

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

***Etude *in vitro* et *in silico* de l'inhibition de la
peroxydase : traitement de goitre.***

Présenté par :

BENALI Fatima Zohra

BEKHAOUA Ikram Cherifa

Soutenu publiquement le :

Devant le jury :

Président(e) : Pr YOUSFI Mohamed (Pr)

Examinatrice : M^{elle} Mahfoudhi Reguia (MAA)

Rapporteur : Dr BENAROUS Khedidja (MCA)

Dédicace

A mon très cher père : BENALI Bachir

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être

A ma très chère mère : ZIREGUE Fatma

Affable, honorable, aimable : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement. Vous n'avez pas cessé de m'encourager et de prier pour moi

A mon très cher frère : Salem

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi. Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus difficiles

A ma très chère sœur : Amina

Ma chère grande sœur présente dans tous mes moments d'examen par son soutien moral et ses belles surprises sucrées. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de sérénité avec ta petite famille

A tous les membres de ma famille BENALI/ ZIREGUE

A mon binôme : Ikram

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble. Je te remercie.

FATIMA ZOHRÀ

Dédicace

*Je tiens en premier lieu à remercier le bon dieu de m'avoir donné la foi,
la force et le courage d'affronter toutes les difficultés.*

Je dédie ce modeste travail comme preuve de respect :

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon
cœur, ma vie et mon bonheur ; maman Seghier Zoulikha qui j'adore*

A mon père Bekhaoua Abdelkader

*Aucune dédicace ne saurait exprimer le respect que j'ai toujours eu pour
vous.*

*A mes sœurs : Manal, Siham, Inas, Hidaya et bien sûr A mon cher petit
frère Ibrahim ; Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute
la spontanéité et ton élan chaleureux je vous dédie ce travail avec tous
mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*Et sans oublier mon neveu Mohammed Siradj Eddine que j'adore
profondément*

Et à toute ma famille

*A mon cher binôme Benali Fatima Zohra qui m'a partagé les difficultés
de ce travail*

Et à tous mes collègues de master biochimie des produits naturels

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail
soit réalisé, je vous dis merci.*

IKRAM

Remerciements

Au terme de la rédaction de ce mémoire, nous remercions ALLAH qui nous a toujours donné la force de passer à travers toutes les épreuves et qui nous a aidé à mener à terme cette recherche.

Nous remercions sincèrement notre encadreur, Docteur BENAROUS Khedidja « maitre de conférences A », pour ses judicieux conseils.

Quelques mots ne suffiront pas à exprimer notre profonde gratitude pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant de superviser ce travail. Nous n'oublierons jamais la disponibilité, les encouragements et les qualités scientifiques exceptionnelles qu'elle a su mettre au service de nos apprentissages tout au long de notre collaboration.

Nous voulons également remercier et exprimer notre profond respect à tous les examinateurs qui ont bien voulu nous faire l'honneur de juger la qualité de ce travail et de formuler leurs remarques constructives.

Nous voulons également remercier les ingénieurs de laboratoires de Biochimie de la faculté de médecine pour leur accueil chaleureux et leur aide inestimable afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Nous remercions également M^{lle} Mahfoudhi Reguia pour les produits qu'elle nous a ramenés pour réaliser ce travail.

RÉSUMÉ

Les peroxydases, sont des enzymes qui appartiennent à la classe des oxydoréductases, elles sont largement répandues dans le règne végétal et animal, catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols en présence du peroxyde d'hydrogène, qui agit en tant qu'accepteur d'hydrogène et sera par la suite réduit en molécule d'eau. L'objectif principal de cette étude est de tester la capacité d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase de *Armoracia ruticana* par des extraits et molécules naturelles comme les composés phénoliques et les alcaloïdes et de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition ainsi de savoir la nature des interactions entre ces inhibiteurs et la peroxydase (1HCH) en utilisant l'amarrage moléculaire. Les résultats obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur contre la 1HCH avec une inhibition compétitive, ils pourraient être employés dans le traitement du goitre.

Mots clés: Peroxydase de *Armoracia ruticana* (1HCH), inhibition, composés phénoliques, alcaloïdes, amarrage moléculaire, goitre.

ABSTRACT

Peroxidases, are enzymes which belong to oxydoreductase class, they are largely founded in both of vegetable and animal kingdom that catalyzes the oxidation of varioussubstrates such as phenols in the presence of hydrogen peroxide, which acts as a hydrogen acceptor and being converted to water. In this study, the main objective is testing the capacity of peroxidase inhibition by naturel extracts and molecules as phenolic compounds and alkaloids and to better understand the mechanism of inhibition thus to know the nature of the interactions between these substances and peroxidase (1HCH) using molecular docking. These results show that these molecules have an inhibitory activity against the 1HCH with a competitive inhibition; they could be employed in the treatment of goiter.

Keywords: *Armoracia ruticana* Peroxidase (1HCH), inhibition, phenolic compounds, alkaloids, molecular docking, goiter.

المخلص

البيروكسيداز هي إنزيمات تنتمي إلى صنف الأنزيمات المؤكسدة المرجعة المتواجدة بكثرة في مملكة الحيوان والنبات تقوم بأكسدة عدة ركازات من ضمنها الفينول في حضور بيروكسيد الهيدروجين الذي يعمل بمثابة مستقبل للهيدروجين و يتم إرجاعه بعد ذلك إلى جزيء الماء. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو اختبار القدرة المثبطة للنشاط الأنزيمي للبيروكسيداز من طرف الجزيئات الطبيعية مثل المركبات الفينولية و القلويدات و الحصول على آلية التثبيط و أيضا معرفة طبيعة التفاعلات بين هذه المواد و البيروكسيداز استنادا على البحوث المعلوماتية. و أظهرت النتائج أن هذه الجزيئات لديها قوة مثبطة ضد البيروكسيداز مع نوع تنافسي، و أنها يمكن أن تستخدم في علاج تضخم الغدة الدرقية.

الكلمات المفتاحية: البيروكسيداز، التثبيط، المركبات الفينولية، القلويدات، المعلوماتية، تضخم الغدة الدرقية .

Liste des abréviations

1HCH : Le code PDB de la peroxydase.

°C : Degré Celsius

V_{\max} : La vitesse maximale.

K_M : La constante michaelienne.

IC_{50} : La constante inhibitrice à 50%.

TSH: Thyroid Stimulating Hormone

TPO: Thyroperoxydase.

Tg : Thyroglobuline.

MIT: Monoiodotyrosine.

DIT: Diiodotyrosine.

T3: Triiodothyronine.

T4: Thyroxine.

TRH: Thyroïde-releasing hormone.

PTU: Propylthiouracile.

Liste des figures

Figure 1. Le Marrube blanc, <i>Marrubium vulgare</i>	13
Figure 2. Le polypore hérissé, <i>Inonotus hispidus</i>	14
Figure 3. Procédure de l'extraction des composés phénoliques.....	22
Figure 4. Le schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes	23
Figure 5. Courbe cinétique de la catalyse enzymatique de l'acide urique «Abs=f (t)».....	28
Figure 6. Courbe cinétique de la catalyse enzymatique de l'acide urique «V=f (S)».....	29
Figure 7. Représentation de Lineweaver-Burk de l'enzyme michaelienne $1/V = f(1/S)$	29
Figure 8. Représentation graphique de l'inhibition de la réaction catalysée par la peroxydase.....	32
Figure 9. Les structures 2D des différents inhibiteurs.....	36
Figure 10. Images représentent les interactions 2D des inhibiteurs.	40
Figure 11. Images représentent les interactions 2D des inhibiteurs.	42
Figure 12. Docking moléculaire de l'inhibiteur harmaline (couleur orange) avec 1HCH.	43
Figure 13. Docking moléculaire de l'inhibiteur harmine (couleur vert clair) avec 1HCH.	44
Figure 14. Docking moléculaire de l'inhibiteur harmalol (couleur mauve clair) avec 1HCH.	44
Figure 15. Docking moléculaire de l'inhibiteur harmol (couleur rose) avec 1HCH.	45
Figure 16. Docking moléculaire de l'inhibiteur hispidine (couleur bleu clair) avec 1HCH.	45
Figure 17. Docking moléculaire de l'inhibiteur l'acide gallique (couleur mauve foncé) avec 1HCH...	46
Figure 18. Docking moléculaire de l'inhibiteur rutine (couleur vert pistache) avec 1HCH.	46
Figure 19. Docking moléculaire de l'inhibiteur marrubiine (couleur vert bleu) avec 1HCH.	47
Figure 20. Docking moléculaire de l'inhibiteur dérivé de l'Ac gallique (couleur jaune) avec 1HCH...	47

Liste des tableaux

Tableau 1. Les paramètres cinétiques de la peroxydase d' <i>A. rutilana</i>	29
Tableau 2. Les valeurs d'IC ₅₀ des inhibiteurs.	30
Tableau 3. Type des liaisons entre les inhibiteurs et les acides aminés de site actif.....	43

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	10
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	15
1. La thyroïde :	16
2. Formation des hormones thyroïdiennes	16
3. Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes :	18
4. Action des hormones thyroïdiennes :	18
5. L'hypothyroïdie :	19
MATERIELS ET METHODES.....	21
1. Matériel végétal.....	22
2. Activité enzymatique de la peroxydase.....	22
2.1. Principe de l'activité enzymatique de la peroxydase :	22
3. Protocoles expérimentaux	24
3.1 Cinétique de la réaction catalysée par la peroxydase	24
3.1.1 Détermination du temps nécessaire de la réaction enzymatique	24
3.1.2 Paramètres cinétiques de la réaction enzymatique	24
3.2 Inhibition de la réaction catalysée par la peroxydase.....	24
4. Modélisation moléculaire.....	25
RESULTATS ET DISCUSSION.....	27
1. Cinétique de la réaction catalysée par la peroxydase	28
2. Paramètres cinétiques déterminés pour la peroxydase <i>d'Armoracia ruticana</i>	28
3. Inhibition de la réaction catalysée par la peroxydase.....	30
4. Modélisation moléculaire.....	32
CONCLUSION GENERALE.....	48
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	50

INTRODUCTION GENERALE

Approximativement 200 millions de personnes dans le monde souffrent d'une certaine forme de maladie thyroïdienne, les nodules thyroïde, les morceaux thyroïde, ou un élargissement de la glande thyroïde connu sous le nom de goitre est le problème endocrine le plus connu. Les goitres, sont observés depuis plus de 5000 ans et plus exactement en 2800 ans avant JC, c'est un empereur chinois qui les cite en premier (Sin-Ting et *al.*,2015).

Le terme goitre indique une augmentation de taille de la glande thyroïde, produit d'une répliation excessive de cellules thyroïdiennes épithéliales bénignes. Chez les patients ayant un goitre non toxique les valeurs d'hormones thyroïdiennes sont normales. L'augmentation de la taille de la thyroïde est un processus lent, qui s'étend sur de nombreuses années, débutant avec un accroissement diffus qui devient fréquemment nodulaire avec le temps (Claude et *al.*, 1997).

Le goitre non toxique est la maladie thyroïdienne la plus fréquente, son incidence augmente avec l'âge et il affecte les femmes 3 à 5 fois plus souvent que les hommes. Les goitres ont été classés en goitre endémique ou sporadique. Quand l'augmentation de la taille de la thyroïde affecte plus de 10% de la population on parle de goitre endémique qui est présumé secondaire à des facteurs environnementaux, tels que la carence d'iode ou la présence de goitrigènes inhibant la synthèse des hormones thyroïdiennes dans la chaîne alimentaire (Claude et *al.*, 1997).

Le goitre est dit sporadique lorsqu'il ne concerne qu'une petite partie de la population. La cause de goitre sporadique est variable, la croissance thyroïdienne est en général stimulée par des facteurs extra thyroïdiens, comme la TSH qui est le stimulus le plus fréquent. Le fait que les goitres surviennent également chez des sujets ayant des hormones thyroïdiennes normales, et une TSH normale ou basse suggère que la sensibilité à la TSH des cellules thyroïdiennes peut être accrue ou que d'autres facteurs stimulent la croissance thyroïdienne (Claude et *al.*, 1997).

L'histologie du tissu thyroïdien goitreux varie en fonction du stade et de la cause du goitre :

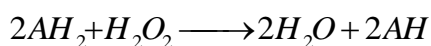
Stade 0 : l'augmentation de la thyroïde est ni visible, ni palpable, ce stade ne peut être identifié que par échographie. On parle de goitre à partir d'un volume thyroïdien 18 ml chez les femmes 25ml chez les hommes.

Stade 1 : l'augmentation du volume thyroïdien est palpable mais n'est pas apparent

Stade 2 : l'augmentation du volume de la glande est visible et palpable (Herold., 2012).

La thyroperoxydase (TPO) est une protéine membranaire apicale contenant l'hème qui agit en tant que catalyseur enzymatique pour les étapes initiales dans la synthèse d'hormone thyroïdienne dans le lumen folliculaire des thyrocytes. La TPO catalyse l'oxydation de l'iodure, et permet l'iodation non spécifique des résidus de tyrosyls de thyroglobuline (Tg) et des iodotyrosyls pour produire des Tg couplés au monoiodotyrosine (MIT) et diiodotyrosine (DIT), l'hydrolyse des MITS et des DITS de Tg a comme conséquence la libération des hormones thyroïdienne, thyroxine (T3) et triiodothyronine (T4), de la glande dans la circulation systémique, dont le T4 présente le produit prédominant de cette synthèse. Il n'existe pas encore en thérapeutique de substances s'opposant aux effets des hormones thyroïdiennes, mais il existe des possibilités de modifier leur métabolisme, soit en inhibant la capture d'iode par la thyroïde, soit en inhibant la synthèse hormonale (Katie et *al.*, 2013).

La peroxydase de *Armoracia ruticana* (1HCH) est une protéine à hème, capable de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques qui sont des donneurs de protons H⁺, en utilisant le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée, H₂O₂) ou l'hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron qui sera réduit en molécules d'eau (H₂O) (Delannoy et *al.*, 2004).



Les peroxydases (EC 1.11.1.7) regroupent une grande famille d'enzymes. Elles appartiennent à la famille des oxydoréductases, en accord avec la nomenclature officielle. Ce sont des enzymes ubiquitaires retrouvées dans les plantes, les animaux et les microorganismes (Colonna et *al.*, 1999).

Un alcaloïde dénommé de manière générique diverses molécules à bases azotées, le plus souvent hétérocycliques, très majoritairement d'origine végétale (Arshad et *al.*, 2008 ; Astulla et *al.*, 2008).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, ce sont des composés mineurs par rapport aux composés des métabolites primaires, ils sont très répandus dans le règne végétal. Ils possèdent des activités biologiques : antioxydants, anti radicalaire, anticancéreux, inhibiteurs d'enzyme...) (Benarous., 2007).

Marrubium vulgare Linn (Herbaceae), populairement connu sous le nom de " marroio-branco " ou « Maroubia», est une plante médicinale largement distribuée dans les pays méditerranéens. En Algérie, il est utilisé dans la médecine traditionnelle contre une grande variété de maladies, telles que des désordres gastro-intestinaux, des infections intestinales, processus d'inflammation, antidiabétique, anticancéreux, antioxydant, notamment des études chimiques précédentes avec cette plante ont démontré la présence de quelques classes importantes des composés organiques, y compris des terpènes et des sesquiterpènes de furane, des alcaloïdes et des flavonoïdes(Souza et *al.*,1998 in Benarous, 2010 et 2014).



Figure 1.Le Marrube blanc, *Marrubium vulgare*.

Inonotus hispidus, généralement connu sous le nom de «Sorret el btoum »(Benarouset *al.*,2015) est un champignon parasite vivant de préférence sur un grand choix d'arbres à feuilles caduques comme le Fraxinus, quercus, Sorbus et le Malus. En Algérie, il se trouve sur l'arbre de *Pistaciaatlantica*. Il produit une quantité considérable de colorant jaune, par exemple l'hispidine. Ce champignon a été utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter l'ulcère gastrique (Nasser et *al.*,1996 in Benarous, 2010 et 2014)



Figure 2.Le polypore hérissé, *Inonotus hispidus*.

À droite : la dégradation de la charpente de la plante à la suite du développement du parasite (Végh, 1987).

D'après notre recherche bibliographique, c'est la première fois au niveau de l'université de Laghouat et en Algérie, qu'on étudie l'effet inhibiteur des extraits naturels et des molécules isolées dans le but de traiter le goitre. L'idée de cette étude est inspirée du taux élevé des personnes qui souffrent de cette maladie. Selon une petite enquête faite chez les pharmaciens de la Wilaya de Laghouat, cette maladie se classe 3^{ème} après le diabète et l'hypertension artérielle.

Nous avons rencontré beaucoup de difficultés à bien mener nos recherches à cause du manque d'informations et de recherches bibliographiques concernant cette enzyme. N'ayant pas trouvé d'enzyme toute prête à utiliser, nous avons dû acheter le réactif d'acide urique pour entamer notre expérience.

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques de département de biologie et le laboratoire de Biochimie dans la faculté de médecine.

L'objectif majeur de cette étude est de chercher et d'analyser la capacité d'inhibition de la peroxydase par des molécules pures naturelles y-compris des composés phénoliques et des alcaloïdes afin d'atteindre le but et trouver un traitement contre le goitre (Hyperthyroïdie).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. La thyroïde :

La thyroïde, la glande endocrine la plus volumineuse de l'organisme, pèse environ 20 grammes, son lobe droit est en général plus volumineux que le lobe gauche. La taille adulte est atteinte à l'âge de 15 ans. Les deux lobes latéraux sont situés en avant du cartilage cricoïde et sont reliés par un isthme situé juste en dessous du cartilage cricoïde. Chaque lobe, dont le pôle supérieur est pointu et le pôle inférieur arrondi une épaisseur de 2 cm, une hauteur de 4 à 5 cm et une largeur de 2 à 3 cm (Claude et *al.*, 1997).

Les lobes sont subdivisés par des septums fibreux en pseudolobes composés de structures sphériques appelées follicules. Un réseau capillaire dense encercle les follicules qui sont richement innervés par des terminaisons sympathique et parasympathique. Les follicules sont constitués d'une monocouche de cellules épithéliales qui délimite une lumière remplie d'un matériel protéique colloïde composé à 75 p. 100 de thyroïdiennes épithéliales (Claude et *al.*, 1997).

Une boucle de rétrocontrôle reliant l'hypothalamus (L'hypothalamus est une glande endocrine, située dans le cerveau, qui interagit étroitement avec l'hypophyse) l'hypophyse et la glande thyroïde régulent la sécrétion des hormones thyroïdiennes. L'hypothalamus fabrique la thyroïde-releasing hormone (TRH) qui stimule la libération de la thyroid-stimulating hormone (TSH). La TSH stimule la sécrétion hormonale thyroïdienne qui rétroagit sur l'hypothalamus et l'hypophyse pour fermer la boucle de rétrocontrôle (Claude et *al.*, 1997).

2. Formation des hormones thyroïdiennes

La thyroxine (T₄) est le produit de sécrétion majoritaire de la glande thyroïde, avec une production quotidienne de 80 à 100 µg. La T₄ est produite exclusivement par la thyroïde. Seulement 20% de la production de tri-iodothyronine (T₃) sont issus de la thyroïde et 80% proviennent de la conversion périphérique de la T₄ (Claude et *al.*, 1997).

La production quotidienne de T₃ est de 30 à 40 µg. La production normale des hormones thyroïdiennes requiert un taux normal de TSH et un apport suffisant mais pas excessif d'iode. L'apport quotidien optimal d'iode est de 150 à 300 µg.

Dans certaines régions montagneuses du globe, l'apport quotidien peut descendre de 20 à 30 µg, la population des États-Unis a des apports élevés de l'ordre de 600 à 700 µg /j,

provenant pour la plus de grande part des additifs alimentaires comme le sel iodé et la farine (Claude et *al.*, 1997).

L'iode est réduit en iodure (I⁻) dans le tractus gastro-intestinal et absorbé sous cette forme. Une partie de l'iodure circulant est captée et concentrée par la thyroïde. Le reste est éliminé par voie urinaire. En conditions normales, la clairance rénale de l'iodure est de 30 ml par minute, tandis que la clairance thyroïdienne est de 8 ml par minute. De telle sorte que seulement 25% des apports atteignent la thyroïde en condition normale. L'excès d'apports d'iode diminue la captation (Claude et *al.*, 1997).

La captation thyroïdienne de l'iodure varie de 5 à 30% d'autres organes tels que les glandes salivaires, les glandes mammaires, la muqueuse gastrique et les plexus choroïdes peuvent également capter l'iodure, mais ils ne peuvent synthétiser les hormones thyroïdiennes. La capacité de la thyroïde à concentrer activement l'iode par un transporteur d'iodure localisé dans la membrane plasmique génère un gradient de concentration de 20 à 40 entre la cellule et le plasma. Dans la cellule thyroïdienne l'iodure est rapidement oxydé et incorporé dans la thyroglobuline sur les tyrosines par un processus enzymatique, appelé organification, qui fait intervenir la peroxydase thyroïdienne (Claude et *al.*, 1997).

La peroxydase thyroïdienne requiert une activation par H₂O₂. La nature précise du système générateur d'H₂O₂ probablement une cytochrome C réductase a NADPH, est incertaine. Les drogues antithyroïdiennes telles que le propylthiouracile (PTU) et le méthimazole. La synthèse des hormones thyroïdiennes a lieu au sein de la thyroglobuline, une glycoprotéine de 660 kDa dont 25% des résidus tyrosine sont accessibles à l'iodation. La tyrosine mono-iodée (MIT) et la tyrosine di-iodée (DIT) sont couplées par la peroxydase thyroïdienne, pour former la T₄ en couplant deux molécules de DIT ou la T₃ en couplant une molécule de MIT et une de DIT (Claude et *al.*, 1997).

La thyroglobuline contient seulement 4 molécules de T₄ et 0,2 à 0,3 molécule de T₃. L'organification et le couplage sur la thyroglobuline ont lieu au pôle luminal du thyrocyte qui sécrète la thyroglobuline par exocytose et la stocke sous forme de colloïde. La sécrétion des hormones thyroïdiennes débute par l'endocytose d'une gouttelette de colloïde par la membrane luminale du thyrocyte. Après fusion de la gouttelette avec les lysosomes pour former des phagolysosomes, la thyroglobuline est protéolysée et la T₄ et la T₃ sont libérées au pôle basal dans les capillaires. Les iodotyrosines, en particulier MIT et DIT, libérées à partir de la thyroglobuline, sont désiodées par une désiodase spécifique. L'iodure ainsi libéré se

mélange avec l'iodure capté à partir du flux sanguin et est réutilisé pour l'organification. Rarement une diminution de cette désiodase peut causer un goitre et une hypothyroïdie (Claude et *al.*, 1997).

3. Régulation de la synthèse des hormones thyroïdiennes :

La synthèse des hormones thyroïdiennes est influencée par des facteurs intrathyroïdiennes, en premier lieu la quantité d'iodure dans la cellule thyroïdienne et par des facteurs extrathyroïdiennes, essentiellement des hormones peptidiques qui peuvent occuper le récepteur de la TSH, et des immunoglobulines thyroïdostimulantes dans la maladie de Basedow. Dans les conditions de carence iodée, la T3 est fabriquée préférentiellement à la T4. L'excès d'iode conduit à une inhibition transitoire de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Cependant, après 48 heures, le transport d'iodure est diminué et la synthèse des hormones thyroïdiennes retourne à la normale malgré un taux élevé d'iodure circulant (Claude et *al.*, 1997).

L'excès d'iodure inhibe également la libération des hormones thyroïdiennes. L'iodation croissante de la thyroglobuline la rend résistante à la protéolyse, diminuant ainsi la libération de T4 et T3 paradoxalement, l'excès d'iode peut aussi augmenter la synthèse des hormones thyroïdiennes, particulièrement dans une glande thyroïde anormale. Pour ces raisons, l'iode ne doit pas être utilisé comme traitement des maladies thyroïdiennes, en dehors de quelques cas particuliers (Claude et *al.*, 1997).

La TSH influence la fonction thyroïdienne en stimulant toutes les étapes de la synthèse hormonale. La liaison de la TSH à son récepteur stimule la formation d'AMPc et par conséquent l'activité de la protéine kinase A, la voie de la phospholipase C est aussi activée, ainsi que la voie du proto-oncogène RAS. En plus des effets majeurs de la TSH et de l'iodure sur la synthèse des hormones thyroïdiennes, certaines prostaglandines et certaines cytokines telles que les interleukines et les catécholamines influencent la fonction thyroïdienne (Claude et *al.*, 1997).

4. Action des hormones thyroïdiennes :

La plupart des effets des hormones thyroïdiennes sont médiés par la liaison de la T3 sur le récepteur nucléaire des hormones thyroïdiennes. L'affinité de la T3 pour ce récepteur est 10 fois plus grande que celle de la T4 ce qui explique la plus grande activité biologique de la T3. Les récepteurs nucléaires de la T3 appartiennent à la famille des proto-oncogènes et

sont codés par les gènes *c-erbA α* et *c-erbA β*. Chaque gène a plusieurs variantes d'épissage, dont seulement certains lient la T3. Le récepteur nucléaire de la T3 est un facteur de transcription activé par la T3 qui se lie sur des séquences nucléotidiques spécifiques en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription des gènes régulés par la T3. Nombre de gènes régulés par la T3 voient une augmentation de leur transcription lors de la liaison de la T3 à son récepteur. Ceci conduit à une synthèse accrue d'ARN messagers spécifiques et à protéines telle que l'hormone de croissance, l'enzyme malique, la chaîne lourde α de la myosine et la pompe à calcium du réticulum sarcoplasmique. La T3 freine la transcription d'autres gènes comme ceux des sous-unités α et β de la TSH (Claude et *al.*, 1997).

Certaines mutations spécifiques du récepteur *c-erbA β* conduisent au syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes : le récepteur mutant perturbe l'action des récepteurs normaux. En plus de ces effets sur la transcription, la T3 module la demi-vie des ARN messagers, action qui peut entraîner des modifications rapides de transport ionique (Claude et *al.*, 1997).

5. L'hypothyroïdie :

L'hypothyroïdie est le syndrome clinique qui résulte de la diminution de sécrétion d'hormones thyroïdiennes par la glande thyroïde. Le plus souvent, elle reflète une maladie de la glande thyroïde elle-même (hypothyroïdie primaire) mais peut aussi être causée par une maladie hypophysaire (hypothyroïdie secondaire) ou hypothalamique (hypothyroïdie tertiaire) (Claude et *al.*, 1997).

L'hypothyroïdie conduit à un ralentissement des processus métaboliques et dans les formes les plus sévères à l'accumulation de mucopolysaccharides dans la peau provoquant un œdème ne prenant pas le godet, appelé myxœdème (Claude et *al.*, 1997).

Le terme de myxœdème est réservé par certains aux formes sévères d'hypothyroïdie, tandis que les autres usent indifféremment des deux termes. Le terme crétinisme est réservé aux hypothyroïdies datant de la naissance et conduisant à des anomalies du développement intellectuel et physique. Le syndrome de résistance généralisée aux hormones thyroïdiennes (RGHT) résulte d'une anomalie dans la séquence en acide aminés de la forme β du récepteur aux hormones thyroïdiennes, conduisant à une altération de la liaison de la T3, la diminution des effets des hormones thyroïdiennes dans la RGHT est partiellement compensée par une

augmentation des hormones thyroïdiennes, protégeant les patients de l'hypothyroïdie, ce syndrome est rare (Claude et *al.*, 1997).

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel végétal

Les extraits de la plante *Marrubium vulgare* et le champignon *Inonotus hispidus* ont été obtenus à partir de Dr BENAROUS Khedidja selon le protocole d'extraction montré dans (la figure3).

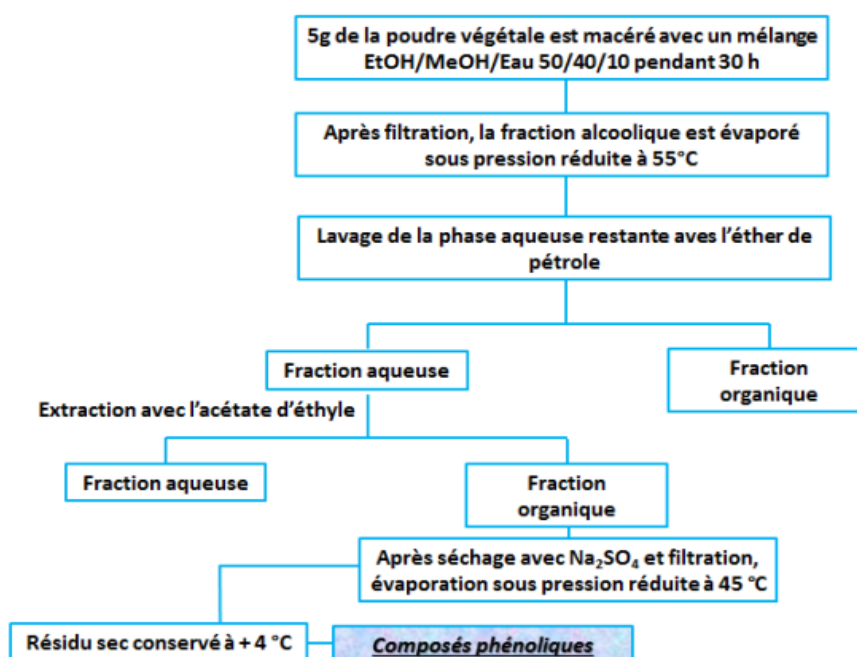


Figure 3. Procédure de l'extraction des composés phénoliques

(Benarous., 2014).

Les molécules pures Harmine et Hispidine ont été fournies par Dr BENAROUS Khedidja.

2. Activité enzymatique de la peroxydase

2.1. Principe de l'activité enzymatique de la peroxydase :

Nous avons utilisé le réactif de dosage de l'acide urique de la marque Biolabo qui est constitué de trois flacons. Le premier est composé par les deux enzymes, l'uricase (120U/l) et la peroxydase (450U/l), ainsi que l'hexacyanoferrate (II) de potassium (42µmol/L) avec l'amino-antipyrine (0,150mmol/L) nommé réactif 1, le deuxième est le tampon tris à pH=8 à 25 °C (50mmol/L) avec le dichlorohydroxybenzène sulfonate (2 mmol/L) nommé réactif 2,

le troisième constitue le substrat qui est l'acide urique avec une concentration de 100mg/L (595 μ mol/L).

Chez l'être humain, l'acide urique est le produit principal du catabolisme des nucléosides puriques, adénosine et guanosine. Les principales causes d'hyper-uricémie sont la goutte primaire (hyperproduction métabolique des purines ou trouble de l'urico-élimination rénale), ou la goutte secondaire dont la cause peut être une maladie rénale ou l'administration de médicaments (diurétique, chimiothérapie...) l'hyper-uricémie peut aussi être attribuée à une déficience d'une des enzymes impliquées dans le métabolisme de purines ou à une hémopathie. L'hypo-uricémie est beaucoup moins courante que l'hyper-uricémie (Bernard., 1989 ;Tietz., 1999)

L'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (dichloro-4-hydroxybenzènesulfonate et amino-antipyrine) pour former une quinonéimine, complexe de couleur rouge. L'absorbance mesurée à 520nm (490-530), est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans le spécimen (Tietz., 1999 ;Fossati et *al.*,1980).

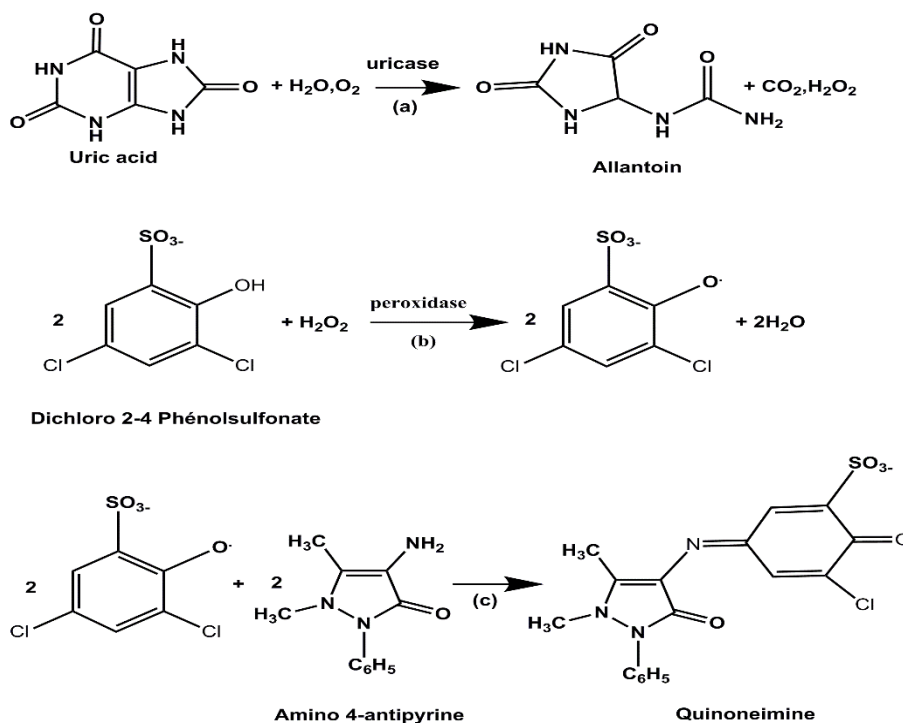


Figure4. Le schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes (Fraisse et *al.*, 2002)

- (a) Incubation de l'acide urique avec l'uricase.
- (b) L'oxydation de Dichloro 2-4 Phenolsulfonate par la peroxydase.
- (c) L'association de radical phenoxyyle avec Amino 4-antipyrine.

3. Protocoles expérimentaux

3.1 Cinétique de la réaction catalysée par la peroxydase

3.1.1 Détermination du temps nécessaire de la réaction enzymatique

Nous avons tracé la courbe de l'apparition du produit *P*(quinoneimine) en fonction du temps *t* en secondes ($P = f(t)$). Une quantité de 800 µl du réactif A (préparé à partir de mélange de réactif 1 et 2 selon la notice) contenant la peroxydase a été ajoutée à 100 µl de l'acide urique (substrat) de concentration 0,1 mg/ml, le mélange a été incubé à 37 °C et la lecture de l'absorbance a été effectuée chaque 10 secondes dans le spectrophotomètre de UV-SP-3000nano pendant 300secondes. Cette courbe nous a permis de connaître la cinétique enzymatique ainsi le temps nécessaire de la réaction enzymatique.

3.1.2 Paramètres cinétiques de la réaction enzymatique

Les paramètres de la cinétique enzymatique ont été déterminés à l'aide des courbes $V_0 = f(S_0)$ et $1/V_0 = f(1/S_0)$. Pour ce faire, nous avons préparé une gamme de concentrations croissantes de l'acide urique, une quantité de 100 µl de chaque concentration du substrat a été ajoutée à 800 µl de réactif A, le mélange a été incubé à 37 °C pendant 5 min, la lecture est effectuée à 510 nm à l'aide du spectrophotomètre UV- SP-3000nano.

3.2 Inhibition de la réaction catalysée par la peroxydase

Dans le but d'étudier l'effet de nos inhibiteurs sur 1 HCH et de déterminer le paramètre d'inhibition IC_{50} : la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50 % de l'activité enzymatique (IC_{50}), nous avons optimisé ce protocole d'inhibition après plusieurs essais afin de déterminer le temps nécessaire de la pré-incubation avec l'inhibiteur et la concentration nécessaire de l'inhibiteur.

Le milieu réactionnel contient 100µl de l'inhibiteur (la molécule pure ou extrait dilué) et 800 µl de réactif A a été pré-incubé dans un bain marie à 37°C pendant 30 min, après chaque minute, la réaction est initiée par l'ajout d'un volume de 100µl de substrat. Après une incubation de 5min à 37°C, la lecture est effectuée à 510nm dans un spectrophotomètre UV-SP-3000nano contre un blanc dépourvu de l'inhibiteur et le substrat. Nous avons remarqué que l'absorbance se stabilise après 10 minutes de pré-incubation avec l'inhibiteur et reste stable jusqu'à 30 minutes. Ainsi, nous avons étudié les tests d'inhibition avec 10 mins de pré-

incubation avec l'inhibiteur et de différentes concentrations de ce dernier (de 0.01mg/ml jusqu'à 0.04mg/ml). Tout dépend de la nature de l'extrait ou de la molécule. Toutes les expériences ont été répétées plusieurs fois pour s'assurer des résultats obtenus (plus d'une dizaine de fois).

La valeur de IC_{50} a été déterminée de la représentation graphique $I \% = f (C)$ tel que $I\%$ est déterminée suivant cette relation :

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

Avec :

- $I \%$: le pourcentage d'inhibition.
- A_{extrait} : l'absorbance de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur.
- A_{control} : l'absorbance de l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur.

Nous avons calculé les constantes d'inhibition K_i pour les molécules pures à partir de l'équation suivante et nous avons proposé le type d'inhibition pour les molécules pures selon Cer *et al.*, (2009) (en utilisant ce site <https://botdb-abcc.ncifcrf.gov/toxin/kiConverter.jsp>)

$$K_i = \frac{IC_{50}}{K_M/S + 1} \begin{cases} si : S = K_M, K_i = IC_{50}/2 \\ si : S \gg K_M, K_i \cong IC_{50} \\ si : S \ll K_M, K_i \ll IC_{50} \end{cases}$$

4. Modélisation moléculaire

Harmaline, harmine, harmol, harmalol, hispidine, acide gallique et son dérivé (Galic Acid 3,4-Diphenylmethylene Ketal Benzyl Ester), rutine et marrubiine ont été obtenues à partir de la banque de données de PubChem, ils ont été assemblés avec le logiciel Discovery Studio visualizer v4.0. La structure 3D de la peroxydase de la plante *Armoracia ruticana* (PDB ID: 1HCH) a été obtenue à partir de la banque de données de protéine (PDB). Pour initialiser les études de docking, la protéine a été préparée en enlevant toutes les molécules d'eau, l'hème, deux atomes de calcium, les hétéros atomes, n'importe quel solvant Co-cristallisé et ses ligands. En citant que les hydrogènes sont absents dans les fichiers de PDB, par conséquent, les hydrogènes polaires ont été ajoutés à la structure en utilisant le logiciel Auto dock tools (ADT) (version 1.5.6). Des calculs de docking ont été exécutés avec le programme d'Auto Dock Vina. Puisqu'il utilise les boîtes rectangulaires pour l'accepteur, le centre de boîte a été défini et la boîte de docking a été montrée en utilisant ADT. Le docking était aveugle « blind docking » avec une boîte de grille de 64x62x52 et des points de grille séparés de 1 Å, il a été

placé au centre de la protéine avec ces coordonnées $x= 5,289$; $y= 7,601$; $z= 14,958$. Des paramètres de défaut ont été employés à moins que le nombre de conformations de production ait été placé à 40. Le « *random seed* » était aléatoire. Le nombre de tours est égal à 50 avec un nombre final de solutions obtenues égales à 1000 solutions. Toutes ces solutions ont été bien traitées et les conformations préférées étaient celles de la plus basse énergie de liaison avec le site actif par exemple dans le cas de l'acide gallique l'énergie est égale à -8.5 Kcal/mol et dans le cas de harmaline égale à -7.2 Kcal/mol. Les résultats de docking produits ont été directement chargés et étudiés dans Discovery Studio visualizer, v 4.0. Les interactions hydrogènes avec leurs distances interatomiques exactes ont été déterminées avec le logiciel LigPlot⁺.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Cinétique de la réaction catalysée par la peroxydase

D'après les résultats expérimentaux concernant l'évaluation du temps d'incubation de la peroxydase et l'inhibiteur, en plus du temps nécessaire pour laisser réagir le substrat avec 1HCH, nous constatons que le temps nécessaire pour la pré-incubation entre l'inhibiteur et l'enzyme est 10 min à 37°C (ce temps est défini en gardant la couleur rose de la solution témoin et nous avons éliminé les concentrations d'inhibiteurs qui nous aboutit à la couleur jaune). Alors que le temps nécessaire pour la réaction définie par la fixation de l'absorbance est déterminé dans l'expérience par 2,5 min (figure 5). Ces expériences sont conformes avec la notice du coffret de réactif sachant qu'ils ont optimisé les concentrations et le temps de la réaction (5 min) ainsi la stabilité de la couleur rose du complexe obtenu jusqu'à 30 min, nous voulons à travers cette expérience prouver ces résultats avec l'inhibiteur.

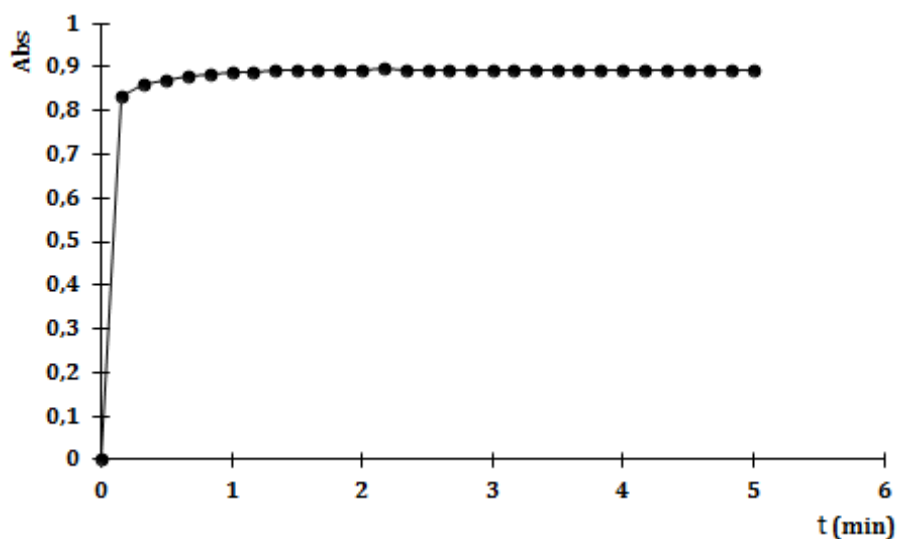


Figure 5. Courbe cinétique de la catalyse enzymatique de l'acide urique «Abs=f (t)».

2. Paramètres cinétiques déterminés pour la peroxydase d'*Armoracia rusticana*

À l'aide des mesures spectrophotométriques réalisées sur l'activité enzymatique de la peroxydase et l'uricase, on aperçoit que ces deux enzymes présentent une cinétique michaelienne.

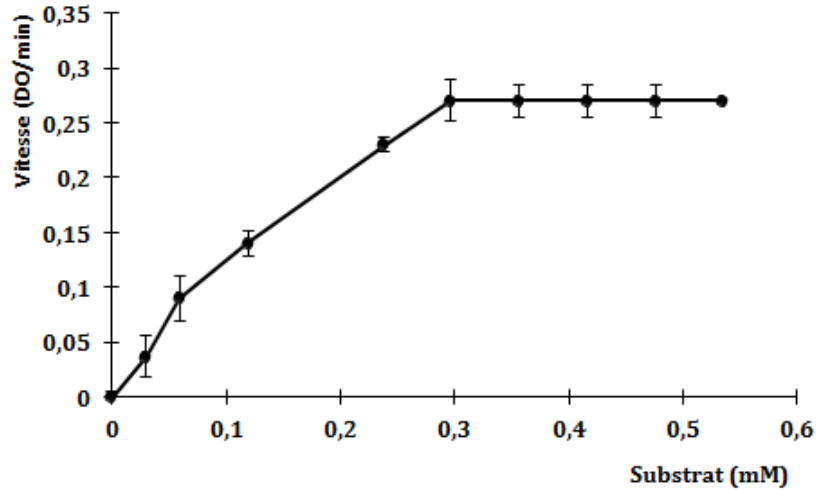


Figure 6. Courbe cinétique de la catalyse enzymatique de l'acide urique « $V=f(S)$ ».

Les paramètres cinétiques de l'enzyme (V_{max} , K_M) sont déterminés selon l'hypothèse d'une cinétique Michaelienne à l'aide de l'équation en double inverse de LineweaverBurk [$1/v=f(1/S)$]. D'après la représentation graphique de LineweaverBurk, on peut alors déterminer la vitesse maximale V_{max} , et la constante michaelienne K_M . Le tableau suivant (Tableau 1) résume les valeurs obtenues de ces paramètres.

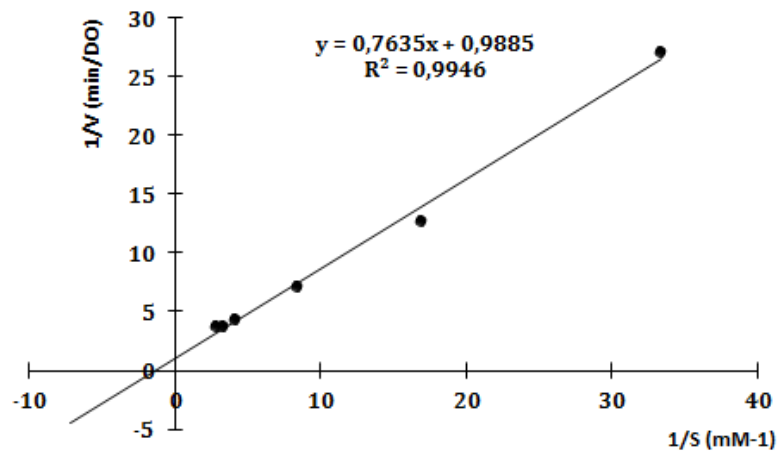


Figure 7. Représentation de Lineweaver-Burk de l'enzyme michaelienne $1/V = f(1/S)$ de la HCH.

Tableau 1. Les paramètres cinétiques de la peroxydase d'*A.ruticana*.

$V_{\max}(\text{Do}/\text{min})$	$k_M\text{mM}$	$1/V_{\max} \text{ min}/\text{Do}$	$1/K_M\text{mM}^{-1}$
1,01±0,01	0,77±0,02	0,99	1,30

Sachant que : V_{\max} : vitesse maximale de la réaction ; K_M : la constante de Michaelis-Menten.

Malheureusement, aucune étude n'a été effectuée pour déterminer les paramètres cinétiques de cette enzyme. En conséquence, nous n'avons pas discuté ces valeurs.

3. Inhibition de la réaction catalysée par la peroxydase

Afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur de nos molécules et extraits sur l'activité de cette enzyme dans le but de trouver le traitement de goitre, l'activité de peroxydase de *Armoracia ruticana* a été empêchée par les différents inhibiteurs, avec une inhibition de 50% de l'activité originale de l'enzyme, pour chaque inhibiteur, les valeurs IC_{50} ont été calculées.

Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations des inhibiteurs exprimées en mg/ml, nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50 % (IC_{50}) de chaque échantillon (les courbes sont présentées dans la figure 8. Ces représentations graphiques nous ont permis de déterminer les valeurs des IC_{50} où ces valeurs sont enregistrées dans le tableau 2.

Tableau 2. Les valeurs d' IC_{50} des inhibiteurs.

Inhibiteurs	$IC_{50} \text{ mg/ml}$	$IC_{50} \mu\text{g/ml}$	$IC_{50}\text{mM}$	Ki mM
Hispidine	0,023 ± 0,002	23 ± 2	0,093 ± 0,008	0,022
<i>Inonotus hispidus</i>	0,023 ± 0,004	23 ± 4	/	/
Harmine	0,030 ± 0,001	30 ± 1	0,141 ± 0,004	0,037
<i>Marrubium vulgare</i>	0,027 ± 0,002	27 ± 2	/	/
Acide gallique	0,025 ± 0,004	25 ± 4	0,150 ± 0,023	0,047

Les résultats obtenus montrent que tous les composés phénoliques et les alcaloïdes ont un pouvoir inhibiteur important de l'activité enzymatique de la peroxydase. Les valeurs des IC_{50} varient selon la nature et la structure chimique de chaque inhibiteur et les groupements fonctionnels que les constituent.

Ces présents résultats démontrent que les cinq solutions inhibitrices ont montré une dégradation de la couleur proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'inhibiteur par rapport au contrôle.

Nous avons enregistré que toutes les solutions utilisées présentent un pouvoir inhibiteur puissant, et les valeurs d'IC₅₀ varient entre 0,023mg/ml (pour l'hispidine) et 0,030 mg/ml (pour harmine). D'après ces résultats, nous pouvons dire que ces extraits, composés phénoliques et alcaloïdes ont un pouvoir inhibiteur important contre la peroxydase d'*Armoracia ruticana*.

Les valeurs de Ki calculées théoriquement par rapport aux molécules pures montrent que l'hispidine présente l'affinité la plus importante vis-à-vis de la peroxydase suivie de harmine et l'acide gallique.

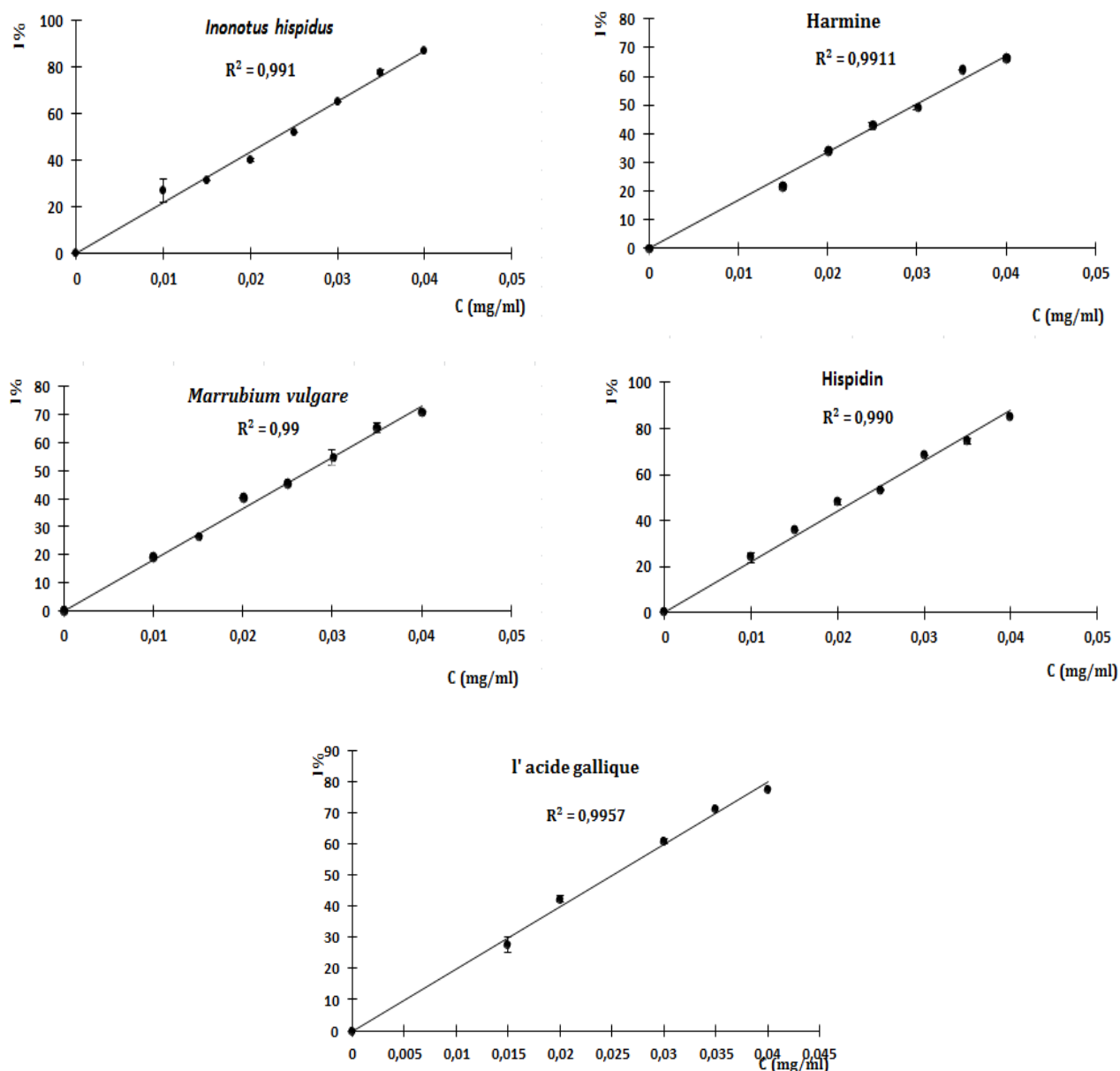


Figure 8. Représentation graphique de l'inhibition de la réaction catalysée par la peroxydase.

4. Modélisation moléculaire

Il a été précédemment prouvé que les acides aminés catalytiques de l'uricase et de la peroxydase n'étaient pas identiques. Les acides aminés catalytiques d'uricase sont Lys 61, Lys10, Thr57, Asp58, Phe 159, Glu228, Asn254 et Arg176, comparés aux acides aminés catalytiques de la peroxydase qui sont His42, Arg38 et Asn70. Dans la présente étude, nous démontrons que l'effet inhibiteur de ces composés phénoliques et alcaloïdes est contre la peroxydase non plus à l'enzyme uricase.

Les résultats expérimentaux obtenus ne sont pas assez suffisants pour confirmer les mécanismes réactionnels de ces inhibiteurs. Donc, il est nécessaire de faire des études bioinformatiques plus approfondies dans le but d'avoir une idée sur le type et la nature d'interaction entre la peroxydase et les inhibiteurs afin de mieux comprendre l'aspect structural de cette inhibition. En utilisant les deux logiciels Ligplot⁺ pour connaître les liaisons hydrogènes ainsi les distances entre l'inhibiteur et 1HCH et Discovery studio vizualiser v4.0 pour avoir les interactions hydrophobes de type *Pi-alkyle* et *Pi-Pi T-shaped*.

Harmaline (4,9-dihydro-7-methoxy-1-methyl-3H-pyrido [3,4-b] indole) est composé de groupement benzyle, indole, et pyridole. Cet alcaloïde prend vraiment une place bien observée. Il est entouré d'un nombre élevé d'acides aminés formants une cavité, ce qui mène le noyau benzyle de faire des multiples liaisons hydrophobes de type *Pi-alkyle* avec les acides aminés Ala 34, Leu37 et Arg38. De plus, le noyau indole a interagi de façon hydrophobe formant des interactions *Pi-alkyle* avec Ala34 et Arg38, ainsi des interactions hydrophiles avec la Lys174 et Arg38 l'acide aminé de site actif de la peroxydase, cette liaison de type hydrogène est entre l'atome H de l'Arg38 et l'atome N de groupement indole, le groupement pyridole a interagi de façon hydrophobe avec les deux acides aminés Arg31 et Arg38, et par une liaison hydrogène avec Lys174 cette interaction est répétée 46fois. Les interactions obtenues assurent que harmaline est un inhibiteur compétitif de la peroxydase (figure 10 et 12).

Harmine, se déplace de façon observée dans une ouverture formée par plusieurs acides aminés. Il interagit par plusieurs liaisons hydrophobes y-compris le groupement pyridole avec Leu138, Ala140, Pro141 et His42 l'acide aminé de site catalytique du 1HCH. Et le groupement indole avec Pro139 et Ala140, ainsi, le groupement benzyle avec Ala140 et Asn135. D'autre part, harmine forme des liaisons hydrogènes avec Arg38 l'interaction est donc entre H de Arg38 et N, aussi le noyau pyridole avec une distance de 3,01Å et le noyau indole avec Leu138, cette interaction est répétée 51fois. C'est une inhibition compétitive (figure 10 et13).

Harmalol, qui est capable de faire de multiples liaisons en citant le noyau benzyle qui s'interagit par des interactions hydrophobes avec les acides aminés suivants Ala140 et Pro 141, la liaison est de type alkyl. D'autre part, il interagit de manière hydrophile avec l'un des acides aminés de site actif Arg38, cette liaison hydrogène se forme entre O de noyau benzyle et l'atome H de Arg38 avec une distance de 2,98Å. En plus, le noyau forme une interaction

hydrophobe de type alkyle avec l'acide aminé Ala140 cette interaction est répétée 16fois. Ce qui confirme l'efficacité de cet inhibiteur. Nous constatons que harmalol est un inhibiteur compétitif (figure 10 et14).

Harmol, sa structure lui donne la priorité d'être placé à l'intérieur entre les acides aminés de site actif Arg38, His42 et Asn70 pour former une interaction hydrogène entre l'oxygène de l'inhibiteur et H de Arg38 avec une distance de 3,07 Å, de l'autre côté, il forme deux interactions hydrophobes, le noyau indole avec His170 et le noyau benzyle avec Asp247 cette interaction est répétée 24fois. Harmol est un inhibiteur compétitif (figure 10 et15).

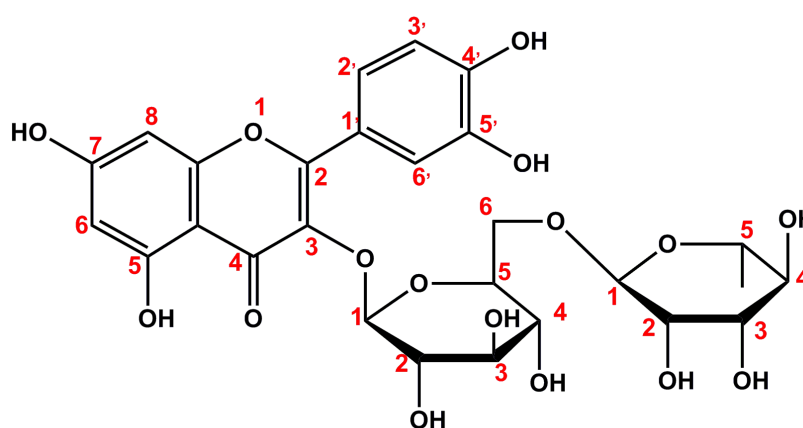
L'hispidine est composé de groupement benzyle et un hétérocycle avec trois groupements hydroxyles, sa structure donne l'occasion au cycle benzyle d'être piégé entre l'acide aminé Ala34 et Arg38. Le noyau benzyle forme deux liaisons hydrophobes de type Pi-alkyle avec ces deux acides aminés, alors que son groupement hydroxyle interagit d'une liaison hydrogène avec Ala34. L'hétérocycle forme deux liaisons hydrogènes avec l'acide aminé de site actif Arg38 entre l'oxygène de l'hispidine et le N d'acide aminé avec une distance de 2,87Å et dans le deuxième cas entre H de l'Arg38 et l'oxygène de l'inhibiteur, cette interaction est répétée 58fois. C'est une inhibition compétitive (figure 10 et16)

L'acide gallique, appelé aussi 3.4.5-trihydroxybenzoïque appartient à la classe des acides phénoliques de catégorie acide hydroxybenzoïque. La présence de noyau benzyle lui permet d'interagir de manière hydrophobe avec l'acide aminé His170, en plus les groupements hydroxyles forment deux liaisons hydrogènes avec l'Arg38 de site catalytique et à une distance de 3,11 Å, et l'atome H de la fonction acide forment une liaison hydrogène avec Ala140 cette interaction est répétée 28fois. Ce qui assure que l'acide gallique est inhibiteur compétitif (figure 10 et17).

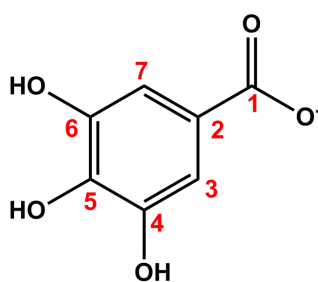
La rutine fait partie de la grande famille des flavonoïdes, c'est un diglucoside composé de quercétine et de rutinose. La présence de la partie osidique facilite la formation des liaisons hydrophiles entre les deux groupements hydroxyles et H d'Asn70 l'un des acides aminés de site actif pour donner deux liaisons hydrogènes de distance de 2,92 Å et 2,99 Å. Aussi l'un des deux sucres interagit avec une seule liaison hydrogène avec Lys65. Le fragment de quercétine forme à la fois des liaisons hydrophobes avec Arg31 et Arg75 et des liaisons hydrogènes avec Glu25 et Arg75 cette interaction est répétée 54fois. Donc, nous constatons que cette inhibition est compétitive (figure 11 et18).

Marrubiine, est une lactone diterpénique et sa structure lui donne la spécificité de réagir avec les divers acides aminés y-compris l'un des acides catalytiques Asn70 avec une liaison hydrogène de distance de 3,00 Å et d'autre part il forme des interactions hydrophobes avec Lys65, Ser73, Phe77 et Pro78 cette interaction est répétée une seule fois. La position de sa fixation confirme que c'est un inhibiteur compétitif (figure 10 et 19).

Le dérivé de l'acide gallique, sa structure dans l'espace le mène à être piégé dans une ouverture entouré par des acides aminés. Il interagit en formant des liaisons hydrophobes avec Arg38, Phe68, Pro139, Phe179, Pro141 et Ile244. De plus, il forme une liaison hydrogène au niveau de liaison osidique avec l'un des acides aminés de site actif Arg38, cette interaction est répétée 13fois. C'est une inhibition compétitive (figure 11 et 20).



Rutin C₂₇ H₃₀ O₁₆



Galic acid C₇ H₆ O₅

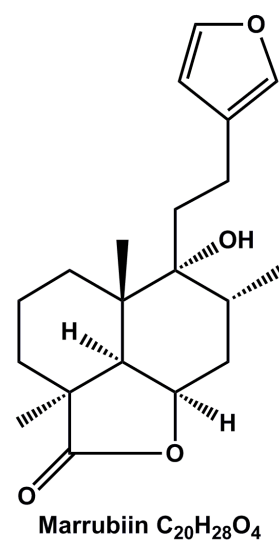
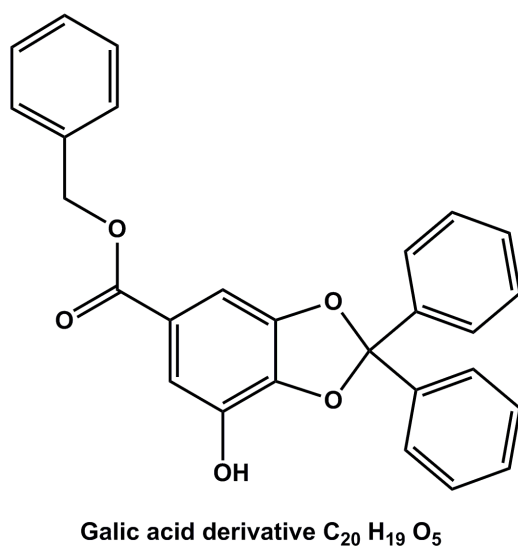
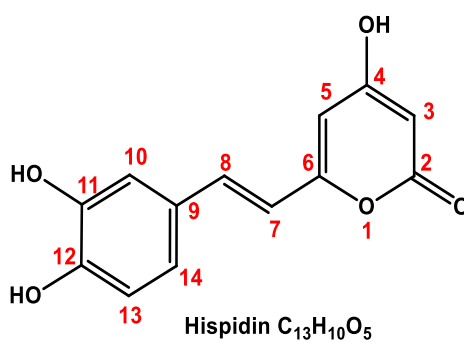
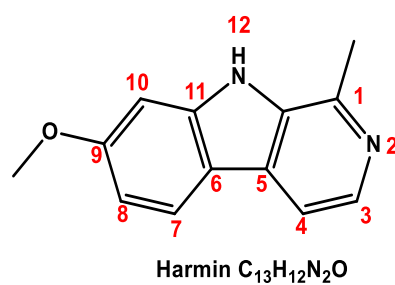
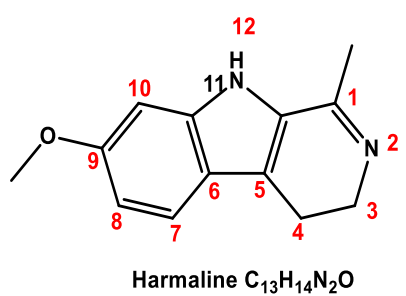
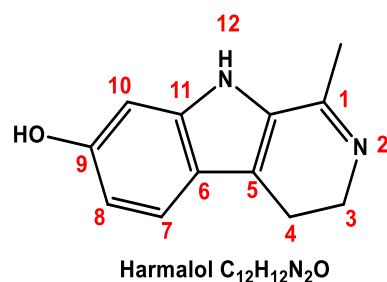
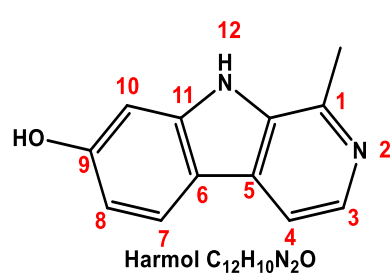
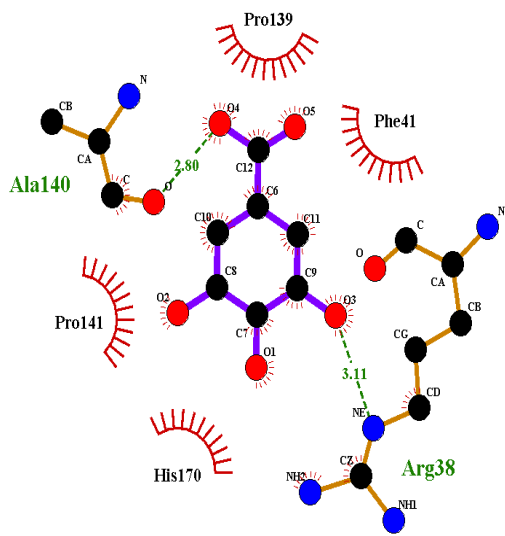
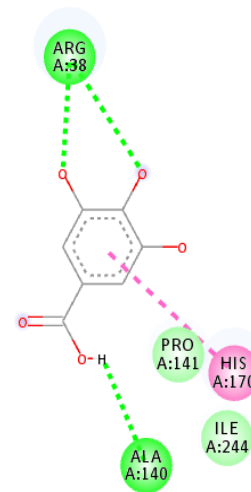


Figure 9. Les structures 2D des différents inhibiteurs.

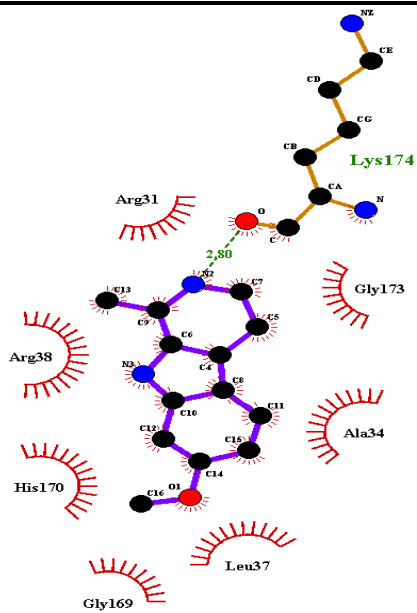


galichch

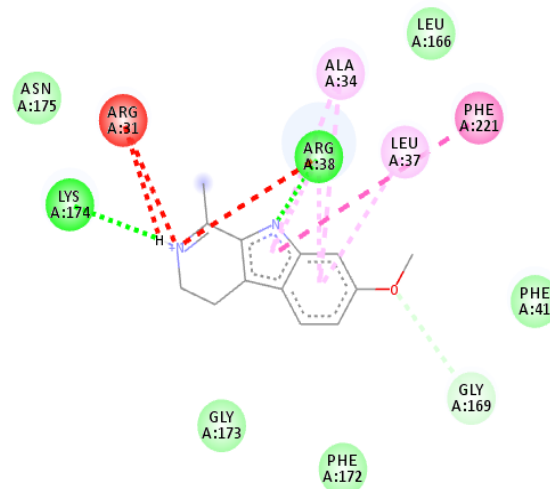


Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Pi T-shaped

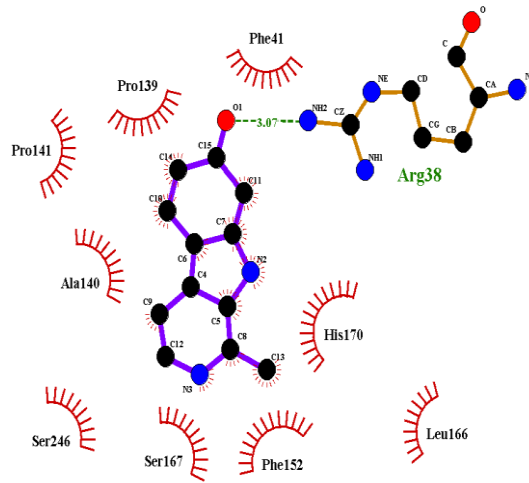


harmalinehch

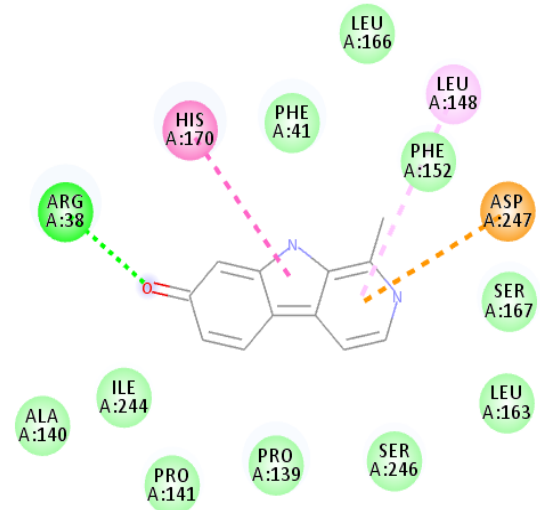


Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Carbon Hydrogen Bond
- Pi-Pi T-shaped
- Pi-Alkyl
- Unfavorable Donor-Donor
- Unfavorable Positive-Positive

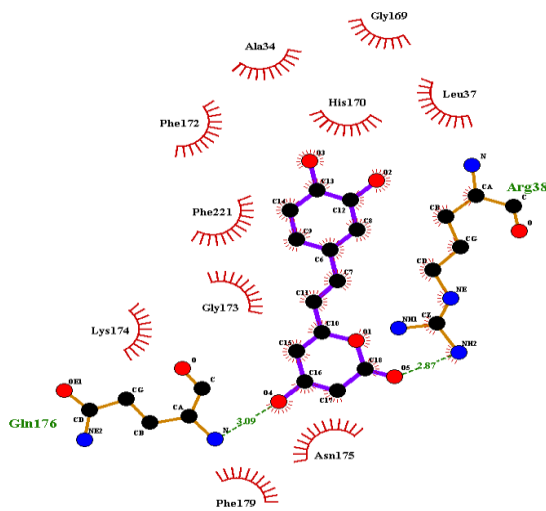


harmolhch

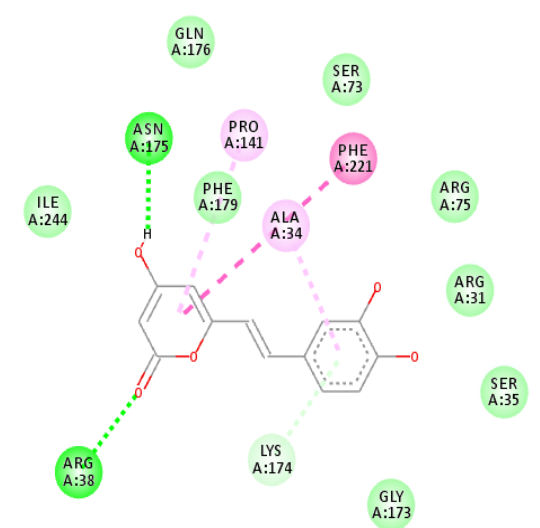


Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Anion
- Pi-Pi T-shaped
- Pi-Alkyl



hispidinhch



Interactions

- van der Waals
- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Donor Hydrogen Bond
- Pi-Pi T-shaped
- Pi-Alkyl

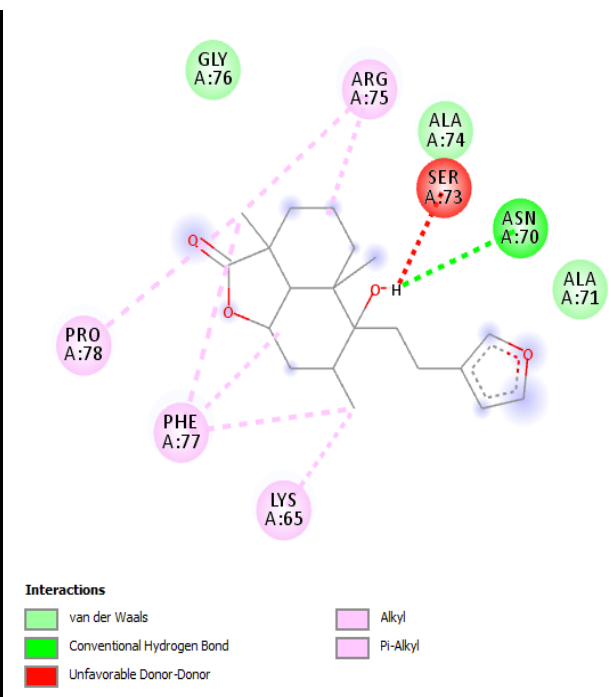
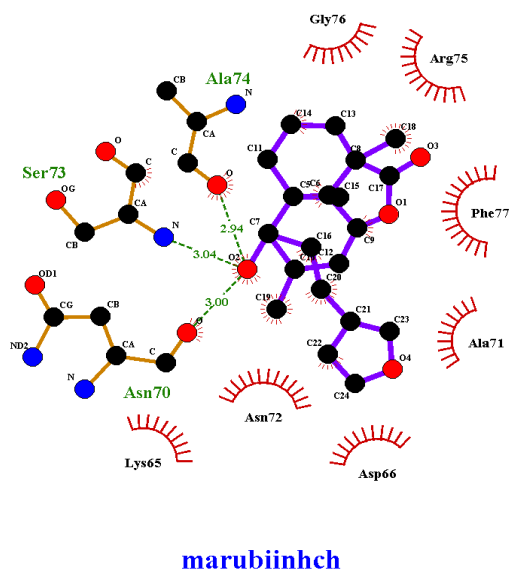
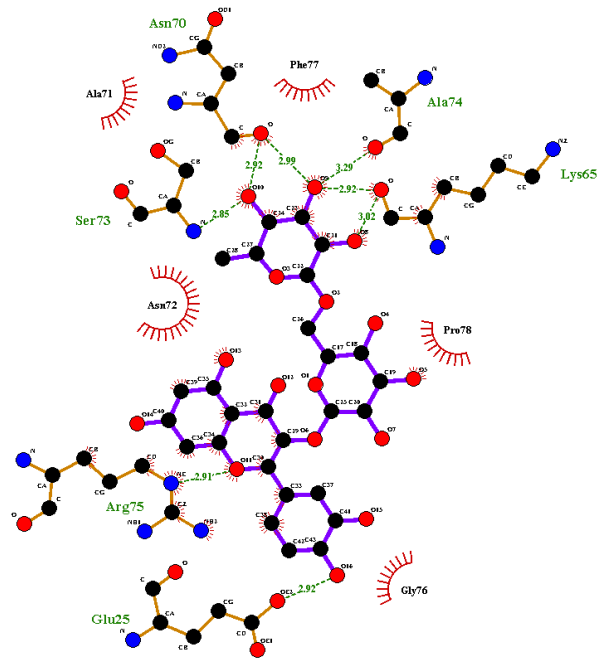
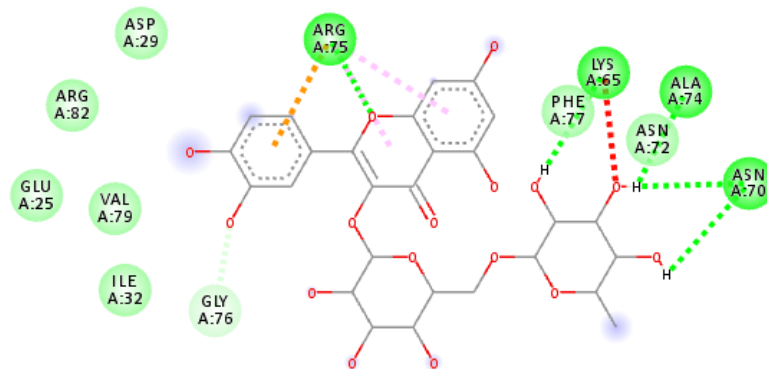


Figure 10. Images représentant les interactions 2D des inhibiteurs.
 (à gauche avec ligplot⁺, à droite avec discovery studio)

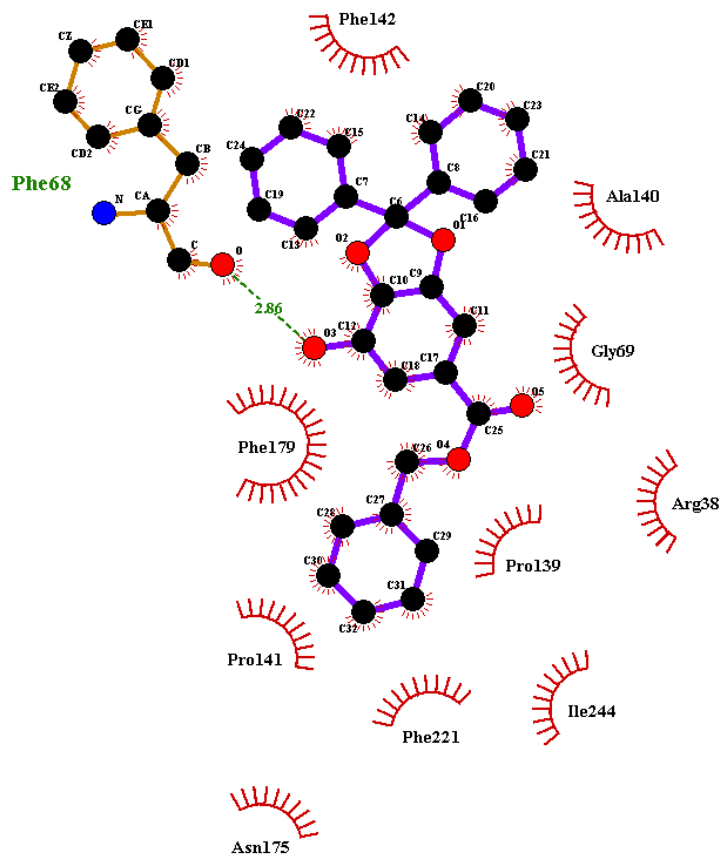


rutin_hch

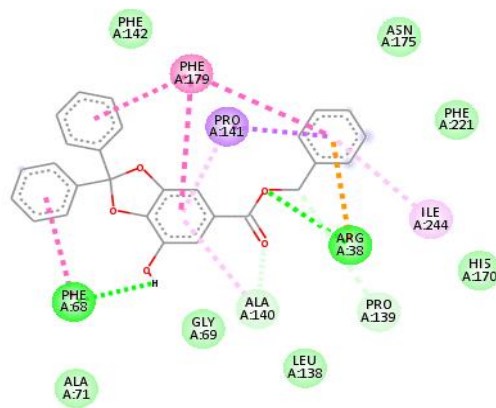


Interactions

- | | |
|--|---|
|  van der Waals |  Unfavorable Acceptor-Acceptor |
|  Conventional Hydrogen Bond |  Pi-Cation |
|  Carbon Hydrogen Bond |  Pi-Alkyl |



Galic acid derivative



Interactions

van der Waals	Pi-Sigma
Conventional Hydrogen Bond	Pi-Pi Stacked
Carbon Hydrogen Bond	Pi-Pi T-shaped
Pi-Cation	Pi-Alkyl

Figure 11. Images représentant les interactions 2D des inhibiteurs.
(en haut ligplot⁺, en bas discovery studio)

Tableau 3.Type des liaisons entre les inhibiteurs et les acides aminés de site actif.

Les inhibiteurs	Acide aminé de l'interaction	Type de liaison	Nombre de répétitions	Pourcentage de répétitions (%)
Harmine	Arg 38 et His 42	Liaison hydrogène et pi-alkyle	51/157	32,48
Harmaline	Arg 38	Liaison hydrogène	46/56	82,14
Harmol	Arg 38	Liaison hydrogène	24/33	72,72
Harmalol	Arg 38	Liaison hydrogène	16/42	38,09
Hispidine	Arg 38	Liaison hydrogène	58/96	60,41
Acide gallique	Arg 38	Liaison hydrogène	28/202	13,86
Rutine	Asn70	Liaison hydrogène	54/75	72
Marrubiine	Asn70	Liaison hydrogène	¼	25
Dérivé de l'acide gallique	Arg38	Liaison hydrogène	13/48	27,08

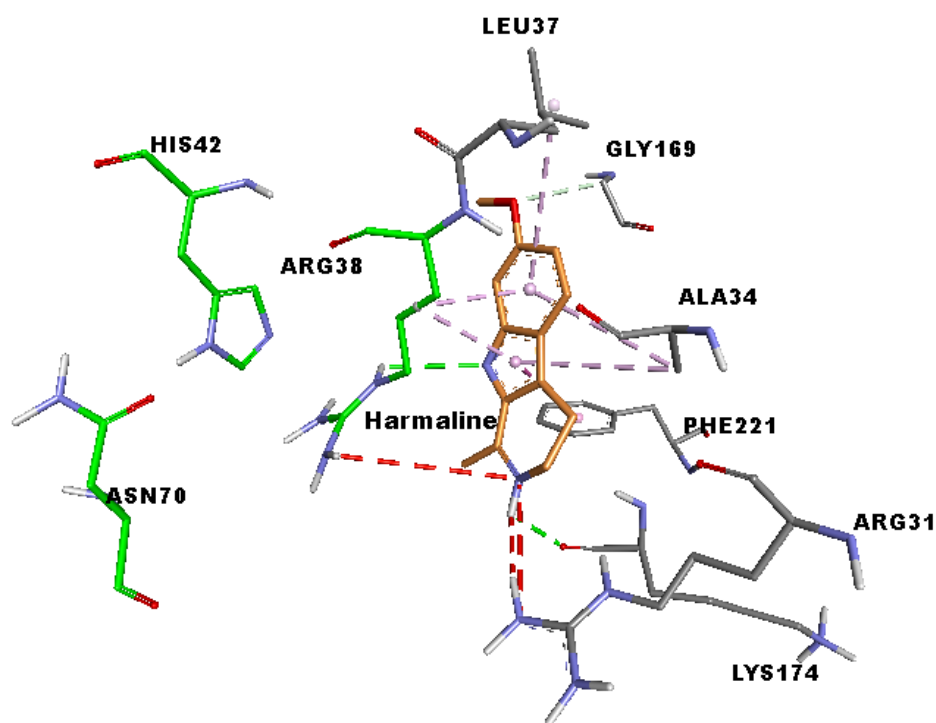


Figure 12.Docking moléculaire de l'inhibiteur harmaline (couleur orange) avec 1HCH.

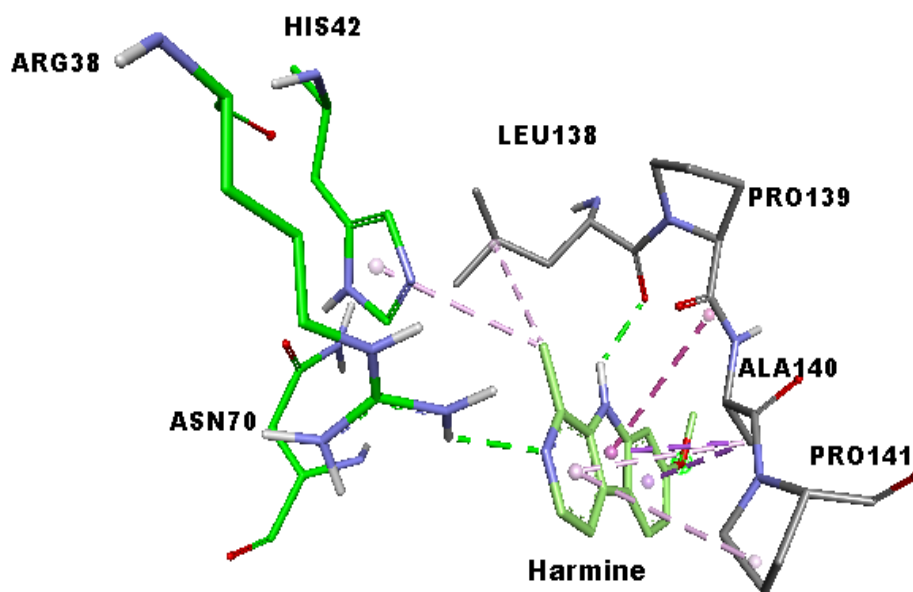


Figure 13.Docking moléculaire de l'inhibiteur harmine (couleur vert clair) avec 1HCH.

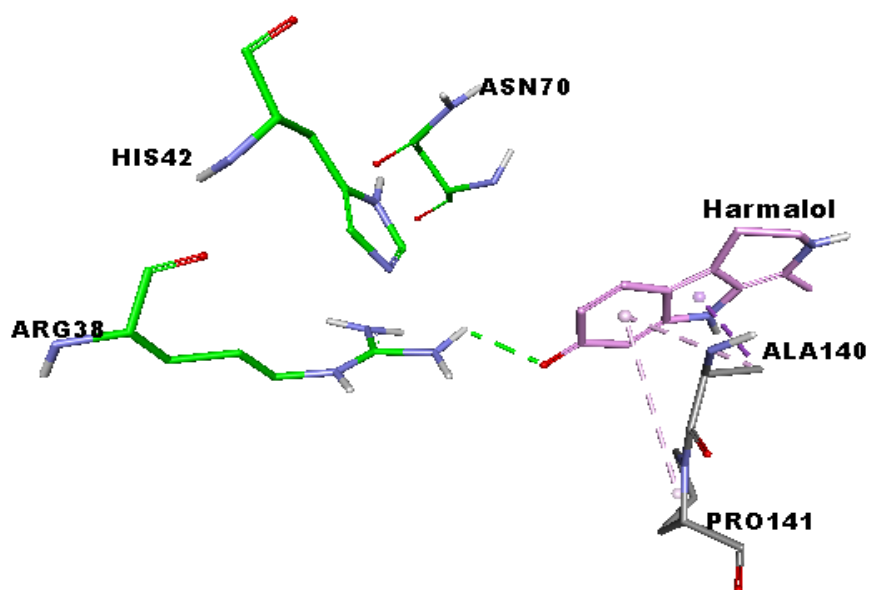


Figure 14.Docking moléculaire de l'inhibiteur harmalol (couleur mauve clair) avec 1HCH.

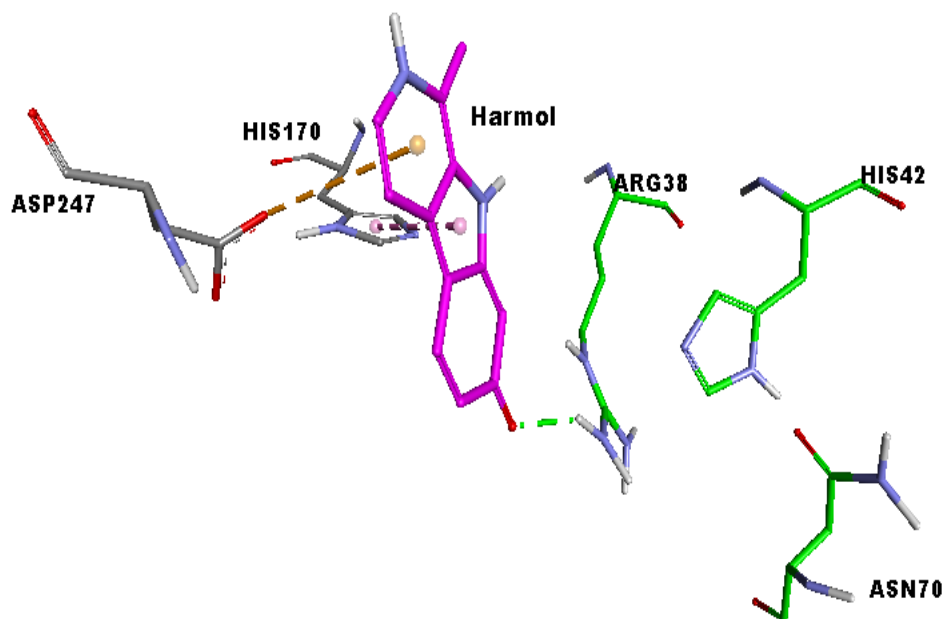


Figure 15.Docking moléculaire de l'inhibiteur harmol (couleur rose) avec 1HCH.

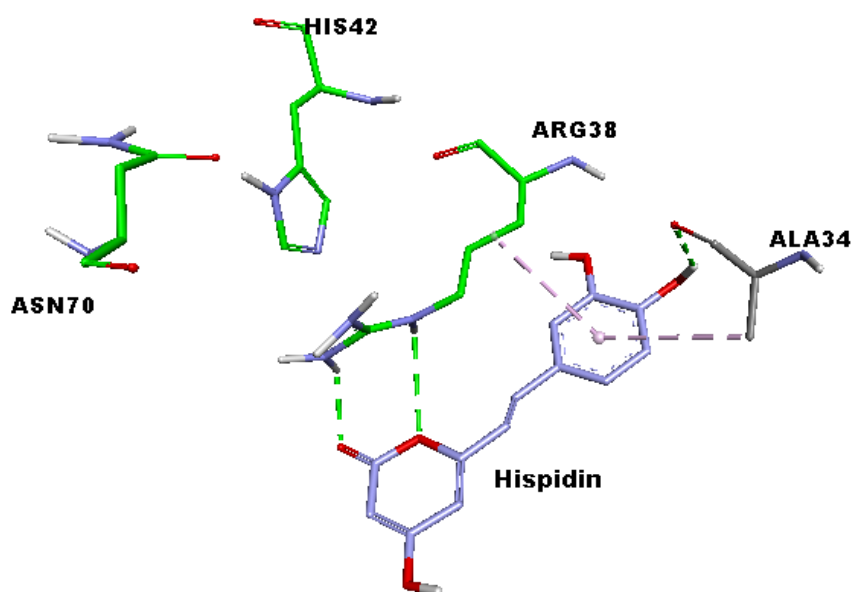


Figure 16.Docking moléculaire de l'inhibiteur hispidine (couleur bleu clair) avec 1HCH.

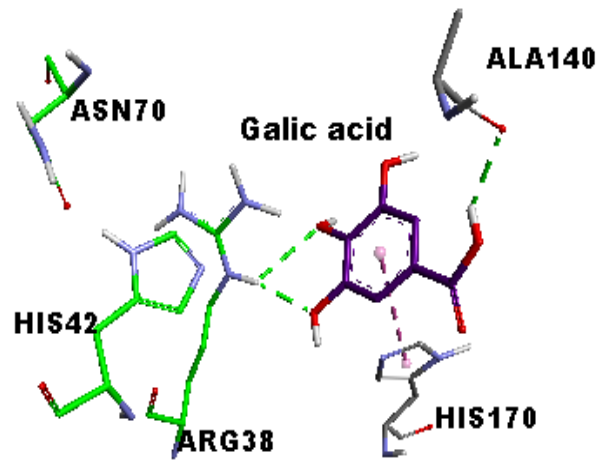


Figure 17.Docking moléculaire de l'inhibiteur l'acide gallique (couleur mauve foncé) avec 1HCH

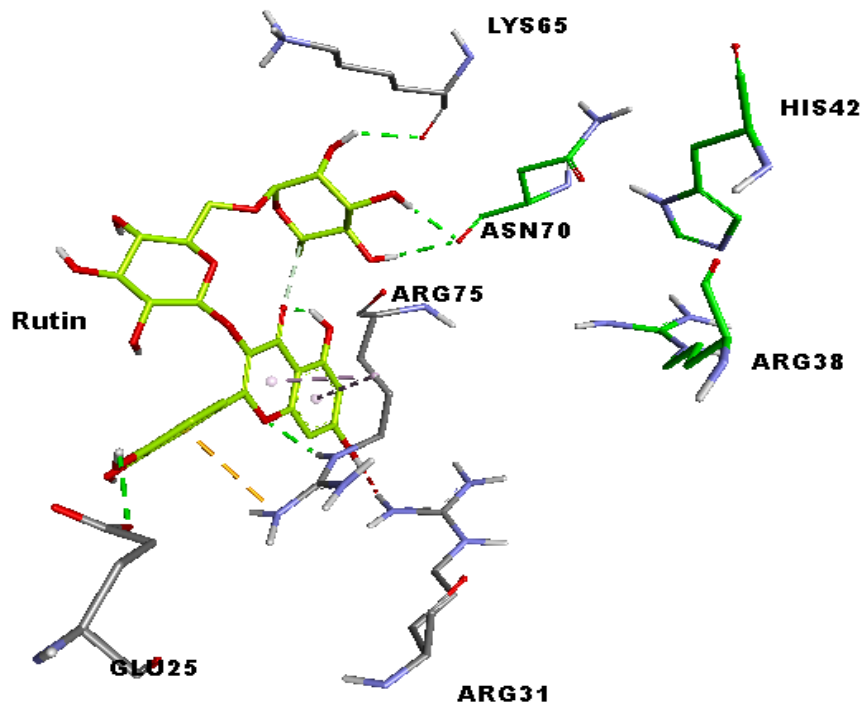


Figure 18.Docking moléculaire de l'inhibiteur rutine (couleur vert pistache) avec 1HCH.

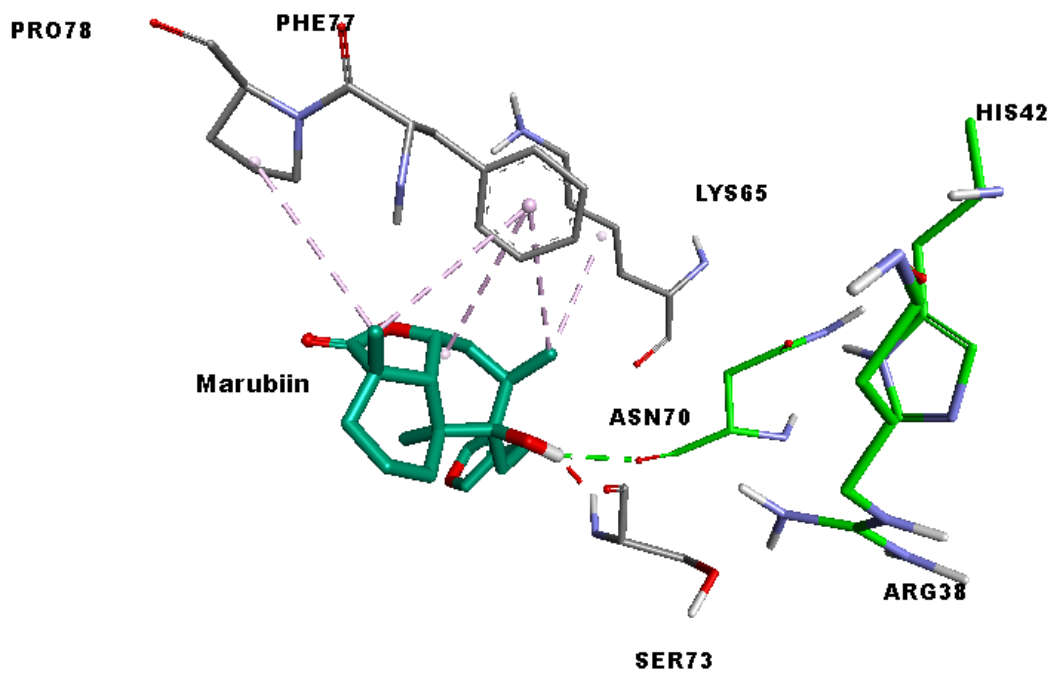


Figure 19.Docking moléculaire de l'inhibiteur marrbiine (couleur vert bleu) avec1HCH.

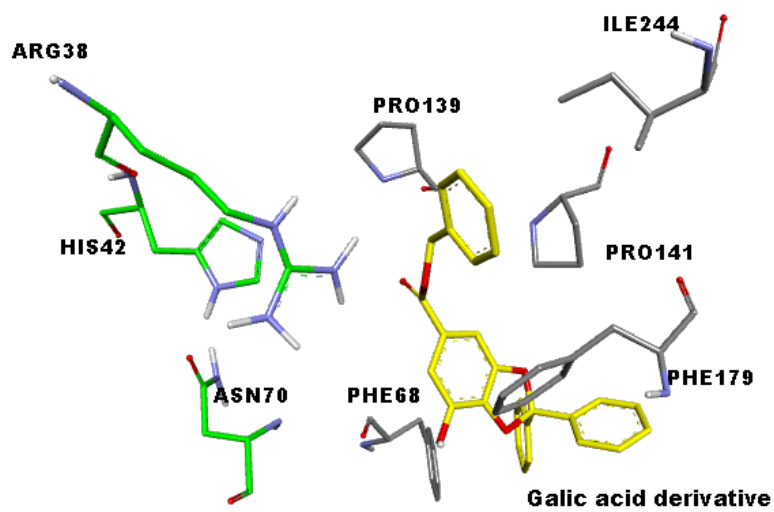


Figure 20.Docking moléculaire de l'inhibiteur dérivé de l'Ac gallique (couleur jaune) avec1HCH.

CONCLUSION GENERALE

Le goitre est la maladie thyroïdienne la plus fréquente, il affecte plus de 10% de la population à travers le monde. C'est le domaine de recherche le plus impliqué actuellement. De cette approche, nous avons pensé de trouver un traitement de cette maladie à base des substances naturelles y-compris les composés phénoliques et les alcaloïdes ayant des propriétés pharmacologiques contre certaines maladies.

Dans notre étude, le choix des inhibiteurs à étudier est effectué selon leurs structures chimiques, nous nous sommes intéressées d'étudier ses effets inhibiteurs contre la peroxydase d'*Armoracia ruticana*.

Les résultats expérimentaux obtenus à travers ce test montrent que tous les inhibiteurs possèdent une activité inhibitrice ce qui est confirmé par les valeurs des IC₅₀ qui sont variant entre 0,023mg/ml (pour l'hispidine) et 0,030 mg/ml (pour harmine), donc nous concluons que l'hispidine le produit majeur de l'*Inonotus hispidus* est le meilleur inhibiteur contre la peroxydase.

Ces résultats sont prouvés par l'étude bioinformatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de la peroxydase.

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

Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les molécules isolées inhibitrices de la peroxydase nécessitent leurs tests *in vivo* afin d'étudier leurs potentialités commedes futures médicaments contre le goitre. Il reste encore beaucoup de plantes utiles locales qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de l'être afin de déterminer leurs potentialités dans les domaines étudiés. Ces plantes peuvent présenter plusieurs types d'activités biologiques par exemple des anti-inflammatoires, des antifongiques, des inhibiteurs d'enzymes, antibactériens, des pesticides, des antiviraux, des antitoxicités etc... Ainsi, il existe plusieurs molécules naturelles dans les différentes bases de données qui nécessitent leur modélisation moléculaire afin de déterminer les meilleurs inhibiteurs de la peroxydase.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

Arshad, N., Zitterl-Eglseer, K., Hasnain, S., Hess, M., 2008. Effect of *Peganumharmala* or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytother. Res.* 22, 1533–1538.

Astulla, A., Zaima, K., Matsuno, Y., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Cholies Zaini, N., Morita, H., 2008. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities, *J Nat Med.*, 62: 470–472.

Bernard S, *Biochimie clinique-Instruments et technique de laboratoire diagnostique médicaux chirurgicaux.* 2^{ed} Ed. 1989 p153-156 Ed. MALOINE PARIS.

BenarousKhedidja, Isabelle Bombarda, Isabel Iriepa, Ignacio Moraleda, Herbet Gaetan, Abderrahmane Linani, Djillali Tahri, Mohamed Sebaa, Mohamed Yousfi, Harmaline and hispidin from *Peganumharmala* and *Inonotushispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: *In silico* and *in vitro* studies, *Bioorganic Chemistry* 62 (2015) 1–7.

BenarousKhedidja, 2010. Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de *Candida rugosa*, thèse de magister, université Amar Telidji, Laghouat, p133.

BenarousKhedidja, 2014. Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits naturels de cinq plantes locales sur la lipase de *Candida rugosa*, thèse de doctorat, université Amar Telidji, Laghouat, p173.

BenarousKhedidja, <http://geniebiologique.e-monsite.com>

Cloude J., Bennett M.D, Fred plum M.D, Cecil traité de médecine interne. 1^{ere} édition. 1997. p1241.

Colonna S., Gaggero N., Richelmi C. and Pasta P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidase. *TIBTECH.* 17:163-168 Delannoy E., Marmey P., Pennel C. and Nicole M. (2004). Les peroxydases végétales de classe III. *Acta botanica gallica* 151: 353-380.

Fossati P, Prencipe L, Berti G., Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulfonic acid-4-amino phenazone chromogenic system in direct enzymatic assays of uric acid in serum and urine. *Slin.Chem.* 26 (227-231) 1980.

Gerd Herold, *Médecine interne.* 4^{ème} édition. 2012. p728.

Katie B. Paul, Joan M. Hedge, Chitrlekha Macherla, Dayne L. Filer, Emily Burgess, Steven O. Simmons, Kevin M. Crofton, Michael W. Hornung, Cross-species analysis of thyroperoxidase inhibition by xenobiotics demonstrates conservation of response between pig and rat, *Toxicology* 312 (2013) pp97-107.

Laurent Fraisse, Marie Claude Bonnet, Jacques Philippe de Farcy, Christophe Agut, Didier Dersigny et Alain Bayol, A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters, *Analytical Biochemistry* 309 (2002) pp173–179.

Nasser Ali, Rolf Jansen, Horst Pilgrim, Kerstin Libirra, Ulrike Lindequiste, Hispolon a yellow pigment from *Inonotushispidus*, *Phytochemistry*, 1996, Wol. 41, No. 3, pp. 927–929.

Sin-Ting Lau, Tingwen Zhou, Jessica Ai-jia Liu, Eva Yi-Man Fung, Chi-Ming Che, Brian Hung-Hin Lang, Elly Sau-Wai Ngan, Dysregulation of clathrin promotes thyroid cell growth and contributes to multinodular goiter pathogenesis, *biochimica et biophysica Acta* 1825 (2015) 1676-1686.

Souza.M.M, Jesus.R.A.P, Cechinel-Filho.V and Schlemper.V, Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*, *Gustav Fischer Verlag* 1998, *Phytomedicine*, Vol.5(2), pp.103-107.

Tietz N.W, Burtis.C.A, Ashwood.E.R, Saunders.W.B, Test book of clinical chemistry, 3rd Ed (1999) p.1245-1250.

Végh, I., 1987. Champignons des arbres et arbustes d'ornement: premier inventaire des Champignons identifiés en France, Editions Quae, p 91.