

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES IN
LIFE, HEALTH AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE

LABORATORY OF PHARMACOLOGIE AND TOXICOLOGY

Effets des biflavonoïdes de *Garcinia manni* *oliv.*, sur un modèle de la maladie d'Alzheimer induite chez la drosophile par le chlorure d'aluminium

Mémoire soumis comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biochimie

Option : **Biotechnologie et Développement**

Par :

TCHAMBA TCHANA Jordas Casares

Matricule: **17S2832**

Licencié ès-Sciences

Sous la Co-Direction de :

OWONA AYISSI Brice

Chargé de cours

Université de Yaoundé I

NJAYOU Frédéric Nico

Professeur

Université de Yaoundé I



Année académique : 2023-2024

DEDICACE

Ce travail est dédié

À ma Tante : **KENGNI TIONANG Larissa Epse. GUIFO**

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le **Dieu** Tout-puissant de m'avoir donné la force, le courage et la santé pour la réalisation de ce travail. Beaucoup de personnes et d'institutions m'ont accompagné tout au long de cette étude et je tiens ici à leur adresser mes remerciements :

Pour les personnes,

- **Au Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef du Département de Biochimie et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I pour m'avoir accueilli et permis la réalisation de ce travail dans votre laboratoire. Recevez ici professeur, l'expression de ma profonde gratitude ;
- **Au Pr. NJAYOU Frédéric Nico**, Vous m'avez accueilli dans votre équipe de recherche en acceptant de conduire mes premiers pas en recherche avec toute la rigueur scientifique qui vous est reconnue. Vos conseils, vos encouragements et vos observations ont été d'une importance capitale dans l'élaboration de ce mémoire. Recevez en ces termes l'expression de ma profonde gratitude ;
- **Au Dr. OWONA AYISSI Brice Vincent**, pour votre accompagnement. Votre disponibilité permanente ainsi que votre humilité m'ont permis de bénéficier de vos conseils avisés à chaque étape de ce travail. Votre aide a été inestimable. Recevez Docteur, mes sincères remerciements ;
- **Au Dr. MERSIMINE**, pour votre aide, vos encouragements et conseils pratiques sur l'entretien des drosophiles. Recevez ici l'expression de ma sympathie ;
- **À Tous les Enseignants** du Département de Biochimie pour la formation académique reçue ;
- **Monsieur NJINGOU Ibrahim** et **Monsieur ENANG II EDDIE Brice Junior**, pour leur accompagnement, leur disponibilité permanente, et leur humilité qui m'ont permis de bénéficier des multiples connaissances scientifiques, recevez ici mes sincères remerciements ;
- Tous mes aînés du laboratoire, particulièrement, **NGOHOB A Vigny**, **CHIEUGO Epiphania**, **JIGNOUA Yannick**, pour leur assistance, remarques pertinentes et conseils prodigués lors de la réalisation de ce travail ;

- À mes camarades de promotion, en particulier à **AGOUAK SAMBA Roche**, **CHOURUPOUO NGOUMOUN Lesli-Loïc**, **TCHIOTCHOUA KINPI Zidane**, **KENNE Bertanie** pour toutes les joies et les peines vécues ensemble ;
- À l'ensemble de l'équipe du **Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'université de Yaoundé I** ;
- À mes parents, **TCHAMBA LENTA Raoul** et **ATIONANG DONGMO Chantale Aimée** Epse. **TCHAMBA** qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance ;
- À mes tantes particulièrement à **ATIONANG NONNY Dariane** Epse. **WADJI** pour l'assistance psychologique, financière et les conseils ;
- **DONGMO NOUMEY Breshenelle**, **TIONANG TCHAMBA Farlain**, **NGUENA NOUMEY Jessica**, **TCHAMBA Jessy Dawn** pour vos encouragements et vos conseils apportés lors de la réalisation de ce travail ;
- Tous ceux et celles dont les noms ont été oubliés, veuillez m'excuser et recevez mes sincères remerciements.

✚ **Pour les laboratoires :**

- Le Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie (**LPT**) où le travail a été réalisé ;
- Le Centre de Recherche sur les Maladies Infectieuses (**CRID**) pour l'obtention et les conseils d'assistance sur l'entretien des drosophiles ;
- Le laboratoire de Chimie Organique de l'**UYI** pour l'obtention des biflavonoïdes.

TABLE DE MATIERE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DE MATIERE	iv
LISTES DES TABLEAUX.....	viii
LISTES DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	ix
RESUME	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCTION.....	Erreur ! Signet non défini.
Hypothèse de recherche.....	3
Objectif général.....	3
Objectifs spécifiques.	3
I. Généralité sur la maladie d'Alzheimer (MA)	5
I.1. Définition.....	5
I.2. Prévalence	5
I.2.1. Prévalence mondiale.....	5
I.2.2 Prévalence en Afrique.....	6
I.2.3. Prévalence au Cameroun.....	6
I.3. Types de la maladie d'Alzheimer.....	6
I.3.1. L'étude des familles possédant un héritage de gènes autosomiques dominants.....	7
I.3.2. L'étude des maladies d'Alzheimer tardive	7
I.4. Causes probables	8
I.5. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	10
I.6. Diagnostique, symptômes, conséquences et avancées de la recherche sur la maladie d'Alzheimer	14
I.6.1. Diagnostique et stratégies de détections précoces.	14
I.6.2. Symptômes	14
I.6.3. Conséquences de la maladie d'Alzheimer	14
I.6.4. Avancées de la recherche sur la maladie d'Alzheimer	15
I.6.5. Médicaments disponibles.....	16
I.7. Modèles de la MA au laboratoire.....	17
II. Aluminium et maladie d'Alzheimer	19
II.1. Définition	19
II.2. Interaction entre l'aluminium et la maladie d'Alzheimer	19
II.3. Physiopathologie de l'aluminium dans le cerveau	21

II.4. Aluminium et stress oxydatif	23
II.5. Aluminium et neurotoxicité chez les drosophiles.....	23
II.6. Autres alternatives d'induction de la MA	25
a. Introduction à MVD.....	26
b. Fonctionnement de MVD.....	26
c. Processus de docking.....	26
d. Analyse des résultats	26
III.1.2. Système de scores de MVD	27
III.1.3. Analyse des systèmes de score	27
III.1.4. Utilisation de MVD.....	28
IV. Les flavonoïdes comme traitement de la maladie d'Alzheimer.	28
IV.1. Définition.....	28
IV.2. Structures chimiques et fonction.....	28
IV.3. Les flavonoïdes et la maladie d'Alzheimer (MA)	29
VI.4. Travaux antérieurs sur <i>Garcinia manni</i> oliv.	30
I. Matériel.....	33
I.1. Matériel animal.....	33
I.2. Matériel végétal	33
I.3. Réactifs	35
I.4. Consommables.....	35
I.5. Équipements.....	35
II. Méthodes.....	36
II.1. Préparation du milieu de culture des drosophiles	36
II.2. Analyse <i>in silico</i>	36
II.2.1. Etude d'amarrage moléculaire (Fortuné, 2008).....	36
II.2.2. Utilisation du logiciel MVD	37
1. Paramètres du Docking.....	37
2. Préparation de la structure 3D des protéines	37
3. Préparation des ligands.....	37
4. Les algorithmes de recherche de docking et le système de score	37
5. Paramètres du système de score.....	38
II.2. Analyse <i>in vivo</i>	38
II.2.1. Recherche de la concentration toxique du chlorure d'aluminium (Abolaji et <i>al.</i> , 2020; Ao et <i>al.</i> , 2020).....	38
II.2.2. Recherche des concentrations non toxiques des composés testés	39

II.2.4. Tests de Géotaxie négatif (Ao et <i>al.</i> , 2020).....	40
II.2.5. Tests de mémoire à court terme (Busto et <i>al.</i> , 2010).....	42
II.3. Analyse des paramètres du stress oxydatif.....	43
II.3.1. Dosage de la superoxyde dismutase (Misra et Fridovich, 1972)	44
II.3.2. Dosage de la catalase (Sinha, 1972)	45
II.3.3. Dosage du malondialdéhyde (Wilbur et <i>al.</i> , 1949)	46
II.3.4. Dosage des nitrites (Fermor et <i>al.</i> , 2001).	47
II.3.5. Dosage de protéines (Gornall et <i>al.</i> , 1949).	48
II.4. Analyses statistiques	49
III.1. Résultats	51
III.1.1. Interactions probables avec les protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer	51
III.1.2. Etude <i>in vivo</i>	63
III.1.2.1. Concentration du AlCl ₃ induisant les symptômes de la MA chez la drosophile en fonction de l'âge.	63
III.1.2.2. Concentration non toxique des composés testés	64
III.1.2.3. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la mobilité des drosophiles.....	66
III.1.2.4. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la mémoire à court terme chez les drosophiles.....	67
III.1.3. Effet sur l'activité des enzymes des drosophiles	68
III.1.3.1. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur l'activité de la catalase	68
III.1.3.2. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la quantité de superoxyde dismutase	69
III.1.3.3. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur le taux de nitrites (NO).....	70
III.1.3.4. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la peroxydation lipidique	72
III.1.3.5. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la quantité de protéines totales.....	73
III.2. Discussion.....	74
IV.1. Conclusion	79
IV.2. Perspectives	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	81
ANNEXES	a

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence mondiale de la maladie d'Alzheimer en 2015 (OCDE., 2015).....	5
Figure 2 : Prévalence de la maladie d'Alzheimer et estimation de son évolution jusqu'en 2050. (OMS., 2021)	6
Figure 3 : Causes et risques de la maladie d'Alzheimer (Huat et al., 2019).....	9
Figure 4 : Processus de formation des plaque amyloïde beta golgi (Maitre et al., 2017).....	12
Figure 5 : Processus de formation de l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Maitre et al., 2017)	13
Figure 6 : Physiopathologie de l'aluminium dans la maladie d'Alzheimer (Kawahara, 2005).	20
Figure 7 : L' influence des métaux essentiels dans la maladie d'Alzheimer (Huat et al., 2019).	22
Figure 8 : Structures générales des principales sous classes de flavonoïdes	29
Figure 9 : G. manni au jardin botanique de Limbé au Cameroun. (Garcinia manni, 2023)	31
Figure 11 : Concentration de AlCl ₃ induisant les symptômes de la MA chez les drosophiles en fonction de l'âge.....	64
Figure 12 : Effet des concentrations des composés testés.	65
Figure 13 : Effet de OBIII et DS03 sur la mobilité des drosophiles.....	66
Figure 14 : Effets sur la mémoire à court terme des drosophiles des composés (A) OBIII et (B) DS03.	67
Figure 15 : Effet de OBIII et DS03 sur l'activité de la catalase chez les drosophiles	68
Figure 16 : effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur l'activité de la superoxyde dismutase chez les drosophiles (suite)	70
Figure 17 : Effet du biflavonoïdes OBIII sur le taux de nitrites chez les drosophiles	71
Figure 18 : Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la peroxydation lipidique chez les drosophiles	72
Figure 19 : Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la quantité de protéine totale chez les drosophiles	74

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Quelques test comportementaux avec les drosophiles.....	24
Tableau 2 : Structures sen 2D et 3D des biflavonoïdes testés	33
Tableau 3 : Composition des différents du milieu de culture de chaque groupe.....	39
Tableau 4 : Composition des différents du milieu de culture de chaque groupe.....	39
Tableau 5 : Composition des différents du milieu de culture de chaque groupe durant le test de mobilité des drosophiles.....	41
Tableau 6 : Protocole dosage de la SOD	44
Tableau 7 : Protocole de dosage de la catalase	45
Tableau 8 : Protocole de dosage du MDA	46
Tableau 9 : Protocole de dosage des nitrites.....	47
Tableau 10 : Protocole de dosage des protéines totales.....	49
Tableau 11 : Scores de docking moléculaire et types d'interactions avec la catalase humaine (PDB : 1DGF).....	51
Tableau 12 : Scores de docking moléculaire et types d'interactions avec la SOD humaine (PDB : 2SOD).....	53
Tableau 13 : Scores de docking moléculaire et types d'interactions avec la NO Synthétase (PDB : 2NOS).....	55
Tableau 14 : Scores de docking moléculaire et types d'interactions avec la protéine amyloïde beta humaine (PDB : 1IYT).....	58
Tableau 15 : Scores de docking moléculaire et types d'interactions avec l'acétylcholine estérase (PBD : 4BDS).....	60

LISTES DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ABTS : Acide 2,2'-Azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AChE : Acétylcholinestérase
ACMA : Association Comprendre la Maladie d'Alzheimer,
ADNI : Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative
APOE : Apolipoprotéine E
APP : Protéine Précurseur Amyloïde
A β : Peptide β -amyloïde
BACE1 : Beta-Secretase 1
BHE : Barrière Hématoencéphalique
BSA : Sérum d'Albumine Bovin
CD33 : Cluster de différenciation 33
CD35 : Cluster de différenciation 35
CDNB : 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzène
CDP2AP : endocytose, trafic intracellulaire, apoptose
CLU : Clusterin
COX-2 : Cyclooxygénase-2
DEPPD : N-N-diéthyl-para-phénylènediamine
DNTB : Diméthyl nitrobleu tétrazolium
DPPH : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EPHA1 : Ephrin Type-A Receptor 1
GLUT-1 : Glucose transporter 1
GSH : Gluthation réduit
GSK3 : Glycogène Synthétase Kinase
HCl : Chlorure d'hydrogène
HDL : High-Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
iNOS : Inductible Nitric Oxide Synthase
IRP : Iron Regulatory Protein
JAMA : Journal de l'association Médicale Américaine
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LR11 : Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
MA : Maladie d'Alzheimer
MAO : Monoamine oxydase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MDA : Malondialdéhyde
MS4A : Membrane-Spanning 4-Domains Subfamily A
mTOR : Mechanistic Target of Rapamycin
MVD : Molegro Virtual Docker
NEP : Neprilysine
NFT : Neurofibrillary Tangle
NF-K β : Nuclear Factor Kappa B
NIA : National Institute on Aging
NO : Oxyde Nitrique
PDB : Protéine Data Base
PI : Indice de performance
PI3K : phosphatidyl-inositol 3 kinase
PLP : Potentiel Linéaire Par Morceaux
PSNE1 : Préséniline 1

PSNE2 : Préséniline 2

ROS : Reactive Oxygen Species

SNP : Symptômes Neuropsychiatriques

SOD : Superoxyde Dismutase

TBA : Acide Thiobarbiturique

TBARS : Acide Thiobarbiturique

TCA : Acide Trichloro Acétique

TEP : Tomographie par Emission de Positrons

Tf : Transferrine

TfR : Transferin Receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha

RESUME

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une perte progressive de la mémoire, des fonctions cognitives et de l'autonomie. Les symptômes de la MA incluent : des troubles de la mémoire à court terme, des changements de personnalité et une détérioration progressive des capacités mentales. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé environ 50 millions de personnes dans le monde vivent actuellement avec une forme de démence, et ce nombre devrait atteindre 152 millions d'ici 2050 en raison du vieillissement de la population. Actuellement, les médicaments approuvés pour la prise en charge de la MA comprennent les inhibiteurs de l'acétyl cholinestérase tels que le donépézil, la rivastigmine. Les effets secondaires potentiels de ces médicaments incluent des nausées, des vomissements, de la diarrhée etc. Le but de la présente étude était d'évaluer l'effet curatif des biflavonoïdes extraits des feuilles et tiges de *Garcinia manni* sur les protéines et événements impliqués dans le développement de la MA induite chez la drosophile par le chlorure d'aluminium. Une étude d'amarrage moléculaire a été d'abord effectuée grâce au logiciel *Molegro Virtual Docker* avec les cibles (catalase, SOD, NO synthétase, protéine amyloïde beta et acétylcholine estérase) et les biflavonoïdes (OBIII, OB3B, DS1, DS03 et DR03) ceci a permis de sélectionner les biflavonoïdes OBIII et DS03 à cause de leurs bonnes fixations au site actif des protéines cibles de la maladie. Ensuite, les drosophiles ont été intoxiqués au chlorure d'aluminium aux concentrations 5, 10 et 20 mM. Après sept jours d'observation la concentration de 5mM d' AlCl_3 a induit les symptômes de la MA chez cette mouche et sélectionnée comme dose toxique. Puis, les drosophiles ont été intoxiqués au AlCl_3 à la concentration sélectionnée pendant 3 jours à travers leur alimentation. Après ceci, les mouches ont été traitées aux biflavonoïdes ou baicaline aux concentrations 650 et 6500 μM pendant 4 jours. Comparées aux drosophiles du groupe intoxiqués non traités, les mouches des groupes essais ont présenté une amélioration significative ($p < 0.001$) de la locomotion et de la mémoire à court terme. Enfin, pour étudier l'effet curatif des deux biflavonoïdes, 7 groupes de 50 drosophiles chacun ont été constitués et les biflavonoïdes testés aux concentrations 650 et 6500 μM . Le dosage des marqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation dans les homogénats de tête de drosophiles par spectrophotométrie a montré une baisse significative ($p < 0.001$) de la production du MDA et NO et une augmentation de l'activité des enzymes catalase, superoxyde dismutase dans les groupes traités au biflavonoïdes. Ces observations montrent que les molécules auraient un potentiel thérapeutique dans cette pathologie.

Mots-clés : Maladie d'Alzheimer, *Garcinia manni*, biflavonoïdes, Chlorure d'aluminium, , amarrage moléculaire, drosophiles

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of memory, cognitive functions, and autonomy. The symptoms of AD include short-term memory impairment, personality changes, and gradual deterioration of mental abilities. According to the World Health Organization, approximately 50 million people worldwide currently live with some form of dementia, and this number is projected to reach 152 million by 2050 due to population aging.

Currently, approved medications for the management of AD include acetylcholinesterase inhibitors such as donepezil and rivastigmine. Potential side effects of these drugs include nausea, vomiting, and diarrhea.

The aim of this study was to evaluate the curative effect of biflavonoids extracted from the leaves and stems of *Garcinia manni* on proteins and events involved in the development of AD, induced in *Drosophila* by aluminum chloride. A molecular docking study was first conducted using Molegro Virtual Docker, targeting key enzymes and proteins associated with AD (catalase, superoxide dismutase, nitric oxide synthase, beta-amyloid protein, and acetylcholinesterase) and five biflavonoids (OBIII, OB3B, DS1, DS03, and DR03). OBIII and DS03 were selected due to their strong binding affinity at the active sites of the target proteins. Subsequently, *Drosophila* flies were intoxicated with aluminum chloride at concentrations of 5, 10, and 20 mM. After seven days of observation, the 5 mM dose was found to induce AD-like symptoms and was selected as the toxic dose. The flies were then exposed to aluminum chloride at the selected concentration for three days through their diet. After this, the flies were treated with biflavonoids or baicalin at concentrations of 650 and 6500 μ M for four days. Compared to the untreated intoxicated flies, the treated groups exhibited a significant improvement ($p < 0.001$) in locomotion and short-term memory.

Finally, to study the curative effects of the two biflavonoids, seven groups of 50 flies each were formed, and the biflavonoids were tested at 650 and 6500 μ M concentrations. Spectrophotometric measurement of oxidative stress and inflammation markers in fly head homogenates revealed a significant reduction ($p < 0.001$) in MDA and nitric oxide production and an increase in catalase and superoxide dismutase activity in the biflavonoid-treated groups. These findings suggest that the tested molecules may have therapeutic potential in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, *Garcinia manni* oliv, biflavonoids, Aluminum chloride, Molecular Docking, *Drosophila*

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La MA est une maladie du système nerveux central qui affecte principalement le cortex cérébral en particulier les régions impliquées dans la mémoire, l'apprentissage, la pensée et la planification (**Eratne et al., 2018**). Elle a pour principales caractéristiques neuropathologiques la présence des plaques séniles extracellulaires composées du peptide Amyloïde beta ($A\beta$) et les dégénérescences neurofibrillaires liées à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau au niveau intracellulaire (**Villemagne et al., 2013**). Elle évolue vers une détérioration progressive des capacités intellectuelles (**Lane et al., 2018**). En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 47 millions de personnes dans le monde sont touchées par la démence et 10 millions de nouveaux cas sont dénombrés chaque année. Ce nombre devrait atteindre 82 millions en 2030 et 152 millions d'ici 2050 en absence de traitements efficaces et de diagnostic précoce.

En Afrique la prévalence de la maladie est difficile à estimer avec précision en raison du manque de données fiables et de recherches spécifiques sur le sujet. Cependant, selon L'OMS, la prévalence de la maladie d'Alzheimer et d'autres formes de démence en Afrique subsaharienne était estimée à environ 2,4% (**Preux et al., 2015**). Ces chiffres peuvent varier d'un pays à l'autre en fonction de facteurs tels que l'âge de la population, les habitudes de vie, les facteurs génétiques et l'accès aux soins de santé.

Au Cameroun, en raison du manque de données spécifiques et de recherches approfondies sur ce sujet, la prévalence de la maladie n'est pas clairement établie et on estime que celle-ci serait en nette augmentation en raison du vieillissement de la population et des changements dans les modes de vie. Une étude menée à Douala, a estimé la prévalence de la démence dégénérative à 2,07 % (**Massi et al., 2020**). Bien que cette étude ne se concentre pas exclusivement sur la maladie d'Alzheimer, elle fournit des informations sur les démences en général.

Parmi les modèles animaux existant à l'instar des souris et des rats albinos, les drosophiles, de par leur court cycle de vie, permettent d'observer les effets du vieillissement sur la neurodégénérescence de manière accélérée (**Bouleau et al., 2015**). De plus, elles partagent de nombreux gènes et voies biologiques avec les humains, ce qui en fait un modèle pertinent pour étudier les processus neurodégénératifs (**Fernandez-Funez et al., 2015**). De plus, les radicaux libres sont produits naturellement par le corps, et leur production peut être augmentée par des facteurs tels que le stress, l'exposition aux toxines environnementaux et

l'alimentation (Sebbar et al., 2023). Le stress oxydatif est considéré comme un facteur clé dans le développement de la maladie d'Alzheimer, car il peut endommager les cellules du cerveau et contribuer à la formation de plaques amyloïdes et de dégénérescence neuronale (Bensakhria, 2018).

Le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer implique la formation de plaques amyloïdes et de dégénérescence neurofibrillaire, ainsi que le stress oxydatif, qui contribuent à la perte de neurones et à la détérioration des fonctions cognitives, notamment la mémoire à court terme (Jack et al., 2013). Ces mécanismes interagissent de manière complexe pour conduire à l'apparition et à la progression de la maladie.

La prise en charge actuelle de la maladie d'Alzheimer se concentre sur des traitements médicamenteux (inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, antagonistes des récepteurs du glutamate) et des thérapies non médicamenteuses (thérapie cognitive, occupationnelle). Mais ses traitements a savoir les anticorps monoclonaux comme Aducanumab, les médicaments comme la donepezil etc. présente des limites telles que des effets secondaires, une efficacité limitée et un impact minime sur la progression de la maladie (Lee et al., 2023).

Dans ce contexte, la recherche de nouveaux traitements pour la MA est devenue une priorité pour les chercheurs du monde entier (Leuthold, 2023). Il a été démontré que l'extrait de *Ginkgo biloba* réduisait les problèmes de mémoire dans plusieurs études, tant chez le rat que chez la souris (Xie et Lu, 2022) ; des expériences sur la phagocytose de l'amyloïde β ont montré que les prétraitements par des extrait de *Khaya grandifoliola* peuvent réparer l'activité phagocytaire des cellules de la lignée cellulaire humaine monocytique, qui était altérée après l'activation de l'inflammasome (Owona et al., 2024). Ceci démontre bien, le fort potentiel des plantes médicinales pour le traitement de la MA.

Les biflavonoïdes sont des composés présents dans diverses plantes dont *Garcinia manni* oliv. Ce sont des molécules complexes composées de deux flavonoïdes reliés par une liaison covalente. Les biflavonoïdes, avec leur action multi cible sur l'amyloïde β , la tau, l'inflammation et le stress oxydatif, pourraient offrir une alternative prometteuse en protégeant les neurones, en améliorant la cognition associée à une meilleure tolérance (Thapa et Chi, 2015)

Dans ce travail, nous avons recherché les effets des biflavonoïdes isolés de *Garcinia manni* sur un modèle de la MA induite chez la drosophile par le $AlCl_3$. Pour cela, une approche

intégrée combinant des simulations informatiques et des expériences *in vivo* a été adoptée pour répondre à la question de recherche suivante : Quels sont les effets des biflavonoïdes de *G. manni* Oliv., sur les protéines clés et paramètres comportementaux impliqués dans le développement de la MA ?

Hypothèse de recherche.

L'administration des biflavonoïdes extraits de *Garcinia manni* Oliv., atténue les déficits cognitifs et le stress oxydatif induits par le chlorure d'aluminium chez la drosophile sauvage, suggérant un potentiel neuroprotecteur contre la maladie d'Alzheimer.

Objectif général.

Rechercher les effets des biflavonoïdes de *Garcinia manni* Oliv., Sur un modèle de la maladie d'Alzheimer induite par le chlorure d'aluminium chez la drosophile sauvage.

Objectifs spécifiques.

- ✓ Déterminer les interactions probables entre les biflavonoïdes étudiés avec quelques protéines clés : Catalase, Superoxyde dismutase, protéine amyloïde β , acétylcholine estérase et nitrite synthétase impliqués dans la MA.
- ✓ Déterminer l'effet des biflavonoïdes ayant une forte interaction probable avec les protéines clés sur la mobilité et la mémoire à court terme des drosophiles intoxiquées.
- ✓ Déterminer l'effet de ces biflavonoïdes sur l'activité des enzymes du système antioxydant (CAT, SOD), la peroxydation lipidique et la production de NO chez les drosophiles intoxiquées..

CHAPITRE I :

REVUE DE LA LITTÉRATURE

I. Généralité sur la maladie d'Alzheimer (MA)

I.1. Définition

La MA est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'accumulation pathologiques de peptides β -amyloïdes ($A\beta$) et enchevêtrement neurofibrillaires dans le cerveau, aboutissant à une défaillance cognitive (**Sodhi et Singh, 2013**). Elle est reconnue comme priorité par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Malgré d'importants progrès dans la compréhension de la pathogenèse de la MA et de la façon dont la maladie est conceptualisée depuis qu'Alois Alzheimer a signalé le premier cas en 1907 (Soria Lopez et al., 2019).

La démence c'est-à-dire la déficience cognitive progressive acquise suffisante pour avoir un impact sur les activités de la vie quotidienne est une cause majeure de dépendance, d'invalidité et de mortalité.

I.2. Prévalence

I.2.1. Prévalence mondiale

Actuellement, plus de 55 millions de personnes sont atteintes de démence dans le monde, dont plus de 60 % dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. Chaque année, il y a près de 10 millions de nouveaux cas. Ce chiffre devrait plus que tripler d'ici 2050 à mesure que la population vieillit (**Lane et al., 2018**). Selon les statistiques de l'OMS, 33 millions de personnes dans le monde sont atteintes, donc seulement 8% de personnes en Afrique sont atteintes de la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été observé qu'après l'âge de 65 ans, 6 à 8 % de la population mondiale développe une démence et 4,4 % développe la maladie d'Alzheimer. La figure 1 montre la prévalence mondiale de la MA selon le Bureau des changements climatiques mondiaux (OGCE)

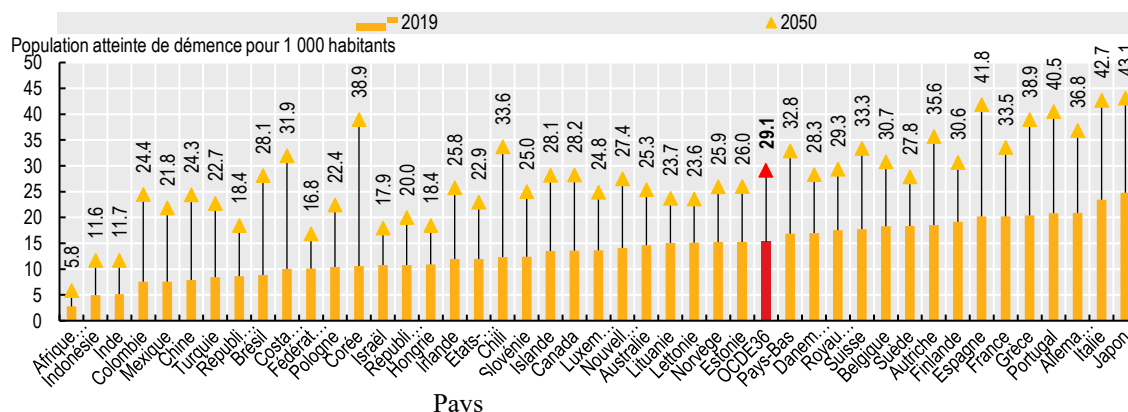


Figure 1 : Prévalence mondiale de la maladie d'Alzheimer en 2015 (OCDE., 2015).

I.2.2 Prévalence en Afrique

Près de 3 millions de personnes sont atteintes de la maladie d'Alzheimer en Afrique. En Afrique sub-saharienne, ce problème commence à émerger. Quelques études menées ont révélé que la prévalence de la démence variait de 2,3 % au Nigeria à 8,8 % en République centrafricaine (**the African Dementia Consortium et al., 2022**). Cependant, les tests et critères utilisés ne sont pas encore standardisés. D'autres études sont nécessaires pour étudier les différences possibles d'incidence entre les zones urbaines et rurales et les facteurs de risque de démence (**Preux et al., 2015**).

La prévalence continentale de la MA par estimation de son évolution jusqu'à l'année 2050 selon l'OMS est représentée par la figure 2 ci-dessous.

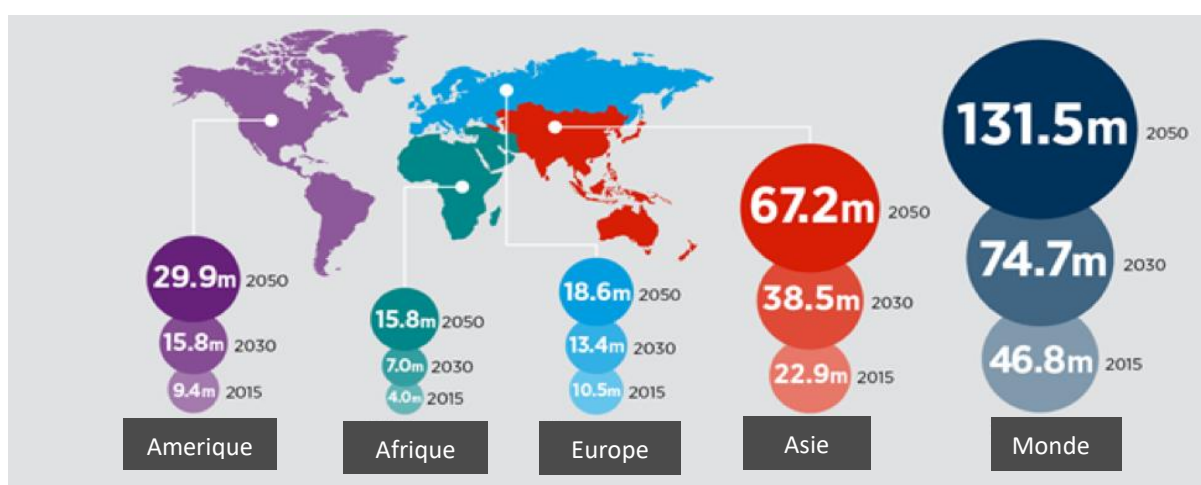


Figure 2 : Prévalence de la maladie d'Alzheimer et estimation de son évolution jusqu'en 2050. (OMS., 2021)

I.2.3. Prévalence au Cameroun

La MA constitue un véritable problème de santé publique au Cameroun. Sur les 9 640 cas étudiés à l'hôpital général de Douala en 2020, la prévalence de la démence était de 2,07 % (n = 200). L'âge moyen des patients était de $66,26 \pm 11,61$ ans. Les étiologies de démence étaient principalement dégénératives (45 %), non dégénératives (34 %) et mixtes (21 %) (**Massi et al., 2020**). L'hôpital général de Douala enregistre au moins un nouveau cas chaque semaine, soulignant l'importance de la sensibilisation et de la recherche dans ce domaine. Bien qu'irréversible, la maladie peut être retardée et contrôlée. La lecture stimule les cellules neuronales, et certains médicaments peuvent ralentir son évolution. Cependant, ces médicaments sont coûteux (**Massi et al., 2020**).

I.3. Types de la maladie d'Alzheimer

Bien que la plupart des MA semblent être sporadiques, des mutations dans trois gènes : la protéine précurseur amyloïde (APP), la préséniline 1 (PSEN1) et la préséniline 2 (PSEN2), contribuent à des formes familiales rares (< 0,5 %) de la maladie d'Alzheimer. Les symptômes commencent plus tôt que la MA sporadique, généralement entre 30 et 50 ans (**Bateman et al., 2011**).

La MA tardive « typique » est probablement due à une interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux.

I.3.1. L'étude des familles possédant un héritage de gènes autosomiques dominants

L'étude de ce type de la maladie a permis d'orienter les recherches sur des gènes considérés comme les principaux facteurs de risque de la MA. Parmi ceux-ci, trois gènes sont essentiels (**Maitre et al., 2017**) :

- Le gène codant pour la protéine précurseur amyloïde (APP) qui est clivée par des enzymes sécrétoires (α , β , λ). La plupart des mutations APP sont situées à proximité des sites de clivage β - et λ -sécrétase. Environ 49 mutations différentes sont connues, impliquant 119 familles. Ces mutations prédominent pour la plupart d'entre elles ;
- Le gène codant pour la préséniline de type 1, qui fait partie du complexe -sécrétase. Les mutations de ce gène expliquent une MA précoce d'environ 50 secondes ;
- Le gène codant pour la préséniline de type 2. La fréquence des mutations de ce gène est beaucoup plus rare. La protéine correspondante est également un composant important du complexe -sécrétase.

I.3.2. L'étude des maladies d'Alzheimer tardive

De nombreuses régions du génome ont été identifiées comme facteurs de risque de MA tardive, la plupart codant pour des protéines impliquées dans trois domaines biologiques individuels (**Maitre et al., 2017**) :

- **Les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol**
- ✓ Le gène de l'apolipoprotéine E (APOE) est le facteur de risque connu le plus ancien et le plus dangereux. L'APOE transporte le cholestérol dans les cellules, et un taux de cholestérol élevé à l'âge adulte constitue un mauvais pronostic pour l'apparition de la MA chez les personnes âgées. Parmi ces protéines APOE, il existe 4 allèles, APOE4 est de mauvais pronostic tandis que posséder l'allèle APOE2 est tout à fait bénéfique. Ces protéines APOE sont impliquées dans le métabolisme A, la formation de plaques amyloïdes ainsi que le transport et l'élimination des peptides A. Mais aussi dans le transport du

cholestérol et des lipides, dans la neurogenèse et l'activité synaptique. L'APOE4 peut ralentir la clairance des peptides amyloïdes du cerveau.

- ✓ Le gène du membre 7 de la sous-famille A des transporteurs ABCA7 (ATP-Binding Cassette 7) participe au transport des particules HDL du métabolisme du cholestérol et à la synthèse des phospholipides. Sa mutation semble serrée liée à l'apparition de la MA. Chez les souris dépourvues d'ABCA7, les peptides amyloïdes s'accumulent dans le cerveau. La clusterine (CLU) est également un gène présentant un polymorphisme significativement associé au risque de MA. C'est une apolipoprotéine jouant un rôle dans le transport des lipides, l'apoptose et la protection membranaire. La protéine clusterine est augmentée dans le liquide céphalo-rachidien des personnes atteintes de la maladie et est présente dans la plaque amyloïde.
- ✓ Le gène de la *Lipid Raft 11*(LR11) participe au transport intracellulaire et à la protéolyse de l'APP, réduisant la teneur en peptide amyloïde ;

➤ **Gènes impliqués dans la réponse immunitaire**

La famille de gènes sous-famille A de la protéine à 4 domaines transmembranaires (MS4A) code pour des protéines comportant quatre domaines transmembranaires. Certains allèles de cette famille de gènes modifient les conditions de synthèse affectant les niveaux de phosphorylation et d'apoptose de tau. Les protéines de cette famille interfèrent avec le mouvement intracellulaire du Ca²⁺ (Maitre et al., 2017).

- ✓ Le gène de la Cluster de différenciation 35 (CD35) est un récepteur transmembranaire qui favorise la phagocytose des complexes immuns et a des effets neuroprotecteurs dans la MA.

➤ **Les gènes impliqués dans le transport vésiculaire et intracellulaire.**

La plupart de ces gènes sont impliqués dans le transport intracellulaire de l'APP. Parmi ses gènes nous avons le BIN1 responsable du transport intracellulaire des vésicules), PICALM responsable d'endocytose et du trafic intracellulaire, EPHA1 impliqué dans la formation des synapses et CDP2AP qui joue un rôle dans l'endocytose, le trafic intracellulaire et l'apoptose.

I.4. Causes probables

On pense maintenant qu'environ 70 % du risque de MA est attribuable à des facteurs génétiques (Lane et al., 2018). Certaines études d'association à l'échelle du génome utilisant des milliers d'échantillons ont identifié plus de 20 facteurs de risque génétiques, y compris les voies inflammatoires, le métabolisme du cholestérol et les voies de recyclage des vésicules endosomales (Karch & Goate, 2015). Ces gènes à risque relativement courants ajoutent chacun

peu de risque, mais lorsqu'ils sont combinés dans un score de risque polygénique, ils doublent presque la probabilité de prédire un cas de MA (Escott-Price et al., 2015). En particulier, l'activation microgliale en réponse au dépôt d'amyloïde est maintenant reconnue comme jouant un rôle clé dans la pathogenèse de la MA.

La figure 3 montre les différentes causes d'apparition de la MA notamment les facteurs de risque de développement de la MA (figure 3a) et celle de la formation des enchevêtrements neurofibrillaires et plaques amyloïdes (figure 3b).

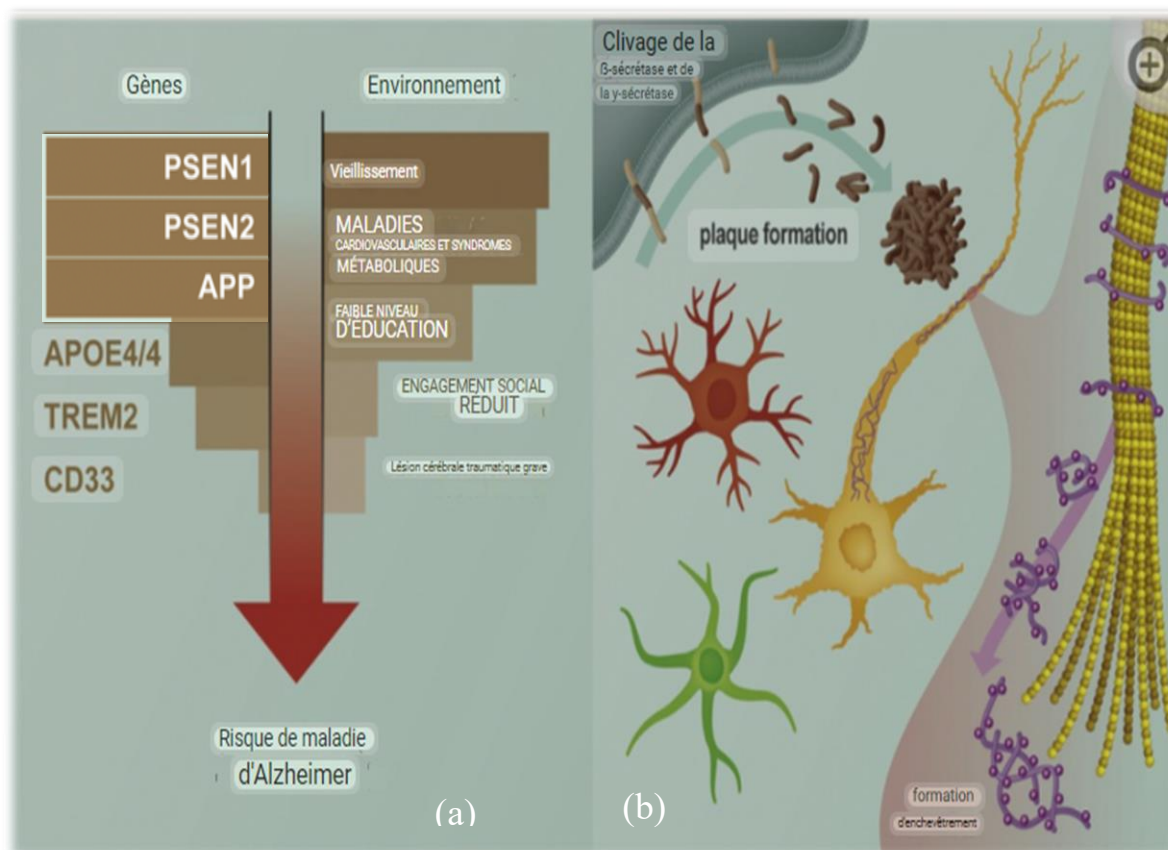


Figure 3 : Causes et risques de la maladie d'Alzheimer (Huat et al., 2019).

La figure 3 a montre que des mutations rares dans les gènes APP, PSEN1 et PSEN2 modifient le traitement de l'APP et sont reconnues comme des causes génétiques puissantes de la MA. D'autres mutations génétiques associées au métabolisme lipidique, à l'endocytose et aux réponses inflammatoires, notamment APOE, TREM2 et CD33, sont répandues dans la population, mais elles sont associées à un risque modéré à faible de MA. Les facteurs de risque environnementaux de la MA comprennent l'âge avancé, les troubles cardiaques et métaboliques (tels que le diabète et l'hypertension), le niveau d'éducation, la diminution de l'engagement social et les traumatismes crâniens graves.

La figure 3b nous montre que la MA se caractérise par la formation de plaques Aβ et

d'enchevêtrement neurofibrillaire (NFTs) dans le cerveau. La production d'A β résulte d'un défaut dans le traitement de l'APP, qui est clivé par les β - et γ -sécrétases plutôt que par l' α -sécrétase. Les peptides A β sont sujets à un mauvais repliement et à une agrégation, conduisant finalement à l'oligomérisation et à la formation de plaques A β , déclenchant des réponses pro-inflammatoires de la microglie et des astrocytes. A β provoque également une hyperphosphorylation de la protéine tau, entraînant sa dissociation des microtubules et provoquant finalement une déstabilisation au sein des neurones. De plus, la protéine tau hyperphosphorylée a tendance à s'agréger pour former des NFTs, ce qui est corrélé à la perte neuronale et à la neurodégénérescence.

I.5. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Les plaques amyloïdes sont des accumulations extracellulaires composées principalement d'A β mal replié de 40 ou 42 acides aminés (A β 40 et A β 42), deux sous-produits du métabolisme de l'APP. L'A β 42 est plus répandu que l'A β 40 en raison de son taux élevé de fibrose et de son insolubilité de la plaque. Le dépôt amyloïde ne suit pas toujours des schémas stéréotypés, mais se développe globalement dans l'isocortex et affecte les structures sous-corticales tardivement. Contrairement aux NFT, les plaques amyloïdes ont moins d'impact sur le cortex entorhinal et la formation de l'hippocampe (**Serrano-Pozo et al., 2011**). Les enchevêtrements neurofibrillaires sont principalement composés de filaments hélicoïdaux appariés constitués de tau hyperphosphorylé.

La pathologie Tau débute typiquement dans l'allocortex du lobe temporal médial (cortex entorhinal et hippocampe) avant de se propager à l'isocortex associatif. Les aires sensorielles, motrices et visuelles primaires ont tendance à être relativement épargnées. La perte de neurones et de synapses est généralement parallèle à la formation d'enchevêtrements et, à ce titre, les caractéristiques cliniques et la gravité de la MA sont mieux corrélées à la pathologie NFT (**Serrano-Pozo et al., 2011**). La principale théorie de la pathogenèse de la MA, l'hypothèse amyloïde, stipule que l'accumulation de formes pathologiques d'A β produites par le clivage séquentiel de l'APP par les enzymes β - et γ -sécrétase dans le cerveau entraîne une inadéquation entre la production d'A β est un processus pathologique majeur entraîné par l'équilibre et la clairance de l'A β . On pense que la formation de NFT et le dysfonctionnement neuronal et la neurodégénérescence qui en résultent sont des processus en aval, éventuellement médiés par l'inflammation (**Hardy et Selkoe, 2002**).

Bien que l'accumulation d'A β soit nécessaire pour un diagnostic de MA, le fait qu'une proportion significative de personnes âgées meurent avec des signes de dépôt significatif de β -

amyloïde sans symptômes montre qu'elle n'est pas suffisante pour la démence encore moins les mutations de protéines tau seule ne sont pas aussi suffisante pour provoquer la MA car, bien qu'il existe des données considérables suggérant que la β -amyloïde est en amont de la pathologie tau dans la MA, certaines personnes âgées en bonne santé présentent des signes de pathologie tau sans β -amyloïde qui peuvent faire partie du processus de vieillissement normal ou refléter une voie neurodégénérative non AD (Lane et *al.*, 2018).

La figure 4 ci-dessous nous montre le processus de formation des plaques amyloïdes beta dans l'appareil de golgi

Deux processus cohabitent : La voie amyloïde conduit à la formation du peptide A β et la voie non amyloïde empêche la synthèse de ces peptides.

L'activité de la β -sécrétase initie la synthèse A β en éliminant la région extracellulaire de l'APP (APP) et induit la production du fragment C-terminal de l'APP (CTF : L'extrémité C ou C99) est clivée par la -sécrétase dans la membrane cellulaire.

Un fragment A β est libéré et peut être éliminé par transport vers le liquide céphalo-rachidien ou le sang, ou par protéolyse par des protéases telles que la néprilysine (NEP).

Dans les cas pathologiques, le fragment A β s'accumule de manière extracellulaire et peut s'agréger en « plaques amyloïdes ou plaques sénescents ». Dans le cas de la voie non amyloïde, la protéine APP est clivée à mi-chemin, libérant le fragment APP et le fragment C-terminal P3 suite à l'action de la β -sécrétase.

De façon générale, le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) est libéré dans le cytoplasme pour une fonction régulatrice au niveau transcriptionnel nucléaire. L'APP joue un rôle dans le guidage des axones et la différenciation neuronale. Il est dégradé par endocytose et digestion dans les lysosomes. Il circule dans le réticulum endoplasmique et trans-golgi (Maitre et *al.*, 2017).

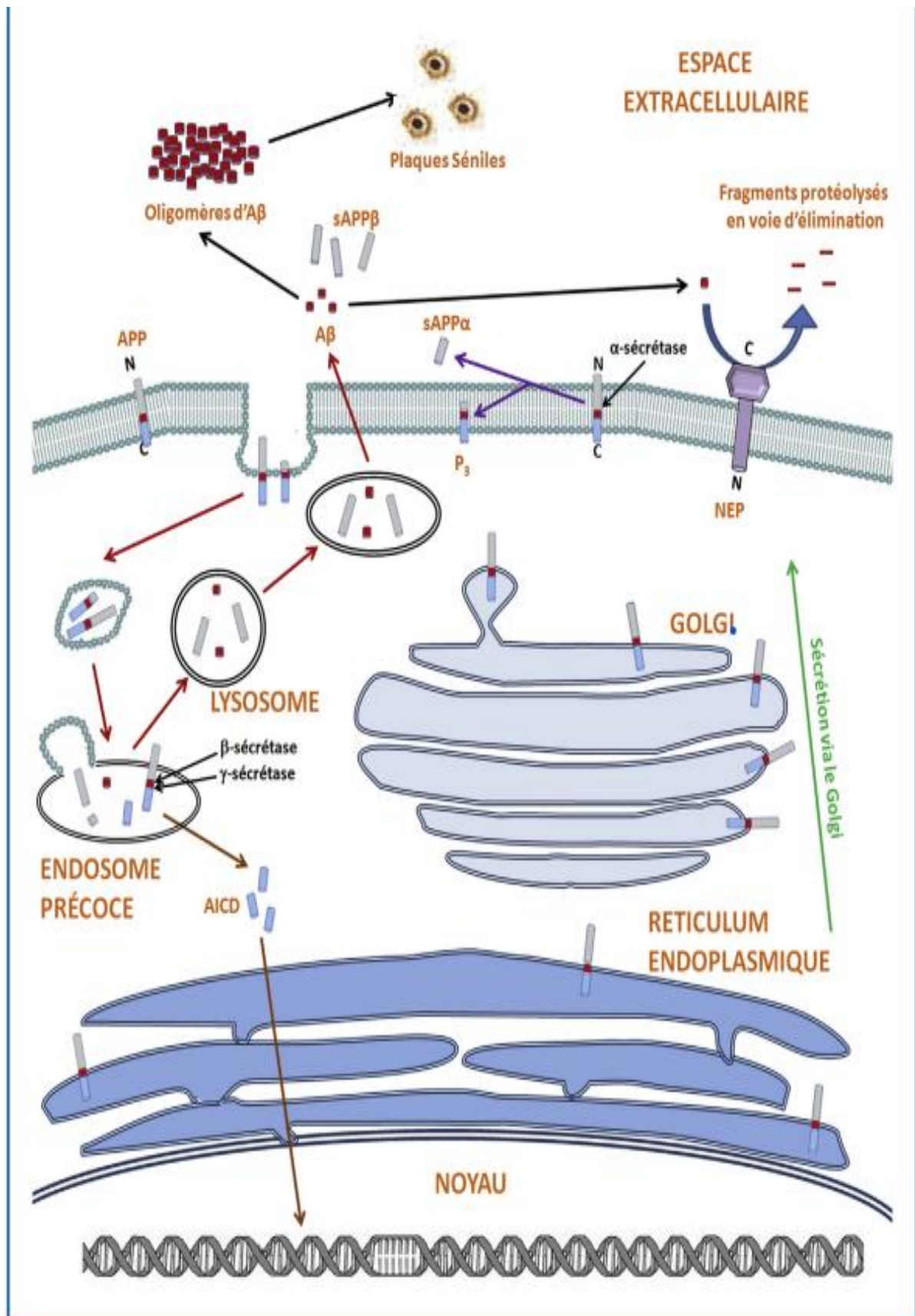


Figure 4 : Processus de formation des plaque amyloïde beta golgi (Maitre et al., 2017).

La figure 5 ci-dessous décrit la phosphorylation de la protéine Tau et les anomalies du transport axonal.

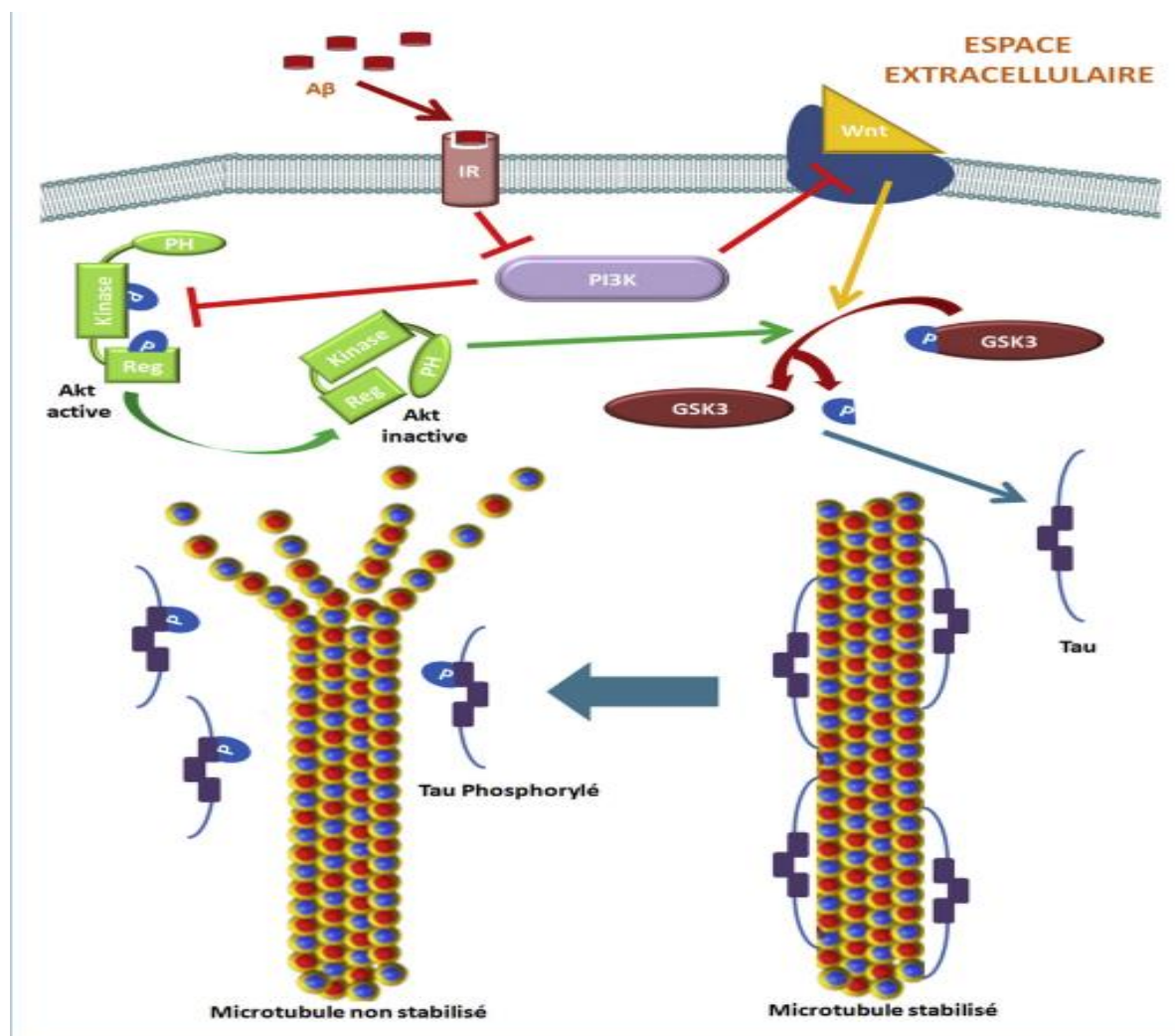


Figure 5 : Processus de formation de l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Maitre et al., 2017)

L'accumulation du peptide Aβ dans le cerveau est considérée comme le déclencheur de l'hyperphosphorylation de la protéine tau, cette protéine est associée aux microtubules et est nécessaire au transport axonal.

La liaison de Aβ aux récepteurs membranaires (tels que l'insuline) inhibe l'activité de l'Akt (protéine kinase B essentielle à la survie cellulaire) et de la Wnt/caténine qui contrôle la réplication cellulaire, via l'inhibition de la PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase).

La déphosphorylation de la GSK3 (glycogène synthétase kinase) conduit à une hyperphosphorylation de la protéine tau avec le dépôt d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires (NFT). Le cytosquelette est altéré par l'arrêt du transport axonal et la mort cellulaire (Maitre et al., 2017).

I.6. Diagnostique, symptômes, conséquences et avancées de la recherche sur la maladie d'Alzheimer

I.6.1. Diagnostique et stratégies de détections précoces.

Le seul moyen définitif de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer consiste à effectuer une autopsie cérébrale du tissu cérébral d'un patient afin de déterminer si la personne est atteinte de la maladie d'Alzheimer ou d'une autre forme de démence. Cependant, ces méthodes ne sont pas pratiques, de sorte que les médecins utilisent des tests qui examinent les capacités mentales d'un patient pour diagnostiquer et en déduire l'état. (Khan et al., 2020).

La démence comprend la perte de mémoire et des difficultés de réflexion, de langage et de résolution de problèmes etc. Comme stratégie de détection précoce de la maladie d'Alzheimer nous avons la détection des biomarqueurs tels que les plaques séniles et l'accumulation des protéines tau (Lashley et al., 2018).

I.6.2. Symptômes

Les symptômes neuropsychiatriques (SNP), tels que la dépression, l'apathie, l'agressivité et la psychose, sont désormais reconnus comme des caractéristiques centrales de la MA, avec des symptômes plus graves associés à un déclin cognitif plus rapide, à l'indépendance. On ne sait pas si ces symptômes résultent des mêmes processus pathogéniques responsables du déclin cognitif ou ont des étiologies uniques non liées à la neurodégénérescence associée à la MA. De nombreuses caractéristiques structurelles et métaboliques du cerveau de malades de MA sont associées à un seul symptôme ou groupe de symptômes neuropsychiatriques. De plus, un certain nombre de gènes ont été identifiés et confirmés et, dans certains cas, sont associés à un risque de symptômes. Cependant, bien qu'aucun gène ne soit fortement prédictif des syndromes neuropsychiatriques individuels, les altérations cérébrales fonctionnelles et structurelles spécifiques à des conditions spécifiques reflètent la variabilité de la progression du même processus pathologique (Li et al., 2014).

I.6.3. Conséquences de la maladie d'Alzheimer

Comme possible conséquences nous avons la possibilité que la barrière hématoencéphalique (BHE) présente des fuites, c'est-à-dire qu'elle n'empêche pas l'entrée incontrôlée dans le cerveau de protéines sanguines et d'autres molécules. Il s'agit clairement d'une question importante car une perturbation, même de nature transitoire ou localisée, pourrait avoir des conséquences dévastatrices sur la fonction cérébrale, induisant une cascade d'événements impliquant la neurotoxicité, la neuroinflammation et le stress oxydatif qui pourraient éventuellement produire la MA (Erickson et Banks, 2013).

La diminution de l'expression de GLUT-1 dans la BHE chez les patients atteints de la MA, soulève la question de savoir si cela est dû à une diminution de la demande par un cerveau dysfonctionnel ou si le cerveau est dysfonctionnel dans la MA parce que la BHE ne délivre pas des quantités adéquates de glucose, affamant essentiellement le cerveau (**Erickson et Banks, 2013**).

En plus de causer de la détresse et de l'incapacité à l'individu, les troubles neuropsychiatriques sont également extrêmement coûteux pour la société et les gouvernements. Ces troubles sont à la fois courants et débilatants et ont un impact sur la cognition, la fonctionnalité et le bien-être (**Sahakian et al., 2015**). Parlant de l'impact sur le plan économique il s'avère qu'un examen des études de données sur les coûts basés sur l'incidence et la prévalence indique que le coût annuel des soins formels et informels pour chaque patient atteint de MA peut atteindre 28 200 000 FCFA. Les coûts annuels totaux associés aux personnes atteintes de tous les types de démence sont d'environ 20 milliards de dollars en coûts directs et de 38 milliards de dollars en soins informels. Il est conclu que les programmes de financement publics dans leur forme actuelle, comme les polices d'assurance privées, laissent de nombreuses lacunes dans la couverture des prestations pour les personnes atteintes de la MA (**Max, 1993**).

I.6.4. Avancées de la recherche sur la maladie d'Alzheimer

L'avancée de la recherche actuelle sur la détection de la MA est centrée sur la neuroimagerie, "Initiative de neuroimagerie de la maladie d'Alzheimer (ADNI) est une étude longitudinale multicentrique en cours conçue pour développer des biomarqueurs cliniques, d'imagerie, génétiques et biochimiques pour la détection précoce et le suivi de la MA (**Weiner et al., 2015**). Les critères de l'Institut national sur le vieillissement (NIA) et de l'Association contre l'Alzheimer (*Alzheimer's Association*) pour la MA préclinique sont conçus comme ayant 3 stades. Les individus au stade 1 ont des preuves de biomarqueurs (Amyloïde β -plaques et des déficits synaptiques) qui peuvent être démontrées par imagerie amyloïdes par tomographie par émission de positrons (TEP), au stade 2 en plus des biomarqueurs cités plus haut nous avons la présence de protéines tau, au stade 3 quant à lui nous observons comme marqueurs supplémentaire les enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) et des pertes neuronales. (**Tan et al., 2014**).

Sur la base des informations actuellement disponibles, la MA est mieux conceptualisée comme un continuum biologique et clinique couvrant à la fois les phases précliniques

(individus cliniquement asymptomatiques présentant des signes de pathologie de la MA) et cliniques (symptomatiques) de la MA (**Aisen et al., 2017**).

I.6.5. Médicaments disponibles

Plusieurs anticorps monoclonaux ciblant les dépôts amyloïdes ou peptidiques sont testés comme facteurs préventifs (solanezumab, gantenerumab, crenezumab). D'autres médicaments cibles plutôt l'acétylcholine estérase en inhibant son activité, nous avons parmi tant d'autres : la Memantine et la Donepezil.

Actuellement, seul les médicament inhibiteurs de dégradation de l'acétylcholine (inhibiteurs de l'acétylcholine estérase) ou les antagonistes des récepteurs ionotropes du glutamate de type NMDA sont approuvés pour « traiter » la MA (**Maitre et al., 2017**). Quant à l'acétylcholine, ce neurotransmetteur est fortement impliqué dans les mécanismes de mémoire et d'apprentissage et certaines études ont montré une diminution des niveaux de ce neurotransmetteur dans le cerveau atteint de MA. En inhibant sa dégradation, on produit une augmentation de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau. Parmi les antagonistes des récepteurs NMDA, la mémantine est le plus largement utilisé. C'est un antagoniste partiel qui protège les vaisseaux sanguins et les cellules cérébrales en réduisant la neurotoxicité du glutamate et en protégeant le récepteur NMDA, largement impliqué dans la formation de traces mnésiques au niveau cellulaire. Ces deux classes de substances ne produisent que des effets bénéfiques modestes, qui dépendent largement du stade de la maladie et de la sensibilité de chaque patient au traitement. Différents objectifs de traitement sont encore en développement et font l'objet d'essais cliniques à différents stades ou sont encore dans un état de recherche passionnante mais non exhaustive (**Maitre et al., 2017**).

La recherche d'un nouveau médicament pour la maladie d'Alzheimer (MA) est un processus complexe. Les essais cliniques évaluant et les thérapies centrées sur la pathologie amyloïde (les anticorps monoclonaux et inhibiteurs de β -sécrétase principalement) sont jusqu'à présent négatifs à l'exception de l'annonce récente faite en octobre 2019 concernant l'efficacité clinique de l'**aducanumab** dans un essai clinique de phase III (étude EMERGE) (**Delrieu & Vellas, 2020**).

Les principaux traitements en cours d'évaluation dans des essais cliniques qui ciblent la pathologie amyloïde sont des anticorps monoclonaux anti-amyloïdes, des vaccins anti-amyloïdes, et des inhibiteurs de β -sécrétase (**Delrieu et Vellas, 2020**). Les médicaments qui ciblent la neurotransmission cholinergique ou glutamatergique sont actuellement des traitements disponibles pour la MA.

La recherche de molécules telles que les flavonoïdes purs (par exemple, la quercétine, la gentsine, l'hespéridine, l'épigallocatechine-3-gallate) ou des extraits enrichis peut réduire l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1 β et COX-2), régule à la baisse les marqueurs inflammatoires et prévenir les dommages neuraux. Cette activité anti-inflammatoire est principalement liée à la régulation des cellules microgliales, médiée par leurs effets sur les voies de signalisation MAPK et NF- κ B, comme le démontrent les données *in vivo* et *in vitro* (Spagnuolo et al., 2018a).

Parlant de la prévention la maladie d'Alzheimer il a été découvert que certaines vitamines sont conseillées pour prévenir la MA. C'est le cas par exemple des vitamines E et C. Selon deux études publiées en 2002 dans le Journal de l'Association Médicale Américaine (JAMA), leurs propriétés anti oxydantes favoriseraient la prévention de cette maladie. L'apport conseillé en vitamine E est de 12 mg par jour, et pour la vitamine C de 110 mg par jour. Les aliments riches en vitamine E sont : les huiles végétales, les céréales, les fruits secs (noix, amandes, etc.), la patate douce, les mangues. - Les aliments riches en vitamine C sont : cassis, poivron, citron, chou-fleur, melon, orange...Jouer aux échecs, aux dames, faire des mots croisés, des sudokus ou encore lire de nouveaux genres littéraires stimulerait le cerveau et la mémoire, et diminuerait ainsi le risque de développer la maladie d'Alzheimer. C'est ce qui a été démontré par le Dr Robert Wilson de l'université Rush à Chicago. Faire de l'activité physique au moins trois fois par semaine.

Rester socialement actif, voir régulièrement ses amis, ses voisins et les membres de sa famille préviendrait la survenue de la maladie d'Alzheimer. C'est ce qui a été avancé par les chercheurs du centre médical de l'université Rush de Chicago. La méditation pourrait protéger les seniors des démences comme la maladie d'Alzheimer. Cette piste, étudiée à travers le programme de recherche européen *Medit-Ageing*, semble prometteuse. Une étude sud-coréenne, publiée dans iScience en 2022, met en évidence que manger moins de 3 repas par jour aiderait à se protéger de la maladie d'Alzheimer (Muñoz Fernández et Lima Ribeiro, 2018).

I.7. Modèles de la MA au laboratoire

➤ Modèles transgéniques

Les Souris transgéniques à mutation génétique sont les modèles les plus utilisés (Dhenain & Hantraye, 2008). Les souris transgéniques qui surproduisent de l'APP mutante développent une pathologie similaire à celle trouvée dans le cerveau humain ; Il est important de noter que l'accumulation d'A β dans les plaques extracellulaires se produit et dépend de

l'âge. Autrement dit, malgré une production continue d'A β , ces plaques n'apparaissent qu'à mi-maturité ou tardivement chez la majorité de ces animaux. Notamment, la formation de plaques est accélérée lorsque l'A β 42 plus long est préférentiellement clivé de l'APP, car ce peptide est plus sujet à l'agglomération que l'A β 40 et entraîne des troubles cognitifs plus précoces et plus graves (LaFerla et Green, 2012).

Les rats transgéniques sont aussi utilisés comme modèle dans la MA, à l'instar du modèle de rat transgénique "Tg2576" (Alkandari et al., 2023; Yang et al., 2022 ; Rorabaugh et al., 2017.)

➤ **Modèles induits par les toxiques**

Les modèles animaux induits par des toxiques constituent une approche importante dans la recherche contre la maladie d'Alzheimer (MA). En exposant des animaux à des agents neurotoxiques spécifiques, les chercheurs peuvent reproduire certains aspects de la maladie et étudier les mécanismes sous-jacents.

Les souris sont un modèle animal largement utilisé dans la recherche sur la MA. Des études ont montré que les souris exposées à des agents neurotoxiques tels que l'aluminium (Cai et al., 2022) présentent des déficits cognitifs, des accumulations de plaques amyloïdes et une perte neuronale, reflétant les caractéristiques clés de la MA.

De même, les rats sont utilisés dans des études sur la MA induite par des toxiques. Les rats exposés à l'aluminium (Hawash et al., 2023), par exemple, montrent des altérations du comportement, des changements dans l'activité neuronale et des anomalies dans la plasticité synaptique.

Les drosophiles, des mouches à vinaigre, offrent un modèle animal alternatif pour l'étude de la MA. Ce modèle est considéré comme avantageux en raison de sa simplicité de culture, de son cycle de vie court et de son coût relativement faible (Kawahara, 2005; Ogunsuyi et al., 2023).

Culture des drosophiles en laboratoire

Les mouches sont cultivées à 25 ° C (24 ± 1) sur un régime standard de drosophile contenant de l'agar, de la semoule de maïs, du sucre et de la levure (Rahul et al., 2020).

Avantages d'utilisation des drosophiles

Les avantages d'utiliser les drosophiles au laboratoire sont multiples :

- Les mouches des fruits sont faciles et pas chère à garder ;
- Une génération de mouches de fruits prend environ 10 jours ;

- Son génome est de moindre redondance ;
- Pratiquement tous les gènes de drosophile sont acceptables aux manipulations ciblées, idéales pour faire de la génétique inverse ;
- Manipulations expérimentales et observations de cellules et de tissus *in vivo* ont relativement faciles ;
- Les vastes connaissances en biologie acquises sur les drosophiles, sont non seulement extrêmement importantes pour la recherche, mais offre également des opportunités uniques pour l'enseignement.

II. Aluminium et maladie d'Alzheimer

II.1. Définition

Le composé d'aluminium est une neurotoxine bien connue, et il a une grande affinité avec la biomembrane et la capacité de promouvoir la formation et l'agrégation d'A β insoluble. L'aluminium peut se lier à différentes protéines de liaison aux métaux telles que le calcium, le fer, le cuivre et le zinc qui influence donc l'homéostasie des autres métaux. L'aluminium peut exercer sa neurotoxicité via les radicaux libres dommages issus de la production et de la peroxydation des lipides et des protéines. L'exposition chronique à l'aluminium a une grande affinité avec la biomembrane et la capacité de favoriser la formation et l'agrégation de plaques A β insolubles et (NFT) dans la maladie d'Alzheimer cerveau (Balgoon et al., 2015).

II.2. Interaction entre l'aluminium et la maladie d'Alzheimer

Des métaux neurotoxiques ont été suggérés comme candidats environnementaux pour l'étiopathogénie de la MA. De nombreuses personnes consomment régulièrement des sels d'aluminium comme additif aux aliments transformés traités à l'aluminium et à l'eau potable. En raison des propriétés physiques similaires de l'aluminium et des ions ferriques, l'aluminium utilise des mécanismes conçus pour permettre au fer de pénétrer, de s'accumuler et d'endommager les neurones vulnérables impliqués dans la progression de la maladie d'Alzheimer neurofibrillaire (Walton, 2013).

La figure 6 ci-dessous nous montre la physiopathologie de l'aluminium dans la possible survenue de la MA. L'Al se lie aux IRP et affecte l'expression de l'A β PP et de la ferritine. Une expression aberrante de l'A β PP entraîne une augmentation de l'abondance de l'A β . L'A β normalement sécrété est dégradé par diverses protéases. Cependant, L'A β agrégé en présence d'oligo-métaux tels que L'Al, le Zn, le Fe et le Cu peut être résistant aux protéases et s'accumuler dans le cerveau. L'A β agrégé s'incorpore facilement dans les membranes,

conduisant à la formation de canaux ioniques. Un afflux anormal de calcium via les canaux amyloïdes provoque la phosphorylation des protéines tau, la dégradation des facteurs neurotrophiques tels que le BDNF et la formation de radicaux libres, conduisant finalement à la mort neuronale. Al participe à ces voies neurodégénératives en inhibant l'augmentation des taux de calcium intracellulaire par le BDNF, en accélérant la phosphorylation de la protéine Tau et en stimulant la peroxydation lipidique par le fer. D'autre part, une expression aberrante de ferritine provoque des modifications de la concentration en ions fer libres, entraînant des dommages oxydatifs et une peroxydation des lipides membranaires. Ces événements conduisent finalement à la mort des neurones. Divers facteurs génétiques et environnementaux peuvent contribuer à ces voies de signalisation. L'aluminium et d'autres métaux sont impliqués dans diverses étapes de ces processus dégénératifs et pourraient à terme être liés au développement de la maladie d'Alzheimer (Kawahara, 2005).

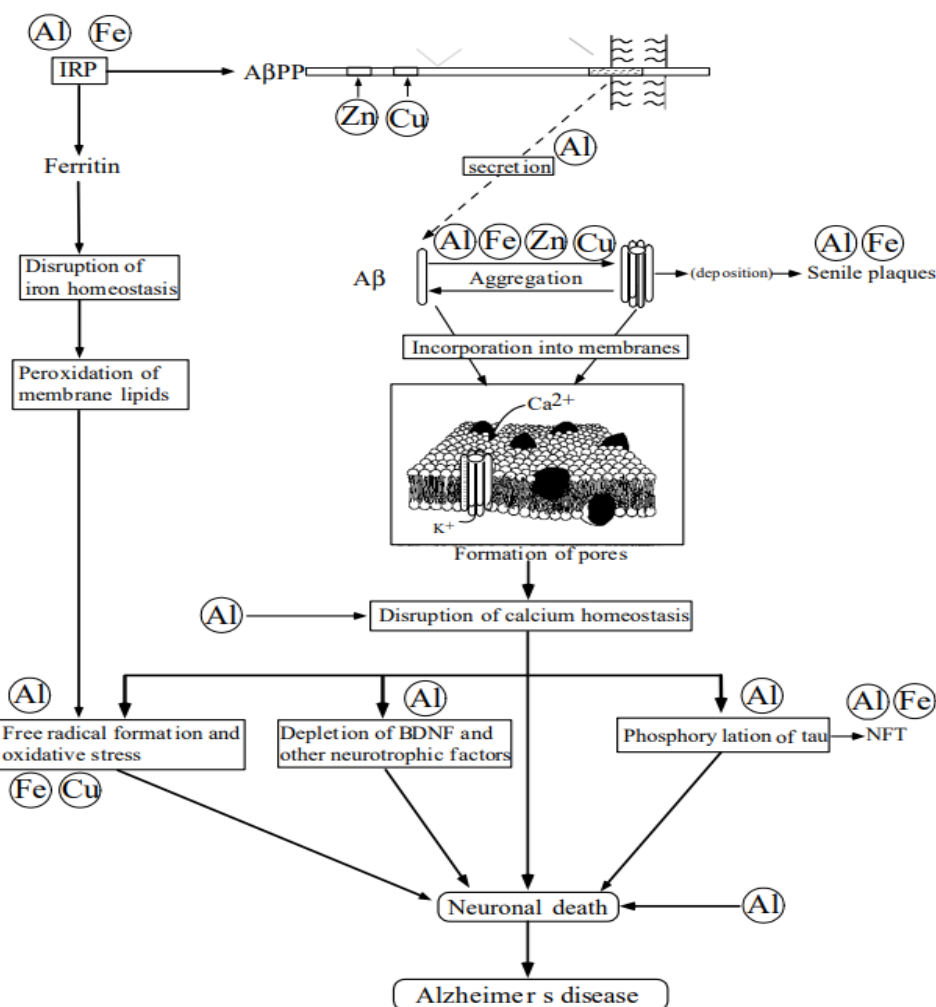


Figure 6 : Physiopathologie de l'aluminium dans la maladie d'Alzheimer (Kawahara, 2005).

II.3. Physiopathologie de l'aluminium dans le cerveau

Bien que le mécanisme par lequel l'Al pénètre dans le cerveau ne soit pas entièrement compris, ce processus semble être contrôlé par deux mécanismes différents. Premièrement, Al peut pénétrer dans le cerveau par le sang. En effet, on sait depuis plus de 25 ans que la transferrine peut médier le transport de l'Al à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) via l'endocytose médiée par le récepteur de la transferrine (TfR) de l'Al-transferrine (**Bondy, 2016; Yokel et McNamara, 2001**). Cependant, il existe également des preuves qu'il pourrait exister un deuxième mécanisme qui transporte le citrate d'Al à travers la barrière hémato-encéphalique jusqu'au cerveau indépendamment de la transferrine. En effet, la concentration de transferrine dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et éventuellement dans le liquide extracellulaire du cerveau est très faible, alors que la concentration de citrate dans le LCR est plus élevée que dans le plasma et le citrate majeur d'Al est préféré comme espèce Al. Liquide extracellulaire cérébral (**Yokel et McNamara, 2001**). Bien que la majeure partie de l'aluminium soit rapidement éliminée dans le cerveau, plusieurs études expérimentales ont montré que sa demi-vie est d'environ 150 jours chez le rat (**Yokel et McNamara, 2001**). Au pH physiologique, Al est dans l'état d'oxydation trivalent (c'est-à-dire Al^{3+}), important pour déterminer les propriétés physicochimiques et les interactions biologiques du métal d'origine. Le principal mécanisme de toxicité de l'Al implique la perturbation de l'homéostasie de métaux tels que le Mg, le calcium (Ca) et le Fe (**Harris et al., 1996; Yokel et McNamara, 2001**).

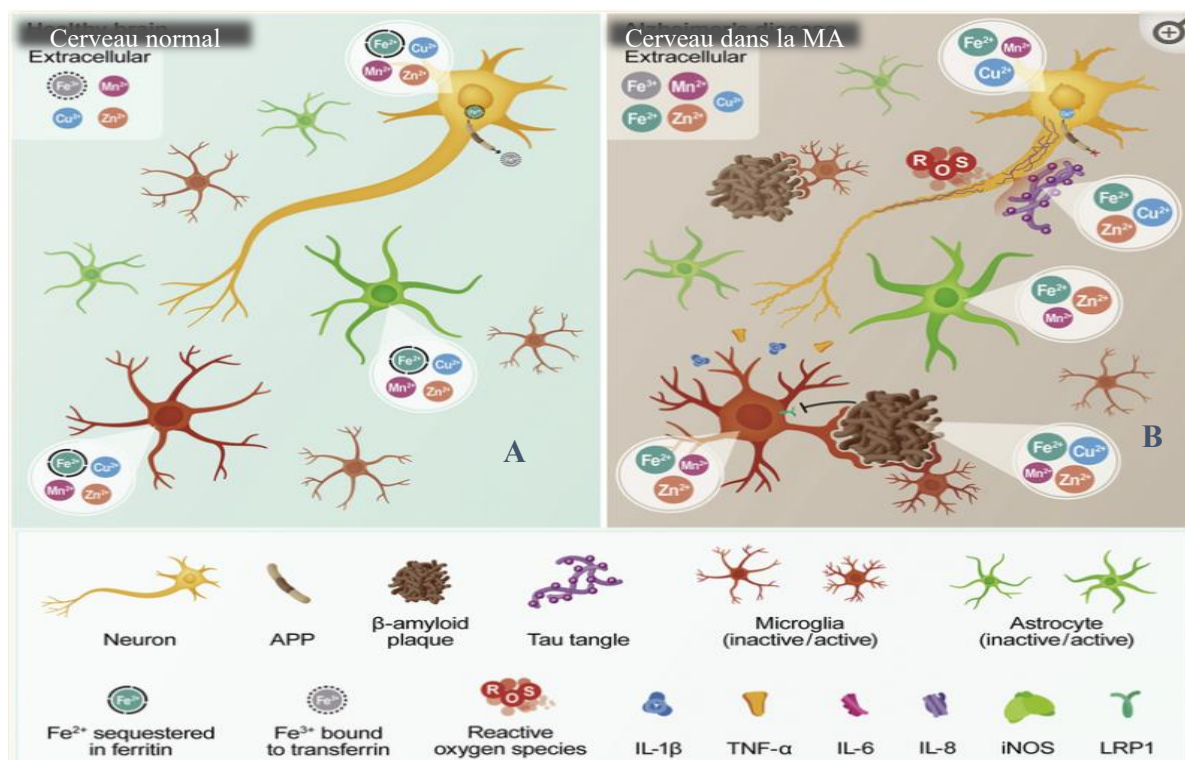


Figure 7 : L' influence des métaux essentiels dans la maladie d'Alzheimer (Huat et al., 2019).

Figure c

Dans un cerveau sain (Figure 7A), les métaux essentiels tels que le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse sont maintenus à des niveaux homéostatiques pour assurer une fonction cellulaire optimale. La réalisation de ces conditions nécessite des mécanismes complexes qui contrôlent étroitement les concentrations intracellulaires et extracellulaires. Par exemple, le fer (Fe^{2+}) est stocké dans la cellule en se liant à la ferritine, une protéine de stockage du fer, ce qui le rend disponible pour une utilisation selon les besoins de la cellule. Dans les neurones, l'APP oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} , induisant ainsi sa libération dans la matrice extracellulaire. À l'extérieur de la cellule, le Fe^{3+} se lie rapidement à la transferrine, une protéine mobilisant le fer, rendant le fer disponible pour d'autres processus biologiques. L'APP participe également à la conversion du Cu^{2+} en Cu^{+} et facilite son excrétion du cerveau. Il contient également des traces de zinc et de manganèse, qui sont finement régulées et essentielles au maintien des fonctions cérébrales.

Dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer (Figure 7B), des anomalies essentielles de l'homéostasie des métaux semblent être associées au développement de la maladie. L'altération de la fonction APP présente dans la MA peut provoquer une augmentation des taux intracellulaires et extracellulaires de Fe^{2+} et du Cu^{2+} , ainsi qu'une diminution du Cu^{+} extracellulaire, favorisant ainsi son accumulation. L'excès de Fe^{2+} et de Cu^{2+} augmente le stress oxydatif via la génération ROS. De plus, le fer, le cuivre et le zinc ont une forte affinité de liaison pour Aβ et peuvent favoriser son agrégation. L'augmentation

du fer, du cuivre et du zinc neuronaux se lient également à la protéine tau et favorisent la formation de NFT. Une homéostasie anormale des métaux essentiels dans l'espace extracellulaire induit une activation des microglies et des astrocytes, suivie d'une surproduction de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α .

II.4. Aluminium et stress oxydatif

De plus, le cerveau est particulièrement sensible aux niveaux élevés de stress oxydatif. On observe une diminution de la quantité de radicaux libres et d'antioxydants après exposition à des substances toxiques (**Kumar et Gill, 2014**). Plusieurs auteurs ont suggéré que l'Al exerce une puissante activité prooxydante malgré son état non rédox (**Exley, 2004; Kumar & Gill, 2014**). À ce jour, de nombreux mécanismes potentiels sous-jacents à la toxicité pro-oxydante associée à l'Al ont été décrits, l'effet de l'Al sur l'homéostasie du Fe étant particulièrement intéressant (**Ward et al., 2001; Wu et al., 2012a**). En effet, les interactions entre les deux substances génèrent du fer labile à partir d'enzymes et de protéines contenant du fer. Le pool intracellulaire de fer libre augmente, ce qui entraîne l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ROS). D'autre part, la toxicité oxydative de l'Al est également associée à une augmentation de la peroxydation lipidique, à une diminution de la fluidité membranaire et à l'oxydation des lipoprotéines de haute densité (**Johnson et al., 2005; Kaneko et al., 2007; Silva et al., 2002; Zatta et al., 2003**). D'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet pro-oxydant de l'Al, comme la formation de radicaux superoxydes Al³⁺ semi-réduits (**Exley, 2004; Ruipérez et al., 2012**). De plus, l'Al³⁺ réduit l'activité de certaines enzymes antioxydantes, telles que la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase (**Fattoretti et al., 2003; Sánchez-Iglesias et al., 2009**), réduisant ainsi les dommages neuronaux causés par le stress oxydatif. Les environnements oxydants dépendants de l'Al sont également caractérisés par une forte baisse de l'activité mitochondriale (**Han et al., 2013**). En particulier, Al³⁺ détruit la bioénergétique mitochondriale, réduisant ainsi l'efficacité respiratoire et la capacité des mitochondries à réguler et contrôler la production d'énergie via le système de phosphorylation.

II.5. Aluminium et neurotoxicité chez les drosophiles

Drosophila melanogaster est un excellent modèle animal pour la toxicité à l'aluminium par rapport à d'autres animaux. La durée de vie courte, pas besoin de clairance éthiques, adaptabilité en tant que modèles alternatifs, facilité de manipulation de gènes de virulence, petite taille de génome, homologues les humains ont rendu les mouches très utiles pour la

recherche biomédicale (**Lenz et al., 2013**). Une forte exposition à Al conduit à son accumulation dans les organes et peut finalement provoquer une gamme d'effets cytotoxiques ; par exemple, Al trouvé dans l'hippocampe et le cortex cingulaire antérieur est impliqué dans l'apparition de la neurodégénérescence (**Nampoothiri et al., 2015**). Par conséquent, plusieurs maladies neurodégénératives, dont la MA, sont associées à la toxicité de l'Al (**Exley, 1999; Hill et al., 2020**). Le rôle de l'Al dans la MA est lié au stress oxydatif et au déficit cholinergique. Grâce à l'accumulation de fer et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'Al s'est avéré cytotoxique et neurodégénératif dans les tissus neuronaux humains primaires. De plus, l'Al est associé à une peroxydation accrue des lipides cérébraux qui est associée à une augmentation du fer. Le stress oxydatif dû à l'augmentation des radicaux libres conduit à l'homéostasie cellulaire et à la neurotoxicité (**Reynolds et al., 2007; Wu et al., 2012b**).

Induction des symptômes de la maladie d'Alzheimer chez les drosophiles avec le AlCl₃

Pour évaluer la toxicité de l'Al pour les mouches, différentes doses de ce métal ont été administrées à des mouches nouvellement mises en cage. Les courbes de survie et les habiletés motrices ont été enregistrées (**Wu et al., 2012**). Une toxicité dose-dépendante a été observée dans les essais de longévité et de locomotion. De faibles concentrations d'Al (2 mM) n'ont eu aucun effet sur la durée de vie et la capacité d'escalade par rapport aux témoins nourris normalement (0 mM), alors que des concentrations moyennes (5 mM) ou élevées d'Al (10 mM) ont réduit l'espérance de vie (**Wu et al., 2012**). Selon certains auteurs la concentration de base en AlCl₃ serait plus de 40 mM (**Adedayo et al., 2022; Ogunsuyi et al., 2021**).

Le tableau 1 ci-dessous nous résume de façon brève les différents tests *in vivo* réalisable chez la drosophile.

Tableau 1 : Quelques test comportementaux avec les drosophiles

Tests	Description
Test de toxicité	Test effectuer pour évaluer la toxicité d'une substance chez les drosophiles, il évalue généralement le taux de survie des mouches de fruits pendant une période de sept jours (Siima et al., 2020).
Test de fécondité	Les paramètres enregistrés comprennent le nombre d'œufs pondus, le nombre de pupes foncées et le nombre de mouches qui ont émergé de la pupa foncée au cours de l'étude (Ishola et al., 2022).

Test de motilité larvaire	Le nombre souhaité de larves individuelles est collecté, lavé dans une solution saline tamponnée au phosphate et transféré dans une boîte de Pétri contenant de l'agar à 2 % fraîchement préparé (précédemment versé et laissé se solidifier) et placé sur un papier 2B avec une grille de 0,1 cm ² (Ishola et al., 2022).
Test de mémoire à court terme	Ce test permet d'évaluer la capacité des drosophiles à former et à conserver des souvenirs à court terme associés à des stimuli olfactifs spécifiques (Busto et al., 2010).
Test de géotaxie négatif	Test utilisé pour évaluer le comportement d'escalade des drosophiles (Ishola et al., 2022).
Test de longévité	Il permet le suivi de l'effet du génotype, de l'environnement ou du médicament comme la survie de <i>Drosophila melanogaster</i> tout au long de sa durée de vie (Ishola et al., 2022).

II.6. Autres alternatives d'induction de la MA

Outre l'aluminium, d'autres agents neurotoxiques peuvent être utilisés pour induire des modèles de la maladie d'Alzheimer (MA) chez les organismes modèles, permettant d'étudier les mécanismes de la maladie et de tester de potentiels traitements.

Le chlorure de fer, un composé métallique, a été utilisé comme agent d'induction de la MA dans plusieurs études (Liu et al., 2018). Il a été montré que l'exposition au chlorure de fer induisait des dommages neuronaux, des déficits cognitifs et des accumulations de plaques amyloïdes, des caractéristiques clés de la MA. Le mécanisme d'action du chlorure de fer est lié à la production de radicaux libres et à la perturbation de la signalisation cellulaire.

Le plomb et le cadmium, deux métaux lourds présents dans l'environnement, sont également reconnus pour leurs effets neurotoxiques et sont utilisés comme modèles d'induction de la MA. Des études ont montré que l'exposition au plomb (Bakulski et al., 2020) et au cadmium (Huat et al., 2019) provoquait des altérations cognitives, des dommages neuronaux et des accumulations de plaques amyloïdes dans le cerveau. Ces métaux interagissent avec les systèmes enzymatiques, induisent un stress oxydatif et perturbent l'homéostasie du calcium dans les neurones, contribuant ainsi à la progression de la MA. Ces modèles d'induction de la MA offrent des outils précieux pour l'étude de la pathogenèse de la maladie et la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques.

III. Etude d'amarrage moléculaire

Le docking moléculaire est une méthode pour prédire l'orientation d'une molécule (ligand) lorsqu'elle se lie à une protéine cible (récepteur). Parmi les outils de docking, **Molegro Virtual Docker** (MVD) est largement utilisé pour ses capacités de prédiction précises.

Le docking moléculaire vise à prédire la meilleure conformation d'un ligand lorsqu'il se lie à une protéine cible. Cette technique est cruciale pour la découverte de médicaments, car elle permet de comprendre les interactions ligand-récepteur et de concevoir des molécules avec une affinité de liaison élevée (Pinzi et Rastelli, 2019).

III.1. Molegro Virtual Docker (MVD)

III.1.1. Fonctionnement et utilisation

a. Introduction à MVD

MVD est une plateforme intégrée pour prédire les interactions entre les protéines et les ligands. Il gère tous les aspects du processus de docking, de la préparation des molécules à la détermination des sites de liaison potentiels de la protéine cible, en passant par la prédiction des modes de liaison des ligands (Thomsen et Christensen, 2006).

b. Fonctionnement de MVD

Importation et Préparation des Molécules

Importation : Les structures moléculaires peuvent être importées à partir de divers formats de fichiers. MVD détecte les liaisons, l'aromaticité, assigne les charges et ajoute des hydrogènes explicites (Thomsen et Christensen, 2006).

Préparation : Le détecteur de cavité intégré identifie les sites de liaison potentiels, ce qui permet de restreindre l'espace de recherche aux régions les plus intéressantes (Thomsen et Christensen, 2006).

c. Processus de docking

Docking Wizard : Un assistant guide l'utilisateur à travers les étapes de configuration du docking, y compris la sélection des structures, la définition de la région de liaison potentielle, et la configuration des propriétés de l'algorithme de recherche.

Algorithmes de Recherche : MVD utilise plusieurs algorithmes de recherche pour explorer les conformations possibles des ligands dans le site actif de la protéine.

d. Analyse des résultats

Pose Organizer : Cet outil permet de parcourir les poses retournées par le moteur de docking. Il est possible d'inspecter les termes énergétiques et les interactions, et de calculer des mesures avancées de réévaluation et d'affinité de liaison.

Visualisation : MVD offre des outils de visualisation avancés pour examiner les interactions ligand-récepteur et affiner les solutions de docking trouvées.

III.1.2. Système de scores de MVD

MVD utilise plusieurs systèmes de score pour évaluer les interactions ligand-récepteur (Bitencourt-Ferreira et de Azevedo, 2019) :

MolDock Score : Ce score est basé sur un algorithme de recherche stochastique qui combine des techniques de Monte Carlo et de recuit simulé. Il évalue l'énergie de liaison en prenant en compte les interactions entre les atomes.

Rerank Score : Après le calcul initial du MolDock Score, le rerank score est utilisé pour affiner les résultats. Il réévalue les poses en utilisant des paramètres supplémentaires pour améliorer la précision de la prédiction.

PLANT Score : C'est un système de notation utilisé dans MVD pour évaluer l'affinité de liaison entre un ligand et une protéine cible. Ce score est basé sur plusieurs facteurs, notamment les interactions hydrogène, stériques et électrostatiques. Les scores négatifs indiquent une meilleure affinité de liaison, avec des valeurs plus basses représentant des interactions plus favorables.

Pose Score : Ce score évalue la qualité de la pose du ligand dans le site actif de la protéine. Il prend en compte la géométrie et l'énergie de la conformation.

III.1.3. Analyse des systèmes de score

Pour analyser les systèmes de score, il est essentiel de comprendre les contributions des différentes interactions (Ferreira et al., 2015) :

Liaisons hydrogène : Ces interactions sont cruciales pour la stabilité de la liaison ligand-récepteur. Elles sont souvent évaluées par leur énergie de liaison et leur géométrie.

Interactions stériques : Ces interactions concernent les forces de répulsion entre les atomes proches. Elles sont importantes pour éviter les chevauchements atomiques et assurer une conformation stable.

Interactions électrostatiques : Ces interactions incluent les forces attractives et répulsives entre les charges partielles des atomes. Elles jouent un rôle clé dans l'affinité de liaison.

Plusieurs études ont utilisé MVD pour le docking moléculaire. Par exemple, une étude (**Dawood et al., 2014**) nous a montré la liaison d'antidépresseurs (AD) établis contre l'enzyme Tryptophane dioxygénase à l'aide d'études d'amarrage in silico grâce au logiciel MVD. En résumé le docking moléculaire et les systèmes de score de MVD sont des outils puissants pour la découverte de médicaments. En comprenant les contributions des interactions hydrogène, stériques et électrostatiques, les chercheurs peuvent mieux prédire et optimiser les interactions ligand-récepteur.

III.1.4. Utilisation de MVD

Découverte de Médicaments : Identifier de nouveaux composés avec une forte affinité de liaison pour des cibles protéiques spécifiques.

Analyse des Interactions : Comprendre les interactions moléculaires au niveau atomique pour optimiser les ligands.

Modélisation des Données : Créer des modèles de régression et de classification pour prédire les propriétés des composés dockés.

IV. Les flavonoïdes comme traitement de la maladie d'Alzheimer.

IV.1. Définition

Les flavonoïdes sont des composé chimiques synthétisés dans les plantes en tant que métabolites secondaires et qui constituent le groupe majeur des polyphénols (**Ravula et al., 2021**). Les polyphénols sont des micronutriments abondants dans notre alimentation, La principale raison de cet intérêt est la reconnaissance des propriétés antioxydantes des polyphénols, leur grande abondance dans notre alimentation et leur rôle probable dans la prévention de diverses maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Manach et al., 2004**).

IV.2. Structures chimiques et fonction

Les flavonoïdes, qui partagent une structure commune constituée de 2 cycles aromatiques (A et B) liés entre eux par 3 atomes de carbone formant un hétérocycle oxygéné (cycle C), peuvent eux-mêmes être divisés en 6 sous-classes en fonction du type de hétérocycle impliqué : flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidines et flavanols (catéchines et proanthocyanidines).

La figure 8 ci-dessous montre les structures de quelques flavonoïdes.

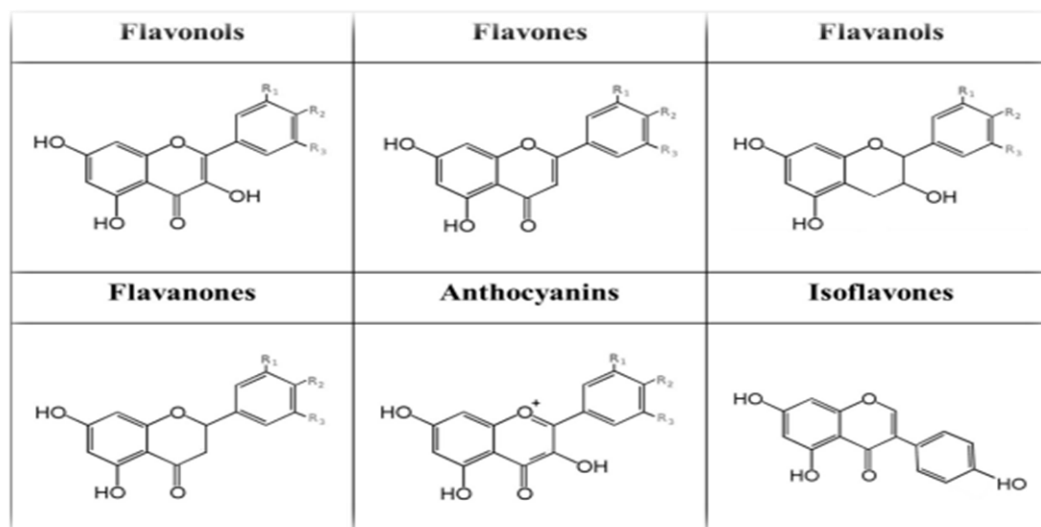


Figure 8 : Structures générales des principales sous classes de flavonoïdes

IV.3. Les flavonoïdes et la maladie d'Alzheimer (MA)

Les acides gras polyinsaturés, les antioxydants et les agents capturant les radicaux libres (vitamines E et C par exemple), les flavonoïdes, les polyphénols (révérastron) favoriseraient la neurogenèse, réduisent le stress oxydant et la neuro-inflammation (Maitre et al., 2017).

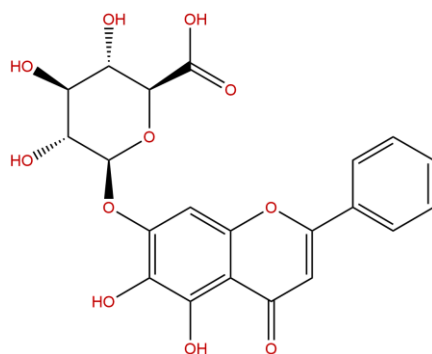
Les flavonoïdes assurent une protection contre les agents étrangers (rayonnement UV, parasites et virus), régulent les enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire et possèdent des propriétés antioxydantes (Spagnuolo et al., 2018).

Les flavonoïdes ont la capacité de favoriser la clairance des peptides A β et d'inhiber la phosphorylation de la protéine tau par la voie de signalisation mTOR/autophagie. De plus, en raison de leur potentiel inhibiteur de la cholinestérase, les flavonoïdes peuvent représenter des agents anti-Alzheimer symptomatiques prometteurs (Uddin et al., 2020).

A titre d'exemple la fisétine a divers effets biologiques, en particulier la neuroprotection via des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Outre la neuroprotection, la fisétine améliore également la fonction cognitive en favorisant la plasticité synaptique (Ravula et al., 2021). Comme autre exemple la lutéoline qui est également un flavonoïde atténuerait le stress oxydatif, la neuroinflammation, la mort cellulaire apoptotique, l'amyloïdogenèse et le dysfonctionnement synaptique (Ahmad et al., 2021).

En fait, les flavonoïdes purs (à l'instar de la quercétine, la gentisine, l'hespéridine, l'épigallocatechine-3-gallate) ou des extraits enrichis peuvent réduire l'expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1 β et COX-2), régulent à la baisse les marqueurs inflammatoires et préviennent les dommages neuraux. Cette activité anti-inflammatoire est principalement liée à la régulation des cellules microgliales, médiée par leurs effets sur les voies de signalisation MAPK et NF- κ B, comme le démontrent les données *in vivo* et *in vitro* (Spagnuolo et al., 2018b).

La baicaline, un flavonoïde bioactif extrait de la *Scutellaria baicalensis*, a suscité un intérêt croissant en tant qu'agent thérapeutique potentiel pour la MA. En effet la baicaline favorise la réduction du stress oxydatif, car elle possède des propriétés antioxydantes, ce qui peut aider à protéger les cellules nerveuses contre les dommages causés par les radicaux libres (Y. Li et al., 2017); Elle peut réduire l'inflammation dans le cerveau, un facteur clé dans le développement de La MA (Hu et al., 2023) ; elle favorise l'inhibition de l'agrégation des protéines amyloïdes elle peut également empêcher l'accumulation anormale de protéines amyloïdes, caractéristique de la MA (Chen et al., 2015a). La baicaline stimule aussi la neurogenèse et de la différenciation en favorisant la croissance de nouvelles cellules nerveuses et leur différenciation fonctionnelle. Enfin grâce à ses Effets anti-apoptose, la baicaline peut protéger les cellules nerveuses contre la mort cellulaire programmée (Li et al., 2017).



Structure de la baicaline

Aux vues des résultat plus que satisfaisant des flavonoïdes sur les maladies neurodégénératives dont la MA, nous nous pencheront sur les biflavonoïdes, ceux-ci étant la combinaison de deux molécules de flavonoïdes liées entre elles par une liaison covalente de type C-C. Il a été démontré que les flavonoïdes contenant deux fragments ou plus, tels que les biflavonoïdes, exercent une plus grande activité biologique que les monoflavonoïdes individuels (Thapa et Chi, 2015).

VI.4. Travaux antérieurs sur *Garcinia manni* oliv.

Garcinia manni Oliv., une plante tropicale, est connue pour ses propriétés médicinales et ses composés bioactifs. Bien que la recherche sur cette plante soit principalement axée sur ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, certaines études ont exploré son potentiel thérapeutique sur la maladie d'Alzheimer. Notamment, une étude de **(Etukudo Mbosowo et Fubara Gift, 2024)** a suggéré que les parties de la plante pourraient être utilisées comme matériau précieux pour la production de médicaments pharmaceutiques. De plus, les contenus plus faibles en anti-nutriments dans les tiges témoignent de leur utilisation comme bâton à mâcher. Le biflavanone Manniflavanone a été isolée de l'écorce de la tige de *Garcinia mannii* **(Crichton et Waterman, 1979)**.

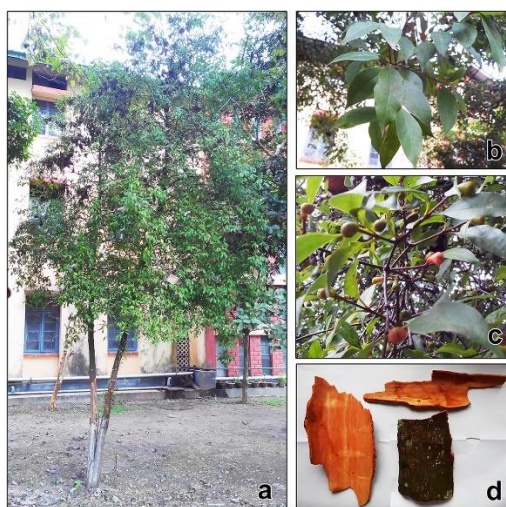


Figure 9 : *G. manni* au jardin botanique de Limbé au Cameroun. (*Garcinia manni*, 2023)

Garcinia mannii est un petit arbre tropical pouvant atteindre dix mètres de hauteur, avec des feuilles elliptiques à obovées et des fleurs jaunes. Il appartient à la famille des *Clusiaceae* et est originaire des forêts tropicales d'Afrique. Cette plante est traditionnellement utilisée en médecine pour traiter divers troubles digestifs, la fièvre et le paludisme. Elle est aussi employée contre certaines affections cutanées et comme tonique pour le foie et les reins. Son fruit contient des composés bioactifs qui pourraient avoir des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, bien que son potentiel thérapeutique soit encore peu étudié scientifiquement. En ethnobotanique, *Garcinia mannii* est souvent intégré dans des préparations médicinales locales et utilisé pour ses effets bénéfiques sur la santé générale (*Garcinia manni*, 2023).

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel

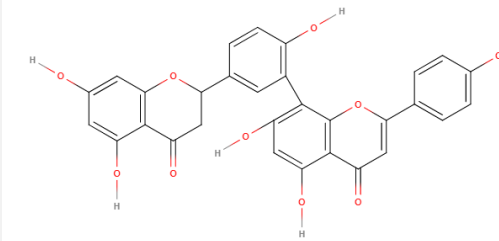
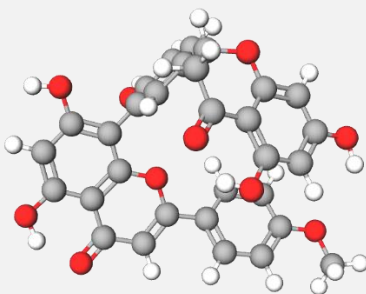
I.1. Matériel animal

Pour l'accomplissement de ce travail nous avons utilisés les drosophiles melanogaster mâle et femelle de type sauvage provenant du CRID (Centre de Recherche contre les Maladies Infectieuses) de Yaoundé qui nous ont été gracieusement donnés pour effectuer les tests *in vivo*.

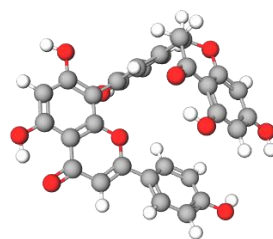
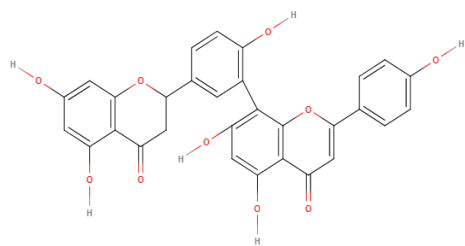
I.2. Matériel végétal

Les biflavonoïdes utilisés dans cette étude proviennent du laboratoire de chimie organique de l'Université de Yaoundé I. Ils ont été obtenus par macération successive des différentes parties de *Garcinia manni* Oliv., notamment les feuilles, l'écorce et les racines , toutes exploitées pour maximiser l'extraction des composés. La macération a été réalisée à l'aide d'un mélange hydro-alcoolique (méthanol-eau), reconnu pour son efficacité dans l'extraction des composés phénoliques tels que les biflavonoïdes. Les feuilles ont été séchées à l'ombre, broyées puis macérées ; l'écorce a été découpée et plongée dans le solvant ; les racines ont été réduites en fragments fins avant macération prolongée, et les fruits ont été traités après dessiccation. Cinq biflavonoïdes distincts ont ainsi été isolés, et leurs structures sont présentées dans le tableau 2.

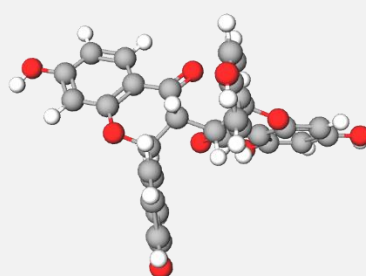
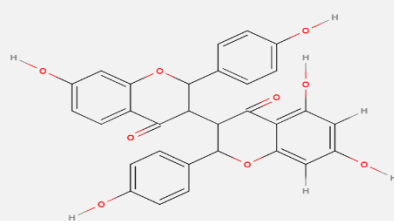
Tableau 2 : Structures sen 2D et 3D des biflavonoïdes testés

Noms	Structure 2D	Structure 3D
DR05		

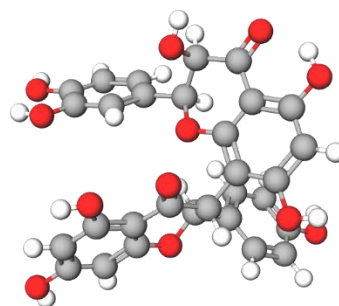
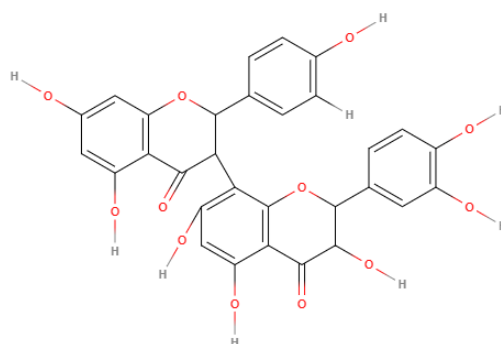
DS1



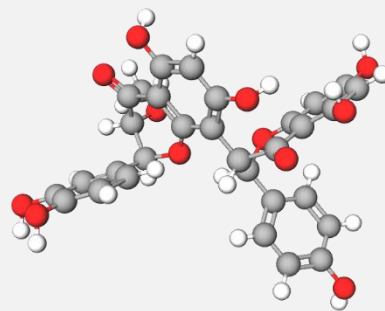
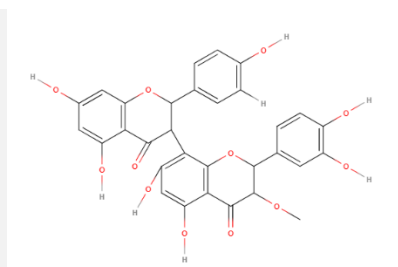
DS03



OB6B



OBIII



I.3. Réactifs

L'agar, le glucose, la nipagine, l'acide propionique, le chlorure d'aluminium (AlCl_3), vinaigre blanc, la levure (*saccharomyces cerevisiae*), eau distillée, la farine de maïs (maïs de variété blanches), la soude (NaOH), l'adrénaline, le carbonate de sodium, le carbonate monosodique, eau oxygénée (H_2O_2), le dichromate de potassium, peroxyde d'hydrogène, acide acétique glacial, chlorure de sodium (NaCl), Chlorure de potassium (KCl), hydrogenophosphate de sodium (NaH_2PO_4), le carbonate de sodium (CO_3NaH), chlorure de magnésium (MgCl_2), chlorure de calcium (CaCl_2), l'acide trichloracétique (TCA), l'acide thiobarbiturique (TBA), acide phosphorique, le naphtyléthylènediamine (NED), sulfanilamide anhydre, nitrite de sodium (NaNO_2), sérum d'albumine de bovin (BSA), sulfate de cuivre hydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), tartrate de sodium et de potassium, hydroxyde de sodium.

I.4. Consommables

Tubes Falcon ; Tubes à essai ; Tubes Eppendorf ; Pipettes ; Embouts ; le Coton.

I.5. Équipements

Centrifugeuse réfrigérée 5804R de marque Eppendorf ; Bain marie ; Microscope optique (OLYMPUS AXIOVERT 40C) ; Spectrophotomètre (SHIMADZU UV-120-01 et GENESYS) ; Vortex (Karl Hecht KG VM4) ; pH-mètre: Agitateur magnétique; Balance à précision; ; Etuve (HP-AD070) ; Trousses à dissection ; Portoirs ; Bécher ; Eprouvette ; Pissette ; tube en verre ; congélateur ; réfrigérateur ; ordinateur portable (PC) ; une caméra ; un chronomètre ; labyrinthe en forme de T.

II. Méthodes

II.1. Préparation de l'alimentation normale des drosophiles

Pour la préparation de l'alimentation, nous avons commencé par peser 4 g d'agar, 5 g de glucose, 7 g de farine de maïs provenant du supermarché Carrefour et 5 g de levure. Ensuite, nous avons ajouté 200 ml d'eau distillée au mélange et remué vigoureusement pendant 2 minutes. Le mélange a ensuite été placé dans un bain-marie à 90° Celsius, où nous l'avons remué pendant 10 minutes pour assurer une homogénéité parfaite. Après avoir retiré le mélange du bain-marie, nous avons continué à remuer constamment pendant 30 minutes pour permettre un refroidissement progressif. Nous avons ensuite incorporé 1,5 mL d'acide propionique 2% et 1 mL de nipagine, en remuant pendant 1 minute pour bien les intégrer. Une fois le mélange refroidi, ceci a été transféré dans des boîtes de culture, en les remplissant jusqu'à 10 cm. Pour faciliter le transfert des drosophiles, nous avons anesthésié les insectes en plongeant les tubes dans de la glace pendant 1 minute, ce qui les a empêchés de voler lors du changement de tube. Cette méthode a permis un transfert en douceur et sans stress pour les drosophiles.

II.2. Analyse *in silico*

II.2.1. Etude d'amarrage moléculaire (Fortuné, 2008)

➤ Principe

L'amarrage moléculaire est une technique de modélisation moléculaire utilisée pour prédire l'orientation préférée d'un ligand lorsqu'il se lie à une protéine cible, formant ainsi un complexe stable. Cette méthode repose sur la préparation des molécules (ligand et récepteur), l'utilisation d'algorithmes de recherche pour explorer les différentes conformations possibles, et l'évaluation des interactions à l'aide de systèmes de score prenant en compte les interactions hydrogène, stériques et électrostatiques. Les résultats sont ensuite analysés pour identifier les poses les plus probables et les interactions clés, ce qui est essentiel pour la découverte de médicaments et l'étude des mécanismes d'action des ligands et des récepteurs.

➤ Mode opératoire

Pour effectuer un docking avec Molegro Virtual Docker (MVD), commencer par importer les structures moléculaires du ligand et du récepteur. Préparer-les en ajoutant des hydrogènes et en assignant des charges. Utiliser le détecteur de cavité pour identifier les sites de liaison potentiels sur la protéine cible. Ensuite, configurer le Docking Wizard pour définir l'espace de recherche et les paramètres de l'algorithme de recherche. Lancer la simulation de docking pour

explorer les différentes conformations possibles du ligand dans le site actif de la protéine. Une fois la simulation terminée, utiliser le Pose Organizer pour inspecter et analyser les résultats, en visualisant les interactions ligand-récepteur et en affinant les poses trouvées.

III.2.2. Utilisation du logiciel MVD

1. Paramètres du Docking

Nous avons utilisé le logiciel Molview pour la génération de structures 3D, PyMOL pour la préparation de structures et l'analyse de données, ainsi que le workflow MolDock pour le criblage virtuel (VS).

2. Préparation de la structure 3D des protéines

La structure tridimensionnelle des différents récepteurs a été récupérée à partir de la banque de données sur les protéines (PDB) (<http://www.rcsb.org>). Nous avons choisi respectivement : la catalase humaine (PDB : 1DGF), La NO synthétase (PDB : 2NOS), l'amyloïde beta humaine (PDB : 1IYT), la Super Oxide Dismutase humaine (PDB : 2SOD) et l'acétylcholine estérase (PDB : 4BDS). Les protéines avaient un ou deux polypeptides et étaient co-cristallisées avec le ligand. Les cibles ont été inspectées visuellement et un ligand de référence a été identifié pour chaque récepteur. Les composants à exclure du docking ont été retirés. Les récepteurs ont été préparés pour le docking en retirant les molécules d'eau, les ligands, les cofacteurs et en attribuant des liaisons, l'ordre des liaisons, l'hybridation et les charges à l'aide du logiciel MVD.

3. Préparation des ligands

Les composés ont été identifiés à partir de la base de données chimiques PubChem. La structure a été dessinée à l'aide du logiciel *Molview* et une minimisation d'énergie a été réalisée en utilisant le champ de force MM2. Plusieurs biflavonoïdes ont été utilisés après analyse par HPLC. Les représentations 2D et 3D ont été générées à l'aide de *Molview*. Les fichiers de structure ont été sauvegardés avec les ligands de référence au format mol. Les charges manquantes et les états d'hybridation différents des composés ont été attribués à l'aide du logiciel MVD.

4. Les algorithmes de recherche de Docking et le système de score

MVD utilise l'algorithme PLP (Potentiel Linéaire Par Morceaux) comme fonction de score pour le criblage computationnel. Dans cette étude, l'algorithme de recherche d'évolution

simplex MolDock a été utilisé pour le Docking. En pratique, le nombre de cavités du récepteur était limité à quatre et en utilisant l'assistant de prédiction de cavité, la cavité de plus grand volume a été sélectionnée. Le Docking des composés dans différents récepteurs a été effectué et les meilleures poses générées ont été utilisées en fonction des scores de Docking.

5. Paramètres du système de score

Le logiciel MVD utilise deux fonctions de score : le score MolDock et le score ReRank.

Le score MolDock est un score E (fonction de score de docking) défini comme suit : $E_{\text{score}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}}$.

E_{inter} : somme de l'énergie d'interaction ligand-protéine, l'énergie d'interaction ligand-eau et l'énergie d'interaction ligand-cofacteur.

E_{intra} : énergie interne du ligand. Le score ReRank fournit une estimation de la force d'interaction ligand-récepteur.

II.2. Analyse *in vivo*

II.2.1. Recherche de la concentration toxique du chlorure d'aluminium (Abolaji et *al.*, 2020 ; Ao et *al.*, 2020)

➤ Principe

Le test de recherche de concentration non toxique de AlCl_3 chez les drosophiles consiste à exposer différents groupes de drosophiles à des concentrations croissantes de AlCl_3 dans leur alimentation durant sept jours. Il repose sur l'observation des effets du chlorure d'aluminium sur la survie et le comportement des drosophiles pour évaluer sa toxicité.

➤ Mode opératoire

Nous avons préparé des solutions de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à des concentrations de 5 mM, 10 mM et 20 mM en les diluant dans un milieu approprié, puis nous avons réparti les drosophiles (en raison de 50 drosophiles par groupe) en quatre groupes distincts (I, II, III, IV) placés dans des tubes de culture séparés. Dans chaque groupe, nous avons ajouté la concentration correspondante d' AlCl_3 à leur alimentation standard et avons observé jour par jour pendant 7 jours les drosophiles pour noter tout changement dans leur comportement et leur survie. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés entre les différents groupes afin d'évaluer l'effet de l' AlCl_3 sur les drosophiles, ce qui nous a permis de déterminer si cet effet était toxique et s'il était dose-dépendant.

Le tableau 3 ci-dessous nous montre les différents groupages des drosophiles au cours du test de toxicité au chlorure d'aluminium.

Tableau 3 : Composition des différentes alimentations de chaque groupe pendant l'étude.

Groupes	Traitement
Groupe I	Alimentation normale
Groupe II	Alimentation + 5mM de AlCl ₃
Groupe III	Alimentation + 10mM de AlCl ₃
Groupe IV	Alimentation + 20mM de AlCl ₃

II.2.2. Recherche des concentrations non toxiques des composés testés

➤ Principe

Le test de recherche des concentrations non toxiques des composés bioactifs OBIII, DS03 et baicaline vise à évaluer leur impact sur la viabilité des drosophiles (*Drosophila melanogaster*) afin de déterminer si ces substances exercent un effet sur la survie des insectes et si cet effet est dose-dépendant. L'exposition des drosophiles à différentes concentrations de ces composés, permet d'identifier les niveaux qui n'affectent pas leur viabilité tout en examinant les variations potentielles d'efficacité en fonction de la concentration pour chaque composé

➤ Mode opératoire

Pour voir si les composés bioactifs testés ne tuent pas les drosophiles (*Drosophila melanogaster*), nous avons réalisé une étude en séparant les mouches en sept groupes distincts (I, II, III, IV, V, VI, VII). Chaque groupe était placé dans des tubes de culture appropriés. Nous avons préparé une alimentation standard pour chaque groupe, en ajoutant des concentrations spécifiques (650 et 6500 μ M) de baicaline pour les groupes II et III, les groupes IV et V contenait 650 et 6500 μ M de biflavonoïdes OBIII respectivement, de même pour les groupes VI et VII avec le biflavonoïdes DS03. Les drosophiles ont été observées pendant une semaine afin de noter leur survie au cours de l'expérience. Enfin nous avons comparé les taux de survie entre les différents groupes pour évaluer l'efficacité de la baicaline et des biflavonoïdes comme traitements potentiels.

Le tableau 4 ci-dessous montre les différents groupes des drosophiles durant le test de détermination de concentration non toxique des composés testés. Les concentrations 6500 μ M et 650 μ M ont été choisies en fonction de la quantité disponibles des biflavonoïdes.

Tableau 4 : Composition des différentes alimentations de chaque groupe

GROUPES	TRAITEMENT
Groupe I	Alimentation normale

Groupe II	Alimentation + 650µM de baicaline
Groupe III	Alimentation + 6500µM de baicaline
Groupe IV	Alimentation + 650µM de OBIII
Groupe V	Alimentation + 6500µM de OBIII
Groupe VI	Alimentation + 650µM de DS03
Groupe VII	Alimentation + 6500µM de DS03

II.2.4. Tests de Géotaxie négatif (Ao et al., 2020)

➤ Principe

C'est une méthode utilisée pour évaluer la réponse comportementale des insectes à la gravité terrestre. Dans ce test, les drosophiles sont placées dans un tube vertical, et leur

$$\text{Indice de performance (PI)} = [1/2 (N_T + N_H - N_B) / N_T] \times 100$$

comportement est observé lorsqu'elles sont confrontées à la gravité. Normalement, les drosophiles ont tendance à se déplacer vers le haut du tube en raison de leur instinct d'exploration et de recherche de nourriture. Cependant, en cas de stress ou d'exposition aux composés spécifiques, leur capacité à grimper peut-être altérée, ce qui se manifeste par une diminution du nombre d'insectes atteignant le sommet du tube. En mesurant la distance parcourue ou le pourcentage de drosophiles ayant atteint le haut du tube, on peut évaluer l'impact de divers facteurs sur leur comportement locomoteur et leur bien-être. Cet impact est calculé suivant la formule suivante :

N_H = Nombre de drosophiles ayant franchi la ligne de 6cm ;

N_B = Nombre de drosophiles n'ayant pas franchi la ligne de 6cm

N_T = Nombre de drosophiles présent dans le tube

➤ Mode opératoire

- Intoxication et traitement des drosophiles

Nous avons premièrement constitué six groupes de *Drosophiles melanogaster*, chacun recevant un traitement spécifique afin d'évaluer l'impact des biflavonoïdes sur les niveaux des paramètres comportementaux (mobilité et mémoire à court terme) en cas d'intoxication au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Le premier groupe a reçu une alimentation normale, tandis que le deuxième a été exposé à 5 mM de $AlCl_3$ pendant 7 jours. Le troisième groupe a bénéficié d'une alimentation normale enrichie de 5 mM de $AlCl_3$ les 3 premiers jours puis de 6500 µM de baicaline les 4 derniers jours. Le quatrième groupe a été traité avec 5 mM de $AlCl_3$ (pendant 3 jours) et 650 µM de OBIII (pendant 4 jours), le cinquième groupe a reçu 5 mM de $AlCl_3$

(pendant 3 jours) avec 6500 μM de OBIII, et enfin, le sixième groupe a eu une alimentation normale avec 5 mM de AlCl_3 et 650 μM de DS03. Chaque traitement visait à analyser les effets des différents composés en présence d'une intoxication au chlorure d'aluminium. Le tableau 5 suivant nous montre les différents groupes de drosophiles pendant les test comportementaux (mobilité et de la mémoire à court terme) des drosophiles.

- Analyse de la mobilité des drosophiles

Chaque groupe de drosophiles au préalable fixés sous légère anesthésie à la glace et placées séparément dans des colonnes de verre verticales étiquetées (15 cm de long, 1,5 cm de diamètre). Après une période de récupération (environ 20 minutes), les mouches ont été tapotées contre le fond de la colonne. Après 6 secondes, le nombre de mouches qui avaient atteint la marque de 6 cm sur la colonne et le nombre de mouches restant en dessous de cette marque ont été enregistrés. Les données ont été exprimées en pourcentage de mouches qui se sont échappées au-delà de la barre des 6 cm en 6 secondes. Le nombre pour chaque groupe étaient la moyenne de trois essais pour chaque groupe de mouches traitées et témoins.

Tableau 5 : Composition des différents du milieu de culture de chaque groupe durant le test de mobilité des drosophiles.

Groupe	Traitement
Groupe I	Alimentation normale
Groupe II	Alimentation + 5mM de AlCl_3
Groupe III	Alimentation + 5mM de AlCl_3 + 6500 μM de baicaline
Groupe IV	Alimentation + 5mM de AlCl_3 + 650 μM de OBIII
Groupe V	Alimentation + 5mM de AlCl_3 + 6500 μM de OBIII
Groupe VI	Alimentation + 5mM de AlCl_3 + 650 μM de DS03
Groupe VII	Alimentation + 5mM de AlCl_3 + 6500 μM de DS03

La photo 1 ci-dessous nous montre comment a été effectuer le test de géotaxie négatif chez les drosophiles.

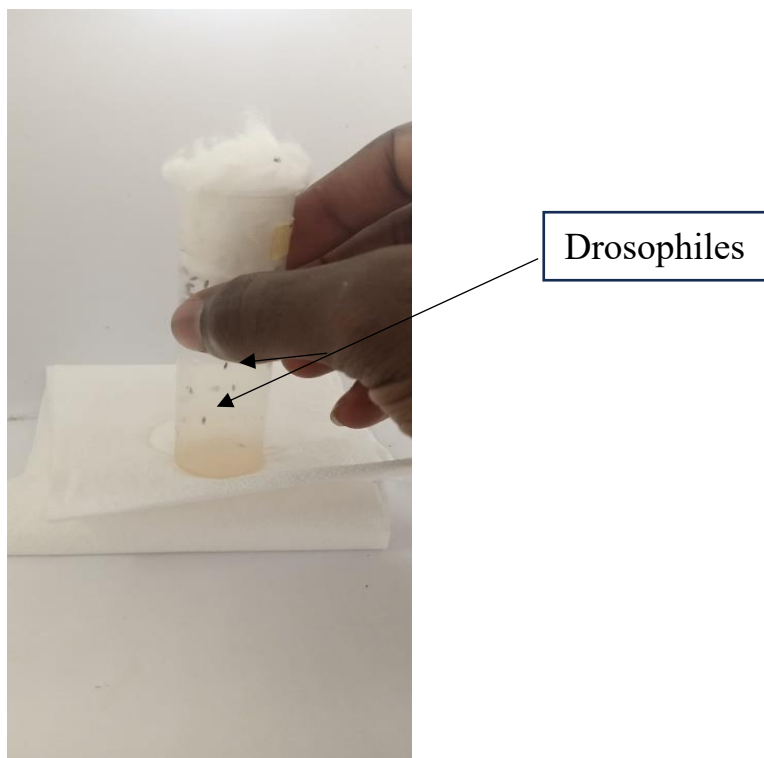


Photo 1 : Test de géotaxie négatif.

II.2.5. Tests de mémoire à court terme (Busto et *al.*, 2010)

➤ Principe

Ce test de mémoire à court terme sur les drosophiles repose sur un conditionnement olfactif. Ce test permet d'évaluer la capacité des drosophiles à former et à conserver des souvenirs à court terme associés à des stimuli olfactifs spécifiques (Vinaigre blanc).

➤ Mode opératoire

Le protocole expérimental a débuté par la sélection de drosophiles âgées de 3 à 5 jours, réparties en huit groupes (T0 à T7). Avant toute manipulation, les drosophiles ont été légèrement anesthésiées à la glace puis disposées au point de départ du labyrinthe. Lors du conditionnement olfactif, chaque groupe a été exposé au vinaigre blanc pendant 20 minutes, suivi d'une exposition à une odeur test spécifique, le vinaigre blanc, pendant 10 minutes. Cette procédure a été répétée plusieurs fois afin de renforcer l'association entre l'odeur test et l'expérience. Après cette phase, les drosophiles ont été maintenues dans un environnement normal pendant 30 minutes, puis exposées à nouveau à l'odeur test dans le labyrinthe. Leurs réponses comportementales ont été enregistrées à intervalles de 5 secondes à l'aide d'un chronomètre. Enfin, les résultats ont été analysés afin d'évaluer la mémoire à court terme des

drosophiles en fonction de leur choix dans le labyrinthe, et les réponses des différents groupes ont été comparées pour déterminer leur capacité à former et conserver des souvenirs olfactifs à court terme.

$$M_{CT} = N_{vb} / N_T$$

N_T : Mémoire à court terme

N_{vb} : Nombre de drosophiles ayant choisis le côté du labyrinthe exposé à l'odeur du vinaigre blanc

N_T : Nombre total de drosophiles

La photo 2 ci-dessous montre les différents matériels utilisés pour effectuer le test de mémoire à court terme chez les drosophiles.

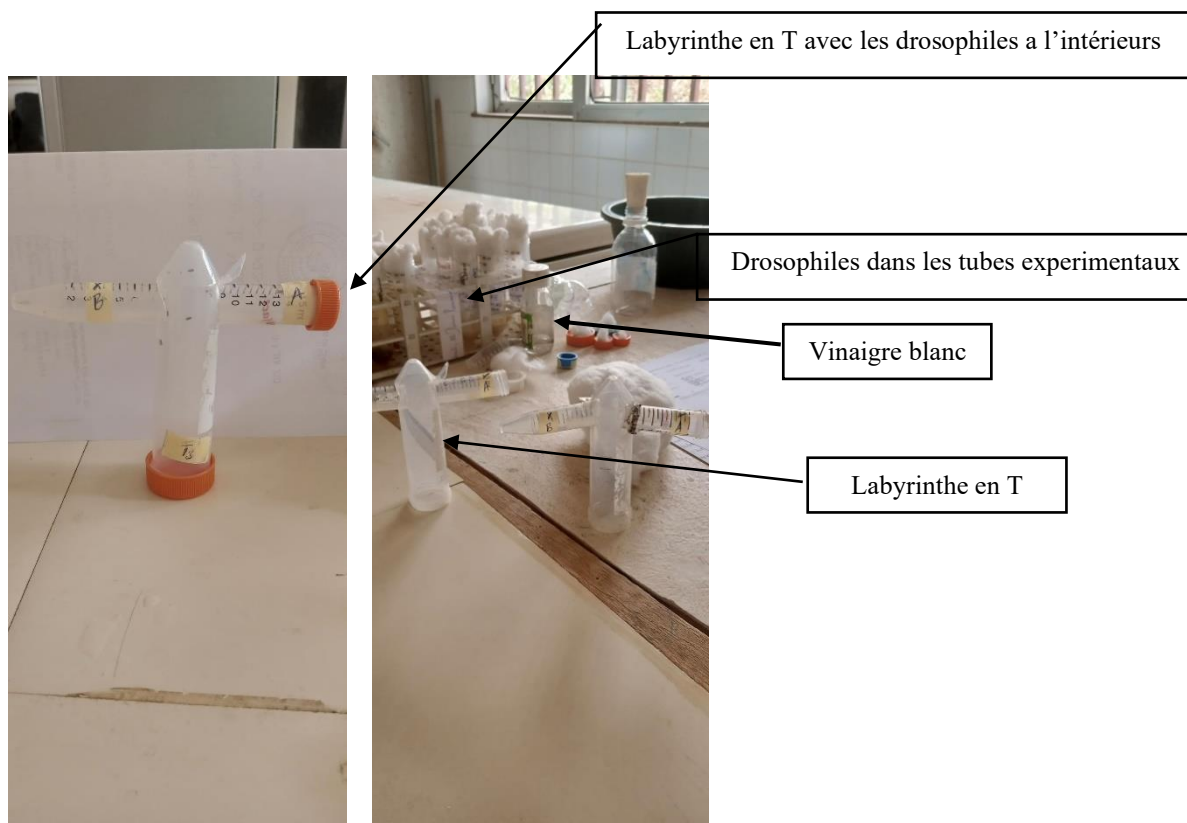


Photo 2 : Dispositif du test de mémoire à court terme chez les drosophiles.

II.3. Analyse des paramètres du stress oxydatif

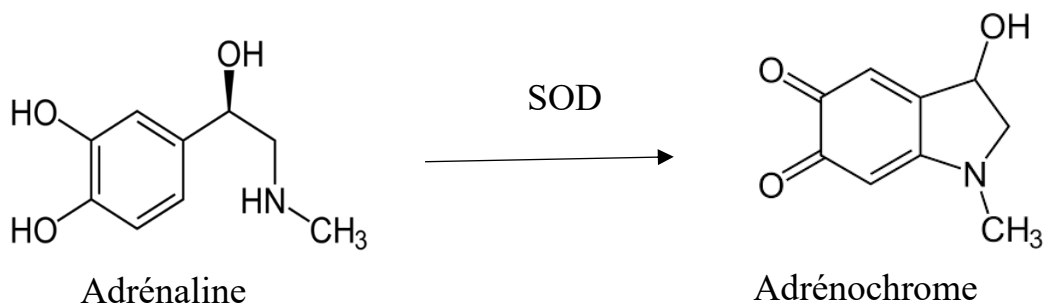
Pour l'évaluation des paramètres du stress oxydatif et de l'activité anti-inflammatoire, les drosophiles ont été anesthésiées à la glace, décapitées, puis broyées dans un tampon phosphate

0,1 M, pH 7,4. L'homogénat obtenu a été centrifugé, et le surnageant a servi aux différentes analyses biochimiques.

II.3.1. Dosage de la superoxyde dismutase (Misra et Fridovich, 1972)

➤ Principe

L'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome dans un milieu est inhibée en présence de la superoxyde dismutase (SOD). La variation de l'absorbance, qui est proportionnelle à l'activité de la SOD, est notée entre 20 et 80 secondes à 480 nm.



➤ Mode opératoire

Le protocole consistait à mélanger des volumes précis d'homogénat de tête de drosophiles, de tampon carbonate et d'adrénaline dans des tubes à essai. Après homogénéisation, l'absorbance des tubes tests a été mesurée à 480 nm à 20 et à 80 secondes, en utilisant le blanc réactif comme référence. L'activité de la SOD a ensuite été calculée en utilisant la formule suivante :

L'activité de la SOD a été déterminée comme suit :

- La variation de l'absorbance : $\Delta A \text{ (min)} = A_{20s} - A_{80s}$
- % d'inhibition = $100 - (\Delta A_{\text{essai}} \times 100 / \Delta A_{\text{blanc}}) = n \text{ unités de SOD}$.

L'activité spécifique de la SOD (unité de SOD/g d'organes) = (nombre d'unité de SOD/mL/g d'organes x f)

A_{20s} = Absorbance mesurée à 20 secondes ; A_{80s} = Absorbance mesurée à 80 secondes ;

ΔA_{essai} = Variation de l'absorbance de l'échantillon; ΔA_{blanc} = Variation de l'absorbance du blanc;

f = facteur de dilution ; 50 % d'inhibition équivaut à une unité de SOD.

Le tableau 6 résume le mode opératoire :

Tableau 6 : Protocole dosage de la SOD

	Blanc réactif	Echantillon
Homogénats de tête(μL)	-	134
Tampon carbonate 0,05 M , pH 10,2 (μL)	1800	1666
Adrénaline 0,3 mM (μL)	200	200

Après homogénéisation, l'absorbance des tubes tests à 480 nm a été mesurée à 20 et à 80 secondes contre le blanc.

II.3.2. Dosage de la catalase (Sinha, 1972)

Principe : Le peroxyde d'hydrogène est rompu en présence de la catalase. Le résidu se lie au dichromate de potassium pour former un précipité bleu vert d'acide perchlorique instable qui va être décomposé par la chaleur et former un complexe vert.



➤ Mode opératoire

Le dosage colorimétrique de la catalase a été réalisé en suivant le protocole décrit dans le tableau 7. Le protocole consistait à mélanger des volumes précis d'eau distillée, d'homogénat, de tampon phosphate, de peroxyde d'hydrogène et de dichromate de potassium/acide acétique glacial dans des tubes à essai. Les tubes ont ensuite été incubés pendant 1 minute à température ambiante avant l'ajout du dichromate de potassium/acide acétique glacial. Les tubes ont ensuite été bouchés à l'aide de billes de verre et les solutions ont été chauffées à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, l'absorbance des échantillons a été lue à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Urit-810, en utilisant le blanc réactif comme référence.

L'activité spécifique de la catalase a été déterminée à partir de la formule suivante :

$$\text{Act CAT} = \Delta\text{DO} / a \times t \times m$$

Act CAT = Activité de la catalase (mM de H₂O₂/min/g d'organes) ; **ΔDO** = DO essai - DO blanc ;
a = Pente de la courbe d'étalonnages ; **t** = durée de la réaction (1 minute) ; **m** = Masse de l'organe (g).

Le mode opératoire de détermination de la CAT est résumé dans le tableau ci-dessous :

Le dosage colorimétrique de la catalase a été réalisé comme l'indique le tableau 7.

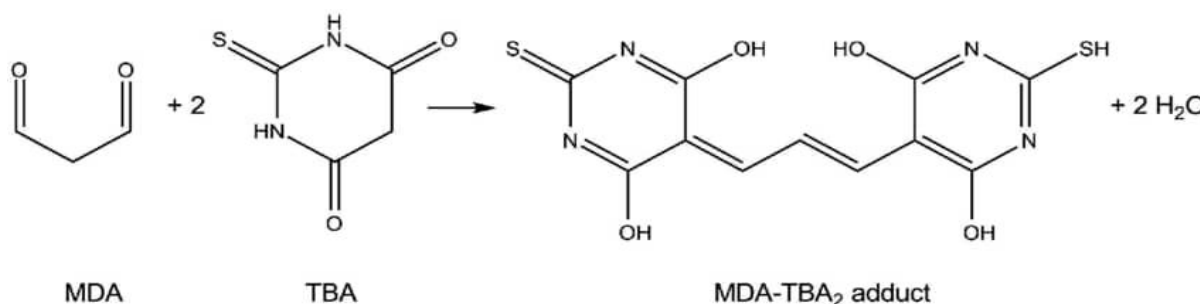
Tableau 7 : Protocole de dosage de la catalase

	Blanc réactif	Echantillon
Eau distillée (μL)	50	-
Homogénats (μL)	-	50
Tampon phosphate 0,1 mM ; pH 7,5 (μL)	750	750
Peroxyde d'hydrogène 50 mM (μL)	200	200
Incubation pendant 1 minute à température ambiante.		
Dichromate de potassium/acide acétique glacial (μL)	2000	2000

Les tubes ont été bouchés à l'aide des billes de verre et les solutions ont été chauffées à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, l'absorbance des échantillons a été lue contre le blanc à 570 nm.

II.3.3. Dosage du malondialdéhyde (Wilbur et *al.*, 1949)

Principe : Le malondialdéhyde (MDA) formé au cours de la peroxydation lipidique réagit avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et chaud, pour donner un complexe rose qui présente un maximum d'absorption à 530 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de MDA présent dans le milieu.



➤ Mode opératoire

Le dosage colorimétrique du MDA a été réalisé en suivant le protocole décrit dans le tableau 8. Le protocole consistait à mélanger des volumes précis de tampon Tris-HCl, d'homogénat, d'acide trichloracétique (TCA) et de thiobarbiturique (TBA) dans des tubes à essai. Les tubes ont ensuite été bouchés à l'aide de billes de verre, chauffés à 90°C pendant 10 minutes au bain-marie, puis refroidis à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 tours/min à température ambiante pendant 15 minutes. Le surnageant a ensuite été prélevé et son absorbance a été lue à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en utilisant le blanc réactif comme référence.

La concentration en MDA dans chaque échantillon a été déterminée par la formule ci-dessous :

$$[\text{MDA}] = \Delta \text{DO} / \epsilon \times L \times m$$

[MDA] = Concentration de MDA (mol/g d'organes) ; ΔDO = DO essai - DO blanc ; L = Trajet optique (1 cm) ; ϵ = Coefficient d'extinction molaire (15600 mol⁻¹.cm⁻¹) ; m = Masse de l'organe (g).

Tableau 8 : Protocole de dosage du MDA

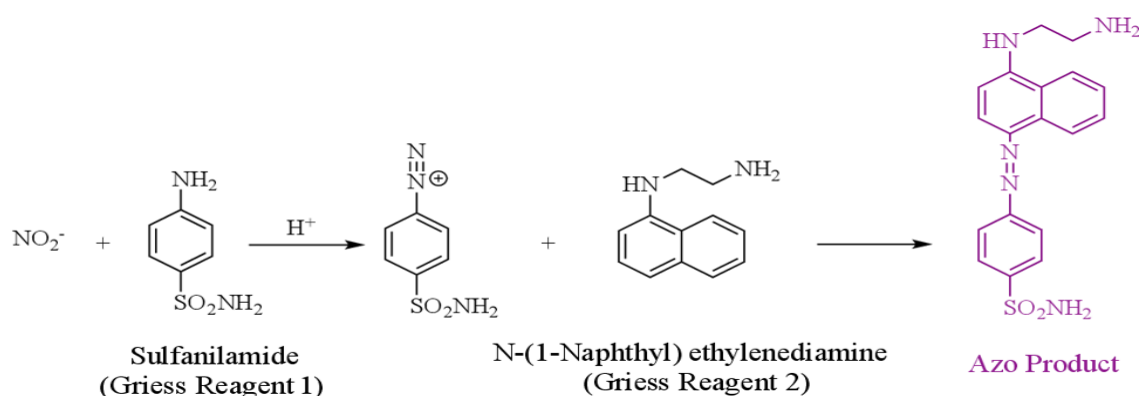
	Blanc réactif	Echantillon
Tampon Tris-HCl 50 mM , pH 7,4/ tampon Mc-Even (μL)	250	-
Homogénat (μL)	-	250
TCA 20 % (μL)	125	125

TBA 0.67 % (μL)	250	250
-----------------	-----	-----

Les tubes ont été bouchés à l'aide de billes de verre, chauffés à 90°C au bain-marie pendant 10 minutes, puis refroidis à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 tours/min à température ambiante pendant 15 minutes. Le surnageant a été pipeté et l'absorbance lue à 530 nm contre le blanc.

II.3.4. Dosage des nitrites (Fermor et *al.*, 2001).

Principe : En présence de l'amino-4-benzènesulfonamide (sulfanilamide) et le dichlorure de N- (naphthyl-1) -diamino-1,2-éthane (N-1-naphtyléthylènediamine) en milieu acide, les nitrites subissent une réaction de diazotation. Le produit est proportionnel à la quantité de nitrites présente dans l'échantillon.



Réaction de diazotation entre le nitrite, la sulfanilamide et le N-(1- naphthyl) ethylenediamine

➤ Mode opératoire

Le dosage de l'oxyde nitrique (NO) a été réalisé par la méthode colorimétrique de Griess, basée sur la réaction des nitrites avec le réactif de Griess pour former un produit coloré. Le protocole a consisté à préparer une série d'étalons de nitrite de sodium (NaNO_2) à des concentrations connues, ainsi que des échantillons à analyser. Le réactif de Griess a ensuite été ajouté à chaque tube, suivi d'une incubation pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance des solutions a ensuite été lue à 546 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été établie en traçant l'absorbance des tubes étalons en fonction de la concentration de NaNO_2 . La concentration en nitrite dans chaque échantillon a ensuite été déterminée à partir de cette droite d'étalonnage.

Le mode opératoire est résumé dans le tableau 9 :

Tableau 9 : Protocole de dosage des nitrites.

	Blanc		Etalonnage					Essai
Numéro des tubes	0	1	2	3	4	5	6	Tests
[NaNO ₂]	0	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1	/
V _{NaNO₂} (μL)	/	100	100	100	100	100	100	/
Echantillon (μL)	/	100						
Eau distillée (μL)	500	400	400	400	400	400	400	400
Réactif de Griess (μL)	500	500	500	500	500	500	500	500
Homogénéisation et incubation/ 10 min à température ambiante. Les absorbances ont été lues à 546 nm								

La droite d'étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons à la concentration de NaNO₂. La concentration en nitrite dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la formule :

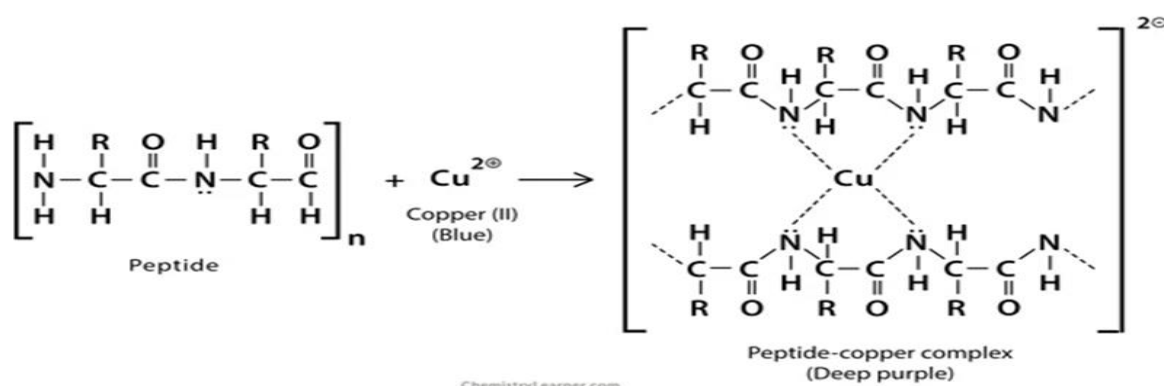
$$[\text{Nitrite}] = \Delta\text{DO} / a \times m$$

[Nitrite] = Concentration de nitrites (μmol/g d'organes) ; ΔDO = DO essai - DO blanc ; *a* = Pente de la courbe d'étalonnage ; *m* = Masse de l'organe (g).

II.3.5. Dosage de protéines (Gornall et *al.*, 1949).

➤ Principe

En milieu basique, le tartrate de sodium et de potassium forme avec les ions cuivriques un complexe soluble. L'addition d'une protéine déplace le cuivre lié au tartrate pour former un complexe cuivro-protéique de couleur violette. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la solution.



➤ Mode opératoire

Le dosage des protéines totales a été réalisé suivant la méthode de Biuret. Une série de tubes contenant des solutions d'albumine sérique bovine (SAB) à des concentrations connues

a été préparée, ainsi que les échantillons à analyser. Le réactif de Biuret a ensuite été ajouté à chaque tube, suivi d'une incubation de 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'absorbance des solutions a ensuite été lue à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été établie en traçant l'absorbance des tubes étalons en fonction de la quantité de protéines. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon a ensuite été déterminée à partir de l'équation de la droite de la courbe d'étalonnage ($y = ax$).

Le mode opératoire est résumé dans le tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 : Protocole de dosage des protéines totales.

	Blanc			Etalonnage				Essai
Numéro de tubes	0	1	2	3	4	5	6	Tests
SAB 3mg/ml (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	/
Eau physiologique (mL)	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1	1,2	1,475
Echantillon (mL)	/	/	/	/	/	/	/	0,025
Réactif de Biuret (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Quantité de protéine	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	/
Homogénéiser et laisser à température ambiante 30 min à l'abri de la lumière puis lire les absorbances à 540 nm contre le blanc								

SAB = Serum Albumin Bovin ; **0** = Tube blanc ; **1-6** = Tubes étalons ; **X₁-X_n** = Tubes échantillons. La courbe d'étalonnage a été obtenue en faisant correspondre l'absorbance des tubes étalons à la quantité de protéines. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon a été déterminée à partir de la droite d'équation $y = ax$

II.4. Analyses statistiques

Le logiciel *Molegro Virtual Docker* (MVD) a été utilisé pour effectuer l'étude d'amarrage moléculaire. Les dosages ont été réalisés en triple, les données ont été introduites dans le tableur Excel 2016 et analysées grâce au logiciel *GraphPad Prism* version 8.0.1. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart type. L'analyse statistique a été effectuée par le test ANOVA à un facteur suivi du post test de Turkey pour un seuil de significativité $P < 0,05$. La corrélation linéaire a été réalisée à l'aide du test non paramétrique de Spearman.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Interactions probables avec les protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer

Paramètre de validation des résultats : Dans cette étude, l'amarrage moléculaire a été réalisé à l'aide du logiciel Molegro Virtual Docker (MVD) afin d'évaluer l'affinité des ligands pour la cible moléculaire sélectionnée. Les résultats ont été analysés sur la base des scores Moldock, qui reflètent l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine, ainsi que des ReRank scores, qui prennent en compte une réévaluation plus précise de la conformation liée à la flexibilité du ligand et des interactions spécifiques (hydrogène, stériques, etc.). Pour garantir la fiabilité de l'étude, les paramètres de validation ont inclus : une redocking du ligand natif pour vérifier la précision du placement ($\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$ considéré acceptable), la sélection de la pose la plus stable en fonction du **plus bas Moldock score**, et la cohérence des résultats entre les différentes poses.

Les tableaux 11 à 15 suivants présentent les interactions moléculaires entre des biflavonoïdes (DS03, OBIII, DR05, OB6B et DS1) et la baicaline avec des protéines clés impliquées dans la maladie d'Alzheimer. L'analyse porte sur l'interaction de ces molécules avec la catalase (Tableau 11), la superoxyde dismutase (SOD) (Tableau 12), la nitrite oxide synthase (Tableau 13), la protéine amyloïde bêta humaine (Tableau 14) et l'acétylcholine estérase humaine (Tableau 15). Les résultats montrent que les biflavonoïdes présentent généralement une meilleure affinité et des énergies de liaison plus favorables comparées à la baicaline, suggérant un potentiel d'interaction plus élevé avec ces protéines. Ces interactions probables sont illustrées sur les photos 3 à 7.

Tableau 11 : Scores de Docking moléculaire et types d'interactions avec la catalase humaine (PDB : 1DGF)

<u>Protéine</u>	<u>Ligand</u>	<u>Scores de Docking moléculaire</u>		<u>Types d'interactions</u>	
		<u>MolDock Score (Kcal/mol)</u>	<u>ReRank Score (Kcal/mol)</u>	<u>Liaisons Hydrogènes</u>	<u>Liaisons stériques</u>
	DS03	-120,039	-103 ,754	-	1 interaction: la Val (448)
	OBIII	-83,525	-65,6647	3 interactions :	3 interactions :

1DGF				1 avec His (364), 2 avec Leu (366) et 1 avec Arg (365 ;68)	2 avec His (364) et, 1 avec Leu (366)
	DR05	-129,412	-115,516	5 interactions : 2 avec His (364) et 3 avec Arg (363 ;66*2)	7 interactions : 2 avec Met (392) ,3 avec His (364) et 2 avec Pro (368)
	OB6B	-133,366	-113,364	11 interactions: 4 avec Arg (363 ; 365*2 ;66), 1 avec Leu (366) et 6 avec His (364)	4 interactions: 4 avec His (365)
	DS1	-154,745	-111,649	5 interactions : 2 avec (His364) ; et 3 avec Arg (66)	11 interactions: 1 avec Gly (367) ; 2 avec Leu (366) ; 3 avec Arg (66*2, 365) ; 3 avec His (364) et 2 avec Pro (368)
	Baicaline	-74,1781	-82,3413	2 interactions : 1 avec Leu (366) et Arg (365)	3 interactions : 1 avec Gly (367) et 2 avec His (364)

Code de la catalase sur *Protein Data Bank* (PDB) : 1DGF

Codes des biflavonoïdes : OBIII ; DR05 ; OB6B ; DS1 ; DS03.

Le tableau 11 illustre que tous les résultats de docking moléculaire révèlent des scores variés pour plusieurs complexes, avec DS03 affichant un score de -120,039 Kcal/mol et une interaction clé avec Val (448), tandis qu'OBIII présente un score de -83,525 Kcal/mol avec trois liaisons hydrogènes notables, notamment avec His et Arg. D'autres complexes comme DR05 et 1DGF OB6B montrent des scores compétitifs et une richesse en interactions, tandis que DS1 se distingue par son score exceptionnel de -154,745 Kcal/mol et un grand nombre d'interactions.

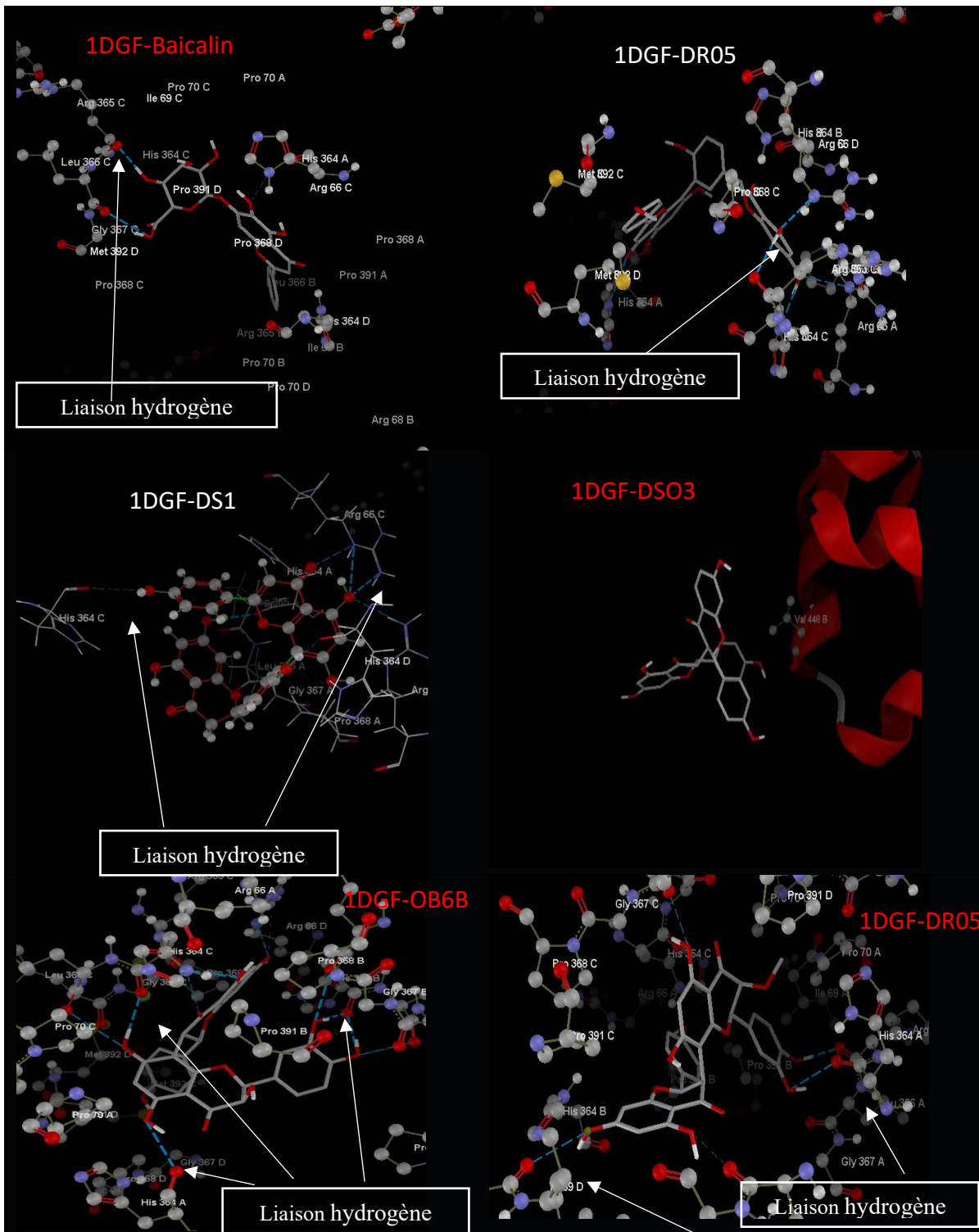


Photo 3 : Différentes interactions impliquant les acides aminés du site actif de la catalase et les biflavonoïdes étudiés.

Tableau 12 : Scores de docking moléculaire et types d'interactions avec la SOD humaine (PDB : 2SOD)

Scores de docking moléculaire	Types d'interactions
-------------------------------	----------------------

<u>Proteine</u>	<u>Ligand</u>	<u>MolDock Score (Kcal/mol)</u>	<u>ReRank Score (Kcal/mol)</u>	<u>Liaisons Hydrogènes</u>	<u>Liaisons stériques</u>
2SOD	DS03	-106,044	-83,5244	3 interactions : 1 avec Arg (141), Asn (51) et Val (7)	6 interactions : 3 avec Lys (9) ,1 avec Cys (55), 1 avec Gly (54) et 1 avec Thr (52)
	OBIII	-89,9878	-67,4299	1 interaction: Ala (87)	4 interactions: 1 avec Asp (88), 2 avec Ala (87) et 1 avec Glu (38)
	DR05	-118,08	-99,0369	-	2 interactions avec Asp (88)
	OB6B	-115,952	-103,68	3 interactions : 1 avec Asp (50), Val (7) et Asn (51)	4 interactions : 2 avec Lys (9),1 avec Gly (54) et 1 avec Cys (55)
	DS1	-106,978	-88,3427	3 interactions : 1 avec Asp (11), Gln (15), Lys (9)	6 interactions : 1 avec Gly (12), 1 avec Asp (11), 2 avec Asn (51), 1 avec Gly (54) et 1 avec Lys (9)
	Baicaline	-84,8274	-79,8709	4 interactions : 3 avec Lys (9) et 1 avec Gly (10)	5 interactions : 2 avec Gly (10) et 3 avec Lys (9)

Code de la SOD sur *Protein Data Bank* (PDB) utilisé : 2SOD

Les résultats de Docking moléculaire avec la SOD (tableau 12) révèlent des composés prometteurs, avec une attention particulière sur. Ces ligands se distinguent par plusieurs liaisons hydrogènes significatives avec les principaux acides aminés du site actif de la SOD, ainsi que plusieurs interactions stériques, soulignant leur forte affinité. OBIII suit avec un score de -89,9878 Kcal/mol et un ReRank Score de -67,4299 Kcal/mol, présentant une liaison hydrogène avec Ala (87) et quatre interactions stériques. D'autres composés tels que DR05 et 2SOD OB6B montrent également des scores compétitifs, respectivement -118,08 Kcal/mol et -115,952 Kcal/mol, mais sans liaisons hydrogènes pour DR05.

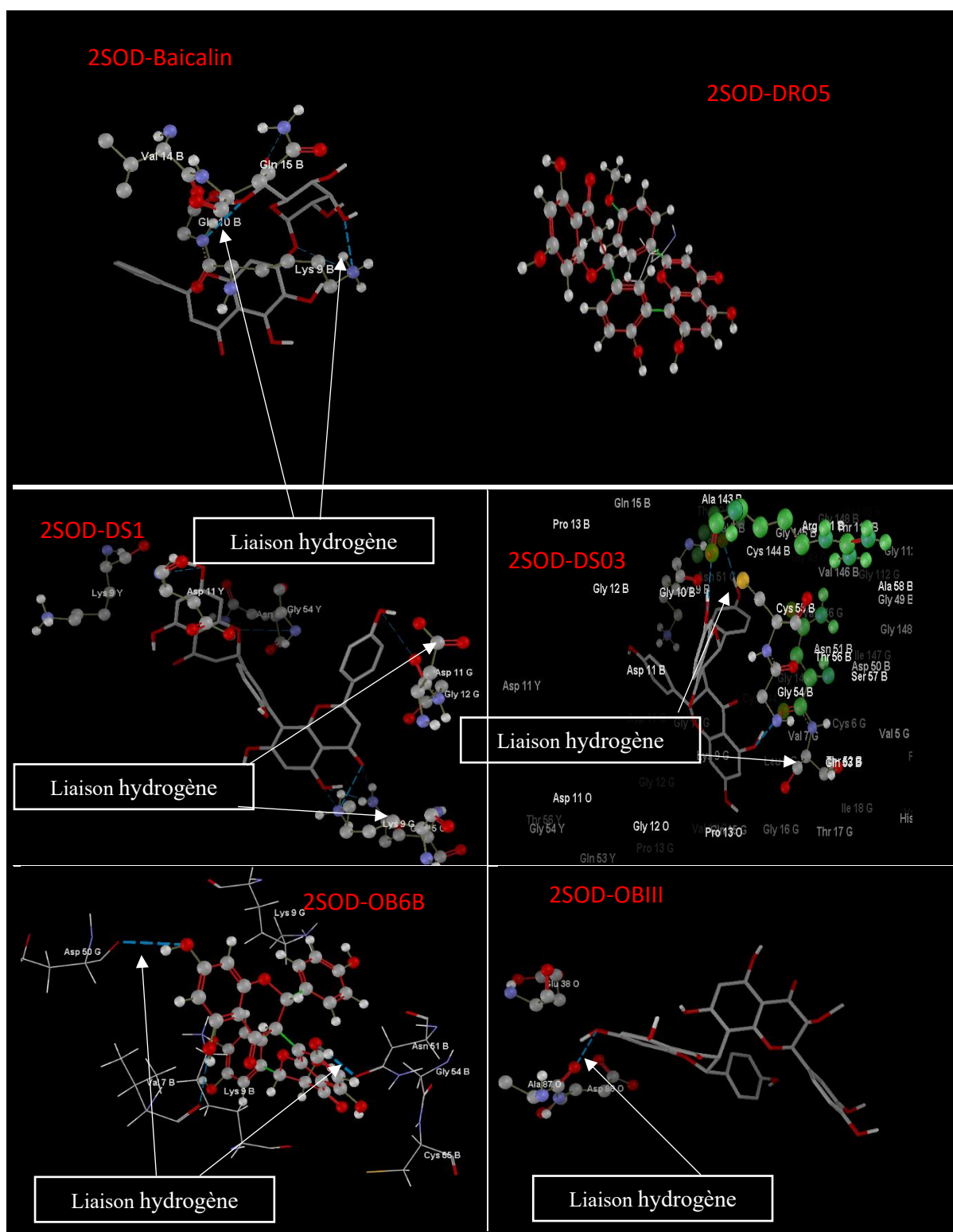


Photo 4 : Différentes interactions impliquant les acides aminés du site actif de la superoxyde dismutase avec les biflavonoïdes étudiés. (suite et fin)

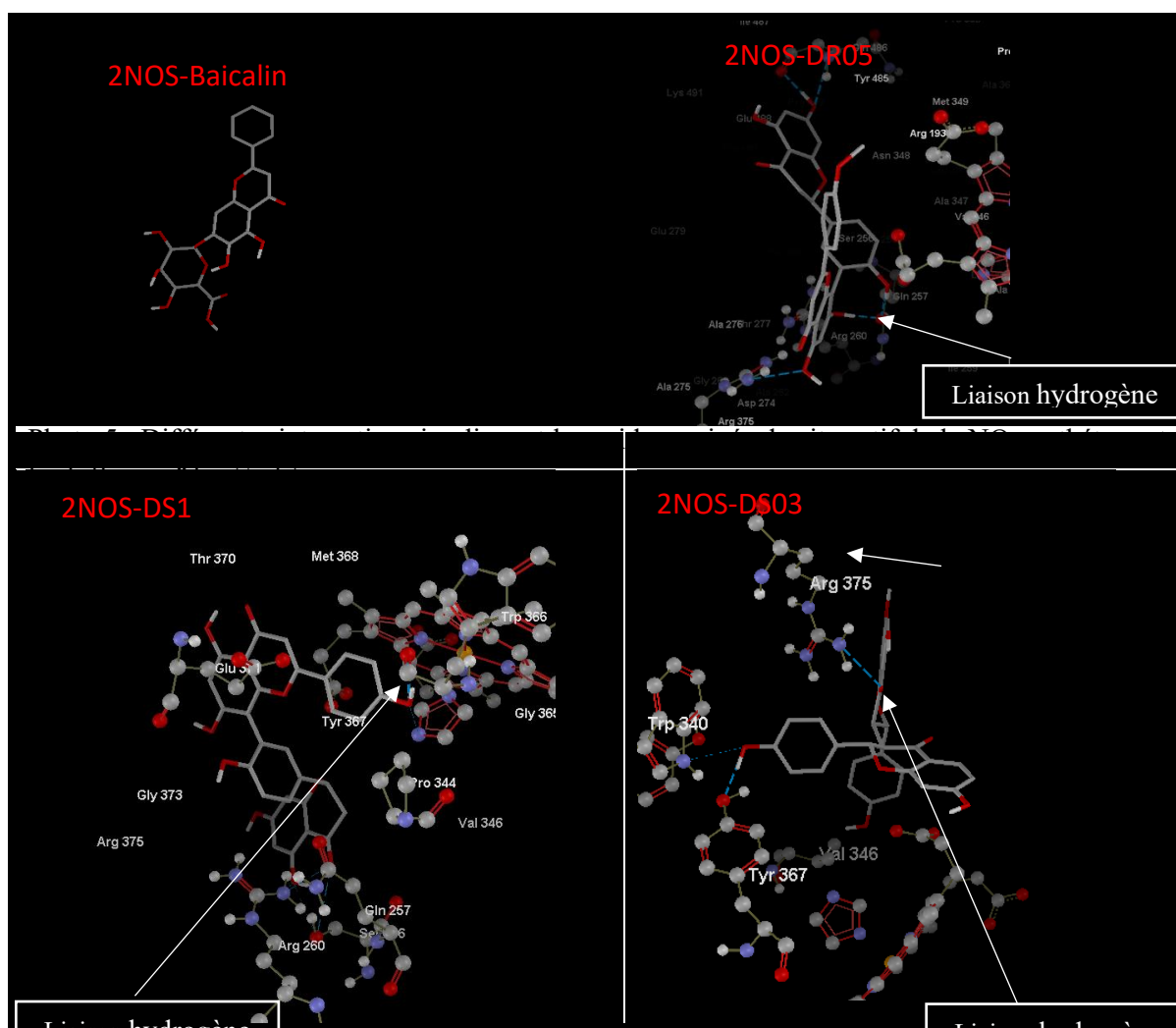
Tableau 13 : Scores de Docking moléculaire et types d'interactions avec la NO Synthétase (PDB : 2NOS)

Scores de docking moléculaire	Types d'interactions
----------------------------------	----------------------

<u>Protéine</u>	<u>Ligand</u>	<u>MolDoc k Score (Kcal/mol)</u>	<u>ReRank Score (Kcal/mol)</u>	<u>Liaisons Hydrogènes</u>	<u>Liaisons stériques</u>
2NOS	DS03	-81,8817	-57,6702	2 interactions : 1 avec Tyr (367) et Arg (375)	3 interactions : 1 avec Val (346), 1 avec Tyr (341) et 1 avec Trp (340)
	OBIII	-65,4659	-39,1393	3 interactions: 1 avec Gln (486), 1 avec HEM_901 et 1 avec IMD_902	5 interactions: 1 avec Glu (371), 1 avec Arg (260), 2 avec Tyr (485) et 1 avec Asn (348)
	DR05	-86,1789	-70,963	4 interactions : 3 avec Gln (257*2 ; 486) et 1 avec Arg (375)	1 interaction avec Arg (260)
	OB6B	-94,9262	-64,517	9 interactions : 1 avec Gln (257), 1 avec Trp (340), 2 avec Tyr (341), 1 avec Arg (260), 1 avec Glu (488), 2 avec HEM_901 et 1 avec IMD_902	2 interactions : 1 avec Val (346) et 1 avec Gly (373)
	DS1	-107,909	-76,7297	4 interactions : 1 avec Arg (260), 1 avec Ser (256), 1 avec IMD_902 et 1 avec Trp (366)	7 interactions : 2 avec Ser (256), 1 avec Gln (257), 1 avec Pro (344) et 3 avec Glu (371)
	Baicaline	-79,3878	-68,3457	-	-

Code de la NO synthétase sur *Protein Data Bank* (PDB) utilisé :2NOS

Le tableau 13 montre que tous les biflavonoïdes ont obtenu de très bons scores, parmi lesquels le meilleur composé est DS1 avec un score de -107,909 Kcal/mol et un ReRank Score de -76,7297 Kcal/mol. Ce ligand établit quatre liaisons hydrogènes, notamment avec Arg (260) et Ser (256), et présente sept interactions stériques, renforçant ainsi son affinité. 2NOS OB6B suit avec un score de -94,9262 Kcal/mol et un ReRank Score de -64,517 Kcal/mol, affichant neuf liaisons, dont plusieurs avec Gln (257) et Tyr (341), ainsi que deux interactions stériques. DR05, bien qu'il ait un score compétitif de -86,1789 Kcal/mol, montre une interaction hydrogène avec Arg (375) et une unique interaction stérique. Les ligands DS03 et OBIII présentent des scores respectifs de -81,8817 Kcal/mol et -65,4659 Kcal/mol, mais leur potentiel est moins marqué par rapport aux meilleurs composés.



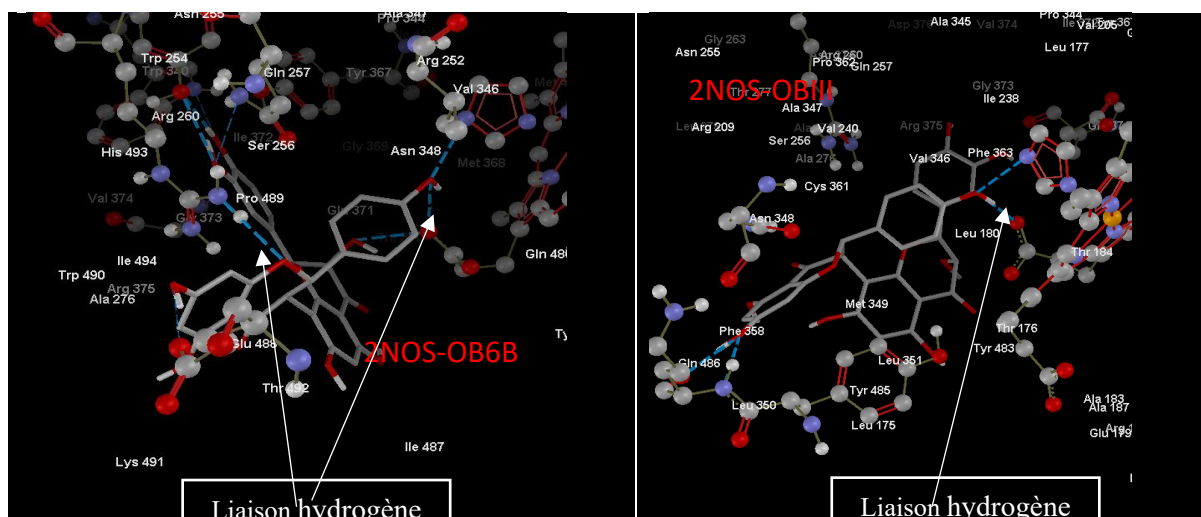


Photo 5 : Différentes interactions impliquant les acides aminés du site actif de la NO synthétase et les biflavonoïdes étudiés. (Suite et fin)

Tableau 14 : Scores de Docking moléculaire et types d'interactions avec la protéine amyloïde beta humaine (PDB : 1IYT)

Protéine	Ligand	Scores de docking moléculaire		Types d'interactions	
		MolDock Score (Kcal/mol)	ReRank Score (Kcal/mol)	Liaisons Hydrogènes	Liaisons stériques
1IYT	DS03	-343,166	-23,9181	1 interaction avec Lys (160)	21 interactions : 5 avec Leu (34), 6 avec Val (240), 1 avec Met (35), 7 avec Phe (20), 1 avec Lys (16) et 2 avec Ile (31)
	OBIII	-313,603	-76,4009	2 interactions: 1 avec Gln (15) et 1 avec Lys (16)	22 interactions : 9 avec Phe (19*7 ; 20*2), 10 avec Lys (16), 1 avec Val (12) et 3 avec Gln (15)
	DR05	-427,056	-220,501	1 interaction avec Asp (23)	19 interactions : 8 avec Phe (20*2 ; 19*6), 3 avec Gln (15), 2 avec Val (12), 4

				avec Lys (16) et 2 avec Asp (23)
OB6B	-419,841	232,051	27 interactions : 4 avec Val (18*2 ; 24 ;12), 4 avec Ala (21), 2 avec Glu (22), 1 avec Gly (25), 2 avec Asp (23), 6 avec Phe (19*2 ;20*4), 1 avec His (13), 1 avec Gln (15), 4 Leu (17) et 2 Lys (16)	43 interactions : 7 avec Val (18), 4 avec Glu (22), 10 avec Ala (21), 1 avec Phe (19), 7 avec Asp (23), 10 avec Phe (20), 3 avec Gln (15) et 1 avec Lys (16)
DS1	-485,774	-343,838	16 interactions : 1 avec Gln (15), 3 Val (12 ;24 ;18), 1 avec His (13), 3 avec Lys (16), 1 avec Glu (22), 1 avec Phe (19), 3 avec Ala (21), 1 avec Asp (23) et 2 avec Leu (17)	65 interactions : 15 avec Lys (16), 6 avec Glu (22), 2 avec Phe (20 ;19), 8 avec Asp (23), 10 avec Leu (17), 6 avec Val (6), 12 avec Ala (21), 4 avec Gln (15) et 2 avec His (13)
Baicaline	-314,534	-62,7358	2 interactions avec Lys (16)	19 interactions : 7 avec Phe (20*4 ;19*3), 3 avec Gln (15) et 9 avec Lys (16)

Code de de la protéine amyloïde beta humaine sur *Protein Data Bank* (PDB) utilisé : 1IYT

Le tableau 14 nous montrent que DS1 se classe en tête avec un score de -485,774 Kcal/mol et un ReRank Score de -343,838 Kcal/mol, grâce à ses 16 liaisons hydrogènes et 65 interactions stériques. Il est suivi par DR05, qui présente un score de -427,056 Kcal/mol et un ReRank Score de -220,501 Kcal/mol, avec une liaison hydrogène unique et 19 interactions stériques. OB6B se distingue également avec un score de -419,841 Kcal/mol et 27 liaisons hydrogènes, en plus de 43 interactions stériques. Bien que DS03 et OBIII aient des scores inférieurs, ils n'atteignent pas le même potentiel que les trois premiers.

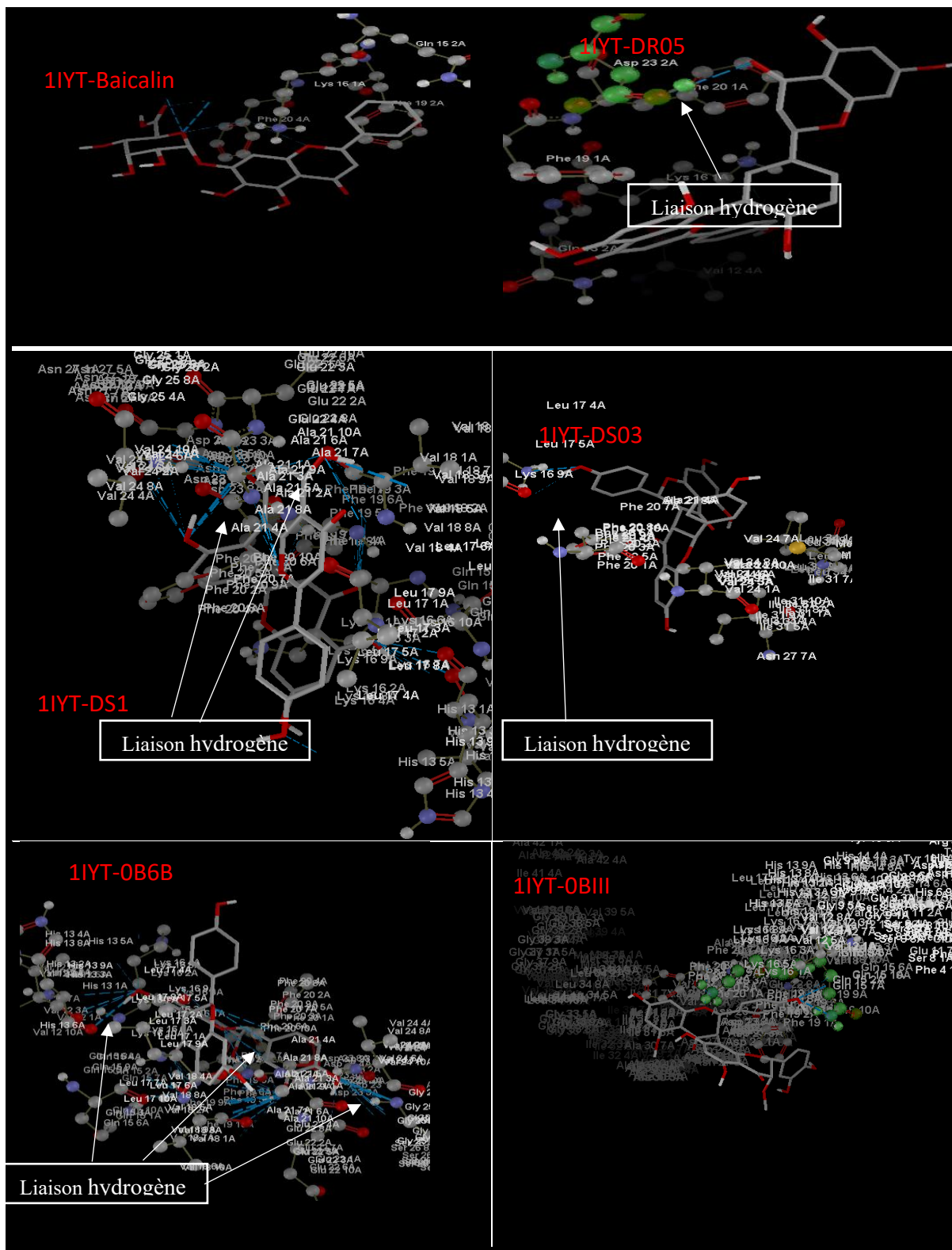


Photo 6 : Différentes interactions impliquant les acides aminés du site actif de la protéine amyloïde beta et les biflavonoïdes étudiés (suite et fin).

Tableau 15 : Scores de Docking moléculaire et types d'interactions avec l'acétylcholine estérase (PBD : 4BDS)

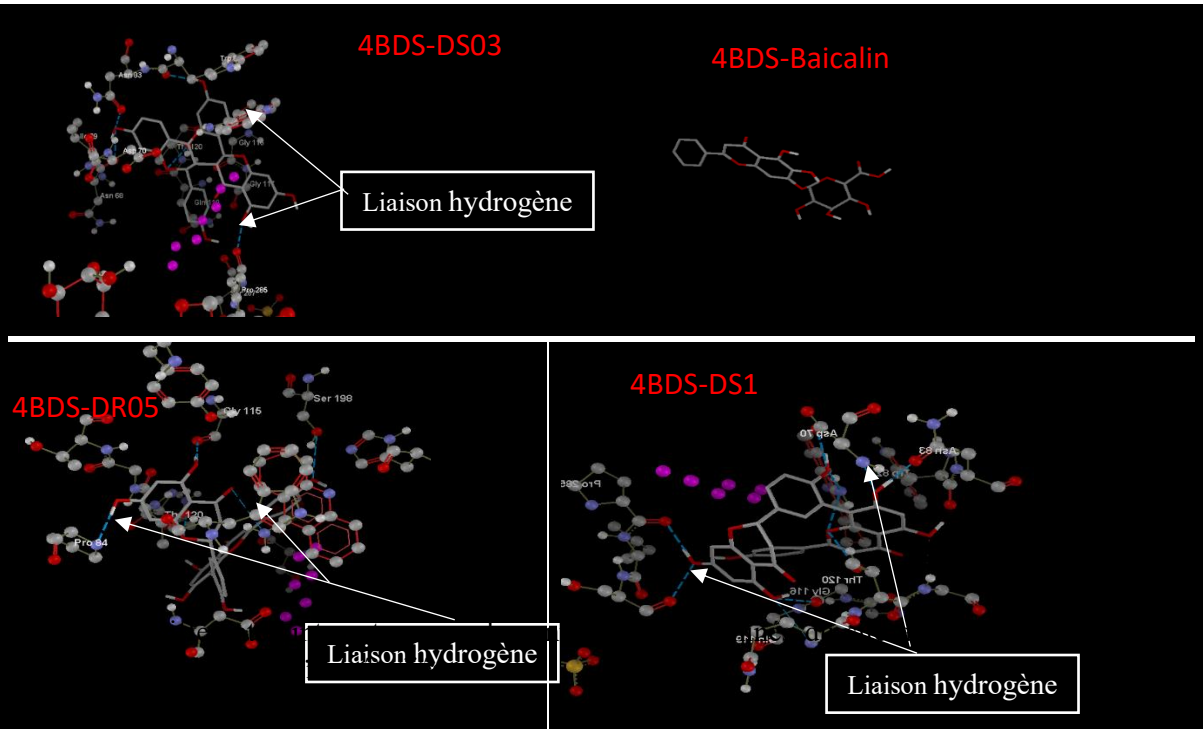
Scores de docking moléculaire	Types d'interactions
-------------------------------	----------------------

<u>Protéine</u>	<u>Ligand</u>	<u>MolDock Score (Kcal/mol)</u>	<u>ReRank Score (Kcal/mol)</u>	<u>Liaisons Hydrogènes</u>	<u>Liaisons stériques</u>
4BDS	DS03	-42,5411	141,384	7 interactions : 1 avec Ser (287), 1 avec Trp (82), 1 avec Thr (120), 1 avec Pro (285), 1 avec THA_701 et 2 avec Asn (83 ; 68)	18 interactions : 1 avec Ser (287), 1 avec Gln (119), 6 avec Gly (116*5 ;117), 7 avec Thr (120), 1 avec Asn (68), 1 avec Ile (69) et 1 avec Asp (70)
	OBIII	-4,41982	382,031	3 interactions : 1 avec Ser (79), 1 avec Trp (82) et 1 avec THA_701	27 interactions : 1 avec Asp (70), 3 avec Asn (83), 1 avec Glu (80), 6 avec Ser (79*3 ; 198*3), 1 avec Phe (329), 1 avec Ala (199), 8 avec Gly (117*2 ;121 ;116*5) et 6 avec Thr (120)
	DR05	-108,954	49,2608	5 interactions : 1 avec Gly (115), 1 avec Pro (84), 1 avec Thr (120), 1 avec Ser (198) et 1 avec THA_701	21 interactions : 1 avec Asp (70), 2 avec His (438), 2 avec Ser (287), 2 avec Gln (119), 4 avec Thr (120*2 ; 122*2), 4 avec Trp (82), 3 avec Gly (121) et 1 avec Tyr128
	OB6B	-99,261	53,0059	6 interactions : 1 avec Trp (82), 1 avec Thr (122), 1 avec Asp (70), 1 avec Gly (115) et 2 avec THA_701	19 interactions : 1 avec Leu (125), 5 avec Gly (121*2 ; 115*2 ; 117), 3 avec Tyr (128 ; 82*2), 4 avec Thr (120), 1 avec Ile (69), 2 avec Asp (70), 1 avec Asn (83) et 1 avec Gln (67)
	DS1	-157,127	-45,7361	10 interactions : 1 avec Pro (285), 1 avec	21 interactions : 1 avec Leu (286), 1 avec Ser (287), 2 avec

				Asn (83), 2 avec Asp (70), 1 avec Trp (82), 1 avec Thr (120), 2 avec THA_701, 1 avec Gly (116) et 1 avec Gln (119)	Gln (119), 3 avec Gly (116), 4 avec Asp (70), 3 avec Trp (82), 2 avec Gly (121 ; 115), et 5 avec Thr (120)
	Baicaline	-117,849	-104,732	-	-

Code de l'acétylcholine estérase sur *Protein Data Bank* (PDB) utilisé : 4BDS

Le tableau 15 nous montre les résultats des scores de docking moléculaire révélant des interactions variées entre les ligands et la protéine. DS03 affiche un MolDock Score de -42,5411 Kcal/mol avec 7 liaisons hydrogènes et 18 interactions stériques, tandis que OBIII présente un score de -4,41982 Kcal/mol avec 3 liaisons hydrogènes et 27 interactions stériques. DR05 se distingue avec un score de -108,954 Kcal/mol, comprenant 5 liaisons hydrogènes et 21 interactions stériques. OB6B suit avec un score de -99,261 Kcal/mol, affichant 6 liaisons hydrogènes et 19 interactions stériques. Enfin, DS1 obtient un score de -157,127 Kcal/mol, avec le plus grand nombre de liaisons hydrogènes (10) et 21 interactions stériques. Le ligand Baicalin présente un score de -117,849 Kcal/mol, mais sans détails sur les types d'interactions



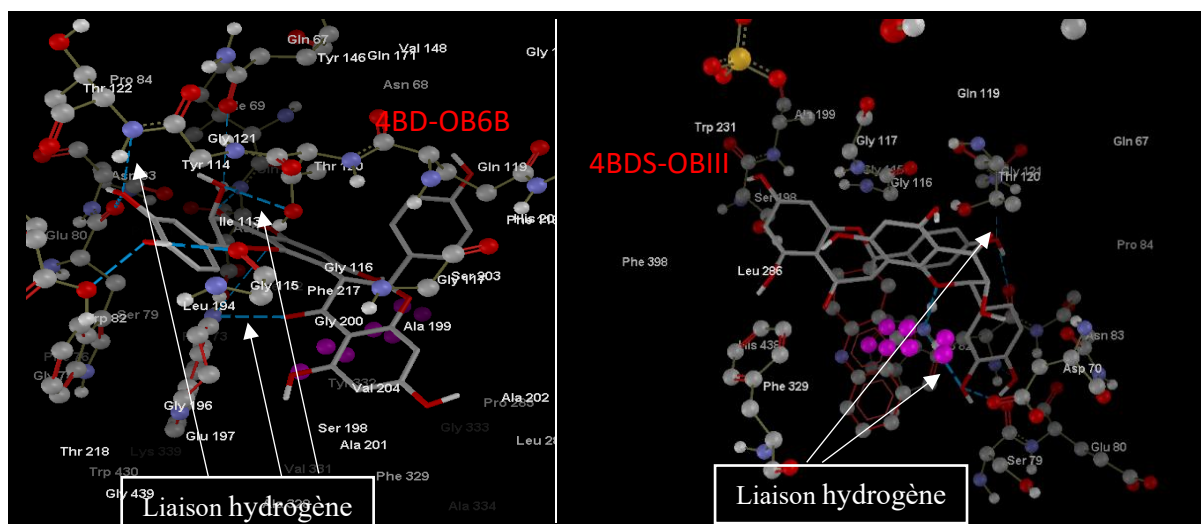
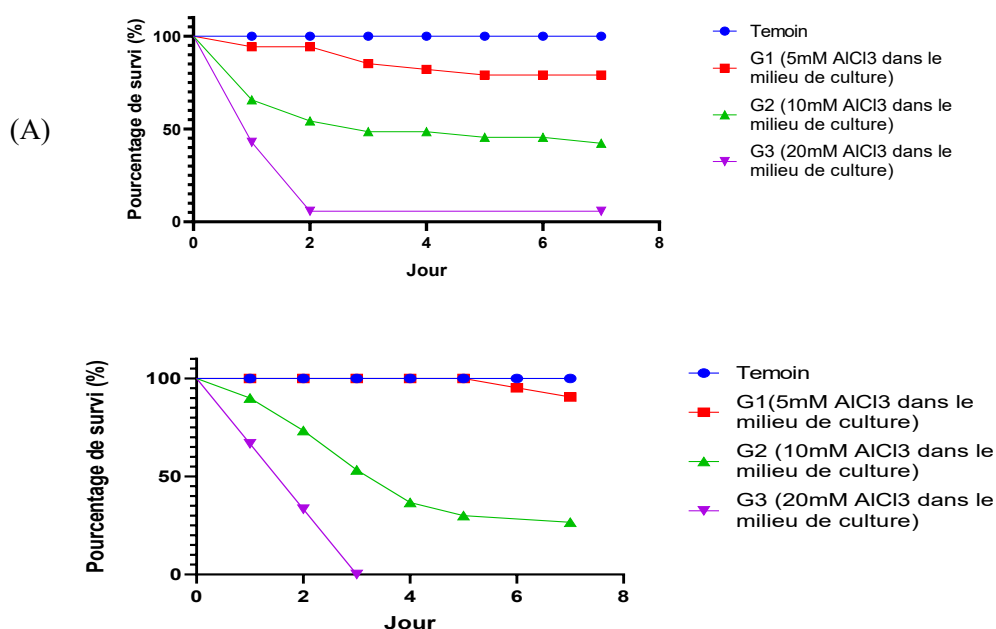


Photo 7 : Différentes interactions impliquant les acides aminés du site actif de l'acétylcholine estérase et les biflavonoïdes étudiés. (suite et fin)

III.1.2. Etude *in vivo*

III.1.2.1. Concentration du $AlCl_3$ induisant les symptômes de la MA chez la drosophile en fonction de l'âge.

Les résultats de notre étude sur l'effet du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) induisant des symptômes de la maladie d'Alzheimer (MA) chez la drosophile sont illustrés à travers les trois graphiques de la figure 11, chacun représentant des groupes d'âges différents.



(B)

(C)

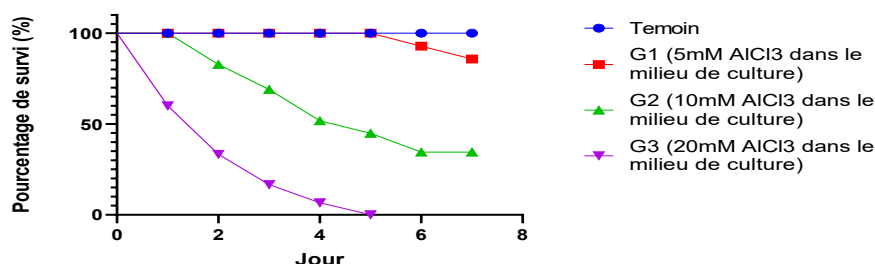


Figure 10 : Concentration de AlCl_3 induisant les symptômes de la MA chez les drosophiles en fonction de l'âge

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$.

Témoin : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans AlCl_3 ; **G1** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM d' AlCl_3 pendant 7 jours ; **G2** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 10 mM d' AlCl_3 pendant 7 jours ; **G3** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 20 mM d' AlCl_3 pendant 7 jours

La figure 11 A montre l'effet significatif des différentes concentrations d' AlCl_3 sur les drosophiles âgées de plus de 10 jours. La figure 11 B, représentant l'effet du AlCl_3 sur les drosophiles âgées de 5 à 7 jours. Quant à la figure 11 C, elle illustre l'effet du AlCl_3 sur les drosophiles âgées de 3 à 5 jours. De ces figures il ressort que la concentration de 5mM d' AlCl_3 a induit les symptômes de la MA sans tuer les drosophiles.

III.1.2.2. Concentration non toxique des composés testés

Le figure 12 montre l'effet non toxique de la baicaline, OBIII et DS03 sur les drosophiles.

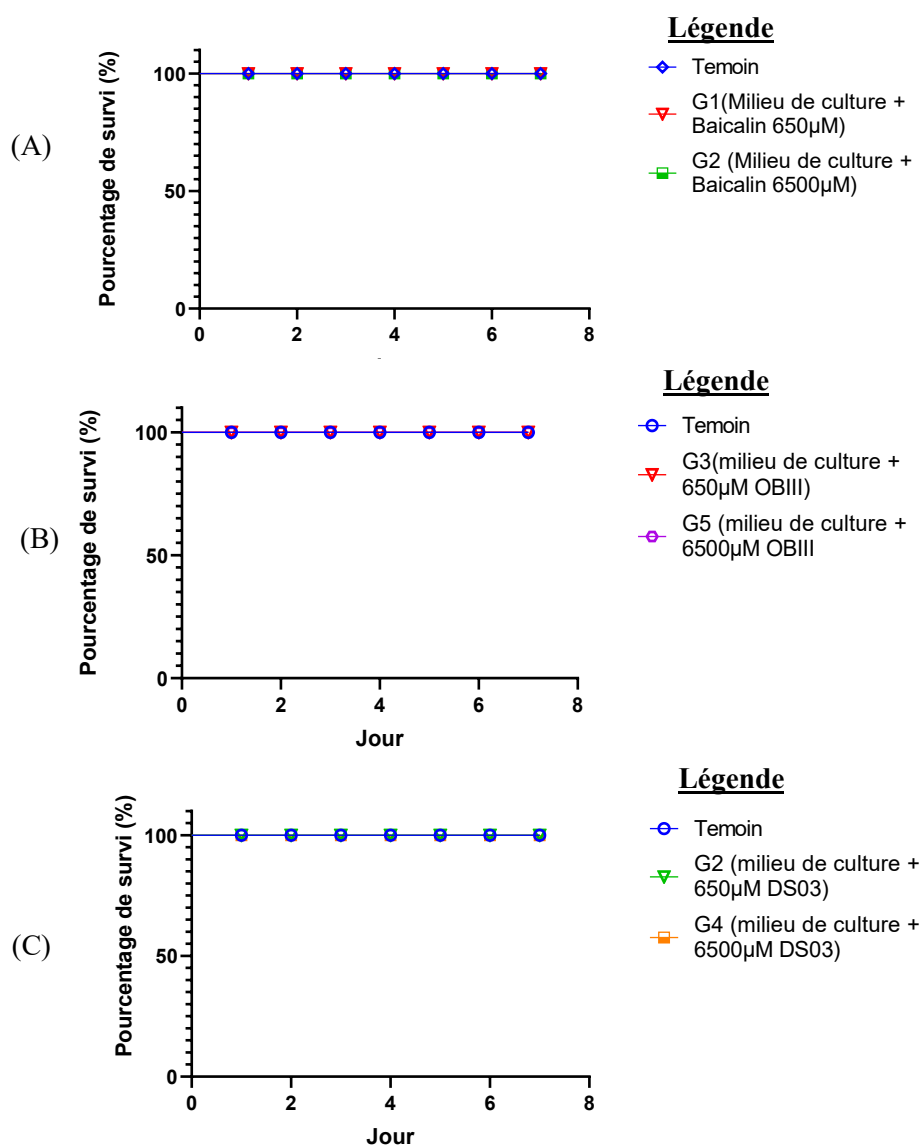


Figure 11 : Effet des concentrations des composés testés.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$.

Témoin : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans $AlCl_3$; **G1** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 650mM de baicaline pendant 7 jours ; **G2** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 6500mM de baicaline pendant 7 jours ; **G3** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 650mM de OBIII pendant 7 jours ; **G4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 650mM de DS03 pendant 7 jours ; **G5** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 6500mM de OBIII pendant 7 jours. **G6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 6500mM de DS03 pendant 7 jours.

La figure 12 A illustre la non-toxicité de la baicaline sur les drosophiles, où l'on observe un taux de survie maximal après 7 jours d'exposition dans leur alimentation. Les figures 11 B et 11 C démontrent également une terre de survie de 100% pour OBIII et DS03, respectivement, sur les drosophiles.

III.1.2.3. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la mobilité des drosophiles.

La figure 13 illustre l'effet des biflavonoïdes sur la mobilité des drosophiles, après une intoxication au chlorure d'aluminium pendant 3 jours suivie d'un traitement pendant 4 jours.

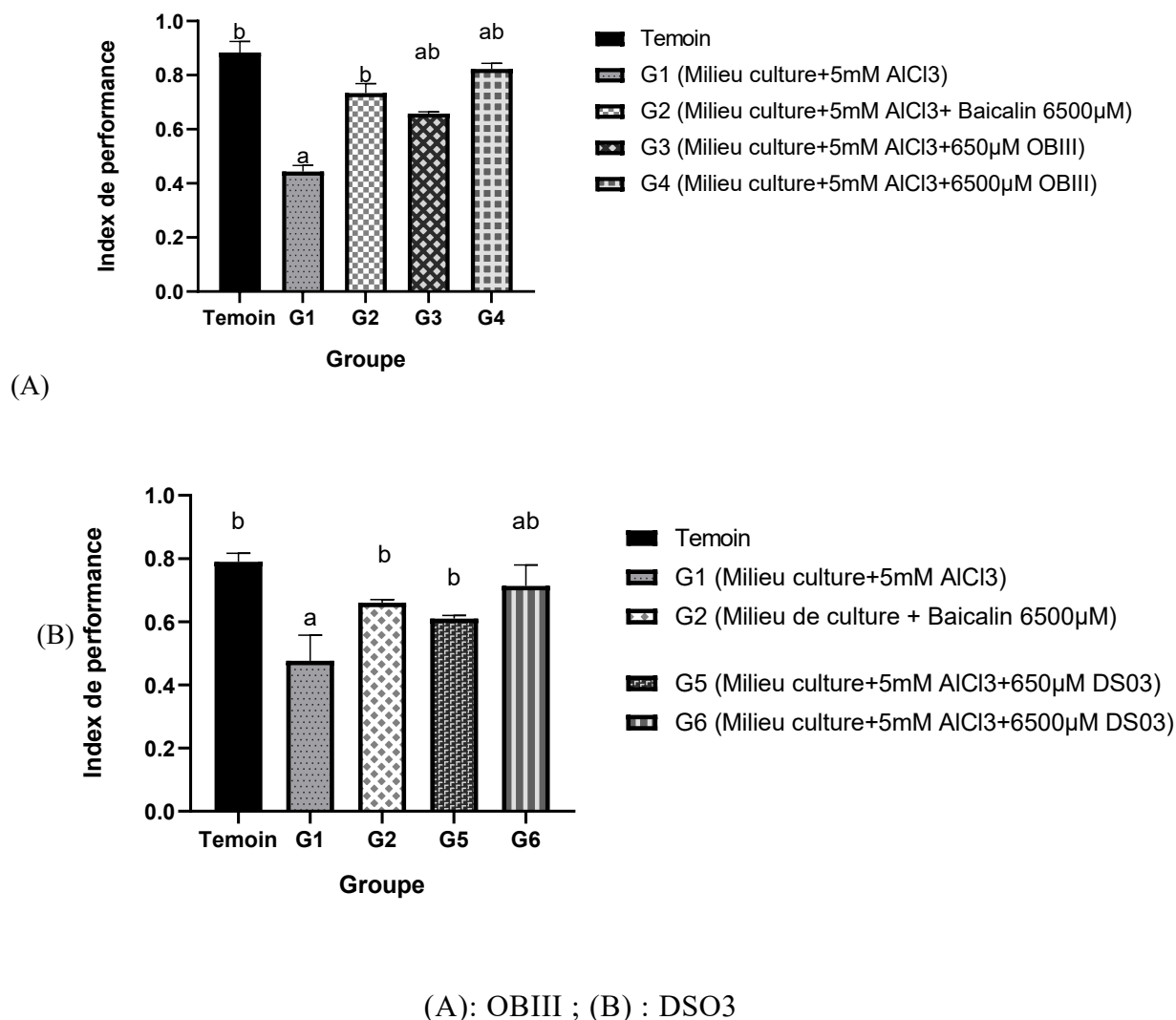


Figure 12 : Effet de OBIII et DS03 sur la mobilité des drosophiles.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$; $^{\#} p < 0,05$: différence significative comparé au G1.

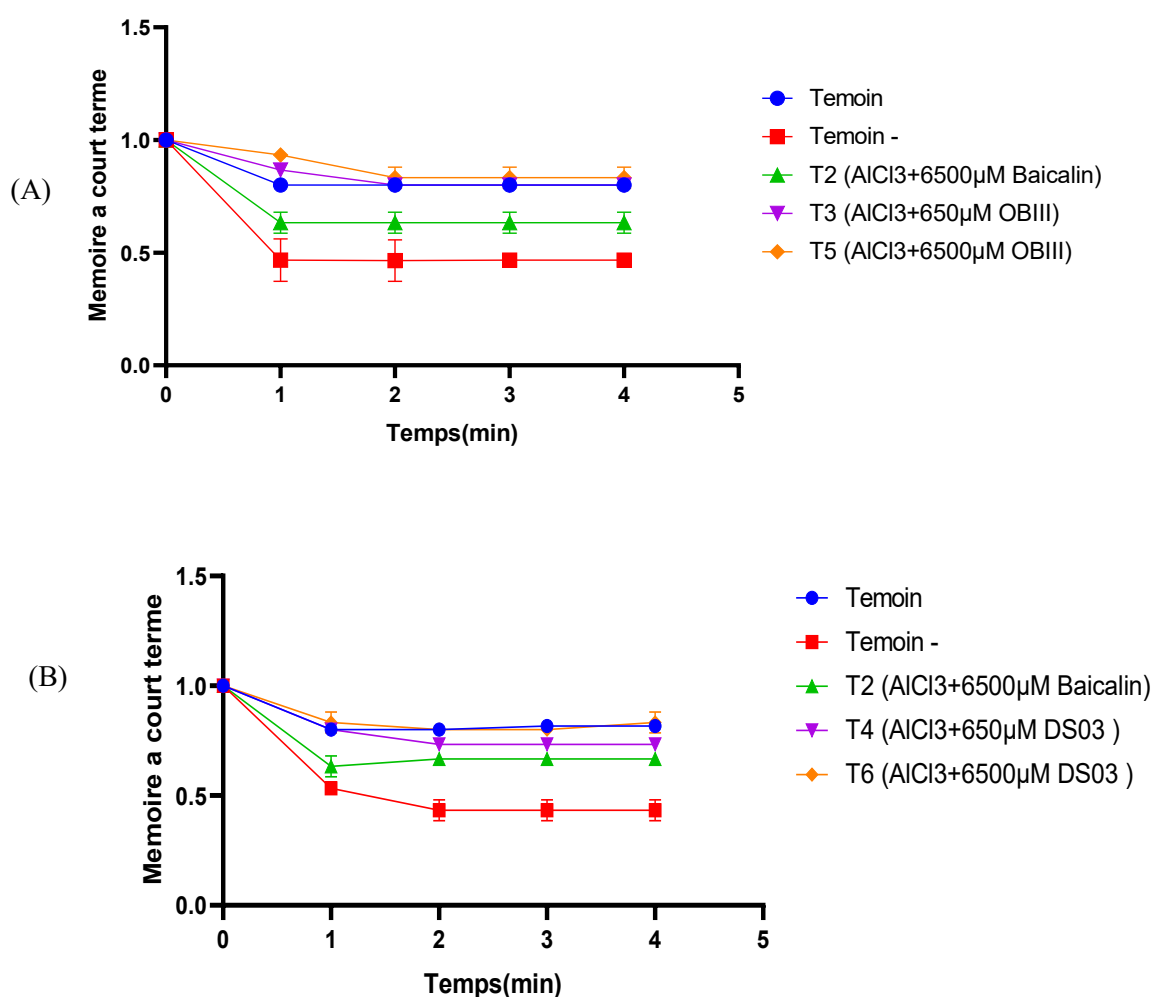
Témoin : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans $AlCl_3$; **G1 avec $AlCl_3$ 5mM** : groupe témoin négatif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$; **G2** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM de baicaline durant 4 jours ; **G3** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 650mM en OBIII durant 4 jours ; **G4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en OBIII durant 4 jours ; **G5** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 650mM en DS03 durant 4 jours ; **G6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours

La figure 12 illustre une augmentation de la mobilité des drosophiles dans les groupes traités avec les biflavonoïdes OBIII (figure 12 A) et DS03 (figure 12 B) par rapport au groupe témoin

négatif. En effet, nous constatons une augmentation significative ($p < 0,05$) entre le groupe non intoxiqué et celui intoxiqué avec du chlorure d'aluminium pour les deux groupes traités, avec des pics élevés en fonction de la concentration des biflavonoïdes utilisés.

III.1.2.4. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la mémoire à court terme chez les drosophiles.

La Figure 14 montre l'effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 respectivement sur la mémoire à court terme de drosophiles âgées de 3 à 5 jours, après une exposition au chlorure d'aluminium pendant 3 jours et un traitement pendant 4 jour consécutif.



(A): OBIII ; (B) : DS03

Figure 13 : Effets sur la mémoire à court terme des drosophiles des composés (A) OBIII et (B) DS03.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$.

Témoin : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans AlCl₃ ; **T1 avec AlCl₃ 5mM** : groupe témoin négatif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ ; **T2** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de baicaline durant 4 jours ; **T3** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 650mM en OBIII durant 4 jours ; **T4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 650mM en DS03 durant 4 jours ; **T5** : groupe ayant

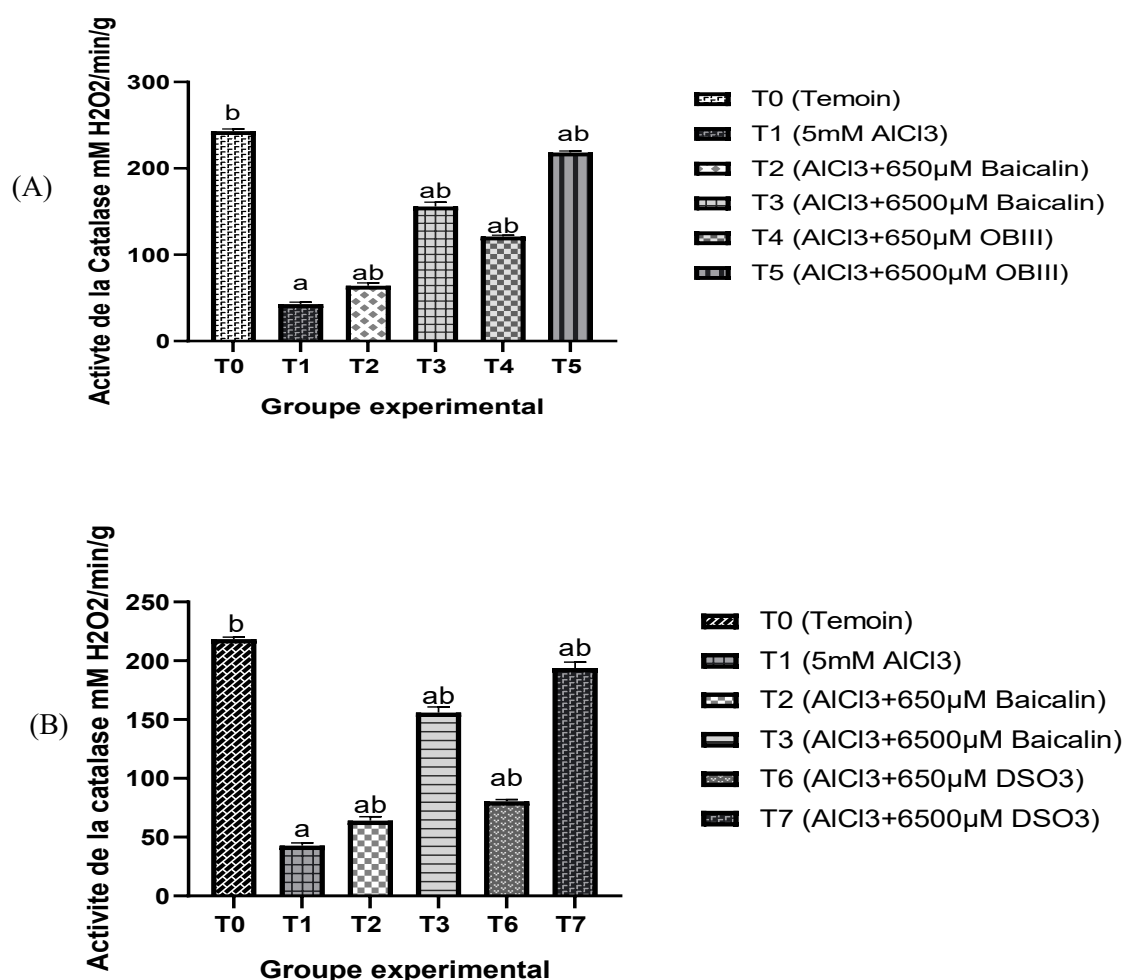
reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en OBIII durant 4 jours ; **T6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en DSO3 durant 4 jours.

Les figure 14 A et B montrent des graphes sur lesquels les courbes de la diminution (pente) de la mémoire à court terme des drosophiles intoxiqués et traités sont au-dessus des courbes des mouches intoxiquées et non traitées. Ce qui montre que la baicaline et les composés empêchent la perte de la mémoire due à l'intoxication au $AlCl_3$

III.1.3. Effet sur l'activité des enzymes des drosophiles

III.1.3.1. Effet des biflavonoïdes OBIII et DSO3 sur l'activité de la catalase

Les figure 15 A et 15 B ci-dessous représente les effets des biflavonoïdes sur l'activité de catalase.



(A) : OBIII ; (B) : DSO3

Figure 14 : Effet de OBIII et DSO3 sur l'activité de la catalase chez les drosophiles

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$; # $p < 0,05$: différence significative comparé au T1.

T0 : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans $AlCl_3$; **T1 avec $AlCl_3$ 5mM** : groupe témoin négatif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$; **T2** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 650mM de baicaline durant 4 jours ; **T3** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM de baicalin durant 4 jours ; **T4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en OBIII durant 4 jours ; **T5** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM de OBIII durant 4 jours ; **T6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours ; **T7** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM de DS03 durant 4 jours.

La figure 15 indique que les groupes traités avec les biflavonoïdes OBIII (figure 15 A) et DS03 (figure 15 B) présentent des différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin non intoxiqué, ainsi qu'au groupe témoin intoxiqué au chlorure d'aluminium. Cette différence se traduit par des pics d'activité de la catalase plus élevés dans les groupes traités avec les biflavonoïdes, en fonction de leur concentration, ce qui suggère une activité accrue de la catalase pour ces deux composés.

III.1.3.2. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la quantité de superoxyde dismutase

Les figure 16 A et B présentées ci-dessous illustre les effets des biflavonoïdes OBIII et DS03 respectivement sur les niveaux de SOD.

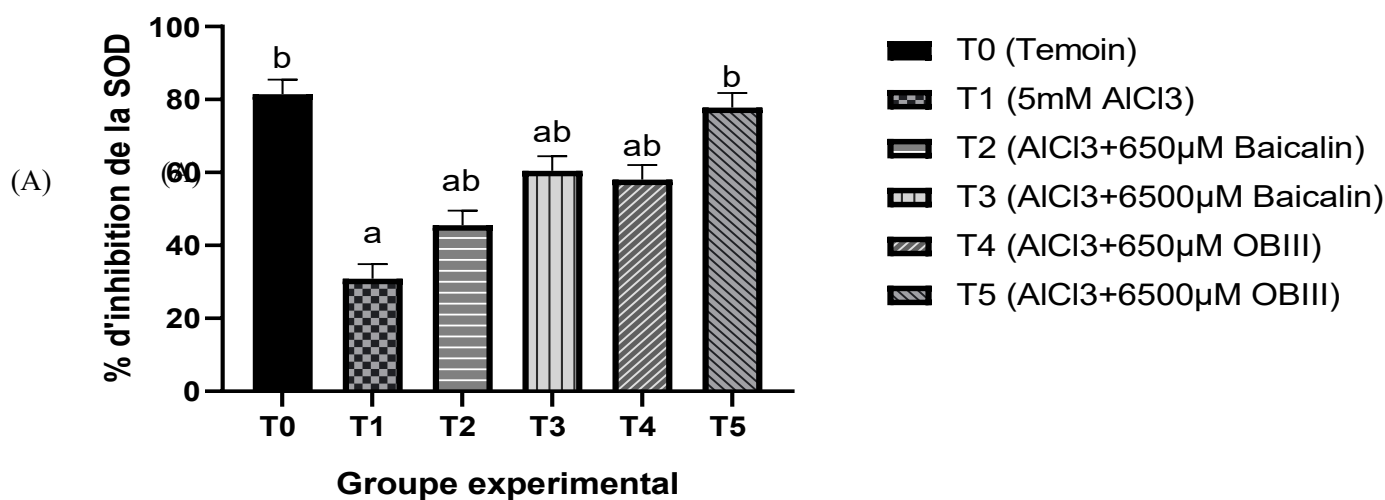
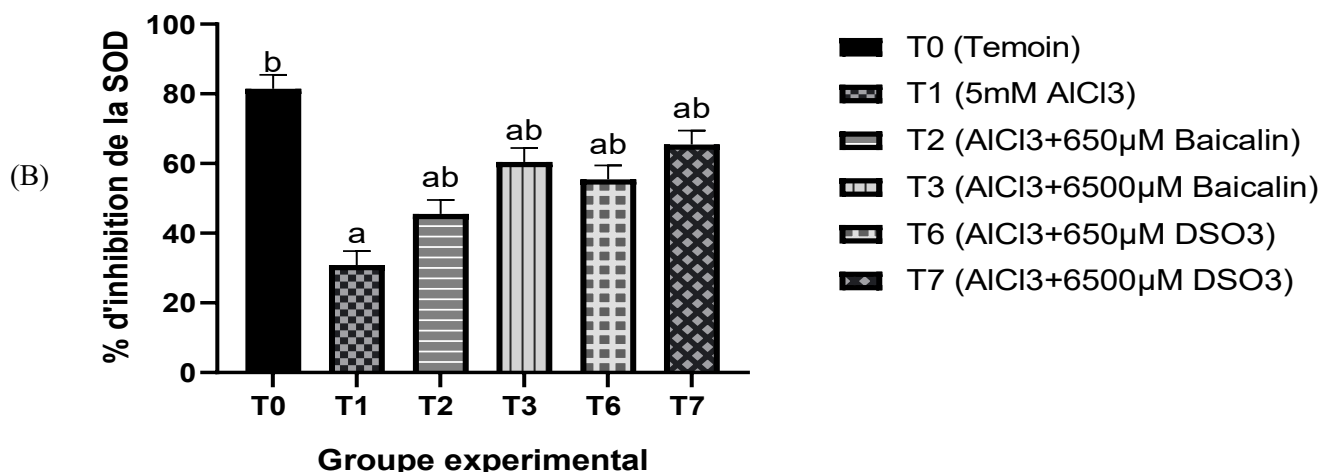


Figure 16 : effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur l'activité de la superoxyde dismutase chez les drosophiles



(A): OBIII ; (B) : DSO₃

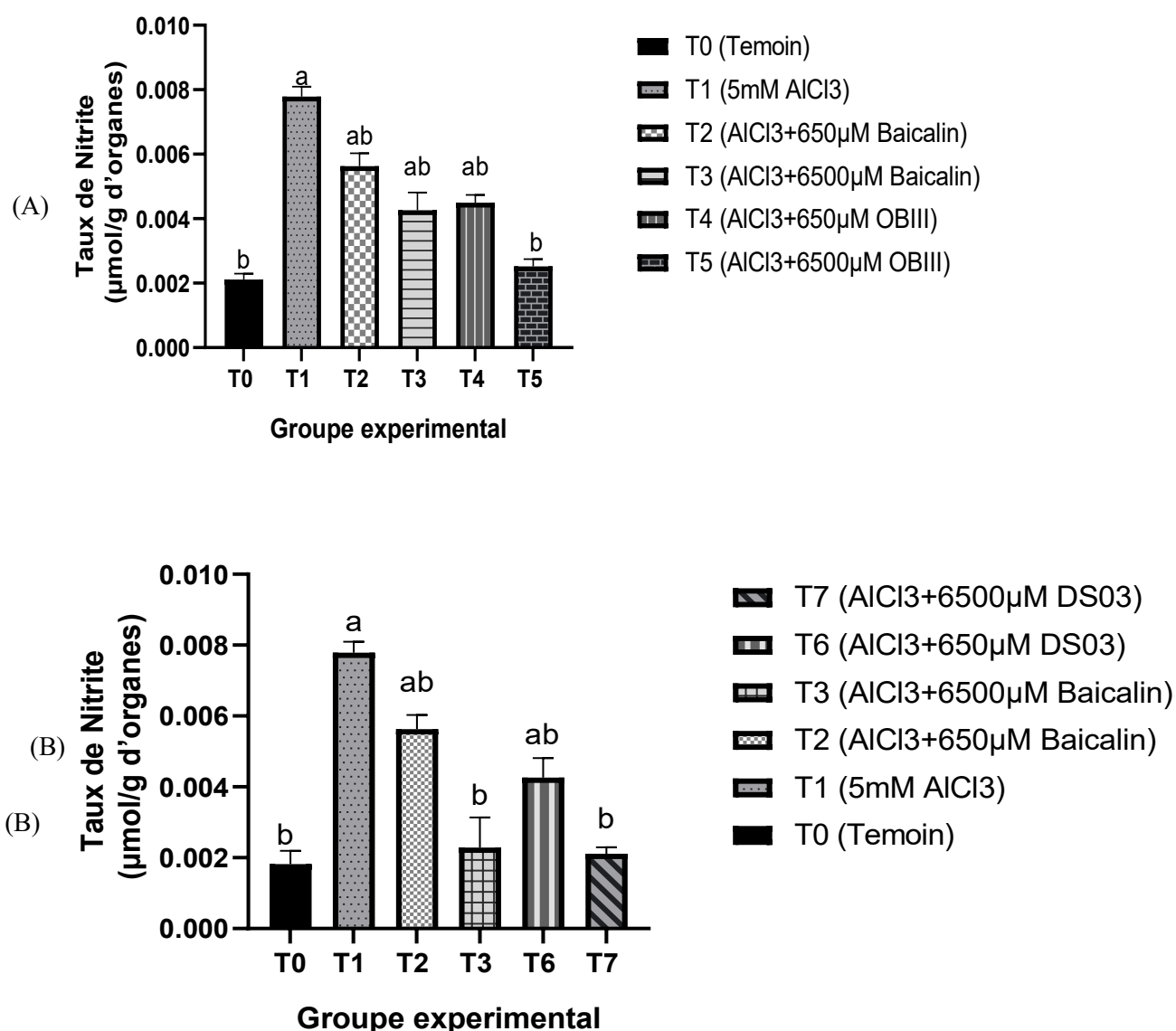
Figure 15 : effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur l'activité de la superoxyde dismutase chez les drosophiles (suite)

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$; # $p < 0,05$: différence significative comparé au T1.

T0 : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans AlCl₃ ; **T1 avec AlCl₃ 5mM** : groupe témoin négatif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ ; **T2** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 650mM de baicaline durant 4 jours ; **T3** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de baicaline durant 4 jours ; **T4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours ; **T5** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de DS03 durant 4 jours ; **T6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours ; **T7** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de DS03 durant 4 jours.

La figure 16 indique que les groupes traités avec les biflavonoïdes OBIII (figure 16 A) et DS03 (figure 16 B) présentent des différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin non intoxiqué, ainsi qu'au groupe témoin intoxiqué au chlorure d'aluminium. Ces différences se manifestent par des niveaux d'activité de la superoxyde dismutase (SOD) plus élevés dans les groupes traités avec les biflavonoïdes, en fonction de leur concentration, ce qui suggère une stimulation de l'activité de la SOD pour ces deux composés.

III.1.3.3. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur le taux de nitrites (NO)



Les figure 17 A et B ci-dessous mettent en évidence les effets des biflavonoïdes OBIII et DS03 respectivement sur les niveaux de nitrite d'oxyde.

(A): OBIII ; (B) : DS03

Figure 16 : Effet du biflavonoïdes OBIII sur le taux de nitrites chez les drosophiles

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$; $^{\#} p < 0,05$: différence significative comparé au T1.

T0 : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans AlCl₃ ; **T1 avec AlCl₃ 5mM** : groupe témoin négatif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ ; **T2** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 650mM de baicaline durant 4 jours ; **T3** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de baicalin durant 4 jours ; **T4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM en OBIII durant 4 jours ; **T5** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de OBIII durant 4 jours ; **T6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours ; **T7** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de DS03 durant 4 jours

La figure 17 illustre que les groupes traités avec les biflavonoïdes OBIII (figure 17 A) et DS03 (figure 17 B) montrent une diminution significative ($p < 0,05$) des niveaux de monoxyde d'azote (NO) par rapport au groupe témoin, qui a été intoxiqué avec du chlorure d'aluminium. Cette réduction est dépendante de la concentration de biflavonoïdes administrés, Nous observons une diminution des pics du niveau de NO dans les groupes traités indiquant que les biflavonoïdes exercent un effet curatif, contribuant ainsi à atténuer l'augmentation du NO provoquée par l'intoxication.

III.1.3.4. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la peroxydation lipidique

Les figure 18 A et B ci-dessous représentent les effets des biflavonoïdes OBIII et DS03 respectivement sur la peroxydation lipidique.

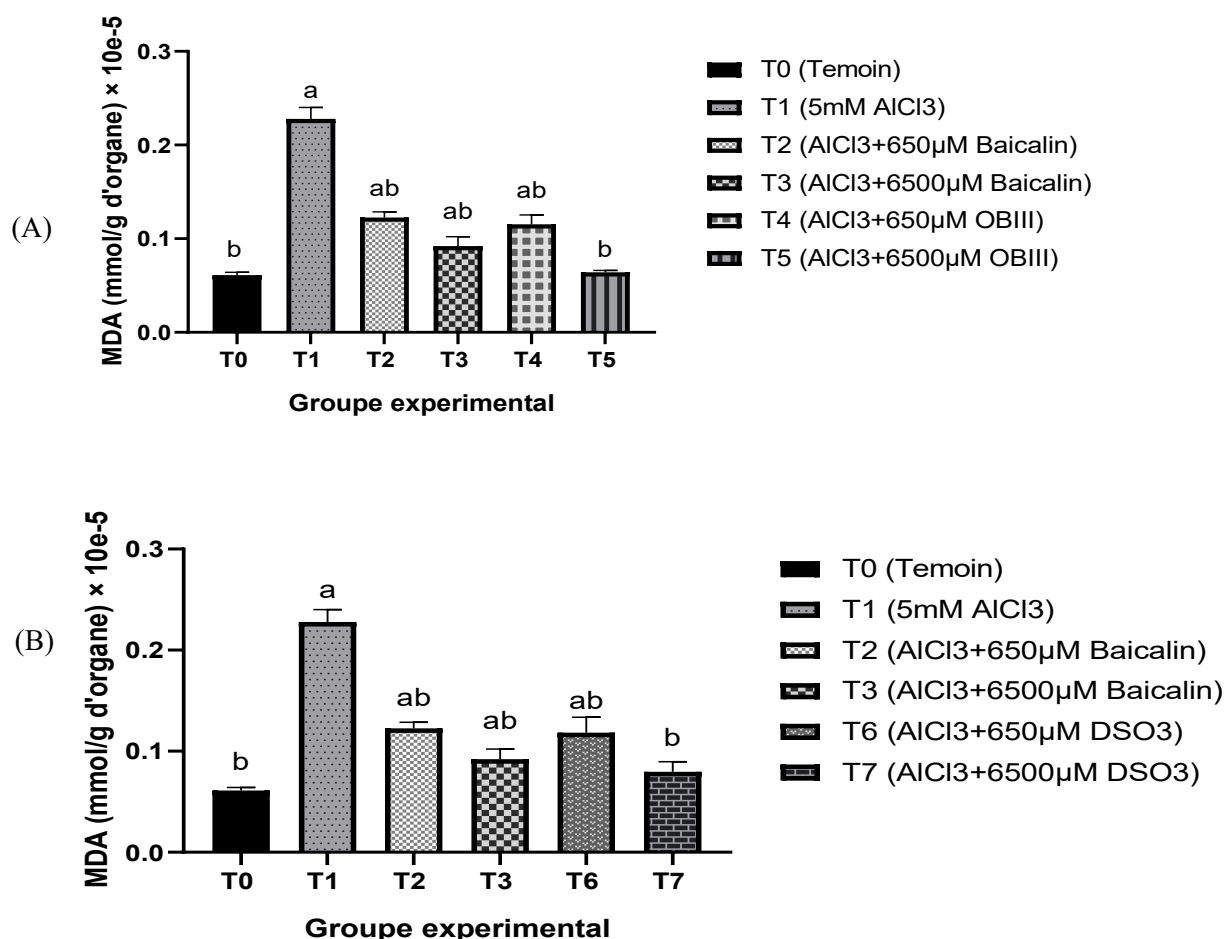


Figure 17 : Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la peroxydation lipidique chez les drosophiles

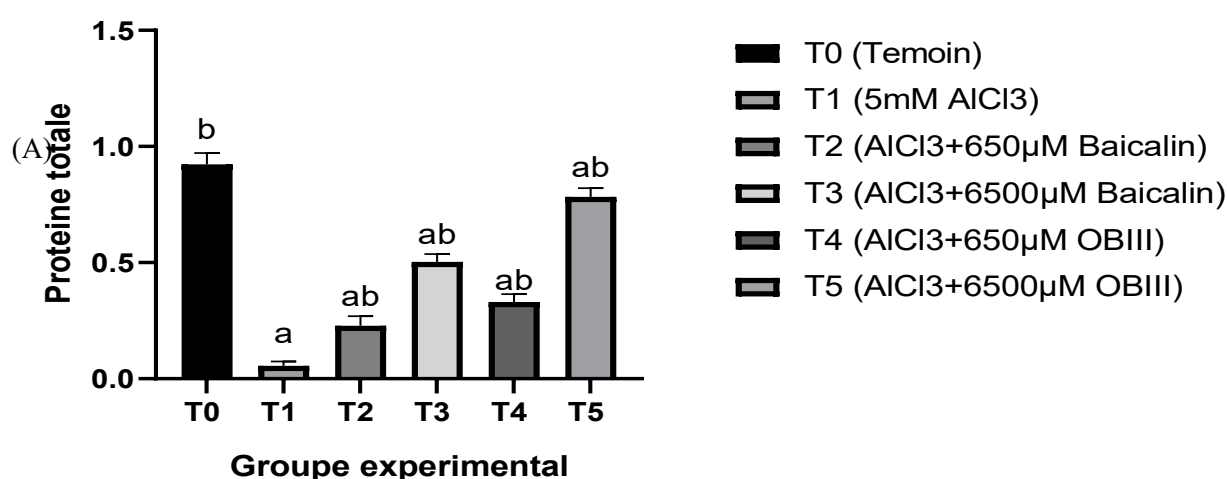
Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$; # $p < 0,05$: différence significative comparé au T1.

T0 : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans $AlCl_3$; **T1 avec $AlCl_3$ 5mM** : groupe témoin négatif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$; **T2** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 650mM de baicaline durant 4 jours ; **T3** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM de baicalin durant 4 jours ; **T4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours ; **T5** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM de DS03 durant 4 jours ; **T6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours ; **T7** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de $AlCl_3$ pendant 3 jours puis 6500mM de DS03 durant 4 jours.

La figure 18 montre que les groupes ayant reçu les biflavonoïdes OBIII (figure 18 A) et DS03 (figure 18 B) présentent une réduction significative ($p < 0,05$) des niveaux de malondialdéhyde (MDA) par rapport au groupe témoin, intoxiqué avec du chlorure d'aluminium. Cette diminution est dépendante de la concentration des biflavonoïdes administrés. On constate une baisse des niveaux de MDA dans les groupes traités, ce qui suggère que les biflavonoïdes ont un effet thérapeutique, aidant ainsi à réduire la peroxydation lipidique causée par l'intoxication.

III.1.3.5. Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la quantité de protéines totales

La figure 19 A et B ci-dessous représente les effets des biflavonoïdes OBIII et DS03 respectivement sur la quantité en protéines totales. Il en découle de celle-ci que les biflavonoides OBIII et DS03 ont significativement ($p < 0.001$) augmentés la quantité en protéines totales dans les groupes traités, comparativement au groupe T1 qui par contre présente un taux significativement bas en en protéines totales.



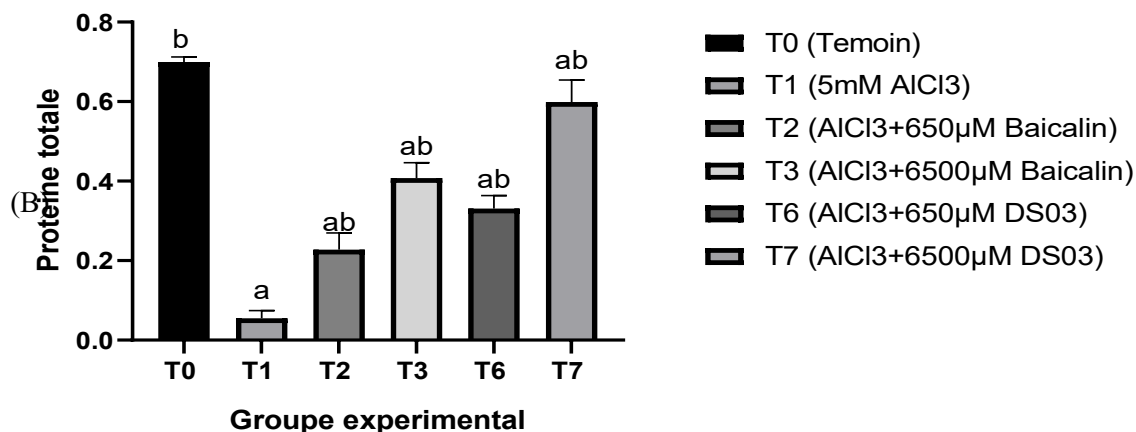


Figure 18 : Effet des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la quantité de protéine totale chez les drosophiles

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=3$; # $p < 0,05$: différence significative comparé au T1.

T0 : contrôle normal ayant reçu une alimentation standard sans AlCl₃ ; **T1 avec AlCl₃ 5mM** : groupe témoin négatif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ ; **T2** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 650mM de baicaline durant 4 jours ; **T3** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de baicalin durant 4 jours ; **T4** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM en OBIII durant 4 jours ; **T5** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de OBIII durant 4 jours ; **T6** : groupe ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM en DS03 durant 4 jours ; **T7** : groupe témoin positif ayant reçu une alimentation supplémentée de 5mM de AlCl₃ pendant 3 jours puis 6500mM de DS03 durant 4 jours

La figure 19 montre que les groupes traités avec les biflavonoïdes OBIII et DS03 présentent une augmentation significative ($p < 0,05$) des niveaux de protéines totales par rapport au groupe témoin, qui a été exposé à une intoxication au chlorure d'aluminium. Cette élévation est proportionnelle à la concentration des biflavonoïdes administrés. On constate ainsi une hausse des niveaux de protéines totales, illustrée par des pics élevés dans les groupes traités, ce qui suggère que les biflavonoïdes exercent un effet bénéfique en contribuant à restaurer les niveaux protéiques altérés par l'intoxication.

III.2. Discussion

L'exposition aux métaux environnementaux a été associée à la pathogenèse des troubles neurodégénératifs, notamment les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Jones et Bennett, 1986). L'aluminium, bien qu'il soit stable et ne participe normalement pas aux réactions d'oxydoréduction, a été lié au stress oxydatif par des études *in vitro* et *in vivo* (Kumar et Gill,

2009). Plusieurs effets toxiques de l'aluminium ont été observés dans des modèles animaux, qu'ils soient vertébrés ou invertébrés (**Nampoothiri et al., 2015**).

Plusieurs plantes, notamment pour leurs richesses en composés bioactifs comme les flavonoïdes ont montrée des effets potentiels contre la maladie d'Alzheimer a l'instar de la baicaline et la curcumine qui ont montré des effets thérapeutiques grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antidépressives et leurs inhibitions de l'activité de l'acétylcholinestérase (**Chen et al., 2015; Oyetayo et al., 2020a; Sowndhararajan et al., 2018**). Les biflavonoïdes, une classe de composés naturels présents dans diverses plantes, ont démontré un potentiel prometteur dans la lutte contre la maladie d'Alzheimer. Des études scientifiques récentes ont mis en lumière leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, deux mécanismes clés impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer. **Thapa et Chi, (2015)** ont confirmé les propriétés antioxydantes des biflavonoïdes, suggérant qu'ils pourraient contribuer à neutraliser les radicaux libres nocifs qui endommagent les cellules cérébrales. Par ailleurs, **Owona et al., (2024)** ont mis en évidence les effets anti-inflammatoires des biflavonoïdes, qui pourraient aider à réduire l'inflammation chronique dans le cerveau, un processus associé à la progression de la maladie d'Alzheimer.

La drosophile présente plusieurs avantages par rapport aux rongeurs pour l'étude des troubles neurodégénératifs. Son système nerveux est simple, sa durée de vie est courte, et sa reproduction rapide facilite les expériences génétiques (**Jeibmann & Paulus, 2009**). Elle est également utilisée pour étudier des maladies telle que la maladie d'Alzheimer (**Moloney et al., 2010**). Notre étude a exploré le potentiel curatif des biflavonoïdes issus de *Garcinia manni* Oliv., en utilisant une approche multiple. Premièrement, nous avons réalisé des analyses d'amarrage moléculaire *in silico* sur cinq biflavonoïdes (DS03, DS1, OB3B, DR03 et OBIII) pour identifier leurs interactions potentielles avec des cibles protéiques impliquées dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Ensuite, nous avons étudié *in vivo* l'effet de deux biflavonoïdes prometteurs, OBIII et DS03, sur le comportement locomoteur et la mémoire à court terme de drosophiles exposées au AlCl₃. Ce modèle de neurotoxicité induite par l'AlCl₃ chez la drosophile simule les effets neurotoxiques de l'aluminium, un métal lourd associé à la maladie d'Alzheimer. Enfin, nous avons analysé l'effet de ces biflavonoïdes sur des marqueurs biochimiques clés du stress oxydatif et de l'inflammation.

Les simulations de docking moléculaire ont révélé que tous les biflavonoïdes examinés présentent des affinités de liaison élevées pour plusieurs enzymes du système antioxydant, notamment la catalase et la superoxyde dismutase (SOD). En particulier, les biflavonoïdes ont démontré un effet sur la catalase (PDB : 1DGF) principalement par des interactions

hydrophobes, ainsi que par la formation de quatre liaisons hydrogène pour OBIII (résidus His364, Leu366, Arg365, Arg68) et aucune liaison hydrogène significative pour DS03. Concernant la SOD (PDB : 2SOD), des interactions significatives ont été observées pour les cinq biflavonoïdes (DS03, OBIII, DS1, OB6B et DR05), avec des scores de liaison surpassant ceux de la baicaline. Les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène observées sont notamment Arg141, Asn51 et Val7 pour DS03, et Ala87 pour OBIII. Ces observations sont en accord avec les résultats rapportés par **Singh et al., (2022)**, suggérant une affinité de liaison robuste et une activité inhibitrice notable de ces biflavonoïdes sur les enzymes antioxydantes ciblées.

Les biflavonoïdes ont également montré des interactions spécifiques sur la NO synthétase en raison de leurs interactions hydrophobes avec des résidus critiques du site actif de l'enzyme. En outre, les liaisons hydrogène formées avec les résidus Gln486, HEM_901, et IMD_902 pour OBIII, ainsi que Tyr367 et Arg375 pour DS03, semblent stabiliser l'interaction avec la synthase de NO, corroborant les observations rapportées par **Owona et al., (2022)**. Bien que OBIII et DS03 aient présenté une affinité de liaison modeste pour l'acétylcholine estérase (PDB : 4DBS) par rapport à la baicaline, leur affinité de liaison est néanmoins améliorée en raison d'interactions hydrophobes étendues et de liaisons hydrogène spécifiques, telles que Gln15 et Lys16 pour OBIII, et Lys160 pour DS03. Par ailleurs, pour l'amyloïde β synthétase (PDB : 1IYT), les biflavonoïdes ont montré des énergies de fixation plus favorables, bien que les interactions hydrophobes aient été moins prononcées. Une liaison hydrogène stable a été observée avec le résidu Ala87, indiquant une interaction avec OBIII, mais moins marquée que pour d'autres protéines. Ces résultats sont cohérents avec les données observées par d'autres auteurs (**Hira et al., 2020; Liu et al., 2019; Rasool et al., 2018; Singh et al., 2022**), suggérant que ces biflavonoïdes pourraient moduler l'activité de ces enzymes et conférer une protection contre le stress oxydatif, un facteur crucial dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (**Evans et al., 2021**). De plus, l'affinité de liaison des biflavonoïdes pour les enzymes impliquées dans la dégradation des peptides amyloïdes bêta ($A\beta$) et la régulation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur important pour la mémoire et la cognition, suggère leur potentiel à modifier la cascade amyloïde et à améliorer les fonctions cognitives (**Wang et al., 2020**).

L'exposition des drosophiles à 5mM d' $AlCl_3$ pendant 7 jours a induit une neurotoxicité significative, évaluée par la réduction de leur mobilité et l'altération de leur mémoire à court terme. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes qui ont démontré les effets neurotoxiques de l' $AlCl_3$ sur les drosophiles (**Haddadi et al., 2014; Oyetayo et al., 2020b;**

Saliu et al., 2024). L'administration des biflavonoïdes OBIII et DS03 pendant 4 jours après 3 jours d'intoxication au $AlCl_3$ a atténué la neurotoxicité induite par l' $AlCl_3$, suggérant leurs propriétés neuroprotectrices. En particulier, les biflavonoïdes DS03 et OBIII ont montrés une activité neuroprotectrice concentration-dépendante.

L'examen de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes a montré que les biflavonoïdes OBIII et DS03 influençaient l'activité de ces enzymes de manière significative. Ces biflavonoïdes ont entraîné une augmentation notable de l'activité de la catalase, de la superoxyde dismutase (SOD) et de la synthase de l'oxyde nitrique (NO). Ces observations indiquent que les biflavonoïdes pourraient renforcer les mécanismes de défense antioxydante des cellules, offrant ainsi une protection contre les dommages oxydatifs. Par ailleurs, les composés OBIII et DS03 ont entraîné une réduction substantielle des niveaux de malondialdéhyde (MDA), un indicateur clé du stress oxydatif, tout en augmentant les niveaux de protéines totales, ce qui suggère des effets bénéfiques sur la santé cellulaire et tissulaire. En outre, la diminution des niveaux de nitrite, un métabolite de l'oxyde nitrique, indique que les biflavonoïdes pourraient réduire la production d'oxyde nitrique, un aspect crucial pour la neuroprotection et la régulation de la vasodilatation ce qui est en phase avec les travaux de (**Singh et al., 2019).**

Les résultats de cette étude fournissent des preuves de l'activité curative des biflavonoïdes OBIII et DS03 isolés de *Garcinia manni oliv.*, qui ont montré une affinité de liaison pour les enzymes clés du système antioxydant et ont modulé leur activités, améliorant les défenses antioxydantes des cellules. De plus, ils ont atténué la neurotoxicité induite par l' $AlCl_3$, améliorant les performances cognitives chez les drosophiles. Ces résultats suggèrent qu'ils pourraient constituer des candidats prometteurs pour le développement de traitements contre la maladie d'Alzheimer. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'efficacité et la sécurité de ceux-ci chez des modèles animaux et humains.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1. Conclusion

Parvenu au terme de cette étude portant sur l'effet de biflavonoïdes isolés de *Garcinia manni* sur un modèle de drosophile sauvage de la maladie d'Alzheimer, il en ressort que :

- Les cinq biflavonoïdes étudiés (OBIII, DR05, OB6B, DS1, DS03) présentent une affinité de liaison significativement meilleure que la baicaline pour les enzymes antioxydantes catalase et SOD, suggérant que ces composés pourraient interagir sur ces enzymes d'où leurs potentiel antioxydant accru. De plus, ces biflavonoïdes OB3B et DS1 montrent une affinité de liaison favorable à la NO synthase, indiquant un potentiel de modulation de la voie du monoxyde d'azote. Bien que l'OBIII présente une affinité comparable à celle de la baicaline pour la NO synthase et l'acétylcholine estérase, les autres biflavonoïdes affichent des affinités de liaison prometteuses à ces enzymes, suggérant un potentiel d'interaction avec les systèmes de neurotransmission et de régulation du stress oxydatif.
- Les biflavonoïdes OBIII et DS03 possèdent un potentiel curatif significatif chez les drosophiles exposées à 5mM d'AlCl₃. Ces biflavonoïdes ont amélioré la mobilité et la mémoire à court terme des drosophiles de manière dose-dépendante, suggérant qu'ils pourraient moduler les voies neurobiologiques impliquées dans ces fonctions.
- Les biflavonoïdes OBIII et DS03 ont montré une augmentation de l'activité des enzymes du système antioxydant (SOD et Catalase), le taux de NO et des protéines totales ainsi qu'une diminution de la peroxydation lipidique.

Les biflavonoïdes OBIII et DS03 pourrait judicieusement être de bon candidats médicaments pour le traitement de la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives.

IV.2. Perspectives

Dans un futur proche, nous engageons compléter ce travail en :

- Déterminant comment l'expression moléculaire du gène de l'acétylcholinestérase est modulée chez des modèles de drosophiles atteints de la maladie d'Alzheimer et traités avec les biflavonoïdes.
- Détermination l'effet curatif des biflavonoïdes OBIII et DS03 sur la clairance des agrégats de protéines amyloïdes chez les drosophiles intoxiquées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adedayo, B. C., Ogunsuyi, O. B., Akinniyi, S. T., & Oboh, G. (2022).** Effect of *Andrographis paniculata* and *Phyllanthus amarus* leaf extracts on selected biochemical indices in *Drosophila melanogaster* model of neurotoxicity. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(1), 407-416.
- Ahmad, S., Jo, M. H., Ikram, M., Khan, A., & Kim, M. O. (2021).** Deciphering the Potential Neuroprotective Effects of Luteolin against A β 1-42-Induced Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9583.
- Aisen, P. S., Cummings, J., Jack, C. R., Morris, J. C., Sperling, R., Frölich, L., Jones, R. W., Dowsett, S. A., Matthews, B. R., Raskin, J., Scheltens, P., & Dubois, B. (2017).** On the path to 2025 : Understanding the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's Research & Therapy*, 9, 60.
- Alkandari, A. F., Madhyastha, S., & Rao, M. S. (2023).** N-Acetylcysteine Amide against A β -Induced Alzheimer's-like Pathology in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12733.
- Ao, A., Kd, F., Ce, I., M, A., & Eo, F. (2020).** Curcumin attenuates copper-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology reports*, 7.
- Bakulski, K. M., Seo, Y. A., Hickman, R. C., Brandt, D., Vadari, H. S., Hu, H., & Park, S. K. (2020).** Heavy Metals Exposure and Alzheimer's Disease and Related Dementias. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 76(4), 1215-1242.
- Bateman, R. J., Aisen, P. S., De Strooper, B., Fox, N. C., Lemere, C. A., Ringman, J. M., Salloway, S., Sperling, R. A., Windisch, M., & Xiong, C. (2011).** Autosomal-dominant Alzheimer's disease : A review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 3(1), 1.
- Bitencourt-Ferreira, G., & de Azevedo, W. F. (2019).** Molegro Virtual Docker for Docking. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2053, 149-167.
- Bondy, S. C. (2016).** Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. *Neurotoxicology*, 52, 222-229.
- Bouleau, S., & Tricoire, H. (2015).** *Drosophila* models of Alzheimer's disease : Advances, limits, and perspectives. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 45(4), 1015-1038.
- Busto, G. U., Cervantes-Sandoval, I., & Davis, R. L. (2010).** Olfactory Learning in *Drosophila*. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(6), 338-346.
- Cai, Y., Chai, Y., Fu, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Zhu, L., Miao, M., & Yan, T. (2022).** Salidroside Ameliorates Alzheimer's Disease by Targeting NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 809433.
- Chen, C., Li, X., Gao, P., Tu, Y., Zhao, M., Li, J., Zhang, S., & Liang, H. (2015a).** Baicalin attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by amyloid β 1-42 protein. *Metabolic Brain Disease*, 30(2), 537-544.

Crichton, E. G., & Waterman, P. G. (1979). Manniflavanone, a new 3,8-linked flavanone dimer from the stem bark of *Garcinia mannii*. *Phytochemistry*, 18(9), 1553-1557.

Dawood, S., Zarina, S., & Bano, S. (2014). Docking studies of antidepressants against single crystal structure of tryptophan 2, 3-dioxygenase using Molegro Virtual Docker software. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5 Spec no), 1529-1539.

Delrieu, J., & Vellas, B. (2020). Les nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 204(3), 237-247.

Dhenain, M., & Hantraye, P. (2008). IRM et TEP de modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. *Journal de Radiologie*, 89(10), 1516-1517.

Eratne, D., Loi, S. M., Farrand, S., Kelso, W., Velakoulis, D., & Looi, J. C. (2018). Alzheimer's disease: Clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australasian Psychiatry*, 26(4), 347-357.

Erickson, M. A., & Banks, W. A. (2013). Blood–Brain Barrier Dysfunction as a Cause and Consequence of Alzheimer's Disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(10), 1500-1513.

Escott-Price, V., Sims, R., Bannister, C., Harold, D., Vronskaya, M., Majounie, E., Badarinarayan, N., GERAD/PERADES, IGAP consortia, Morgan, K., Passmore, P., Holmes, C., Powell, J., Brayne, C., Gill, M., Mead, S., Goate, A., Cruchaga, C., Lambert, J.-C., ... Williams, J. (2015). Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain*, 138(12), 3673-3684.

Exley, C. (1999). A molecular mechanism of aluminium-induced Alzheimer's disease? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 76(2), 133-140. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00125-7)

Exley, C. (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(3), 380-387. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.017>

Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Balialetti, M., Mocchegiani, E., Scancar, J., Zambenedetti, P., & Zatta, P. (2003). The effect of chronic aluminum(III) administration on the nervous system of aged rats: Clues to understand its suggested role in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 5(6), 437-444.

Fernandez-Funez, de M., & De, R.-L. (2015). Modeling the complex pathology of Alzheimer's disease in *Drosophila*. *Experimental neurology*, 274.

Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(7), 13384-13421.

Haddadi, M., Jahromi, S. R., Sagar, B. K. C., Patil, R. K., Shivanandappa, T., & Ramesh, S. R. (2014). Brain aging, memory impairment and oxidative stress: A study in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural Brain Research*, 259, 60-69.

Han, S., Lemire, J., Appanna, V. P., Auger, C., Castonguay, Z., & Appanna, V. D. (2013). How aluminum, an intracellular ROS generator promotes hepatic and neurological diseases: The metabolic tale. *Cell Biology and Toxicology*, 29(2), 75-84.

Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease : Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356.

Harris, W. R., Berthon, G., Day, J. P., Exley, C., Flaten, T. P., Forbes, W. F., Kiss, T., Orvig, C., & Zatta, P. F. (1996). Speciation of aluminum in biological systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48(6), 543-568.

Hawash, Z. A. S., Yassien, E. M., Alotaibi, B. S., El-Moslemany, A. M., & Shukry, M. (2023). Assessment of Anti-Alzheimer Pursuit of Jambolan Fruit Extract and/or Choline against AlCl₃ Toxicity in Rats. *Toxics*, 11(6), 509.

Hill, J. M., Percy, M. E., & Lukiw, W. J. (2020). Early insight into the potential contribution of aluminum to neurodegeneration—A tribute to the research work of Robert D. Terry, Igor Klatzo, Henryk M. Wisniewski and Donald R.C. McLachlan. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 203, 110860.

Hira, S., Saleem, U., Anwar, F., Raza, Z., Rehman, A. U., & Ahmad, B. (2020). In Silico Study and Pharmacological Evaluation of Eplerinone as an Anti-Alzheimer's Drug in STZ-Induced Alzheimer's Disease Model. *ACS Omega*, 5(23), 13973-13983.

Hu, Q., Hou, S., Xiong, B., Wen, Y., Wang, J., Zeng, J., Ma, X., & Wang, F. (2023). Therapeutic Effects of Baicalin on Diseases Related to Gut–Brain Axis Dysfunctions. *Molecules*, 28(18).

Huat, T. J., Camats-Perna, J., Newcombe, E. A., Valmas, N., Kitazawa, M., & Medeiros, R. (2019). Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *Journal of molecular biology*, 431(9), 1843-1868.

Ishola, I., Afolayan, O., Badru, A., Olubodun-obadun, T., John, N., & Adeyemi, O. (2022). Angiotensin converting enzyme inhibitor captopril prevents neuronal overexpression of amyloid-beta and alpha-synuclein in *Drosophila melanogaster* genetic models of neurodegenerative diseases. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 37(1).

Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Aisen, P. S., Shaw, L. M., Vemuri, P., Wiste, H. J., Weigand, S. D., Lesnick, T. G., Pankratz, V. S., Donohue, M. C., & Trojanowski, J. Q. (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease : An updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *The Lancet. Neurology*, 12(2), 207-216.

Johnson, V. J., Tsunoda, M., Murray, T. F., & Sharma, R. P. (2005). Decreased membrane fluidity and hyperpolarization in aluminum-treated PC-12 cells correlates with increased production of cellular oxidants. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(2), 221-230.

Kaneko, N., Sugioka, T., & Sakurai, H. (2007). Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes : Insight into cellular damage caused by oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(6), 967-975.

Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77(1), 43-51.

Kawahara, M. (2005). Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 8(2), 171-182.

- Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020).** Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 18(11), 1106-1125.
- Kumar, V., & Gill, K. D. (2014).** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration : A review. *Neurotoxicology*, 41, 154-166.
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012).** Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), 6320.
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018).** Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), 59-70.
- Lashley, T., Schott, J. M., Weston, P., Murray, C. E., Wellington, H., Keshavan, A., Foti, S. C., Foiani, M., Toombs, J., Rohrer, J. D., Heslegrave, A., & Zetterberg, H. (2018).** Molecular biomarkers of Alzheimer's disease : Progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms*, 11(5).
- Lee, D., Clark, E. D., Antonsdottir, I. M., & Porsteinsson, A. P. (2023).** A 2023 update on the advancements in the treatment of agitation in Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 24(6), 691-703.
- Lenz, S., Karsten, P., Schulz, J. B., & Voigt, A. (2013).** Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*, 127(4), 453-460.
- Leuthold, R. (2023).** De nouvelles voies dans la lutte contre l'Alzheimer. *Bulletin des médecins suisses*, 104(0102), 76-77.
- Li, X.-L., Hu, N., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2014).** Behavioral and Psychological Symptoms in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2014, e927804.
- Li, Y., Zhao, J., & Hölscher, C. (2017).** Therapeutic Potential of Baicalein in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, 31(8), 639-652.
- Liu, J.-L., Fan, Y.-G., Yang, Z.-S., Wang, Z.-Y., & Guo, C. (2018).** Iron and Alzheimer's Disease : From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 632.
- Liu, S., Cao, X.-L., Liu, G.-Q., Zhou, T., Yang, X.-L., & Ma, B.-X. (2019).** The in silico and in vivo evaluation of puerarin against Alzheimer's disease. *Food & Function*, 10(2), 799-813.
- Maitre, M., Klein, C., & Mensah-Nyagan, A. G. (2017).** Mécanismes, facteurs de risque et stratégies thérapeutiques dans la maladie d'Alzheimer. *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie*, 17(102), 352-364.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004).** Polyphenols : Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Massi, D. G., Aretoutap, M. A., Kenmegne, C., & Mapoure, Y. N. (2020).** Épidémiologie hospitalière des démences à Douala, Cameroun. *Revue neurologique*, 176, S3.
- Max, W. (1993).** The economic impact of Alzheimer's disease. *Neurology*, 43, S6-S10.
- Muñoz Fernández, S. S., & Lima Ribeiro, S. M. (2018).** Nutrition and Alzheimer Disease. *Clinics in Geriatric Medicine*, 34(4), 677-697.

Nampoothiri, M., John, J., Kumar, N., Mudgal, J., Nampurath, G. K., & Chamallamudi, M. R. (2015). Modulatory Role of Simvastatin against Aluminium Chloride-Induced Behavioural and Biochemical Changes in Rats. *Behavioural Neurology*, 2015, 210169.

Ogunsuyi, O. B., Aro, O. P., Oboh, G., & Olagoke, O. C. (2023). Curcumin improves the ability of donepezil to ameliorate memory impairment in *Drosophila melanogaster*: Involvement of cholinergic and cnc/Nrf2-redox systems. *Drug and Chemical Toxicology*, 46(5), 1035-1043.

Ogunsuyi, O. B., Oboh, G., Özek, G., & Göger, F. (2021). Solanum vegetable-based diets improve impairments in memory, redox imbalance, and altered critical enzyme activities in *Drosophila melanogaster* model of neurodegeneration. *Journal of Food Biochemistry*, 45(3), 13150.

Owona, B. A., Mary, A., Messi, A. N., Ravichandran, K. A., Mbing, J. N., Pegnyemb, E., Moundipa, P. F., & Heneka, M. T. (2024). Biflavonoid Methylchamaejasmin and Khaya grandifoliola Extract Inhibit NLRP3 Inflammasome in THP-1 Cell Model of Neuroinflammation. *Molecular Neurobiology*.

Owona, B. A., Njayou, F. N., Mkouna, P., & Moundipa, P. F. (2022). Khaya grandifoliola active fraction as a source of therapeutic compounds for Alzheimer's disease treatment: In silico validation of identified compounds. *In Silico Pharmacology*, 10(1), 11.

Oyetayo, B. O., Abolaji, A. O., Fasae, K. D., & Aderibigbe, A. (2020a). Ameliorative role of diets fortified with Curcumin in a *Drosophila melanogaster* model of aluminum chloride-induced neurotoxicity. *Journal of Functional Foods*, 71, 104035.

Oyetayo, B. O., Abolaji, A. O., Fasae, K. D., & Aderibigbe, A. (2020b). Ameliorative role of diets fortified with Curcumin in a *Drosophila melanogaster* model of aluminum chloride-induced neurotoxicity. *Journal of Functional Foods*, 71, 104035.

Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4331.

Preux, P.-M., Guerchet, M., Ndamba-Bandzouzi, B., Mbelesso, P., Pilleron, S., Désormais, I., Lacroix, P., Aboyans, V., Desport, J.-C., Jésus, P., Tchalla, A., Marin, B., Clément, J.-P., Lambert, J.-C., & Dartigues, J.-F. (2015). Épidémiologie des démences en Afrique sub-saharienne. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 199(7), 1187-1197.

Rahul, null, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2020). Effect of kaempferol on the transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 10(1), 13793.

Rasool, M., Malik, A., Waquar, S., Tul-Ain, Q., Jafar, T. H., Rasool, R., Kalsoom, A., Ghafoor, M. A., Sehgal, S. A., Gauthaman, K., Naseer, M. I., Al-Qahtani, M. H., & Pushparaj, P. N. (2018). In-Silico Characterization and in-Vivo Validation of Albiziasaponin-A, Iso-Orientin, and Salvadorin Using a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 9.

Ravula, A. R., Teegala, S. B., Kalakotla, S., Pasangulapati, J. P., Perumal, V., & Boyina, H. K. (2021). Fisetin, potential flavonoid with multifarious targets for treating neurological disorders: An updated review. *European Journal of Pharmacology*, 910, 174492.

Reynolds, A., Laurie, C., Lee Mosley, R., & Gendelman, H. E. (2007). Oxidative Stress and the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 82, p. 297-325).

Rorabaugh, J. M., Chalermpananupap, T., Botz-Zapp, C. A., Fu, V. M., Lembeck, N. A., Cohen, R. M., & Weinshenker, D. (2017). Chemogenetic locus coeruleus activation restores reversal learning in a rat model of Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 140(11), 3023-3038.

Ruipérez, F., Mujika, J. I., Ugalde, J. M., Exley, C., & Lopez, X. (2012). Pro-oxidant activity of aluminum : Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 118-123.

Sahakian, B. J., Bruhl, A. B., Cook, J., Killikelly, C., Savulich, G., Piercy, T., Hafizi, S., Perez, J., Fernandez-Egea, E., Suckling, J., & Jones, P. B. (2015). The impact of neuroscience on society : Cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders and in healthy people. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1677), 20140214.

Saliu, J. A., Olajuyin, A. M., & Olowolayemo, S. F. (2024). Ameliorative role of diets fortified with Artocarpus altilis in a Drosophila melanogaster model of aluminum chloride-induced neurotoxicity. *Clinical Phytoscience*, 10(1), 2.

Sánchez-Iglesias, S., Méndez-Alvarez, E., Iglesias-González, J., Muñoz-Patiño, A., Sánchez-Sellero, I., Labandeira-García, J. L., & Soto-Otero, R. (2009). Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain : Potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 109(3), 879-888.

Sebbar, E.-H., Naji, I., El Mezgueldi, I., & Choukri, M. (2023). Le stress oxydatif, une agression cellulaire. *Actualités Pharmaceutiques*, 62(626), 36-37.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), 006189.

Siima, A. A., Stephano, F., Munissi, J. J. E., & Nyandoro, S. S. (2020). Ameliorative effects of flavonoids and polyketides on the rotenone induced Drosophila model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 81, 209-215.

Silva, V. S., Cordeiro, J. M., Matos, M. J., Oliveira, C. R., & Gonçalves, P. P. (2002). Aluminum accumulation and membrane fluidity alteration in synaptosomes isolated from rat brain cortex following aluminum ingestion : Effect of cholesterol. *Neuroscience Research*, 44(2), 181-193.

Singh, S. K., Srivastav, S., Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2019). Neuroprotective and Antioxidant Effect of Ginkgo biloba Extract Against AD and Other Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*, 16(3), 666-674.

Singh, Y. P., Kumar, N., Priya, K., Chauhan, B. S., Shankar, G., Kumar, S., Singh, G. K., Srikrishna, S., Garg, P., Singh, G., Rai, G., & Modi, G. (2022). Exploration of Neuroprotective Properties of a Naturally Inspired Multifunctional Molecule (F24) against

Oxidative Stress and Amyloid β Induced Neurotoxicity in Alzheimer's Disease Models. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(1), 27-42.

Sodhi, R. K., & Singh, N. (2013). Liver X receptors : Emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 72, 45-51.

Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 231-255.

Sowndhararajan, K., Deepa, P., Kim, M., Park, S. J., & Kim, S. (2018). Neuroprotective and Cognitive Enhancement Potentials of Baicalin : A Review. *Brain Sciences*, 8(6), 104.

Spagnuolo, C., Moccia, S., & Russo, G. L. (2018a). Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 153, 105-115.

Tan, C.-C., Yu, J.-T., & Tan, L. (2014). Biomarkers for preclinical Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 42(4), 1051-1069. <https://doi.org/10.3233/JAD-140843>

Thapa, A., & Chi, E. Y. (2015). Biflavonoids as Potential Small Molecule Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 863, 55-77.

Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock : A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3315-3321.

Uddin, M. S., Kabir, M. T., Niaz, K., Jeandet, P., Clément, C., Mathew, B., Rauf, A., Rengasamy, K. R. R., Sobarzo-Sánchez, E., Ashraf, G. M., & Aleya, L. (2020). Molecular Insight into the Therapeutic Promise of Flavonoids against Alzheimer's Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1267.

Villemagne, V. L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K. A., Salvado, O., Szoëke, C., Macaulay, S. L., Martins, R., Maruff, P., Ames, D., Rowe, C. C., Masters, C. L., & Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Research Group. (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease : A prospective cohort study. *The Lancet. Neurology*, 12(4), 357-367.

Walton, J. R. (2013). Aluminum involvement in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 35(1), 7-43.

Ward, R. J., Zhang, Y., & Crichton, R. R. (2001). Aluminium toxicity and iron homeostasis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 87(1-2), 9-14.

Weiner, M. W., Veitch, D. P., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Cairns, N. J., Cedarbaum, J., Green, R. C., Harvey, D., Jack, C. R., Jagust, W., Luthman, J., Morris, J. C., Petersen, R. C., Saykin, A. J., Shaw, L., Shen, L., Schwarz, A., Toga, A. W., Trojanowski, J. Q., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2015). 2014 Update of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative : A review of papers published since its inception. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 11(6), e1-120.

Wu, Z., Du, Y., Xue, H., Wu, Y., & Zhou, B. (2012a). Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging*, 33(1), 199.1-12.

Yang, L., Wu, C., Parker, E., Li, Y., Dong, Y., Tucker, L., Brann, D. W., Lin, H. W., & Zhang, Q. (2022). Non-invasive photobiomodulation treatment in an Alzheimer Disease-like transgenic rat model. *Theranostics*, 12(5), 2205-2231.

Yokel, R. A., & McNamara, P. J. (2001). Aluminium toxicokinetics : An updated minireview. *Pharmacology & Toxicology*, 88(4), 159-167.

Zatta, P., Lucchini, R., van Rensburg, S. J., & Taylor, A. (2003). The role of metals in neurodegenerative processes : Aluminum, manganese, and zinc. *Brain Research Bulletin*, 62(1), 15-28.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe I : Matériel et Réactifs

1) Matériel

❖ Matériel léger :

Micropipettes, agitateur magnétique, tubes Falcon, tubes Eppendorf, tubes à essai, trousse à dissection, Balance de marque OHAUS (CS 5000), mortier et pilon, béchers, éprouvettes, fioles jaugées, erlenmeyers, chronomètre, portoirs, embouts, vortex, tubes sec (5 mL) pro coagulant et EDTA, gants.

❖ Matériels lourds :

Bain marie (Julabo TW 12), spectrophotomètre (Spectrum ab 752s), centrifugeuse réfrigérée (Eppendorf, centrifuge 5804 R), balance électronique (NAPCO JA-310), congélateur.

1) Réactifs

❖ Réactifs du laboratoire :

KCl, NaCl, KOH, BSA, NaOH, DTNB, tartrate double de sodium et de potassium, sulfate de cuivre, NED, acide trichloracétique, acide thiobarbiturique, eau distillée, sulfanilamide, formol, sulfate de cuivre peroxyde d'hydrogène, Solution dichromate, acide acétique.

Annexe II : Préparation des solutions

1° Dosage du malondialdéhyde (MDA)

❖ Solution de chlorure de potassium (KCl) 1,15% (P/V)

Peser 2,875g de KCl ; Dissoudre dans 250mL d'eau distillée qsp

❖ Solution d'ATC 20% (P/V)

Peser 20g d'ATC ; Dissoudre dans 100mL d'eau distillée qsp

❖ Solution d'ATB 0,67% (P/V)

Peser 0,67g d'ATB ; Dissoudre dans 100mL d'eau distillée qsp

2° Dosage des protéines totales

❖ Solution de sérum albumine bovin (SAB) (3mg/mL)

Peser 0,03mg de SAB ; Dissoudre dans 10mL d'eau distillée qsp

❖ Préparation du Réactif de Biuret

Solution A

Peser 0,75g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3g de tartrate double de Na et K, $4\text{H}_2\text{O}$; Dissoudre dans 150mL d'eau distillée qsp

Solution B

Peser 15g de NaOH ; Dissoudre dans 150mL d'eau distillée qsp 150mL

Mélanger la Solution A et la Solution B puis ajouter 500mL d'eau distillée qsp

❖ **Solution de NaCl 0,9% (P/V) : Vf= 250mL**

Peser 2,25g de NaCl ; Dissoudre dans 250mL d'eau distillée qsp

3° Dosage de l'oxyde nitrique (NO)

❖ **Solution d'acide phosphorique (HPO_4) 2,5% : Vf= 50mL**

Prélever 1,47mL HPO_4 ; Compléter dans 50mL d'eau distillée qsp

❖ **Préparation du réactif de Griess**

Solution A : Solution de naphthyléthylène diamine (NED) 0,1% (P/V) : Vf= 50mL

Peser 0,05g de NED ; Dissoudre dans 50mL d'eau distillée qsp

Solution B : Solution de Sulfanilamide 1% (P/V) : Vf= 50mL

Peser 0,05 g de sulfanilamide puis dissoudre dans 50mL HPO_4 2,5% qsp

Le réactif de Griess a été obtenu en mélangeant, à l'abri de la lumière, les Solution A et B

❖ **Solution étalon de nitrite 1mM : Vf= 10mL**

Peser 0,69g de NaNO_2 anhydre ont été dissous dans 10mL d'eau distillée qsp

❖ **Solution étalon de nitrite 1 μ M**

La solution de nitrite de sodium 1 μ M a été obtenue par dilution de la solution de NaNO_2 1mM au 1/1000e, avec de l'eau distillée.

❖ **Préparation de la solution de peroxyde d'hydrogène 50 Mm**

La solution de peroxyde d'hydrogène 50 mM a été obtenue en diluant 243 μL de peroxyde d'hydrogène 35 % dans de l'eau distillée pour un volume final de 50 mL.

❖ **Préparation de la solution de dichromate de potassium 5 %**

La solution de dichromate de potassium 5 % a été préparée en faisant dissoudre 2,5 g de dichromate de potassium dans de l'eau distillée pour un volume total de 50 mL. Ensuite, 150 mL d'acide acétique glacial y ont été ajouté.

❖ **Préparation de tampon de phosphate de potassium (0,1M ; pH 6,8)**

Le tampon phosphate de potassium a été préparé en dissolvant séparément 3,40 g de KH_2PO_4 et 4,35 g de K_2HPO_4 dans 250 mL d'eau distillée. Le pH de la première solution a été ajusté à 6,8 avec la deuxième solution. La solution finale a été conservée à 4 °C avec une stabilité d'un mois.

❖ **Préparation de tampon de phosphate de sodium (Tampon S) (0,1M ; pH 7,3)**

Dans 350 mL d'eau distillée, ont été dissouts 1,175 g de NaH_2PO_4 , 5,8 g de Na_2HPO_4 et 4,4 g de NaCl . La gélatine (0,5 g) a été dissoute dans 25 mL d'eau distillée tiède et additionnée au mélange. Le pH a été ajusté à l'aide de la solution de NaOH (0,1M) et le volume final complété à 500 mL avec l'eau distillée. La solution tampon S ainsi obtenue a été conservée à 4 °C.

❖ **Préparation de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5)**

Pour préparer le tampon de phosphate, une solution A est préparée par dissolution de 8,9 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans 500 mL d'eau distillée. Une solution B est également préparée par dissolution de 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans 500 mL d'eau distillée. A 500 mL de la solution de phosphate disodique hydraté obtenue ont été ajoutés 200 mL de la solution de phosphate monosodique, puis goutte à goutte 80 mL de la même solution jusqu'à obtention d'un volume final de 780 mL.

❖ **Préparation de tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,5)**

Le tampon phosphate a été préparé en faisant dissoudre 8,9 g de phosphate disodique hydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée pour 500 mL (Solution A). Puis 6,5 g de phosphate monosodique hydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ont été dissouts dans de l'eau distillée pour 500 mL (Solution B). Le pH de la solution B a été ajusté à 6,5 par titration avec la solution A.

Préparation de Réactif d'Ellman

Pour la préparation du réactif de Ellman, 5 mg d'acide 2-dithio bis-nitrobenzène (DTNB) ont été dissouts dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,5) pour un volume final de 250 mL qsp.

❖ **Préparation de la solution d'acide acétique 2% (V/V) : Vf= 50mL**

Nous avons prélevés 1mL d'acide acétique glacial (99,99%) ; Compléter à 50mL avec de l'eau distillée qsp

Calcul de la dose d'acide acétique à administrer

Densité de l'acide acétique est 1,05 mg/ml à 20 °C ; Dose en ml/kg est 5 et 2. Densité = Dose (mg/kg) / Dose (ml/kg)

Dose (mg/kg) = Densité $\times$ Dose (ml/kg) ce qui donne respectivement 5,25 et 2,625 mg/kg

4° Dosage de la SOD

❖ **Tampon carbonate (0,05 M ; pH = 10,2)**

Le tampon carbonate (0,05 M ; pH = 10,2) a été préparé en faisant dissoudre 4,5 g de carbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) et 4,2 g de carbonate monosodique (Na_2CO_3) dans 500 mL d'eau distillée. Le pH de la solution a été ajusté à 10,2 avec de la soude 1 M et le volume complété à 1000 mL avec de l'eau distillée.

❖ **Solution d'adrénaline 0,06 mg/mL**

La solution d'adrénaline 0,06 mg/mL a été préparée à l'abri de la lumière, en dissolvant 6 mg d'adrénaline dans de l'eau distillée pour un volume final de 100 mL.

5° Dosage de la catalase

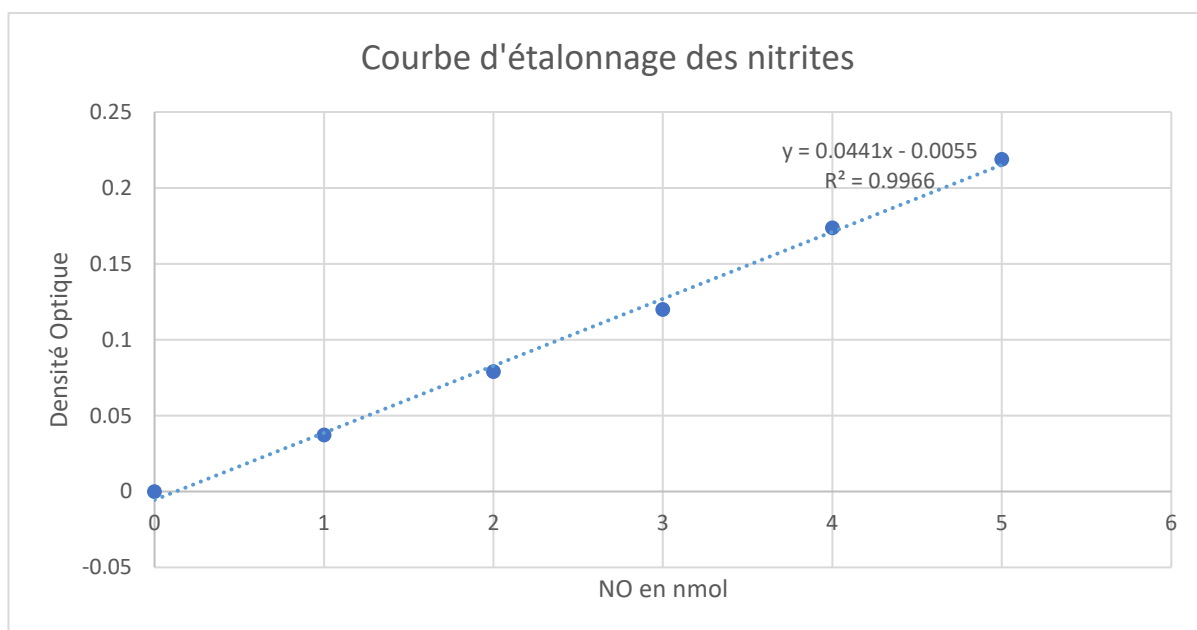
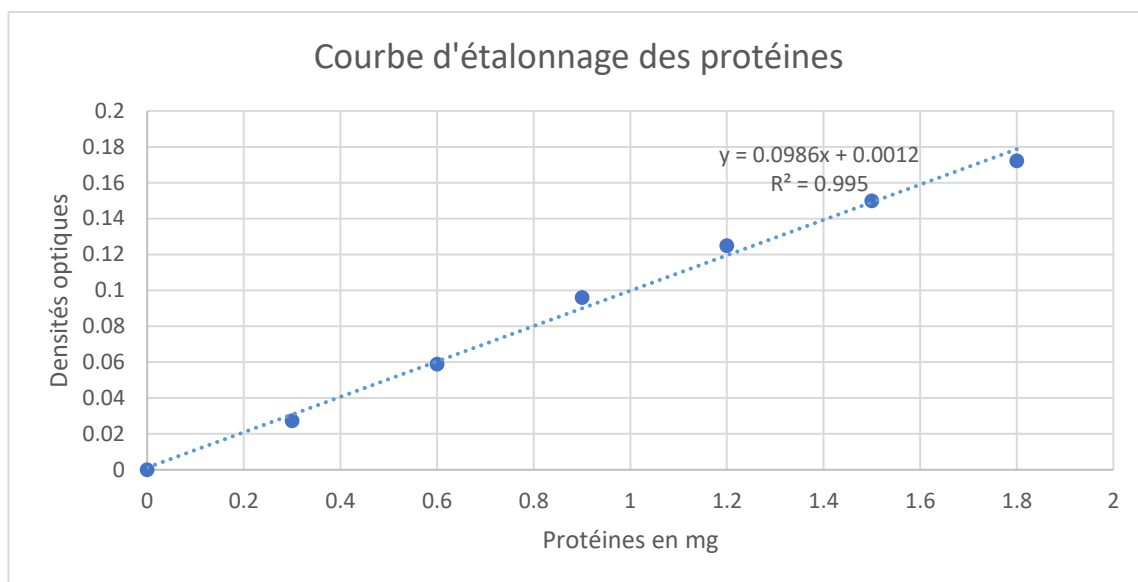
❖ **Solution de peroxyde d'hydrogène 50 mM**

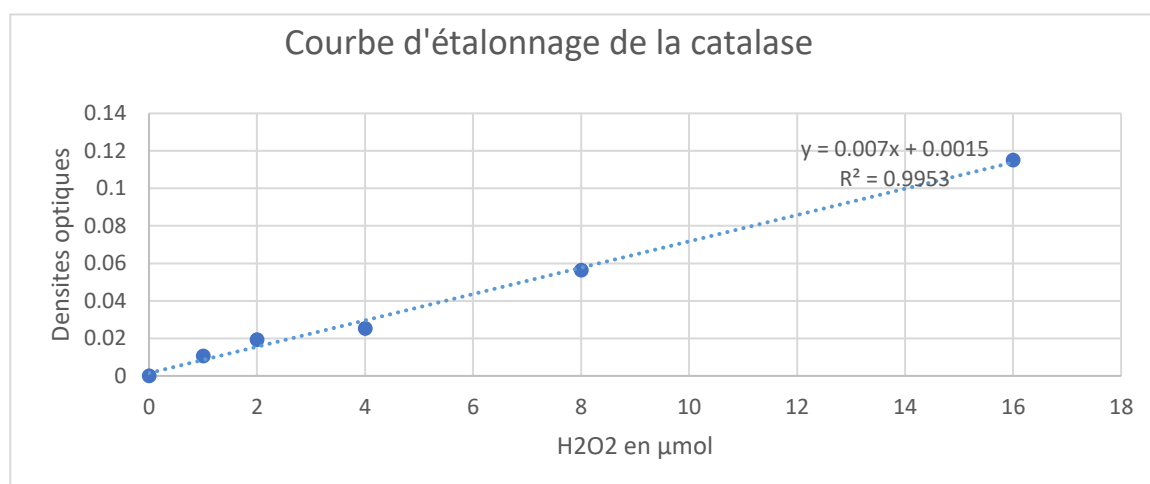
La solution de peroxyde d'hydrogène 50 mM a été obtenue en diluant 243 μL de peroxyde d'hydrogène 35 % dans de l'eau distillée pour un volume final de 50 mL.

❖ **Solution de dichromate de potassium 5 %/acide acétique glacial**

La solution de dichromate de potassium 5 % a été préparée en faisant dissoudre 2,5 g de dichromate de potassium dans de l'eau distillée pour un volume total de 50 mL. Ensuite, 150 mL d'acide acétique glacial y ont été ajoutés.

Annexe IV : Courbes d'étalonnages

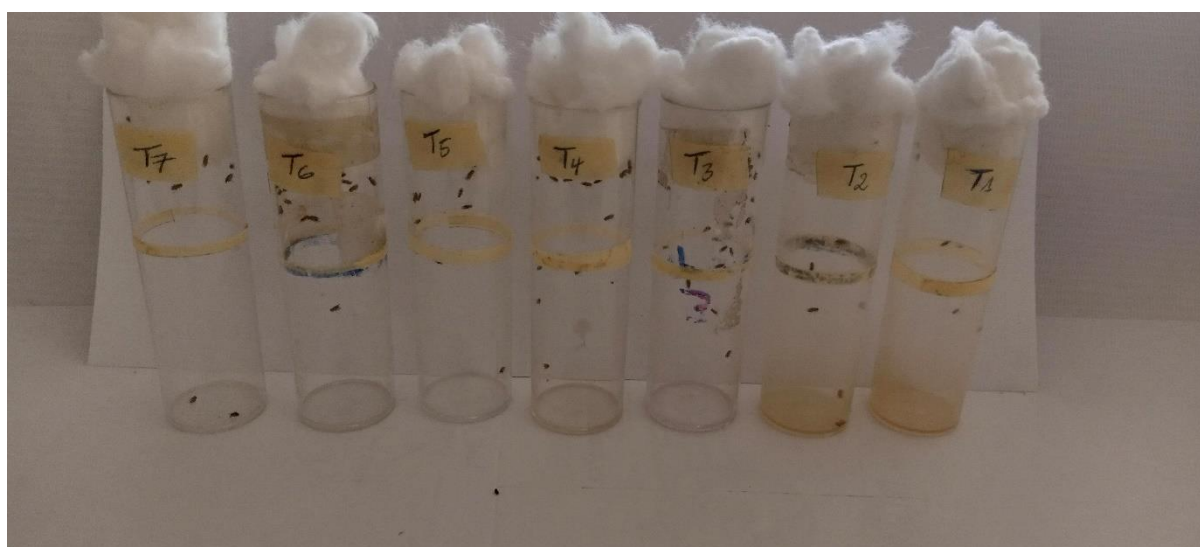




Photographie des groupes de drosophiles avant le test de Géotaxie négatif



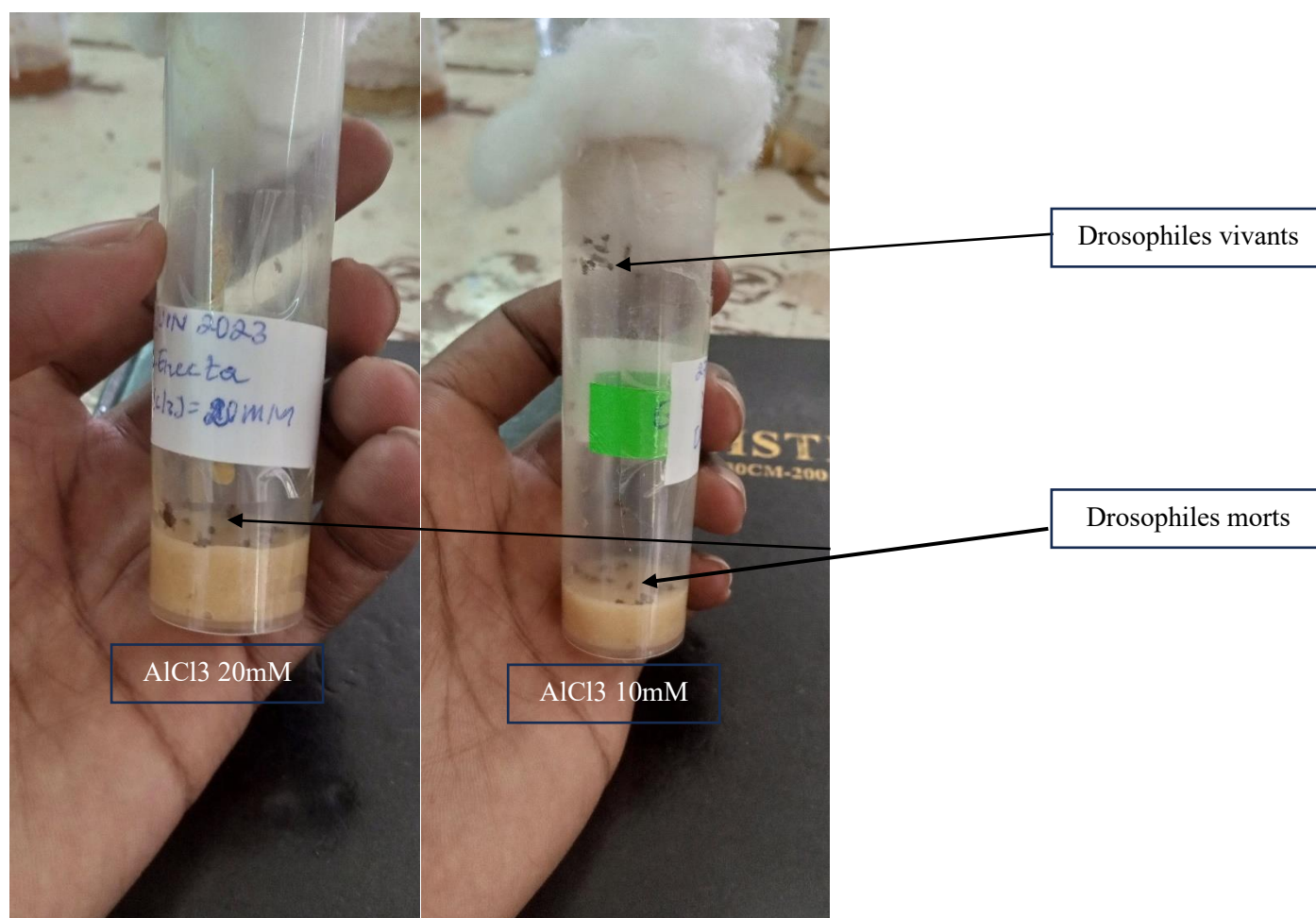
Culture des drosophiles



Test de Géotaxie négatif : Observation de la motilité des drosophiles.



Photographie au jour 7 des groupes de drosophiles pour le test de mémoire à court terme.



Photographies des groupes de drosophiles (20Mm et 10Mm d'AlCl₃) lors du 7^e jour du test de toxicité au AlCl₃