Résumé

Les travaux menés au cours de cette thèse visent dans un premier temps à l'étude phytochimique de *Peganum harmala* (*P. harmala*) notamment la caractérisation des alcaloïdes par chromatographie sur couche mince (CCM), fractionnement par flash chromatographie, analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et quantification des alcaloïdes des parties aériennes, graines et racines de *P. harmala* par HPLC. L'étude phytochimique a montré que les parties aériennes et les graines contiennent comme alcaloïdes majoritaires l'harmine et l'harmaline avec des taux de «0,055», «2,93» et «0,05», «3,8» %, respectivement, tandis que les racines contiennent comme alcaloïdes majoritaires l'harmine et l'harmol avec des taux de «3,2» et «2,9» %, respectivement. Dans un deuxième temps, les travaux ont visé à l'étude pharmacologique des extraits et des alcaloïdes purs de la plante par l'évaluation des effets antioxydants des extraits alcaloïdiques notamment la détermination du pouvoir réducteur, effet scavenging des radicaux DPPH et ABTS, la chélation du fer ferreux et aussi par l'évaluation des effets anti-inflammatoires via l'inhibition de l'activité de la myéloperoxydase (MPO), inhibition de l'oxydation des LDL. En plus, l'énergie de liaison a été déterminée par le criblage virtuel, ou le docking, le potentiel rédox à l'aide d'un Potentiostat Epsilone et la cytotoxicité des extraits alcaloïdiques sur des globules rouges a été mesurée. Les meilleurs pouvoir réducteur ont été obtenus avec l'extrait alcaloïdique des racines et des graines (0,18 ± 0,007 ; 0,17 ± 0,001UA), respectivement. Le meilleur effet scavenging du radical DPPH a été obtenu avec l'extrait alcaloïdique des graines (ATSe) avec une IC_{50} de 0,15 mg/ml, et le meilleur effet scavenging du radical $ABTS^{\bullet+}$ a été obtenu avec ATSe (0,8 mg/ml) avec une capacité antioxydante de 1278,68 mmol équivalent trolox. Les extraits de différentes parties de *P. harmala* ont exhibé une très bonne activité chélatrice du fer. Le test chlorine amine a démontré que le meilleur effet inhibiteur de la MPO a été obtenu avec l'extrait de graine (20 µg/ml) avec un pourcentage de 97 ± 5%. Concernant, les alcaloïdes purs, le meilleur effet a été enregistré avec l'harmaline, l'harmine et l'harmane avec une IC_{50} de 80, 260 et 720 nM, respectivement. Par contre nous avons noté que l'harmol et l'harmalol ne sont pas actifs sur cette enzyme. Ces alcaloïdes exercent des effets inhibiteurs similaires sur l'oxydation des LDL induite par la MPO. L'analyse du docking moléculaire des alcaloïdes ont montré que ces deniers ont tous une affinité au site actif de l'enzyme avec une énergie de liaison qui est supérieur à -3.1 kcal/mol. Le potentiel rédox mesuré des alcaloïdes est de + 1014, 1014 et 1003 mV pour l'harmine, l'harmaline et l' harmane, respectivement et de + 629/778 et 532/644 mV pour l'harmalol et l'harmol, respectivement. En fin, le test de toxicité des extraits alcaloïdiques de *P. harmala* vis-à-vis de globules rouges a démontré que ces extraits ne sont pas toxiques même à une concentration élevée (1m/ml) à l'exception de l'extrait de la partie aérienne. L'inhibition de l'activité de la myéloperoxydase par les alcaloïdes de *P. harmala* a été rapportée pour la première fois, qui peut expliquer l'utilisation traditionnelle de cette plante comme un remède anti-inflammatoire.

Mots clés : *Peganum harmala*, alcaloïdes, HPLC, myéloperoxydase, Docking, Oxydation des LDL, anti-inflammatoire.

Abstract

This thesis was conducted in order to evaluate in the first one on the phytochemical study of *Peganum harmala* (*P. harmala*) i.e. characterization of alkaloids by Thin Layer Chromatography (TLC),fractionation by flash chromatography, analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) and quantification by HPLC of the alkaloids in aerial parts, seeds and roots of *P. harmala*. The phytochemical study demonstrated that aerial parts and seeds contained as major alkaloids harmine and harmaline with «0.055», «2.93» and «0.05», «3.8» %, respectively, while the roots contained as major alkaloids harmine and harmol with 3.2 and 2.9 %, respectively. Secondly, it aims to determine the pharmacological study of the extracts and pure alkaloids of *P. harmala* by the evaluation of antioxidant effect of alkaloids extract: reducing power, DPPH and ABTS scavenging, Iron chelation, and by the evaluation of the anti-inflammatory effect: inhibition of myeloperoxidase (MPO) activity, inhibition of LDL oxidation, determination of free energies binding by molecular docking, the redox potential using an Epsilon Potentiostat and the cytotoxicity of alkaloid extracts on red blood cells was measured. A significant reducing power was obtained with alkaloid extract of roots and seeds (0.18 ± 0.007 and 0.17 ± 0.001 UA), respectively. A good scavenging effect on DPPH radical was observed with alkaloid extract of seeds (IC_{50}= 0.15 mg/mL) and a good ABTS scavenging was also obtained with this extract at 0.8mg/mL with 1278.68 mmol trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The extracts of different parts of *P. harmala* exhibited a good iron chelating activity. The chlorine amine test demonstrated that a good inhibitory effect of MPO was obtained with seeds extract (20µg/mL) with 97 ± 5%. Concerning the pure alkaloids, the potent effect was registered with harmaline, harmine and harmane with a respective IC_{50} 80, 260 and 720 nM. Whereas, we noticed that harmol and harmalol are not active. These alkaloids exerted a similar inhibition effects on MPO-induced LDL oxidation. Molecular docking analysis of *P. harmala* alkaloids on MPO showed that all active *P. harmala* alkaloids have a high affinity on the active site of MPO (predicted free energies of binding up to -3.1kcal/mol). The measured redox potentials of alkaloids are: harmine, harmaline and harmane (+ 1014, 1014 and 1003 mV, respectively); harmalol and harmol (+ 629/778 and 532/644mV, respectively). Finely, the toxicity test of *P. harmala* alkaloid extracts toward red blood cells demonstrated that these alkaloid extracts are not toxic even at high concentration (1 mg/mL), with the exception of alkaloid extract of aerial parts. The inhibition of MPO by *P. harmala* β-carboline alkaloids, herein reported for the first time, may explain the anti-inflammatory effect traditionally attributed to its herbal medicine.

Key words: *Peganum harmala*, alkaloids, HPLC, myeloperoxidase, Docking, LDL oxidation, anti-inflammatory.

ملخص

العمل المنجز خلال هذه الاطروحة يهدف في البداية الى دراسة الكمياء النباتية لنبات الحرمل ،لاسيما تمييز القلودات بواسطة التحليل على الطبقة الرقيقة ، التجزئة من خلال التحليل بالفلاش الكروماتوغرافي ، التحليل بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عاليةالاداء و التحليل الكمي للقلودات للاجزاء الهوائية، البذور و جذور الحرمل.اظهرت دراسة الكمياء النباتي ان الاجزاء الهوائية و البذور تحتوي كقلويدات رئيسية الحرمين و الحرملين مع معدلات "0,055" ،2,93" و"0,05"،"3,8"%، على التوالي، في حين ان الجذور تحتوي على قلويدات رئيسية الحرمول و الحرمين مع معدلات 3,2 و2,9 % ، على التوالي. ثانيا يهدف هذا العمل لدراسة صيدلانية لمستخلص قلودات النبات و القلودات النقية من خلال تقييم ا لتأثير المضاد للأكسدة لمستخلص قلويدات النبات بما في ذالك تحديد القوة الارجاعية، قوة التأثير على الجذور د ب ب ش و اب ت س ،تثبيط الحديد وكذلك تقييم تأثير مضاد للالتهاب بدراسة تثبيط انزيم الميلوبروكسيداز ، دراسة تثبيط اكسدة ال ل د ل ،تحديد الطاقة الحرة للارتباط بالفحص الجزيئي لآلية التفاعل،و تم تحديد امكانيات اكسدة وارجاع القلودات و دراسة السمية الخلوية للقلويدات على كريات الدم الحمراء. تم الحصول على افضل قوة ارجاع من طرف قلودات الجذور و البذور 0,18±0,007 ؛ 0,17±0,001 و.م، على التوالي. تم الحصول على افضل تثبيط للجذور من طرف مستخلص البذور مع اس50=0,15مغ/مل ضد جذر د.ب.ب.ش و قوة مضادة لأكسدة ا.ب.ت.س. ب 1278,68 ميلي مولر ما يعادل التروليوكس بتركيز 0,8 مغ/مل من هذا المستخلص. لقد بينا ان مستخلصات قلويدات النبات تتميز بفعالية تثبيط الحديد. لقد اظهرت نتائج اختبار كلورين امين ان افضل تأثير كابح للانزيم تم الحصول عليه من طرف مستخلص البذور بقيمة 97±5 % ل 20ميكروغرام/مل، في حين تم تسجيل في القلويدات النقية افضل نتائج مع الحرمين و الحرملين والحرمان بقيمة اس50: 80, 260 و720 نانو مولر، على التوالي . كما لاحظنا ان القلويدات الحرمول و الحرملول غير فعالة. هذه القلويدات الفعالة اظهرت نفس التأثير على تثبيط اكسدة ال ل.د.ل من طرف الميلوبروكسيداز. لقد اظهرت نتائج الدوكنج الجزيئي ان كل القلويدات تملك صلة ربط قوية مع الانزيم مع طاقة ربط تفوق-3,1 كيلو كالوري/مول. قيم قدرة اكسدة و ارجاع للقلويدات قدر ب + 1014, 1014و 1003 ميلي فولط ل الحرمين ،الحرملين و الحرمان، على التوالي و ب +778/629 و +644/532 ميليفولط للحرمول و الحرملول، على التوالي. و في الاخير قد اظهرت نتائج سمية قلويدات نبات الحرمل على خلايا الدم الحمراء ان هذه المركبات ليست سامة حتى لتركيز عالي 1مغ/مل باستثناء مستخلص الاجزاء الهوائية. نتائج تثبيط الميلوبروكسيداز قد اعلنت لأول مرة، وهو قد ما يفسر الاستعمال التقليدي للنبات كعلاج للأمراض الالتهابية.

كلمات المفتاح: الحرمل، القلويدات ،HPLC ، ميلوبروكسيداز، دوكينغ، اكسدة ال ل.د.ل ،ضد الالتهاب