

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار تليدي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOuat  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

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

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Biochimie appliquée*

### Thème

**Activité antioxydante des extraits polaires de la plante *Smilax aspera* et étude *in silico* de l'activité inhibitrice de quelques enzymes par l'épicatéchine et le resvératrol.**

**Présenté par :**

- Melle. BELAID Mamma Denia
- Melle. BELKHIR Asmaa

**Devant le jury compose de :**

M. BOURIMA Youcef	MAA (Universite Amar Telidji Laghouat)	Président
M. SIFI Ibrahim	MCA (Universite Amar Telidji Laghouat)	Examineur
Melle. ZAKHROUF Zohra	MAA (Universite Amar Telidji Laghouat)	Rapporteur
M. BOUKEROUIS Djoudi	MAA (Universite Amar Telidji Laghouat)	Co-Rapporteur

**Soutenu publiquement le : 22/06/2023**

## **Résumé :**

Le but de notre travail était d'évaluer les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits polaires des racines de la plante *Smilax aspera*, en plus, l'utilisation de docking moléculaire pour étudier la capacité des certains métabolites secondaires de cette plante pour inhiber des enzymes responsables de stress oxydatif et effet prolifération cellulaire. Des processus d'extraction successifs par des solvants organiques à polarité croissante ont abouti à des rendements différents. Le dosage quantitatif des polyphénols totaux montre la richesse de l'extrait dichlorométhanolique, avec une valeur de  $55,70 \pm 6,40$  mg EAG/g ES, tandis que l'extrait d'acétonique présente l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une valeur de  $10.71 \pm 0.13$  mg EQ/g ES. L'étude de l'activité antioxydante de ces extraits a été évaluée par test DPPH, selon les résultats obtenus, l'extrait acétonique enregistre la valeur la plus importante de VCEAC ce qui permet de lui considérer comme étant l'extrait le plus puissant. L'étude *in silico* via l'amarrage moléculaire nous a montré que les composés identifiés dans les racines de cette plante dans des études précédentes : le resvératrol et l'épicatéchine ont une activité inhibitrice importante sur les enzymes : alpha-amylase, xanthine oxydase et la télomérase.

**Mots clés :** composés phénoliques ; activité antioxydante ; docking moléculaire ; resvératrol ; epicatéchine.

## ملخص

كان الهدف من عملنا هو تقييم مستويات المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات القطبية لجذور نبات الفشاغ، بالإضافة إلى استخدام الإلتحام الجزيئي لدراسة قدرة بعض المستقلبات الثانوية لهذا النبات المحدد من عمليات البحث السابقة لتنشيط الإنزيمات المسؤولة عن الإجهاد التأكسدي. أدت عمليات الإستخراج المتتالية بواسطة المذيبات العضوية المستقطبة بشكل متزايد إل عوائد مختلفة. يظهر التحديد الكمي لمجموع البوليفينول ثراء مستخلص ثنائي كلورو الميثانوليك، بقيمة  $6.40 \pm 55.70$  ميليغرام مكافئ حمض الغاليك /غرام مستخلص جاف، بينما يحتوي مستخلص الأستونيك على أعلى مستخلص في الفلافونويد بقيمة  $0.13 \pm 10.71$  ميليغرام مكافئ حمض الغاليك /غرام مستخلص جاف. تم تقييم دراسة النشاط المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات من خلال إختبارتنشيط الجذر الحر الألكيلي، وفقا للنتائج التي تم الحصول عليها يسجل مستخلص الأستونيك أهم قيمة لسعة مضادات الأكسدة المكافئة لفيتامين ج، والتي تسمح لنا بإعتباره أقوى مستخلص. أظهرت لنا الدراسة في السيليكو عن طريق الإلتحام الجزيئي أن المركبات التي تم تحديدها في جذور هذا النبات في الدراسات السابقة : ريسفيراترول و ايبيكاتيشين لهما نشاط مثبط مهم على الإنزيمات : ألفا أميلاز، زانثين أكسيداز وتيلوميراز.

**كلمات مفتاحية :** مركبات فينول ;نشاط مضاد الأكسدة ;الإلتحام الجزيئي; ريسفيراترول ; ايبيكاتيشين.

## **Abstract**

The aim of our work was to evaluate the phenolic compound contents and the antioxidant activity of the polar extracts from the roots of the *Smilax aspera* plant, in addition, the use of molecular docking to study the capacity of certain secondary metabolites to inhibit enzymes responsible for oxidative stress and cell proliferation. Successive extraction processes with organic solvents with increasing polarity have resulted in different yields. The quantitative determination of the total polyphenols shows the richness of the dichloromethanolic extract, with a value of  $55.70 \pm 6.40$  mg EQ/g ES, while the acetonic extract presents the extract richest in flavonoids with a value of  $10.71 \pm 0.13$  mg EQ/g ES. The study of the antioxidant activity of these extracts was evaluated by DPPH test according to the results obtained, the acetone extract records the most important value of VCEAC, which makes it possible to consider it as the most powerful extract. The *in silico* study via molecular docking showed us that the compounds identified in the roots of this plant in previous studies: resveratrol and epicatechin have important inhibitory activity on the enzymes: alpha-amylase, xanthine oxidase and telomerase.

**Keywords:** phenolic compounds; antioxidant activity; molecular docking; resveratrol; epicatechin.

# *Dédicace*

*A l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mon cher père **ABDELKADER** qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes Etudes, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements, puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorde santé, longue vie et bonheur.*

*A ma très chère mère **BADRA** qui me représente le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études, puisse Dieu, le Tout puissant, te préserver et t'accorde santé, longue vie et bonheur.*

*A mon très cher frère **Dr. MOHAMED LAMINE**. Merci, mon frère. Merci d'avoir donné à ta petite sœur la force et le courage de faire de petits pas vers son rêve. Je voulais simplement vous remercier de tout votre soutien. Vous avez été un catalyseur pour moi et je suis très reconnaissante de vous avoir dans ma vie.*

*Je remercie tous les membres de la grande famille « **BELKHIR** », surtout mon frère **SALAH EDDINE**, qui m'a fait toujours confiance et qui m'a beaucoup encouragé et mes belles sœurs **MANEL** et **SAMAH** pour leur sacrifices leurs encouragements permanents, et leur soutien moral, je lui dis « merci beaucoup ma chère famille ».*

*A mes chères amies : **Sabrine, Meriem, Asma, Fatna** pour la motivation et le soutien inconditionnel qu'elles m'ont offert durant toute la période du mémoire, sans elles ce travail n'aurait pas accompli. Merci beaucoup.*

*Sans oublier un grand merci du fond cœur à mon cher collègue dans ce travail **DOUNIA** a passé des moments ensemble que dieu garde notre amitié pour toujours.*

**ASMAA**

# ***Dédicace***

## ***À mes chers parents***

*Qui sont à l'origine de toutes mes réussites. Merci pour votre confiance et votre soutien permanent.*

### ***Père***

*Tu m'as toujours soutenu dans mes études. Encore aujourd'hui tu essaies de suivre ce que je fais et tu m'apportes toujours l'aide nécessaire pile au bon moment.*

### ***Mère***

*Aucun mot ne sera assez fort pour te remercier de tout ce que tu as fait ces dernières années, pour tout ce que tu fais et ce que tu feras. Ton dévouement et tes encouragements sont inestimables, pour moi, pour nous quatre. Tu es mon modèle, mon roc et mon réconfort*

### ***À mon frère***

*En témoignage de ma gratitude pour ses encouragements, sa patience, son aide et son incitation à poursuivre mon rêve*

### ***A mes chères amies***

*Hadjer, Khadidja, Sabrina, Meriem, pour la motivation et le soutien continus*

*Un grand merci à mon cher Asma collègue pour le temps que nous avons passé ensemble afin que Dieu garde notre amitié pour toujours, sans oublier.*

*Nous remercions aussi tous mes amis qui ont de près ou de loin contribué à l'élaboration de ce mémoire*

***Mamma Denia***

# **Remerciements**

*Tout d'abord, nous remercions **ALLAH**, notre créateur de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.*

*Nous mentionnons d'abord, nos profonds remerciements à **Melle. ZAKHROUF ZOHRA** pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé pour réaliser ce travail.*

*On désire remercier aussi notre Co-encadreur, **Mr. BOUKEROUIS DJOUDI** pour avoir accepté de diriger ce travail. Leur contribution au suivi de ce travail a été décisive à l'accomplissement de l'objectif visé à travers ce travail.*

*Nous exprimons nos sincères gratitudes, à **Mr. BOUBRIMA YUCEF** pour l'honneur qu'il fait de présider le jury et d'évaluer ce travail. Nous adressons nos remerciements à l'égard de **Mr. SIFI IBRAHIM** qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*On remercie aussi **Pr. GOUZI HICHEM** pour son soutien et ses encouragements.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à tous les membres du laboratoire pédagogique de département de biologie pour leurs conseils et leurs orientations. et le directeur de laboratoire des sciences fondamentales **Pr. YOUSFI MOHAMED** de nous accepter dans son laboratoire de recherche pour faire une partie de notre projet de fin d'étude.*

*Je ne peux jamais oublier l'aide de mes amies : **Belmecheri Sabrine, Belarif Meriem.***

*Et Nous remercions surtout : **Tamimount khouloud, Dali Abir***

*Enfin, Nous tenons aussi à remercier toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.*

## Liste des tableaux

Tableau 1 :	Nomenclature de la plante <i>Smilax aspera</i> .....	5
Tableau 2 :	Principaux constituants chimiques de <i>Smilax aspera</i> .....	6
Tableau 3 :	Les principales sources des RL .....	9
Tableau 4 :	Quelques maladies liées au stress oxydant .....	10
Tableau 5 :	Molécules de <i>Smilax aspera</i> pour l'étude de docking moléculaires.....	17
Tableau 6 :	Les informations structurales des enzymes choisies .....	24
Tableau 7 :	Le rendement (%), aspect, et couleurs des différents extraits étudiés de <i>smilax aspera</i> .....	28
Tableau 8 :	Teneurs en polyphénols totaux dans les différents extraits de <i>Smilax aspera</i> .....	29
Tableau 9 :	Teneurs en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de <i>Smilax aspera</i> .....	31
Tableau 10 :	Les valeurs de VCEAC en mg/g des extraits de <i>Smilax aspera</i> .....	33
Tableau 11 :	Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme alpha-amylase...	35
Tableau 12 :	Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme xanthine oxydase	37
Tableau 13 :	Les valeurs de docking score des ligands avec le télomérase.....	39
Tableau 14 :	Les paramètres de la règle de cinq de Lipinski.....	41
Tableau 15 :	Les propriétés pharmacocinétiques et toxicité des ligands.....	42

## Liste des figures

Figure1	Classification botanique de <i>Smilax aspera</i> .....	5
Figure2	Photographie des racines de l'espèce <i>Smilax aspera</i> .....	14
Figure3	Interface de la page d'accueil du RCSB PDB .....	15
Figure4	Interface de la page d'accueil du PubChem .....	15
Figure5	Interface de la page d'accueil du logiciel AutoDoc .....	15
Figure6	Interface de la page d'accueil de logiciel Discovery studio .....	16
Figure7	Interface graphique de SwissADME .....	16
Figure8	Interface graphique de ADMETlab	16
Figure9	Organigramme du protocole expérimental .....	18
Figure10	Protocole d'extraction de notre travail.....	19
Figure11	Réaction de radical DPPH .....	22
Figure12	La structure des ligands resvératrol (A : 2D ; B ; 3D) ; et épicatechine (C : 2D ; D ; 3D) .....	23
Figure13	Les critères de la règle de Cinq Lipinski.....	25
Figure14	Comparaison entre les rendement en % des différent extraits .....	28
Figure15	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique .....	29
Figure16	Comparaison entre les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de <i>Smilax aspera</i> .....	30
Figure17	Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	31
Figure18	Comparaison entre les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>Smilax aspera</i> .....	32

Figure19	La courbe d'inhibition PI% en fonction de la concentration de Vit C (test de DPPH ).....	<b>33</b>
Figure20	Comparaison entre les valeurs de VCEAC des extraits de <i>smilax aspera</i> (test de DPPH) .....	<b>34</b>
Figure21	Analyse visuelle du site de liaison de resvératrol (A) et épicatechine (B) avec alpha amylase .....	<b>36</b>
Figure22	Analyse visuelle du site de liaison de resvératrol (A) et épicatechine (B) avec xanthine oxydase .....	<b>38</b>
Figure23	Analyse visuelle du site de liaison de resvératrol (A) et épicatechine (B) avec télomérase .....	<b>40</b>

## Liste des abréviations

**ACT** : Acétone

**ADMET** : Absorption Distribution Métabolisme Excrétion Toxicité

**AG**: Acide gallique

**AM** : amarrage moléculaire

**ABS** : Absorbance

**AA%** : Activité antioxydante%

**BBB** : Pénétration de la barrière hémato-encéphalique

**BIBR1532**: 2-[(2E)-3-(naphthalen-2-yl) but-2-enoyl] amino } benzoic acid

**CYT** : Cytochrome

**2D** : Structure bidimensionnelle

**3D** : Structure tridimensionnelle

**DCM** : Dichlorométhane

**UV** : Rayonnement ultraviolet

**EAG** : Equivalent d'acide gallique

**EE** : Extrait éthanolique

**ES** : Extrait sec

**EQ** : Equivalent de la quercétine

**GI Absorption**: Gastro-intestinal absorption

**HERG**: Human Ether Related Gene channel

**IC50** : Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres

**LogP** : Coefficient de partition octanol / eau

**MW** : Poids moléculaire

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

**nOHN** : Nombre donneurs de liaisons Hydrogène

**nON** : Nombre d'accepteurs de liaisons Hydrogène

**nRot** : Nombre d'angles de rotation

**PDB** : Protéine Data Bank

**PDBQT**: Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)

**PSA** : Surface polaire

**ROS** : Espèces réactives oxygénées

**RCSB**: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

**RL** : radicaux libres

**SDF** : Spatial Data File

**SNC** : système nerveux central

**TEI**: 2-(3-cyano-4-isobutoxy-phenyl) -4-methyl-5-thiazole-carboxylic acid

**VCEAC** : Vitamine C Equivalent Antioxydant Capacité

**VIT C** : Vitamine C

**XO** : Xanthine oxydase

# Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction ..... I

## Chapitre I : Etude bibliographique

1. La plante étudiée.....	4
1.1 Définition des plantes médicinales .....	4
1.2 Présentation de la plante <i>Smilax aspera</i> .....	4
1.2.1 Description botanique.....	4
1.2.2 Distribution géographique .....	4
1.3 Classification botanique .....	4
1.4 Nom vernaculaire .....	5
1.5 Caractérisation chimique .....	5
1.6 Utilisation de la plante.....	6
2. Les composés phénoliques .....	6
2.1 Classification des composés phénoliques.....	7
2.1.1 Phénol simple .....	7
2.1.2 Acides phénoliques.....	7
2.1.3 Benzophénones, xanthones et stilbènes.....	8
2.1.4 Les flavonoïdes.....	8
2.1.5 Les tanins.....	8
3. Le stress oxydatif.....	8
3.1 Définition.....	9
3.2 Les radicaux libres.....	9
3.3 Sources des radicaux libres .....	9
3.4 Principales cibles des radicaux libres .....	9
3.5 Les maladies liées au stress oxydant .....	10
3.6 Les antioxydants .....	11
3.6.1 Les antioxydants enzymatiques .....	11
3.6.2 Les antioxydants non enzymatiques .....	11
4. L'importance des études <i>in silico</i> .....	11
5. Docking moléculaire .....	11
5.1 Alpha amylase .....	12

5.2 Xanthine oxydase .....	12
5.3 Télomérase .....	12

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

1. Matériels .....	14
1.1 Matériel végétal .....	14
1.2 Matériels informatiques et programmes d'analyse <i>in silico</i> .....	14
1.2.1 Micro-ordinateur .....	14
1.2.2 Programme et Banque des données .....	15
1.2.3 Métabolites secondaires de l'espèce <i>Smilax aspera</i> .....	17
2. Méthode .....	17
2.1 Méthodes expérimentale .....	17
2.2 Analyses quantitatives des extraits .....	20
2.2.1 Rendement de l'extraction .....	20
2.2.2 Dosage des composés phénoliques totaux .....	20
2.2.3 Dosage des flavonoïdes .....	21
2.2.4 Evaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH .....	21
2.3 Docking moléculaire .....	23
2.3.1 Préparation des ligands .....	23
2.3.2 Préparation des protéines .....	24
2.3.3 Visualisation de mode d'action des ligands sur leur site de liaison .....	24

## **Chapitre III : Résultats et discussions**

1. Résultats et discussions de l'étude <i>in vitro</i> .....	28
1.1 Rendement de l'extraction .....	28
1.2 Dosage des polyphénols totaux .....	29
1.3 Dosage des flavonoïdes totaux .....	31
1.4 Résultats de l'activité antioxydante .....	33
2. Résultats et discussions de docking moléculaire .....	36
2.1 Pour l'enzyme alpha amylase .....	36
2.1.1 Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme alpha amylase .....	36
2.1.2 Analyse visuelle de mode d'action des ligands sur alpha amylase .....	37
2.2 Pour l'enzyme xanthine oxydase .....	37
2.2.1 Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme xanthine oxydas .....	37
2.2.2 Analyse visuelle de mode d'action des ligands sur xanthine oxydase .....	39
2.3 Pour l'enzyme télomérase .....	40
2.3.1 Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme télomérase .....	40

2.3.2 Analyse visuelle de mode d'action des ligands sur télomérase.....	41
3. Résultats des propriétés pharmacologiques.....	42
<b>4. Résultats des propriétés pharmacocinétiques et toxicité .....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>44</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>46</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>52</b>

---

# *Introduction*

---

Les produits naturels, en particulier ceux d'origine végétale, ont longtemps été considérés comme une source importante de composés médicinaux. Actuellement, entre 25 et 30 % des médicaments utilisés pour traiter les maladies proviennent de sources naturelles. (Plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) **(Muanda, 2010)**.

La majorité de la population mondiale, en particulier dans les pays en développement, prend soin d'elle-même principalement avec des remèdes conventionnels à base de plantes. Seulement environ 400 000 des espèces végétales connues ont été étudiées chimiquement et pharmacologiquement, et chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de constituants différents, donc cet approvisionnement semble sans fin **(Hostettmann et Marston 1998)**.

Un nombre croissant de rapports confirment que de nombreuses plantes médicinales et fruits, légumes peuvent protéger contre certaines maladies chroniques causées par le stress oxydatif. Une attention particulière a été accordée aux propriétés antioxydante des plantes, qui peuvent être consommées par les humains. En raison de leur potentiel antioxydant prometteur, les composés phénoliques sont très recherchés dans les secteurs de l'alimentation, de la chimie et de la médecine **(Le Jury, 2016)**.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydants naturels en évaluant les propriétés antioxydants des racines de *Smilax aspera* et l'activité inhibitrice de différentes enzymes par quelques métabolites secondaires de cette plante identifiées à partir des recherches précédentes. Ce manuscrit est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre : comprend principalement une étude bibliographique sur la plante médicinale, les molécules bioactives des plantes, l'activité antioxydante et le docking moléculaire.

Le deuxième chapitre : est consacré à la présentation de matériel et la description des protocoles utilisés.

Le troisième chapitre : il reprend les résultats obtenus et les discute avec une comparaison avec les résultats des recherches antérieures.

Finalement, nous clôturons ce manuscrit par la conclusion tirée de ce travail de recherche ainsi que les perspectives.

---

***Chapitre I :***  
***Etude bibliographique***

---

## 1. La plante étudiée

### 1.1 Définition des plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante qui contient un ou plusieurs ingrédients actifs pouvant prévenir, atténuer ou guérir une maladie (**Boughrara, 2016**).

### 1.2 Présentation de la plante *Smilax aspera*

*Smilax aspera* (Sarsaparilla) est un grimpeur vivace de la famille des Smilacaceae (**Patel, 2020**).

#### 1.2.1 Description botanique.

La Salsepareille d'Europe (*Smilax aspera*) est une liane vivace mesurant ou dépassant 1 mètre de hauteur, et pouvant atteindre 6 mètres. Son port est rampant ou grimpant, et elle est très ramifiée (**Fouré, 2022**).

La salsépareille a une tige glabre avec quelques épines peu espacées, une feuille avec des épines typiquement autour du périmètre, et fleurit avec des fleurs mâles et femelles parce que c'est une espèce dioïque. (**Fouré, 2022**).

La racine était ridée longitudinalement, d'environ 3 mm de diamètre, de couleur brun rougeâtre foncé et avec de nombreuses ramifications sans racines, résistantes, souples et non cassantes. Le rhizome était également plissé, dur, de couleur brun externe, de couleur blanche interne ou jaune clair, inodore et légèrement amer (**Patel, 2020**).

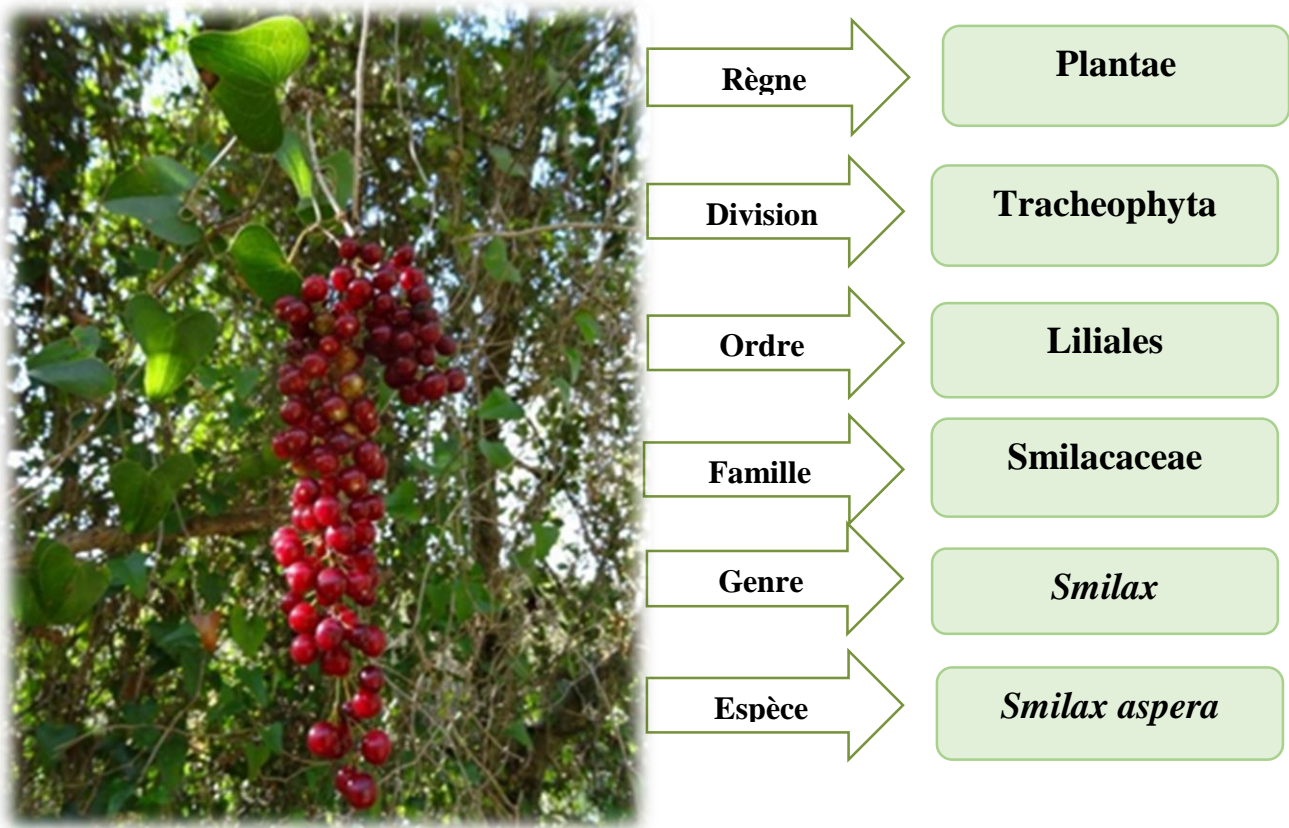
#### 1.2.2 Distribution géographique

*Smilax aspera* est présente dans quatre régions du monde : sur l'ensemble du pourtour de la mer Méditerranée, en Afrique de l'est, au Moyen-Orient ainsi qu'en Asie du Sud et Américaine (**Fouré, 2022**).

La Salsepareille en Algérie Médéa (Hamdania) et en Kabylie (Jijle et Gurès) (**Boubetra et al., 2022**).

### 1.3 Classification botanique

D'après (Ghédira et Goetz, 2016) *Smilax aspera*. (Figure.1) est une espèce qui appartient à :



**Figure1** : classification botanique de *Smilax aspera* (Fouré., 2022)

#### 1.4 Nom vernaculaire

Selon (Ghédira et Goetz, 2016), cette plante a plusieurs noms vernaculaires est attribuée dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Nomenclature de la plante *Smilax aspera* (Ghédira et Goetz, 2016).

Nom français	Salsepareille d'Europe
Nom anglais	Sarsaparilla
Nom arabe	عشبة حرّة, فشاغ

#### 1.5 Caractérisation chimique

L'espèce *Smilax aspera* joue un rôle important dans l'écosystème forestier et connue pour ses propriétés pharmacologiques car contient divers composés chimiques (tableau 02) :

**Tableau 2** : Principaux constituants chimiques de *Smilax aspera* selon (Ghédira et Goetz, 2016).

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques
Saponines de structure stéroïdique	Curilline G, asparagoside E, asparagoside A, B
Phénols	(+) catéchine et (-) épicatechine, resvératrol
Caroténoïdes	$\beta$ -carotène, $\beta$ -cryptoxanthine
Sels minéraux	Sels de K (1,25 %), Ca et Mg (0,3 à 0,4 %)
Autres Acide	Sarsapique, acide ascorbique

### 1.6 Utilisation de la plante

Les Amérindiens auraient utilisé *Smilax aspera* pendant longtemps. Comme beaucoup d'autres plantes, il a rapidement gagné en popularité comme traitement contre la syphilis. Il a été administré pour la syphilis, la goutte, l'eczéma, le foie et la rate (Ghédira et Goetz, 2016).

Cette plante est principalement utilisée pour traiter les rhumatismes et les maladies de peau. On pourra retenir aussi d'autres usages moyennement répandus : comme sudorifique, fébrifuge et dépuratif, comme diurétique, comme astringent, comme hémostatique (en cas de blessures), antispasmodique ainsi que dans le traitement des maladies vénérienne (Fouré, 2022).

## 2. Les composés phénoliques

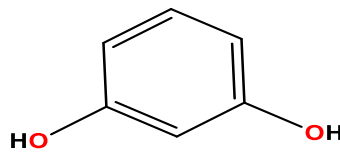
Les plantes ont une capacité unique de synthétiser de nombreux produits chimiques. Les métabolites secondaires sont des substances qui ne sont pas présentes dans toutes les espèces, ce qui indique qu'elles ne font pas partie du métabolisme général et ne contribuent pas directement aux fonctions de base de l'organisme végétal (EL-Haci, 2015).

## 2.1 Classification des composés phénoliques

Les substances phénoliques sont des substances ayant un ou plusieurs groupes hydroxyles liés directement à un cycle aromatique.

### 2.1.1 Phénol simple

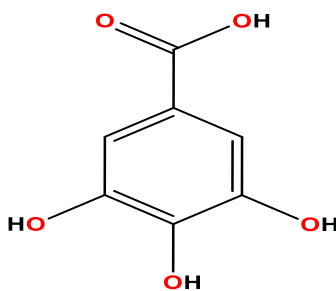
Les phénols simples sont ceux qui ont eu leurs ortho, méta, et para groupes substitués (Pandey et Rizvi, 2009).



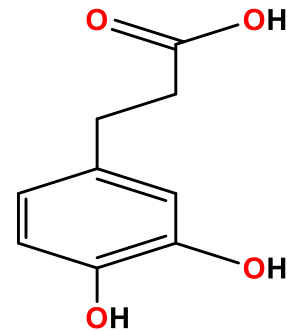
Résorcinol

### 2.1.2 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques comme l'acide caféique sont plus répandus que les acides hydroxybenzoïques comme l'acide gallique (Pandey et Rizvi, 2009).



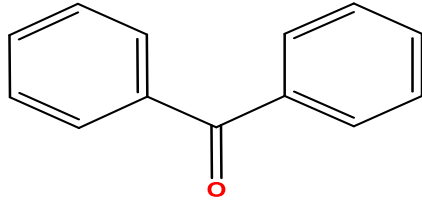
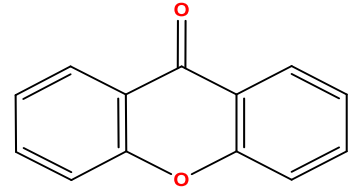
Acide gallique



Acide caféique

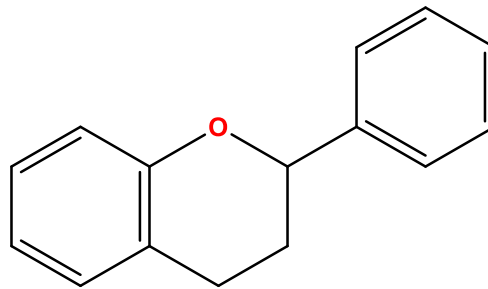
### 2.1.3 Benzophénones, xanthones et stilbènes

Les benzophénones et les xanthones ont une structure C6-C1-C6 et les stilbènes ont une structure C6-C2-C6. Les xanthones sont des pigments jaunes présents dans les fleurs. Parmi eux se trouvent : benzophenone, xanthone, resvératrol (**Bruneton, 2009**).

**Benzophénone****Xanthone**

### 2.1.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (ou bioflavonoïdes) sont des métabolites secondaires des plantes vasculaires, partageant tous la même structure de base constituée de deux cycles aromatiques reliés par trois carbones (C6-C3-C6) (**Jean, 2009**).

**Flavonoïdes**

### 2.1.4 Les tanins

Les tanins sont un large groupe structurellement diversifié qui partage la capacité de se lier et de précipiter les protéines. Le tanin fait référence au processus de tannage des peaux d'animaux en cuir, un processus connu depuis la préhistoire. Les tanins sont divisés en trois groupes : tanins condensés, tanins hydrolysables, tanins complexes (**Khanbabaee et Van Ree, 2001**).

## 3. Le stress oxydatif

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces parce qu'il provoque le stress oxydatif (**Muanda, 2010**).

### 3.1 Définition

Le stress oxydatif c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés (les radicaux libres) toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (**Favier, 2003**).

### 3.2 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des entités chimiques possédant un électron (ou plus) non apparié « Célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité déstabilisant ainsi d'autres molécules (**Bendif, 2017**).

### 3.3 Sources des radicaux libres

Les principales sources des radicaux libres sont soit endogènes ou exogènes, elles sont résumées dans le (tableau 3) (**Adjadj et Baghiani, 2009**) :

**Tableau 3** : Les principales sources des RL

Endogènes	Exogènes
- Mitochondries	- Cigarette
- Phagocytoses	- Radiation ionisantes
- Xanthine oxydase	- Pollutions diverses
- Peroxysomes	- Rayonnement UV
- Inflammation	- Produits chimiques

### 3.4 Principales cibles des radicaux libres

#### ➤ Les Lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (**Favier, 2003**).

### ➤ Les protéines

Les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures. De nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Adjadj et Baghiani, 2009).

### ➤ L'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH peuvent être générées. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées ou le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, ou attaquer le sucre lui-même (Adjadj et Baghiani, 2009).

## 3.5 Les maladies liées au stress oxydant

Un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses. Un stress oxydant « pathologique » est ainsi potentiellement impliqué dans de nombreuses affections (plus de 200 ont été recensées) ou dans le développement de complications associées (Defraigne et Pincemail, 2008). Certaines maladies liées au stress oxydant sont représentées dans le tableau 4 :

**Tableau 4** : quelques maladies liées au stress oxydant

Maladies	Références
<b>Cancer</b>	(Favier, 2006)
<b>Les maladies cardiovasculaires</b>	(Baudin, 2020)
<b>Les maladies neurodégénératives</b>	(Desport et Couratier, 2002)
<b>Maladie d'Alzheimer</b>	Desport et Couratier, 2002)
<b>La maladie de diabète</b>	(Defraigne et Pincemail, 2008)
<b>Hypertension</b>	(Defraigne et Pincemail, 2008)

### 3.6 Les antioxydants

Un antioxydant a été défini comme étant toute substance présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable qui retarde ou inhibe l'oxydation de ce substrat (**Boutatoua et Kabouche, 2018**).

#### 3.6.1 Les antioxydants enzymatiques

Pour lutter contre les effets destructeurs des RL, les organismes aérobies ont développé des enzymes antioxydantes protectrices telles que superoxyde dismutase, les catalases (**Goyal et Basak, 2010**).

#### 3.6.2 Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants naturels incluent diverses vitamines (vitamines A, C et E), des composés pouvant être synthétisés par les cellules animales (glutathion et créatine) ou d'origine végétale apportés par l'alimentation (flavonoïdes, resvératrol et autres polyphénols caroténoïdes, lycopène) (**Descamps et al., 2006**).

## 4. L'importance des études *in silico*

L'utilisation des techniques *in silico* dans la recherche pharmaceutique et la découverte de médicaments devient de plus en plus cruciale, voire aujourd'hui essentielle. Il est possible de déterminer les configurations spatiales tridimensionnelles des atomes dans une molécule en utilisant des méthodes *in silico* de modélisation moléculaire. Parce qu'ils permettent d'évaluer les caractéristiques physicochimiques et les capacités des liaisons intermoléculaires, ils sont particulièrement intrigants dans le domaine de la recherche médicale (**Pachoulide, 2021**).

## 5. Docking moléculaire

Le terme « amarrage moléculaire » fait référence à des simulations moléculaires qui intègrent plusieurs méthodes pour étudier les interactions pharmacologiques entre un ligand de petite molécule et un récepteur macromoléculaire (une protéine cible). Le docking moléculaire a pour objectif essentiel de prédire la conformation définie par la position et l'orientation relative la plus favorable du ligand au sein de son récepteur (**Kim, 2022**).

Le docking moléculaire est un moyen plus rapide et moins coûteux que les méthodes de test *in vitro*, recommandé pour réduire la taille d'une banque de données chimique afin de ne garder que les composés d'intérêt thérapeutique (**Kadri et al., 2021**).

Il existe actuellement un certain nombre de récepteurs qui jouent un rôle dans l'émergence de diverses maladies. Selon les objectifs de notre présent travail, nous avons sélectionné trois récepteurs ou cibles moléculaires qui sont cités ci-dessous :

### 5.1 Alpha amylase

Les enzymes amylases sont classées dans le groupe de l'hydrolyse. Parmi eux se trouve l'enzyme alpha-amylase, qui joue plusieurs rôles par exemple : dans la dissolution de l'amidon et du glycogène (**Rahman et al., 2001**).

Cependant, c'est un facteur important dans le diabète, car ce dernier implique un stress oxydatif en libérant des radicaux libres, provoquant une faible libération d'insuline (**Liguori et al., 2018**).

En fait, l'une des principales façons de traiter le diabète est d'inhiber cette enzyme. Les formes d'amylase pancréatique et de salive sont inhibées par des inhibiteurs d'amylase *in vitro* et *in vivo* (**Sharma et al., 2021**).

### 5.2 Xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui constitue une source biologique importante de ROS. XO catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et, enfin, en acide urique en présence d'oxygène moléculaire (**Agbadua et al., 2022**).

Une activité XO élevée joue un rôle majeur dans l'apparition du stress oxydatif ; par conséquent, cette enzyme est une cible pertinente non seulement pour le traitement de la goutte, mais aussi pour la prévention et sur ou peut-être le traitement d'un large éventail de conditions pathologiques (**Agbadua et al., 2022**).

### 5.3 Télomérase

La télomérase est une enzyme qui joue un rôle important dans le maintien de la taille des télomères. Cette enzyme interagit avec de nombreux partenaires, y compris Dyskerine, lui permettant d'exercer diverses actions sur de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Les phénomènes physiologiques tels que le vieillissement cellulaire ou les phénomènes

pathologiques tels que le développement du cancer peuvent affecter ces différentes voies **(Billard, 2017)**.

En effet, par la réactivation de sa sous unité télomérase, dans les cellules cancéreuses, elle permet aux cellules d'acquérir un mécanisme de maintenance des télomères leur permettant soit d'éviter le processus de sénescence répllicative, soit de stabiliser leur génome pour continuer de proliférer. Globalement, ses activités expliquent que près de 95% des tumeurs sont dépendantes de cette enzyme et en font un oncogène majeur **(Billard, 2017)**.

---

## *Chapitre II :*

# *Matériels et Méthodes*

---

Notre recherche expérimentale a été menée au Laboratoire de Sciences Fondamentales et Laboratoire Pédagogique du Département de Biologie à l'Université Amar Telidji de Laghouat.

L'objectif de notre recherche est d'évaluer l'activité antioxydante de quelques extraits des racines de plante *Smilax aspera* et l'étude *in silico* de l'activité inhibitrice de différentes enzymes responsables du stress oxydatif ( $\alpha$ -amylase, xanthine oxydase) et prolifération des cellules cancéreuses (télomérase) par quelques métabolismes secondaires (resvératrol et épicatechine) identifiées dans la même partie de cette plante à partir des recherches précédentes.

## 1. Matériels

### 1.1 Matériel végétal

L'étude et l'évaluation de l'activité antioxydante ont nécessité d'un matériel végétal représenté par les racines de *Smilax aspera* importé du Maroc dans l'année 2019.



**Figure 2** : photographie des racines(A) et rhizome(B) de l'espèce *Smilax aspera* (Original)

### 1.2 Matériels informatiques et programmes d'analyse *in silico*

#### 1.2.1 Micro-ordinateur

Nous avons utilisé un microordinateur qui possède une RAM de 4.00 GO et un processeur Intel(R) Pentium(R) 1.70GHz, Windows 10 pro.

### 1.2.2 Programme et Banque des données

#### -PDB (Protein Data Bank): <https://www.pdb.org/>

La principale source de données pour la biologie structurale est la banque de données sur les protéines (figure.3) qui contient des expériences qui déterminent les structures tridimensionnelles (3 D) des protéines, des acides nucléiques et d'autres macromolécules (Burley *et al.*, 2017).



Figure 3 : interface de la page d'accueil du RCSB PDB

#### -PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Une banque publique de données chimiques appelée PubChem (Figure 4) qui abrite des millions des composés en ligne, elle est essentielle pour la communauté de la recherche biomédicale (Kim *et al.*, 2022).



Figure 4 : interface de la page d'accueil du PubChem.

#### -AutoDock Tools :

AutoDock Tools dispose d'un affichage moléculaire complet et d'un support graphique pour toutes les étapes requises pour préparer et analyser les processus d'atterrissage (Seeliger, 2010).

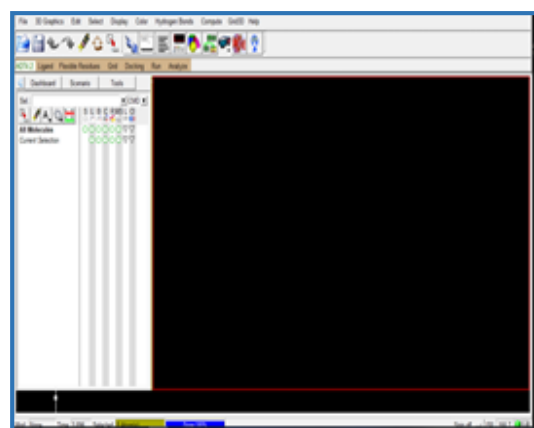
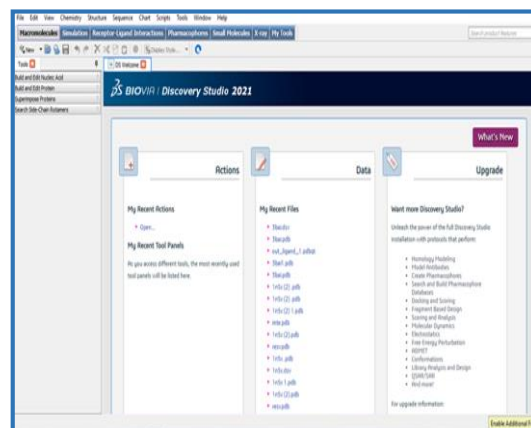


Figure 5 : interface de la page d'accueil du logiciel AutoDock Tools

**-Discovery studio**

Est un logiciel de modélisation gratuit et riche en fonctionnalités pour visualiser et analyser les données des résultats d'amarrage moléculaire (AM) (Figure 6). (Jejurikar et Rohane,2021)



**Figure 6** : l'interface de la page d'accueil de logiciel Discovery studio

**-SwissADME** : <http://www.swissadme.ch/>

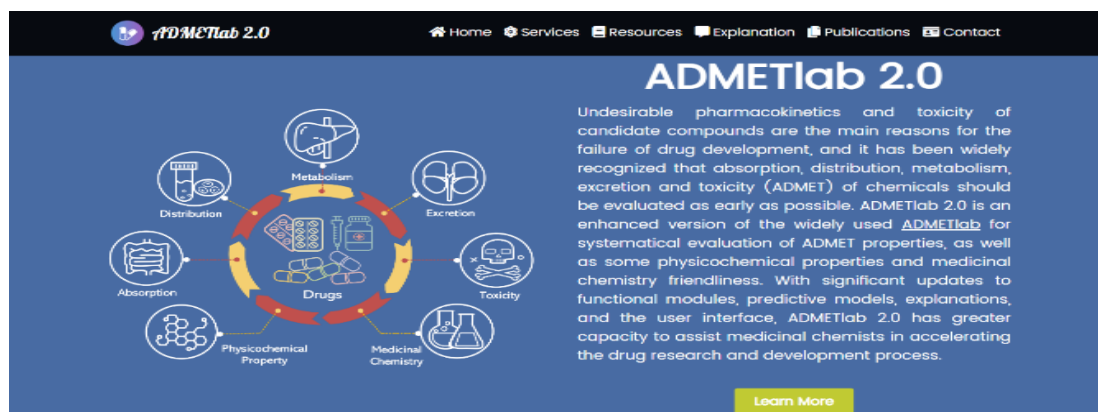
Nous avons utilisé l'outil Web SwissADME, qui offre un accès gratuit à un ensemble de modèles prédictifs rapides et puissants pour les propriétés physico-chimiques, la pharmacocinétique, la similarité des médicaments et la disponibilité des produits chimiques médicaux (Pires *et al.*,2015).



**Figure 7** : l'interface graphique de SwissADME

**-ADMETlab** : <https://admetmesh.scbdd.com/>

ADMETlab appelé serveur web est largement utilisé pour les prédictions des propriétés pharmacométriques et de toxicité des produits chimiques (Xiong *et al.*, 2021).



**Figure 8** : l'interface graphique de ADMETlab

### 1.2.3 Métabolites secondaires de l'espèce *Smilax aspera*

Les molécules utilisées dans ce travail sont des dérivées phénoliques isolées à partir de racines de l'espèce *Smilax aspera*, le choix de ces deux molécules est basé sur les résultats de l'identification dans des études précédentes

- ❖ **Resvératrol** : le resvératrol (3,5,4' -trihydroxystilbène) est un polyphénol naturel. La structure polyphénolique du resvératrol confère une activité antioxydante en plus d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses par une apoptose accrue et/ou un blocage du cycle cellulaire (King *et al.*, 2006). Néanmoins, il est à noter déjà isolé des racines d'espèces *Smilax aspera* (Belhouchet *et al.*, 2008)
- ❖ **Epicatéchine** : Un flavonoïde de la famille des flavan-3-ols est connu pour ses propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires. L'épicatéchine inhibe la fonction plaquettaire et module le profil coagulant et fibrinolytique (Sinégre, 2021), et signalé par (Fouré J, 2022).

**Tableau 5** : Molécule de *Smilax aspera* pour l'étude de docking moléculaire

Les molécules	Partie de plante
Resvératrol	Les racines
Epicatéchine	Les rhizomes

## 2. Méthode

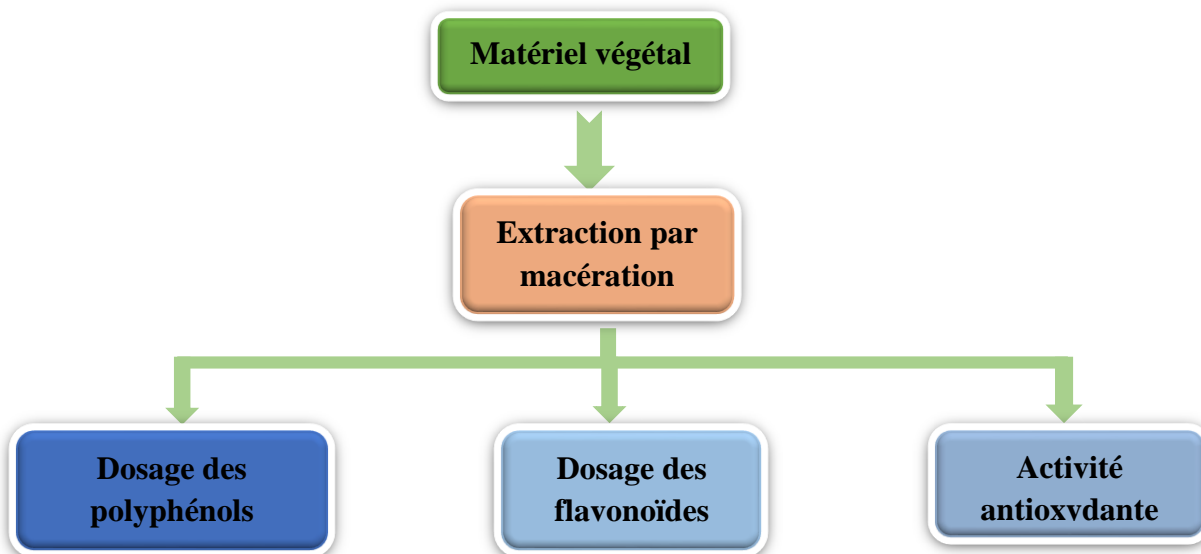
### 2.1 Méthodes expérimentale

#### Extraction des polyphénols par macération (solide-liquide)

La préparation d'un extrait de plante présente un nombre variable d'étapes selon l'objectif suivi, dans le présent travail nous ciblons les composés phénoliques.

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération successive par trois solvants organiques de polarité croissante. Il s'agit de l'hexane pour une délipidation, le dichlorométhane, l'acétone et le méthanol sur la poudre de la partie souterraine de plante.

Le diagramme ci-dessous montre comment cette étude a été menée dans son intégral :



**Figure 9 :** organigramme du protocole expérimental

#### **Extraction par hexane :**

50g de poudre végétale ont été macérés avec 150 ml d'hexane. Après une macération de 24 heures sous agitation de deux heures à température ambiante, le mélange est filtré. L'opération est répétée 2 fois avec renouvellement du même solvant (pour délipidation )

#### **Extraction par dichlorométhane :**

Macération de 10 g de résidu végétale de la première extraction dans 100 ml de DCM, le mélange introduire dans un flacon pendant 24 heures avec agitation pendant deux heures à température ambiante. Après un jour nous filtrons le mélange par papier filtre, les tourteaux obtenus sont repris pour une deuxième fois d'extraction.

Nous avons mélange les deux filtrats et finalement l'évaporation le mélange à température de 30°C par rotavapor.

#### **Extraction par acétone :**

Le même processus est utilisé pour extraire les produits chimiques moyennement polaires des résidus végétaux restants après la deuxième extraction à l'aide acétone

#### **Extraction par méthanol :**

Avec la même procédure, une extraction par le méthanol, est réalisée sur le résidu végétal issu de la troisième extraction, pour extraire les composés polaires.

Nous avons finalement obtenu trois extraits organiques bruts : extrait de dichlorométhane, extrait d'acétone et extrait de méthanol, qui seront récupérés dans des flacons en verre. Les étapes d'extraction sont résumées à (figure.10)

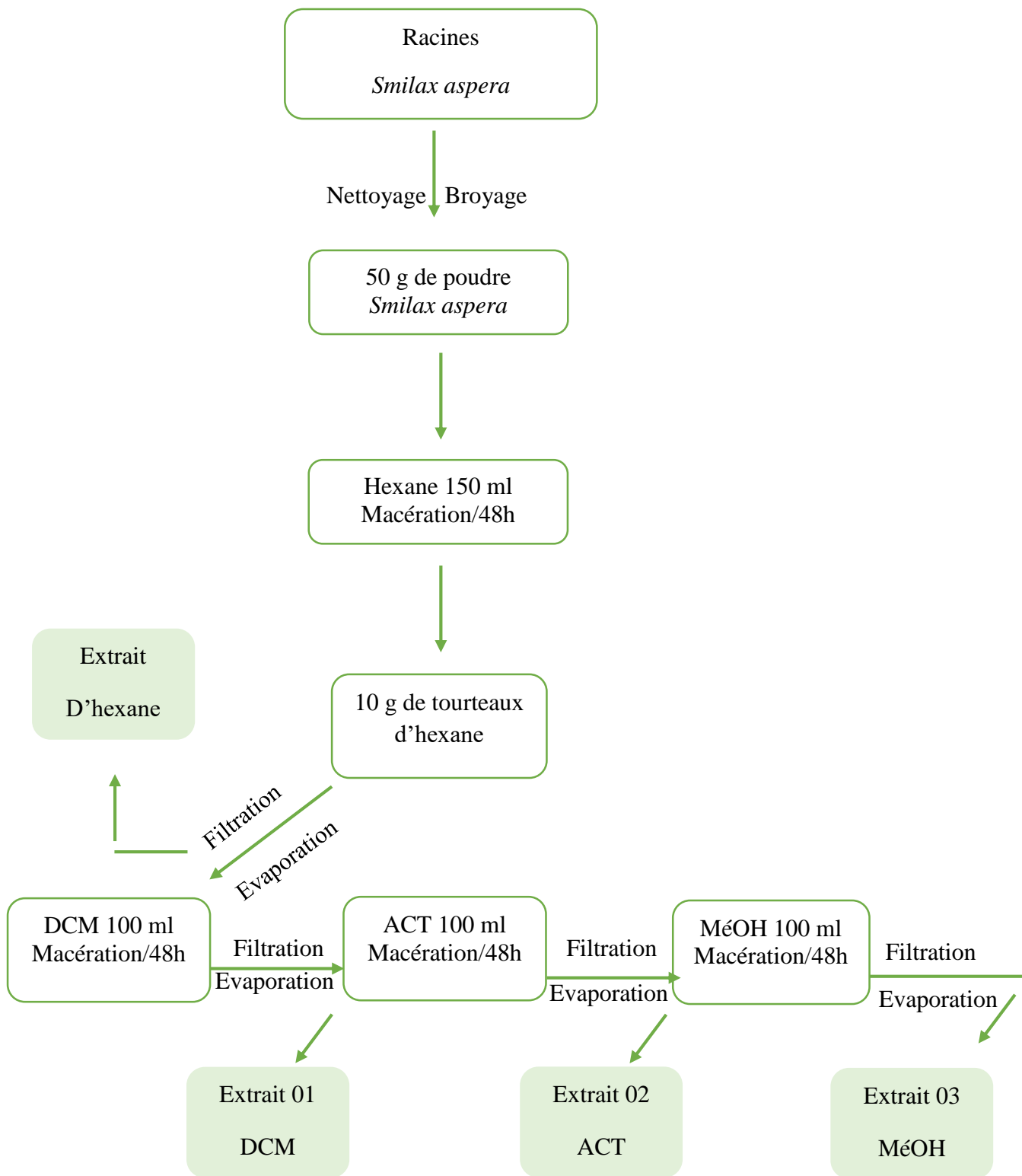


Figure 10 : protocole d'extraction de notre travail

## 2.2 Analyses quantitatives des extraits

### 2.2.1 Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction indique la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant il est exprimé en pourcentage par rapport à 100 g de matière végétale sèche et broyée.

Le pourcentage de l'extraction a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} : (\text{Poids de l'extrait brut obtenu} / \text{Poids de la poudre végétale}) \times 100$$

### 2.2.2 Dosage des composés phénoliques totaux

#### Principe

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué de poly hétérocycles acides contenant l'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

#### Procédure

Un volume de 100  $\mu\text{l}$  de chaque solution diluée de l'acide gallique ou de l'extrait végétal dilué a été ajouté à 500  $\mu\text{l}$  de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. Après 2 minutes, 2 ml de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2% ont été ajoutés, le mélange a été maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc (ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de doser les phénols totaux dans les extraits végétaux).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait sec (mg d'EAG/g sec).

### 2.2.3 Dosage des flavonoïdes

#### ✚ Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat 1991 en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif. Avec ce composé, ils forment des complexes acides stables avec le carbonyle (C=O) en position C-4 ou le groupe hydroxyle C-3 ou C-5 de flavones et de flavonols (**Chang *et al.*, 2002**).

#### ✚ Protocole

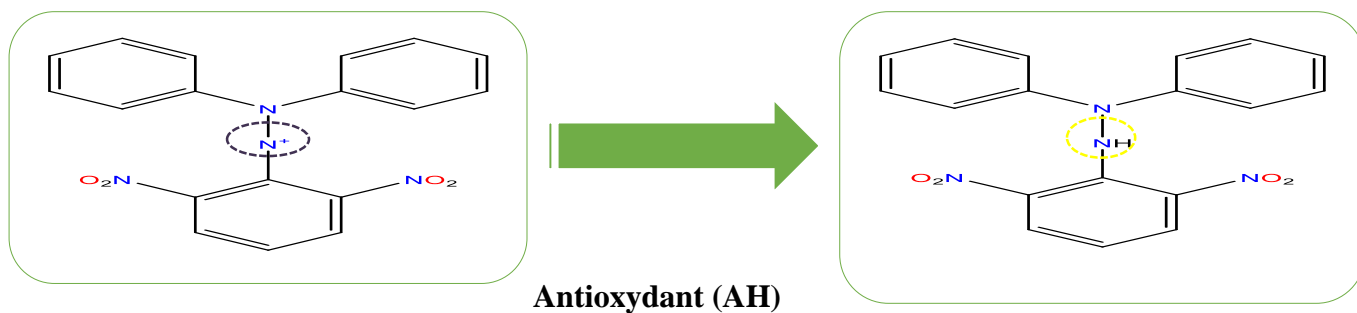
Dans des tubes à essai, on mélange 500 µl de l'extrait dilué avec 500 µl de solution d'AlCl<sub>3</sub> (1%). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière la lecture des absorbances est à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par un standard étalon la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de Quercétine par gramme de l'extrait sec (mg EQ/g d'extrait sec).

### 2.2.4 Evaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH

#### ✚ Principe :

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre stable de couleur violacé qui absorbe à 517 nm, il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. En présence de composé antiradicalaire, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées servant à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**Bentabet *et al.*, 2014**).



DPPH Bleu-violet

DPPH-H -jaune

Figure 11 : réaction de radical DPPH.

#### ✚ Procédure :

500 µl de l'extrait sont ajoutés à 500 µl de la solution méthanolique du DPPH (250µM) et agité à l'aide d'un vortex. Après 30min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à longueur d'onde 517nm. Le standard utilisé est la vitamine C comme antioxydant de référence.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH (PI%) est calculé selon la formule :

$$\text{PI \%} = \frac{[\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}]}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

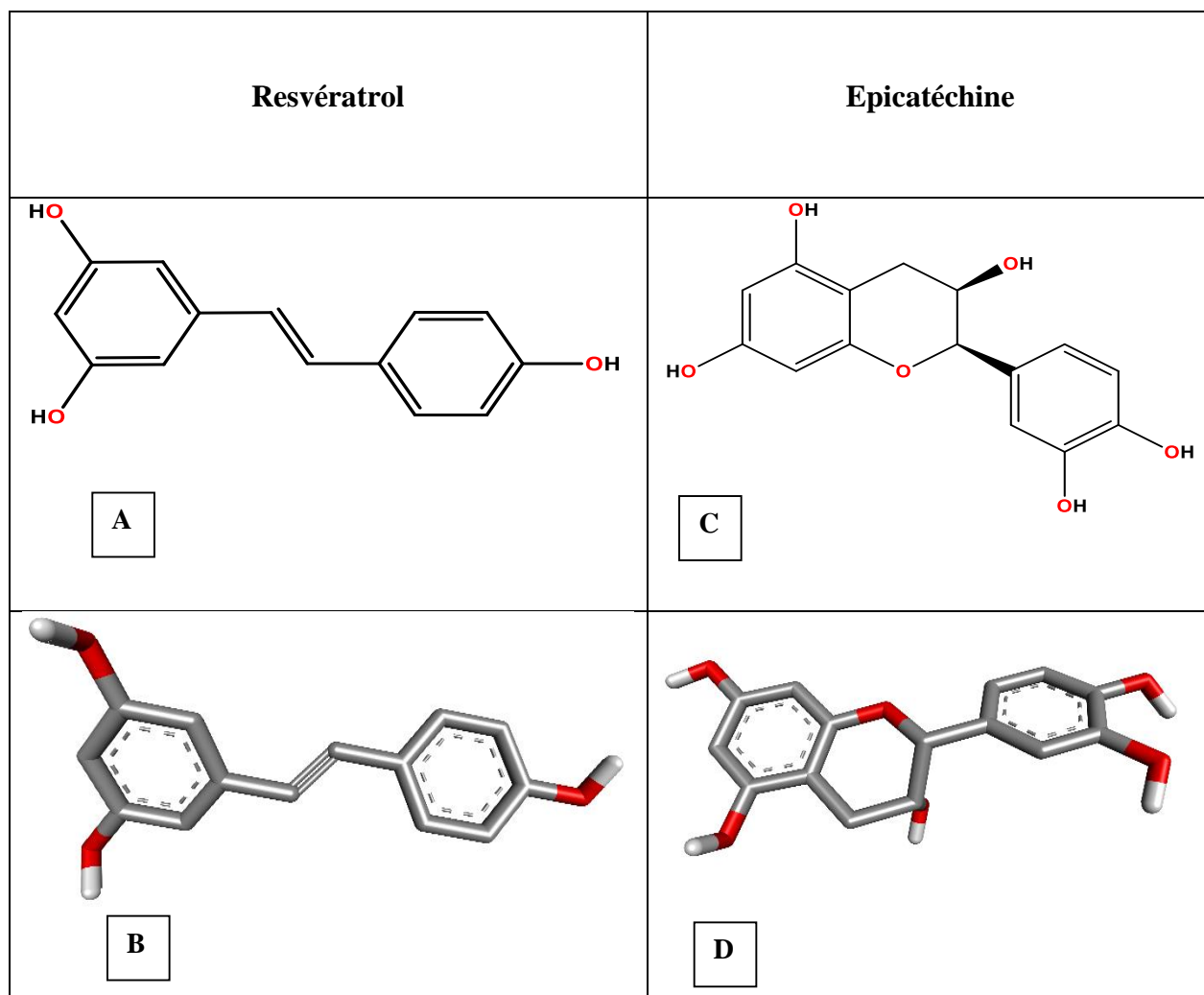
**PI%** : Pourcentage d'inhibition

**Abs** : Absorbance à 517nm

## 2.3 Docking moléculaire

### 2.3.1 Préparation des ligands

Nous avons téléchargé les structures des composés isolés de l'espèce *Smilax aspera* à partir de la banque de donnée PubChem sous forme fichier SDF, par la suite ces ligands ont été enregistrés en format pdb à l'aide de programme Discovery studio visualiser et à la dernière étape, nous avons converti le format PDB en format PDBQT par AutoDock Tools.

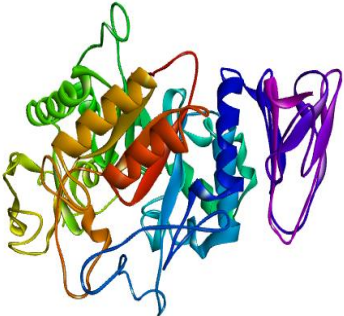



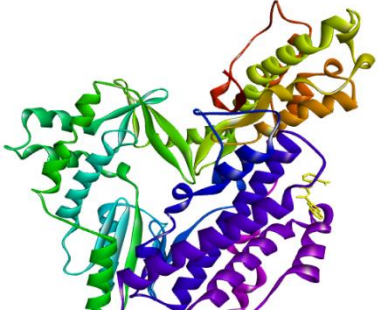
**Figure 12** : la structure des ligands resvératrol (A : 2D ; B :3D) ; et épicatechine (C : 2D ; D :3D).

**2.3.2 Préparation des protéines**

Les enzymes que nous avons étudiées : alpha amylase, xanthine oxydase et la télomérase ont été obtenues à partir de la banque de donnée PDB sous format PDB. Après téléchargement des enzymes, nous avons éliminé les chaînes identiques et molécules de l'eau. Nous convertissons les enzymes de format PDB en format PDBQT en enregistrant dans un fichier. Les deux formes PDB et PDBQT sont enregistrés dans un dossier avec fichier de configuration de docking et les codes d'instruction vina (vina, vina-licence, vina-split).

**Tableaux 6** : les informations structurales des enzymes choisies

<b>Alpha amylase</b>		<b>Structure 3D</b>	<b>Télomérase</b>		<b>Structure 3D</b>
<b>Code</b>	1OSE		<b>Code</b>	5CQG	
<b>Les chaînes</b>	A		<b>Les chaînes</b>	A, B	

<b>Xanthine oxydase</b>		<b>Structure 3D de</b>
<b>Code</b>	1N5X	
<b>Les chaînes</b>	A, B	

**2.3.3 Visualisation de mode d'action des ligands sur leur site de liaison**

La technologie nous a fourni de nombreux programmes utiles qui nous ont aidé dans de nombreuses études, y compris, le studio Biovia Discovery que nous avons utilisé pour nous préparer et visualiser les enzymes et les ligands afin d'étudier les interactions entre les protéines et les ligands.

**2.4 Les propriétés pharmacologiques :**

### 2.4.1 La règle Lipinski :

Chaque médicament potentiel doit se conformer à plusieurs critères de base, tel que : son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, métabolisme d'excrétion de la toxicité (filtre ADME/ Tox) (Boucherit., *et al* 2013) qui est basée sur la règle de 5 formulée par Lipinski *et al.*, 2001. Cette règle décrit un ensemble de critères permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Les critères sont résumés dans la figure ci-dessous.

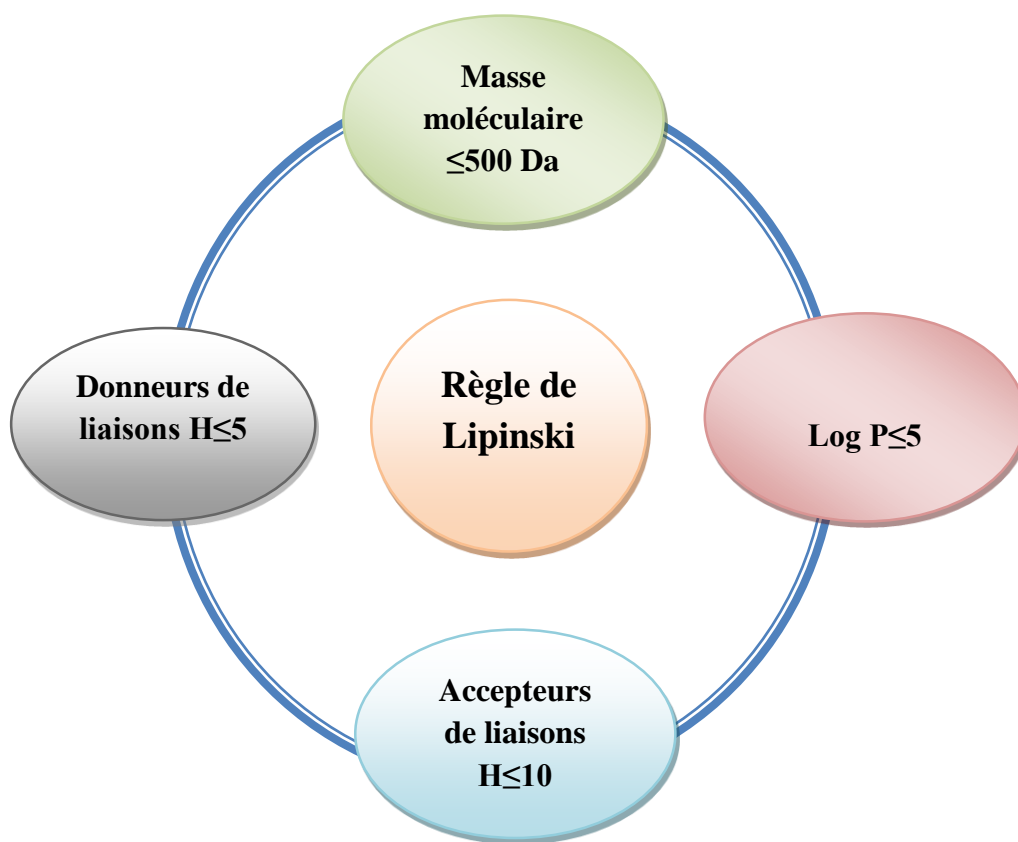


Figure 13 : les critères de la règle de cinq Lipinski

### 2.5 Les propriétés pharmacocinétiques

Le domaine prédictif ADMET (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité) en chimie médicinale s'est élargi depuis les premiers jours de la règle des cinq de Lipinski pour inclure des domaines tels que le développement d'essais à haut débit, l'extraction de données, la visualisation de données, apprentissage automatique et modélisation structurée. De nombreuses recherches ont montré comment l'utilisation efficace de modèles prédictifs in

silico admission peut accélérer l'identification de petits composés avec une meilleure efficacité, sécurité et dosage. (Cáceres *et al.*, 2020).

---

***Chapitre III :***  
***Résultats et discussions***

---

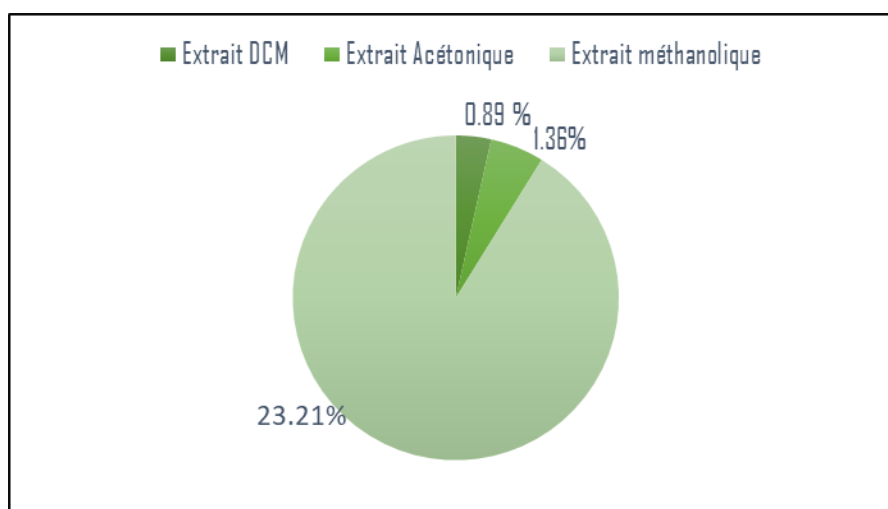
## 1. Résultats et discussions de l'étude *in vitro*

### 1.1 Rendement de l'extraction

Les trois extraits obtenus à partir de poudre de la racine de *Smilax aspera*, chaque extrait a été caractérisé par sa couleur, aspect et son rendement (%). Le tableau 7 résume les différents résultats :

**Tableau 7** : le rendement (%), aspect, et couleur des différents extraits de *Smilax aspera*

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Dichlorométhane	Pâteux	Jaune	0.89%
Acétone	Pâteux	Jaune ambré	1.36%
Méthanol	Pâteux	Brune	23.21%



**Figure 14** : comparaison entre les rendements de différents extraits.

D'après les résultats obtenus tableau 7, nous constatons que le rendement le plus élevé a été enregistré avec l'extrait méthanolique (23,21 %) suivi par l'extrait acétonique (1,36 %) et enfin l'extrait dichlorométhanolique (0,89 %). Notre résultat a été supérieur aux résultats de (Benatia *et al.*, 2022) où ils ont travaillé sur les racines sèches de *Smilax aspera* qui ont obtenu un rendement de l'extrait d'acétate d'éthyle de système ACT/H<sub>2</sub>O (1,402%) suivi par l'extrait acétate d'éthyle de MOH/H<sub>2</sub>O (1,194%), dichlorométhane de système ACT/H<sub>2</sub>O (0,502%), l'extrait de dichlorométhane de MOH/H<sub>2</sub>O a enregistré la plus faible valeur (0,422%).

La différence de rendement entre les extraits est probablement due à plusieurs facteurs comme la méthode de l'extraction utilisée, les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (à chaud ou à froid) et la nature de solvant (Michel *et al.*, 2012).

### 1.2 Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques constituent une classe principale des antioxydants présents dans les plantes et sont généralement quantifiés par une méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, la teneur en polyphénol totaux des différents extraits est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure.15). Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme extrait sec (mg d'EAG/g ES). (Tableau 8).

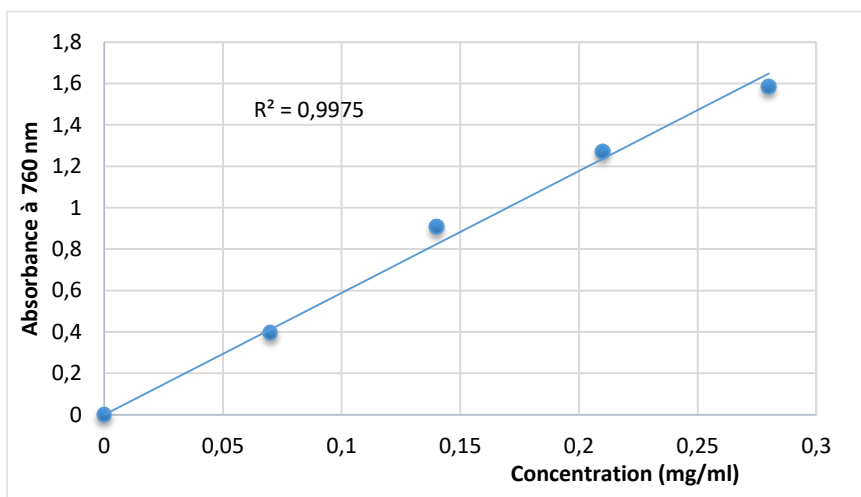
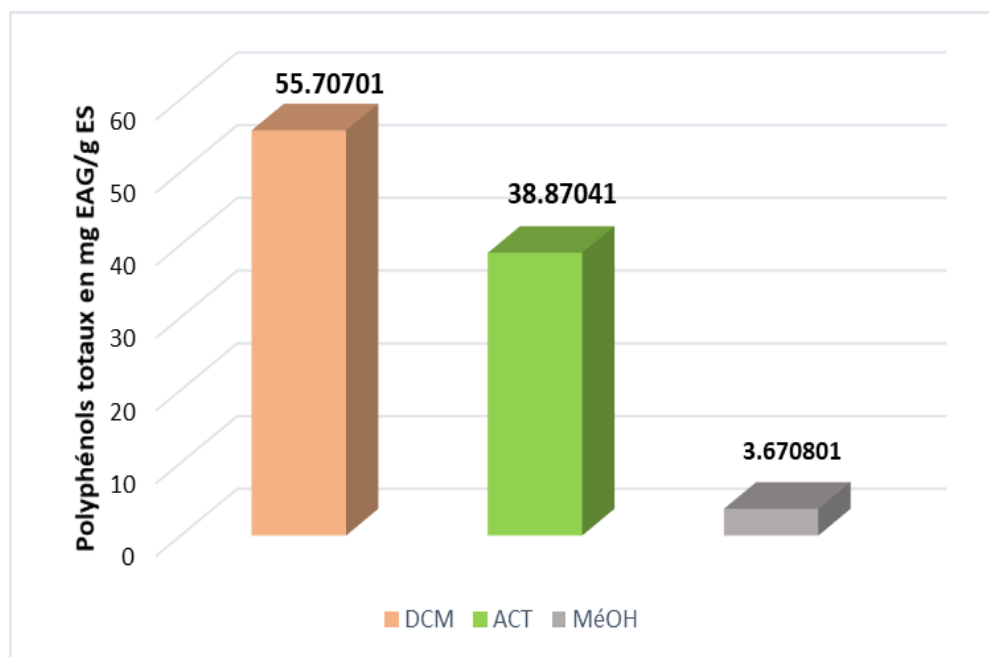


Figure 15 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 8 : Teneurs en polyphénols totaux dans les différents extraits de *Smilax aspera*

Extrait	Polyphénols totaux (mg EAG/g ES)
Dichlorométhanolique	55,70 ± 6,74
Acétonique	38,87 ± 1,13
Méthanolique	3,67 ± 0,03

Les teneurs les plus élevées en polyphénols ont été observées dans l'extrait DCM (55,70 ± 6,74 mg EAG/g ES) suivi par l'extrait acétonique (38,87 ± 1,13 mg EAG/g ES) tandis que l'extrait méthanolique a donné des teneurs les plus faibles (3,76 ± 0,03 mg EAG/g ES).



**Figure 16 :** Comparaison entre les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de *Smilax aspera*

L'étude menée par (**Benatia et al., 2022**) sur les extraits organiques (dichlorométhane et acétate d'éthyle) de la même espèce étudiée a montré des niveaux plus forts en polyphénols par rapport à nos résultats : MOH/H<sub>2</sub>O (DCM  $57,08 \pm 3,62$  /AC-O-E  $50,90 \pm 5,25$  mg EAG/g ES) et ACT/H<sub>2</sub>O (DCM  $89,26 \pm 3,00$ /AC-O-E  $43,04 \pm 0,41$  mg EAG/g ES).

Selon (**Bourgou et al., 2016**), l'eau apparaît comme étant le solvant le plus efficace pour l'extraction de polyphénols élevés, ce qui concorde avec les résultats des (**Benatia et al., 2022**).

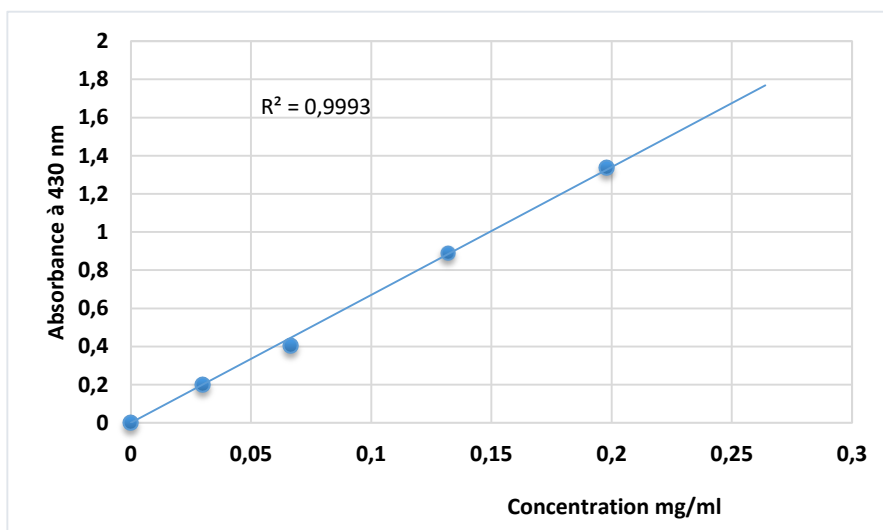
Ainsi, de nombreuses études réalisées par (**Fonseca et al., 2017**) sur de la feuille d'espèces différentes *Smilax brasiliensis* ont montré des niveaux plus faibles en polyphénols par rapport aux résultats : DCM ( $231,40 \pm 58,06$  ug EAG/mg ES) ; EE ( $380,79 \pm 36,41$  ug EAG/mg ES) et AC ( $811,61 \pm 102,38$  ug EAG/mg ES).

La variation des teneurs totales en phénols, entre espèces pourrait être due aux divers facteurs intrinsèques (potentiel génétique des espèces individuelles) et extrinsèques (la partie de plante utilisée, environnement, stade de maturation et période de stockage). (**Nicoletti et al., 2015**). Des conditions expérimentales des dosages peuvent affecter les teneurs, ainsi que la composition du milieu réactionnel, c'est l'exemple du réactif du Folin-Ciocalteu qui peut

réagir avec des protéines, des sucres, l'acide ascorbique et des composés soufrés, ce qui peut influencer les résultats obtenus (Musci et Yao, 2017).

### 1.3 Dosage des flavonoïdes totaux

La présence des flavonoïdes dans l'extrait végétal des racines de *Smilax aspera* est confirmée après l'ajout d' $\text{AlCl}_3$  et après incubation, lorsqu'une couleur jaunâtre est produite dont l'intensité est proportionnelle au contenu de l'extrait végétal. La courbe d'étalonnage donne la concentration de flavonoïdes de l'extrait. La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait sec).

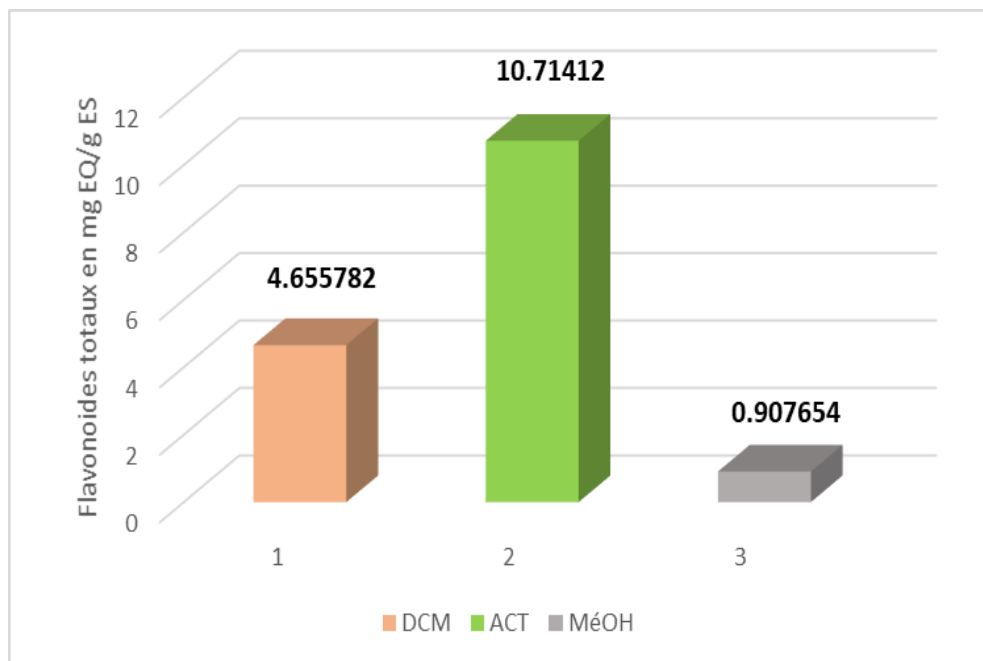


**Figure 17** : courbe d'étalonnage de la quercétine

**Tableau 9** : résultats du dosage des flavonoïdes totaux de différents extraits de plante

Extrait	flavonoïdes totaux (mg EQ/g ES)
Dichlorométhanolique	4,65 ± 0,40
Acétonique	10,71 ± 0,13
Méthanolique	0,90 ± 0,17

Selon les résultats mentionnés dans tableau 9 et la figure 17, les teneurs en flavonoïdes totaux révèlent que l'extrait acétonique contenait la plus grande teneur en flavonoïdes ( $10,71 \pm 0,13$ (mg EQ/g ES), suivie de l'extrait dichlorométhanolique et enfin l'extrait méthanolique.



**Figure 18 :** Comparaison entre les teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *Smilax aspera*

Nos résultats sont inférieurs à ceux reportés par (**Benatia et al., 2022**) où elles ont obtenu les valeurs suivantes : ACT/H<sub>2</sub>O (DCM  $11,67 \pm 0,23$ /AC-O-E  $6,98 \pm 0,14$ ) et MOH/H<sub>2</sub>O (DCM  $5,48 \pm 0,13$ /AC-O-E  $6,71 \pm 0,24$ ) toutes ces teneurs sont exprimées en mg EQ/g ES. Par contre les travaux de (**Fonseca et al., 2017**) sur les feuilles de la plante *Smilax brasiliensis* ont présenté des niveaux de flavonoïdes inférieurs aux résultats : DCM ( $152,85 \pm 33,76$  ug EQ/mg ES) ; EE ( $111,08 \pm 26,02$  ug EQ/mg ES) et AC ( $194,80 \pm 30,12$  ug EQ/mg ES).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les polyphénols présents ne sont pas tous des flavonoïdes, il peut y avoir aussi la présence d'autres polyphénols tels que les tanins catéchiques. Des facteurs comme les méthodes d'extraction différentes et les solvants utilisés la sécheresse, le chauffage et l'intensité lumineuse peuvent agir sur les résultats (**Ouahida, 2019**).

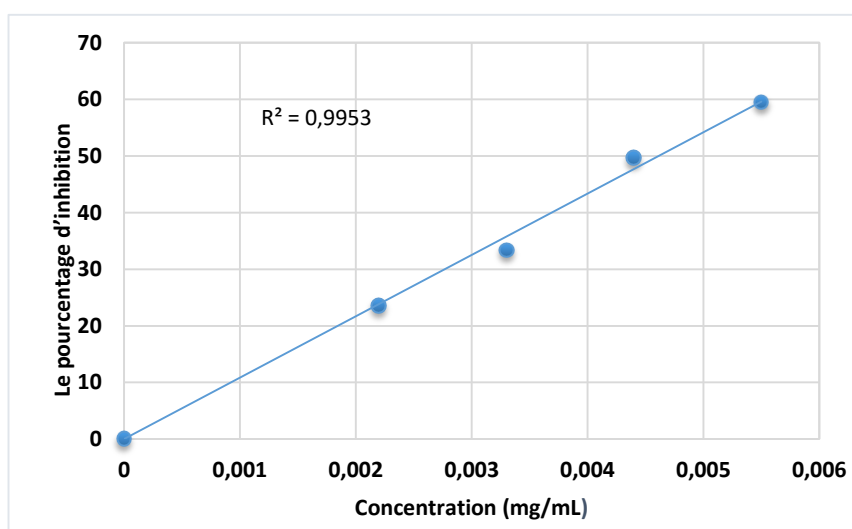
### 1.4 Résultats de l'activité antioxydante

Dans cette étude, les extraits bruts (DCM, acétonique et méthanolique) préparés à partir des racines de la plante *Smilax aspera* ont été étudiés pour leurs activités antioxydantes potentielles en utilisant la méthode de DPPH.

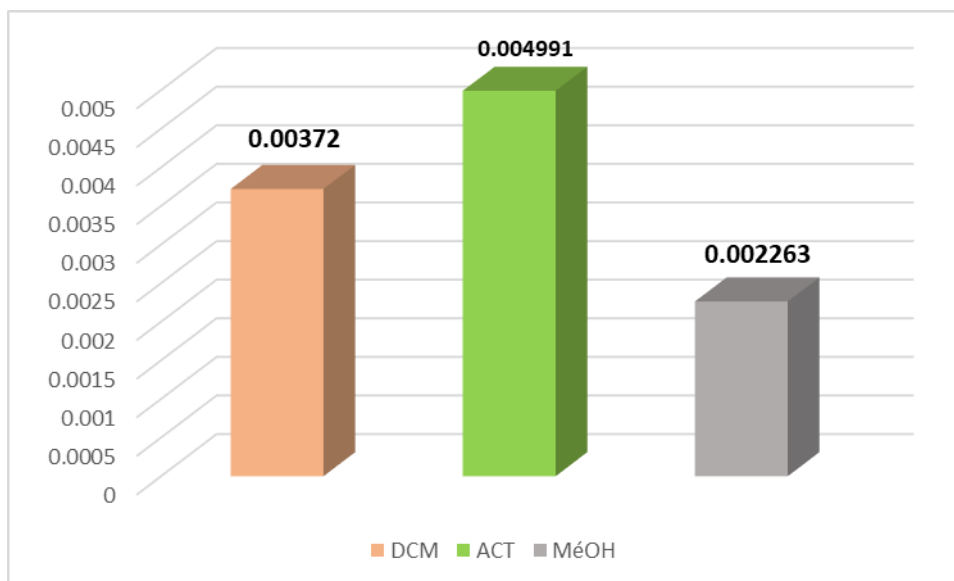
Les résultats de l'activité antioxydante par le test de DPPH sont exprimés par VCEAC g de l'extrait sec / g équivalent de vit C. (tableau 10 et figure. 19)

**Tableau 10** : Valeurs de VCEAC des extraits de *Smilax aspera*.

Extrait	Concentration (g/ml)	VCEAC (g /g d'extrait)	Interprétation
DCM	0,0012	0,0037 ± 0,00026	1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0,0037g de vitamine C
ACT	0,0012	0,0049 ± 0,00047	1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0,0049g de vitamine C
MOH	0,0012	0,0022 ± 0,00021	1g de l'extrait a un pouvoir antioxydant équivalent de 0,0022g de vitamine C



**Figure 19** : la courbe d'inhibition PI% en fonction de la concentration en du Vit C. (test de DPPH)



**Figure 20 :** Comparaison entre les valeurs de VCEAC des extraits de *Smilax aspera*. (Test de DPPH)

Nous constatons que l'extrait acétonique de la plante *Smilax aspera* montre la meilleure activité anti radicalaire. Les valeurs de VCEAC en g/ g d'extrait enregistrent l'ordre suivant :

Extrait acétonique ( $0,0049 \pm 0,00047$ ) < extrait dichlorométhanologique ( $0,0037 \pm 0,00026$ ) < extrait méthanologique ( $0,0022 \pm 0,00021$ ).

En comparant nos résultats avec les travaux de (**Benatia et al., 2022**), ils ont utilisé la méthode de IC50 et leurs résultats sont : ACT/H<sub>2</sub>O (DCM  $0,3461 \pm 0,1773$ /AC-O-E  $0,9078 \pm 0,0738$  mg/ml) et MOH/H<sub>2</sub>O (DCM  $0,324 \pm 0,0166$  /AC-O-E  $1,187 \pm 0,487$  mg/ml), ces derniers montrent qu'ils sont plus forts que nos résultats. La preuve est qu'ils ont utilisé une concentration beaucoup plus faible que nous avons utilisé, et ils ont obtenu le taux d'inhibition le plus élevé de plus de 50%. Cela peut être expliqué par le fait que la méthode d'extraction et les solvants utilisés (système de solvants) sont différents.

Les études menées par **Fonseca et al., 2017** sur les extraits de *Smilax brasiliensis* ont montré que l'extrait DCM des feuilles possède la meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits : DCM ( $11,75 \pm 0,89$  ug/ml) ; EE ( $9,76 \pm 1,06$  ug/ml) ; ACT ( $2,80 \pm 0,12$  ug/ml).

La variation des résultats de l'étude du pouvoir antioxydant peut être attribuée aux différences de réactivité des extraits en raison de leur complexité chimique, et la variation des polarités des extraits est étroitement liée aux différentes méthodes utilisées. Les matériaux végétaux extraits, les conditions et le protocole expérimental utilisés, ainsi que les facteurs liés à la croissance de l'espèce végétale elle-même (région de récolte, climat et stade de maturité) (**Mouffouk, 2019**).

La corrélation entre l'activité antioxydante par le test de DPPH et les contenus en flavonoïdes a été établie. Cette analyse révèle une corrélation entre l'activité antioxydante et le teneur en flavonoïdes fortement positive avec un coefficient de corrélation  $R^2=0.96$ .

Cela montre l'implication linéaire des composés phénoliques essentiellement les flavonoïdes dans l'activité antioxydante.

## 2. Résultats et discussions de docking moléculaire

### 2.1 Pour l'enzyme alpha amylase

#### 2.1.1 Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme alpha amylase

L'amarrage de deux composants de la partie souterraine de *Smilax aspera* se fait sur la base structurale de la protéine cible. Le tableau 11 illustre les résultats.

**Tableau 11** : les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme alpha-amylase

Ligands	Energie (Kcal/mol)	AA impliquées	Type Interaction	Distance (Å)
<b>Acarbose</b>	-9.3	GLY306, GLU233 ASP300, HIS299, HIS305, GLN63, VAL163, LYS200, TYR62, ASP197, HIS101, TRP59, GLY164, SER105, HIS201, GLY106, LEU165	Hydrogène Hydrophobe	2,92
<b>Resvératrol (Ligand 1)</b>	-8.0	ASP300, TYR62, TRP59, VAL163	Hydrogène Hydrophobe	2,35
<b>Épicatéchine (Ligand2)</b>	-8,9	ASP197, TRP59 TYR62, VAL163	Hydrogène Hydrophobe	2,18

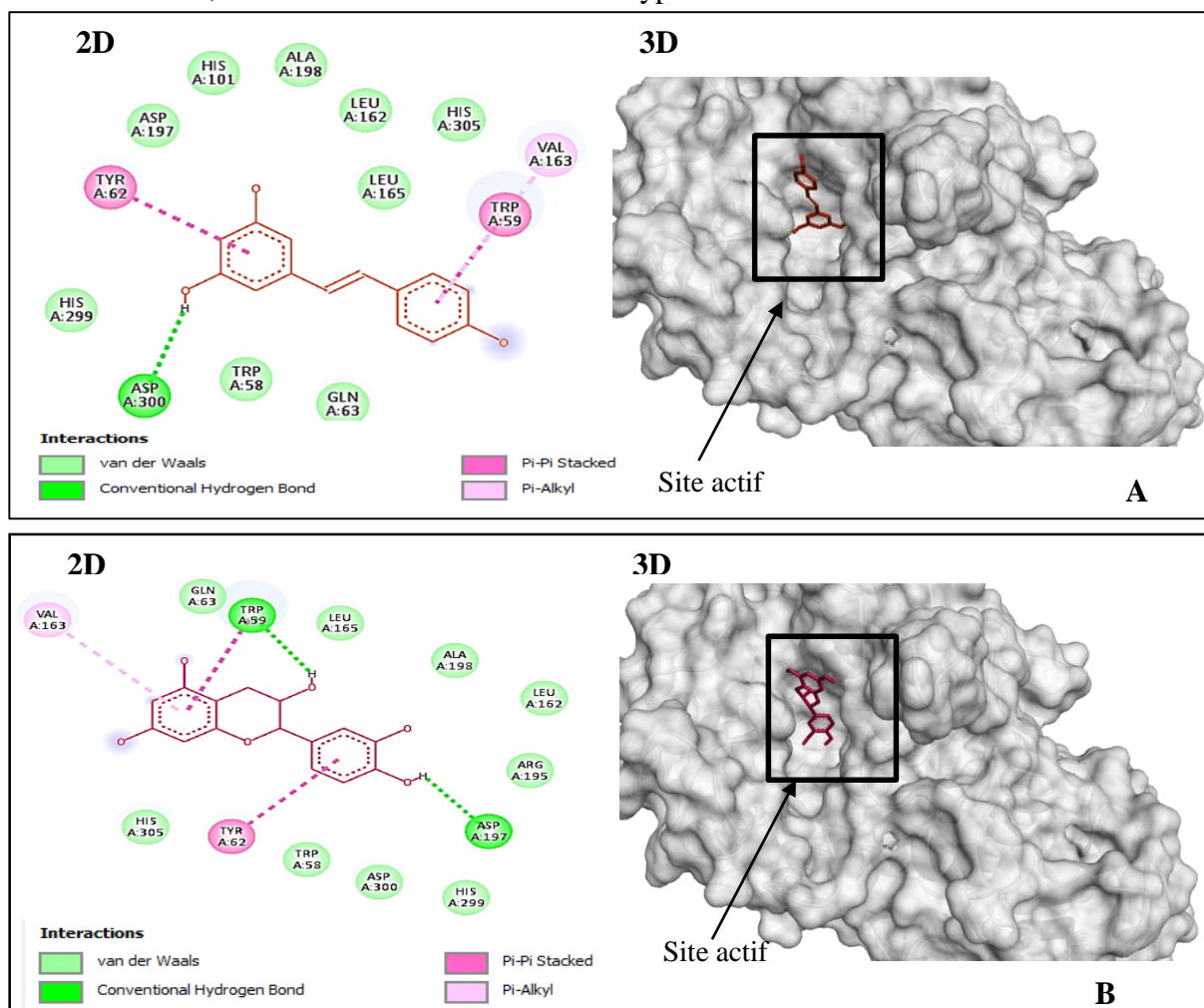
Sur la base des résultats de l'amarrage moléculaire nous montrons que l'énergie de resvératrol et l'épicatéchine (-8.0 Kcal/mol), (-8.9 Kcal/mol) consécutivement faible que l'énergie de ligand d'origine (-9.3 Kcal/mol), et les deux ligands se fixent sur le site actif et peuvent interagir directement avec les résidus ASP300, TRP59, VAL163, ASP197 et ce dernier lui-même qui interagit avec le ligand standard.

Selon des travaux antérieurs sur les interactions moléculaires d'amarrage moléculaire entre le resvératrol et  $\alpha$ -amylase la majorité des résultats a révélé la fixation de resvératrol par des acides aminés communs : ASP300, TRP58, TYR62 (**Khalid et al., 2022**) et les résultats (**Rasouli et al., 2017**) ont montré la stabilisation de catéchine isomères de épicatéchine par des acides aminés : ASP197, TYR62, TRP59 et TRP58, se sont les mêmes acides aminés obtenus

dans notre étude. Nous en concluons que ligand 1 et ligand 2 peuvent être des inhibiteurs compétitifs d'alpha-amylase.

### 2.1.2 Analyse visuelle de mode d'action des ligands sur alpha amylase

La visualisation des résultats du docking moléculaire montre la stabilité du complexe ligand 1 et alpha-amylase par diverses interactions que nous avons schématisées sur la figure 21. Une seule liaison hydrogène a été formée entre l'hydrogène de la fonction alcool de ligand1 et l'acide aminé ASP300, des liaisons hydrophobiques entre les deux groupements benzyles et les acides aminés TYR62, TRP59 et VAL163 et des interactions de type Van der Waals. La même chose pour le ligand 2 stabilisé par : liaison hydrogène entre hydrogène de la fonction alcool et acides aminés : ASP 197, TRP 59, liaison hydrophobique avec l'acide amine TYR 62, VAL 163 et des interactions de type van der Waals.



**Figure 21** : analyse visuelle du site de liaison de resvératrol (A) et épicatechine (B) avec alpha amylase

#### 2.2.1 Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme xanthine oxydas

Les interactions entre les sites actifs de l'enzyme XO et les deux molécules sont calculées lors du docking moléculaire, les valeurs sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 12** : les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme xanthine oxydase.

Ligand	Energie (Kcal/mol)	AA Impliquées	Type Interaction	Distance (Å)
<b>TEI</b>	-7,5	PRO1076, ASN768 THR803, LYS771, PHE1013, THR1010 ALA1079, ALA107 VAL1011, LEU373 LEU1014, LEU648 ARG880, PHE914 PHE1009	Hydrogène Hydrophobe	2,78
<b>Resvératrol (Ligand1)</b>	-8.6	THR1010, PHE914, PHE1009, LEU648 ALA1078, VAL1011 LEU873	Hydrogène Hydrophobe	<b>3,22</b>
<b>Épicatéchine (Ligand2)</b>	-9.2	CYS150, MET1038, GLY797, GLU802 ALA1078, PHE798 ARG912	Hydrogène Hydrophobe	<b>2,55</b>

D'après les résultats obtenus par l'amarrage moléculaires nous avons remarqué que l'énergie d'interaction de resvératrol et épicatechine sont élevées (-8.6 kcal /mol), (- 9.2 kcal /mol) et les deux ligands se fixent sur le site actif d'enzyme xanthine oxydase comparant aux travaux de **Agbadua et al., 2022**, on retrouve la même interaction hydrogénée entre l'oxygène de fonction alcool et l'acide aminé THR1010 et des interactions hydrophobiques avec les acides aminés : PHE914, PHE1009, LEU648, ALA1078, VAL1011 et LEU873.

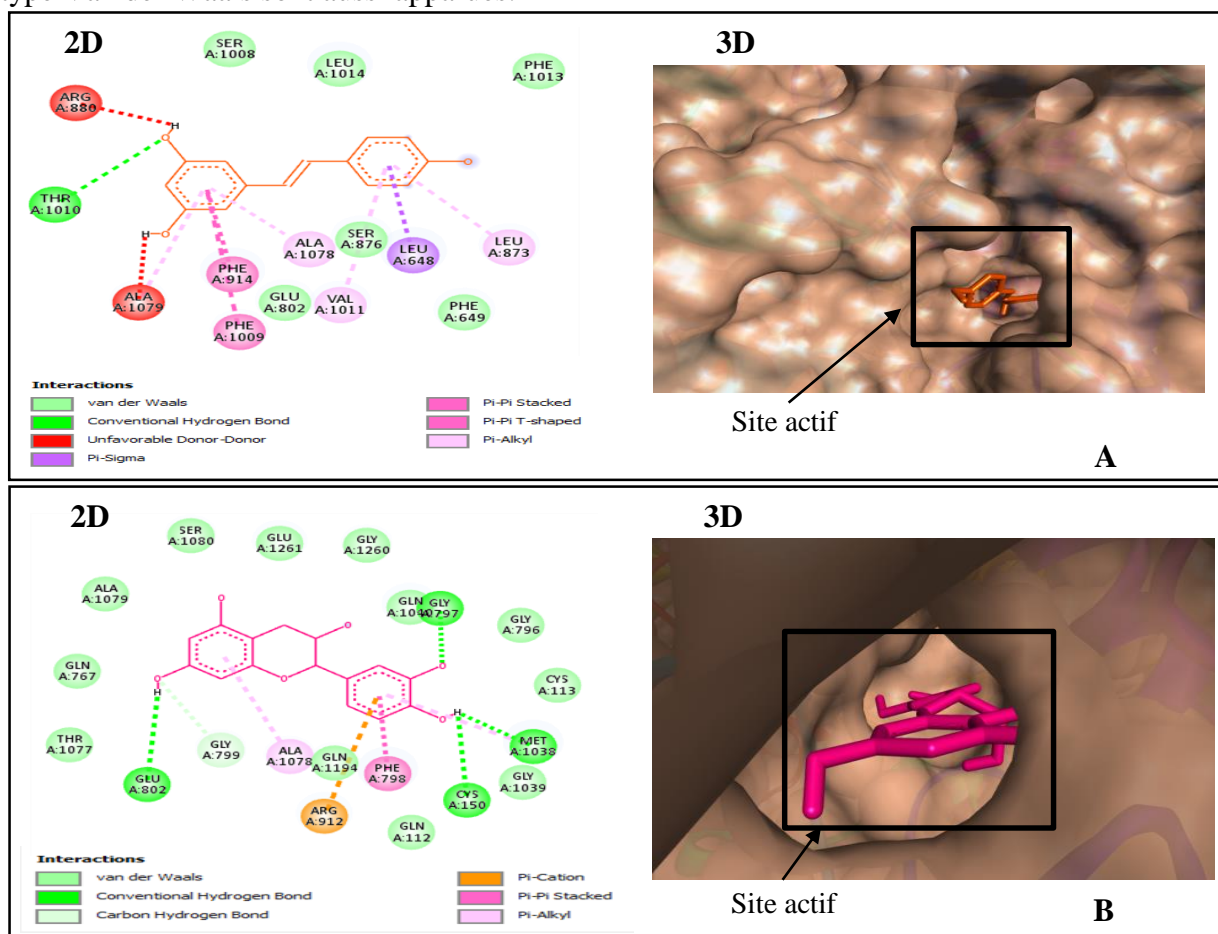
Nous supposons que les deux molécules ont une affinité plus élevée pour la protéine cible par rapport au ligand de référence et peuvent former des complexes plus stables avec elle. Par conséquent, on peut dire que le resvératrol et l'épicatéchine sont des molécules qui pourraient être testées pour leurs effets antioxydants en utilisant la protéine xanthine oxydase.

### 2.2.2 Analyse visuelle de mode d'action des ligands sur xanthine oxydase

La stabilité du complexe formé entre xanthine oxydase et resvératrol est régie par diverses interactions que nous avons schématisées dans la figure.22. Une seule liaison hydrogène a été formées entre oxygène de la fonction alcool de resvératrol et l'acide aminé THR1010.

Les interactions hydrophobes jouent un rôle essentiel dans la formation du complexe. Les acides aminés : LEU648, VAL1011, LEU873, ALA1079, ALA1079, LEU1014, PHE1009 et PHE914 sont responsables de la formation de ces interactions. Des interactions de type van der Waals avec les acides aminés : SER1008, LEU1014, PHE1013 PHE649, GLU802 et SER876.

La stabilisation du complexe enzyme XO et le ligand 2 est régie par quatre liaison hydrogène entre hydrogène de fonction alcool et acides aminés GLU802, CYS150, MET1038 et oxygène de même fonction GLY797, des interactions hydrophobiques et interactions de type Van der Waals sont aussi apparues.



**Figure 22** : Analyse visuelle du site de liaison de resvératrol (A) et épicatechine (B) avec xanthine oxydase

## 2.3 Pour l'enzyme télomérase

### 2.3.1 Les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme télomérase

Le tableau ci-dessous présente les valeurs d'énergies de liaison, ligand-récepteur obtenues lors de docking moléculaire pour les deux ligands étudiés et l'enzyme télomérase.

**Tableau 13** : les valeurs de docking score des ligands avec l'enzyme télomérase.

Ligand	Energie (Kcal/mol)	AA Impliquées	Type Interaction	Distance Å
<b>BIBR1532</b>	-10,7	LEU554, ILE497 MET482, TYR551 ILE550, ARG486  PHE494	Hydrophobe	3,91
<b>Resvératrol (Ligand1)</b>	-8.4	LEU554, ILE497, ILE550, PHE494, MET482	Hydrophobe	3,50
<b>Épicatéchine (Ligand2)</b>	-8.0	LEU554, ILE497 MET482, TYR551 ILE550, ARG486  PHE494	Hydrophobe	3,52

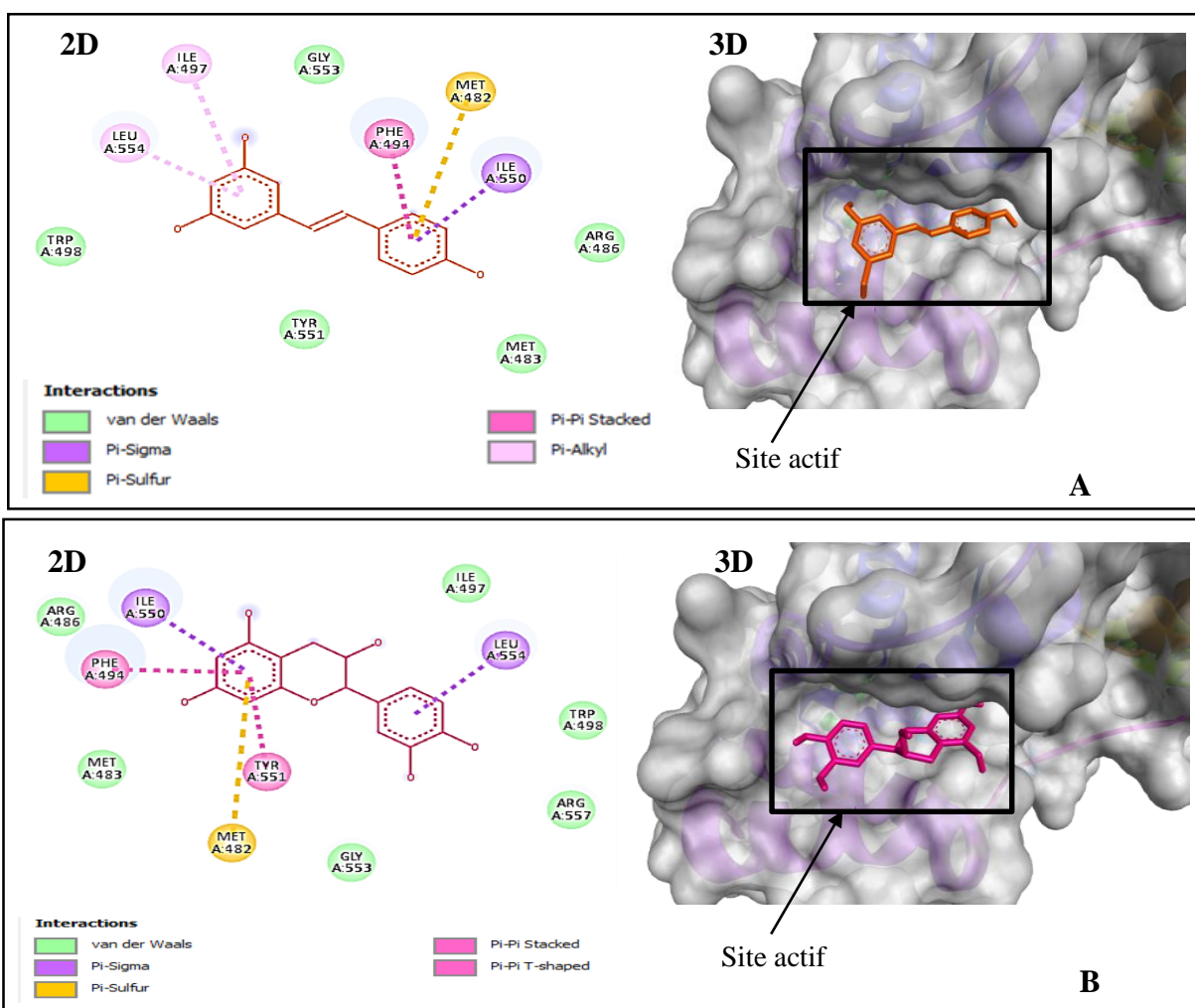
D'après les résultats obtenus par l'amarrage moléculaire l'énergie de resvératrol et épicatechine sont très stables avoisinant (-8.4 Kcal/mol) et (-8.0 Kcal/mol), d'autre part on remarque la stabilisation de deux ligands par quelques résidus identiques : ILE550, PHE494, TYR551 LEU554 et MET482, ces mêmes acides aminés sont présents dans le complexe de télomérase et le ligand de référence, ce résultat montre que les deux ligands ont une affinité importante vis-à-vis de l'enzyme.

Étant donné que les molécules ont montré une interaction très forte avec le même site de liaison de ligand standard de la protéine télomérase, on peut donc dire que les molécules resvératrol et épicatechine sont des molécules potentiellement candidates à vérifier pour ses activités anticancéreuses via la protéine télomérase.

### 2.3.2 Analyse visuelle de mode d'action des ligands sur télomérase

La visualisation de résultat du docking moléculaire montre la stabilité du complexe resvératrol et télomérase par diverses interactions que nous avons schématisées sur la figure ci-dessous.

Les interactions hydrophobiques entre le cycle benzénique et les acides aminés : LEU554, ILE550, PHE494, ILE550 et MET482 avec autre interaction de type van der Waals et les acides aminés : TRP498, GLY495, ARG486, MET483, TYR551, GLY553 et la même chose pour l'épicatéchine stabilisé par même types des liaisons hydrophobiques et van der Waals.



**Figure 23 :** Analyse visuelle du site de liaison de resvératrol (A) et épicatechine avec télomérase

### 3. Résultats des propriétés pharmacologiques

Il est indispensable de compléter ce travail en calculant les propriétés pharmacocinétiques des composés ayant présenté les meilleures scores d'énergie afin de nous renseigner sur leur biodisponibilité par voie orale, en appliquant la règle de 5 de Lipinski (tableau 14).

**Tableau 14 :** les paramètres de la règle de cinq de Lipinski.

Ligand	MW	Log P	nON	nOHN
Resvératrol	228,25	2,99	3	3
Épicatéchine	290,27	1,37	6	5

A travers le tableau 14, le poids moléculaire de resvératrol et épicatéchine sont inférieures à 500 g/mol, donc ils traversent facilement la membrane cellulaire.

Nous montrons que les deux ligands ont le nombre d'accepteur d'hydrogène inférieur à 10 et le nombre donneur d'hydrogène inférieur à 5.

La propriété Log P, qui détermine la solubilité plus la valeur de Log P est élevée, plus la solubilité est faible nous enregistrent dans le tableau 14 la valeur de logP inférieur 5 pour les deux molécules. Donc le resvératrol et épicatéchine répondent aux règles de Lipinski.

### 4. Résultats des propriétés pharmacocinétiques et toxicité

En utilisant le moteur de prédiction SwissADME et ADMETlab pour vérifier les propriétés pharmacocinétiques et toxicité des resvératrol et épicatéchine. Les résultats sont présentés dans le tableau 15

**Tableau 15 :** les propriétés pharmacocinétiques et toxicité des ligands

Propriétés	Resvératrol	Épicatéchine
GI (Gastro intestinal) absorption	Elevée	Elevée
BBB (Blood Brain Barriere)	Non	Non
CYP1A2 inhibition	Non	Non

CYP2C19 inhibition	Non	Non
CYP2C9 inhibition	Non	Non
CYP2D6 inhibition	Non	Non
CYP3A4 inhibition	Non	Non
Test d'Ames	Négative	Négative
Cancérogénicité	Négative	Négative
hERG_inhibition	Négative	Négative

**GI** : Gastro intestinal absorption, **BBB** : Pénétration de la barrière hémato-encéphalique

**CYP**: Cytochrome, **HERG**: Human Ether Related Gene channel

Les résultats SwissADME des composés resvératrol et épicatechine montrent que ces deux molécules présentent une absorption gastro-intestinale élevée, ce qui indique qu'ils peuvent facilement passer dans la circulation sanguine et les résultats ADMETlab montre que les deux composés ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique.

Il s'avère que les deux composés n'inhibent pas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 CYP2D6, CYP3A4), ce qui indique qu'ils n'ont aucun effet sur le cerveau et sur les métabolismes des nombreux médicaments.

Leur profil de toxicité ne montre pas de mutagène dans test d'Ames, sans un risque pour l'inhibition de HERG.

---

# *Conclusion*

---

Les plantes à usage médicinal sont considérées comme la principale source de soins de santé pour la majorité de la population mondiale. Notre travail est une contribution à l'étude des activités antioxydants de l'espèce *Smilax aspera* et l'activité inhibitrice des différentes enzymes par quelques métabolites secondaires par le docking moléculaire.

L'extraction des racines de la plante *Smilax aspera* en utilisant des solvants de polarité croissante à montrer des rendements différents selon les solvants utilisés, on a remarqué la valeur la plus élevée dans l'extrait méthanolique (23,21 %) suivi par l'extrait acétonique (1,36 %) et enfin l'extrait dichlorométhanolique (0,89 %).

La quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en polyphénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus nous ont révélé que l'extrait riche en polyphénols est l'extrait de DCM ainsi qu'en flavonoïdes est l'extrait acétonique. Les potentialités antioxydantes ont été évaluées par le piégeage du radical libre de DPPH, les résultats montrent que l'extrait acétonique possède une bonne activité antioxydante avec une valeur de VCEAC la plus élevée.

Les résultats de l'amarrage moléculaire ont montré que le resvératrol et l'épicatéchine donnent une bonne affinité sur le site actif de la cible testée. Les résultats de l'évaluation des propriétés physico-chimiques obtenus à partir du serveur SwissADME et swisslab ont révélé que les deux ligands ont présenté un bon profil ADMET et ont répondu la règle de Lipinski ainsi une bonne biodisponibilité par voie orale avec une facilité d'absorption ou de perméabilité dans le corps.

Enfin, ce n'est que le début de la recherche sur les substances naturelles biologiquement actives.

Il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- Étude expérimentale complémentaire *in vitro* du resvératrol et épicatéchine pour l'évaluation de l'activité antioxydante sur des modèles animaux (*in vivo*) afin de déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales.
- Études autres activités biologiques des racines de *Smilax aspera* comme (l'activité anti-inflammatoire, antidiabétique, antimicrobienne ...)

---

## *Références bibliographiques*

---

- Adjadj, M., Baghiani, A. (2009). Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva* (L.)
- Agbadua, O. G., Kúsz, N., Berkecz, R., Gáti, T., Tóth, G., Hunyadi, A. (2022). Oxidized Resveratrol Metabolites as Potent Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitors.
- Alsenan, S., Al-Turaiki, I., Hafez, A. (2020). A recurrent neural network model to predict blood–brain barrier permeability. *Computational Biology and Chemistry*, 89.
- Aurélien, M. (2006). Création et utilisation de chimio thèques optimisées pour la recherche «*in silico* » de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat. Université d'Orléans.
- Baudin, B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(522), 22-30.
- Belhouchet, Z., Sautour, M., Miyamoto, T., & Lacaille-Dubois, M. A. (2008). Steroidal saponins from the roots of *Smilax aspera* subsp. *mauritanica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(9), 1324-1327.
- Benatia, N., Khineche A., Hamidat H. (2022). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des extraits polaires de la plante *Smilax aspera*. Master, Université Amar Telidji Laghouat.
- Bendif, H. (2017). Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae. Thèse de doctorat, Ecole normale supérieure de kouba-Alger.
- 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. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.
- Boizot, N., Charpentier, J. P. J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.
- Boubetra, K., Azizi, N., Amirouche, N., Bouyaiche, M., Zannidouche, O., Ouamrane, L., ... & Amirouche, R. (2022). Caractérisation caryologique de *Smilax aspera* L.(Smilacaceae), espèce lianescente de la forêt algérienne. *Annales de la Recherche Forestière en Algérie*, 12(1), 44p.
- Boucherit, H., Chikhi, A., Bensegueni, A., Merzoug, A., Hioual, K. S., & MOKRANI, E. (2013). L'amarrage moléculaire: une nouvelle approche pour lutter contre le développement de la tuberculose. *Review of Industrial Microbiology Sanitary and Environmental*, 7, 133-149.
- Boughrara B. (2016). Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêts thérapeutique et nutritif du Parc national El- kala. Thèse de doctorat, Université badji mokhtar-annaba, 158.
- Bouratoua, A., Kabouche, A. (2018). Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques des espèces algériennes *Athamanta sicula* L. et *Ferula longipes* Coss. Thèse de doctorat, Université Frères Mentouri-Constantine 1.

- Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., Ksouri, R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.
- Billard, P. (2017). La télomérase: fonctions biologiques et ciblage thérapeutique (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Burley, S. K., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Markley, J. L., Nakamura, H., et Velankar, S. (2017). Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive, 627-641p.
- Cáceres, E. L., Tudor, M., & Cheng, A. C. (2020). Deep learning approaches in predicting ADMET properties. *Future Medicinal Chemistry*, 12(22), 1995-1999.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10.
- Dalkılıç, S., Korkmaz, İ., Dalkılıç, L. K., Akay, G., & Fidan, S. (2022). *In vitro* cytotoxic effects of *Smilax aspera* L. roots on cancer cell lines. *Food Biosciences*, 46, 10150.
- Defraigne, J., Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63p.
- Descamps, E., Gelé, P., Bordet, R., Vamecq, J. (2006). Modulation pharmacologique du stress oxydatif. *La Lettre du pharmacologue*, 20(4), 107-108.
- Desport, J., Couratier, P. (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives Oxydative stress in neurodegenerative diseases. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 253-259.
- El-Haci, I.A. (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales end : *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Anabasis aretioides* Moq. & Coss. Et *Limoniastrum feei* (Girard). Thèse de doctorat, Université ABOU-BEKR-BELKAID Tlemcen, 13p.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 108p.
- Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises*, V 64, p390-396.
- Fonseca, J., Barbosa, I., Silva, J. (2017). Antioxidant and allopathic activities of *Smilax Brasiliensis* Sprengel (*Smilacaceae*). *South African journal of Botany* 336-340.
- Fouré, J. (2022). La Salsepareille d'Europe.
- Ghédira, K., Goetz, P. (2016). Salsepareille *Smilax Sarsaparilla* L. (syn. *Smilax aspera* L.) [*Smilacaceae*], 1-3p.
- Goyal, M., Basak, A. (2010). Human catalase: looking for complete identity. 1(10), 888-897.
- Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.).
- Jejurikar, B., L, Rohane., S. H. (2021). Drug designing in discovery studio.

- Kadri, H., Kellai, S., Kebir, A., Ladjimi, C. (2021). Place de la modélisation moléculaire dans le domaine pharmaceutique, étude par docking moléculaire de deux nouvelles séries antifongiques.
- Khalid, M. F., Rahman, K., Irshad, K., Chohan, T. A., et Akash, M. S. H. (2022). Biochemical investigation of inhibitory activities of plant-derived bioactive compounds against carbohydrate and glucagon-like Peptide-1 metabolizing enzymes.
- Khanbabaee, K., Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.
- Kim, S., Cheng, T., He, S., Thiessen, P. A., Li, Q., Gindulyte, A., et Bolton, E. E. (2022). PubChem Protein, Gene, Pathway, and Taxonomy data collections: bridging biology and chemistry through Target-Centric Views of PubChem data. *Journal of Molecular Biology*, 434.
- Kim, S., Cheng, T., He, S., Thiessen, P., Gindulyte, A., Bolton, E. (2022). PubChem Protein, Gene, Pathway, and Taxonomy data collections: bridging biology and chemistry through Target-Centric Views of PubChem data. *Journal of Molecular Biology*, 434(11).
- King, R. E., Bomser, J. A., & Min, D. B. (2006). Bioactivity of resveratrol. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(3), 65-70
- Le Jury, D. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes (Doctoral dissertation, Université de Laghouat).
- Lee, S., Lee, I., Kim, H., Chang, G., Chung, J., No, K. (2003). The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physicochemical, drug absorption and drug-like properties. *EuroQSAR designing drugs and crop protectants: processes, problems and solutions*.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., .... Et Abete, P. (2018). Stress oxydatif, vieillissement et maladies. *Intervention clinique dans le vieillissement*, 13, 757– 772.
- Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., & Feeney P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X (96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3–26.
- Michel T., Destandau E., Le Floch G., Lucchesi M.E., Elfakira C. (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of seabuckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*. 131(3). 754-760
- Mouffouk, C. (2019). Evaluation des activités biologiques et étude de la composition chimique de la plante *Scabiosa stellata* L (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- Muanda, F.N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 238.

- Musci M., Yao S. (2017). Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 68(8), 913-918.
- Nicoletti M., Toniolo C., Venditti A., Bruno M., Ben Jemia M. (2015). Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian Cistus: Cistus monspeliensis, Cistus villosus and Cistus libanotis. *Natural product research*. 29(3), 223-230.
- Ouahida, D. I. A. (2019). Optimisation de l'extraction des polyphénols des (Phoenix dactylifera) L par différents solvants et méthodes (Doctoral dissertation, Université KASDI MERBAH Ouargla).P57-61
- Pachoulide, C. (2021). Les méthodes in silico dans la recherche pharmaceutique : exemple d'application pour l'étude pharmacocinétique post-autorisation de mise sur le marché des  $\beta$ -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome (Doctoral dissertation).
- Pandey, K., Rizvi, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2 (5).
- Patel, S., Biswas, B., Rambabu, K., Sundaram, E. N., & Arya, R. (2020). Pharmacognostical studies of *Smilax aspera* Linné.
- Pires, D., E., Blundell, T. L., et Ascher, D. B. (2015). pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of medicinal chemistry*, 58, 4066-4072.
- Rahman, H., Uddin, S., Islam, N., Nikkon, F., & Hasan, M. F. (2001). Comparative Analysis on the Purified Amylases from Healthy and Diseased Sugarcane Juice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(6), 728-732.
- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S. M. B., Adibi, H., et Khodarahmi, R. (2017). Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds.
- Remko, M., Swart, M., et Bickelhaupt, F. M. (2006). Theoretical study of structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some centrally acting antihypertensives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(6), 1715-1728
- Seeliger, D., Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design*, 24 , 417-422.
- Sharma, R., Bolleddu, R., Maji, J. K., Ruknuddin, G., et Prajapati, P. K. (2021). In Vitro  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities and *in-vivo* anti-hyperglycemic potential of different dosage forms of guduchi (tinospora cordifolia [willd.] miers) prepared with ayurvedic bhavana process.
- Sinegre, T. (2021). Impact de l'épicatéchine sur l'hémostase et la structure du caillot de fibrine. Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne.
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., ... & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5-W14.
- Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M., 1998. Preparative chromatography techniques : Applications in natural products isolation, 2nd ed. Springer Verlag. Berlin Heidelberg.



---

# *Annexes*

---

## Les produits chimiques, réactifs et appareillage utilisés

Produits chimiques	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"><li>- Hexane</li><li>- Méthanol</li><li>- Acétone</li><li>- Dichlorométhane</li><li>- Ethanol</li><li>- Acide gallique</li><li>- Quercétine</li><li>- Carbonate de sodium</li><li>- Vitamine C</li><li>- Eau distillée</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Folin-Ciocalteu</li><li>- Trichlorure d'aluminium</li><li>- Réactif du DPPH</li></ul>
	Appareillage
	<ul style="list-style-type: none"><li>- Rota vapeur</li><li>- Spectrophotomètre UV/Visible</li><li>- Balance électronique de précision</li><li>- Agitateur magnétique</li><li>- Agitateur vortex</li><li>- Micropipettes (variable)</li></ul>

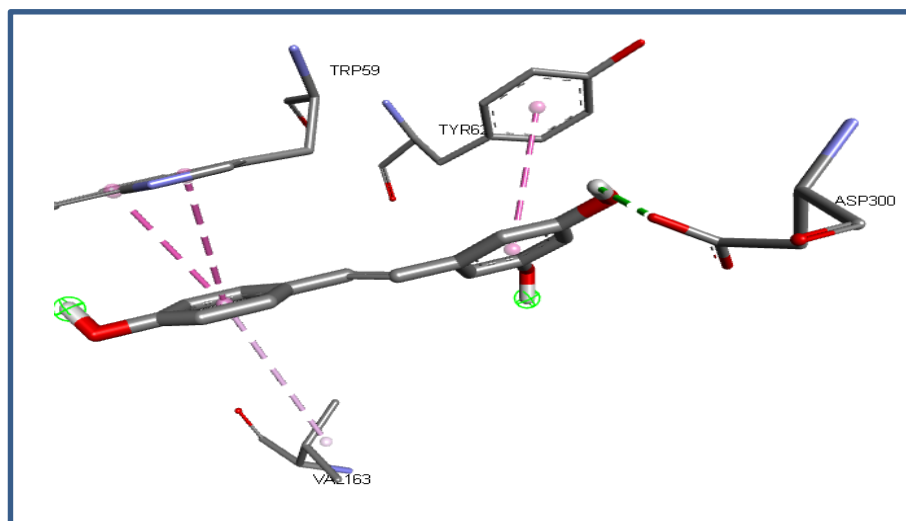


Image d'interaction entre l'alpha amylase avec la resvératrol

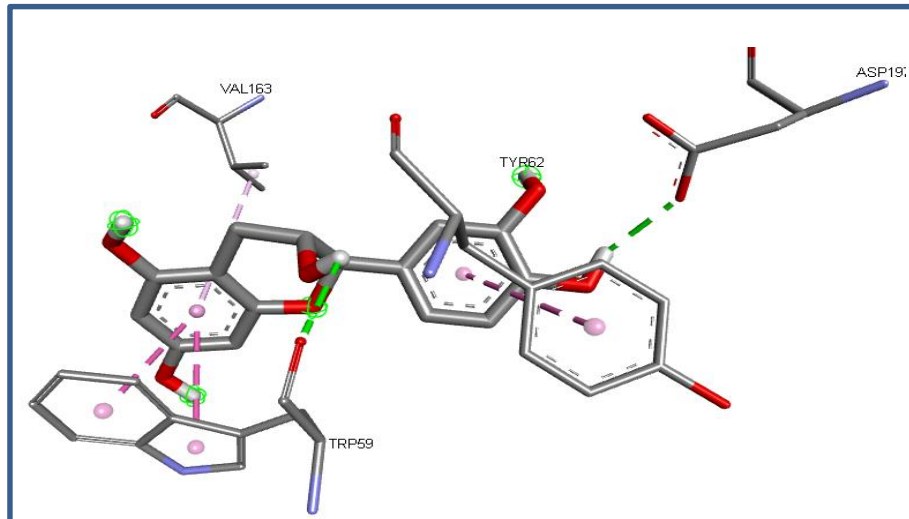
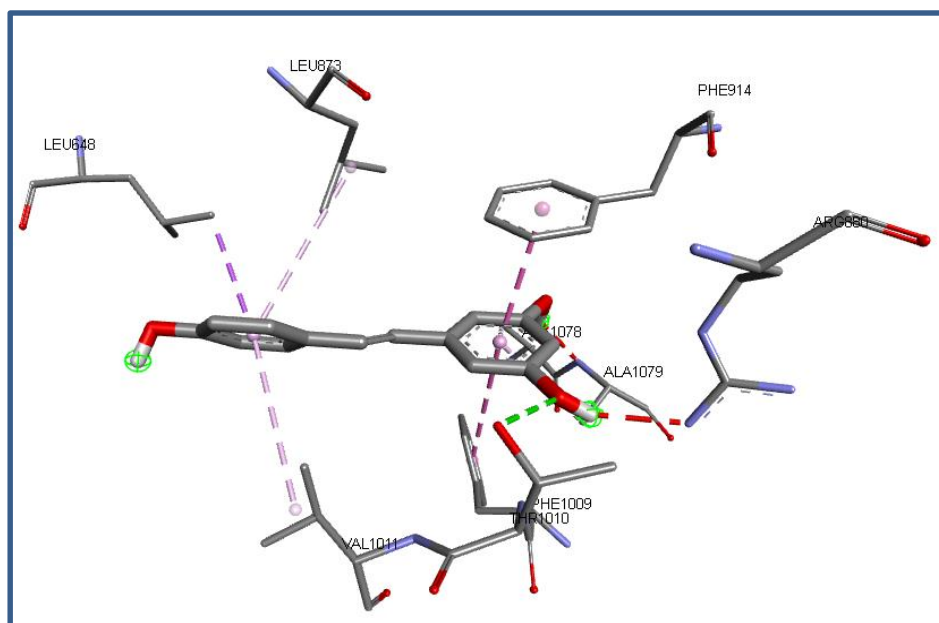
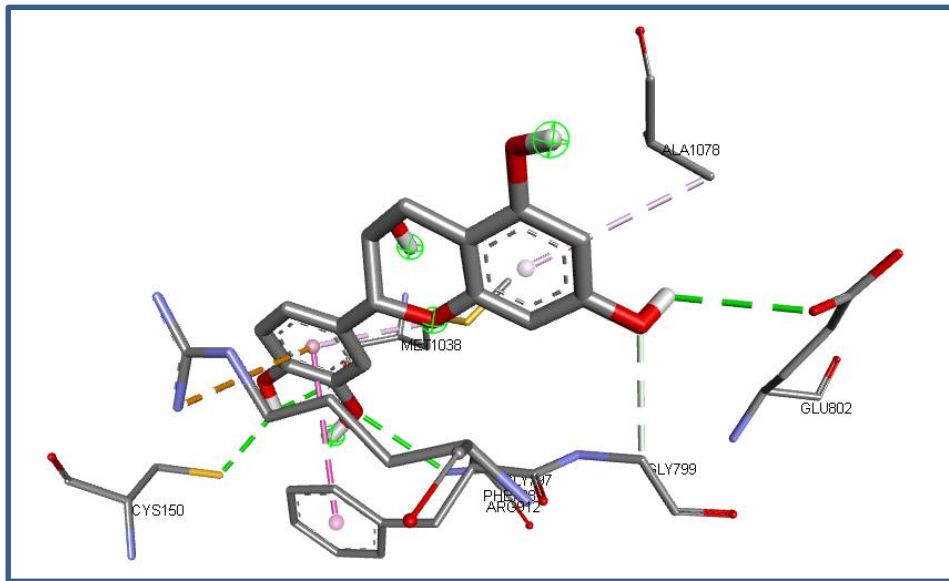


Image d'interaction entre l'alpha amylase avec la épicatechine



. Image d'interaction entre la xanthine oxydase avec resvératrol



. Image d'interaction entre la xanthine oxydase avec épicatechine

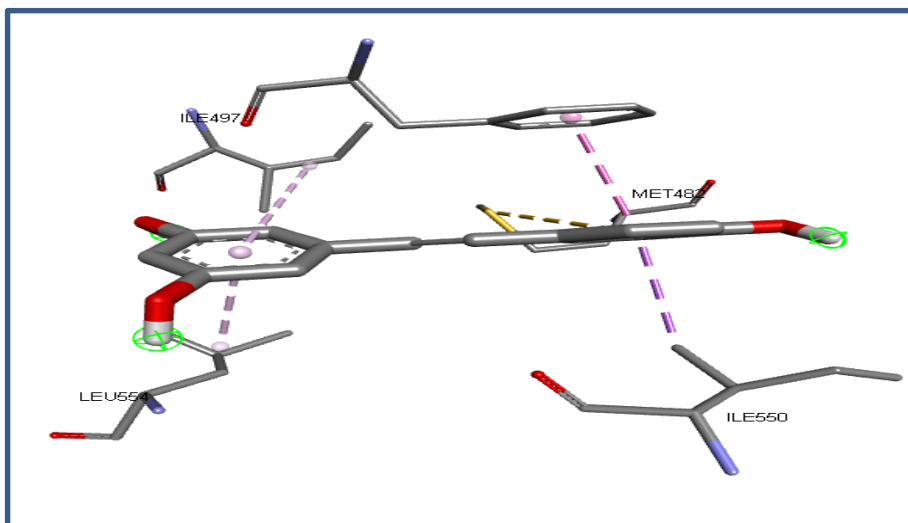


Image d'interaction entre la télomérase avec resvératrol

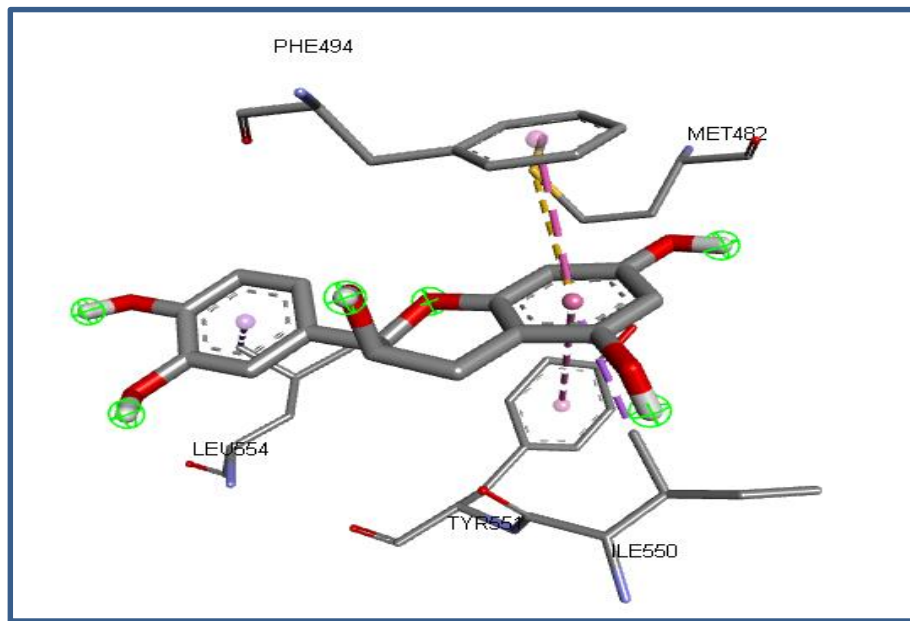


Image d'interaction entre la télomérase avec épigallocatéchine