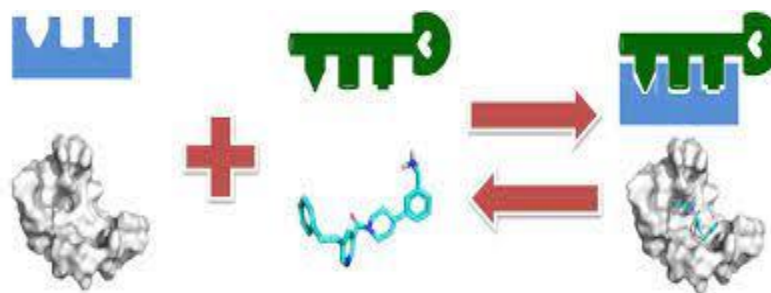


Figure N°6 : Modèle clé-serrure



2. **Docking semi-flexible** : Pendant le processus d'amarrage semi-flexible, la conformation du récepteur fixe reste inchangée, tandis que la conformation du ligand est altérée. Dans la quasi-totalité des programmes de docking utilisés actuellement, la flexibilité du ligand est prise en compte tout en considérant la cible comme corps rigide.

3. **Docking flexible** : L'amarrage flexible est généralement utilisé pour étudier avec précision l'interaction entre les molécules. Il permet de modifier facilement la conformation du système d'amarrage (récepteur et ligand). le processus de ce type est trop compliqué

III.3. Outils du docking moléculaire :

Les éléments indispensables pour pratiquer un docking moléculaire sont : un récepteur macromoléculaire de nature protéique, un ligand et un programme de docking qui prédit la conformation la plus favorable du ligand au sein du récepteur choisi.

1. Récepteur

Un récepteur est une protéine capable de se lier spécifiquement et réversiblement à une autre molécule appelée ligand. Les structures 3D des différentes protéines sont disponibles et accessibles gratuitement dans la banque de données PDB.

Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée [64].

2. Ligand

Le ligand est une molécule capable de se lier de manière réversible à une macromolécule ciblée (le récepteur) pour induire un effet thérapeutique souhaité. Il doit être également sous forme 3D. Pour y obtenir, il existe deux moyens : [65].

Le premier moyen consiste à utiliser des programmes de construction moléculaire 3D tels que ChemDraw, Marvin, Titan, Syby, Arguslab.

Le deuxième moyen consiste à consulter des banques de données de ligands (chimiothèques), qui répertorient un nombre considérable de structures 3D de molécules.



Parmi les chimiothèques les plus utilisés, on cite : PubChem, Zinc, la Chimiothèque Nationale Française.

III.4. Programmes du docking

A présent, un bon nombre de programmes du docking moléculaire (commerciaux ou non) est disponible comme : **DOCK**, **AUTODOCK**, **GOLD**, **FLEXX**, **ZDOCK**, **MZDOCK**, **MSDOCK**, **SURFLEX**, **MCDOCK** et bien d'autres. Ces programmes présentent des algorithmes de recherche et des fonctions de score variés [66].

III.4.1. Programme Surfex

Le programme Surfex est l'un des meilleurs logiciels de docking moléculaire et qui a été utilisé dans le présent travail. Ce programme repose sur l'ajustement de fragments en commençant par construire un modèle « en négatif » du site actif dit protomol [67].

Surfex est un algorithme d'amarrage moléculaire flexible entièrement automatique qui combine la fonction de notation du système d'amarrage Hammerhead avec un moteur de recherche qui s'appuie sur une méthode de similarité moléculaire basée sur la surface comme moyen de générer rapidement des poses putatives appropriées pour les fragments moléculaires [68].

Partie expérimentale

CHAPITRE I
Matériel et méthodes




I. Etude expérimentale

I.1. Présentation de la matière première

Notre étude expérimentale se tourne autour de trois échantillons de la propolis Algérienne issus de trois régions différentes de l'est Algérien : OUED ZEHOUR (wilaya de Skikda), EL TAHIR (Wilaya de Jijel) et OUED ATHMANIA (Wilaya de Mila). Les caractéristiques de ces échantillons sont représentées dans le tableau N° 7.

Tableau N°7 : Présentation de la matière première

Abréviation de l'échantillon	PRO Z	PRO TAH	PRO ATH
Wilaya	SKIKDA	JIJEL	MILA
Commune	OUED ZEHOUR	EL TAHIR	OUED ATHMANIA
Couleur	Jaune foncé	Marron clair	Marron foncé
Poids (g)	40	80	85
Propolis récoltée			

PRO Z: propolis d'Oued Zehour ; PRO TAH: propolis d'El Tahir ; PRO ATH: propolis d'El Athmania.

I.2. Préparation des échantillons

La méthode utilisée lors de l'extraction est celle de Park et Ikegaki (1998) par macération dans un solvant volatil [69].

I.2.1. Broyage

La propolis obtenue est conservée au froid à -16°C pendant 24h puis broyée par un mixeur.

Les échantillons après broyage sont présentés dans la figure N°7 :



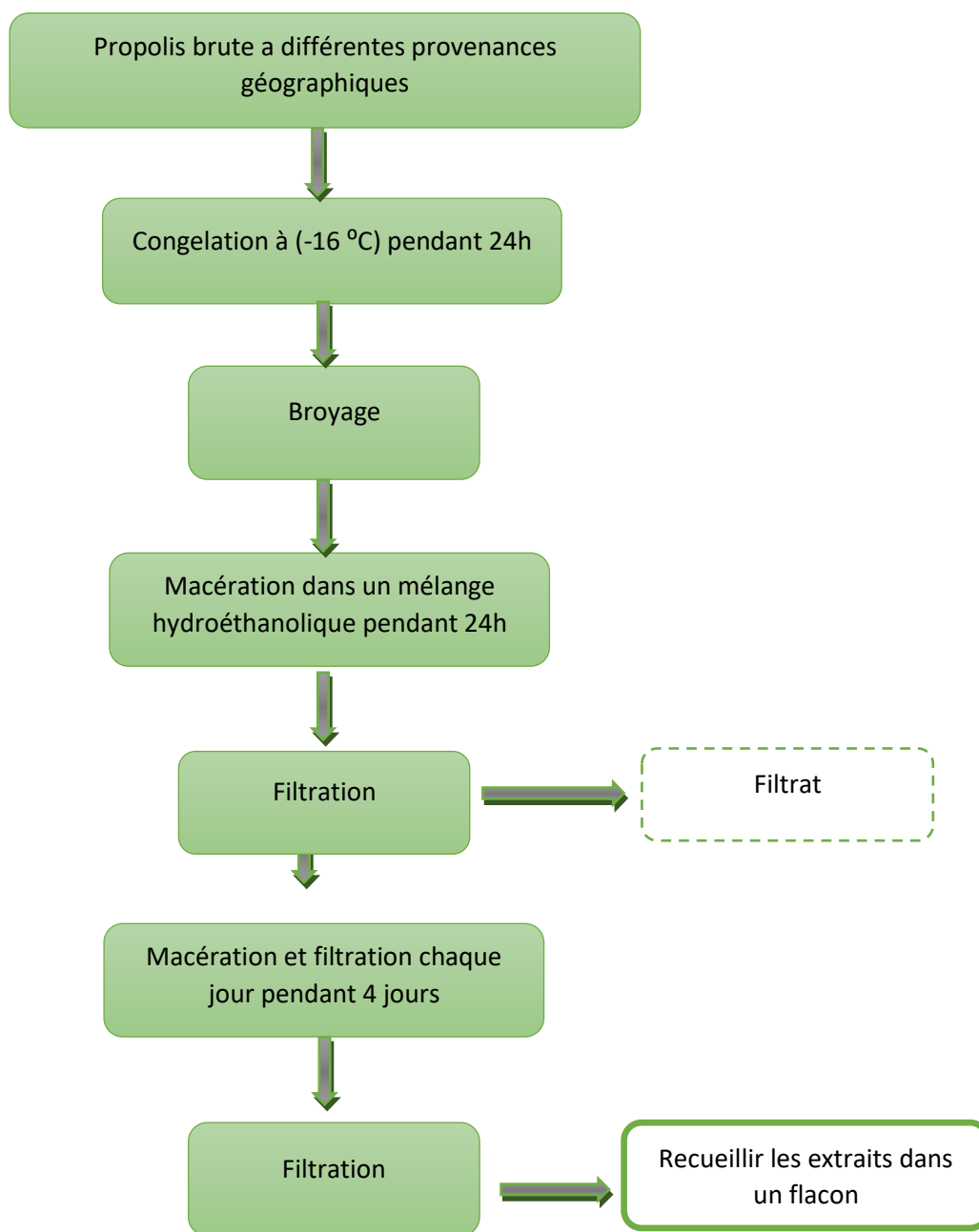
Figure N°7 : Echantillons après broyage

I.2.2. Préparation des extraits éthanoliques

Le mélange alcool-eau représente un solvant polaire pouvant extraire des composés phénoliques. Dans notre travail, nous avons utilisé le mélange hydroéthanolique (Ethanol/Eau ; 80/20 ; v/v) comme solvant d'extraction.

I.2.3. Extraction

L'extraction par macération consiste à maintenir les broyats obtenus en contact prolongé avec un solvant. C'est une extraction qui se fait à température ambiante. Elle permet également d'effectuer l'extraction jusqu'à épuisement des substances naturelles si la durée d'extraction est élevée. Dans notre travail, les trois échantillons ont été macérés dans 250mL de mélange hydroéthanolique (80/20 : v/v) séparément pendant 24 heures puis filtrées. Par la suite, le filtrat est de nouveau macéré dans un mélange hydroéthanolique comme précédemment. Cette opération a été répétée 5 fois et ce pour épuiser les échantillons et en extraire le maximum possible des composés. Les filtrats sont évaporés par l'évaporateur rotatif afin d'obtenir des extraits secs et facile à manipuler. Le diagramme ci-dessous représente le processus d'extraction que nous avons réalisé.



Les extraits secs obtenus après l'évaporation sont représentés dans la figure N°8 :

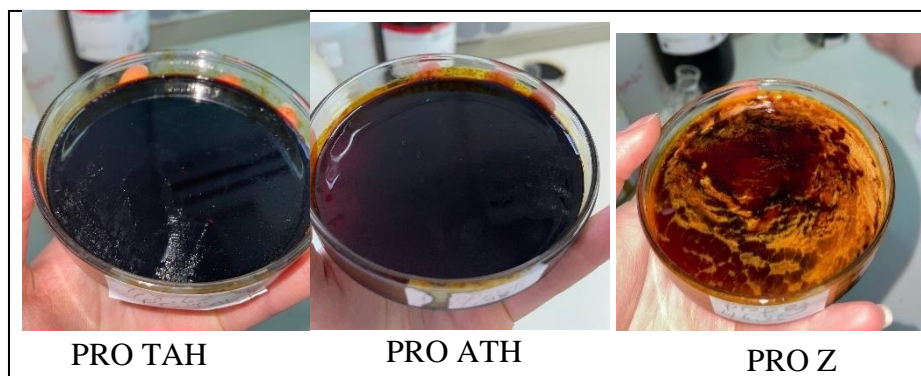


Figure N°8 : Etat finale des extraits après évaporation

I.3. Détermination du rendement

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids de chaque extrait et le poids de la poudre d'échantillon à traiter. Le rendement en pourcentage (R) est calculé par la formule suivante :

$$R = (PE / PP) \times 100.$$

PE : poids de l'extrait sec en g.

PP : poids de la poudre d'échantillon en g.

I.4. Tests qualitatif

Les tests phytochimiques consistent à mettre en évidence les différentes familles des métabolites secondaires existants dans la propolis, et ceci par une caractérisation qualitative [70].

I.4.1. Test qualitatif des flavonoïdes

Un volume d'extrait (2 ml) a été mélangé avec 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré et 0,5 g de magnésium métallique. Une coloration rose/rouge développée après 3 minutes indique la présence de flavonoïdes.

I.4.2. Test qualitatif des coumarines

Dans un tube à essai, quelques gouttes d'eau distillée ont été ajoutées à 1 ml de l'extrait. Le tube a été recouvert de papier imbibé d'hydroxyde de sodium (10%). Par la suite, le tube a été chauffé jusqu'à ébullition. La fluorescence jaunâtre sous lampe UV indique la présence de coumarines.



I.4.3. Teste qualitatif des tannins

La présence des tanins est mise en évidence par l'addition à 1 ml de l'extrait aqueux de la propolis, de 2 ml d'eau et de 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire ou bleu-vert.

I.5. Analyse chromatographique (Chromatographie sur couche mince)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode analytique rapide et simple permettant de donner une appréciation globale sur les métabolites présents dans un extrait [71].

Mode opératoire

Tous les extraits obtenus à partir des extraits de propolis étudiés ont été analysés qualitativement par chromatographie sur couche mince.

- Phase mobile

Egalement appelée éluant est un solvant (ou un mélange de solvants) qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur un support entraînant les composants de l'échantillon. Dans notre étude nous avons utilisé trois systèmes solvants :

1. Diethyl-ether/Dichlorométhane avec une proportion 5 : 5
2. *n*-hexane/acétate d'éthyle /méthanol avec une proportion 7 : 4 : 0.5
3. *n*-hexane/dichlorométhane/méthanol avec une proportion 7 : 4 : 0.5

- Phase stationnaire



Figure N°9 : La chromatographie sur couche mince sur des plaques de type GF 254



- Dépôt des échantillons

Une ligne de dépôt des extraits est tracée à 0,5cm du bord inférieur de la plaque. Puis les échantillons en solution sont déposés sous forme de points sur la ligne de dépôt à l'aide d'une pipette pasteur. Ils sont espacés de 1cm alors que les dépôts extrêmes sont réalisés à 0,5cm des bords. Les dépôts sont séchés immédiatement à l'aide d'un sèche-cheveux.

- Développement du chromatogramme

La plaque est alors disposée en position verticale légèrement inclinée dans la cuve contenant le solvant d'éluion après saturation (une demi-heure), puis on ferme la cuve. Ainsi, le solvant migre par capillarité vers le haut le long de la plaque chromatographique. Lorsque le front de solvant se trouve à 8mm du bord supérieur de la plaque, on la retire de la cuve et elle est séchée à l'air libre.

- Révélation

Après la migration et le séchage, les chromatogrammes ont été observés sous UV à 254 puis à 365nm. Pour la condensation des couleurs des spots, nous avons utilisé les vapeurs d'Ammoniac (NH_3) afin de visualiser les changements des spots correspondant aux flavonoïdes. Puis nous avons calculé le rapport frontal de chaque spot.

I.6. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été réalisée à l'aide d'un système de chromatographie liquide haute performance (Shimadzu Coopération, Japon) qui se compose d'une unité de distribution de solvant Shimadzu modèle LC-20AT et d'un système de détection à barrette de diodes Shimadzu modèle SPD-M20A, contrôlé par un logiciel de solution LC (Contrôleur système CBM-20A, Shimadzu).

La séparation a été effectuée sur une colonne analytique Inertsil ODS-3 (4 μm , 4,0 mm x 150 mm) et une colonne analytique de garde Inertsil ODS-3. Le débit a été fixé à 0,6 ml/min et la température de la colonne a été ajustée à 35°C. Le programme solvant était le suivant :

Les phases mobiles étaient de l'acide acétique aqueux, 0,1 % (A) et du méthanol (B). L'extrait de propolis (8 mg) a été dissous dans 1 ml (8 mg.mL⁻¹) de méthanol à température ambiante et filtré à travers un filtre PTFE (0,45 μm) par un injecteur pour éliminer les particules. Le volume d'injection était de 20 μL et La détection a été effectuée à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) à une longueur d'onde de 254 nm. L'analyse HPLC a été réalisée à l'aide de 42 étalons de référence (acides phénoliques, flavonoïdes et organiques).



L'identification des composés phénoliques a été confirmée par comparaison directe des temps de rétention et des spectres acquis dans les mêmes conditions analytiques, et les résultats ont été exprimés en microgrammes par gramme de poids sec.

I.7. Activité anti-oxydante

L'activité antioxydant des trois échantillons de la propolis a été évaluée selon cinq méthodes : piégeage du radical libre DPPH, piégeage de l'ABTS, réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline, reducing power et snp.

I.7.1. Activité anti radicalaire au DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres a été menée selon la méthode de Blois (1958) [72]. En effet, 40 μ L/1 ml MeOH de l'échantillon à différentes concentrations, ont été ajoutés à 160 μ L de DPPH fraîchement préparée à une concentration de (0,1 mM). L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm, après une incubation de 30 min à température ambiante et dans l'obscurité.

I.7.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS

Ce test a été réalisé selon la méthode de Re (1999) [73], avec une légère modification. Le radical ABTS est produit par l'oxydation de l'ABTS (7 mM), par le persulfate de potassium (2,4mM). Le mélange a été conservé pendant 16 heures dans l'obscurité et à température ambiante. Par la suite, le mélange a été dilué avec l'eau distillé afin de parvenir à une absorbance de $0,7 \pm 0.02$ à 734 nm. 160 μ L de cette solution d'ABTS ont été ajoutée à 40 μ L de différentes concentrations de l'extrait étudié, Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 734 nm.

I.7.3. Activité de phenanthroline

L'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phenanthroline des extraits a été évaluée selon la méthode décrite par Szydłowska-Czerniaka (2008) [74]. 10 μ l des extraits avec différentes concentrations, ont été ajoutés à une solution de : 50 μ l $FeCl_3$ (0.2%), 30 μ l Phenanthroline (0.5%) et 110 μ l de méthanol. Le mélange a été agité vigoureusement et incubé pendant 20 min à l'étuve à température de 30°C. L'absorbance a été déterminée à 510 nm.

I.7.4. Activité du reducing power

L'activité « **reducing power** » a été évaluée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986) [75]. 10 μ l de l'extrait à différentes concentrations ont été mélangées avec 40 μ l d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50 μ l d'une solution de ferricyanure de potassium



$K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 μ L de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, 40 μ L d'eau distillée et 10 μ L d'une solution aqueuse de chlorure ferrique $FeCl_3$ à 0,1% sont additionnés. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 700 nm.

I.7.5. Activité Silver nanoparticle (SNP)

L'activité Métal Chélate est déterminée selon la méthode de Mustafa Özyürek, (2012) [76]. Brièvement, 20 μ l de l'extrait à différentes concentrations ont été mélangées avec 130 μ L de solution SNP et 50 μ l d'eau distillé. L'ensemble est incubé à 25 °C pendant 30 min. La lecture de l'absorbance a été mesurée à 423 nm.

I.7.6. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois essais. Les valeurs de l'IC₅₀ (Concentration d'inhibition à 50%) et de A 0.5 (la concentration indiquant 0,50 d'absorbance) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir des deux courbes : [% inhibition = f (concentrations)] pour l'IC₅₀ et [Absorbance= f (concentrations)] pour la A 0.50.

I.8 Activité anti-enzymatique

I.8.1 Activité Acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase

L'activité anticholinestérasique a été menée selon la méthode d'Ellman et al. (1961) [77], avec une légère modification. Brièvement, 150 μ L de sodium phosphate buffer (pH 8.0) ont été mélangé avec 10 μ L d'extrait solution dissous dans méthanol a différentes concentrations et 20 μ L AChE (5.32 \times 10⁻³ U) ou BChE (6.85 \times 10⁻³ U) solution. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 15 mn. Ensuite 10 μ L de DTNB (0.5 mM) ont été ajoutés à 10 μ L d'acetylthiocholineiodide (0.71 mM) ou 10 μ L de butyrylthiocholinechloride (0.2 mM). La lecture de l'absorbance a été mesurée à 412 nm, pour 0 mn et 15 mn. Le pourcentage d'inhibition de AChE ou BChE enzymes est déterminé contre un blanc (éthanol avec le phosphate buffer pH 8) par la formule $(E - S)/E * 100$.

E : l'activité de l'enzyme sans extrait / S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

La galantamine est utilisé comme référence.



I.9 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des extraits de la propolis a été évaluée sur quatre souches bactériennes dont deux à Gram + : *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* ATCC 4698 ; et deux à Gram - : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. et une souche fongique *Candida albicans*. Dans cette optique, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé : le principe de cette méthode est d'utiliser des disques stériles du papier Wattman de 6 mm de diamètre. Chaque disque est imprégné de 20 microlitres des extraits à différentes concentrations (20 ; 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,625 mg/ml qui convient de 20mg de propolis). Ces disques sont déposés à la surface d'un milieu inondé par une suspension microbienne. (Figure N°10). Nous avons utilisé pour les levures le milieu dextrosé à la pomme de terre (PDA), et le milieu gélose nutritive (GN) pour souches bactériennes. Après 24 heures à 37°C d'incubation des souches microbiennes et cinq jours à une température de 28 à 30 C° d'incubation des souches fongiques, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

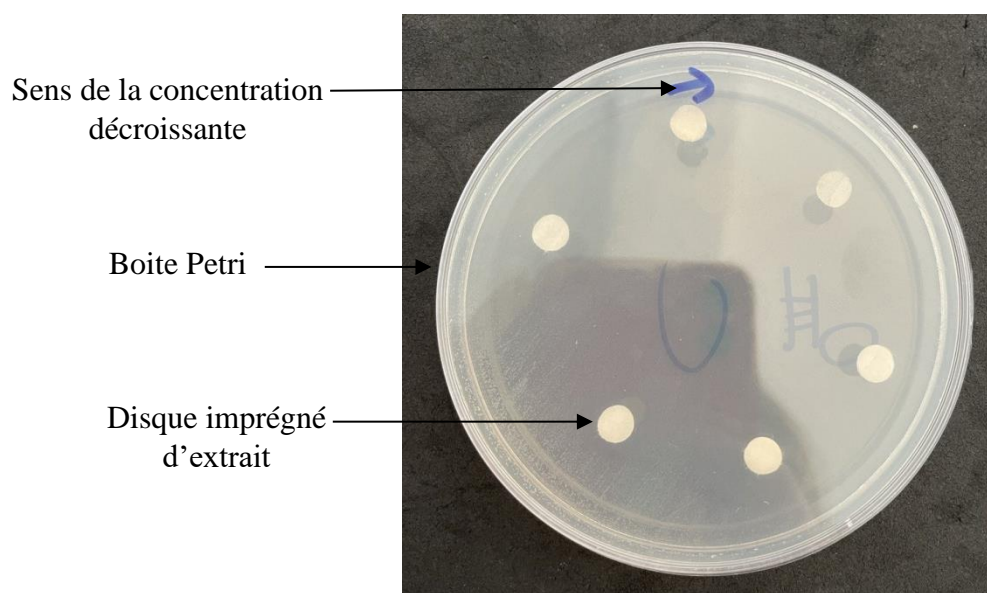


Figure N°10 : Méthode utilisée pour l'activité antibactérienne



II. Etude *in silico*

La partie *in silico* faisant suite à la partie expérimentale de notre travail nous permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'interaction de nos composés identifiés par HPLC dans les 3 échantillons de la propolis vis-à-vis des cibles enzymatiques étudiées : Acétylcholinestérase et Butyrylcholinestérase.

II. 1. Matériel

II.1.1. Programmes

Pour réaliser ce travail nous avons utilisé plusieurs programmes suivants :

- ✓ **Surflex version 1.3** : est le programme de docking moléculaire que nous avons utilisé dans notre étude. Ce programme repose sur l'algorithme de fragmentation/reconstruction permettant un docking rapide et précis des composés étudiés à l'égard des cibles enzymatique [68].
- ✓ **Open Babel** : est logiciel libre principalement utilisé dans des applications de chemo-informatique pour la conversion de fichiers de structures chimiques. Les formats de fichier que le programme Open Babel prend en charge comprennent : PDB, MOL, MOL2, SDF, XYZ, PC, SMI...etc. [78].
- ✓ **ChemDraw 3D** : est un logiciel de modélisation qui nous a permis de construire, de générer des modèles 3D et d'optimiser la géométrie des différents inhibiteurs.
- ✓ **Biovia Discovery studio visualizer 2019** : Il s'agit d'un programme libre permettant la visualisation des interactions enzyme-inhibiteurs que nous avons étudié [79].

II.1.2. Sites et serveurs en ligne

- ✓ **Protein Data Bank (PDB)** : Il s'agit d'une banque de données des structures 3D des macromolécules biologiques notamment les protéines et les acides nucléiques. La PDB est accessible gratuitement sur le Web (<https://www.rcsb.org/>). Elle nous a permis d'obtenir la structure 3D de notre cible et des autres complexes protéine-ligand utilisés pour vérifier la fiabilité du programme Surflex par le test RMSD [80].



II.2. Méthode

II.2.1. Préparation des molécules pour le docking moléculaire

1. Préparation d'enzyme

Les composés que nous avons identifiés par HPLC dans les 3 échantillons de propolis étudiés ont fait l'objet d'une étude *in silico* de leur potentiel inhibiteur à l'égard de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). La structure 3D de ces deux enzymes cibles a été téléchargée à partir de la PDB sous les codes **4M0E** et **2XQF** respectivement. Les caractéristiques de ces deux codes sont représentées dans le tableau N°8.

Tableau N°8 : Caractéristiques des structures cristallographiques de l'AChE et la BChE.

Cible	Code pdb	Nombre de chaîne	Nombre d'acide aminés par chaîne	Ligand de référence
AChE	4M0E	Chaîne A et B	542	1YL
BChE	2XQF	Chaîne A	527	VX

Un fichier de structure PDB n'est pas adapté pour une utilisation immédiate et nécessitant ainsi une préparation préalable avant de passer au docking moléculaire. Lors de cette préparation, nous avons ajouté les hydrogènes qui manquent tout en éliminant les molécules d'eau. Par la suite, le fichier des cibles ont été convertis en mol2.

2. Préparation des ligands

Les composés identifiés par HPLC dans les 3 échantillons de propolis étudiés ont été dessinés à l'aide du programme de construction moléculaire ChamDraw 3D. Par la suite, une étape de minimisation de l'énergie a été réalisée afin d'optimiser la géométrie de chaque molécule en utilisant le champ de force MM2 présent dans chemDraw3D. Enfin, ces composés ont enregistré sous le format mol2.

II.2.2. Calculs de docking moléculaire

Le docking moléculaire par Surflex exige de passer par les étapes suivantes :

1ère étape : Génération du protomol

Le programme Surflex identifie le site actif d'une enzyme par la construction d'une pseudo-molécule appelée « protomol » au tour d'un ligand de référence. Cette étape réalisée grâce à la commande suivante :

```
Surflex-dock proto ligand.mol2 protein.mol2 pl
```




2ème étape : Docking moléculaire

Cette étape nécessite la disponibilité de la protéine format .mol2, le protomol généré dans l'étape précédente et les ligands sous format .mol2. Le docking moléculaire par « Surfex » permet d'avoir les dix (10) meilleures positions de chaque ligand au sein du site actif étudié, classées selon leur score (Final-0, Final-1...Final-9). Cette étape a été réalisée par la commande suivante :

```
Surflex-dock dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 protein.mol2
```

II.2.3. Test RMSD

La capacité d'un logiciel de docking à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à son récepteur est habituellement déterminée au moyen de la Déviation Quadratique Moyenne ou RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre le modèle du ligand simulé par docking moléculaire vis-à-vis de celui de référence (déterminé expérimentalement). La valeur seuil admise est une différence maximale de 2Å [81]. Dans notre travail, le test de fiabilité du programme Surfex par RMSD a été réalisé sur 100 complexes protéine-ligand pris de manière aléatoire via la PDB. En effet, ces complexes ont été séparés, dans deux fichiers différents, (protéine et ligand). Par la suite, nous avons converti ces fichiers du format pdb au format mol2. Ainsi la valeur du RMSD de chaque complexe a été calculée par la commande suivante :

```
Surflex-dock rms final-0.mol2 ligand.mol2
```

II.2.4. Analyse visuelle

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape importante qui permet de vérifier et de comparer les résultats numériques du RMSD. Elle permet de mettre en évidence la superposition entre le modèle du ligand simulé par docking moléculaire vis-à-vis de celui de référence (déterminé expérimentalement).



CHAPITRE II
Résultats et discussion



Le présent travail vise la valorisation de trois échantillons de la propolis issus de trois régions différentes de l'est Algérien à savoir OUED ZEHOOR (wilaya de Skikda), EL TAHIR (Wilaya de Jijel) et OUED ATHMANIA (Wilaya de Mila). Dans cette perspective, nous avons réalisé les étapes suivantes :

- Extraction de la propolis
- Screening phytochimique
- Identification structurale par HPLC
- Tests biologiques (activité antioxydante, anticholinestérase, antibactérienne et antifongique).
- Docking moléculaire

I.1. Rendement d'extraction

A titre de rappel, l'extraction des composés phénoliques issus de la propolis a été menée en utilisant un mélange hydroéthanolique (80/20 : v/v). Le rendement d'extraction obtenu pour les trois échantillons étudiés est illustré dans la figure N°10.

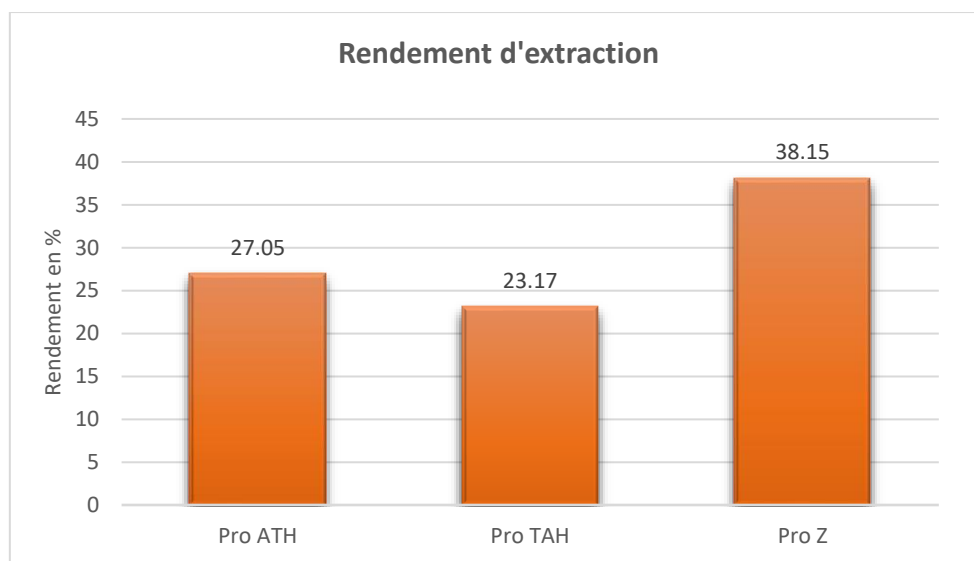


Figure N°10 : Rendement d'extraction

Il ressort de la figure N°10 que l'extrait PRO Z présente le rendement le plus élevé (38,15%) suivi par l'extrait PRO ATH (El athmania – Mila) (27,05%) et le Pro TAH (Tahir – Jijel) (23,17%). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Rebiai *et al.* (2013) ont trouvé un rendement très faible de 0.72% pour la propolis de Ghardaïa et seulement 2.41% pour celle de Khenchla [82]. Cette variation dépend du solvant d'extraction ainsi que la






provenance de la propolis, ce qui prouve une fois de plus la complexité de la composition de la propolis.

I.2. Screening phytochimique

Plusieurs tests ont été menés afin de mettre en évidence la présence de quelques familles chimiques dans les échantillons étudiés. Les résultats de ces tests sont illustrés dans le tableau N°9 :

Tableau N°9 : Screening phytochimiques des extraits de propolis

Echantillons	PRO TAH	PRO ATh	PRO Z	Couleur
Tanins	+++	++	++	
Flavonoïdes	+++	+++	+++	
Coumarines	+	+	+	

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif.

Les résultats du screening phytochimique représentés dans le tableau N°10 ont permis de mettre en évidence la présence des composés phénoliques qui sont caractérisés par leur richesse en tanins et flavonoïdes par rapport à celle des coumarines. De façon générale, les composés phénoliques dans notre étude viennent confirmer les travaux de Segueni et al (2017), Boulechfar et al (2021) sur la propolis d'Algérie [83, 84].

I.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM a été réalisée sur les trois extraits de la propolis afin d'avoir une idée sur leur composition chimique. Dans cette optique, trois systèmes solvant ont été utilisés : (Diethyl-ether/Dichlorométhane) (5 : 5) ; (*n*-hexane/Acétate d'éthyle/Méthanol) (7 : 4 : 0.5) et (*n*-hexane/Dichlorométhane/Méthanol) (7 : 4 : 0.5).

Les chromatogrammes résultant comportent une série de spots (figure N°11), l'identification préliminaire des composés étant basée sur la comparaison des rapports frontaux R_f et la couleur observée sous la lumière UV à 365nm.

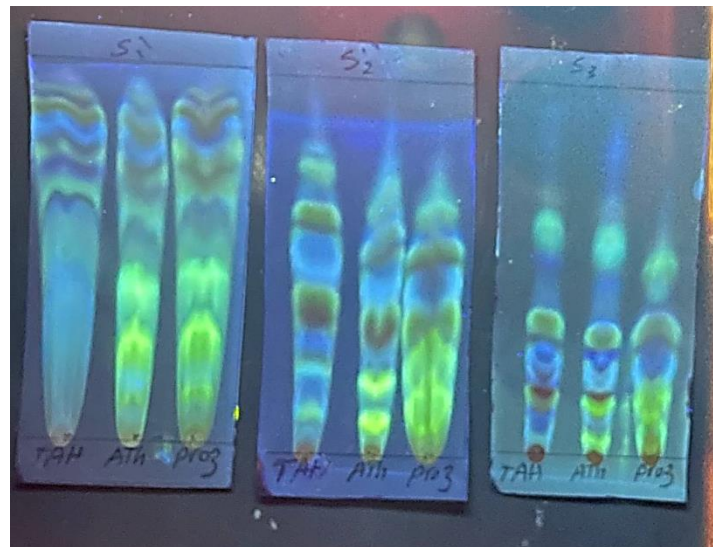


Figure N°11 : Chromatographie sur couche mince

Les tableaux N°10, 11 et 12 comportent les Rf des différents spots apparus, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV selon le système solvant utilisé.



Tableau N°10 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV dans le système solvant 1 (Markham, 1982) [85].

Ech	Types de composé possible	Couleur sous UV	Rf	
PRO TAH	Flavonols, flavonones, aurones.	Vert	0,85	
	Flavone	Violet	0,81	
	Anthocyanidine 3-glucoside.	Marron	0,77	
	Flavonols, flavones, aurones			
	Acide phénolique ou Coumarine	Bleu	0,73	
	Flavonols, flavonones, aurones.	Vert	0,63	
Acide phénolique ou coumarine	Bleu	0,40		
PRO ATH	Flavone	Violet	0,80	
	Anthocyanidine 3-glucoside.	Marron	0,70	
	Flavonols, flavones, aurones			
	Flavonols	Jaune	0,39	
PRO Z	Flavonols, flavonones, aurones.	Vert	0,25	
	Anthocyanidine 3-glucoside.	Marron	0,84	
	Flavonols, flavones, aurones			
	Flavonols, flavonones, aurones.	Vert	0,76	
	Flavone	Violet	0,70	
Flavonols, flavonones, aurones.	Vert	0,44		
Flavonols	Jaune	0,31		



Tableau N°11 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV par le système solvant 2

Ech	Types de composé possible	Couleur sous UV	Rf	
PRO TAH	Flavonols, flavonones, auronnes.	Vert	0,73	
	Anthocyanidine 3-glucoside.	Marron	0,62	
	Flavonols, flavones, auronnes	Bleu	0,50	
	Acide phénolique Coumarine	Marron	0,38	
	Anthocyanidine 3-glucoside.			
	Flavonols, flavones, auronnes			
Flavonols, flavonones, auronnes.	Vert	0,20		
Flavonols	Jaune clair	0,10		
PRO ATH	Anthocyanidine 3-glucoside.	Marron	0,53	
	Flavonols, flavones, auronnes	Bleu	0,44	
	Acide phénolique Coumarine	Marron	0,32	
	Anthocyanidine 3-glucoside.			
	Flavonols, flavones, auronnes	Vert	0,25	
	Flavonols, flavonones, auronnes.	Jaune	0,09	
PRO Z	Anthocyanidine 3-glucoside.	Marron	0,53	
	Flavonols, flavones, auronnes.	Bleu	0,44	
	Acide phénolique Coumarine	Marron	0,36	
	Anthocyanidine 3-glucoside.	Vert	0,25	
	Flavonols, flavones, auronnes.			
	Flavonols, flavonones, auronnes	Jaune	0,12	
Flavonol				



Tableau N°12 : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV par le système solvant 3

Ech	Types de composé possible	Couleur sous UV	Rf	
PRO TAH	Flavones	Violet	0,94	
	Flavonols, flavonones, auronnes	Vert	0,79	
	Acide phénolique			
	Coumarine	Bleu	0,60	
	Anthocyanidine 3-glucoside. Flavonols, flavones, auronnes.	Marron	0,5	
	Acide phénolique	Bleu	0,31	
	Coumarine	Marron	0,18	
	Anthocyanidine 3-glucoside. Flavonols, flavones, auronnes.			
	Acide phénolique	Bleu	0,08	
Coumarine	Jaune	0,04		
Flavonols				
PRO ATH	Flavone	Violet	0,93	
	Flavonols, flavonones, auronnes.	Vert	0,77	
	Acide phénolique			
	Coumarine	Bleu	0,64	
	Anthocyanidine 3-glucoside. Flavonols, flavones, auronnes.	Marron	0,45	
	Acide phenolique	Bleu	0,36	
	Coumarine			
	Anthocyanidine 3-glucoside. Flavonols, flavones, auronnes.	Marron	0,18	
	Flavonols	Jaune	0,14	
Flavonols, flavonones, auronnes	Vert	0,05		
PRO Z	Flavonols, flavonones, auronnes	Vert	0,77	
	Acide phénolique			
	Coumarine	Bleu	0,6	
	Anthocyanidine 3-glucoside. Flavonols, flavones, auronnes.	Marron	0,45	
	Acide phénolique	Bleu	0,32	
	Coumarine	Jaune	0,18	
Flavonols	Vert	0,08		
Flavonols, flavonones, auronnes				



I.4. Identification des composés par HPLC

Les composés présents dans les extraits issus des 3 échantillons de la propolis algérienne ont été identifiés par HPLC en comparant leur temps de rétention (RT) avec des composés de référence (29 standards phénoliques). Au total, 17, 15, et 13 composés ont été détectés dans les extraits PRO ATH, PRO TAH, PRO Z respectivement.

Il ressort du tableau N°13 que certaines molécules sont présentes dans les trois échantillons avec des petites quantités tels que : P-acidecoumarique, vanilline, acide vanilique et 6,7-dihydroxy-coumarin. Il y'en a d'autres qui se trouvent dans un des trois extraits comme : Trans 2-hydroxycinnanicacide et la rutine dans la propolis PRO TAH, et la coumarine dans la PRO Z uniquement. De plus, les acides phénoliques les plus abondants trouvés dans les échantillons PRO ATH, PRO TAH, PRO Z était l'acide caféique avec une quantité de 5.91, 18.28 et 0.48 mg/g respectivement. Alors que l'acide ellagique détecté uniquement dans l'échantillon TAH avec une valeur de 3.93 mg/g .Par contre six flavonoïdes : Naringenine, cynarine, quercétine, kaempférol, apigénine et hespérétine étaient présents dans tous les échantillons de propolis. Relativement, l'hespérétine et la Naringenine étaient les composants les plus abondants dans l'extrait TAH avec une quantité de 12,18, 6,05 et 9.49mg/g. Certains composés ont été exclusivement détectés dans Ath comme oleuropeine, lutéoléine et la chrysine dans l'extrait PRO TAH avec une valeur de 18.84 mg/g.

**Tableau N°13** : Composition chimiques des trois échantillons par HPLC

Composé	RT	PRO ATH	PRO TAH	PRO Z
		mg/g	mg/g	mg/g
Acide Protocatechique	22.39	0.16	0.10	0.03
Théophylline	29.44
Acide 4-Hydroxy-Benzoïque	31.69	0.08	tr	0.03
6,7-Diohcoumarin	33.43	tr	tr	tr
Acide Vanilique	34.68	tr	tr	tr
Acide Caféique	35.19	5.91	18.28	0.48
Vanilline	37.12	tr	tr	tr
Acide Chlorogénique	38.88	0.12	0.12	..
Acide P-Coumarique	40.81	tr	tr	tr
Acide Ferulique	42.92	0.52	0.58	0.09
Cynarine	43.85	7.38	7.70	6.78
Coumarine	44.91	tr
Gallate de Propyle	46.98
Rutine	47.52	..	tr	..
Acide Trans-2-Hydroxycinnamique	48.07	..	tr	..
Acide Ellagique	50.00	..	3.93	..
Fisetine	51.24
Quersetine	55.42	0.59	1.29	0.63
Acide Trans cinnamique	55.92
Lutéoline	57.87	1.00
Kæmpferol	62.48	0.52	1.93	1.02
Apigénine	64.07	0.68	4.06	1.08
Chrysine	72.77	9.16	18.84	6.31
4-Hydroxylresorcinol	73.06	364.21	774.65	386.97
1,4-Diclorobenzène	73.81	36.68	39.79	31.43
Hespéridine	47.38	0.13	1.02	..
Oleuropeine	49.54	0.37
Naringénine	55.51	2.38	9.49	2.43
Hesperétine	57.47	7.69	12.18	9.09

RT : Rétention time ; Tr : trace de petite quantité ; .. : Absence

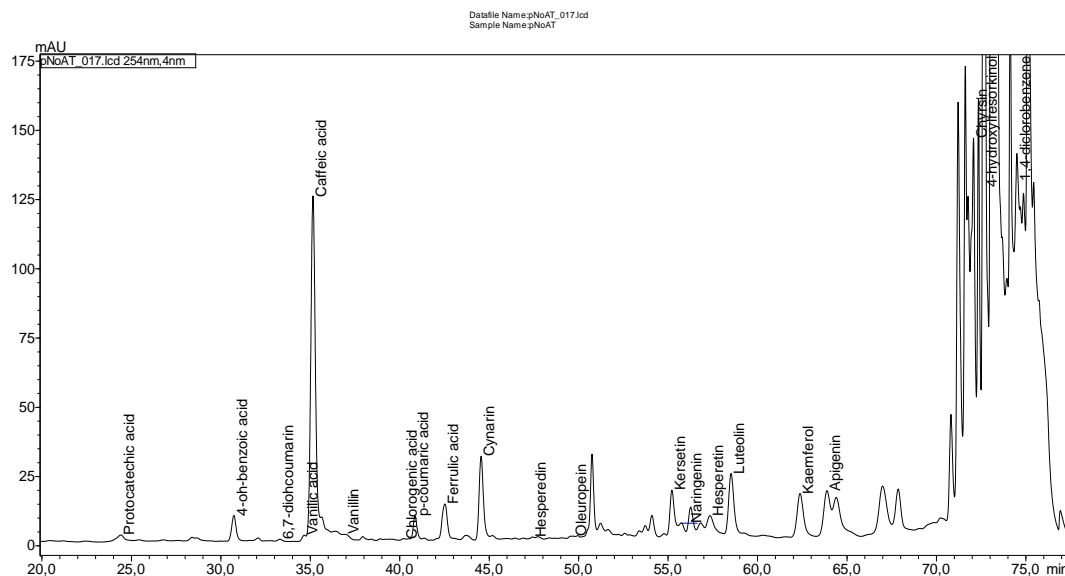


Figure N°12 : Chromatogramme d'HPLC de PRO ATH

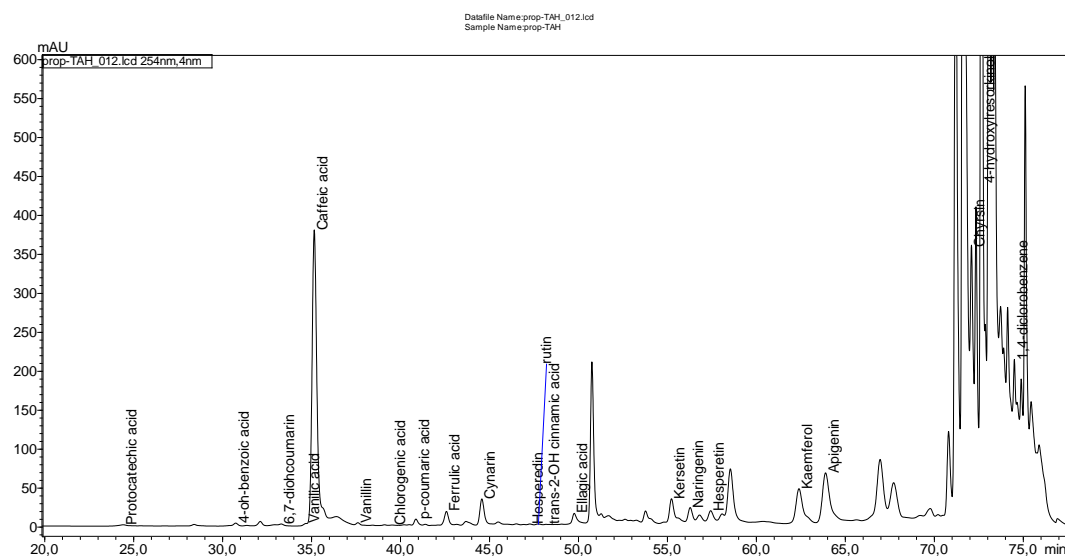


Figure N°13 : Chromatogramme d'HPLC de PRO TAH

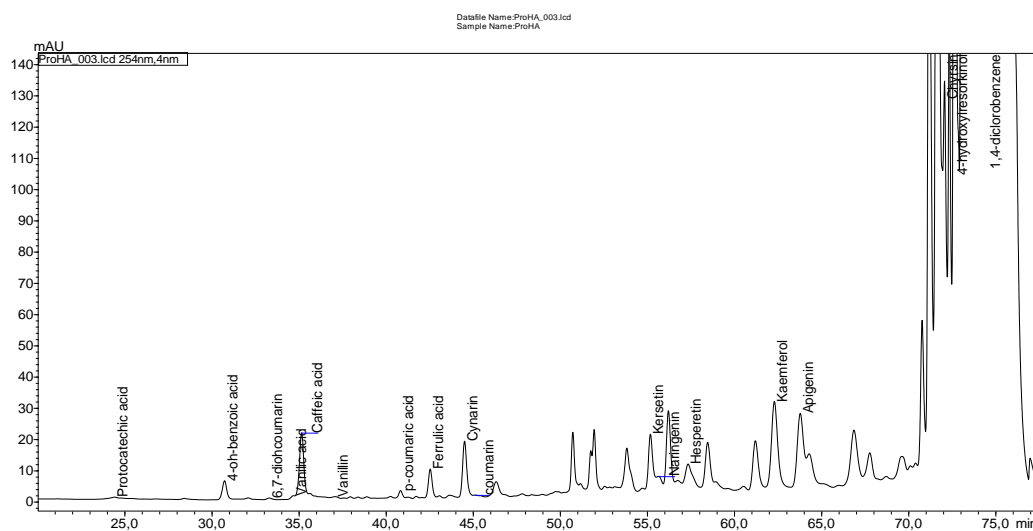


Figure N°14 : Chromatogramme d'HPLC de la PRO Z



I.5. Activités antioxydantes

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'activité antioxydante. Certaines d'entre elles reposent sur la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant et d'autres reposent sur la mesure de la capacité d'une substance à piéger les composés radicalaires [86], Dans notre travail, nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits de la propolis par cinq méthodes différentes :

I.5.1. Activité antiradicalaire DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie à 517 nm, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune. Dans ce test, les résultats ont été comparés aux étalons de référence (BHA, BHT). L'IC₅₀ d'une substance antioxydante correspond à la concentration nécessaire pour inhiber 50 % d'un oxydant impliqué. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé Chen *et al.* (2013) [87]. Les résultats sont présentés dans dans la Figure N°15, Tableau N°14 et l'annexe 1.

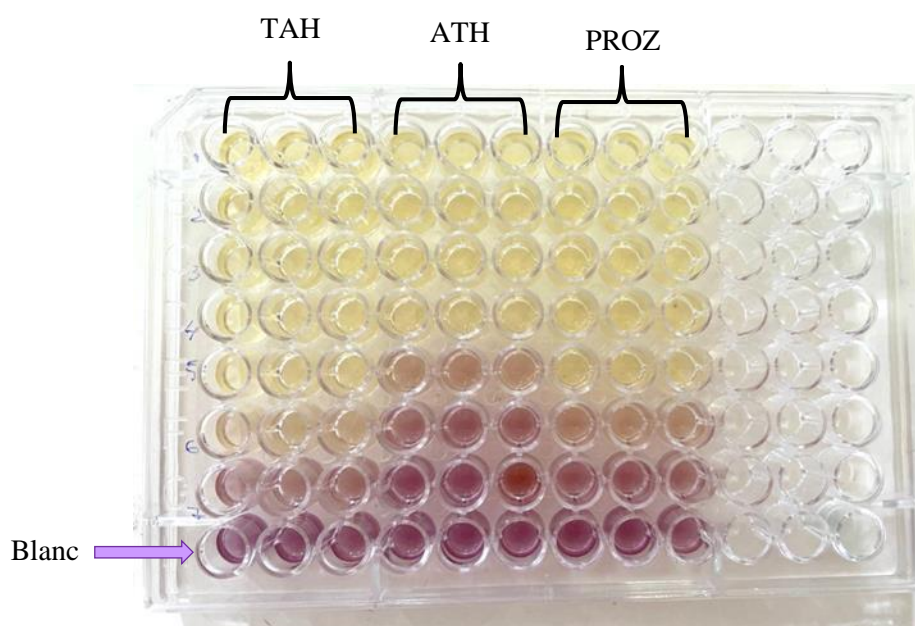


Figure N°15 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH)


Tableau N°14 : Pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ du test DPPH

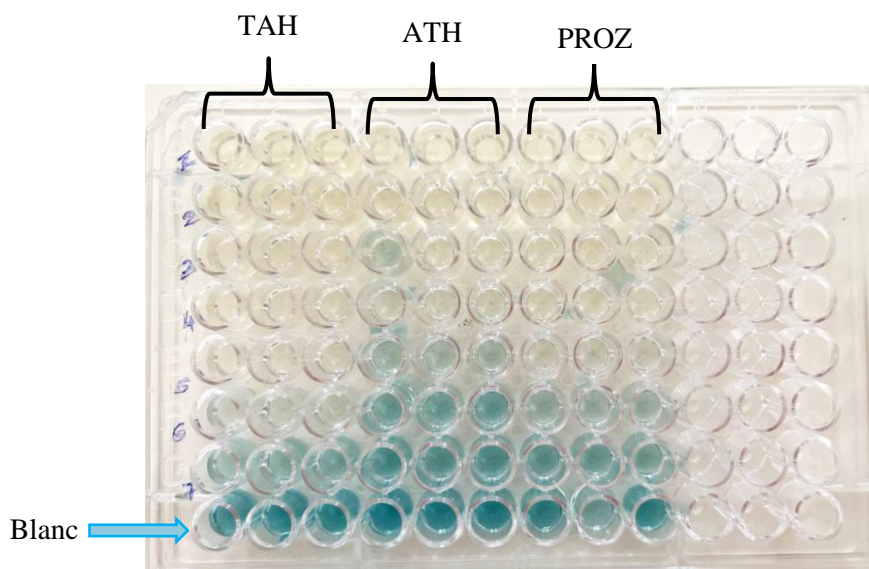
Extracts	% Inhibition in DPPH assay							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
PRO TAH	39,83±0,46	71,99±1,33	84,98±0,79	84,98±1,00	Sat	Sat	Sat	15,05±0,28
PRO ATH	17,84±1,48	26,84±1,11	56,44±1,57	82,96±1,87	84,50±0,16	84,82±0,42	Sat	44,67±1,28
PRO Z	29,23±3,46	56,92±0,74	82,91±0,97	83,49±0,37	84,19±0,32	84,88±1,45	85,14±1,05	24,51±1,04
BHA	76,55±0,48	79,89±0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00	6.14±0.41
BHT	49,09±0,76	72,63±2,06	88.73±0,89	94.00±0,31	94.97±0,08	95.38±0,41	95.02±0,23	12.99±0.41
α-Tocopherol	37,21±1,82	81,53±1,51	89,23±0,12	89,38±0,19	89,45±0,22	89,99±0,23	89,52±0,33	13.02±5,17

Sat : saturé

L'extrait PRO TAH a présenté la meilleure activité antiradicalaire par rapport aux autres extraits (IC₅₀ : 15,05±0,28). Cependant, cette activité est deux fois plus faible que celle de BHA (IC₅₀ : 6.14±0.41 µg/ml) et proche à celles de BHT (IC₅₀ : 12.99±0.41 µg/ml) et α-Tocophérol (IC₅₀ : 13.02±5,17µg/ml).

I.5.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS

L'ABTS est un composé organique stable utilisé dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire, avec un pic d'absorption à 734 nm. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, le cation ABTS⁺ subit une réduction et passe de la couleur bleu-vert à un état neutre incolore. Les résultats sont présentés dans la figure N°16, le Tableau N°15 et l'annexe 2.


Figure N°16 : Profil de la microplaque de dosage du test ABTS

**Tableau N°15** : Pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ du test ABTS

Extracts	% Inhibition in ABTS assay							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
PRO TAH	52,40±2,25	78,65±2,82	90,35±0,67	91,78±0,25	92,33±0,25	Sat	Sat	3,68±0,71
PRO ATH	37,95±2,29	45,06±3,87	65,97±3,34	85,82±0,63	91,73±0,29	Sat	Sat	29,70±3,12
PRO Z	43,85±2,39	65,09±2,50	85,38±1,61	91,17±1,00	92,00±0,25	Sat	Sat	15,25±1,49
BHT	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90.95±0,51	96.68±0.39	1.29±0.30
BHA	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95,86±0,10	1.81±0.10

Les résultats du test ABTS montrent une meilleure activité de l'échantillon Pro TAH (IC₅₀ : 3,68±0,71 µg/ml) par rapport à celle des autres extraits (PRO ATH et PRO Z). Cependant, l'activité anti radicalaire de ces 3 extraits a été bien moindre que celle des standards utilisés BHT et BHA (IC₅₀ : 1.29±0.30, 1.81±0.10 µg/ml respectivement). Ces résultats confirment ceux du test précédent (DPPH).

I.5.3. Activité de phénanthroline

La méthode phénanthroline permet de mesurer la capacité antioxydante totale des extraits. Elle est basée sur la réduction de Fe⁺³ par un agent antioxydant pour donner l'ion Fe⁺² qui ensuite réagit avec la phénanthroline pour donner un complexe de couleur rouge orangé, et qui absorbe à 510 nm. Ce test a abouti aux résultats présentés dans le tableau n°16, figure n° 27 et l'annexe 3.

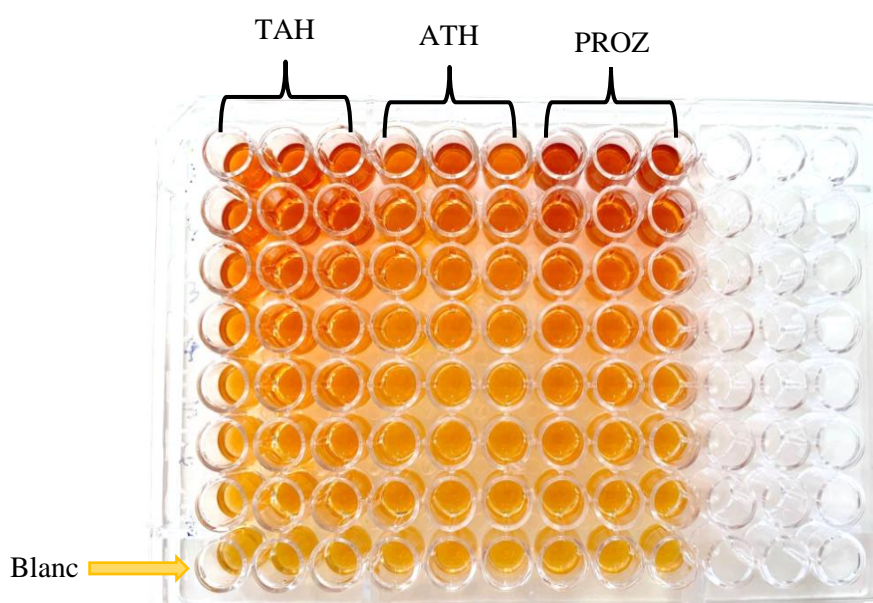
**Figure N°17** : Profil de la microplaque de dosage du test Phénanthroline



Tableau N°16 : Pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ du test Phenanthroline

Extracts	Absorbances in phenanthroline assay							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0.5} µg/mL
PRO TAH	0,57±0,04	0,66±0,05	0,75±0,12	0,97±0,11	1,38±0,24	2,19±0,23	2,44±0,40	3,38±1,30
PRO ATH	NA	NA	0,41±0,02	0,58±0,08	0,70±0,08	1,10±0,01	1,84±0,56	20,25±3,66
PRO Z	0,46±0,03	0,51±0,04	0,60±0,04	0,84±0,06	1,12±0,03	2,06±0,13	3,22±0,21	5,98±1,99
	0.78125	1.5625	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	A_{0.5} µg/mL
BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
BHT	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17

En comparaison avec les autres extraits, PRO TAH a présenté la meilleure activité de réduction du fer avec (A_{0.5} : 3,38±1,30 µg/ml). Cette activité est trois fois inférieure à celle du BHA (A_{0.5} : 0,93±0,07 µg/ml) et proche à celle de BHT (A_{0.5} : 2,24±0,17 µg/ml). Cependant, les deux autres extraits (PRO Z et PRO ATH) ont manifesté une activité deux et six fois inférieure à celle de PRO TAH respectivement. Les résultats de cette activité sont en accord avec les deux tests précédents.

I.5.4. Activité du reducing power (FRAP)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir donneur d'électron. Le ferricyanide de potassium est réduit en présence d'un antioxydant pour former le ferrocyanide de potassium qui va réagir ensuite avec le chlorure ferrique et forme un complexe fer ferreux de couleur bleu-vert Bentabet *et al*, (2014) [88]. Le test nous a permis d'obtenir les résultats présenté dans le tableau N°17, figure N° 18 et l'annexe 4.

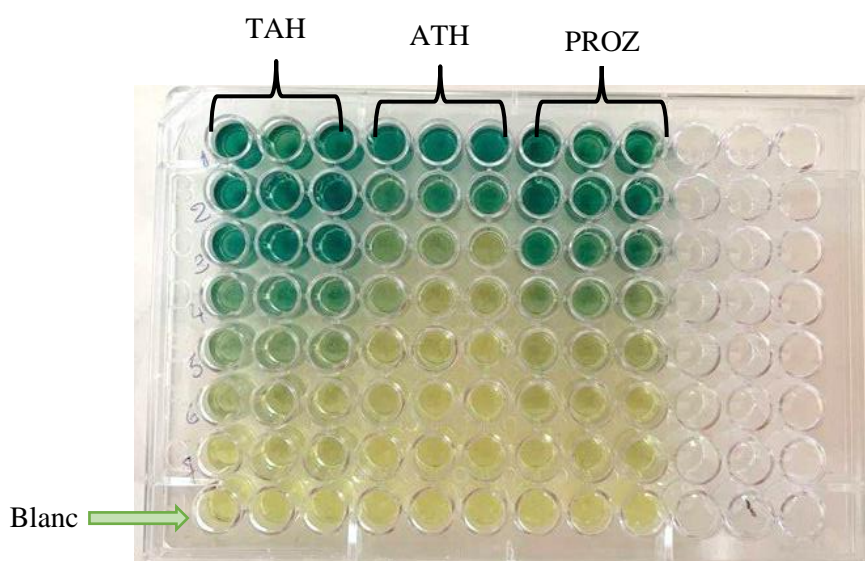


Figure N°18 : Profil de la microplaquette de dosage du test FRAP



Tableau N°17 : Pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ du test FRAP.

Extracts	Absorbance in reducing power assay							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0.5} µg/mL
PRO TAH	0,11±0,01	0,15±0,03	0,25±0,05	0,50±0,05	1,10±0,16	1,70±0,45	1,99±0,37	22,89±0,67
PRO ATH	0,08±0,01	0,09±0,02	0,10±0,02	0,17±0,04	0,22±0,08	0,59±0,06	1,67±0,20	86,19±0,3
PRO Z	0,10±0,01	0,11±0,01	0,14±0,01	0,29±0,02	0,63±0,10	1,17±0,26	1,61±0,41	38,33±0,39
Ascorbic acid	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	6,77±1,15
α-Tocopherol	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	34,93±2,38

Les résultats du test du pouvoir réducteur confirment les résultats des trois premiers tests. En effet, l'extrait PRO TAH est le plus actif avec une A_{0.50} de 22,89±0,67µg/ml suivie par l'extrait PRO Z (A_{0.50} :38,33±0.39) et PRO ATH (A_{0.50} : 86,19±0.3) qui sont plus faibles par rapport aux autres. En comparaison avec les standards l'acide ascorbique et l'α-Tocophérol dont les A_{0.5} sont de 6.77±1.15 et 34.93±2.387µg/ml, respectivement, tous les deux extraits PRO Z et PRO ATH montrent une activité antioxydante inférieure sauf pour l'extrait PRO TAH dont l'activité antioxydante est plus importante que celle de l'α-Tocophérol.

I.5.5. Activité Silver nano particle (SNP)

L'activité nanoparticule des extraits a été évaluée par spectrophotométrie à 423 nm, en suivant la réduction de l'Ag⁺ en nanoparticules d'argent sphérique. Dans ce test les résultats ont été comparés par rapport à l'acide ascorbique et le Trolox tableau N°18, figure N° 19 et l'annexe 5.

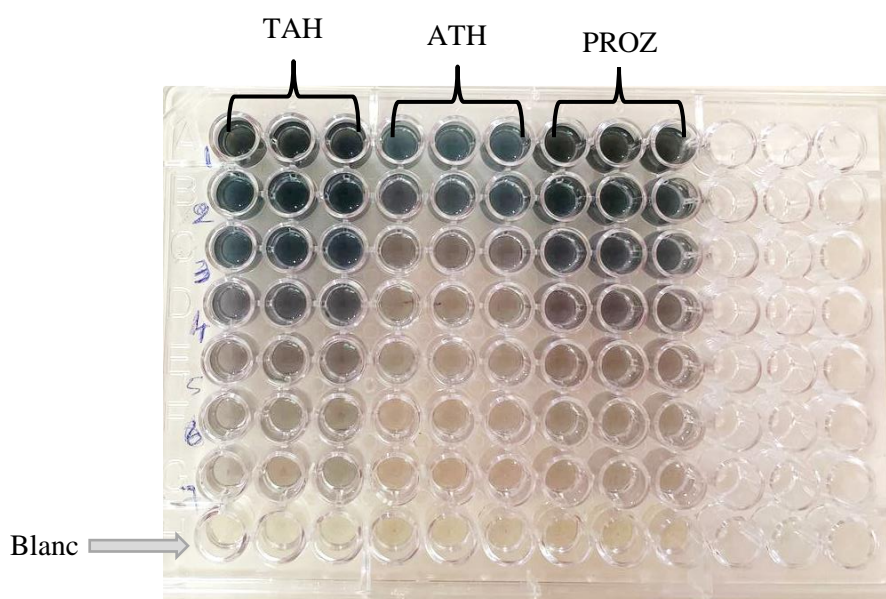


Figure N°19 : Profil de la microplaque de dosage du test SNP



Tableau N°18 : Pourcentage d'inhibition et l' $A_{0,5}$ du test SNP

Echantillon	6.25µg	12.5µg	25µg	50µg	100µg	200µg	400µg	$A_{0,5}$ (µg/ml)
PRO TAH	0,23±0,01	0,27±0,02	0,35±0,01	0,47±0,02	0,65±0,02	0,97±0,05	1,55±0,07	57,80±4,39
PRO ATH	0,19±0,00	0,20±0,00	0,21±0,00	0,26±0,01	0,34±0,00	0,50±0,00	0,88±0,02	191,80±4,94
PRO Z	0,20±0,00	0,24±0,01	0,31±0,00	0,41±0,01	0,56±0,01	0,82±0,02	1,69±0,06	80,72±2,20
	1.5625µg	3.125µg	6.25µg	12.5µg	25µg	50µg	100µg	$A_{0,5}$ (µg/ml)
Acide ascorbique	0.24±0.00	0.32±0.01	0.45±0.01	0.75±0.01	1.22±0.02	1.90±0.03	2.35±0.01	7.14±0.05
Trolox	0.17±0.00	0.20±0.01	0.23±0.00	0.30±0.01	0.43±0.01	0.64±0.03	1.04±0.01	34.17±1.23

Les résultats obtenus montrent que l'extrait PRO TAH a présenté la meilleure activité avec une valeur ($A_{0,50} = 57,80 \pm 4,39 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux autres extraits. Son activité est deux fois plus faible que le Trolox ($A_{0,50} = 34.17 \pm 1.23 \mu\text{g/ml}$) et huit fois plus faible que l'acide ascorbique ($A_{0,50} = 7.14 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$).

Une étude a été menée sur les échantillons de la propolis *Bouaroura et al (2019)* ont confirmé nos résultats, dont ils ont trouvé que l'extrait éthanolique de la propolis a montré une activité supérieure à celle de BHT dans les dosages DPPH et CUPRAC [22]. Ces résultats peuvent être expliqués par la différence de la nature de la flore botanique de l'Algérie (la région influe sur la composition de la propolis).

I.6. Activité anti-enzymatique

I.6.1. Inhibition de l'acétylcholinestérase

L'activité ant-AChE a été évaluée en déterminant les concentrations inhibitrices IC_{50} des trois extraits ainsi que la galantamine (standard). La disparition de la couleur jaune indique la capacité de l'échantillon à inhiber cette enzyme. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°19, figure N° 20 et l'annexe 6.

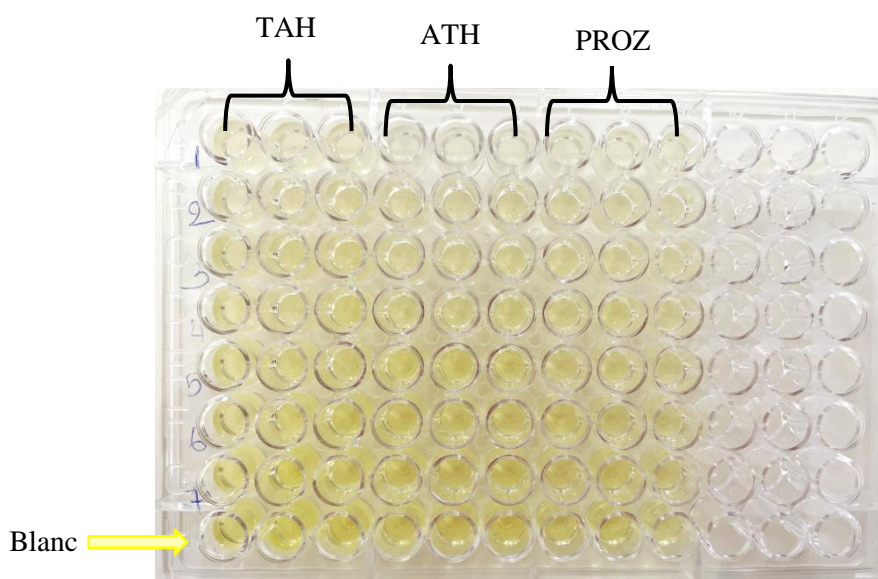


Figure N°20 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité inhibitrice de l'Acétylcholinestérase

Tableau N°19 : Pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ du test anti-acétylcholinestérase

Extracts	Acetylcholinesterase inhibitory activity							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ (µg/mL)
PRO TAH	NA	36,28 ± 2,09	41,70± 3,41	42,25± 0,42	49,81± 2,57	63,55± 2,33	81,43± 2,02	54,04±2,35
PRO ATH	27,55± 1,01	29,93 ± 5,98	32,41± 1,02	55,54± 3,29	61,06± 3,05	65,38± 2,12	92,96± 0,72	22,09±1,67
PRO Z	26,06± 1,26	31,83± 3,35	35,45± 1,32	41,39± 0,18	44,77± 2,75	56,27± 3,64	67,41± 0,66	65,58±3,55
Galantamine	35,93 ±2,28	43,77 ±0.00	68,50 ±0,31	80,69 ±0,41	85,78 ±1,63	91,80 ±0,20	94,77 ±0,34	6.27±1.15

Ce test montre que les 3 extraits possèdent une faible activité anti-AChE par rapport à la galantamine. Avec des valeurs de leur IC₅₀ de 22,09±1,67µg/ml, 54,04±2,35µg et 65,58±3,55µg/ml les extraits PRO ATH, PRO TAH et PRO Z possèdent respectivement une activité anti-AChE deux fois, neuf fois et dix fois plus faible que celle de la galantamine.

I.6.2. Inhibition de la butyrylcholinestérase

Cette activité a le même principe de l'activité précédente. Les résultats sont présentés ci-dessous : tableau N°20, figure N° 21 et l'annexe 7.

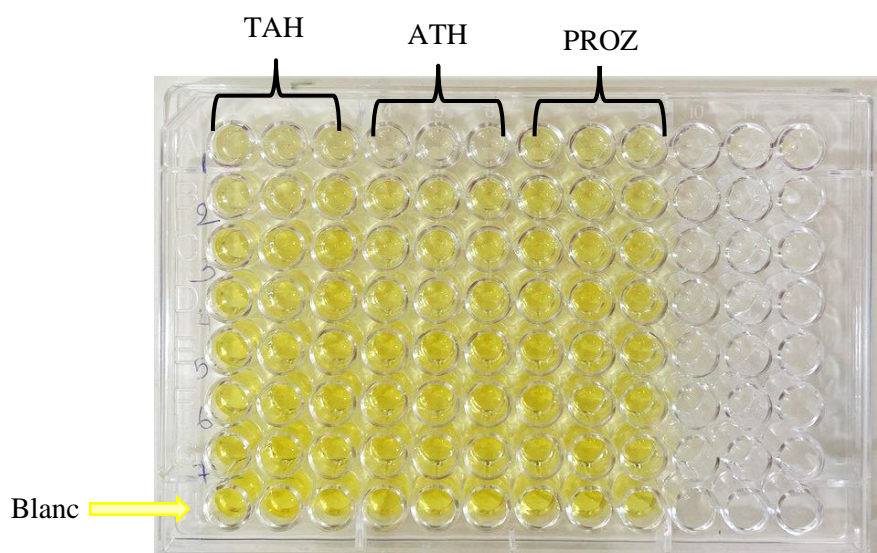


Figure N°21 : Profil de la microplaque de dosage de l'activité inhibitrice de la Butyrylcholinesterase

Tableau N°20 : Pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ du test anti-Butyrylcholinesterase

Extracts	Butyrylcholinesterase inhibitory activity							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ (µg/mL)
PRO TAH	NA	NA	23,47± 2,42	28,80± 2,35	49,88± 0,00	54,08± 0,00	78,92± 1,51	77,36±0,95
PRO ATH	16,82± 4,54	41,14± 3,33	59,50± 4,64	62,30± 4,46	74,64± 2,63	82,42± 4,20	86,01± 2,14	9,82±0,84
PRO Z	NA	NA	NA	NA	21,72± 3,03	31,87± 3,48	60,82± 9,24	150,74±3,15
Galantamine	3,26± 0,62	6,93± 0,62	24,03± 2,94	45,13± 2,60	63,87± 2,85	73,57± 0,77	78,95± 0,58	34.75±1.99

Avec une IC₅₀ de 9,82±0,84 µg/ml l'extrait PRO ATH a présenté une activité anti-BChE trois fois meilleure que celle de la galantamine (34.75±1.99 µg/ml). Cependant, cette même activité des deux autres extraits est relativement faible à celle du standard.

I.7. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des trois extraits de la propolis a été effectuée en utilisant une souche fongique (levure) *Candida albicans* et quatre souches bactériennes, dont deux à Gram + : *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* ; et deux à Gram - : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité a été réalisée avec la technique de diffusion sur gélose. Les résultats sont illustrés dans le tableau N°21 :



Tableau N°21 : Diamètres d'inhibition des propolis pour les souches étudiées.

		<i>M. luteus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
PRO ATH	C (mg/ml)	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne
	20	13.6	11	14	31	12.3
	10	14.3	11	12	26	11.6
	5	13.3	10	10	21	11.3
	2,5	10.3	10.3	9	15	10.3
	1,25	7.6	8.3	-	9	10.3
	0,625	6.3	11	-	-	8.3
PRO TAH	20	8	10	10	12	12.6
	10	-	7	8	9	9
	5	-	7.3	-	-	10.3
	2,5	-	6.6	-	-	10.3
	1,25	-	6	-	-	9.3
	0,625	-	-	-	-	8.3
PRO Z	20	-	11.6	-	17	16
	10	-	12	-	13	12
	5	-	9.6	-	-	11.6
	2,5	-	9.6	-	-	10.6
	1,25	-	10	-	-	10.6
	0,625	-	10	-	-	9.6

NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulations.

Il ressort du tableau que l'extrait PRO ATH a un effet antibactérien plus élevé par rapport aux autres extraits étudiés. Cependant, PRO Z, qui a présenté l'effet antibactérien le plus faible, a présenté la meilleure activité antifongique. Les résultats obtenus ont montré également que les trois extraits de la propolis ont un effet antibactérien considérable sur les bactéries à gram positive (*Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*).

Une étude a été menée sur les échantillons de la propolis des régions de Sidi Bel Abbés, Tlemcen et Mascara a confirmé nos résultats, où le diamètre de la zone d'inhibition est rangé entre 8,05 et 21,4 mm contre *S.aureus*, tandis qu'aucun effet antibactérien n'a été enregistré sur *E. coli* (gram négative) [89]. En fait, l'activité antibactérienne et antifongique de la propolis est



due à la présence des composés (flavonoïdes, acides phénoliques et leurs esters), dont le mécanisme possible de cette action est dû à une inhibition de la division cellulaire en présence de cette propolis, en agissant sur la réplication de l'ADN de ces organismes [90].

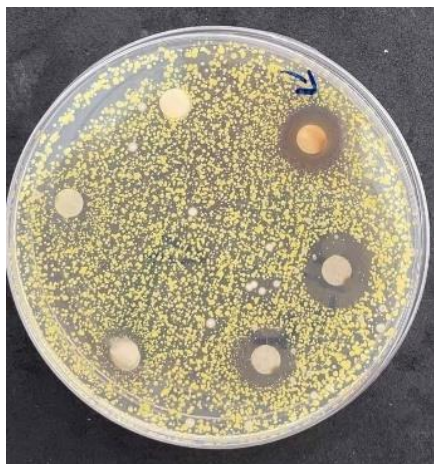


Figure N°22 : Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche *M.Luteus*

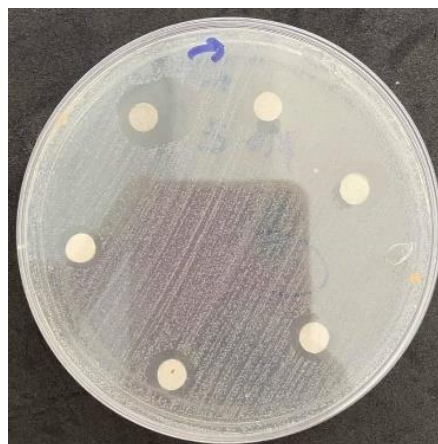


Figure N°23 : Effet antifongique de l'échantillon PRO Z sur la souche *Candida*



Figure N°24 : Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche *S.aureus*

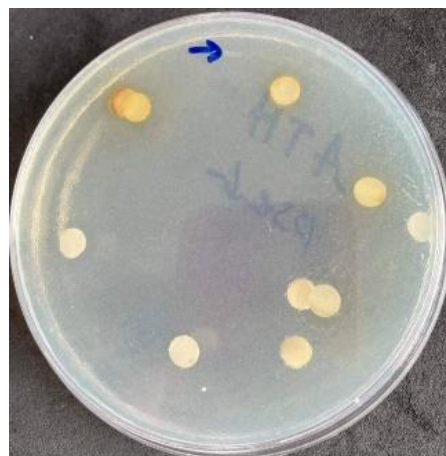


Figure N°25: Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche *P. aeruginosa*

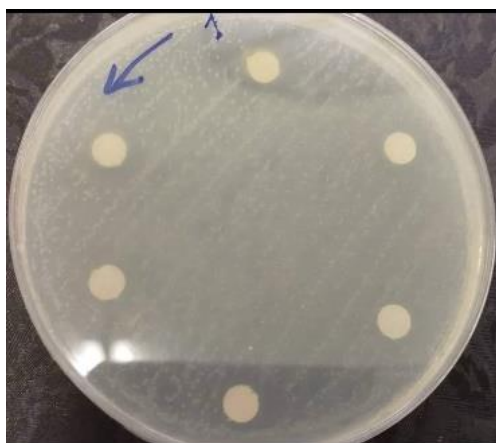


Figure N°26 : Effet antibactérien de l'échantillon PRO ATH sur la souche *E.coli*



II. Etude *in silico*

La partie *in silico* faisant suite à la partie expérimentale de notre travail a été menée sur les 25 composés identifiés dans les trois extraits de la propolis par HPLC. En faisant appel aux approches de modélisation par docking moléculaire, nous avons tenté de comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'interaction des composés de la propolis à l'égard des cibles enzymatiques étudiées expérimentalement à savoir l'AChE et la BChE.

II. 1. Test de fiabilité du programme surflex

Avant de simuler les interactions des 25 composés issus des trois extraits de la propolis vis-à-vis de l'AChE et la BChE, nous avons tenté tout d'abord d'évaluer la performance du logiciel de docking moléculaire « Surfex » utilisé dans cette étude. Dans ce but, nous avons appliqué le test RMSD sur 100 complexes protéine-ligand tirés de manière arbitraire via la PDB. A titre de rappel, une prédiction est jugé fiable si la valeur de RMSD est inférieure à 2Å [81]. Dans notre travail, 88 % des complexes étudiés ont présenté un $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ et sont considérés comme résultats positifs (Figure N°27 et Annexe N°8). Ces résultats sont en accord avec ceux de (Teniou. S., 2012) qui révèlent un pourcentage de 85,8% sur 134 complexes [91].

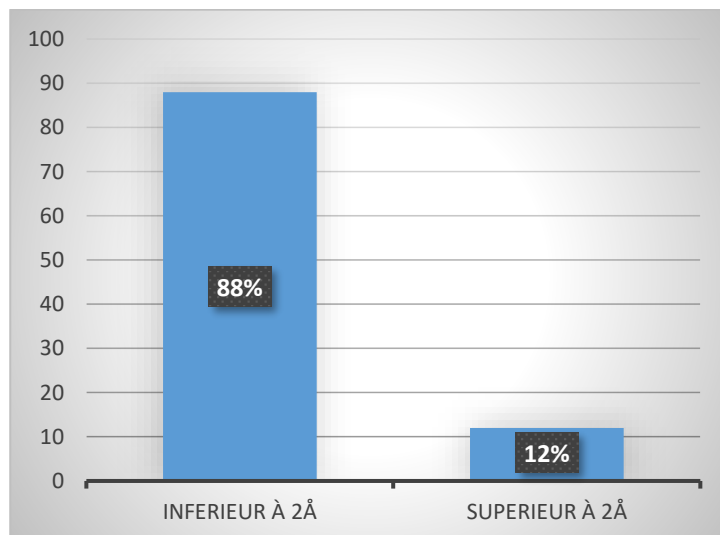


Figure N°27 : Pourcentages des valeurs de RMSD générés par Surfex

II.1.1 Analyse visuelle :

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape essentielle pour juger la performance du programme Surfex. Elle permet de visualiser les résultats décrits par la valeur numérique du RMSD. Pour cela, nous avons choisi le complexe 1AMN qui possède un RMSD égale à 1.57 Å.

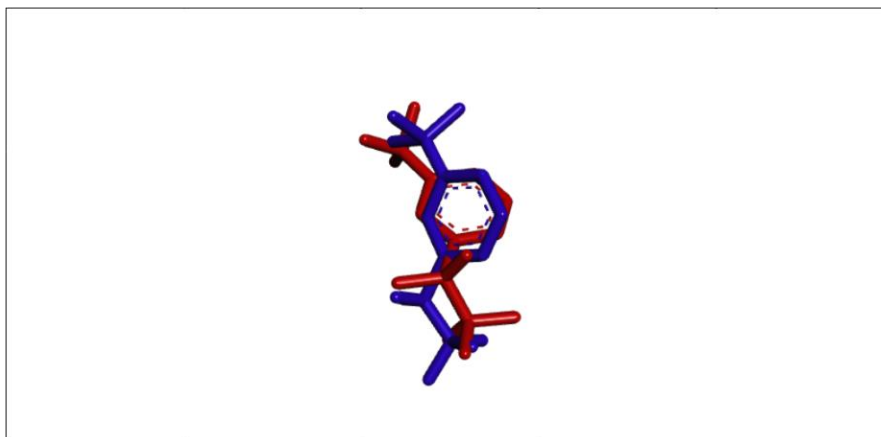


Figure N°28 : Superposition de L'inhibiteur de référence (coloré en bleu) et du finale-0 calculé par Surflex (coloré en rouge) du complexe **1AMN** (RMSD =1.57 Å)

Comme le montre la figure N°28 la pose expérimentale du ligand se superpose avec celle simulée par le logiciel. Donc, nous pouvons conclure que le logiciel Surflex est fiable et peut être utilisé sans trop risque d'erreurs pour prédire les interactions.

II.2. Docking moléculaire des composés de la propolis

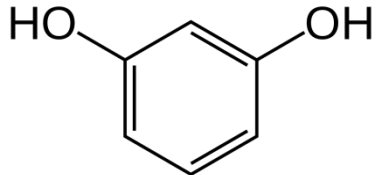
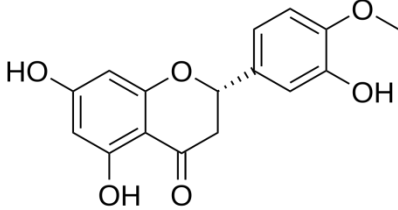
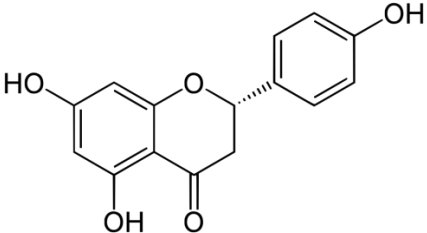
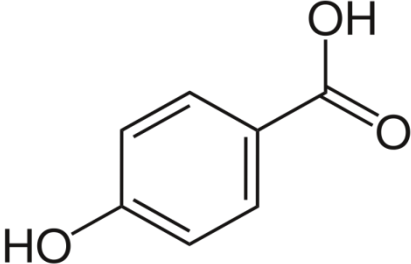
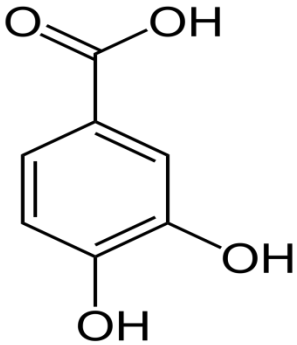
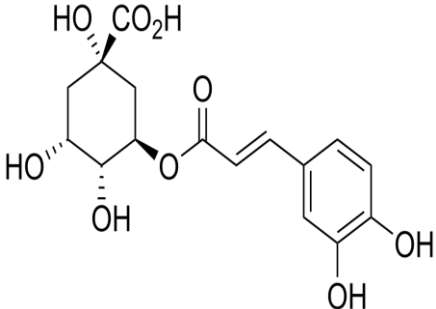
Les 25 composés issus des trois extraits de la propolis ont fait l'objet d'une étude de docking moléculaire afin de simuler leur affinité et les interactions formées à l'égard de l'AChE et la BChE. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°22.



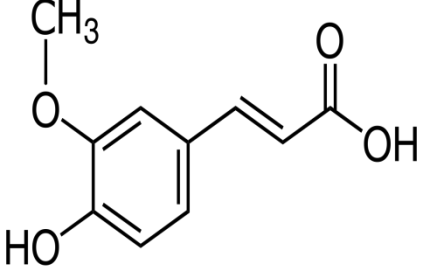
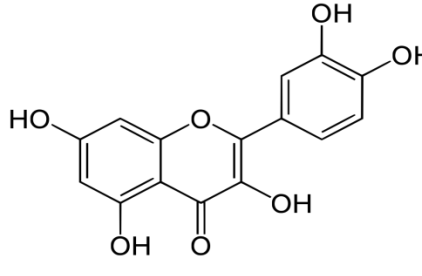
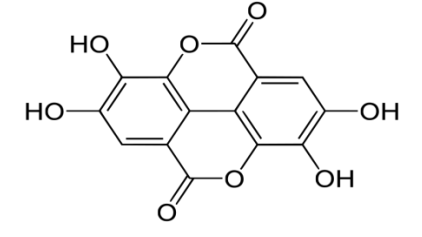
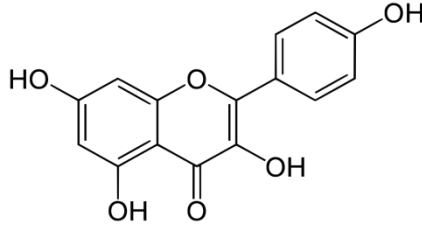
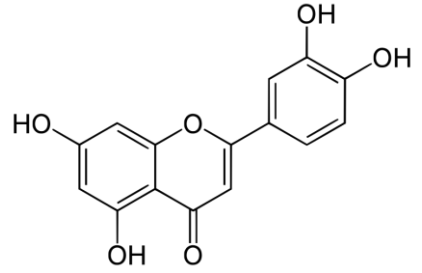
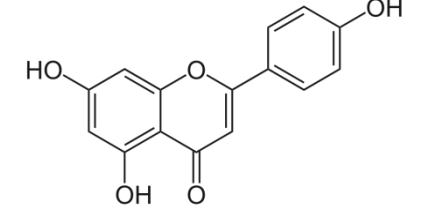
Tableau N°22 : Nom, Structure et affinité calculé par SurfleX des 25 molécules issues de la propolis.

Nom de molécules	Structures	Affinité avec l'AChE	Affinité avec la BChE
Galanthamine		1.95	2.28
Acide caféique		4.48	3.03
Cynarine= 3 acides phénoliques		5.55	4.74
Chrysine =flavonoïde		3.98	2.49
1,4 dichlorobenzène		1.11	1.05

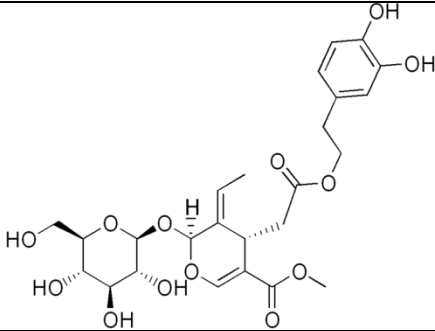
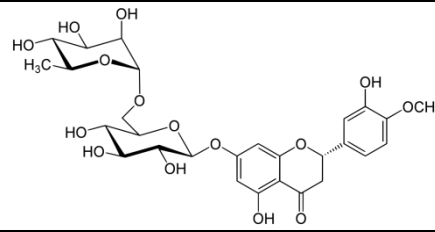
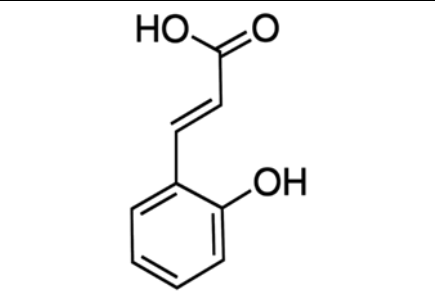
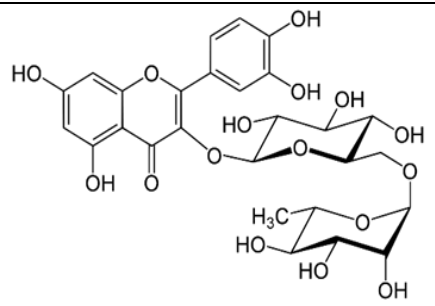
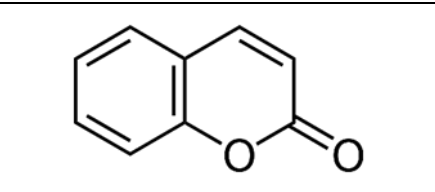
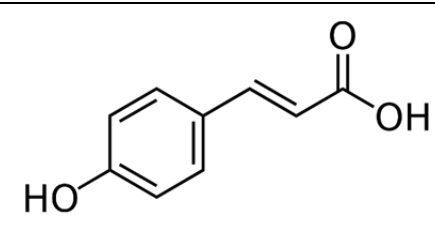


4- hydroxylrésorkinol = résorcine		3.75	2.78
Hesperétine = flavonoïde		3.81	3.12
Naringénine = flavonoïde		2.67	2.32
4-hydroxy- acidebenzoïque		3.22	3.15
Acide protocatéchique		2.85	3.25
Acide chlorogénique		5.63	2.89



Acide ferrulique		3.39	2.89
Quercetine = flavonoïde		5.11	4.15
Acide ellagique		4.5	2.33
kaempférol = flavonoïde		3.93	2.91
Lutéoline = flavonoïde		4.5	3.96
Apigénine = flavonoïde		3.85	2.95



<p>Oleuropéine</p>		<p>5.51</p>	<p>3.33</p>
<p>Hespéridine = flavonoïde</p>		<p>1.2</p>	<p>2.71</p>
<p>Trans2-hydroxyacide cinnamique</p>		<p>2.88</p>	<p>3.06</p>
<p>Rutine</p>		<p>3.44</p>	<p>-0.72</p>
<p>Coumarine</p>		<p>2.18</p>	<p>1.92</p>
<p>p-acide coumarique</p>		<p>2.89</p>	<p>2.82</p>



vanilline		2.23	1.57
Acide vanilique		2.49	2.59
6,7dihocoumarine		3.39	2.32

Parmi les 25 composés étudiés, 23 ont présenté une affinité nettement supérieure à celle de la galantamine à l'égard de l'AChE et 21 composés dans le cas de la BChE. Avec des affinités de 5.63 et 4.74, l'acide chlorogénique et la Cynarine se présentent comme meilleures inhibiteurs de l'AChE et la BChE respectivement. Ces composés ont fait l'objet d'une analyse visuelle à l'aide du programme Biovia Discovery Studio afin d'analyser le nombre et le type de liaisons formées avec leur cible.

II.2.1. Etude des interactions du complexe acide chlorogénique-AChE

L'acide chlorogénique est le meilleur inhibiteur de l'AChE parmi les 25 composés étudiés avec une affinité de 5.63. Comme le montre les figures N°29 et N°30 ce composé est bien placé dans le site actif de l'AChE à l'instar de la galantamine. L'analyse visuelle du mode d'interaction de l'acide chlorogénique montre qu'il forme 10 liaisons avec le site actif de l'AChE et ce contrairement à la galantamine qui forme 12 avec cette cible (Figure N°31 et N°32). Le nombre et le type des interactions formées sont représentés dans le tableau N°23. Ceci peut expliquer l'effet inhibiteur élevé de la galantamine par rapport à l'acide chlorogénique.



Tableau N°23 : Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par l'acide chlorogénique et la galantamine.

	Acide chlorogénique	Galantamine
Affinité avec l'AChE	5.63	1.95
Nombre total d'interactions	10	12
Liaison hydrogène	5 (2THR75, ARG296, TYR341, TYR124)	2 (GLU202, AER203)
Liaisons carboniques	1 (VAL294)	5 (HIS447, TYR124, SER125, ASP74, SER303)
Pi-Alkyl	3 (TYR124, TRP286, TYR341)	3 (TRP86, TYR337)
Pi-Lone Pair	1 (TYR72)	-
Pi-Pi T-Shaped	-	2 (GLY121, TYR337)

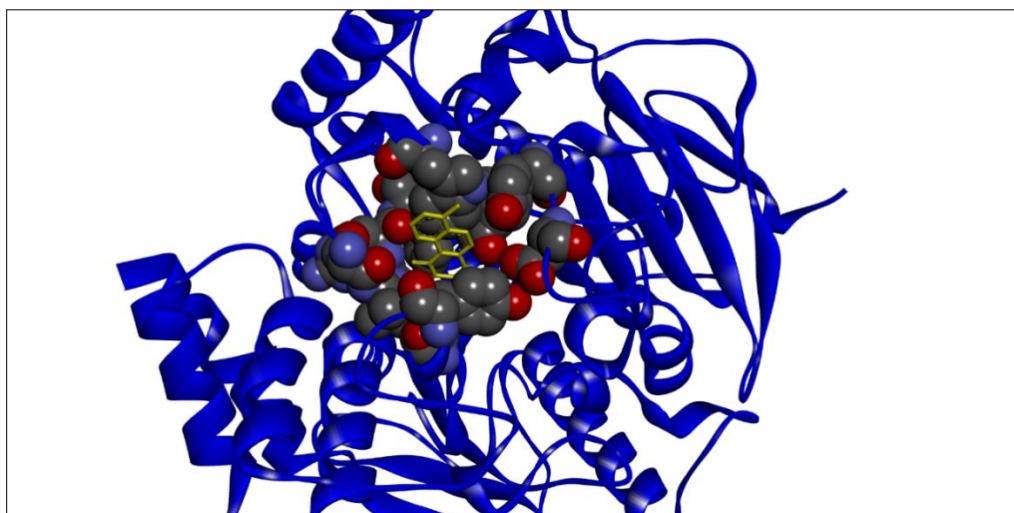


Figure N°29 : Positionnement de l'acide chlorogénique dans le site actif de l'AChE

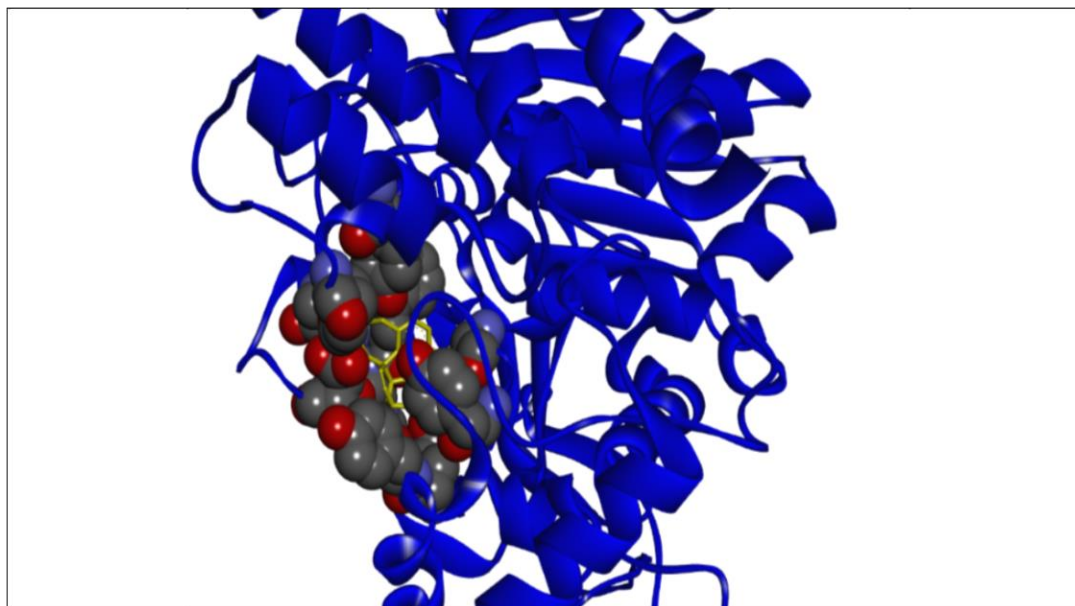


Figure N°30 : Positionnement de la galantamine dans le site actif de l’AChE

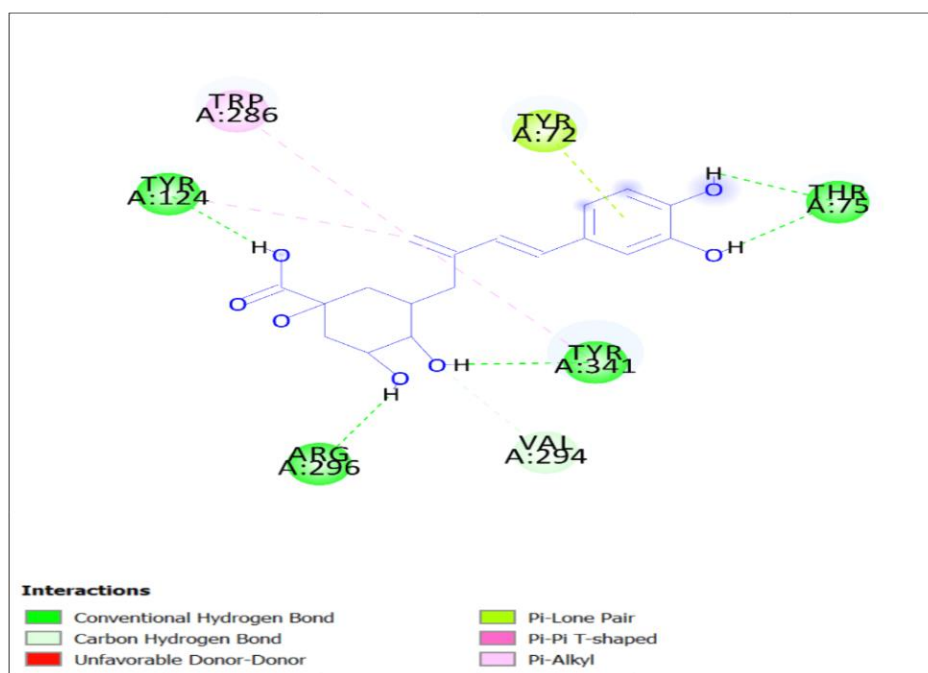


Figure N°31 : Diagramme des interactions AChE- acide chlorogénique

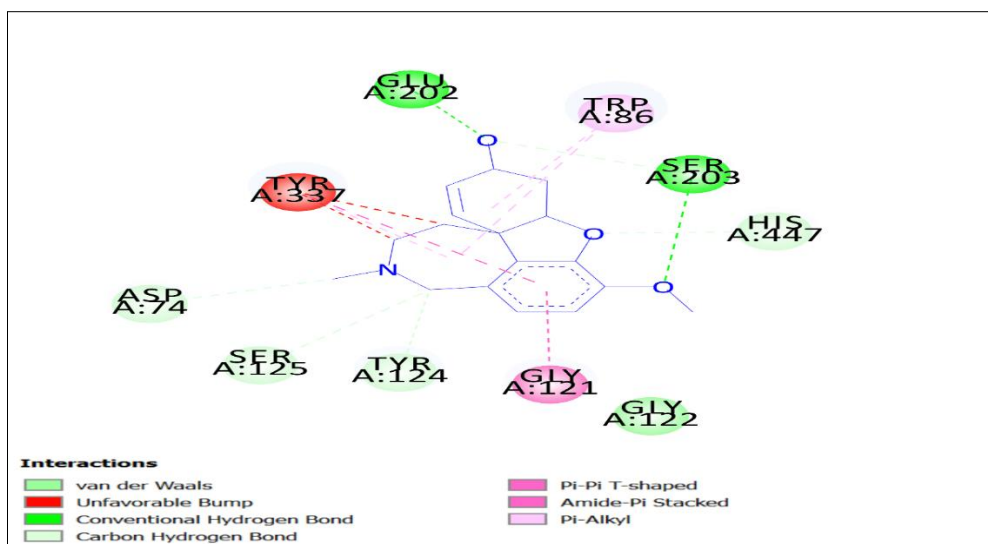


Figure N°32: Diagramme des interactions AChE- Galantamine

II.2.1. Etude des interactions du complexe Cynarine-BChE

Le docking moléculaire des 25 composés de la propolis révèle la cynarine comme meilleur inhibiteur de la BChE avec une affinité de 4.74. Ce composé est bien placé dans le site actif de la BChE comme c'est le cas de la galantamine (Figures N°33et 34).

L'affinité plus élevée de la Cynarine avec la BChE par rapport à celle enregistrée dans le cas de la galantamine peut être expliquée par le nombre de liaisons hydrogènes formées avec la cible. En effet, 6 liaisons hydrogènes sont formées entre la Cynarine et la BChE alors que la galantamine n'a formée aucune liaison de ce type dans le site actif étudié (Figure N°35et N°36 et Tableau N°24).



Tableau N°24 : Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'BChE par la Cynarine et la galantamine.

	Cynarine	Galantamine
Affinité avec l'BChE	4.74	2.28
Nombre total d'interactions	11	9
Liaison hydrogène	6 (LEU286, THR120, ASP70, SER287, THR284, SER198)	-
Liaisons carboniques	1 (GLY116)	3 (GLY117, HIS438, SER287)
Pi-Alkyl	-	4 (TRP231, PHE329, HIS438, ALA199)
Pi-Lone Pair	1 (TRP231)	-
Pi Sigma	1 (LEU286)	1 (TRP231)
Pi-Pi T-Shaped	2 (PHE329, TRP231)	-
Amide Pi-Stacked	-	1 (GLY116)

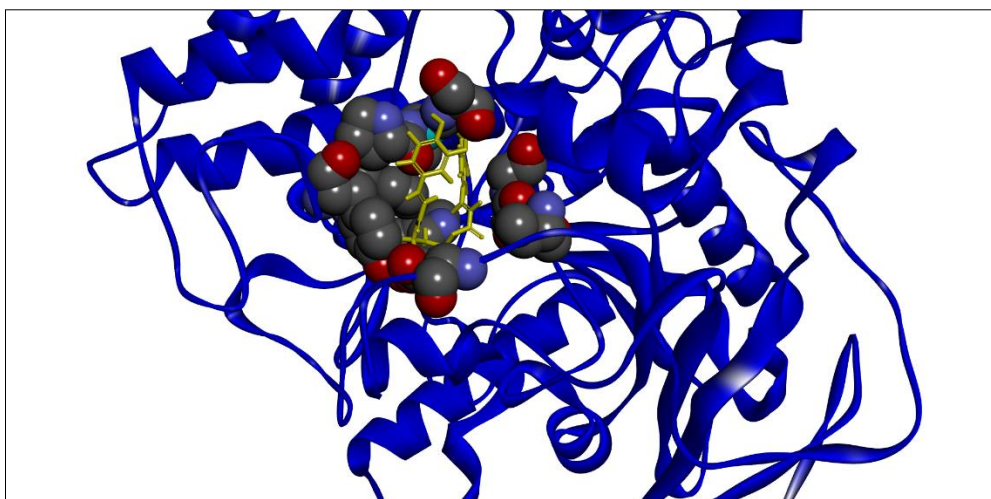


Figure N°33 : Positionnement de la Cynarine dans le site actif de la BChE

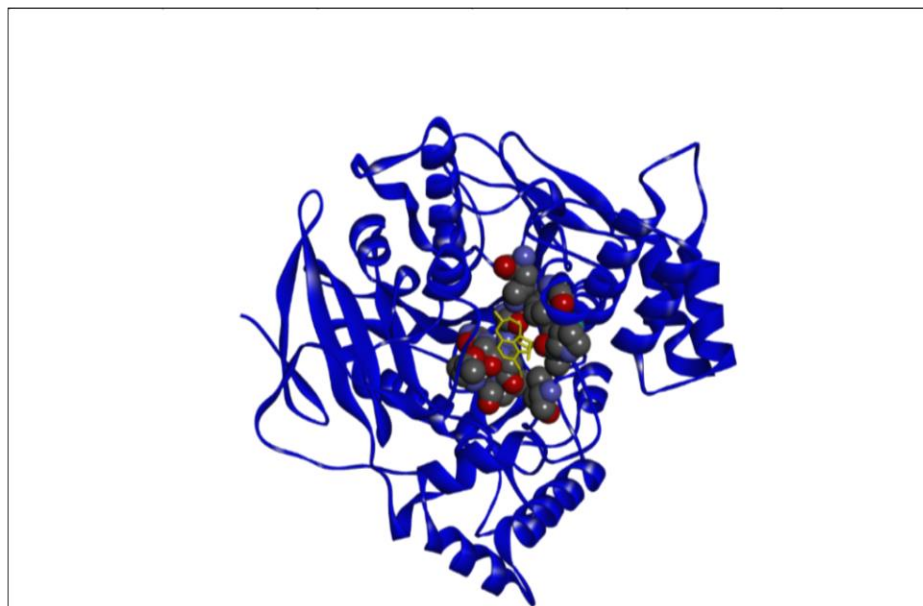


Figure N°34 : Positionnement de la Galantamine dans le site actif de la BChE

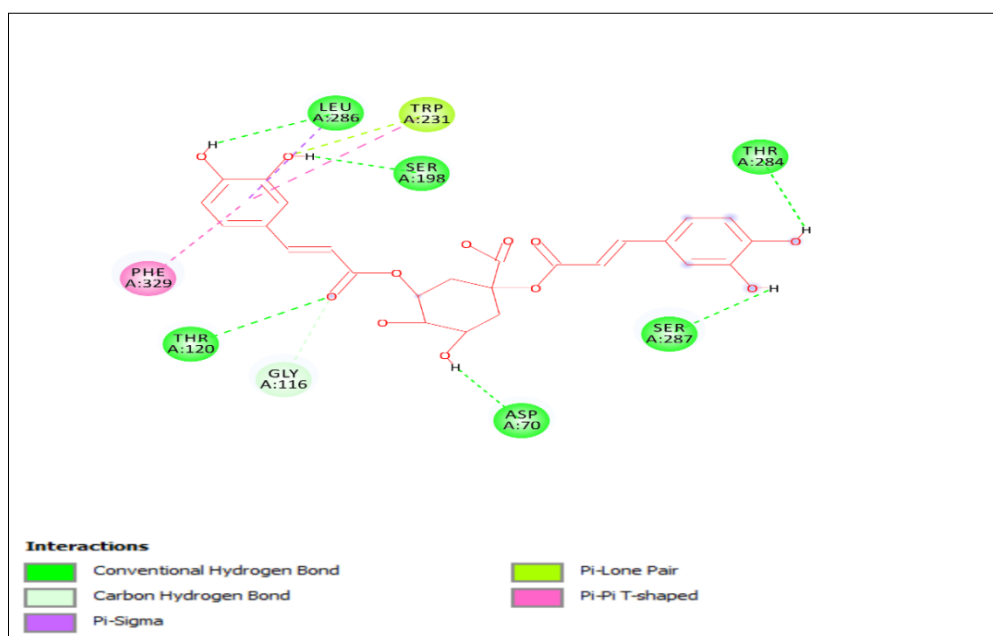


Figure N°35 : Diagramme des interactions BChE-Cynarine

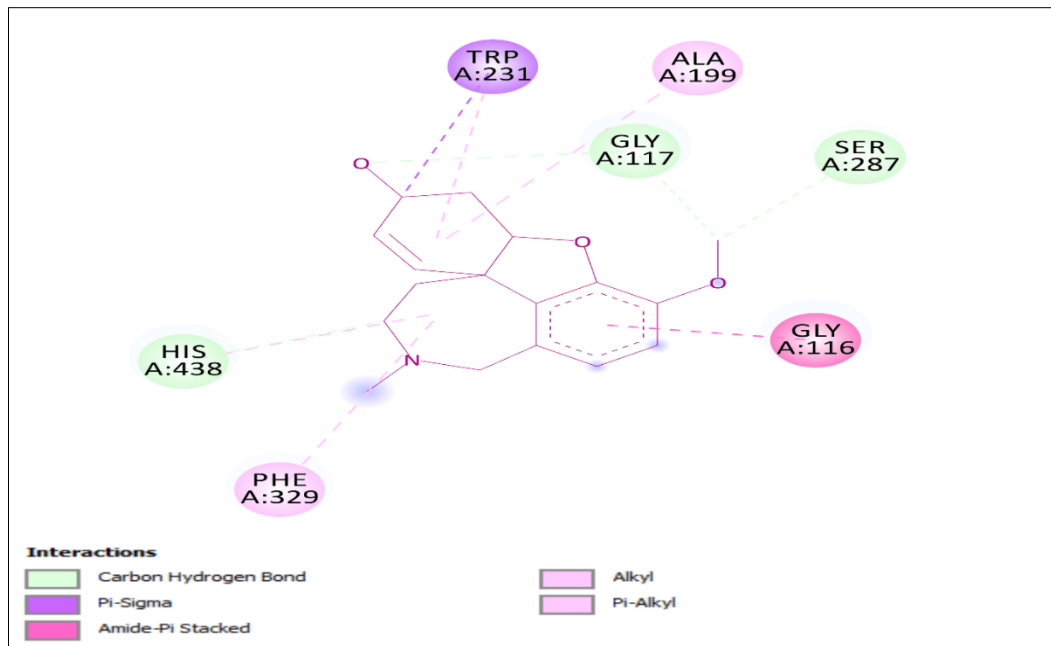


Figure N°36 : Diagramme des interactions BChE-Galantamine

Conclusion



Conclusion

Le présent travail avait pour but de valoriser trois échantillons de la propolis issus des régions de l'Est Algérien : OUED ZEHOUR (wilaya de Skikda), EL TAHIR (Wilaya de Jijel) et OUED ATHMANIA (Wilaya de Mila). L'approche technique d'une telle étude a été réalisée grâce à trois parties complémentaires : Etude phytochimique, activités biologique et bioinformatique par docking moléculaire.

Dans la partie phytochimique, l'extraction menée par macération en utilisant un système solvant hydroéthanolique nous a permis d'avoir un meilleur rendement. De plus, les tests de screening phytochimique ont révélé la forte présence de flavonoïdes, des tannins et peu de coumarines. L'analyse de la composition chimique des extraits de la propolis par chromatographie sur couche mince (CCM) nous a permis d'identifier la présence des composés phénoliques, des stéroïdes et des flavonoïdes (flavonol, flavone...etc). La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier les acides phénoliques : acide férulique, acide gallique... et flavonoïdes : chrysin, apigénine, kaempferol, Hespéridine... et d'autres composés.

Afin de valoriser les trois extraits de la propolis, plusieurs activités biologiques ont été évaluées. Les résultats obtenus ont montré que l'effet biologique des extraits de la propolis dépend de leur origine géographique. En effet, il est avéré que l'extrait TAH a montré le meilleur effet antioxydant et l'extrait ATH a présenté le meilleur effet inhibiteur à l'égard de l'AChE et la BChE. A titre de rappel, ces deux enzymes sont des cibles thérapeutiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. De plus, les trois extraits ont montré une efficacité variable contre les souches bactériennes testées, avec un effet considérable contre les bactéries à gram positifs (*Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*). L'activité antifongique de nos extraits était également très élevée contre *Candida albicans*.

Dans une dernière partie, l'approche de modélisation par docking moléculaire a été utilisée afin de mieux appréhender les mécanismes d'interactions mis en jeu dans l'inhibition de l'AChE et la BChE par les différents composés présents dans les extraits de la propolis étudiés. En effet, le docking moléculaire des 25 composés identifiés par HPLC dans les propolis étudiés fait ressortir l'acide Chlorogénique et la cynarine comme meilleurs inhibiteurs de l'AChE et la BChE respectivement. L'analyse visuelle montre que ces composés sont bien positionnés dans les sites actifs étudiés en impliquant un nombre important d'interactions telles que des liaisons hydrogènes, Pi-Anion, Pi-Pi stacking...etc.



Il conviendrait dans le prolongement de ce travail de :

- Mener une étude expérimentale complémentaire *in vivo* afin de valider nos résultats obtenus *in silico* et *in vitro*.
- Identifier plus de molécules bioactives en faisant appel à d'autres techniques d'identification moléculaire telles que la RMN et la LC-MS



Références bibliographiques



Références bibliographiques

- [1]. Kasiotis, K.M. Anastasiadou, P. Papadopoulos, A. et Machera, K. (2017). Revisiting Greek Propolis: Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study. *Journal Plos One*. **12**(1):1-27.
- [2]. Cardinault, N. Cayeux, MO. Percie du Sert, P. (2012). La propolis : Origine, composition et propriétés. *Phytothérapie* **7** : 298-302.
- [3]. Liqin, J. Guozhen, F. Yan, Z. Guojie, C. Shuo, W. (2008). Analysis of Flavonoids in Propolis and Ginkgo biloba by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **56**:11571–11577.
- [4]. Devequi-Nunes, D. Machado, B. Barreto, G. Rebouc, A. Silva, J. da Silva, DF. *et al.* (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *Plos ONE* **13**.
- [5]. Stepanović, S. Antić, N. Dakić, I. et Švabić-Vlahović, M. (2003). "In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs". *Microbiol* **158** (4): 353-357.
- [6]. Dimov, V. Ivanoska, N. Manolova, N. Bankova, V. Nicolov, N. Popov, S. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. *Apidologie* **22** : 155-162.
- [7]. Murad, J. M., Calvi, S. A., Soares, M. V., Bankova, V., Sforcin, J. M. (2002). Effect of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophage against *Paracoccidivides Brasiliensis*. *J Ethnopharm* **79**: 331-334.
- [8]. Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Sotah, T. (1997). Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* **20** : 497-501.
- [9]. Boulechfar, S. Zellagui, A. Chamsa, E.A. Bensouici, C. Seguni, N. Lahoual, M. *et al.* (2019). Investigation of Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Essential Oil and Methanolic Extract of Propolis from Mila Region. *Journal of Biologically Active Products from Nature* **9**: 434 – 444.
- [10]. Ferhoum, F. (2010). Analyse physico chimique de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locale (*Apis mellifica intermissa et Apis mellifica sahariensis*). Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de docteur de l'université Boumèrdes : Sciences de l'Ingénieur. Boumèrdes : M'hamed Bougara, p22.
- [11]. Debab, M. (2019). Analyse pollinique et activités biologiques de la propolis de l'Ouest Algérien. Thèse de Doctorat. Faculté des sciences de la nature et de la vie, Sidi Bel Abbes.
- [12]. Puker, A; Abot, A. R; Matias, R; Rodrigues, S. R; Pinto, A. M. (2010). Propolis produced by Africanized honeybees in the Cerrado – Pantanal ecotone: effects of seasonality in production and physico – chemical characteristics. *Sociobiology*, **56** (1), 149 – 162.
- [13]. Segueni, N. (2011). Contribution à l'étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de docteur de l'université Constantine 1 : Sciences Exactes. Constantine : Frères Mentouri, p14.



- [14]. Lavie, P. (1975). La propolis. Edition : Apimondia. Bucharest
- [15]. Potier, F. (2014). La propolis, propriétés et intérêt thérapeutique. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de docteur en pharmacie de l'université de lorraine.
- [16]. Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis a review. *Bee World* **60**: 59-84.
- [17]. Arvouet-Grand, A. Vennat, B. Pourrat, A. Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique* **4** : 462–468.
- [18]. Hrytsenko, V. I, Tyjhonov, O., Pryakhin, R. (1977). Study on the polysaccharide preparation propolis. *Journal de Farmatseytychnyi* 32, 92-93.
- [19]. Higashi, K. O. De Castro, S. (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacology* 46, 55-8.
- [20]. Krell, R. (1996). Value-Added products from beekeeping. *FAO Agricultural services. Bulletin*, N 124.
- [21]. Gharbi, M. (2011). Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles – Composition Propriétés thérapeutiques Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de docteur de l'université de Claude Bernard, Lyon I. France.
- [22]. Bouaroura, A. Segueni, N. Jusus, G.D. Bensouici, C. Akkal, S. Rhouati, S. (2019). Preliminary analysis of the chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of Algerian propolis. *Natural Product Research*.
- [23]. Al-Hariri, M. (2014). Potential antioxidant benefits of Propolis. *Recent Review the Journal of Free Radicals and Antioxidants* **140**: 328-331.
- [24]. Ramos, A. Miranda, J. (2007) propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions.n.4, p.697-710.
- [25]. Orsi, R.O. Fernandes Junior, A. Bankova, V and Sforcin, J.M. (2012). Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian propolis and synergistic effects with antibiotics acting on the bacterial DNA and folic acid. *Nat. Prod. Res*, pp. n.26, p.344-349
- [26]. Seidel, V. Peyfoon, E. Watson, D.G. and Fearnley J. (2008). Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother. Res*, pp. n. 22, p. 1256–1263
- [27]. Silva-Carvalho, R. Baltazar, F. and Almeida-Aguiar, C. (2015) Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- [28]. Dandiya, P.C. Dobrowolski, J.W. Naqui, S.A.H. Sharma, K. Shaukat, A.S and Vohora, S.B. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products, *Journal of Ethnopharmacology* **35**.
- [29]. Séverine, B. (2014). Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de docteur de l'université d'Angers : pharmaco chimie. Angers : université Nantes Angers le mans, p390.



- [30]. Alvarez-Suarez, J.M. (2017). Bee Products-Chemical and Biological Properties. Cham, Switzerland: *Springer*.
- [31]. Shimizu, T. Hino, A. Tsutsuli, A. *et al.* (2008). Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemther.* 19(1):7-13
- [32]. Cascella, M. Rajnik, M. Cuomo, A. Dulebohn, S. Napoli, R. and StatPearls. (2020). Features, evaluation and treatment Coronavirus (COVID19).
- [33]. Watanabe, M. (2011). Cytotoxic Constituents of Propolis Inducing Anticancer Effects: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 1378–1386.
- [34]. Berretta, A. Nascimento, A. Bueno, C. De Oliveira, M. Vaz, L. Marchetti, J.M. (2012). Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. *Int J Biol Sci.* Pp. n. 8(4), p. 512–521.
- [35]. Fondation pour la recherche sur la propolis, (Propriétés anesthésiques locales) disponible sur: <https://www.ruchersdelorraine.com/fr/propolis.php> (Consulté le 23-03-2022).
- [36]. Monzote, L. Cuesta-Rubio, O. Fernandez, M. Hernandez, I. Fraga, J. Pérez, K. Kerstens, M. Maes, L. Cos, P. (2012). In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.*, pp. n. 107 (8), p. 978-984.
- [37]. De Almeida, E.C. Menezes, J. (2002). Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 8:191.
- [38]. Bankova, V. Dyulgerov, A. Popov, S. Evstatieva, L. Kuleva, L. Purb, O. *et al.* Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie, Springer Verlag*, 23 (1) : 79-85.
- [39]. Bankova, V. Christov, R. Popov, S. Pureb, O. Bocari, G. (1994). Volatile constituents of propolis. *Journal de Naturforsch* 49: 6-10.
- [40]. Cuesta-Rubio, O. Frontana-Urbe, B.A. Ramirez-Apan, T. Cardenas, J. Z. *Naturforsch.* (2002). 57, 372.
- [41]. Hegazi, A.G. Abd El Hady, F.K. Z. (2002). *Naturforsch* 57: 395.
- [42]. Nagy, M. (1989). Constituents of propolis of Czechoslovak origin. V. *Chemical Papers*, 42 (5): 691-696.
- [43]. Omar, M.O.M. (1989). Some characteristics of propolis from Upper Egypt. Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo, Egypt, 6-10 November 1988, 88-92
- [44]. Papay, V. (1987). Chemical and pharmacological study of propolis from various locations. *Acta Pharmac. Hung.*, 57:143-151.
- [45]. Gabrys, J. (1986). Free amino acids in beehive products (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. *Pharmac. Research Communications* 18 (6): 513518.



- [46]. Cuellar Cuellar, A. Rojas Hernandez, N.M. (1987). Chemical components of Cuban propolis. *Revista Cubana de Farmacologia*, **21**(3): 365-372.
- [47]. Tosi, Enzo, A. Ciappini. Maria, C. Cazzolli. Ampelio, F. Tapiz. Luis, M. (2006). Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *Apiacta* **41**:110-120.
- [48]. Shiva, M. Z. Shariatpanahi, M. Manoochehr, H. Reza, A. Samadi, N. Ostad, N. (2006). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*.
- [49]. Ahn, M. Kumazawa. S. Usui Y.; Nkamura. J.; Matsuka M.; Zhu. F.; Nakayama. T. (2007). Antioxydant activity and constituent of propolis collected in varaus areas of china. *Food chemistry* **101**. 1383 – 1392.
- [50]. Ghedira. K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* N 4: 162-169
- [51]. Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem*, **1**:569-590.
- [52]. Van Der Woude H., Alink G.M., Van Rossum B.E.J., Walle K., Van Steeg H., Walle T., Rietjens I.M.C.M. (2005). Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol*, **18**, 1907-1916.
- [53]. Marcucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, **26**: 83 – 99
- [54]. Nicola Volpi. ; Gianluca Bergonzini. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by online HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **42**: 354 – 361
- [55]. Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoïds. *PharmacolTherap*, **96**: 67-2002
- [56]. Silici, S. Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**: 69 -73.
- [57]. Häkkinen, S. (2000). Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Thèse doctorale. *KUOPIO*, **93**.
- [58]. Ribéreau-Gayon. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. *Dunod Paris*, 254
- [59]. Moudir, N. (2004). Les polyphénols de la propolis algérienne. Mémoire présenté en vue de l'obtention du magister de l'universite de M'sila : chimie. M'sila : Université Mohamed Boudiaf.
- [60]. Thiriot, E. (2009). Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy: Université de Nancy. France. 291 p

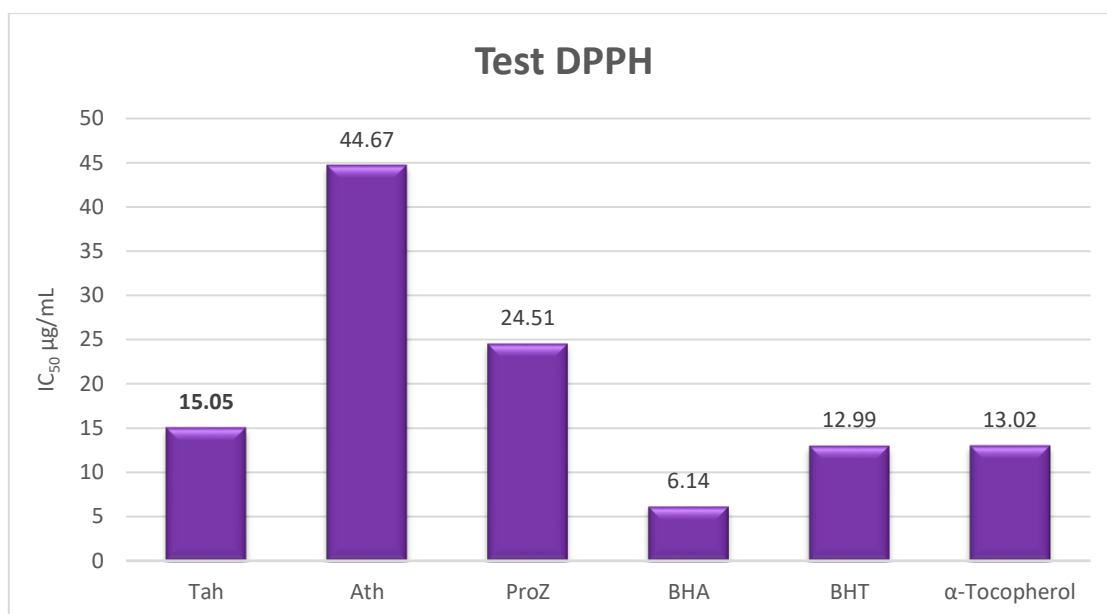


- [61]. Schulz-Gasch, T. Stahl, M. (2004). Scoring Functions for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective », *Drug Discovery Today: Technologies*.N (1), 231-239.
- [62]. Halperin, B. Wolfson, Ma, H. Nussinov, R. (2002). “Principles of Docking : An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions,” *PROTEINS Struct. Funct. Genet* **443** (47) : 409–443.
- [63]. Brut, M. (2009). Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques. Thèse de doctorat d’université : Nanophysique. Toulouse : Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 170 p.
- [64]. Grosdidier A. (2007). Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie, Grenoble : Université Joseph Fourier. France.
- [65]. Renvez G. (2010). Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking. Thèse de doctorat d’université : Nanophysique. Toulouse : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 163 p.
- [66]. Sousa, S. F., Fernandes, P. A., Ramos M. J. (2006). Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *Proteins*. 65: 15-26.
- [67]. Bessadok, M.A. (2011). La multiplicité de transport de la P-glycoprotéine : Etudes de modélisation comparative et de docking au sein de la famille des protéines ABC. Thèse de doctorat d’université : Bioinformatique Structurale. Paris : université pierre et marie curie. France. p 189.
- [68]. Jay, A. Jain, N. (2007). Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *J. Comput.-Aided Mol* **21**: 281-306.
- [69]. Park, Y. K. Ikegaki, M. (1998). Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparation. *Biosc Biotechnol Biochem* **62**: 2230-2232.
- [70]. Cavé, A. (1993). Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Second Ed. Tec. ET Doc Ed Lavoisier, Paris. pp. 274-285.
- [71]. Hadj-salem J. (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *nitrariaretusa* et dérivés acyles de ce molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Lorraine.
- [72]. Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*: **4617** (181): 1119-1200.
- [73]. Re, R. Pellegrini, N. Proteggente, A. Pannala, A. Yang, M. Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**: 1231–1237.
- [74]. Szydłowska-Czerniaka, A. Dianoczki, C. Recseg, K. Karlovits, G. Szlyk, E. (2008) Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; **76**: 899-905.
- [75]. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**: 307–315.

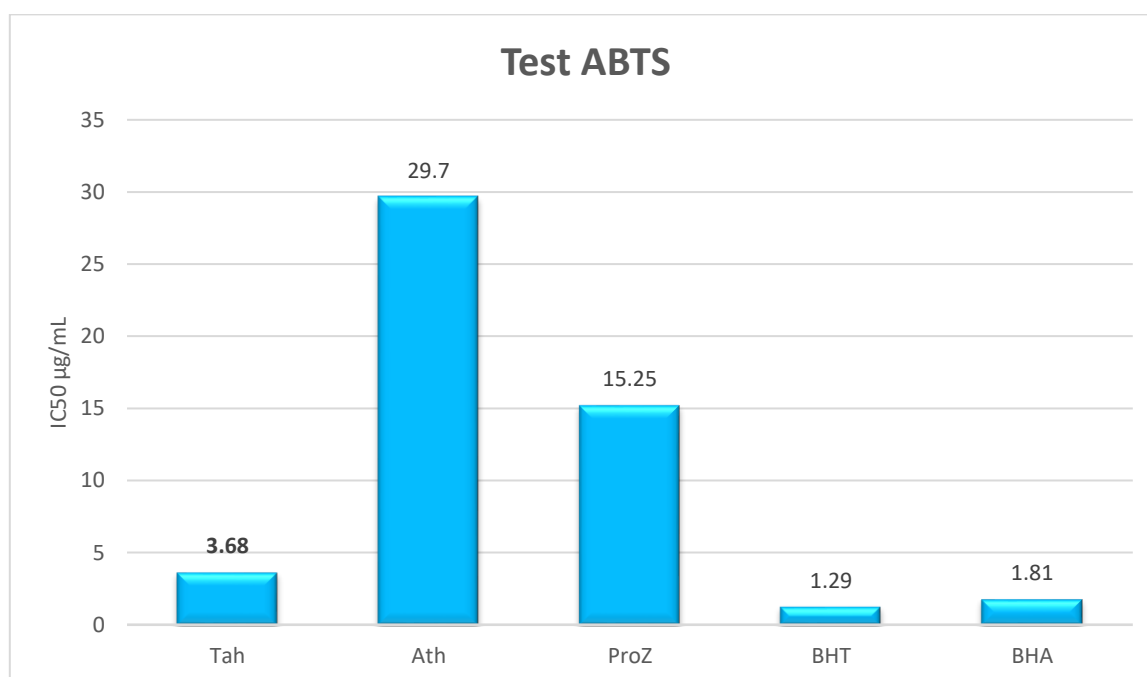


- [76]. Özyürek, M. Güngör, N. Baki, S. Güçlü, K. Apak, R. (2012). Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols, *Analytical Chemistry*.
- [77]. Ellman, G.L. Courtney, K.D. Andres, V. Featherston, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7, 88–95.
- [78]. Boyle, N. M. O. Banck, M. James, C. A. Morley, C. Vandermeersch, T. Hutchison, G. R. (2011). “Open Babel : An open chemical toolbox,” *Journal de Cheminform.* pp. 1–14.
- [79]. Biovia, D. S. (2015). Discovery studio modeling environment. San Diego, *Dassault Systemes*, Release, 4.
- [80]. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N. Weissig, H., *et al*, (2000). “The Protein Data Bank,” *Nucl.Ac.Res* **28**(1): 235–242.
- [81]. Chikhi, A. Bensegueni, A. (2008). “Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Freeware,” *Journal de Comput. Sci. Syst. Biol.*
- [82]. Rebiai, A. Lanez, T. Belfar, M.L. (2013). Total polyphenol contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of Algerian propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* **6** (1): 975-1491.
- [83]. Segueni, N. Evren, D. Akkal, S. Beraat, Ö. Rhouati, S. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent Pakistan. *Journal of pharmaceutical sciences*.
- [84]. Boulechfar, S. Zellagui, A. Bensouici, C. Asan-Ozusaglam4, M. Tacer, S. Djeghim, H., (2021). Anticholinesterase, anti- α -glucosidase, antioxidant and antimicrobial effects of four Algerian propolis. *Journal of food measurement and characterization*.
- [85]. Markhem, K.R. (1982) Techniques of flavonoid identification. *Biological techniques Series*. Ed. TREHERNE j. e. ET Rubery P. H. *Academic Press*. 113p
- [86]. Javanmardi, J., Stushnoff, C. ; Locke, E. ; et Vivanco J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenol content of Iranian *Ocimum* accession. *Food Chemistry* **101**: 410 – 550.
- [87]. Chen, Z. Bertin, R. Frolidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry* **138**(1): 414-420. - Chung Y.,
- [88]. Bentabet, N. Boucherit-Otmani, Z. Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d’extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *ResearchGate*, 1-8.
- [89]. Benhanifia, M. Wessam, M. Bellik, Y. Benbarek, H. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis from North Western Algeria. *Food science and technology* **48**: 2521 – 2527.
- [90]. Ota, C. Unterkriher, C. Fantinato, V. ET Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* **44**: 375 – 378.
- [91]. Teniou, S. (2012). Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Mémoire présenté en vue de l’obtention du Magistère de l’université Constantine-1 : Biochimie. Constantine: Université Frères Mentouri.

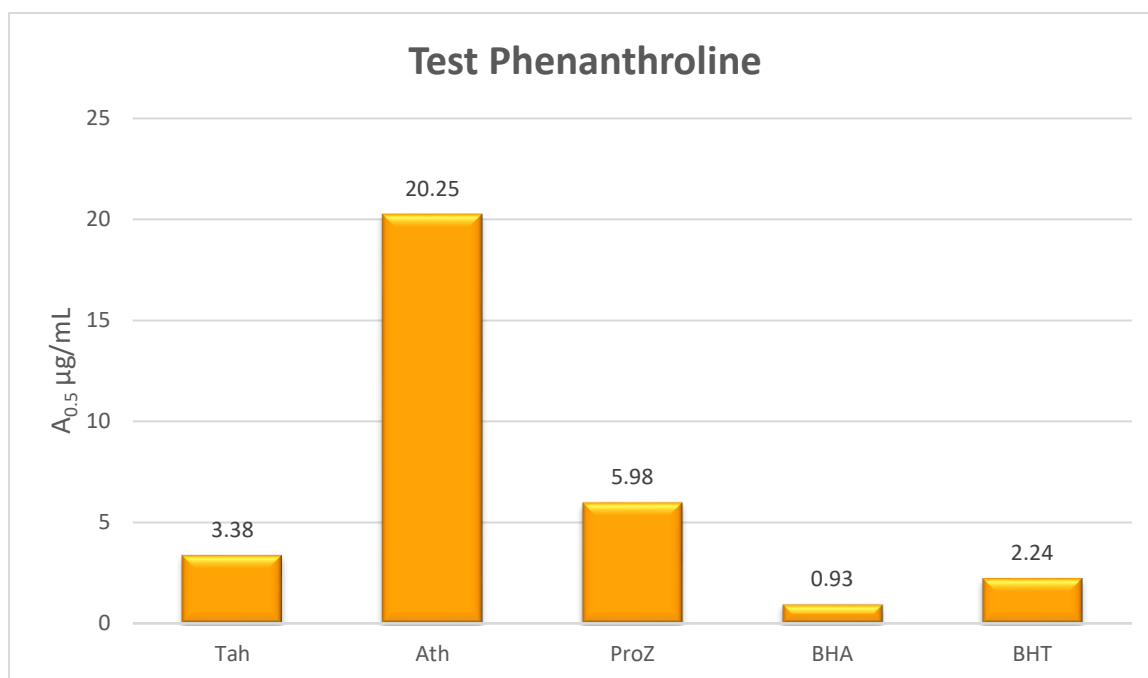
Annexe



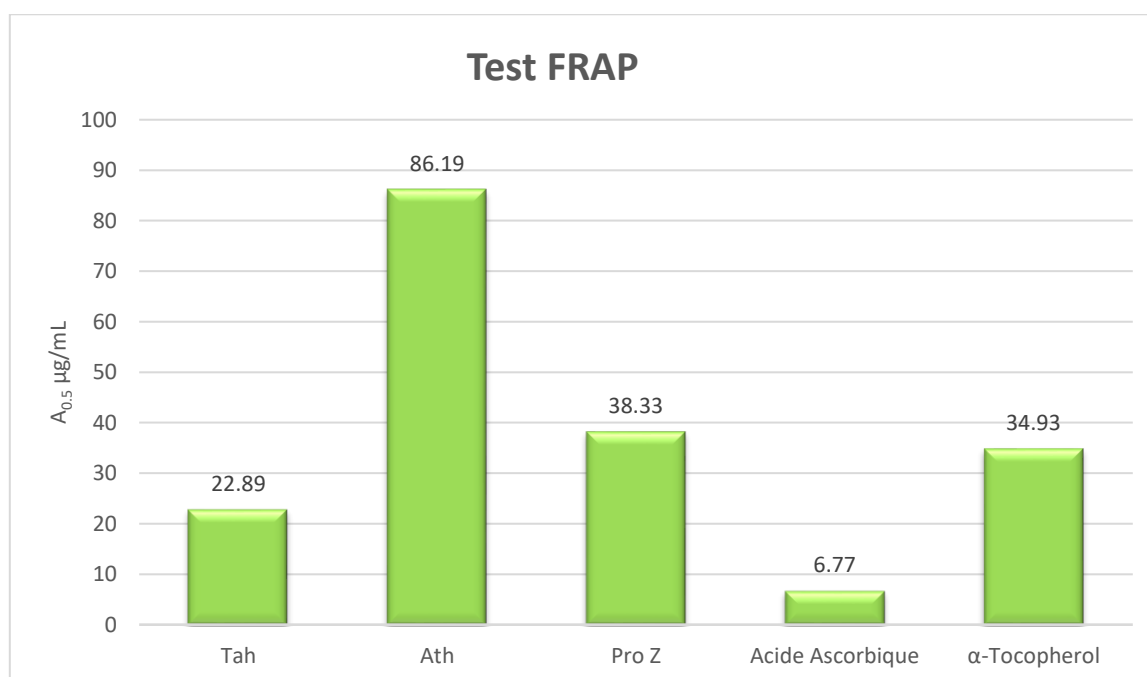
Annexe 1 : Histogramme de l'IC₅₀ des extraits et standards obtenus par le test DPPH.



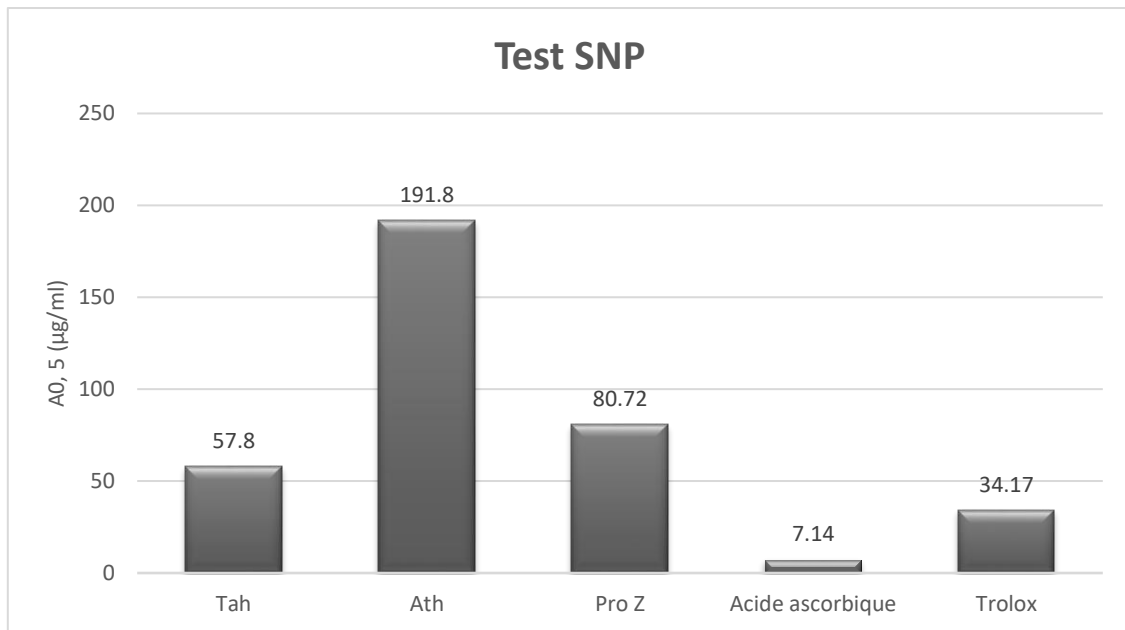
Annexe 2 : Histogramme de l'IC₅₀ des extraits et standards obtenus par le test ABTS



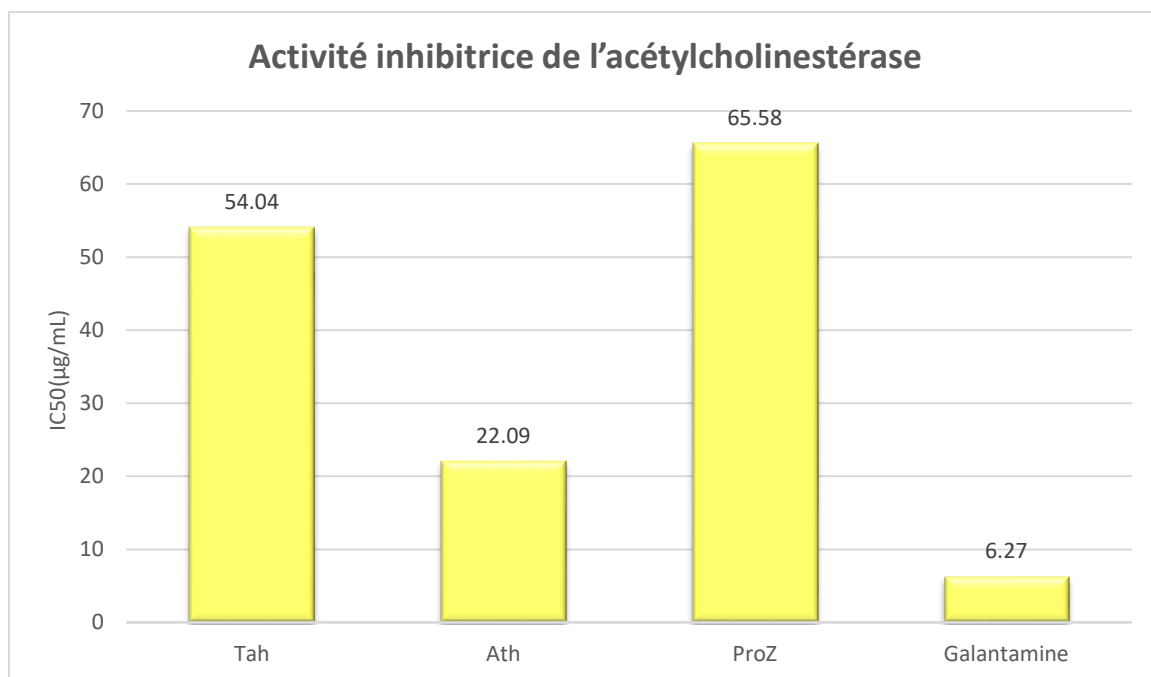
Annexe 3 : Histogramme de l' IC_{50} des extraits et standards obtenus par le test Phenanthroline



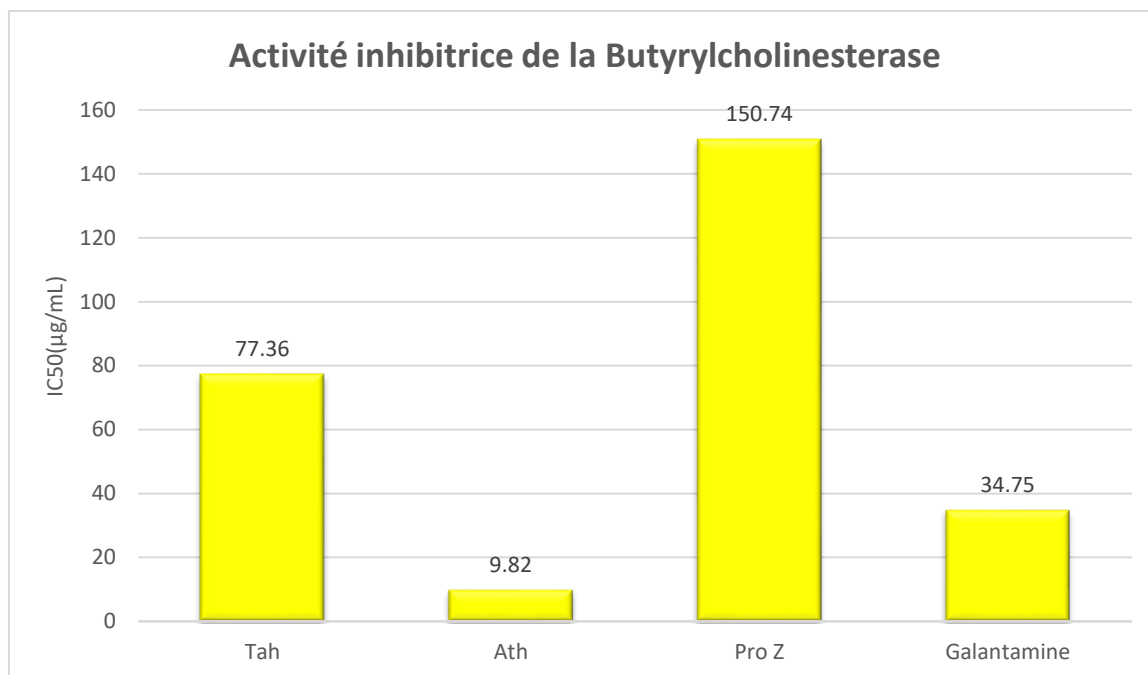
Annexe 4 : Histogramme de l' $A_{0.5}$ des extraits et standards obtenus par le test FRAP



Annexe 5 : Histogramme de l'A_{0,5} des extraits et standards obtenus par le test SNP



Annexe 6 : Histogramme de l'IC₅₀ des extraits et standard obtenus par le test anti-AchE



Annexe 7 : Histogramme de l'IC₅₀ des extraits et standard obtenus par le test anti-BchE



Annexe 8 : Tableau RMSD des 100 complexes.

Protéine	Ligand	RMSD	Protéine	Ligand	RMSD
1A3B	T29	0,596	2VJM	COA	2,703
1ACJ	THA	0,207	2W3S	MTE	1,328
1AMN	NAF	1,576	2WON	ZZE	1,2
1AT3	DFP	0,957	2XBU	5GP	2,531
1BIO	SOA	1,506	2XF0	4UB	1,529
1BJG	CXM	1,2	3CCC	7AC	0,456
1BLC	ACEM	1,072	3DI6	PDZ	1,739
1BQN	HBV	1,81	3DOK	GWJ	1,538
1BTZ	OZY	0,667	3EVQ	THP	2,315
1C1C	612	1,188	3IRX	UDR	1,989
1COT	HEC	1,424	3ISN	EDM	1,851
1CV8	E64	1,319	3M8P	65B	1,84
1DGB	HEM	1,164	3QTQ	X35	0,751
1DTQ	FPT	1,432	3R8Z	Z63	1,682
1EVE	E20	2,869	3WY2	BGC	0,243
1FK9	EFZ	1,381	3WY3	BGC	1,105
1GPN	HUB	2,194	4 E01	0F1	0,037
1GQR	SAF	1,483	4D09	788	1,776
1H2J	ADCB	0,614	4DR9	BB2	1,853
1H49	BGC	0,982	4EBV	007	1,668
1HL7	BD1	1,212	4EOO	ATP	1,325
1HNV	TBO	0,565	4FLL	YZ6	1,464
1HPX	KNI	0,579	4IKR	PVP	0,703
1HTP	OSS	1,53	4IKS	TFD	1,165
1J11	EPG	1,607	4IU6	FZ1	0,504
1JCL	HPD	1,6	4JE7	BB2	1,461
1JOK	THP	1,626	4OGT	2U6	2,761
1JSR	LDO	1,367	4OTY	LUR	2,565
1JZ3	2DG	1,06	4PES	2PJ	1,412
1LOX	RS7	0,772	4ZX4	4TL	1,228
1M4B	NMP	0,377	5EKK	THP	1,374
1RTI	HEF	1,528	5F12	FMN	1,858
1TKT	H12	1,545	5F94	3UO	0,778
1TKX	GWB	1,688	5JF1	BB2	1,621
1V97	FYX	0,773	5JL9	ASD	1,094
1VDV	YSH	1,635	5KRU	THP	0,63
1VRT	NVP	1,458	5LB6	UN9	1,948
1WUT	BN2	1,666	5LYJ	7BA	1,517
2BAN	357	1,474	5NUC	THP	0,146
2BE2	R22	1,183	5OR6	A4K	0,545
2BIB	BTB	0,587	5UMW	RBF	1,534
2BU5	TF1	0,106	5URS	8LA	2,251
2EW5	Y12	2,191	6BR1	E3Y	0,561
2EW6	Y13	1,738	6HOT	CIY	0,088
2G3N	BOG	1,186	6IND	AKO	1,7
2RF2	MRX	1,159	6M8C	IRH	1,41



2RJP	886	0,97	6OK8	THP	2,138
2RJQ	BAT	1,567	6PZO	P6Y	0,446
2RKI	TT1	1,338	6PZR	P7D	2,72
2VG6	NNB	1,362	6SUK	FT8	0,602

Résumés

**Résumé :**

La propolis est une matière première très étudiée de nos jours dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Dans le présent travail, 3 extraits hydroéthanoliques de la propolis provenant de OUED ZEHOUR (wilaya de Skikda), EL TAHIR (Wilaya de Jijel) et OUED ATHMANIA (Wilaya de Mila, ont fait l'objet d'une étude phytochimique, biologique et bioinformatique. En effet, le screening phytochimique a révélé l'existence des phénoliques, des stérols et des flavonoïdes (flavonol, flavone...etc). La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) nous a permis d'identifier 25 composés particulièrement des acides phénoliques (acide férulique, acide gallique...) et flavonoïdes (chrysin, apigénine, kaempferol, Hespéridine). Il a été montré dans ce travail que l'effet biologique des extraits de la propolis dépend de leur origine géographique. En effet, l'extrait TAH a montré le meilleur effet antioxydant et l'extrait ATH a présenté le meilleur effet inhibiteur à l'égard de l'AChE et la BChE. De plus, les trois extraits ont présenté un effet antibactérien considérable, particulièrement contre les bactéries à gram positifs (*Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*) et aussi contre le champignon *Candida albicans*. Enfin, le docking moléculaire des 25 composés identifiés par HPLC fait ressortir l'acide Chlorogénique et la cynarine comme meilleurs inhibiteurs de l'AChE et la BChE respectivement avec une meilleure affinité théorique et un bon positionnement dans le site actif des cibles étudiées.

Mots clés : Activité biologique, Docking moléculaire, HPLC, Polyphénols, Propolis, Screening phytochimique.

**Abstract:**

Propolis is a highly studied raw material nowadays in the food, cosmetic and pharmaceutical sectors. In the present work, three hydroethanolic extracts of propolis from OUED ZEHOUR (State of Skikda), EL TAHIR (State of Jijel) and OUED ATHMANIA (State of Mila), were the subject of a phytochemical, biological and bioinformatics study. Indeed, phytochemical screening has revealed the existence of phenolics, sterols and flavonoids (flavonol, flavone, etc.). High-performance liquid chromatography (HPLC) has enabled us to identify 25 compounds particularly phenolic acids (ferulic acid, gallic acid, etc.) and flavonoids (chrysin, apigenin, kaempferol, Hesperidine). It has been shown in this work that the biological effect of propolis extracts depends on their geographical origin. Indeed, the TAH extract showed the best antioxidant effect and the ATH extract showed the best inhibitory effect with respect to AChE and BChE. In addition, the three extracts had a considerable antibacterial effect, particularly against gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*) and also against the fungus *Candida albicans*. Finally, the molecular docking of the 25 compounds identified by HPLC highlights chlorogenic acid and cynarine as the best inhibitors of AChE and BChE respectively with a better theoretical affinity and a good positioning in the active site of the studied targets.

Keywords: Biological activity, Molecular docking, HPLC, Polyphenols, Propolis, Phytochemical screening.



ملخص:

العكبر هو مادة خام مدروسة بشكل كبير في الوقت الحاضر في قطاعات التغذية، مستحضرات التجميل والمواد الصيدلانية. في هذا العمل، ثلاثة مستخلصات هيدروإيثنولية من العكبر مستخلصة من منطقة واد زهور (ولاية سكيكدة)، منطقة الطاهير (ولاية جيجل) ومنطقة واد العثمانية (ولاية ميله)، كانت موضوع بحث نباتي-كيميائي، بيولوجي و معلوماتي حيوي. في الواقع، الفحص الكيميائي النباتي كشف عن وجود الفينولات، الستيرولات والفلافونويدات (فلافونول، فلافون... الخ). مكنتنا خاصية HPLC، من تمييز 25 مركبًا تحديدا الأحماض الفينولية (حمض الفيروليك وحمض الغاليك...) و الفلافونويدات (كيرسين، أبيجينين، كايمفيرول، هيسبيريدين). وقد ثبت في هذا العمل أن التأثير البيولوجي لمستخلصات العكبر يعتمد على أصلها الجغرافي. حيث أظهر المستخلص TAH أفضل تأثير مضاد للأكسدة، وأظهر مستخلص ATH أفضل تأثير مثبط فيما يتعلق بـ AChE و BChE. بالإضافة إلى ذلك، كان للمستخلصات الثلاثة قدرة تأثير كبيرة ضد البكتيريا، لا سيما موجبة جرام (Staphylococcus aureus) و (Micrococcus luteus) و ضد خميرة *Candida albicans*. أخيرًا، docking moleculaire يسلم للمركبات الـ 25 التي حددتها HPLC الضوء على حمض الكلوروجينيك والسينارين كأفضل مثبطات لـ AChE و BChE على التوالي باحسن قابلية ارتباط نظري وتموضع جيد في الموقع الفعال للأهداف المدروسة.

الكلمات الرئيسية: العكبر، معلوماتي حيوي، الفحص الكيميائي النباتي، HPLC، Docking moleculaire.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : ALLAM Aridj
ZELLAGUI Dina

Biomolécules à intérêt pharmaceutique de la propolis : Etude expérimentale et *in silico*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée

La propolis est une matière première très étudiée de nos jours dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Dans le présent travail, 3 extraits hydroéthanoliques de la propolis provenant de OUED ZEHOOR (wilaya de Skikda), EL TAHIR (Wilaya de Jijel) et OUED ATHMANIA (Wilaya de Mila, ont fait l'objet d'une étude phytochimique, biologique et bio-informatique. En effet, le screening phytochimique a révélé l'existence des phénoliques, des stérols et des flavonoïdes (flavonol, flavone...etc). La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) nous a permis d'identifier 25 composés particulièrement des acides phénoliques (acide férulique, acide gallique...) et flavonoïdes (chrysin, apigénine, kaempferol, Hespéridine). Il a été montré dans ce travail que l'effet biologique des extraits de la propolis dépend de leur origine géographique. En effet, l'extrait TAH a montré le meilleur effet antioxydant et l'extrait ATH a présenté le meilleur effet inhibiteur à l'égard de l'ACHé et la BChE. De plus, les trois extraits ont présenté un effet antibactérien considérable, particulièrement contre les bactéries à gram positifs (*Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*) et aussi contre le champignon *Candida albicans*. Enfin, le docking moléculaire des 25 composés identifiés par HPLC fait ressortir l'acide Chlorogénique et la cynarine comme meilleurs inhibiteurs de l'ACHé et la BChE respectivement avec une meilleure affinité théorique et un bon positionnement dans le site actif des cibles étudiées.

Mots-clefs : Activité biologique, Docking moléculaire, HPLC, Polyphénols, Propolis, Screening phytochimique.

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biochimie appliquée (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Laboratoire de Phytochimie et analyses Physico-chimiques et Biologique (UFM, Constantine 1).

Laboratoire de Proteomique (Centre de recherche en biotechnologie, Constantine).

Laboratoire de biomolécules végétale et amélioration des plantes (Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi)

Encadrant : Mr. MOKRANIE-H (MCB – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mr. BENSEGUENI. A (Pr – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Mme. DEMMAK.R .G (MCA–Université Salah Boubnider, Constantine 3).