

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité: Biochimie Appliquée

Présentée et soutenue par : TENIOU Soumia

Intitulé :

**Isolement d'alcaloïdes à partir du champignon Algérien « *Pleurotus eryngii* » :
analyse structurale et études *in vitro* et *in silico* de leurs activités biologiques.**

Soutenue publiquement le :29-01-2024

Membres du jury :

| | |
|---|---|
| Président : CHIKHI A. | Professeur Université Frères Mentouri Constantine 1 |
| Directeur de thèse : BENSEGUENI A. | Professeur Université Frères Mentouri Constantine 1 |
| Examinatrice : SOBHI W. | Professeur CRBt Constantine |
| Examinatrice : BENLOUNISSI A. | MCA ENSB Taoufik Khaznadar |
| Examinatrice : BENSLAMA O. | MCA Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi |

Année universitaire: 2023 - 2024

Ce travail de recherche est le fruit de nombreuses collaborations pluridisciplinaires, il se situe à la frontière entre la chimie et la biologie ayant une finalité thérapeutique. Mes chaleureux remerciements à toutes les personnes qui ont soutenu cette thèse.

*En tout premier lieu, je remercie **ALLAH** le tout puissant, de m'avoir donné de la santé, ainsi que l'audace, la patience et le courage pour dépasser toutes les difficultés et accomplir ce travail de thèse.*

*Mes premiers remerciements vont tout naturellement à mon Directeur de thèse Pr. **BENSEGUENI Abderrahmane**, Professeur à la Faculté des sciences et de la nature et de la vie de l'université Frères Mentouri Constantine 1, et directeur du laboratoire de Biochimie Appliquée, celui qui m'a permis d'approfondir un des vastes domaines de la Science. Je vous remercie vivement de m'avoir accompagné tout au long de ce parcours, de m'avoir guidé et enseigné les réflexes du bon chercheur. Votre précieux encadrement, vos encouragements, votre disponibilité, votre gentillesse et vos conseils avisés m'ont permis de fructifier ce travail de recherche. Vos qualités scientifiques et humaines ainsi que votre extraordinaire force de travail font de vous un exemple dont j'espère pouvoir longtemps en profiter.*

*C'est avec un grand plaisir que je remercie le professeur **Abdelouahab CHIKHI** à l'Université Frères Mentouri Constantine 1 pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse ainsi que pour l'aide qu'il m'a accordé tout au long de ces années d'études.*

*J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury : Madame **SOBHI W**, professeur au CRBt à Constantine, Madame **BENLOUNISSI A**, MCA à ENSB, Taoufik Khaznadar et Madame **BENSLAMA O**, MCA à l'Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi, qui ont accepté d'être les examinatrices de ce jury. Je vous remercie d'être présentes et accessibles pour évaluer mon travail de thèse, veuillez trouver en ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance.*

*Je serai toujours reconnaissante et je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **BOUMENDJEL Ahcène**, professeur à l'Université Grenoble Alpes, pour m'avoir accueilli dans son équipe au Laboratoire : Département de Pharmacochimie Moléculaire-Université Grenoble Alpes (France), de m'avoir aidé avec beaucoup de compétences, de l'aide précieuse qu'il m'a apporté, de m'avoir fait bénéficier de ces connaissances scientifiques, de son soutien et de ces qualités humaines. Votre bienveillance, votre excellence et votre patience resteront un souvenir fort et un modèle pour le reste de ma vie.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement : **Isabelle Hininger-Favier**, **Brooks Hlybertson**, **Bifeng Gao**, **Swapon Bose** et **Joe McCord** de l'université du Colorado Anschutz Medical Campus. Colorado, États-Unis, et Pathways Bioscience, entreprise de biotechnologie*

à Aurora, Colorado, États-Unis, pour la réalisation de l'activité Nrf2 et l'étude d'expression génique.

J'adresse également tous mes remerciements au Dr. **Kim-Anh Nguyen** pour son aide et ses explications et pour sa disponibilité au cours de mon stage au Laboratoire DPM - Université Grenoble Alpes (France).

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur **Chawki BENSOUICI** responsable du laboratoire de Biochimie du Centre National de Recherche en Biotechnologie Constantine, pour son aide pendant la réalisation de l'activité anti-cholinestérase.

Mes sincères remerciements s'adressent au Dr. **SAHLI FAHIMA**, d'avoir accepté de réaliser l'activité antibactérienne au sein de son laboratoire de microbiologie de l'hôpital Hafid Boudjemaa de Constantine, à **Djendli sabiha** pour son aide et sa disponibilité.

Aussi mes remerciements aux deux frères **Toumi** : Dr. **mohammed.Es.seddik** et **Mouad** d'avoir récolté le champignon, et le Dr **Lounis Yousef Khodja** chercheur associé au Laboratoire de mycologie de biotechnologie et de l'activité microbienne, département de biologie appliquée FSNV. Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour l'identification de l'espèce étudiée.

Un immense merci au Dr. **Mokrani El Hassen**, d'avoir m'aider à la réalisation de la partie *in silico*, à ma chère Dr **Geundouze Assia** pour son aide et ses conseils.

Je ne peux pas passer sans remercier mon père : Pr. **Teniou Abderrahmane** Professeur retraité au département de Chimie. Faculté des sciences et de la nature et de la vie de l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour tout ce que tu m'as fait pour moi tout le long de mon travail, vraiment tu m'as éclairé le chemin dès le premier pas de cette thèse. Merci Papa pour ta disponibilité, ton aide et tes explications au domaine de la phytochimie, ton soutien pendant les moments difficiles surtout au cours de mon stage en France, je n'oublierai jamais quand tu m'appelles pour me faire voir et parler avec ma petite fille Lamis et me dire : « ne t'inquiète pas, elle va très bien avec moi et ta maman ». Merci Papa et Mama..... !.

Pour finir, j'exprime ma sincère gratitude envers tous ceux et celles qui m'ont accompagné de près ou de loin à la concrétisation de cette thèse.

À mes très chers parents

Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle ; ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte. Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements. Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.

Que ALLAH vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

*Une spéciale dédicace à mon cher époux **Abdelaziz** et à mes filles la prunelle de mes yeux : **Lamis et Arwa** , et à mon petit bébé nouveau né **Ousseid**.*

*À ma très chère **sœur Imene**, qui m'a toujours écoutée, soutenue et encouragée tout au long de mon parcours, sans oublié son mari et ses adorables enfants.*

*À mes chers **frères Redha et Walid** et leurs épouses **Sara et Nihed**, qui m'ont soutenue pendant toutes ces années, chacun à leur manière. À leurs chers enfants.*

*À mon **beau père, belle mère, beau frère** et chères **belles sœurs : Hanane, Nabila et Ismahene**, et leurs chers enfants.*

*À mon amie la plus fidèle **Imene**, qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance et mon amitié.*

*À toute l'équipe du laboratoire de **Biochimie Appliquée**, et du Département de **Biochimie et BCM**, particulièrement **Dr Boudersa Nabil** et **Dr Djoudi Ibrahim**.*

À tous ceux qui me sont chers

TENIOU Soumia

| | |
|---|-----------------------------|
| Introduction générale | 1 |
| Synthèse bibliographique | |
| Chapitre 1 : Champignon <i>Pleurotus eryngii</i> | |
| 1.Introduction | 4 |
| 2.Présentation du champignon <i>Pleurotus eryngii</i> | 4 |
| 3.Position systématique | 4 |
| 4.Description botanique | 5 |
| 5.Répartition géographique | 6 |
| 6.Composition chimique | 7 |
| 7.Intérêt thérapeutique du <i>P eryngii</i> | 8 |
| Chapitre 2 : Alcaloïdes | |
| 1.Introduction | 10 |
| 2.Définition | 10 |
| 3.Classification | 11 |
| 3.1. Selon l'origine biosynthétique et la position de l'azote | 12 |
| 3.2. Selon la structure moléculaire et leurs compositions chimiques | Erreur ! Signet non défini. |
| 4.Détection des alcaloïdes | 14 |
| 5.Intérêt thérapeutique..... | 14 |
| Chapitre 3 : Activités biologiques | |
| 1. l'activité anti-cholinestérase..... | 16 |
| 1.1. Présentation de l'acétylcholinestérase (AChE) | 16 |
| 1.1.1. Structure tridimensionnelle de l'AChE | 17 |
| 1.1.2 Site actif de l'AChE..... | 17 |
| 1.1.3. Les inhibiteurs des cholinestérases | 19 |
| 1.2 La butyrylcholinestérase (BChE) | 21 |
| 2. Docking Moléculaire (amarrage) | 22 |
| 2.1. Définition..... | 22 |
| 2.2. Criblage virtuel | 22 |
| 2.3. Les étapes de docking moléculaire..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 2.3.1. Docking | 22 |
| 2.3.2. Scoring..... | 23 |
| 2.4. Les types du docking moléculaire | 23 |
| 2.5. Outils de docking..... | 24 |
| 2.5.1. Récepteur..... | 24 |
| 2.5.2. Ligand..... | 24 |
| 3. L'activation du facteur de transcription Nrf2..... | 25 |
| 3.1. Définition du facteur de transcription Nrf2 | 25 |
| 3.2. Structure du Nrf2 | 25 |
| 3.3 Structure de la protéine KEAP1 | 26 |

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Etude phytochimique..... | 28 |
| 1.1. Récolte et identification du champignon | 28 |
| 1.2. Mise en évidence des alcaloïdes totaux..... | 28 |
| 1.3. Préparation des extraits d'alcaloïdes | 29 |
| 1.3.1 Extraction par un solvant apolaire (E1)..... | 29 |
| 1.3.2. Extraction par un solvant polaire (E2)..... | 30 |
| 1.4. Purification des extraits alcaloïdiques | 31 |
| 1.4.1. Chromatographie liquide moyenne pression..... | 32 |
| 1.4.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)..... | 32 |
| 1.4.3. Chromatographie préparative sur plaque..... | 33 |
| 1.5. Spectrométrie de masse..... | 33 |
| 1.5.1. Méthodes d'ionisation..... | 34 |
| 1.5.2. Ions moléculaires et fragments par impact électronique..... | 34 |
| 1.5.3. Spectre de masse et pic de base..... | 34 |
| 1.5.4. Reconnaissance de l'ion moléculaire (parent), pic et détection des isotopes..... | 34 |
| 1.6. Résonance magnétique nucléaire (RMN)..... | 35 |
| 1.6.1. RMN ¹ H..... | 35 |
| 1.6.2. RMN du ¹³ C..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 2. Activités biologiques..... | 37 |
| 2.1. Activité anti-cholinestérase | 37 |
| 2.1.1. Etude <i>in vitro</i> | 37 |
| 2.1.2. Etude <i>in silico</i> | 38 |
| 2.1.2.1. Docking moléculaire..... | 38 |
| 2.1.2.1.1. Préparation de l'enzyme..... | 38 |
| 2.1.2.1.2. Préparation du ligand..... | 40 |
| 2.1.2.1.3. Déroulement du docking moléculaire..... | 40 |
| 2.1.2.2. Prédiction des propriétés ADMET..... | 40 |
| 2.2. Test d'activation du facteur de transcription Nrf2..... | 41 |
| 2.2.1 Préparation de l'échantillon..... | 41 |
| 2.2.2. Culture de cellules HepG2..... | 42 |
| 2.2.3. Induction de Nrf2..... | 42 |
| 2.3. Tests d'expression génique | 43 |
| 2.3.1. Culture cellulaire et isolement d'ARN..... | 43 |
| 2.3.2. Procédure de dosage ARNm-seq..... | 44 |
| 2.3.3. Analyse d'enrichissement de l'ontologie génique (GO)..... | 45 |
| 2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne | 47 |

Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| 1. Etude phytochimique..... | 49 |
| 1.1. <i>Screening</i> des alcaloïdes..... | 49 |
| 1.2. Extraction | 52 |
| 1.3. Purification | 52 |
| 1.3.1. Purification de l'extrait E1..... | 52 |
| 1.3.2. Purification de l'extrait E2..... | 54 |
| 1.4. Identifications | 54 |
| 1.4.1. Détermination structurale des produits P1 et P2..... | 54 |
| 1.4.2. Détermination structurale des produits P3 et P4..... | 58 |
| 2. Activités biologiques..... | 64 |

| | |
|--|----|
| 2.1. Evaluation de l'effet anticholinestérasique des d'extraits alcaloïdiques E1 et E2 et du composé N-acétyltryptamine..... | 64 |
| 2.1.1. Effet sur l'acétylcholinestérase..... | 64 |
| 2.1.2. Butyrylcholinestérase..... | 66 |
| 2.1.3. Étude <i>in silico</i> | 66 |
| 2.1.3.1. Etude des modes d'interaction du NAT et de la galantamine avec le site actif de l'AChE..... | 66 |
| 2.1.3.2. Prédiction des propriétés ADMET..... | 69 |
| 2.1.3.3. Modifications structurales du NAT..... | 74 |
| 2.2.Evaluation de l'activation du facteur Nrf2 | 83 |
| 2.3 Analyses d'expression différentiels des gènes (DEGs)..... | 85 |
| 2.4 Activité antibactérienne..... | 95 |
| Conclusion générale. | 99 |

Références bibliographiques**Travaux scientifiques****Annexes****Résumés**

2D : Bidimensionnelle

3D : Tridimensionnelle

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AGI : Absorption Gastro-Intestinale

ARE : *Antioxidative Responsive Elements*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

AT : Alcaloïdes totaux.

ATF6 : *Activating transcription factor 6*

ATP : Adénosine-triphosphate

ATPase : Adénosine triphosphatase

BCh : Butyrylcholine

BMRB : *BioMagResBank*

BRCA1 : *Breast-Cancer1*

BTB : *Broad-complex, Tramtrack and Bric a brac*

CAS : Site catalytique

CAT : Chloramphénicol acétyltransférase

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CETP : *Cholesteryl ester transfer protein*

COVID-19 : *CoronaVirus Disease appeared in 2019*

CYP : Cytochrome P450

DEGs : *Differentially expressed genes* (Expression différentielle des gènes)

DGR : *Double Glycine Repeat*

DMSO-d6 : Diméthylsulfoxyde deutéré

DTNB : Dithiobisnitrobenzoate

EI : Impact Electronique

E1 : Extrait 1

E2 : Extrait 2

FDR : *False Discovery Rate*

FBS : Sérum bovin fœtal

FPKM : *Fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped*

G⁺ : Gram positif

G⁻ : Gram négatif

GO : Ontologie génique

GPx : Glutathion peroxydase

gSNAP : *Genomic ShortRead Nucleotide Alignment Program*

H : Hydrogène

HepG2 : Lignée cellulaire cancéreuse de foie humain

hERG : *human Ether-à-go-go-Related Gene*

HMGAI: High Mobility Group A1

HMOX1 : Hème-oxygénase-1

Hz : Hertz

IC₅₀ : *Inhibitory concentration 50%* (Concentration Inhibitrice 50)

InFB : Interféron bêta 1

IVR : *Intervening Region*

Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1*

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LDL : *Low-density lipoprotein*

M : Masse de l'ion moléculaire

m/z : Masse/Charge

MA : Maladie d'Alzheimer

MH : Muller-Hinton

MPLC : Medium Pressure Liquid Chromatography

NA : Non active

NAT : N-acétyltryptamine

NF-E2 : *Nuclear Factor Erythroid 2*

NGS : *Next Generation Sequencing*

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NPC2 : *Niemann Pick C2*

Nrf2 : *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

NUPR1: Nuclear protein 1

P : Produit

ppm : Parties par million

PAS : Site périphérique

PDB : *Protein Data Bank*

PDBe : *Protein Data Bank in Europe*

PE : *Pleurotus eryngii*

PHE : Perméabilité hémato-encéphalique

polyA : Polyadénylation

PPARG : *Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ*

PPRE : *Peroxisome proliferator response élément*

R : Radical

RCSB : *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*

RE : réticulum endoplasmique

RLU : *Relative Light Unit* (Unités de lumière relative)

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RNA-seq : Ribonucleic acid sequencing

ROS : *Reactive oxygen species*

RP : *Retinoblastoma*

SCh : Thiocholine

SM : Solution mère

sMAf : *small musculoaponeurotic fibrosarcoma*

SOD : Superoxyde dismutase

SRAS-CoV-2 : Syndrome respiratoire aigu sévère- CoronaVirus-2

SREBF: *Sterol regulatory element-binding factor*

SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*

TNB : 5-thio-2-nitrobenzoate

UV : Ultraviolet

VMD : Dynamique moléculaire visuelle

XBPI : *X-box protein 1*

| | |
|---|----|
| Figure 1. a : <i>Eryngium compestris</i> , b : <i>Pleurotus eryngii</i> | 5 |
| Figure 2. Description d'espèce <i>Pleurotus eryngii</i> | 6 |
| Figure 3. Distribution du <i>Pleurotus eryngii</i> : 30-50°N du Maroc aux Pays-Bas, couvrant toute la Méditerranée à l'ouest, s'étendant à l'est par l'Asie jusqu'à la Chine et l'Inde (Galceran., 2013) | 7 |
| Figure 4. Structures de quelques alcaloïdes | 11 |
| Figure 5. Structures chimiques de quelques alcaloïdes vrais | 12 |
| Figure 6. Structures chimiques de quelques pseudo-alcaloïdes | 13 |
| Figure 7. Structures chimiques de quelques proto-alcaloïdes..... | 13 |
| Figure 8. Rôle de l'AChE au niveau des synapses | 16 |
| Figure 9. Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE | 17 |
| Figure 10. Représentation schématique du site actif de l'AChE | 18 |
| Figure 11. Structures des médicaments de la maladie d'Alzheimer | 29 |
| Figure 12 : Représentation schématique des étapes du docking moléculaire | 23 |
| Figure 13. Structures de NRF2 et KEAP1 | 26 |
| Figure 14. Interaction NRF2/KEAP1 et activation de NRF2 | 27 |
| Figure 15. Protocole d'extraction des alcaloïdes | 30 |
| Figure 16. Protocole d'extraction des différents types d'alcaloïdes | 31 |
| Figure 17. Réaction colorimétrique d'Ellman..... | 37 |
| Figure 18. Mode de calcul du pourcentage d'inhibition | 38 |
| Figure 19. Vue de face (à gauche) et de profil (à droite) de la structure cristallographique de l'AChE humaine (code PDB : 4M0E) en complexe avec son inhibiteur (1YL). La structure secondaire de l'enzyme est représentée en mode «cartoon» en gris tandis que le CAS (en bleu) et le PAS (en rouge) sont représentés en mode « surface » | 39 |
| Figure 20. (a) : Cellules transfectées pour l'essai luciférase. (b) : Production de luciférase au sein de la cellule (bleu : cytoplasme, vert : noyau) | 41 |
| Figure 21. Étapes de la méthode RNA-seq | 43 |
| Figure 22. Protocole Poly A..... | 44 |
| Figure 23. Schéma de purification de l'extrait E1 | 53 |
| Figure 24. Schéma de purification de l'extrait E2 | 54 |
| Figure 25. La structure du N-acétyltryptamine | 55 |
| Figure 26 : Spectre RMN ¹ H d'un échantillon synthétique du N-acétyltryptamine (DMSO-d ₆ , 200 MHz) | 56 |

| | |
|--|----|
| Figure 27 : Spectre RMN ^1H du produit P2 (DMSO- d_6 , 500 MHz)..... | 57 |
| Figure 28 : Spectre RMN ^{13}C du produit P2 (DMSO- d_6 , 500 MHz)..... | 57 |
| Figure 29 : Spectre RMN ^1H du produit P3 (DMSO- d_6 , 500 MHz) | 59 |
| Figure 30 : Spectre RMN ^1H du produit P4 (DMSO- d_6 , 500 MHz)..... | 59 |
| Figure 31 : Spectre RMN ^1H (DMSO, 300 MHz) d'un triglycéride (Vlahov, 1999) 60 | |
| Figure 32 : Formule chimique générale des triglycérides, R_1 , R_2 et R_3 sont des résidus d'acides gras | 61 |
| Figure 33 : le spectre de masse de P3 | 62 |
| Figure 34 : A : Structure de l'acide oléique et l'acide linoléique..... | 63 |
| Figure 35 . Modes de positionnement de NAT et de la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Le CAS est représenté en mode surface bleu et le PAS en mode surface rouge2..... | 67 |
| Figure 36 . Mode d'interaction de NAT et la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Les liaisons hydrogène sont représentées en mauve, les interactions π -cation en rouge, les interactions π - π en vert | 68 |
| Figure 37 . Représentation des positions des radicaux (R_1 , R_2 , R_3 et R_4) sur la structure du NAT | 74 |
| Figure 38 . Mode de positionnement des composés 1, 2, 3 et de la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Le CAS est représenté en mode surface bleu et le PAS en mode surface rouge | 78 |
| Figure 39 . Mode d'interaction des composés 1, 2 et 3 dans la cavité catalytique de l'AChE. Les liaisons hydrogène sont représentées en mauve, les interactions π - π en vert | 79 |
| Figure 40 . Activation de Nrf2 par l'extrait E1 | 85 |
| Figure 41 . Diagramme en volcan des gènes différentiellement exprimés (DEGs) entre les échantillons présentant l'Effet de l'extrait E1 sur les cellules HepG2 | 87 |
| Figure 42 . (A) Gènes régulés (élevée et faible) par l'extrait E1 ; (B) gènes régulés (élevée et faible) par l'extrait méthanolique. L'axe des x indique le $-\log_{10}$ (P-valeur) pour chaque terme. Les termes significatifs sont mis en évidence en gras..... | 88 |
| Figure 43 . Voies génétiques régulées positivement par E1, évaluées avec une analyse d'enrichissement des voies générée à l'aide d'Enrichr. L'axe des x indique le $-\log_{10}$ (P-value)..... | 95 |

Figure 44. Photographies montrant l'action de l'extrait 1 sur les souches bactériennes
(a) *E.coli*, (b) *S.aureus*, (c) *K. pneumonia*, (d) *P. aeruginosa*.....96

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Classification du <i>Pleurotus eryngii</i> | 5 |
| Tableau 2. Souches bactériennes | 47 |
| Tableau 3. Résultat de recherche des alcaloïdes dans le <i>Pleurotus eryngii</i> | 50 |
| Tableau 4. Rendements d'extraits E1 et E2..... | 51 |
| Tableau 5. Pourcentage d'Inhibition de l'acétylcholinestérase par les deux extraits E1 et E2 et le NAT | 64 |
| Tableau 6. Valeurs des IC ₅₀ de la galantamine des deux extraits E1 et E2 et du NAT . | 65 |
| Tableau 7. Inhibition de la butyrylcholinestérase par les deux extraits E1 et E2 et le NAT | 66 |
| Tableau 8. Evaluation <i>in vitro</i> et <i>in silico</i> de l'activité inhibitrice du NAT et de la galantamine à l'égard de l'AChE | 67 |
| Tableau 9. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par la galantamine et le NAT | 69 |
| Tableau 10. Prédiction des propriétés physico-chimiques du NAT et de la galantamine | 70 |
| Tableau 11. Prédiction des propriétés pharmacocinétiques | 71 |
| Tableau 12. Prédiction de la toxicité potentielle | 73 |
| Tableau 13. Les scores des composés substitués, NAT et la galantamine envers AChE | 74 |
| Tableau 14. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par les composés 1, 2, 3 et la galantamine | 80 |
| Tableau 15. Prédiction des propriétés physico-chimiques des composés 1, 2 et 3 par le serveur SwissADME..... | 82 |
| Tableau 16. Prédiction des propriétés pharmacocinétiques des composés 1, 2 et 3 par le serveur ADMETlab 2.0..... | 83 |
| Tableau 17. Prédiction de la toxicité potentielle des composés 1, 2 et 3 par le serveur ADMETlab 2.0 | 84 |
| Tableau 18. Sélection de gènes modulés après traitement des cellules HepG2 avec l'extrait E1 | 89 |
| Tableau 19. Valeurs des diamètres des zones d'inhibition engendrées par l'extrait E1 vis-à-vis des quatre bactéries | 97 |

Annexe 1. Méthode de préparation des réactifs de la mise en évidence des alcaloïdes totaux

Annexe 2. Contenu des fichiers comportant la liste des résidus du site actif de l'AChE.

Annexe 3. Paramètres par défaut de l'algorithme génétique de Gold.

Annexe 4. Les spectres du composé P1

Introduction
générale

Les champignons font partie de l'histoire culturelle de l'humanité. Quand on parle de champignons, on pense tout d'abord à leur comestibilité ou leur toxicité et moins à leurs propriétés thérapeutiques. Cependant l'utilisation des champignons pour soigner, discipline appelée mycothérapie, existe depuis des temps immémoriaux, au même titre que la phytothérapie. Les champignons sont d'excellentes sources de protéines, polysaccharides, fibres, vitamines et minéraux et de certains métabolites secondaires, dont les composés phénoliques, terpènes, stéroïdes et les alcaloïdes. De plus, ils sont peu caloriques ce qui représente un avantage pour les régimes actuellement plus équilibrés (Sharma et *al.*, 2021).

Du point de vue santé, les champignons ont été reconnus pour leurs propriétés antifongiques, antibactériennes, antioxydantes, antimicrobienne et antivirales, et ont également été envisagés dans les développements des aliments. Ils ont été utilisés dans plusieurs applications thérapeutiques, notamment antitumorales, immunomodulation et traitements antidiabétiques et auraient un rôle préventif dans certaines maladies cardiovasculaires, anti-inflammatoire ainsi que des propriétés analgésiques (Rodrigues et *al.*, 2015 ; Sharma et *al.*, 2021). À cet égard, les champignons comestibles ont fait l'objet de recherches approfondies et contiennent de grandes quantités de composés bioactifs putatifs avec leurs bienfaits pour la santé (Ren et *al.*, 2016 ; Park et *al.*, 2021).

L'un des champignons comestibles le plus consommé, est le genre *Pleurotus* qui comprend divers groupes d'espèces de champignons cultivés avec de hautes valeurs nutritionnelles. Les espèces de *Pleurotus* sont des champignons commercialement importants et largement cultivées dans le monde. La production de champignons *Pleurotus* représente à elle seule environ 25 % de celle totale de champignons cultivés dans le monde (Raman et *al.*, 2020).

Parmi les espèces de *Pleurotus*, *Pleurotus eryngii* sauvage du nord-est d'Algérie retient d'avantage notre attention. Également connu sous le nom de pleurote royale est originaire du sud de l'Europe, de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient. Ce champignon est largement cultivé dans le monde entier et est commercialement considéré comme l'un des importants en raison de son excellent goût, de sa saveur et de sa durée de conservation plus longue. Le *P. eryngii* sauvage pousse près des racines du chardon (genre *Eryngium*, Famille des *Apiacées*), d'où son nom

Pleurotus eryngii. Depuis l'Antiquité, la nutrition et les valeurs de prévention des maladies de *P. eryngii* ont été mis en évidence (Valverde et al., 2015). Plusieurs études ont indiqué que *P. eryngii* peut avoir plusieurs propriétés biologiques dues principalement à la présence de polysaccharides, peptides, stérols, vitamines et les lipides (Vukojevic & Duletic, 2009 ; Sharma et al., 2021)

La recherche bibliographique exhaustive effectuée sur cette espèce a montré que jusqu'à ce jour, elle n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ni biologique traitant la caractérisation et l'intérêt des alcaloïdes. A la lumière de ces données, nous avons orienté notre travail sur une étude extractive et d'identification des alcaloïdes du champignon *Pleurotus eryngii* sauvage du nord-est d'Algérie et de leurs effets thérapeutiques en valorisant dans un premier temps, leur potentiel à gérer les troubles neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, l'extrait alcaloïdique a été étudié *in vitro* en tant qu'inhibiteur de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase, suivi d'une étude *in silico* sur l'acétylcholinestérase, afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction mis en jeu par l'inhibiteur avec le site actif de l'enzyme.

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'activation de cet extrait sur le facteur de transcription nucléaire erythroid 2-related factor 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (Nrf2) connu comme étant le régulateur de la résistance cellulaire aux oxydants, Nrf2 régule l'expression de nombreuses enzymes antioxydantes et d'une grande variété d'enzymes de détoxification de phase II cytoprotectrices (Mccord et al., 2020).

Une enquête approfondie sur l'effet de l'extrait alcaloïdique sur l'expression des gènes humains par la technologie RNA-seq, une méthode centrale actuellement très utilisée pour l'étude du fonctionnement biologique et elle est la plus utilisée à ce jour. En plus d'identifier les espèces d'ARN produites par les cellules, elle permet de détecter l'édition des ARN (Uhel et al., 2019).

Enfin, nous avons mené une étude sur l'activité antibactérienne du champignon *Pleurotus eryngii* sur quatre souches : *Klebsiella pneumoniae* (G⁻), *Pseudomonas aeruginosa* (G⁻), *Escherichia coli* (G⁻) et *Staphylococcus aureus* (G⁺).

Ce travail est divisé en deux parties dont la première a été consacrée à des généralités et données bibliographiques, et la deuxième partie apporte tous les détails expérimentaux entrepris tout au long de ce travail de recherche.

La partie bibliographie englobe trois chapitres dont le premier correspond à une présentation botanique et géographique, suivie par une description des propriétés pharmacologiques et les travaux effectués sur l'espèce *P. eryngii*. Le deuxième chapitre a été consacré aux généralités sur les alcaloïdes en présentant : une définition, classification et leurs propriétés biologiques. Le troisième chapitre comprend des généralités sur les activités anti-cholinestérasiques et antioxydantes par l'activation du facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*).

Les différentes méthodes et matériels utilisés dans ce travail, et l'essentiel de nos résultats, leurs interprétations et leurs discussions seront exposés dans la deuxième partie.

L'étude est clôturée par une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Synthèse
bibliographique

Chapitre 1: Champignon

Pleurotus eryngii

1. Introduction

Les champignons ont été largement consommés depuis l'Antiquité, non seulement comme aliments ou substances aromatisantes, mais aussi à des fins médicinales ou fonctionnelles, en raison de leurs saveurs et textures distinctives (Miyazawa & Usami, 2014). Ces dernières années, de nombreuses macromolécules (polysaccharides, polysaccharides-protéines / peptides et protéines) et des molécules de faible poids moléculaire (Cérébrosides, isoflavones, catéchols, amines, triacylglycérols, sesquiterpènes et stéroïdes) sont considérés comme les principaux constituants biologiques médicaux des champignons comestibles (Zhiming et al., 2016).

L'un des plus consommés est le genre *Pleurotus* qui comprend divers groupes diversifié d'espèces de champignons cultivés avec des valeurs nutritionnelles élevées et des propriétés pharmacologiques significatives. Au cours de la dernière décennie, des composants ayant des propriétés médicales, y compris des effets antiviraux, antitumoraux, antibactériens, antibiotiques, anticholestéroléniques et immunitaires, ont été isolés à partir de plusieurs espèces du *Pleurotus* (Miyazawa & Usami, 2014).

2. Présentation du champignon *Pleurotus eryngii*

Pleurotus eryngii (PE) est un excellent comestible, il est considéré comme l'un des meilleurs champignons et il arrive à être le plus important dans ce genre (Jeznabadi et al., 2016). Connu pour son bon goût et de sa haute valeur nutritionnelle, il contient de nombreux composés biologiquement actifs, tels que les peptides, polysaccharides, lipides, triterpénoïdes, stérols et les fibres diététiques, qui contribuent à leur consommation médicamenteuse. Ces substances ont été largement utilisées pour prévenir ou atténuer les maladies humaines, telles que les cancers, les maladies inflammatoires, l'hyperlipidémie, le diabète, l'athérosclérose et les lésions hépatiques (Ma et al., 2014).

3. Position systématique

Pleurotus eryngii est un champignon basidiomycète du genre *Pleurotus* selon la classification suivante (Hibbett et al., 2014).

Tableau 1. Classification du *Pleurotus eryngii*.

| | |
|------------------------|---------------------------------|
| Règne : | <i>Fungi</i> |
| Division : | <i>Basidiomycota</i> |
| Classe : | <i>Agaricomycetes</i> |
| Sous-classe : | <i>Agaricomycetidae</i> |
| Ordre : | <i>Agaricales</i> |
| Famille : | <i>Pleurotaceae</i> |
| Genre : | <i>Pleurotus</i> |
| Nom binominal : | <i>Pleurotus eryngii</i> |

4. Description botanique

L'une des caractéristiques du *P. eryngii* sauvage, il pousse sur les racines mortes du chardon *Eryngium compestris* (fig 1), d'où son nom de *Pleurotus eryngii* (Valverde et al., 2015). Il pousse aussi dans les pâturages, les prairies, les jardins, principalement avec des plantes parapluies. Ce champignon pousse à leurs racines et à leurs tiges. Rarement dans les pelouses forestières, peut être retrouvé dans les collines, il peut également être se trouvé dans les steppes, dans les champs secs et même dans les zones montagneuses, et peut vivre à la base des racines ou des tiges des plantes vivantes de la famille des Apiacées (Jingjing et al., 2013 ; Nuhi et al., 2011).

a



b

**Figure 1.** a : *Eryngium compestris*, b : *Pleurotus eryngii*

P. eryngii a un chapeau qui mesure de cinq à dix centimètres. Il est dissymétrique et de couleur beige à brun. La marge est enroulée. Les lames sont espacées et de couleur blanc crème. Le pied est souvent excentré, il est courbé et blanc (fig.2) (Siqian & Nagendra, 2011).

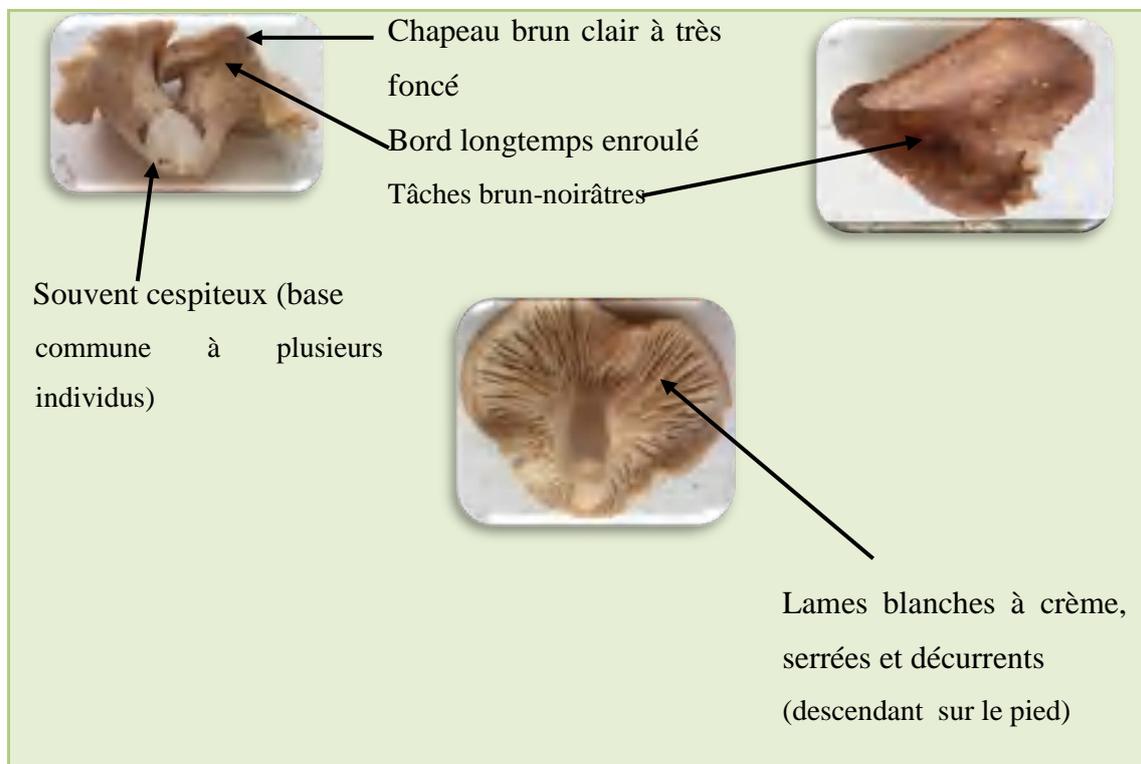


Figure 2. Description d'espèce *Pleurotus eryngii*

5. Répartition géographique

Selon Boisselier et *al* en 1986 la répartition de *Pleurotus eryngii* (PE) est assez vaste en Europe occidentale, il est signalé dans le sud-ouest de la France et remonte vers le nord et le long du littoral. On le trouve également dans l'est de la France, et vers le sud, on le signale autour du Bassin méditerranéen (Espagne, Italie, Corse) et il atteint l'Afrique du Nord (fig.3). La présence du PE n'est cependant pas uniforme sur toute cette aire géographique : sa répartition a une structure fragmentée en petites populations relativement isolés les unes des autres. Ce champignon se trouve aussi en Asie (Zhiming et al., 2016). Plusieurs pays produisent commercialement le PE à savoir : le Japon, la Corée du Sud, l'Italie, l'Australie, l'Afrique du Sud et les États-Unis (Oei & Nieuwenhijzen, 2005). La culture des champignons comestibles a augmenté à l'échelle mondiale ces dernières années en raison de sa valeur culinaire appréciée ainsi que des bienfaits pour la santé. Parmi les champignons comestibles,

P. eryngii, est de plus en plus appréciée des consommateurs, en raison de son bon goût et de son contenu nutritionnel (Akyuz & Yildiz, 2008). A l'échelle mondiale, le pleurote est classé deuxième parmi les champignons cultivés commercialement, après *Agaricus bisporus* et constitue environ un quart de la production totale de champignons (Sardar et al., 2017).



Figure 3. Distribution du *Pleurotus eryngii* : 30-50°N du Maroc aux Pays-Bas, couvrant toute la Méditerranée à l'ouest, s'étendant à l'est par l'Asie jusqu'à la Chine et l'Inde (Josep., 2013).

6. Composition chimique

Pleurotus eryngii a une valeur nutritionnelle élevée, Il est particulièrement riche en glucides (9,6% du poids frais), et une importante quantité en fibres alimentaires (4,64% de poids dont 4,11 % sont insolubles et 0,53 % sont des fibres alimentaires solubles), de la chitine (0,50 % du poids frais) et des polysaccharides (0,41% du poids frais). La teneur totale en azote est d'environ 5,30 % et la teneur en protéines est comprise entre 1,88 % et 2,65 %. Les acides aminés les plus abondants sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, et l'arginine (Manzi et al., 1999; Manzi et al., 2004). Ce champignon se caractérise par des concentrations importantes de vitamines (C, A, B2, B1, D et niacine), de minéraux (en particulier K, Mg, Na et Ca), une très faible quantité de lipides (0,8 % du poids frais) et une humidité élevée (entre 86,6% et 91,7%) (Manzi et al., 1999). Selon Sardar et al en 2017 le *P. eryngii* a une haute valeur nutritive en termes de protéines, glucides, vitamines, calcium et fer. Une combinaison de composés physiologiquement bioactifs bénéfiques pour la santé humaine, a amélioré sa valeur thérapeutique ces dernières années.

D'autres recherches ont montré que PE contient des niveaux élevés de polysaccharides, sur une base sèche (% b.s) : glucides (51-75), protéines (16-18),

condensés (6-7) et des faibles quantités de lipides (1-3). Les principaux acides gras sont l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide stéarique et l'acide linoléique. Les principaux polysaccharides sont les β -glucanes, et K, P, Mg, Ca, Fe et Zn sont les principaux minéraux trouvés (Kalac., 2013; Cohen et al., 2014; Li et al., 2015). Les composés phénoliques et les flavonoïdes : acide gallique, acide protocatéchique, acide p-hydroxybenzoïque, acide p-coumarique, l'acide syringique, l'acide vanillique, l'épicatéchine, la rutine et la catéchine, entre autres, ont également été identifiés (Gasecka., 2016; Lin et al., 2014). De plus, PE synthétise divers biomolécules qui ont des effets pharmacologiques, comme la Pleurerine qui est une nouvelle protéase (Wang & Ng, 2001), aussi qu'une nouvelle ribonucléase qui a été identifiée en 2004 par Ng & Wang, (2004).

7. Intérêt thérapeutique du *P eryngii*

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont indiqué que PE pourrait avoir plusieurs fonctions biologiques (Rodríguez-Seoane et al., 2019; Sharma et al., 2021). Les multiples fonctions biologiques mises en évidence ont été principalement expliquées par la présence de polysaccharides, de peptides, de stérols, de vitamines et de lipides (Stajic et al., 2009; Xue et al., 2015; Li & Shah, 2016).

De nombreux effets bénéfiques pour la santé ont été trouvés chez le PE tels que : l'activité antioxydante (Jinging et al., 2013), l'hypolipidémique (Nuhiet al., 2011), l'activité antimicrobienne (Siqian et al., 2016 ; Jau-tien et al., 2014), ainsi ses propriétés anti-allergiques (Oei & Nieuwenhijzen, 2005), anti-inflammatoires (Li & Shah, 2016), hypoglycémiques (Xue, Li, et al., 2015), immunomodulatrices (Xue, Zhai, et al., 2015), anticancéreuses, antivirales (Zhiming et al., 2016) et anti-athérosclérotiques (Lin et al., 2014).

Il a été démontré que les polysaccharides du PE ont des fonctions multiples, telles que l'hépatoprotection, l'amélioration de l'immunité, l'antihyperlipidémie (Ren et al., 2016) un effet antioxydant (Wu & Chen, 2017). Il est intéressant de noter aussi que plusieurs études ont indiqué que les polysaccharides provenant de ce champignon peuvent inhiber la croissance de plusieurs types de cancer (Ma et al., 2014 ; Yang et al., 2013 ; Ren et al., 2016).

Takashi Kikuchi et al, ont isolé en 2016 six nouveaux stéroïdes de type ergostane à partir du champignon *Pleurotus eryngii* de Paris, ayant un effet inhibiteur sur l'activation des macrophages (Kikuchi et al., 2016). En outre, PE synthétise différentes biomolécules qui ont des effets pharmacologiques, tels que la lovastatine, la pleurerine et la ribonucléase, qui diminuent les niveaux de cholestérol, et présentent des effets antiviraux,

et immunomodulateurs, respectivement (Park et *al.*, 2021). Il a été signalé que l'eryngeolysine, une hémolysine produite par PE, avait des effets cytotoxiques sur les cellules leucémiques et présentait des effets antibactériens contre les bactéries du genre *Bacillus* (Ngai & Ng, 2006).

Chapitre 2 :

Alcaloïdes

1. Introduction

Les métabolites sont des molécules issues du métabolisme des végétaux (ou d'animaux). On distingue deux classes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires (Richter., 1993). Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme :

- Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (cellulose).
- Les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.
- Les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines.

Les métabolites secondaires se sont pas, par définition nécessaires et vitaux pour la cellule ou l'organisme. Ces molécules sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Elles ont de nombreuses applications pharmaceutiques. De façon générale, les métabolites secondaires sont caractéristiques des plantes supérieures. Ces métabolites secondaires sont répartis en trois grandes familles chimiques.

- Les composés aromatiques (phénoliques, l'acide shikimique ou les dérivés d'acétate).
- Les terpénoïdes et stéroïdes.
- Les composés azotés ou alcaloïdes.

Pour cette étude, nous nous intéresserons uniquement aux alcaloïdes. Les alcaloïdes sont une source de molécules bioactives ayant plusieurs intérêts biologiques (Cordell., 1981).

2. Définition

Au début du XIX^{ème} siècle, la notion d'alcaloïdes est inventée à partir du mot "alcali" qui signifie "base" et le suffixe "oïde" synonyme de "comme". Les alcaloïdes sont un groupe diversifié de composés à faibles poids moléculaires, contenant de l'azote dérivés principalement d'acides aminés et trouvés dans environ 20% des espèces végétales (Roberts., 2013). Ce sont des bases contenant de l'azote qui forment des sels en présence des acides. Cette capacité à former des sels et à complexer des ions métalliques a aidé leur séparation et leur détection à l'époque avant l'apparition de la chromatographie (Hanson., 2003). Les alcaloïdes jouent un rôle défensif dans la plante contre les herbivores et les agents pathogènes. En raison de leurs activités biologiques puissantes, bon nombre

d'alcaloïdes connus ont été exploités comme produits pharmaceutiques, stimulants, narcotiques et poisons (Wink., 1998).

Les alcaloïdes sont généralement regroupés sur la base du système cyclique présent. Plusieurs systèmes cycliques communs, tels que les systèmes indolizidine, quinolozidine (Michael., 2003a, 2003b), quinoléine, quinazoline et acridones (Michael., 2004a, 2004b) ont été étudiées. Beaucoup d'alcaloïdes dérivent directement des acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, la tyrosine et du tryptophane (Herbert, 2003). Un échantillonnage des classes d'alcaloïdes est illustré dans la figure 4.

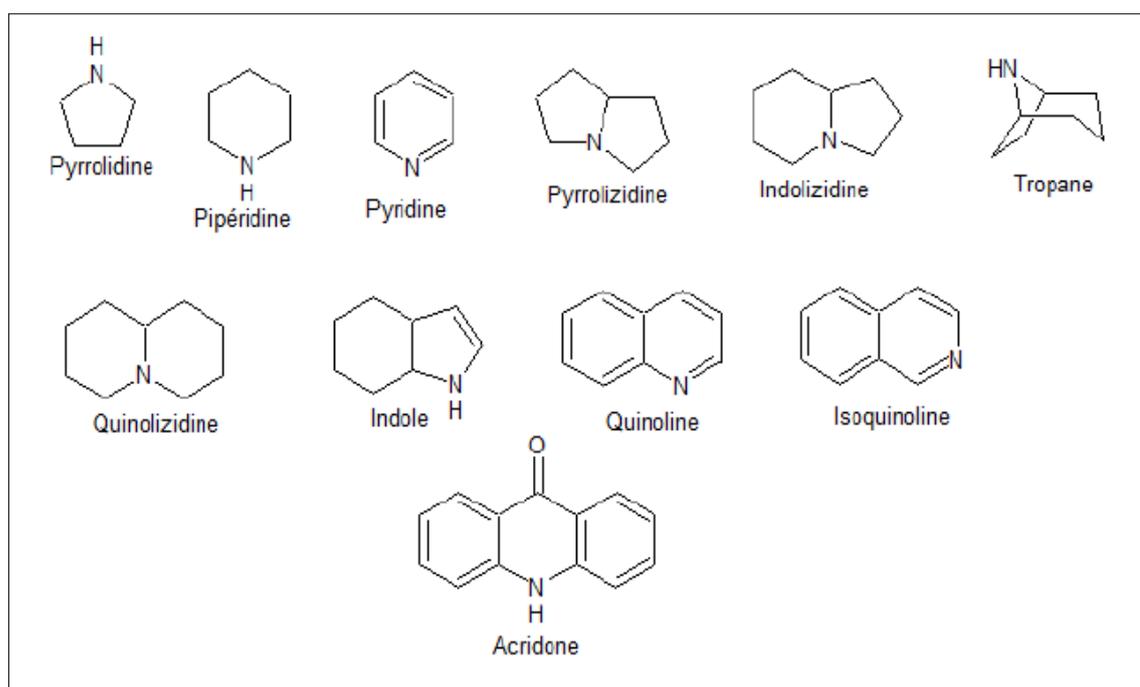


Figure 4. Structures de quelques alcaloïdes

3. Classification

La classification des alcaloïdes est basée sur plusieurs critères, à savoir l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure moléculaire, la taxonomie, la nature chimique ou les propriétés spectroscopiques (Hesse., 2002 ; Bribi., 2018).

3.1. Selon l'origine biosynthétique et la position de l'azote

Les alcaloïdes sont généralement classés selon leurs précurseurs biogénétiques communs et la position de l'atome d'azote, en (Aniszewski., 2007 ; Bruneton., 1999) :

- alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais contiennent ordinairement un azote hétérocyclique dans leurs structures qui dérivent des acides aminés (fig 5).

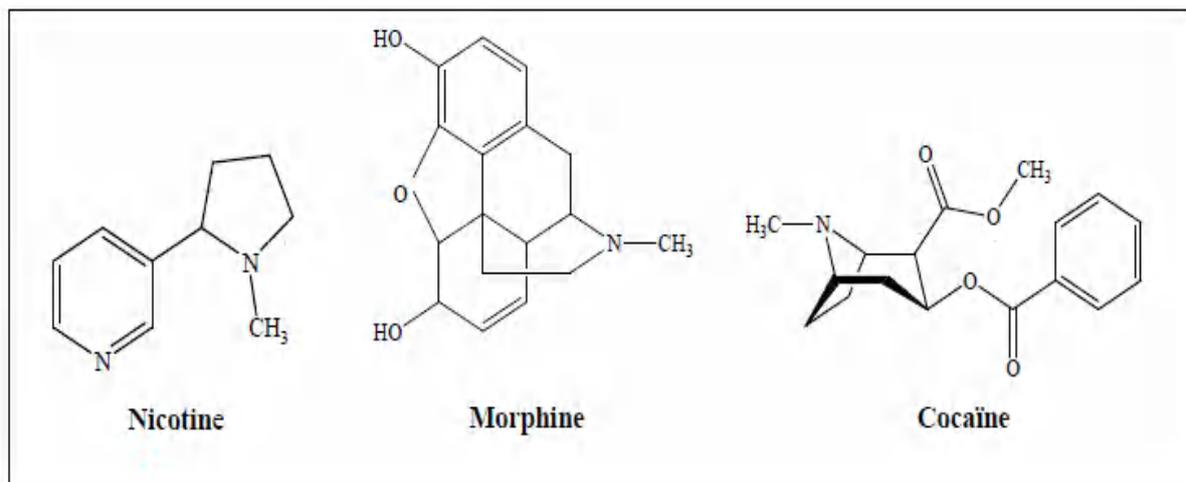


Figure 5. Structures chimiques de quelques alcaloïdes vrais.

- Pseudo- alcaloïdes

Les pseudo-alcaloïdes (fig 6) représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés. Ils sont dérivés des précurseurs ou des postcurseurs des acides aminés. Ils peuvent aussi résulter de l'amination et réactions de transamination des différentes voies reliées à précurseurs ou postcurseurs d'acides aminés (Dewick., 2002).

Ces alcaloïdes peuvent également être dérivés de précurseurs non aminoacides des dérivés du métabolisme d'acétate et de phénylalanine ou des terpénoïdes, ainsi que des alcaloïdes stéroïdiens (Dewick, 2002 ; Tadeusz., 2007).

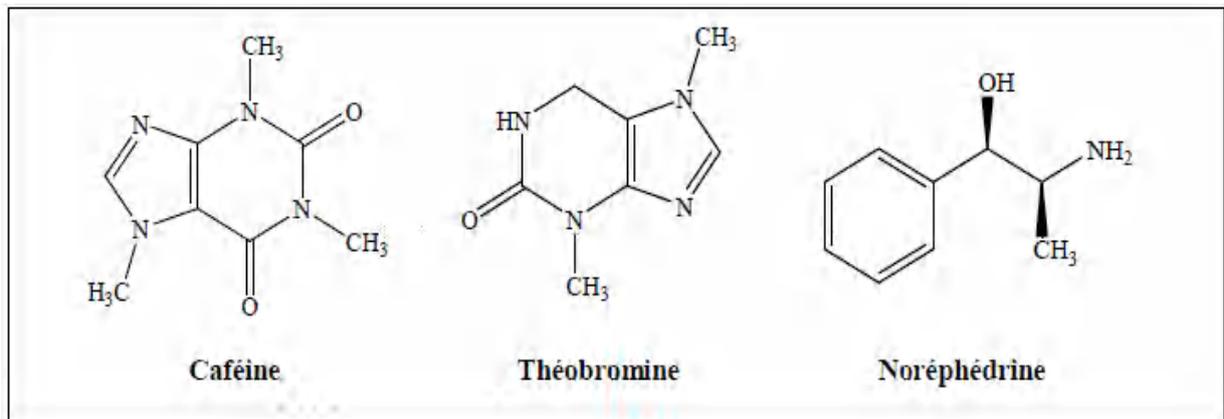


Figure 6. Structures chimiques de quelques pseudo-alcaloïdes

- Proto- alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples, souvent appelés « amines biologiques », dont l'atome d'azote n'est pas inclut dans un système hétérocyclique mais forme plutôt des groupements aminés latéraux (fig 7). Ils sont biosynthétisés à partir des acides aminés ils ont un caractère basique et sont élaborés à partir d'acide aminé et sont soluble dans l'eau (Bruneton., 1999).

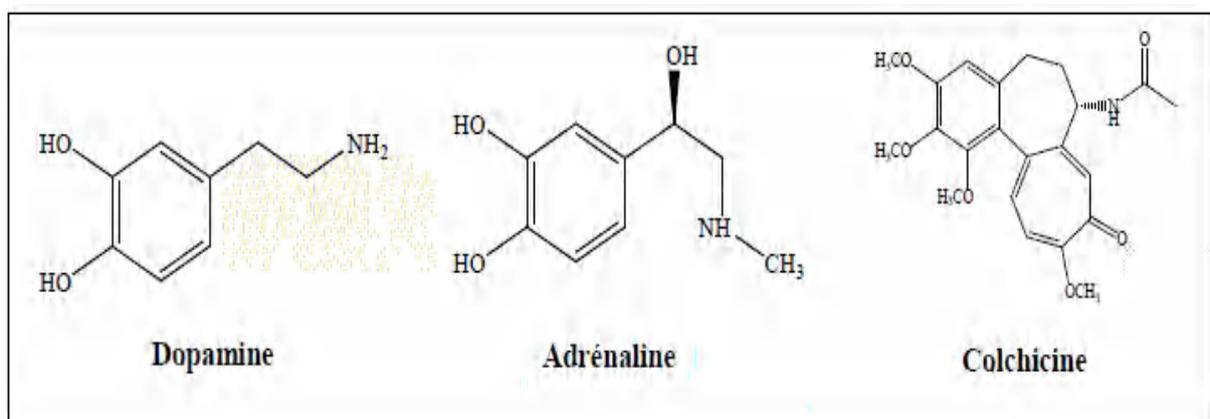


Figure 7. Structures chimiques de quelques proto-alcaloïdes

3.2. Selon la structure moléculaire et leurs compositions chimiques

On distingue cinq grandes classes, dont chacune est divisée en plusieurs sous familles :

- Les alcaloïdes hétérocycliques.
- Les alcaloïdes portant un atome d'azote exocyclique.
- Les alcaloïdes de type putrescine, spermidine et spermine.
- Les alcaloïdes peptidiques.

- Les alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens.

La classe des alcaloïdes hétérocycliques représente la grande majorité des alcaloïdes. Celle-ci est divisée en plusieurs familles suivant le motif hétérocyclique qui la compose (pyrrolidine, indole, pipéridine, tropane, quinoléines, imidazole, isoquinoline, etc.) et elle est divisée de nouveau suivant leur origine végétale ou animale (Hesse., 2002).

4. Détection des alcaloïdes

Les analyses qualitatives des alcaloïdes actuellement employées sont précédées d'une extraction et consistent en une macération dans un alcool évaporée et le résidu repris par de l'eau acidifiée. Après filtration les alcaloïdes sont recherchés dans le filtrat. Ces derniers ont la capacité de se combiner avec les métaux et les métalloïdes, et c'est sur cette dernière propriété que l'on se base pour les détecter, le principe est d'obtenir une précipitation en milieu acide, en présence de réactifs appropriés (Tidjani., 2016). La caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation à l'aide de (Bernard., 2003) :

- Réactif silicotungstique : réactif de Bertrand
- Réactif phosphotungstique : réactif de Scheibler
- Réactif phosphomolybdique : réactif de Try-Sonenschein
- Réactif phosphoantimonique : réactif Schulze
- Iodure de potassium : réactif de Bouchardat
- Tétraiodomercurate de potassium : réactif de Valser-Mayer
- Iodobismuthate de potassium : réactif de Dragendorff

5. Intérêt thérapeutique

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leurs structures, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques (Ge & Wang, 2018). Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (Bruneton., 1993). Leurs propriétés sont généralement variées et dépendent de leurs composantes chimiques comme par exemple, la céphéline (antifongique, antibactérien) l'émétine (amoebicide, antiprotozoaire, amibiase) (Bruneton., 1999 a).

Les alcaloïdes ont un rôle important, comme principes actifs des médicaments, Ils sont utilisés soit tels quels, soit sous forme de dérivés plus actifs, ou manifestant des effets différents. Ils ont souvent servi de modèle pour imaginer de nouvelles molécules de synthèse. Par exemple la morphine reste le produit de référence des analgésiques (médicaments de la douleur). Son dérivé, la codéine (méthylmorphine), est un analgésique mais surtout un calmant de la toux. À la morphine se rattachent également des alcaloïdes hémisynthétiques comme la naloxone, utilisée dans le traitement des toxicomanies.

Les propriétés médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine), Le groupe des alcaloïdes de l'ergot de seigle conserve une place privilégiée avec l'ergotamine, son dérivé dihydrogène, vasodilatateur cérébral indiqué dans le traitement des migraines, et la bromocriptine, inhibiteur de la lactation, également prescrite dans certains types de stérilité. On retrouve des alcaloïdes exploitées par l'industrie pharmaceutique comme des anticancéreux (la colchicine, la vincristine, la camptothécine, le taxol...), des molécules utilisées comme poisons (la strychnine...) ou encore comme antibiotiques du type pénicilline (Vollhardt., 2004 ; Bribi., 2018).

Chapitre 3 :

Activités biologiques

1. l'activité anti-cholinestérase

1.1. Présentation de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase est une enzyme clé pour la neurotransmission qui permet aux neurones cholinergiques de retrouver leur état de repos en hydrolysant l'acétylcholine (ACh) (fig 8) (Ophélie., 2013). Elle est principalement associée aux nerfs et aux muscles et se trouve au niveau des synapses dans les neurones et les cellules gliales du cerveau (Giacobini., 2004).

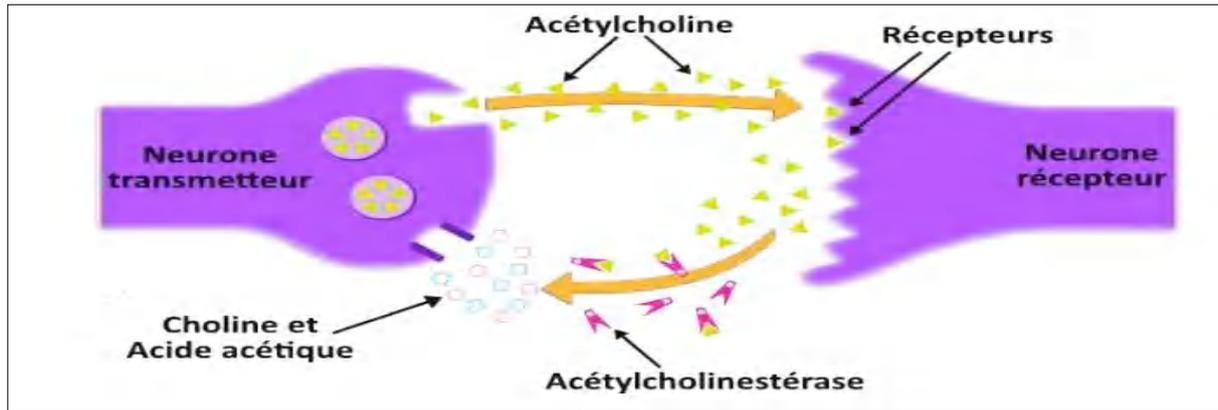


Figure 8. Rôle de l'AChE au niveau des synapses

Les principales fonctions physiologiques de l'acétylcholinestérase sont bien connues. Elle intervient dans les systèmes nerveux périphérique et central et joue ainsi un rôle majeur au niveau de la transmission de l'influx nerveux en éliminant l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur cationique (Taylor., 1991). L'ACh est libéré par le neurone présynaptique sous l'effet d'un potentiel d'action et diffuse dans la synapse pour se fixer à un récepteur cholinergique. Le potentiel d'action est ainsi transmis au neurone postsynaptique. A ce moment, l'AChE hydrolyse rapidement l'ACh, interrompant la transmission de l'influx nerveux (fig 9) (Quinn., 1987).

Dans le système nerveux périphérique, lorsque l'ACh se lie à l'un de ses récepteurs sur les fibres musculaires notamment, des canaux à calcium s'ouvrent dans la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée d'ions calcium dans la cellule. S'ensuit alors une série d'étapes qui mènent à la contraction musculaire. Dans le système nerveux central, l'acétylcholine intervient notamment dans l'apprentissage et la mémoire à court terme.

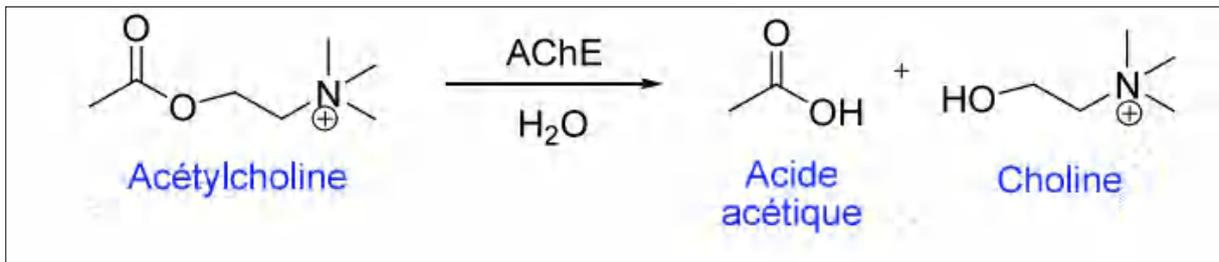


Figure 9. Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE

1.1.1. Structure tridimensionnelle de l'AChE

La structure tridimensionnelle de l'AChE a été résolue pour la première fois par Sussman et *al* en 1991 à partir du poisson torpille (*Torpedo californica*). Quelques années plus tard, celle de l'AChE humaine a aussi été caractérisée (Kryger., et *al* 2000). Il s'agit d'une enzyme homodimérique ayant un poids moléculaire de 75 kDa dont chaque sous unité regroupe 543 acides aminés. D'un point de vue structural, cette enzyme est constituée de 12 feuillets β entourant 14 hélices α ainsi que d'une courte portion de feuillet, à l'extrémité N-terminale, qui n'est engagée dans aucune interaction avec le reste de la structure (fig 8) (Kwasnieski., 2010). Ce repliement, mis en évidence par Ollis et *al*, est typiquement celui de la famille des α/β hydrolases (Ollis., et *al* 1992).

1.1.2 Site actif de l'AChE

Les connaissances structurales de l'AChE humaine ont permis de comprendre son mécanisme catalytique à l'échelle moléculaire. En effet, l'examen détaillé de sa structure cristallographique révèle l'existence d'une gorge profonde (20Å de profondeur) et étroite (5Å de diamètre) au niveau de laquelle s'effectue l'hydrolyse de l'ACh. Deux sites adjacents d'interactions caractérisant cette gorge sont illustrés dans la (fig 10) : le site périphérique (PAS) à l'entrée, et le site catalytique (CAS) au fond, où se trouve la machinerie catalytique (Mokrani., 2020). Le CAS et le PAS constituent ainsi deux cibles potentielles en vue de l'inhibition de l'AChE (Oukoloff., et *al* 2019).

Le site catalytique CAS de l'AChE est principalement organisé autour de la triade catalytique constituée des résidus Ser203, His447 et Glu334 (fig 10). La fonction de ces résidus a été montrée par mutagenèse : si l'on remplace l'un de ces trois résidus par une alanine, une baisse importante de l'activité de l'enzyme est observée. La triade catalytique est au fond d'une étroite gorge de 20 Å de profondeur. Pour que l'hydrolyse ait lieu, il faut donc

que l'acétylcholine pénètre d'abord dans cette gorge et se positionne correctement vis-à-vis de la triade catalytique. Des interactions π -cations avec les résidus aromatiques qui tapissent la gorge facilitent la pénétration du substrat dans celle-ci (Ophélie., 2013).

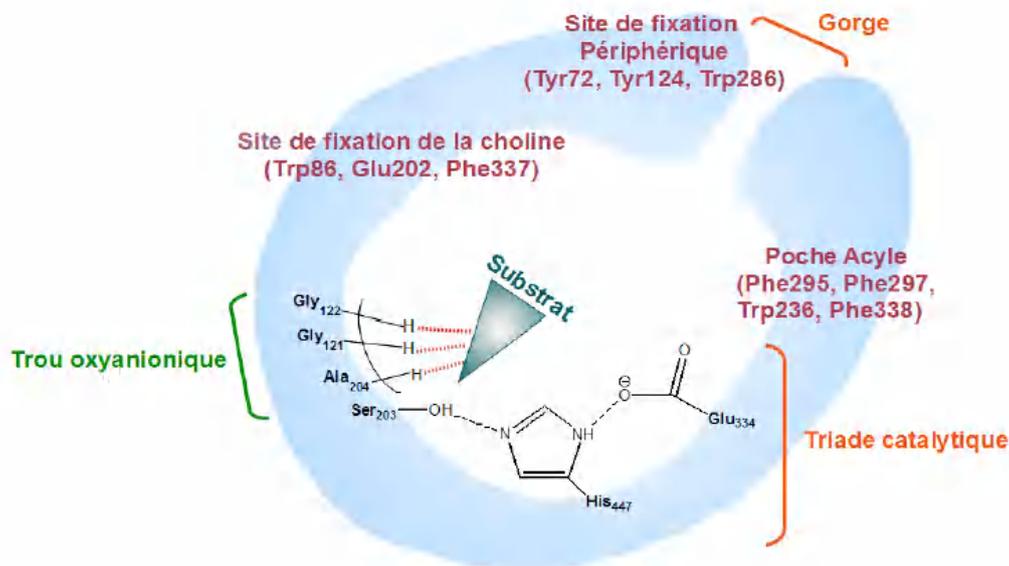


Figure 10. Représentation schématique du site actif de l'ACHé

Au-delà de la triade catalytique, trois principales régions peuvent être définies au niveau du CAS :

- Le sous-site anionique ou site de fixation de la choline est constitué du Trp86, Glu202 et Phe337. Il stabilise les charges positives, et notamment l'ammonium de l'acétylcholine par des interactions π -cations (Harel., et *al* 1993). Le Trp86 est particulièrement important dans la fixation du substrat puisque l'affinité de l'enzyme pour le substrat est divisée par 1000 lorsque le Trp86 est remplacé par une alanine. Par contre, si l'on remplace le Glu202 par une glutamine, l'activité de l'enzyme ne diminue que d'un facteur 5, ce qui semble montrer que le Glu202 n'a pas de rôle direct dans la catalyse (Soreq & Seidman, 2001).
- La poche acyle, région hydrophobe proche du site actif, permet de stabiliser la partie méthyle du groupe acyle et de délimiter la position du substrat. Elle est constituée des résidus Phe295, Phe297, Trp236, Phe338. Ceux-ci sont responsables de la sélectivité de l'ACHé vis-à-vis de l'acétylcholine. En effet, du fait de l'encombrement stérique qu'ils induisent, seuls des groupements acétyl ou propanoyl peuvent venir s'y fixer (Vellom., et *al* 1993). Ces résidus servent également à stabiliser l'His447, et participent donc par ce biais à l'efficacité catalytique de l'ACHé (Barak., et *al* 2011).

- Le trou oxyanionique, composé des résidus Gly121, Gly122 et Ala204, est une zone très importante pour la réactivité de l'AChE. Ces résidus établissent des liaisons hydrogènes avec le substrat, et stabilisent fortement l'intermédiaire acyl-enzyme, et la charge négative sur l'oxygène (Harel., et *al* 1997).

Une quatrième région peut également être définie. Il s'agit du site périphérique anionique (PAS) qui se lie aux substrats cationiques, et notamment aux ligands trop gros pour pénétrer dans la gorge. Ce site est notamment constitué des résidus Tyr72, Tyr124 et Trp286. Il permet au substrat de se fixer avant de glisser vers le site catalytique où il sera hydrolysé (Taylor & Radic, 1994).

1.1.3. Les inhibiteurs des cholinestérases

Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (MA), le taux d'acétylcholine est particulièrement faible entraînant une diminution des activités neuronales et l'apparition de troubles cognitifs. Pour pallier ce déficit, plusieurs travaux de recherche se sont engagés dans la mise au point de molécules naturelles ou de synthèse capables d'augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase.

La maladie d'Alzheimer est l'une des maladies neurodégénératives qui affecte environ 60 à 70% des personnes âgées en induisant des pertes de mémoire irréversibles. Il n'y a pas de remède contre la MA, à l'heure actuelle seuls quatre médicaments sont approuvés pour le traitement de la MA (fig 11) : la mémantine, le donépézil, le rivastigmine, et la galantamine. Ces trois derniers sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) (Derabli et *al.*, 2020), tandis que la mémantine est le seul médicament appartenant à la classe des antiglutamates qui bloque une partie des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) du glutamate (Parsons et *al.*, 2007). Elle est prescrite pour les patients aux stades modéré et avancé de la maladie. Lors de l'évolution de l'Alzheimer, les neurones malades libèrent trop de glutamate (neurotransmetteur). Ce dernier va se lier aux récepteurs d'autres neurones pour les stimuler constamment, ce qui les affaiblit et finit par les mettre hors d'état de fonctionner (phénomène d'excitotoxicité. (Urbain., 2007).

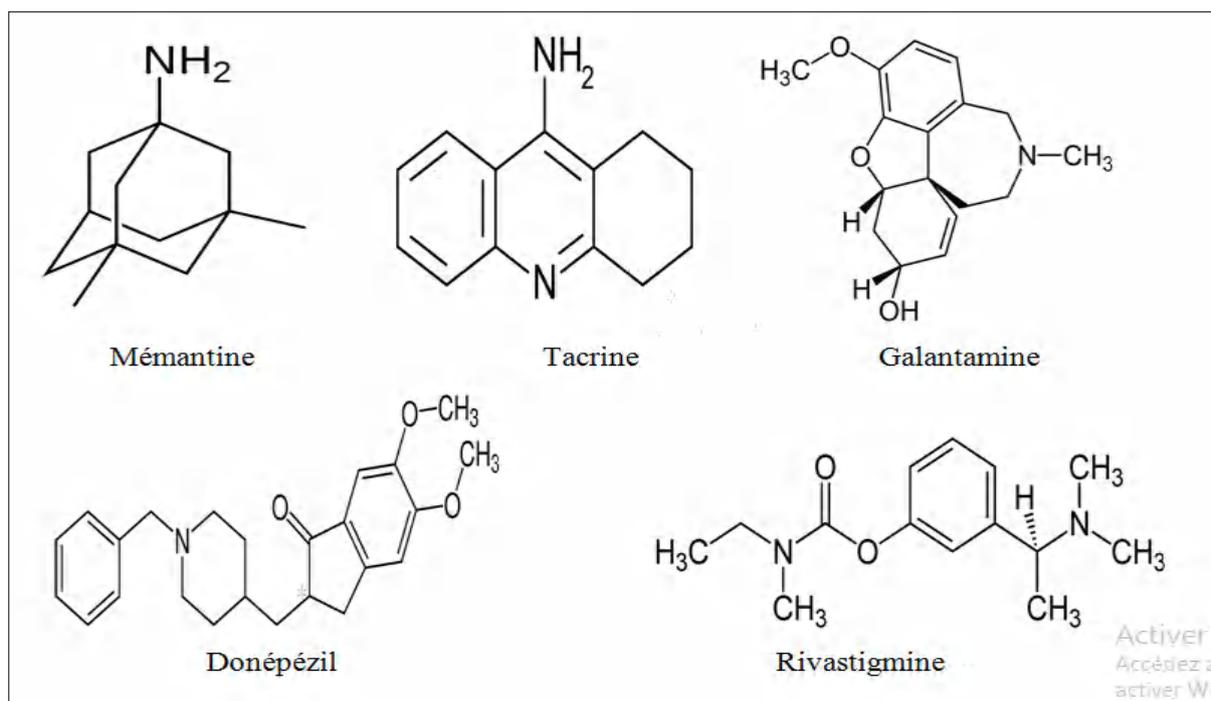


Figure 11. Structures des médicaments de la maladie d'Alzheimer

La tacrine (fig 11) est le premier inhibiteur commercialisé dans le cadre du traitement de la MA, en 1993, mais a été tout de suite abandonné à cause de ses nombreux effets secondaires tels que les nausées: hépatotoxicité, problèmes cardiaques, troubles neuropsychiques digestifs, etc (Knapp et al., 1994). La galantamine est le dernier inhibiteur des AChE mis sur le marché depuis 2000. C'est un alcaloïde d'origine naturelle isolé de plusieurs plantes de la famille des Amaryllidacées comme le perce-neige (*Galanthus nivalis*) ou le narcisse (*Narcissus sp*). La galantamine se diffère des autres inhibiteurs par son mécanisme à double action car en plus d'inhiber l'AChE, elle provoque une modulation allostérique des récepteurs présynaptiques nicotiques, ce qui augmente la libération de neuromédiateurs (Maelicke et al., 2001). Plusieurs autres caractères tels que sa longue demi-vie et son action sélective, réversible et compétitive favorisent et classent la galanthamine comme meilleur inhibiteur actuel de l'AChE (Woodruff-Pak et al., 2001). Bien que ces médicaments aient prouvé leur efficacité quant à l'inhibition des AChE, les grandes agences de santé ne recommandent plus leur utilisation à cause de ses nombreux effets secondaires surtout de type digestif (nausées et vomissement) intolérables par les personnes âgées. Ceci ouvre la voie à une autre perspective de recherche de nouvelles molécules bioactives moins contraignantes que celles déjà connues sur le marché.

1.2 La butyrylcholinestérase (BChE)

La butyrylcholinestérase (BChE) est une cholinestérase exprimé chez plusieurs espèces animales (primates, rongeur...). Chez l'humain, la BChE et l'AChE partagent environ 50% d'homologie de séquence, et ont des structures tertiaires et quaternaires proches (Pope & Brimijoin, 2018). Contrairement à l'AChE, son rôle physiologique n'est pas bien caractérisé. Cette enzyme est capable d'hydrolyser à la fois la butyrylcholine et l'ACh. La BChE est principalement présente dans le plasma et le foie, suivi en plus faible proportion dans la peau et les muscles de la jambe alors que les sources principales d'AChE sont les muscles, le cerveau et la peau. Cependant, globalement, l'humain possède 10 fois plus de BChE que d'AChE (Lockridge., 2015). Afin d'étudier son rôle, des souris n'exprimant pas le gène codant pour la BChE ont été générées. Il ne résulte pas de phénotypes pathologiques à l'extinction de ce gène. De même, chez l'humain, certaines personnes n'expriment naturellement pas le gène BChE et sont en parfaite santé (Dubrana., 2020). De plus, il est admis que la butyrylcholine est un neurotransmetteur absent chez les vertébrés (Pope & Brimijoin, 2018).

Des études ont indiqué que certains neurones cholinergiques se servent de la BChE plutôt que l'AChE pour cliver l'ACh. Ainsi 10 à 15% des neurones cholinergiques dans l'hippocampe et l'amygdale, expriment la BChE au lieu de l'AChE (Darvesh et *al.*, 1998 ; Darvesh et *al.*, 2003). Néanmoins, ce n'est pas son seul rôle. Il s'est avéré, d'après certaines études, que la BChE participe à la détoxification plasmatique des composés estérifiés tels que la succinylcholine, l'héroïne et la cocaïne (Li et *al.*, 2005). Par exemple, la succinylcholine utilisé comme curare de courte durée, est uniquement hydrolysé grâce à la BChE. Chez certains patients, une mutation (D70G) à l'entrée du site actif de l'enzyme altère l'affinité pour ce substrat. L'emploi de la succinylcholine entraîne alors des apnées prolongées (Masson et *al.*, 1997 ; Mollerup et *al.*, 2011). Il a été également prouvé que la BChE hydrolyse la cocaïne (Lynch et *al.*, 1997).

2. Docking Moléculaire (amarrage)

2.1. Définition

Après l'ère exigeant, long et surtout couteux de l'expérimentation *in vivo* et *in vitro* dans le domaine de la recherche scientifique, les méthodes *in silico* viennent donner un pas de géant pour le développement de nouveaux médicaments. En effet ce terme, nouvellement apparu (1989) et qui fait référence au composant essentiel des transistors utilisés dans les ordinateurs (silice), est un néologisme d'inspiration latine désignant une recherche ou un

essai effectué au moyen de calculs complexes informatisés ou de modèles informatiques (Palsson., 2000).

Le docking moléculaire représente un puissant outil *in silico* pour aider à la conception des médicaments. Il peut être défini comme la capacité de prédire, avec un degré de précision substantiel, la structure et la conformation des complexes récepteur-ligand, où le récepteur est généralement une protéine ou une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) et le ligand est soit une petite molécule, soit une autre protéine (Heberle & Azevedo, 2011).

2.2. Criblage virtuel

Le criblage virtuel par docking moléculaire est une approche théorique permettant la simulation de l'affinité d'un très grand nombre de ligands envers une cible thérapeutique donnée, ce qui est plus facile à mettre en œuvre, pour un coût bien moindre que le criblage à haut débit anciennement utilisé. Le criblage virtuel permet donc de filtrer les molécules indésirables ou ceux ayant une faible affinité, ce qui aboutit à l'amélioration des résultats obtenus comparés aux méthodes traditionnelles (Douguet., 2007).

2.3. Les étapes de docking moléculaire

L'objectif du docking est de prévoir la capacité ou non d'une molécule à se lier au site actif d'une protéine. Cela en se basant sur la prédiction de la conformation et de l'orientation de la molécule lors de sa liaison au récepteur, afin d'accélérer la recherche et la découverte de nouvelles molécules bioactives *in-silico* (Kitchen et al., 2010). Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes (fig 12) :

2.3.1. Docking

Qui consiste à placer le ligand dans le site actif de la protéine et évaluer les conformations, les positions et les orientations (poses) possibles, pour garder les interactions les plus favorables. Cette étape est exécutée de manière automatisée *in-silico* à l'aide d'algorithmes de docking, qui améliorent la vitesse et la précision des simulations (Kitchen et al., 2010).

2.3.2. Scoring

Il est utilisé pour estimer mathématiquement l'affinité de liaison entre un récepteur et chacune des poses générées pendant le docking (Gutberlet & Rudolph, 2008). Cette tâche est réalisée par des outils informatiques appelées fonctions de score. Celles-ci estiment d'abord les différentes contributions énergétiques pour la stabilisation du complexe protéine-ligand

puis commandent et ordonnent ces complexes pour identifier les interactions les plus favorables (Quiroga & Villarrea, 2016 ; Weidenhammer & Tsongalis, 2005).

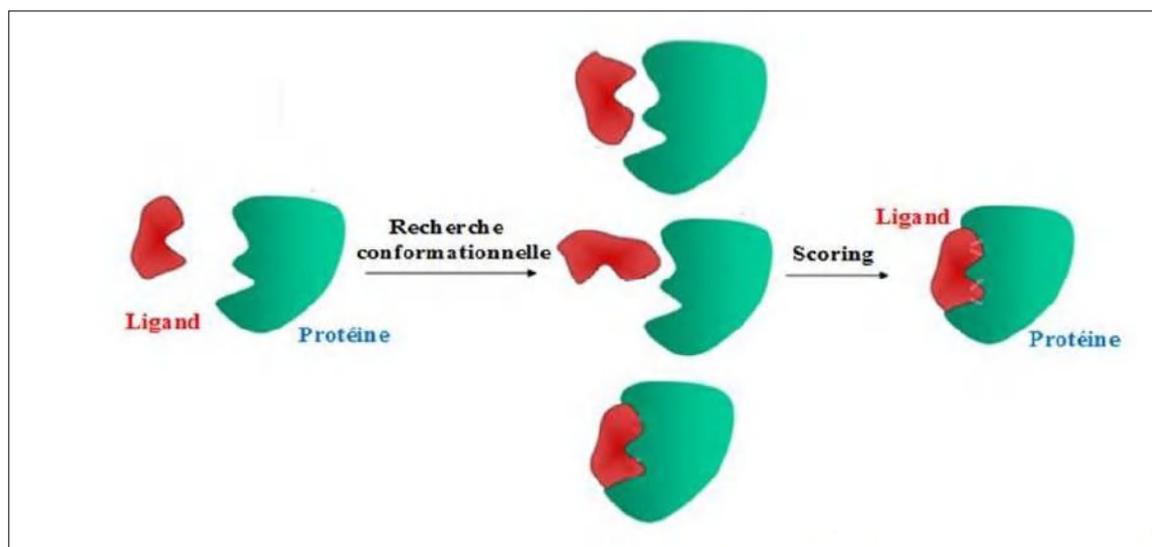


Figure 12 : Représentation schématique des étapes du docking moléculaire

2.4. Les types de docking moléculaire

Il existe deux types de docking : Le docking lié (bound docking) et le docking non lié (unbound docking).

Dans le docking lié, on dispose à l'avance de la structure tridimensionnelle des molécules telles qu'elles seront dans le complexe. Il suffit alors de trouver comment associer ces deux corps rigides, sans devoir se soucier d'un éventuel changement de conformation dû à la flexibilité des molécules. En revanche, dans le cas du docking non lié, on dispose de la structure tridimensionnelle des molécules isolées, ces méthodes rencontrent plus de difficultés. Cette différence a pour conséquence une augmentation importante de la complexité du problème, lequel provient des changements conformationnels qui peuvent apparaître dans les structures des molécules lors de leur liaison (Mangoni et *al.*, 1999 ; Ahmad et *al.*, 2021).

Les types de docking sont répertoriés dans trois sous-classes suivant la manière dont la flexibilité est prise en compte (Mangoni et *al.*, 1999) :

- Le docking rigide où les molécules (le récepteur et le ligand) sont représentées comme des objets rigides dont les formes spatiales ne peuvent pas changer durant le processus du docking.

- Le docking semi-flexible, où une seule molécule en l'occurrence, le ligand est considéré comme flexible.
- Le docking flexible, où les deux molécules le récepteur ainsi le ligand sont considérés comme flexibles.

2.5. Outils de docking

2.5.1. Récepteur

Le terme récepteur désigne une classe de macromolécules protéiques capables de lier une molécule plus petite, appelée ligand, à un site de reconnaissance particulier. La majorité des structures sont extraites de la banque de données des protéines (PDB) qui est l'unique archive mondiale des structures tridimensionnelles des macromolécules biologiques (protéines, ADN, ARN) déterminées expérimentalement (Rose *et al.*, 2017). Elle a été créée en 1971 en tant que première ressource de données numériques en libre accès dans le domaine des sciences biologiques, avec sept structures de protéines. En 2020, l'archive PDB a explosé et compte plus de 155000 structures de protéines, d'ADN et d'ARN (Goodsell *et al.*, 2020). Ces structures sont déterminées expérimentalement par cristallographie aux rayons X (90%), par RMN (9%) ou par microscopie électronique (1%). Les archives PDB sont gérées conjointement par le partenariat Worldwide Protein Data Bank (wwPDB ; wwpdb.org), composé de la RCSB Protein Data Bank, de la Protein Data Bank Japan (PDBj), de la Protein Data Bank in Europe (PDBe) et de la BioMagResBank (BMRB) (Burley *et al.*, 2017).

2.5.2. Ligand

Les ligands sont des composés organiques divers pouvant jouer le rôle d'inhibiteur de l'enzyme. A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné : Le premier moyen, souvent d'aspect commercial, consiste à utiliser des bases de données de structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimiques telles que la Pubchem, Zinc, la chimiothèque Nationale Française etc... Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2...etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que chemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl (Chen *et al.*, 2021).

3. L'activation du facteur de transcription Nrf2

3.1. Définition du facteur de transcription Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) a un rôle de protecteur contre le stress oxydant en induisant des gènes antioxydants. L'activation du Nrf2 est considérée comme une approche privilégiée pour le traitement de certaines maladies neuro-dégénératives où le stress oxydant est un facteur aggravant (Joshi & Johnson, 2012).

Nrf2 est lié à la protéine Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), une protéine possédant le rôle de détecteur de stress oxydatif ; ce complexe Nrf2-Keap1 est retenu dans le cytosol. Lors d'une exposition à un stress oxydatif ou d'une activation des éléments de réponse antioxydants (ARE : *Antioxidative Responsive Elements*), Nrf2 est libéré de Keap1 lui permettant de se déplacer jusqu'au noyau où elle peut se lier aux ARE entraînant ainsi l'expression des enzymes antioxydantes qui protègent la cellule contre des effets oxydatifs (Mathieu., 2020).

3.2. Structure du Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2 a été identifié pour la première fois en 1994 comme un homologue du facteur de transcription érythroïde NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid 2) capable d'interagir avec une séquence d'ADN contrôlant le gène de la β -globine. Nrf2 est un membre de la sous-famille des facteurs de transcription cap'n'collar de type zipper à leucines basiques. Son expression est ubiquitaire (Moi et al., 1994).

La protéine Nrf2 est composée de 605 acides amines chez l'Homme, et de 597 chez la souris. Elle possède une région basique leucine zipper (bZIP) dans son domaine C-terminal, et est divisée en six domaines fonctionnels appelés Neh, Neh1 à Neh6 (NRF2-ECH *homology*) (fig.13) (Magesh et al., 2012). La région basique Neh1, en amont de la région leucine zipper, permet la liaison à l'ADN au niveau des séquences ARE et la dimerisation avec d'autres facteurs de transcription de la famille bZIP tels que les protéines *small musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMAf) ou *Jun*. La région Neh2, présente au niveau de l'extrémité N-terminale, permet la liaison de Nrf2 à son inhibiteur endogène Keap1, *via* les motifs DLG et ETGE. Les régions Neh3, Neh4 et Neh5 sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle de Nrf2. Enfin, la région Neh6 possède deux degrons (acides amines 329-339 et 363-379) qui contrôlent la dégradation de Nrf2 dans le noyau par l'ubiquitine ligase E3 en réponse à un stress oxydant ou électrophile (McMahon et al., 2004).

3.3 Structure de la protéine KEAP1

KEAP1 est une protéine de 624 acides aminés contenant trois domaines (fig.13). Le domaine BTB (*Broad-complex, Tramtrack and Bric a brac*) est principalement le site de fixation du complexe d'ubiquitination (Cullin3 et RBX1). Ce domaine est aussi la région servant à la dimérisation de KEAP1. Le domaine IVR (*Intervening Region*) est riche en cystéines ayant un rôle dans la conformation tertiaire et donc dans la fonction de la protéine. Et enfin, un domaine DGR (*Double Glycine Repeat*) composé de 6 motifs Kelch, répétition de deux glycines, par lequel il y a liaison à Nrf2 (Zhang *et al.*, 2003).

KEAP1 étant riche en résidus cystéines, il est un véritable senseur de l'état redox des cellules. En effet, les résidus cystéines réagissent avec les ROS (*Reactive oxygen species*) ou des molécules dites inductrices de Nrf2 présentes dans la cellule. Cette modification des résidus cystéines empêche la liaison à Nrf2 ou une impossibilité de recruter le complexe d'ubiquitination associé à KEAP1 stabilisant les protéines Nrf2 libres et permettant leur migration vers le noyau. Les cystéines les plus importantes seraient les suivantes :

- la cystéine 151 située dans le domaine BTB serait importante pour le recrutement du complexe d'ubiquitination et la dimérisation de KEAP1.
- les cystéines 273 et 288 dans le domaine IVR seraient nécessaires à une conformation tertiaire optimale pour fixer NRF2 (Zhang *et al.*, 2003).

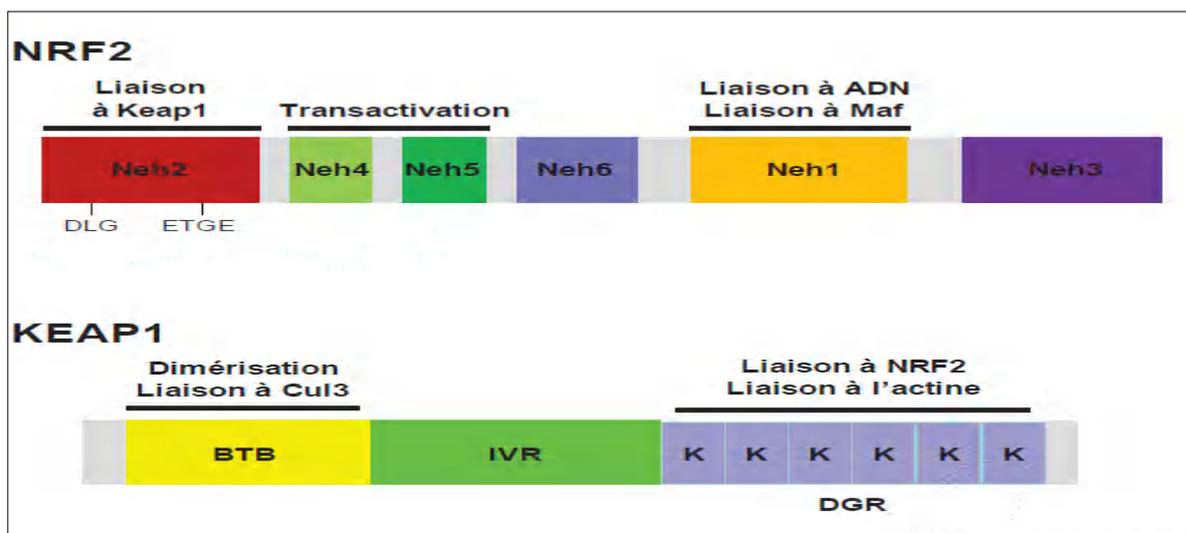


Figure 13. Structures de NRF2 et KEAP1

3.4. Mécanismes moléculaires de la régulation de la voie Nrf2/Keap1

Dans un état d'équilibre, Nrf2 est lié à deux molécules de Keap1 dans le cytoplasme. Lorsqu'il y a augmentation de la quantité de ROS dans la cellule, les cystéines du domaine IVR de Keap1 qui sont exposées à l'extérieur du complexe peuvent ainsi détecter un stress cellulaire (D'Autreaux & Toledano, 2007). L'oxydation des cystéines de Keap1 va conduire à une modification de sa conformation et au non-recrutement du complexe d'ubiquitination, qui va alors cesser d'ubiquitiner et dégrader Nrf2 (Taguchi *et al.*, 2011). Celui-ci va migrer vers le noyau afin de se fixer à une protéine MAF, de la famille des bZIP. L'hétéro-dimère MAF/ Nrf2 se fixera sur une séquence spécifique de type ARE (*Antioxidative Responsive Elements*) engendrant la transcription du gène cible auquel il appartient (Itoh *et al.*, 1997) (fig 14). Les ARE sont des séquences spécifiques situées généralement en amont de la séquence codante des gènes, dans la région régulatrice (Rushmore *et al.*, 1991; Nioi *et al.*, 2003).

Les ARE peuvent aussi fixer des homo-dimères de MAF, ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription du gène. D'autres protéines ont la possibilité de former des hétéro-dimères avec MAF et de se fixer aux ARE. C'est le cas de BACH1. Les hétéro-dimères BACH1/MAF se fixent sur les ARE, inhibant ainsi la transcription du gène cible. Lors d'une augmentation du niveau de ROS intra-cellulaire, il a été montré que BACH1 se détache des ARE et est exporté dans le cytoplasme, permettant l'accessibilité de l'ARE pour Nrf2 (fig 14) (Jean., 2011).

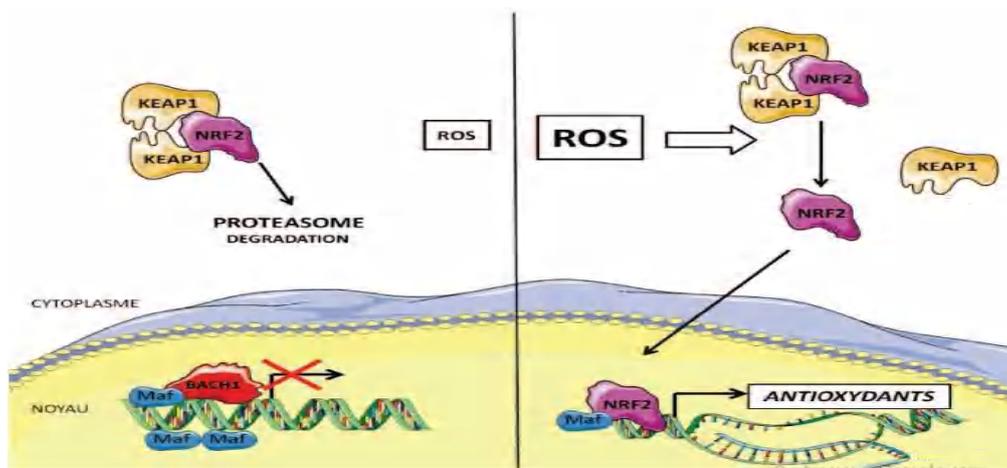


Figure 14. Interaction NRF2/KEAP1 et activation de NRF2

Partie

expérimentale

Matériel
et
méthodes

Cette thèse s'inscrit dans le domaine de la phytochimie et de la pharmacognosie. Le premier volet consiste en l'étude phytochimique de *Pleurotus eryngii*, champignon comestible Algérien. En particulier, ce volet est axé sur l'isolement des alcaloïdes, à notre connaissance, il n'existe aucune recherche traitant la caractérisation des alcaloïdes chez cette espèce de champignon. Le deuxième volet s'inscrit dans le cadre de la valorisation du champignon sauvage (*Pleurotus eryngii*) locale en tant que source de molécules bioactives.

Cette étude a été menée au niveau de plusieurs laboratoires et des établissements cités au dessus :

Les procédures d'extractions et l'étude *in silico* ont été réalisées au niveau du notre laboratoire de biochimie appliquée (LBA) relevant de l'université des frères Mentouri Constantine 1. La purification et la détermination structurale ont été effectuées au laboratoire de pharmacognosie, département de pharmacochimie moléculaire de l'université Grenoble-Alpes. Au niveau du laboratoire de biochimie, centre de recherche biotechnologie (CRBT), Constantine, Algérie, nous avons réalisés les activités anti-cholinestérase et butyrylcholinestérase. L'activité antibactérienne a été menée au laboratoire de microbiologie, hopital Hafid Boudjema. Constantine, Algérie. Le test d'activation du facteur de transcription Nrf2 et les tests d'expression génique ont été effectué au niveau du laboratoire d'université du Colorado Anschutz Medical Campus, Colorado, États-Unis, et l'entreprise de biotechnologie Pathways Bioscience à Aurora, Colorado, États-Unis.

1. Etude phytochimique

Afin de valoriser notre champignon; nous avons réalisé une étude phytochimique orienté sur la mise en évidence et la caractérisation. Pour ce faire, nous avons suivi le protocole expérimental suivant :

1.1. Récolte et identification du champignon

Le champignon comestible objet de travail a été récolté en période d'automne « septembre et octobre » dans la région de Hammam-Grouz à oued el athmania de la willaya de Mila (Nord-est d'Algérie, 36° 14' 59" Nord, 6° 17' 10" Est), et identifié comme étant un champignon comestible dénommé *Pleurotus eryngii*.

1.2. Mise en évidence des alcaloïdes totaux

La mise en évidence des alcaloïdes totaux chez *Pleurotus eryngii* est réalisée par l'extraction selon un protocole simple et rapide suivi de leur précipitation par des réactifs

généraux tels que le réactif de Mayer (qui donne un précipité blanc-jaune) ; le réactif de Dragendorff (précipité rouge-orange) ; le réactif de Wagner (précipité rouge brique foncé) et le réactif Hager (précipité jaune) (Zhaohui.xue et *al.*, 2015). La préparation des ces réactifs est mentionnée dans l'annexe 1. La précipitation est basée sur la combinaison des alcaloïdes totaux avec les métaux et métalloïdes présents dans les réactifs (bismuth, mercure, tungstène, iode etc....).

A 2g de poudre de champignon on ajoute 10 ml de H₂SO₄ à 10%. Après 24 heures de macération à température ambiante, le macérât est filtré et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 20 ml de filtrat. On introduit 1ml de filtrat dans 4 tubes à essais différents en ajoutant 5 gouttes de chacun des réactifs cités précédemment et on attend 15 minutes (Abbah et *al.*, 2010).

1.3. Préparation des extraits d'alcaloïdes

Le champignon a été lavé à l'eau de robinet, séché à l'air à température ambiante, puis broyé en une poudre fine. Deux méthodes d'extractions différentes par des solvants organiques ont été utilisées.

1.3.1 Extraction par un solvant apolaire (E1)

L'extraction des alcaloïdes à partir du *Pleurotus eryngii* a été réalisée grâce à une extraction liquide-liquide basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin (Larbi et *al.*, 2019) (fig 15). L'opération se déroule en 4 étapes :

- Première étape

100g du champignon est alcalinisé pendant 24h par une solution d'ammoniaque concentrée à la quelle on ajoute du dichlorométhane pour extraire les alcaloïdes. La solution est ensuite filtrée sous vide. Cette opération permet de libérer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines.

- Deuxième étape

La phase organique contenant les alcaloïdes est agitée en présence d'une solution d'acide sulfurique fortement diluée à 4% jusqu'à pH =2. Les alcaloïdes se solubilisent dans la phase aqueuse sous forme de sels tandis que les impuretés neutres restent dans la phase organique.

- Troisième étape

La solution aqueuse de sels d'alcaloïdes est alcalinisée par une solution d'ammoniaque concentrée jusqu'à pH =10, permettant le passage des alcaloïdes de la forme sel à la forme

organique. Le traitement de la phase aqueuse par une base entraîne le relargage de l'alcaloïde qui pourra être extrait par le dichlorométhane. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à épuisement de la phase aqueuse par passage de tous les alcaloïdes en phase organique. L'épuisement total de la phase aqueuse en alcaloïde est vérifié par le test de Dragendorff.

- **Quatrième étape :**

Le solvant organique contenant les alcaloïdes est lavée à l'eau distillé, après décantation, ce dernier est séchée par du sulfate de magnésium afin d'éliminer les traces d'eau et évaporé par l'évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu est la somme des alcaloïdes totaux (AT).

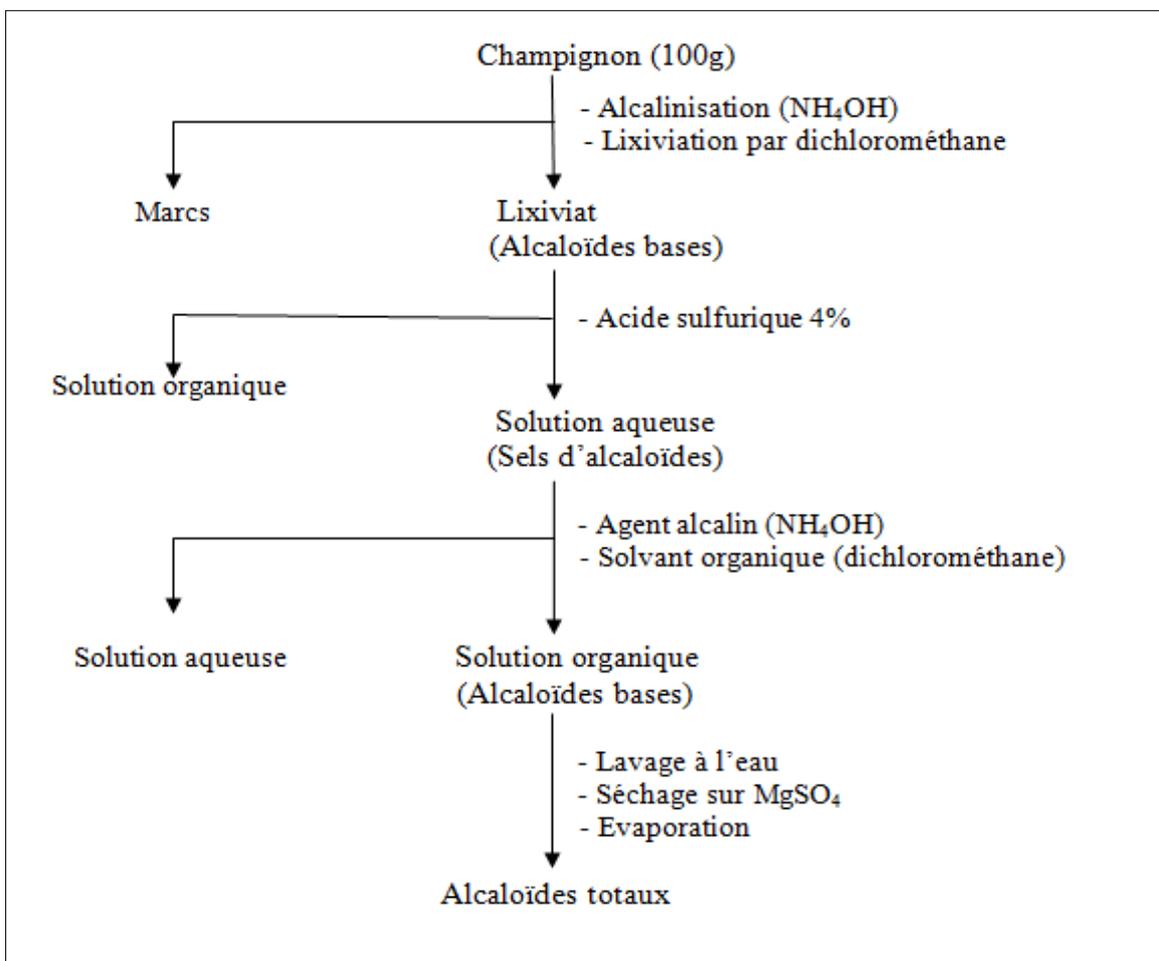


Figure 15. Protocole d'extraction des alcaloïdes

1.3.2. Extraction par un solvant polaire (E2)

Tel qu'il a été rapporté dans la partie bibliographie, les alcaloïdes existent sous forme de sels, ce qui leur permet d'être solubles dans l'eau. La procédure consiste à extraire les

différents types d'alcaloïdes par le méthanol, à partir d'une poudre de 100g de champignon (Harborne., 1998). Cette opération assure la séparation des sels d'alcaloïdes des résidus cellulosiques. L'acidification par l'acide sulfurique à 4% (pH=2) de la solution méthanolique fait passer tous les composés basiques dans la phase aqueuse, qui sera ensuite débarrassée des composés non basiques par plusieurs lavages à l'éther diéthylique. Le traitement de la phase aqueuse par une base entraîne la libération des alcaloïdes qui sont ensuite extraits par l'éther puis récupérés après évaporation du solvant (fig 16).

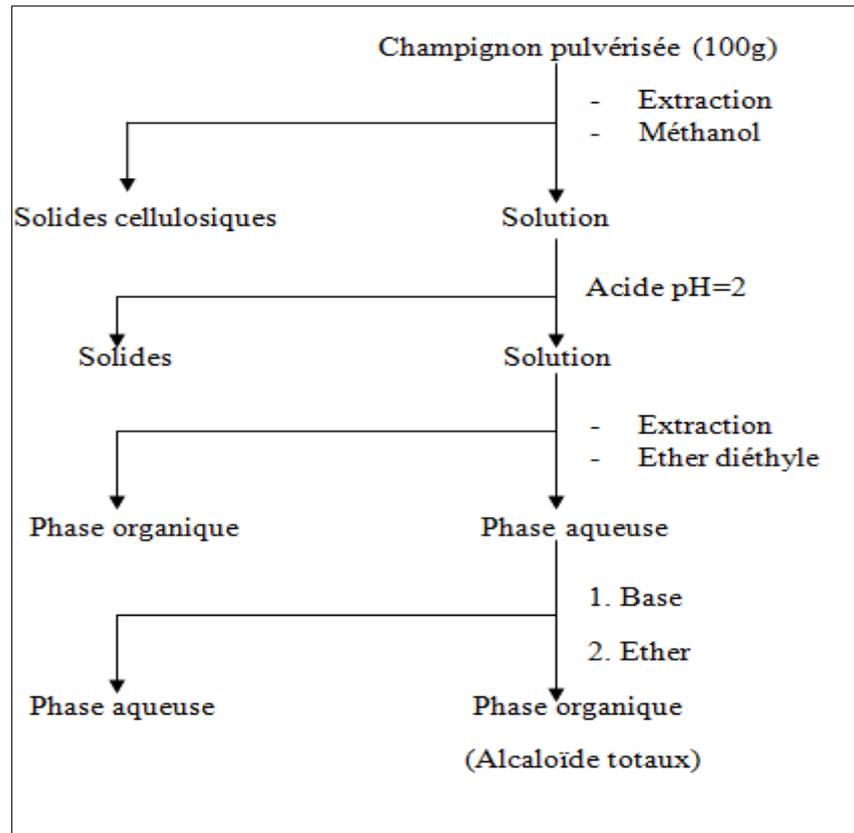


Figure 16. Protocole d'extraction des différents types d'alcaloïdes

1.4. Purification des extraits alcaloïdiques

Quelle que soit la méthode choisie pour extraire les alcaloïdes ; ce ne sont pas des produits purs qui sont obtenus mais plutôt des alcaloïdes totaux (AT) ou un mélange complexe de bases qu'il est nécessaire de séparer. La séparation des extraits bruts et l'obtention des alcaloïdes purs nécessitent l'utilisation combinée de plusieurs techniques chromatographiques, comme la chromatographie liquide moyenne pression (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC ou chromatographie flash) et la chromatographie préparative sur plaque en verre. Des contrôles réguliers à chaque étape de fractionnement sont réalisés par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).

1.4.1. Chromatographie liquide moyenne pression

C'est une technique plus fine de chromatographie sur colonne, supportant des pressions modérées, permettant ainsi d'accroître légèrement les débits. Cette technique permet le fractionnement et la purification en une ou plusieurs étapes des composants d'un mélange complexe. Elle est réalisée sur les deux extraits bruts E1 et E2 obtenus lors de l'étape d'extraction. La colonne de la chromatographie flash a été réalisée sur du gel de silice : type 60, 200-400 mesh, Merck.

Les deux extraits de poids de (E1 :300 mg) et (E2 : 500 mg) sont d'abord solubilisés chacun dans un volume minimum de méthanol puis mélanger à une petite quantité de gel de silice. Après évaporation à sec, la poudre résultante pour chaque extrait est délicatement déposée en haut de la colonne. L'élution est réalisé par un gradient de solvants de type dichlorométhane/ méthanol (CH_2Cl_2 /MeOH, 100:0 à 80:20) commençant par le dichlorométhane (100%) et se terminant par le CH_2Cl_2 /MeOH (80:20). La progression d'élution des substances, suivie en lumière UV détermine les changements de polarité du mélange éluant, afin d'assurer une bonne séparation des produits présents dans l'extrait analysé.

Des fractions de 100 mL ont été collectées en sortie de colonne puis analysées par CCM sous UV à 254 et 365nm et révélées par l'ansaldehyde sulfurique et le réactif DragenDorff. Ce contrôle chromatographique permet de réunir les fractions selon la ressemblance des spots sur les plaques CCM.

1.4.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les CCM permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits élués. Elles sont réalisées sur des plaques de silice de gel de silice (60 F₂₅₄, Merck, 0,25 mm d'épaisseur).

Le développement de ces plaques s'effectue dans des cuves en verre, saturées avec l'éluant approprié, constitué généralement d'un mélange de solvants selon le type de séparation souhaité. En effet, le solvant de migration doit être choisi en fonction de la polarité des molécules contenues dans l'échantillon. Les plaques sont ensuite observées sous lampe UV à 254 et à 366 nm et révélées par le réactif Drangendorff (révélateur des alcaloïdes) et l'ansaldéhyde sulfurique afin de distinguer les molécules possédant un chromophore.

1.4.3. Chromatographie préparative sur plaque

Cette méthode de purification est utilisée dans l'analyse des fractions encore hétérogènes issues de la colonne. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, les zones de silices correspondantes aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique. A cette différence s'ajoute la quantité d'échantillons appliquée sur la plaque chromatographique (20mg à 40mg) ainsi que l'épaisseur de la couche du gel de silice. Dans cette technique, les plaques que nous avons utilisées sont des plaques en verre, format 20 x 20 cm, ces derniers ont été préparés au niveau du laboratoire. À partir d'environ 40 g du gel et 100 ml d'eau distillée, un mélange homogène du gel a été préparé afin de l'étaler sur les plaques à l'aide d'un étaleur manuel.

L'échantillon à séparer est solubilisé dans un solvant adéquat de manière à obtenir la dissolution totale. Il est ensuite déposé sur la plaque à l'aide d'un peigne spéciale. La plaque est développée dans une cuve saturée contenant l'éluant adéquat.

Comme dans la CCM analytique, la plaque est séchée à température ambiante ou avec un sèche-cheveux. On examine les taches des constituants sous lumière UV ou bien on révèle une frange de la plaque par pulvérisation avec le réactif adéquat. A l'aide d'un scalpel ou une spatule on récupère les composés d'intérêt fixés sur la silice. Cette dernière est ensuite dispersée dans une petite quantité de solvant, puis filtrée sous vide, pour permettre la récupération des composés d'intérêt.

Des méthodes spectrales permettent la détermination de la structure des produits purifiés, à savoir la spectrométrie de masse ainsi que la résonance magnétique nucléaire.

1.5. Spectrométrie de masse

La spectroscopie de masse est devenue au fil du temps un outil incontournable dans la chimie organique des substances naturelles. Cette technique est d'une grande utilité dans la détermination des structures moléculaires, elle est une technique analytique qui permet d'obtenir la masse et la fragmentation d'une molécule. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (valeurs m/e ou m/z) (Hu et *al.*, 2005).

1.5.1. Méthodes d'ionisation

Les méthodes d'ionisation les plus importantes sont :

- l'impact électronique dans laquelle l'échantillon est bombardé en phase vapeur avec un faisceau d'électrons à haute énergie (70 eV);
- l'ionisation chimique dans laquelle l'échantillon est introduit dans la chambre d'ionisation à la pression atmosphérique avec un excès d'une substance intermédiaire (méthane, isobutane ou ammoniac) également appelé gaz porteur (KONE Kouwelton., 2018).

1.5.2. Ions moléculaires et fragments par impact électronique

Le bombardement avec un faisceau d'électrons à haute énergie (70 eV) arrache l'électron ayant le plus petit potentiel d'ionisation dans la molécule pour donner l'ion moléculaire ou ion parent M^+ en phase vapeur. L'ion moléculaire donne la masse moléculaire de l'échantillon car la masse de l'électron perdue de la molécule est négligeable (Thompson., 2018).

1.5.3. Spectre de masse et pic de base

Le spectre de masse d'un composé est représenté graphiquement en traçant les valeurs m/e des divers ions (ions moléculaires et ions fragments) par rapport à leurs abondances relatives. Parfois, le pic de l'ion moléculaire lui-même peut être le pic de base. Généralement, les spectres de masse sont représentés sous la forme d'un graphique à barres (Loudon & Maccoll, 1970)

1.5.4. Reconnaissance de l'ion moléculaire (parent), pic et détection des isotopes

La reconnaissance du pic de l'ion moléculaire M^+ (pic parent) dans le spectre de masse d'un composé organique est très importante car elle donne la masse moléculaire du composé. Le pic d'ion moléculaire est le pic du nombre de masse le plus élevé à l'exception des pics isotopiques aux nombres de masse $M+1$, $M+2$ etc. (M = masse de l'ion moléculaire). Les pics isotopiques (satellites) apparaissent en raison de la présence d'un certain nombre de molécules contenant des isotopes plus lourds que les isotopes communs. Puisque l'abondance naturelle des isotopes plus lourds est généralement beaucoup plus faible que celle de l'isotope le plus léger, les intensités des pics isotopiques sont très faibles par rapport au pic parent (Thompson., 2018).

Les spectres de masse ont été enregistrés en EI (Impact Electronique) sur un spectromètre de masse de type Bruker Daltonics Data Analysis 3.4.

1.6. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette technique a été notre principal outil de caractérisation, la résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode spectroscopique utilisant les propriétés dynamiques des moments magnétiques portés par les noyaux dans leur état fondamental. Cette méthode non destructive et sélective donne des informations structurales et dynamiques sur l'environnement du noyau considéré (Boulant., 2009).

Les noyaux pouvant donner un signal en RMN possèdent un électron libre. Les plus couramment utilisées en analyse structurale de composés organiques sont le proton ^1H et le carbone ^{13}C . Mais il est également possible d'enregistrer les signaux émis par l'azote ^{15}N ... Soumis à un champ magnétique, ceux-ci entrent en précession et émettent alors un signal enregistré par le spectromètre de masse. La fréquence de résonance des carbones est très sensible à l'environnement électronique et stérique. La moindre modification structurale se traduit par des variations plus ou moins importantes de pratiquement tous les carbones de la molécule.

Ainsi, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constituera son spectre, ou en quelque sorte son empreinte digitale, à partir duquel elle pourra être identifiée. Pour cela, il est donc très important d'avoir une excellente reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques, dans le spectre du mélange par rapport aux spectres des composés de référence (Meriane., 2018). En phytochimie, les deux atomes les plus étudiés sont l'hydrogène (^1H) et le carbone 13 (^{13}C). Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

1.6.1. RMN ^1H

La réalisation d'un spectre de RMN du ^1H est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. Cette méthode permet de connaître le nombre et la nature des protons présents dans la molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes, depuis l'avènement de la RMN à transformée de Fourier. En RMN du ^1H , trois informations sont importantes :

- Le déplacement chimique (δ) : la position des signaux dans le spectre, exprimée en Hertz (Hz) ou en parties par million (ppm) nous renseigne sur le type de proton correspondant à ce signal.
- L'intégration : l'aire sous la courbe d'un pic est proportionnelle au nombre de protons qui résonnent à cet endroit.

- La multiplicité du signal : indique le nombre de protons avoisinants le proton considéré (Abedini., 2013).

1.6.2. RMN du ^{13}C

L'isotope ^{13}C ne représente qu'1% des atomes de carbone existant. La faible sensibilité de cette expérience contraint le manipulateur à multiplier le nombre d'expériences (*scans*) sur plusieurs heures afin d'obtenir un spectre de bonne qualité. Ceci est particulièrement handicapant pour les substances naturelles qui sont souvent isolées en faible quantité par rapport aux produits de la chimie de synthèse. En revanche, la résolution obtenue est nettement supérieure à celle des spectres de RMN du ^1H . Pour un même appareil : les déplacements chimiques s'échelonnent généralement sur plus de 200 ppm, contre 10 ou 15 ppm pour le proton.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone ont été effectués (RMN- ^1H et C^{13}) sur un spectromètre RMN Bruker Avance III HD 600 MHz équipé d'une cryosonde QCI 5 mm. Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutérés CDCl_3 , dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont rapportés en parties par million ppm par rapport au CDCl_3 [^1H : δ (CDCl_3) = 7,27 ppm ; ^{13}C : δ (CDCl_3) = 77,0 ppm]. Les constantes de couplage sont exprimées en Hz (Abedini., 2013).

2. Activités biologiques

2.1. Activité anti-cholinestérase

2.1.1. Etude *in vitro*

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ont été évaluées par la méthode d'Ellman et *al* (1961) sur les deux extraits alcaloïdiques E1 et E2 obtenus lors de l'extraction et alcaloïde isolée. Il s'agit d'une méthode colorimétrique standard permettant de quantifier l'inhibition de l'AChE et (BChE) par une évaluation de l' IC_{50} qui correspond à la concentration nécessaire du produit capable de diminuer l'activité enzymatique de moitié. Expérimentalement, l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats, Le clivage du substrat par l'AChE ou la BChE produit de la thiocholine (SCh) qui réagit alors à son tour avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un composé anionique de couleur jaune : le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) qui absorbe à 412 nm. L'absorbance du TNB mesurée à

l'aide du spectrophotomètre est proportionnelle à l'activité enzymatique de l'AChE (fig 17).

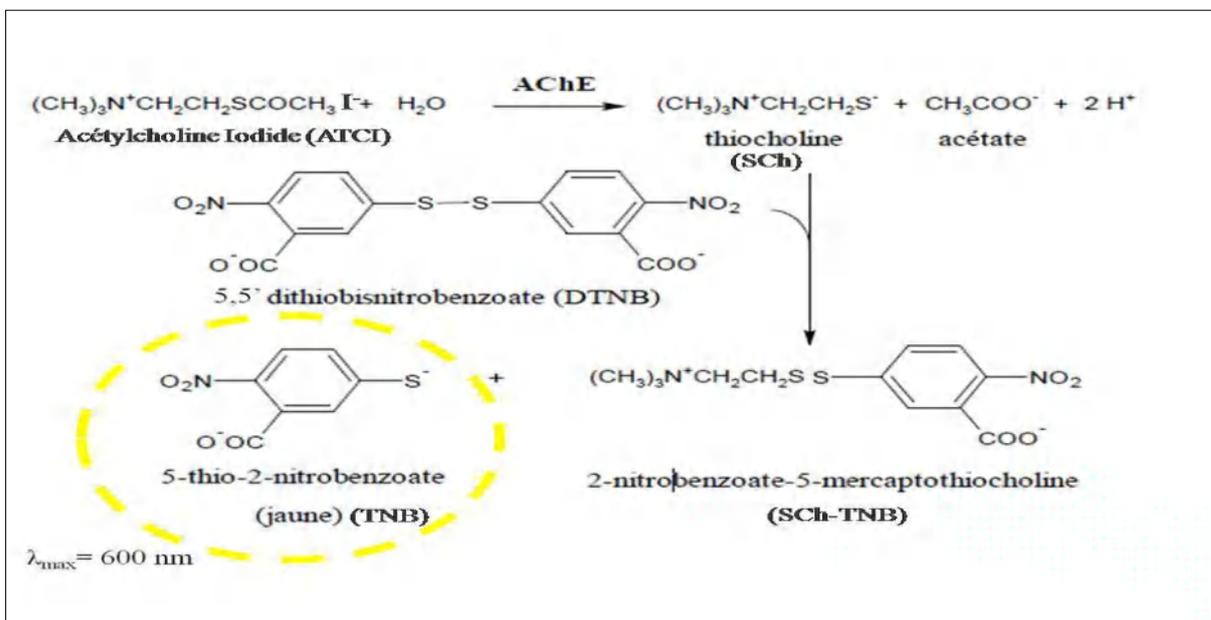


Figure 17. Réaction colorimétrique d'Ellman

Dans chaque puits d'un lecteur de microplaques à 96 puits (SpectraMax PC340, Molecular Devices, États-Unis) sont introduits successivement 150 μl de tampon phosphate de sodium (100mM, pH 8,0), 10 μl d'une solution d'échantillon dissoute dans le méthanol à différentes concentrations (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et un volume de 20 μl d'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou de BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U), le mélange est incubé pendant 15 min à 25⁰ C auquel on ajoute enfin 10 μl de DTNB (0,5 mM). La réaction est ensuite initiée par l'addition de 20 μl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). L'hydrolyse de ces substrats est suivie par spectrophotométrie où selon le résultat de la réaction du DTNB avec le Sch qui est libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine conduit à la formation du TNB de couleur jaune qui absorbe à 412 nm. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE est déterminé par comparaison des vitesses de réaction des échantillons par rapport à l'échantillon témoin (méthanol dans du tampon phosphate, pH 8). Pour le contrôle positif, nous avons fait appel à la galantamine

hydrobromide qui est actuellement considérée comme l'un des meilleurs inhibiteurs de l'AChE utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Atanasova., et al 2015).

Il faut souligner que pour la détermination de l'IC₅₀ d'un composé, il est indispensable d'évaluer d'abord son pourcentage d'inhibition à partir de la figure suivante :

| | |
|-------------------------------------|--|
| $I\% = 100 \times \frac{AC-AP}{AC}$ | <p>AC : Absorbance du contrôle</p> <p>AP : Absorbance du produit</p> |
|-------------------------------------|--|

Figure 18. Mode de calcul du pourcentage d'inhibition

2.1.2. Etude *in silico*

2.1.2.1. Docking moléculaire

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition du site actif de l'AChE par l'alcaloïde isolé et identifié, nous avons utilisé la technique d'amarrage moléculaire (docking moléculaire).

Le docking moléculaire se déroule en deux étapes complémentaires. La première consiste à sélectionner les poses les plus favorables du ligand qui de par sa flexibilité va adopter dans le site actif de la protéine différentes conformations, positions et orientations. La deuxième consiste à classer les meilleures poses grâce à une évaluation par un score qui s'exprime, selon les programmes, soit par une affinité soit par une énergie d'interaction. Le docking moléculaire a été réalisé en mettant en œuvre trois éléments essentiels : l'enzyme (cible), le ligand (l'alcaloïde) et le programme ou le logiciel de docking.

2.1.2.1.1. Préparation de l'enzyme

La *Protein Data Bank* ou PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Dans notre étude nous avons utilisé le complexe 4M0E comme structure de l'enzyme AChE disponible dans la PDB, ce choix est dicté par sa faible valeur de résolution 2 Å (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Pour une bonne réussite du docking moléculaire, il est nécessaire de procéder à une simplification préalable du fichier originel de l'enzyme. Le complexe 4M0E étant sous forme

homodimérique, nous avons fait appel au programme VMD (Dynamique moléculaire visuelle) version 1.9.3 pour éliminer la chaîne B et garder uniquement la chaîne A. Les molécules d'eau ont aussi été supprimées sauf quatre faisant partie de la cavité catalytique de l'enzyme. L'inhibiteur 1YL (dihydrotanshinone I) complexant l'enzyme ainsi que les éléments ou hétéroatomes ayant servi à la cristallisation telle que les ions nitrates, l'alpha-l-fucose, le 1,2-éthanediol et le N-Acétyl-D-glucosamine ont également été retirés.

En règle générale, le site actif de l'enzyme correspond au site de liaison de l'inhibiteur co-cristallisé existant dans le complexe de la PDB. Dans le cas de l'AChE, la cavité catalytique a été définie à l'aide du programme VMD en sélectionnant tous les résidus d'acides aminés se trouvant à proximité de l'inhibiteur originel 1YL à des distances n'excédant pas 6 Å (Chaput., et *al* 2016). Cette méthode nous a permis de retrouver tous les résidus d'acides aminés déjà cités par la littérature (Mokrani et *al.*, 2019 ; Gerlits et *al* 2019 ; Kwasnieski., 2010 ; Johnson et *al* 2006), formant les deux sites catalytique (CAS) et périphérique (PAS) de la cavité catalytique de l'AChE (fig 19) qui sont répartis comme suit :

- **CAS** : Trp86, Gly120, Gly121, Gly122, Tyr133, Glu202, Ser203, Phe295, Arg296, Phe297, Glu334, Tyr337, Phe338, His447, Gly448, Gly449 et Ile451.
- **PAS** : Tyr72, Asp74, Tyr124, Ser125, Trp286, Leu289, Glu292, Ser293, Val294, Tyr341 et Gly342.

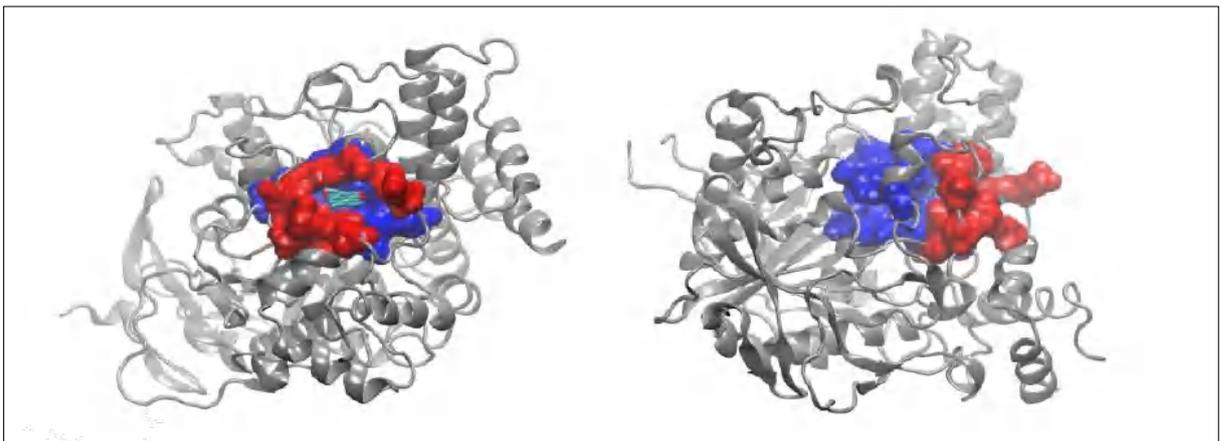


Figure 19. Vue de face (à gauche) et de profil (à droite) de la structure cristallographique de l'AChE humaine (code PDB : **4M0E**) en complexe avec son inhibiteur (**1YL**). La structure secondaire de l'enzyme est représentée en mode « cartoon » en gris tandis que le CAS (en bleu) et le PAS (en rouge) sont représentés en mode « surface ».

Le contenu de ces deux sites est ensuite reporté dans un fichier texte puis enregistré au format mol2 que requiert le programme GOLD, le programme de docking moléculaire utilisé dans cette étude (annexe 2).

2.1.2.1.2. Préparation du ligand

Les structures 3D des composés étudiés (molécule isolée et molécule de référence) ont été dessinées, leur énergie minimisée et exportées en tant que fichiers mol2 en utilisant le programme de construction moléculaire *ChemDraw*16.0 «Chem3D» (<http://www.cambridgesoft.com>).

2.1.2.1.3. Déroulement du docking moléculaire

La réalisation du docking moléculaire a été réalisée par le programme GOLD version 5.2.2. Ce programme repose sur un algorithme génétique très efficace permettant l'exploration d'un nombre important de conformations du ligand au sein du récepteur. Dans notre cas, les paramètres par défaut de l'algorithme génétique de Gold ont été conservés (voir annexe 3). Nous avons utilisé le docking semi-flexible qui tient compte de la flexibilité du ligand ou inhibiteur mais considère la cible ou l'enzyme comme corps rigide (Jones et *al.*, 1995). Pour prédire l'affinité d'un composé, le programme Gold analyse différentes conformations et positions au sein du site actif de l'enzyme. Pour chaque composé, seul 10 conformations correspondant aux meilleurs scores sont sauvegardées par le logiciel. Le classement des poses est généré par une fonction de score dite «*GoldScore*» sans unité. Enfin l'analyse visuelle des interactions entre le ligand et l'enzyme est réalisée grâce aux programmes PyMol version 2.2.3 (<https://pymol.org>) et Maestro version 11.3 de la suite Schrodinger (Maestro, version 11.3, 2015).

2.1.2.2. Prédiction des propriétés ADMET

Le terme ADMET est une abréviation utilisée pour désigner les propriétés pharmacocinétiques d'Absorption, de Distribution, de Métabolisme d'Excrétion et de Toxicité d'une molécule donnée. La connaissance des propriétés ADMET des molécules notamment en ce qui concerne leur perméabilité membranaire, stabilité métabolique et toxicité passe par une connaissance préalable de leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques que l'on tentera de déterminer en faisant appel à des méthodes prédictives *in silico*.

Pour prédire les propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité de la molécule testé par docking moléculaire, une étude computationnelle ADME / Tox a été réalisée à l'aide des serveurs SwisseADME (<http://www.swissadme.ch>), et ADMETlab 2.0.

2.2. Test d'activation du facteur de transcription Nrf2

L'essai luciférase a été utilisé pour l'évaluation systématique de l'induction de Nrf2. Ce test est largement utilisé pour la voie de signalisation Keap1/Nrf2/ARE (Huerta et al., 2016 ; Jiang et al., 2015). Rappelons que Le facteur de transcription Nrf2 a un rôle protecteur contre le stress oxydant en induisant des gènes antioxydants. ARE-Nrf2 Luciférase est une méthode *in vitro* utilisée pour analyser l'activation de la voie protectrice ARE-Nrf2 par détection lumineuse. Lors d'une exposition à un composé oxydant, les gènes endogènes dépendant de Nrf2 sont activés entraînant également l'expression de la luciférase (fig 20). Il s'agit d'une enzyme de luciole (*Photinus pyralis*) qui catalyse la production de lumière par oxydation de la luciférine, en présence d'ATP et d'oxygène (de Wet et al., 1987). La luminescence engendrée par la luciférase est donc ici dépendante de l'expression de Nrf2. Par conséquent, un inducteur de Nrf2 entraînera une augmentation de la lumière produite par l'oxydation (Ow et al., 1986). Dans notre travail, nous avons évalué l'extrait E1 (voir page 29) et l'alcaloïde isolé pour l'activation de Nrf2.

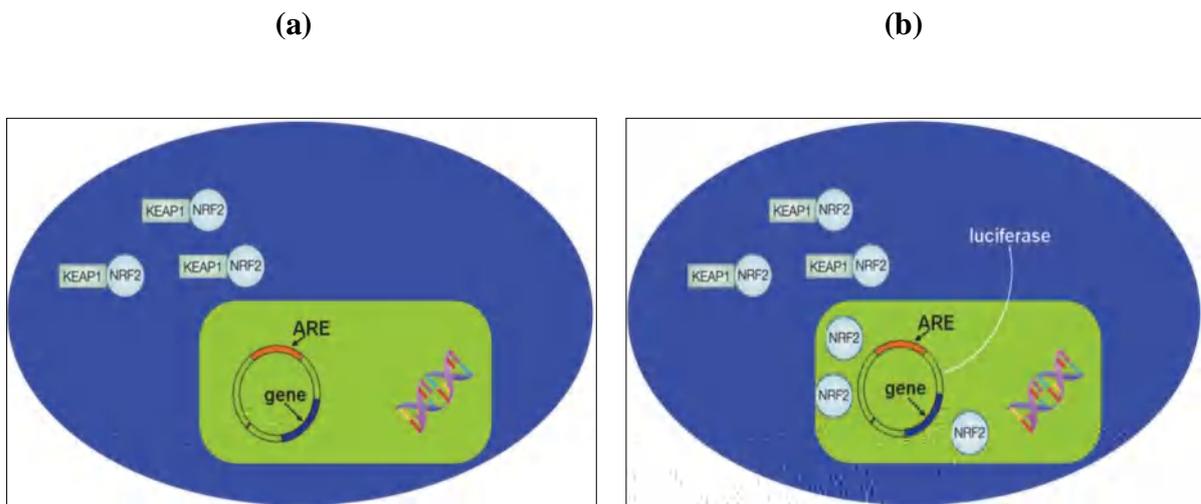


Figure 20. (a) : Cellules transfectées pour l'essai luciférase. (b) : Production de luciférase au sein de la cellule (bleu : cytoplasme, vert : noyau)

2.2.1 Préparation de l'échantillon

L'extrait E1 du champignon *P. eryngii* (50 mg) et la molécule isolée ont été solubilisés dans 1 ml d'éthanol pendant une nuit. Le surnageant a été collecté pour être utilisé pour l'évaluation de l'activation de Nrf2.

2.2.2. Culture de cellules HepG2

Dans cette étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire HepG2 humaine du carcinome hépatocellulaire transfectée avec un gène codant pour la luciférase et régulée par ARE (rapporteur pARE-luciférase) (Hybertson et *al.*, 2019). Les cellules HepG2 et HepG2-ARE ont été cultivées et maintenues par des méthodes standard en utilisant du milieu Opti-MEM avec 4 % de sérum bovin fœtal (FBS) et de la généticine/pénicilline/streptomycine.

2.2.3. Induction de Nrf2

Les cellules HepG2-ARE ont étéensemencées (20 000 cellules dans 400 µL de milieu Opti-MEM, 4% FBS, avec généticine/pénicilline/streptomycine) dans des plaques 24 puits et incubées à 37 C° avec 10% CO₂. Après 24 h, les cellules ont été traitées avec notre échantillon (0 à 100 µg/mL) pendant 18 h.

Les cellules ont été lysées dans leurs puits avec 100 µL d'un tampon de lyse contenant 3,5 mM de pyrophosphate de sodium pour stabiliser le rendement lumineux de la luciférase. Une aliquote de 20 µL de lysat cellulaire a été prélevée dans un tube à essai en verre transparent, placé dans un luminomètre BD Monolight 3010 (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*), dont 50 µL de luciférine 1 mM ont été injectés. La chimioluminescence dépendante de la luciférase a été mesurée et rapportée en unités de lumière relative (RLU).

2.3. Tests d'expression génique

Nous avons examiné les niveaux d'expression génique par La méthode RNA-seq sur les cellules HepG2 (cellules humaine du carcinome hépatocellulaire) (Hybertson et *al.*, 2019), sous l'effet de l'extrait E1 (voir page 29) de notre champignon.

Le séquençage à haut débit de l'ARN (appelé RNA-seq) est une approche relativement récente utilisant la seconde génération de séquenceur, appelés NGS (*Next Generation Sequencing*). Elle est actuellement la technologie la plus employée pour identifier et quantifier, à large échelle, les transcrits extraits d'un ou plusieurs individus, tissus ou types cellulaires, dans des conditions physiologiques données. Avec la production massive de données RNA-seq, des méthodes et outils spécifiques permettant l'analyse de ce type de données ont été et sont encore développés. Le RNA-seq repose sur trois étapes (Fig. 21) (Uhel & Zafrani, 2019) :

- l'extraction et le fractionnement des ARN, suivis de la constitution d'une librairie d'ADNc ;

- séquençage proprement dit ;
- analyse bio-informatique (alignement, assemblage et quantification) des millions de séquences générées.

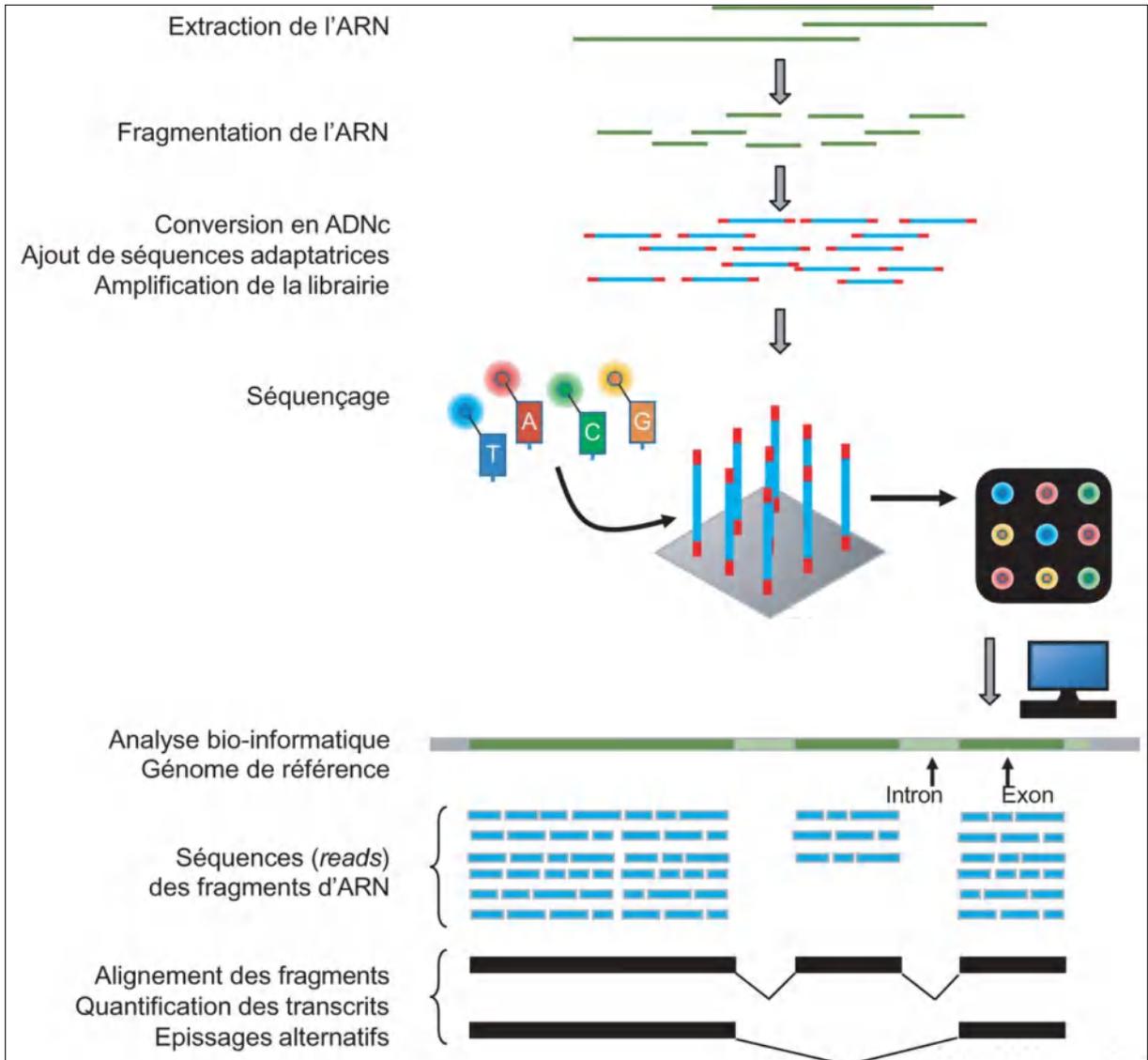


Figure 21. Étapes de la méthode RNA-seq

2.3.1. Culture cellulaire et isolement d'ARN

Les cellules HepG2 ont été cultivées pendant une nuit dans des plaques de 24 puits avec contrôle contre 60 µg/mL d'extrait E1 (dans l'éthanol). Les cellules cultivées ont été lavées deux fois avec la solution tampon phosphate salin (PBS : *phosphate-buffered saline*) dans les puits. L'ARN total a été isolé en utilisant le kit d'extraction Qiagen RNeasy Mini kit (QIAGEN Inc., Valence, Californie, États-Unis). La concentration d'ARN de chaque

échantillon a été déterminé sur la base de l'absorbance à 260 nm en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). L'intégrité des échantillons d'ARN total a été examinée par Agilent Tape Station 4200 (Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis).

2.3.2. Procédure de dosage ARNm-seq

- Préparation de la bibliothèque d'ARNm-seq

Le plus couramment, le RNA-seq vise les ARNm, et on cherche à éliminer les ARNr qui constituent la grande majorité des transcrits. Après extraction et purification, l'isolement de l'ARNm à partir de l'ARN total (100 ng) a été effectué en utilisant le kit NuGEN Universal Plus mRNA-Seq (Tecan Genomics, Redwood City, Californie, États-Unis) qui est une solution complète pour le séquençage d'ARNm, avec un flux de travail simple et facile à suivre, dont le protocole polyA a été utilisé qui permet de sélectionner l'ARN possédant une queue polyA (fig 22), c'est à dire la plupart des ARNm ainsi qu'une partie des longs ARN non codants. Certains ARNm sont néanmoins perdus lors de cette sélection.

Les ARNm sont fragmentés en courtes séquences (les procédés de séquençage ne peuvent prendre en charge que de courts fragments, de l'ordre de 200 à 300 bases alors que les transcrits d'ARN peuvent contenir plusieurs milliers de bases).

Les amorces d'ARNm sont converties en ADNc double brin (plus stable et plus faciles à amplifier et manipuler que l'ARN), les fragments sont ligaturés de part et d'autre par des adaptateurs de séquençage qui permettent à l'automate de reconnaître les fragments et de séquencer plusieurs échantillons en même temps. Qui est ensuite amplifiés, taille sélectionnée et purifiée pour la génération de cluster de séquençage.

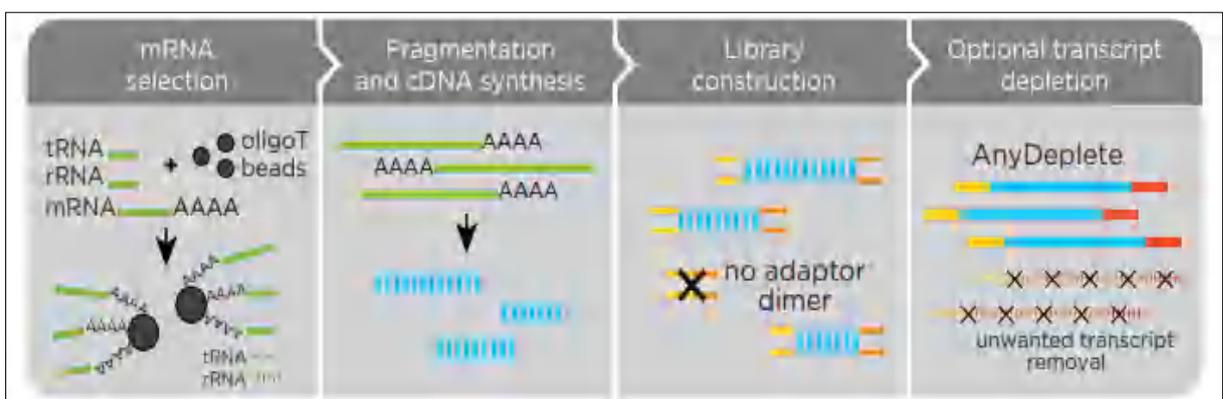


Figure 22. Protocole Poly A

- Le séquençage d'ARNm par RNA-Seq

A cette étape les bibliothèques de matrices d'ARNm ont été séquencées comme lectures appariées de 150 pb sur le système du séquençage Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) à l'Université du Colorado en génomique et microréseau : Plate-forme centrale (Aurora, CO, États-Unis). Nous avons séquencé à une profondeur estimée de ~ 40 M 2X150 bases lit par échantillon. La plateforme Illumina™ utilise des nucléotides marqués avec des fluorochromes différents, ces derniers incorporés au brin synthétisé sont visualisés un par un à l'aide du lecteur.

- L'analyse de l'épissage dans les données RNA-seq

Cette section vise les méthodes bioinformatiques d'analyse des séquences données par RNA-Seq. Les millions de séquences de fragments d'ARN sont réalignés et assemblés. Il est ensuite possible de quantifier les niveaux d'expression des transcrits, de détecter des altérations génomiques, de relever des variations de séquence non détectables à l'échelle génomique, telles que l'expression de transcrits alternatifs.

Les séquences dérivées ont été analysées en appliquant les méthodes basées sur l'alignement des séquences et la détermination de l'expression génique différentielle en utilisant le programme gSNAP « *Genomic ShortRead Nucleotide Alignment Program* » (Baird., 2014). Dans bref, les lectures générées ont été cartographiées sur le génome humain (GRCH38) par gSNAP (Wu & Nacu., 2010), génome de référence pour obtenir un meilleur résultat lors de l'étape d'alignement. Dans ce cas l'outil Cufflinks a été utilisé, qui permet de détecter des nouveaux transcrits, dont le fonctionnement est basé sur l'estimation de leur abondance à partir d'alignement prenant en compte les jonctions d'épissage (TopHat2), et les alignements multiples cela est traduit par l'expression FPKM (*fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped*) (Trapnell et al., 2010). Les données brutes sont stockées dans le format de fichier standard FASTQ accompagnées par un score de qualité pour chaque base indiquant leur fiabilité, en utilisant le serveur Biojupies (Torre et al., 2018). Gènes significatifs à un FDR < 0,05 (*False Discovery Rate*) ont été soumis à une analyse des voies à l'aide du programme Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Germantown, MD) pour identifier les voies d'intérêt qui ont été modifiées par l'extrait E1.

2.3.3. Analyse d'enrichissement de l'ontologie génique (GO)

L'analyse d'enrichissement d'ontologie génique (GO) d'expression différentielle des gènes (DEGs) a été implémenté par les packages Goseq R basés sur une distribution

hypergéométrique non centrale de Wallenius, qui peut ajuster le biais de longueur de gène dans les DEGs. Les voies biologiques sont des séquences d'interactions entre les composés biochimiques qui jouent un rôle clé dans la détermination du comportement cellulaire. Des bases de données telles que KEGG, Reactome et WikiPathways contiennent un grand nombre d'associations entre ces voies et les gènes. Ces ressources de base de données permettant de comprendre les fonctions et les utilités de haut niveau du système biologique telles que la cellule, l'organisme et l'écosystème à partir d'informations au niveau moléculaire, en particulier les ensembles de données moléculaires à grande échelle générés par le séquençage du génome et d'autres technologies expérimentales à haut débit, ont été évaluées à l'aide de BioJupies (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30447998>).

2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

La découverte des antibiotiques constituait une véritable révolution dans la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, la consommation inappropriée et l'utilisation abusive d'antibiotiques, ont accéléré la sélection de bactéries multirésistantes, constituant actuellement, un réel problème d'antibiothérapie et de santé publique. Les conséquences collectives et individuelles de ce problème, sont sérieuses du fait que la plupart des infections, qu'elles soient bénignes ou graves, sont de plus en plus difficiles à traiter. Le recours aux ressources naturelles, devient une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer, pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces (Wright., 2007).

Dans notre étude nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'extrait E1 du champignon sur quatre souches bactériennes (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) (Tableau 2) en utilisant la Méthode de diffusion sur milieu solide, décrit par Biondi et al., 1993. Le principe de ce test repose sur la diffusion des agents antibactériens de différentes concentrations en milieu solide. Après un certain temps de contact entre les composés antibactériens et la souche bactérienne, l'effet du produit antibactérien est apparu comme une zone d'inhibition autour du disque. En fonction du diamètre d'inhibition, la souche est considérée soit sensible, très sensible, extrêmement sensible ou bien résistante.

Tableau 2. Souches bactériennes

| Souches | Gram | ATCC |
|-------------------------------|------------------------|------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Bacille G ⁻ | ATCC700603 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bacille G ⁻ | ATCC27853 |
| <i>Escherichia coli</i> | Bacille G ⁻ | ATCC25922 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Bacille G ⁺ | ATCC25923 |

Le protocole de travail est réalisé selon les étapes suivantes :

- **Préparation du milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé est le Muller-Hinton (MH) (gelose riche en composés d'infusion de viande de boeuf, hydrolysate acide de caseine et amidon de maïs). La gélose (MH) est coulée dans des boîtes de pétri avec une épaisseur de 4 mm. Les boîtes de pétri pré-séchées avant l'emploi.

- **Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne**

A partir d'une culture pure de bactéries sur milieu d'isolement (gélose nutritive) pendant au maximum 24h, nous avons raclé à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. La pipette Pasteur est ensuite lavée par 5 ml d'eau physiologique stérile donnant une suspension bactérienne qu'il faut homogénéiser. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland qui correspond à 10⁸ UFC/mL (Tyagi & Malik., 2011). L'inoculum est ajusté à 10⁸ cellules/mL (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm.

- **Préparation des dilutions d'extrait**

Afin d'obtenir différentes concentrations de notre extrait, nous l'avons diluée dans le DMSO (diméthylsulfoxyde). Sachant que ce dernier n'a aucun pouvoir antibactérien puissant (Gachkar et al., 2006). Les différentes concentrations avec des dilutions successives ont été préparées à partir d'une solution mère de 60 mg/mL de concentration.

- **Méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits)**

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet anti microbien. Elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs. Une suspension de 10⁸ cellules/mL provenant d'une

culture jeune de bactéries a été ensemencé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton agar dont l'ensemencement se fait par écouvillonnage.

Après séchage des boîtes à température ambiante pendant 15 min, la gélose est perforée à l'aide d'une pipette Pasteur. Les cavités ainsi formées sont remplies par la solution aqueuse de l'extrait E1 (environ 10 μ L par puits). Les boîtes sont mises à incuber dans une étuve à 37°C pendant 24h. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibition.

- **Lecture**

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (Ponce et *al.*, 2003) :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

Résultats
et
discussion

Cette partie présente les résultats des différentes investigations menées dans le cadre de l'analyse phytochimique et de l'évaluation de certaines propriétés biologiques du champignon *Pleurotus eryngii*.

1. Etude phytochimique

1.1. Screening des alcaloïdes

Les résultats du screening phytochimique sont classés en fonction des différents critères d'observation, entre autres :

| | |
|-----------------------------------|------|
| - Réaction très positive : | ++++ |
| - Réaction positive : | +++ |
| - Réaction moyennement positive : | ++ |
| - Réaction douteuse | + |
| - Test négatif : | 0 |

La présence des alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité.

Les résultats sont consignés dans le tableau 3.

Tableau 3. Résultat de recherche des alcaloïdes dans le *Pleurotus eryngii*.

| Espèce | Réactifs | Réactions et précipitation | Photographié des résultats | Couleur |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|--|--------------------|
| <i>Pleurotus eryngii</i> | Réactif DragenDorff | ++++ |  | Rouge -orange |
| | Réactif Mayer | ++++ |  | Blanc-jaune |
| | Réactif Wagner | ++++ |  | Rouge brique foncé |
| | Réactif Hager | ++++ |  | Jaune |

Qualitativement au vu des résultats ; le criblage phytochimique nous révèle la présence des alcaloïdes dans le *P.eryngii*.

Plusieurs enquêtes ont été rapportées sur les composés du *P. eryngii* tels que les peptides (Sardar et *al.*, 2017), lipides (Xue, Li, et *al.*, 2015), triterpénoïdes (Xue et *al.*, 2015 ; Xue, Li, et *al.*, 2015), stérols (Belletini et *al.*, 2018), fibres diététiques (Xue, Zhai, et *al.*, 2015), et surtout les polysaccharides (Ren et *al.*, 2016 ; Ma et *al.*, 2014 ; Zhang et *al.*, 2014 ; Chen et *al.*, 2012), mais aucune étude sur les alcaloïdes n'a été rapportée à ce jour.

En se basant sur ces données et les résultats positifs du criblage, il nous a semblé judicieux de cibler les alcaloïdes pour réaliser notre recherche phytochimique sur le champignon *Pleurotus eryngii*. Pour ce faire nous avons réalisé deux types d'extractions par des solvants polaire et apolaire suivis par une étape de purification afin d'identifier les alcaloïdes contenant dans notre champignon. Enfin une série d'activités biologiques a été réalisée sur les extraits bruts des alcaloïdes totaux afin de mettre en exergue l'intérêt médical de *P eryngii*.

1.2. Extraction

Rappelons que la préparation des alcaloïdes totaux à partir du *P eryngii* a été effectuée par une extraction liquide-liquide basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin. Deux extraits nommés E1 et E2 ont été obtenus en utilisant le dichlorométhane en présence d'ammoniac pour le premier, et le méthanol pour le deuxième.

Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage de la masse de l'extrait obtenu après évaporation du solvant par rapport à la masse initiale du champignon séché, par l'application de la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{masse d'extrait}}{\text{masse du champignon}} \times 10$$

Les résultats obtenus pour les deux extraits E1 et E2 sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 4. Rendements d'extraits E1 et E2

| Extraits de PE | Poids de PE initial | Solvants d'extractions | Poids des extraits secs | Rendement |
|----------------|---------------------|--|-------------------------|-----------|
| E1 | 130 g | Dichlorométhane en présence d'ammoniac | 0.4 g | 0.3 % |
| E2 | 100g | Méthanol et l'ether diethyle | 1.2g | 1.2 % |

La présence d'alcaloïdes après extraction est bien visible pour les deux extraits, qui présentent des rendements intéressants comparativement aux résultats de Badiaga (2011) qui a travaillé sur les feuilles de la plante de *Nauclea Latifolia* récoltée dans deux régions

différentes du Mali : Knadjiguila et Lassa. Le rendement des alcaloïdes totaux obtenus dans ces deux régions respectives avec le même protocole d'extraction pour E1 n'est que de 0.41 % correspondant à un poids de feuilles sèches initial de 256g et qu'il n'est que de 0.65% pour un poids sec initial de 208g. En revanche les travaux de Larbi et *al* (2019) montrent que le rendement des alcaloïdes totaux obtenus suivant le même protocole qu'E1 à partir des tiges de la plante *Anabasis articulata* récoltée à Béchar (sud-ouest d'Algérie) est nettement supérieur avec une valeur de 3.578 % pour un poids sec initial de 65g. Cependant, on ne peut pas se baser sur cette comparaison pour évaluer nos résultats car les différents extraits ne sont pas de la même source.

D'après les résultats mentionnés au tableau 4, le bon rendement est observé pour l'extrait E2, cela peut être dû à la différence des protocoles d'extractions des deux extraits E1 et E2, sachant que E1 est désigné pour l'extraction des alcaloïdes basiques par solvant apolaire (Dichlorométhane) selon la méthode Stas–Otto (Larbi et *al.*, 2019), alors que l'extrait E2 est issu d'extraction des alcaloïdes totaux par solvant polaire (Méthanol) (Harborne., 1998).

1.3. Purification

Il s'agit d'appliquer les techniques de séparation chromatographiques. Dans notre cas nous avons utilisé deux méthodes : la méthode flash automatisée (Chromatographie liquide moyenne pression) et la chromatographie préparative sur plaque en verre. Dans les deux cas, le principe repose sur une séparation de l'échantillon basé suivant sa polarité.

1.3.1. Purification de l'extrait E1

Nous avons réalisé une série de séparation grossière des composés en fonction de leur polarité. Au cours de ces séparations, les différentes fractions obtenues sont suivies par la méthode CCM et par rayonnement UV ($\lambda=254$ nm et 365nm) puis révélées par l'anisaldéhyde sulfurique et le réactif de DragenDorff.

Les purifications réalisées sur cet extrait sont résumées dans la figure suivante :

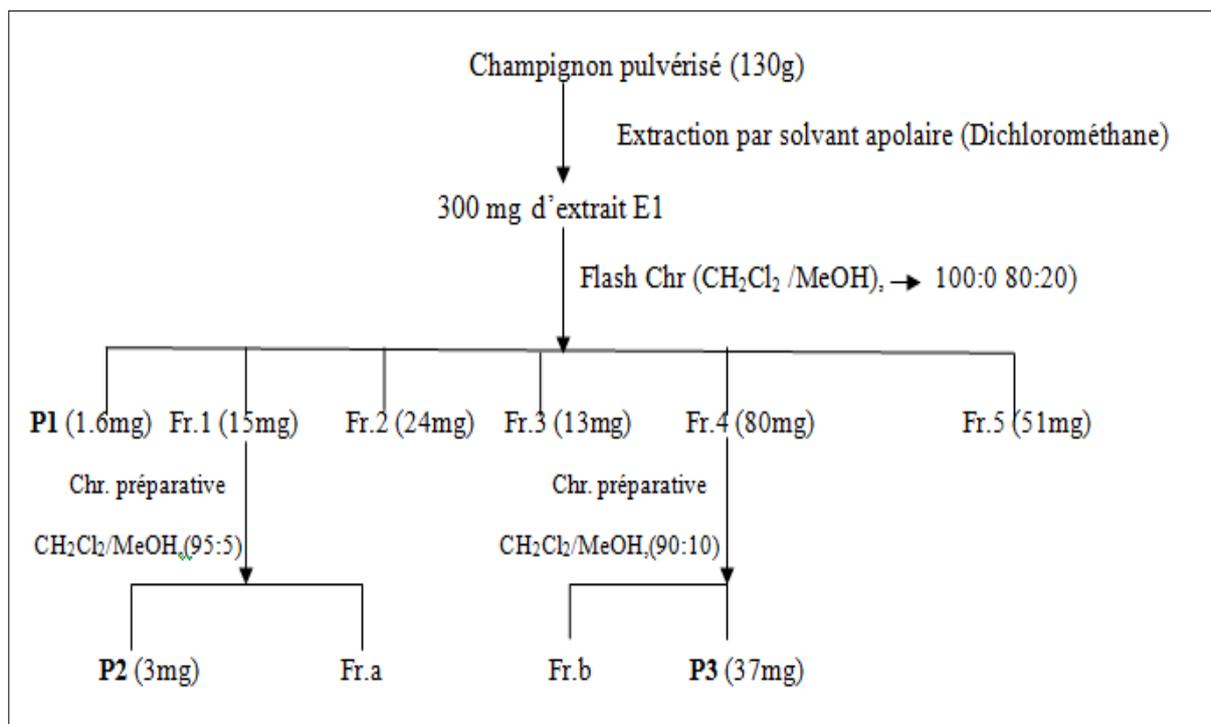


Figure 23. Schéma de purification de l'extrait E1

Nous avons procédé à un fractionnement de 300mg d'extrait E1 en utilisant dans un premier temps la flash chromatographie, 386 fractions de 100 ml ont été collectées dont le contrôle par CCM nous a permis de les réunir en 14 fractions. Suite à une analyse par CCM de ces fractions sous UV à 254 et 365nm et révélées par le réactif de DragenDorff, seules 5 fractions (Fr.1 à Fr.5) ont été choisies en vue de poursuivre leur purification par chromatographie préparative sur plaque (voir figure 23).

Ce choix est dicté par l'apparition sur les plaques CCM de spots orangés révélés par le réactif de DragenDorff, indiquant la présence d'alcaloïdes dans ces fractions. Seuls les composés majoritaires ont été sélectionnés pour être séparés.

D'après les résultats mentionnés dans la figure 23, trois produits ont été isolés : le premier P1 est issu directement à partir de la première purification (Flash Chr), alors que les deux autres produits P2 et P3 proviennent de la deuxième purification (Chr. Préparative) à partir des fractions Fr.1 et Fr.4 respectivement. Il est à noter que nous avons également réalisé des purifications par chromatographie préparative sur les fractions Fr.2, Fr.3, Fr.5, Fr.a et Fr.b sans pouvoir isoler un produit bien déterminé car à chaque fois on obtient un mélange de produits de faible quantité et difficile à séparer.

1.3.2. Purification de l'extrait E2

Les deux méthodes chromatographiques utilisées précédemment ont également servi à la purification de l'extrait E2. En partant de 500 mg d'extrait E2. Seuls les 2 produits P3 et P4 provenant de la fraction Fr.a2 ont pu être isolés (fig 24), Il est utile de souligner que le composé P3 isolé ici est le même que celui qui a été isolé de l'extrait E1. Les fractions Fr2, Fr. b et Fr. a1, bien qu'ayant également subies une chromatographie préparative n'ont pas permis d'obtenir à des produits purs.

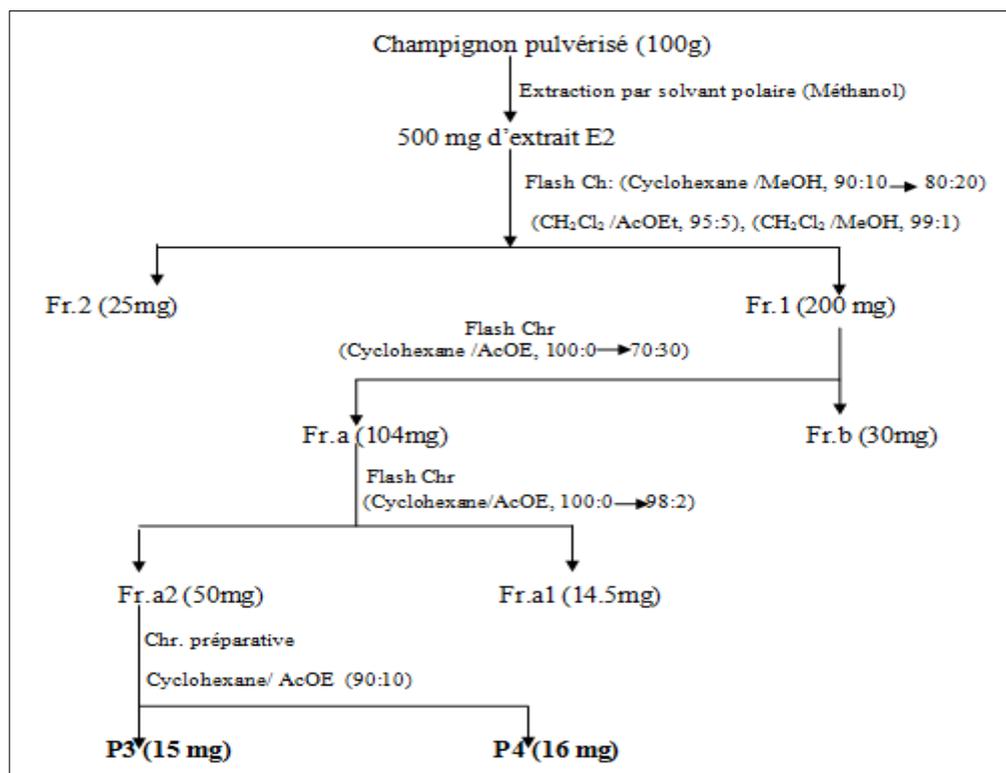


Figure 24. Schéma de purification de l'extrait E2

1.4. Identifications

Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton¹H et du carbone ¹³C à une dimension, de spectrométrie de masse et par comparaison avec les données de la littérature.

1.4.1. Détermination structurale des produits P1 et P2

Rappelons que P1 (1.6mg) et P2 (3mg), sont issus de l'extrait E1 (voir figure 23). Sachant que le composé P3 a été isolé des 2 extrais E1 et E2, son analyse structurale sera exposée ultérieurement avec le composé P4.

L'examen des spectres RMN ^1H enregistré dans DMSO- d_6 à 500 MHz des 2 composés P1 et P2 montre des pics avec des déplacements chimiques dans l'intervalle (7,06 - 7,61 ppm) correspondant à des noyaux aromatiques de nature alcaloïdique. Malheureusement, la structure du composé P1 n'a pas pu être identifiée en raison de son impureté comme le montrent les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C (annexe 4), en plus de sa faible quantité (1.6mg) qui fut pour nous un facteur limitant de sa purification.

Quant au produit P2, sa structure a été identifiée par LC-MS et confirmée par l'analyse spectrale RMN ^1H et RMN ^{13}C comme étant la N-acétyltryptamine (fig 25).

L'authenticité du composé était confirmée par comparaison avec un échantillon synthétique (fig 26).

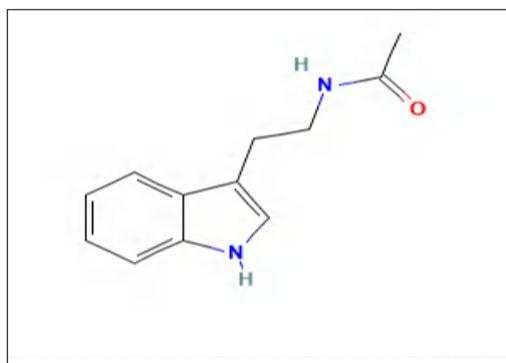


Figure 25. La structure du N-acétyltryptamine

L'étude du spectre RMN ^1H de la N-acétyltryptamine isolé du champignon *P.eryngi* a montré la présence des signaux suivants (fig27) :

- Le signal singulet apparaissent au $\delta=1,53$ ppm, d'intégration 3H attribué au 3H de COCH₃ aliphatique.
- Le triplet d'intégration 2H à $\delta = 2,99$ ppm indique les protons de N-CH₂.
- Le multiplet d'intégration 2H à $\delta=3,61$ ppm est attribué à l'indolyl-CH₂ de l'alcaloïde.
- Le singulet au $\delta = 5,3$ ppm d'intégration 1H représente ainsi le proton de l'amide (-NH).
- Les protons aromatiques du noyau indolique sont observés sous forme de signaux multiples d'intégration 5H aux déplacements chimiques $\delta= 7,06 - 7,61$ ppm.
- Un singulet avec un déplacement de $\delta =8,05$ ppm d'intégration 1H, correspond à 1H, -NH du noyau indole.

L'analyse spectrale de notre composé en RMN ^{13}C a révélé la présence de 12 atomes de carbones au total (fig 28) :

- Les deux signaux assignés aux carbones des groupements CH₂ correspondant au N-CH₂ aliphatique et l'indolyl -CH₂ sont observés aux $\delta = 23,60$ et $25,45$ ppm respectivement.
- un pic caractéristique du carbone de CH3CO est indiqué au $\delta = 39,95$ ppm.
- Les pics des huit carbones aromatiques apparaissent dans l'intervalle 111,39 et 122,46 ppm.
- Le pic dont le déplacement chimique est de $\delta = 171$ ppm correspond au carbone du CH3CO.

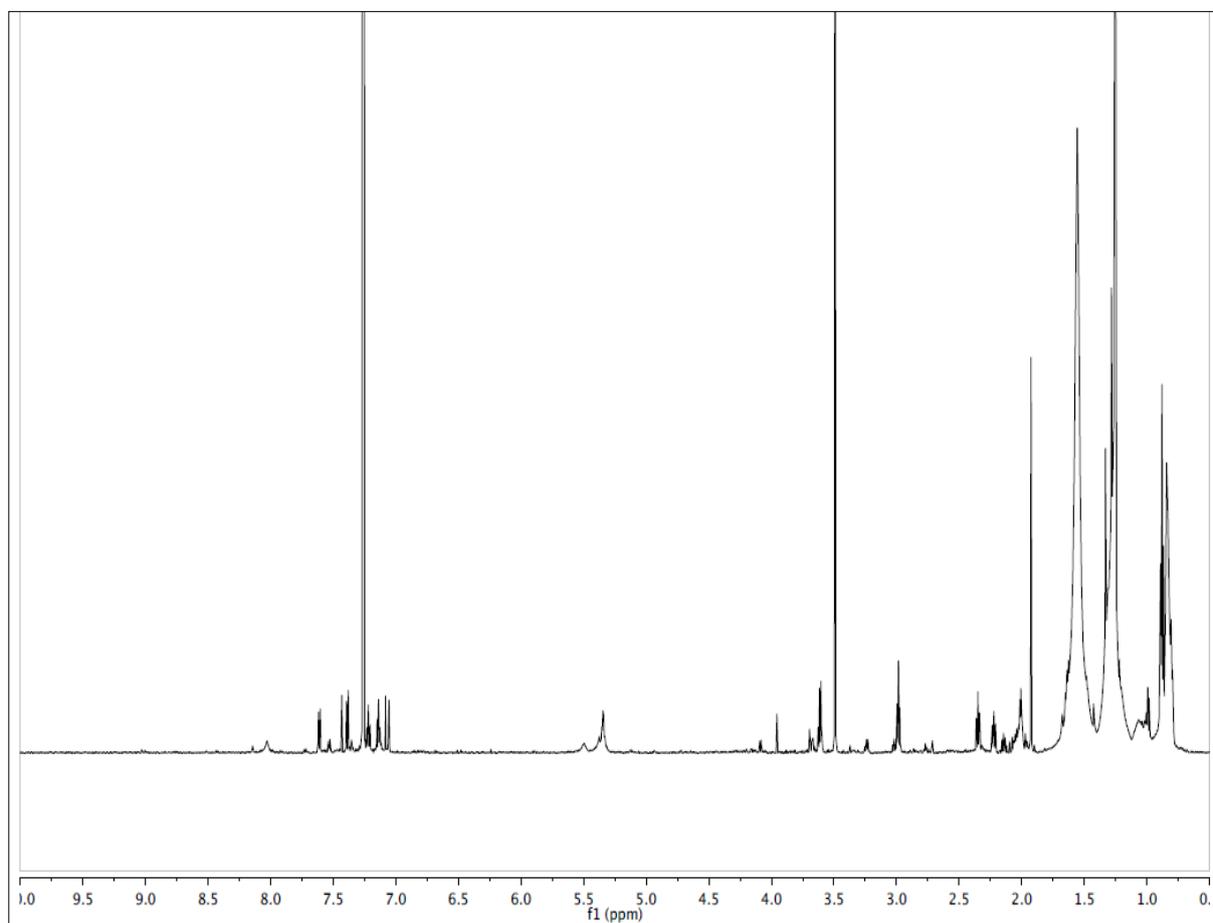


Figure 26 : Spectre RMN ¹H d'un échantillon synthétique du N-acétyltryptamine (DMSO-d₆, 200 MHz)

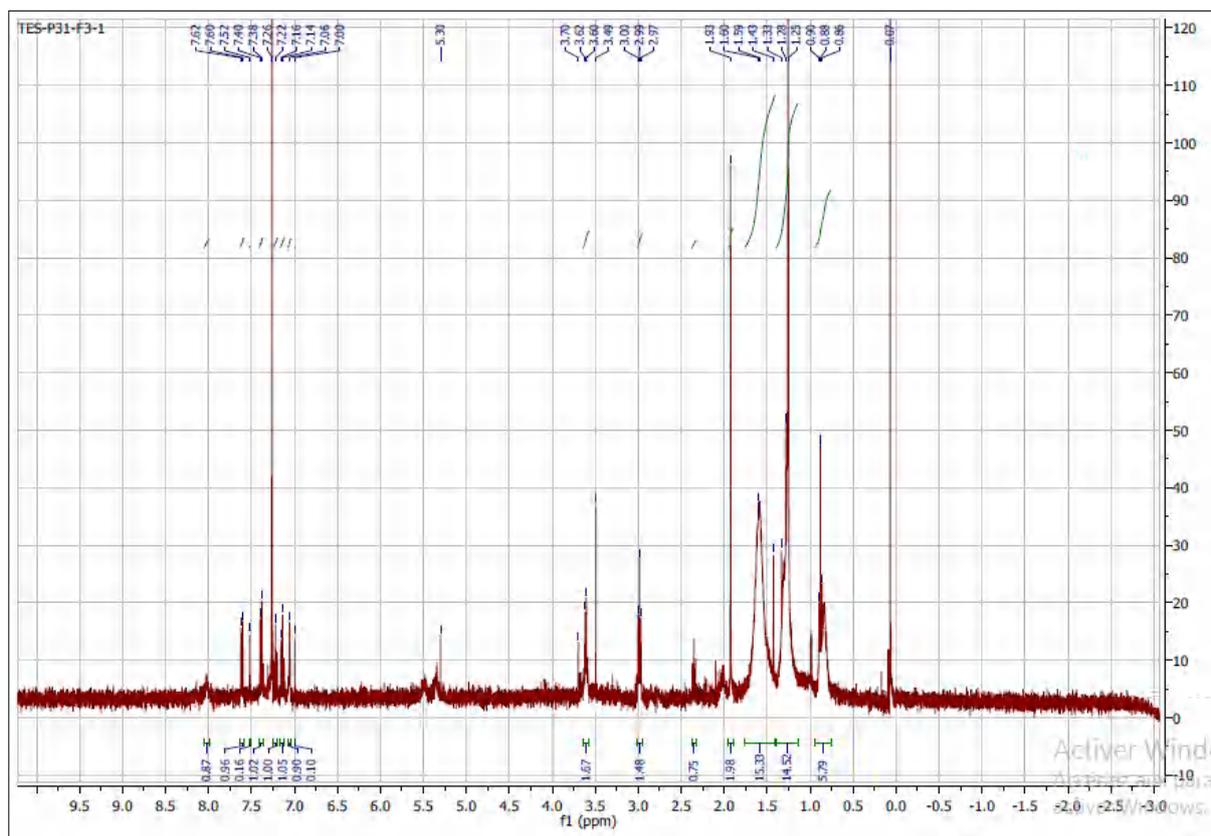


Figure 27 : Spectre RMN ^1H du produit P2 (DMSO-d_6 , 500 MHz)

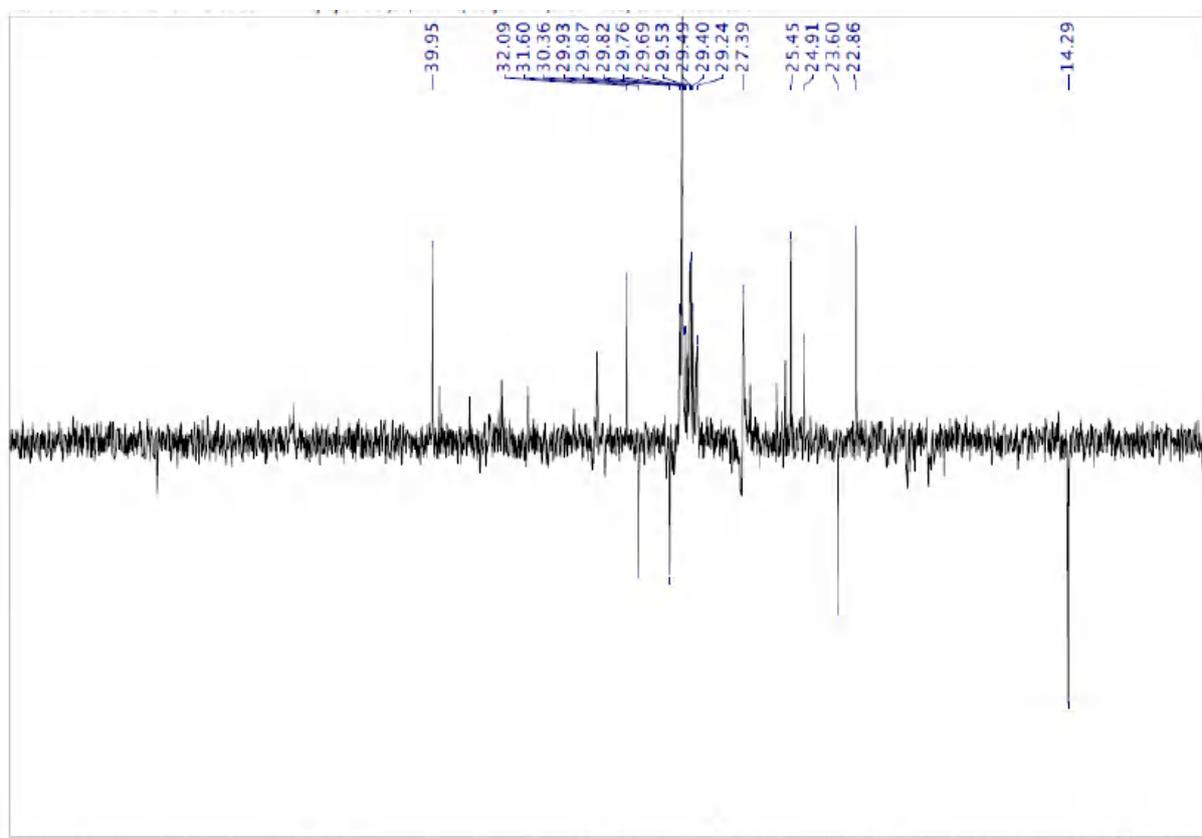


Figure 28 : Spectre RMN ^{13}C du produit P2 (DMSO-d_6 , 500 MHz)

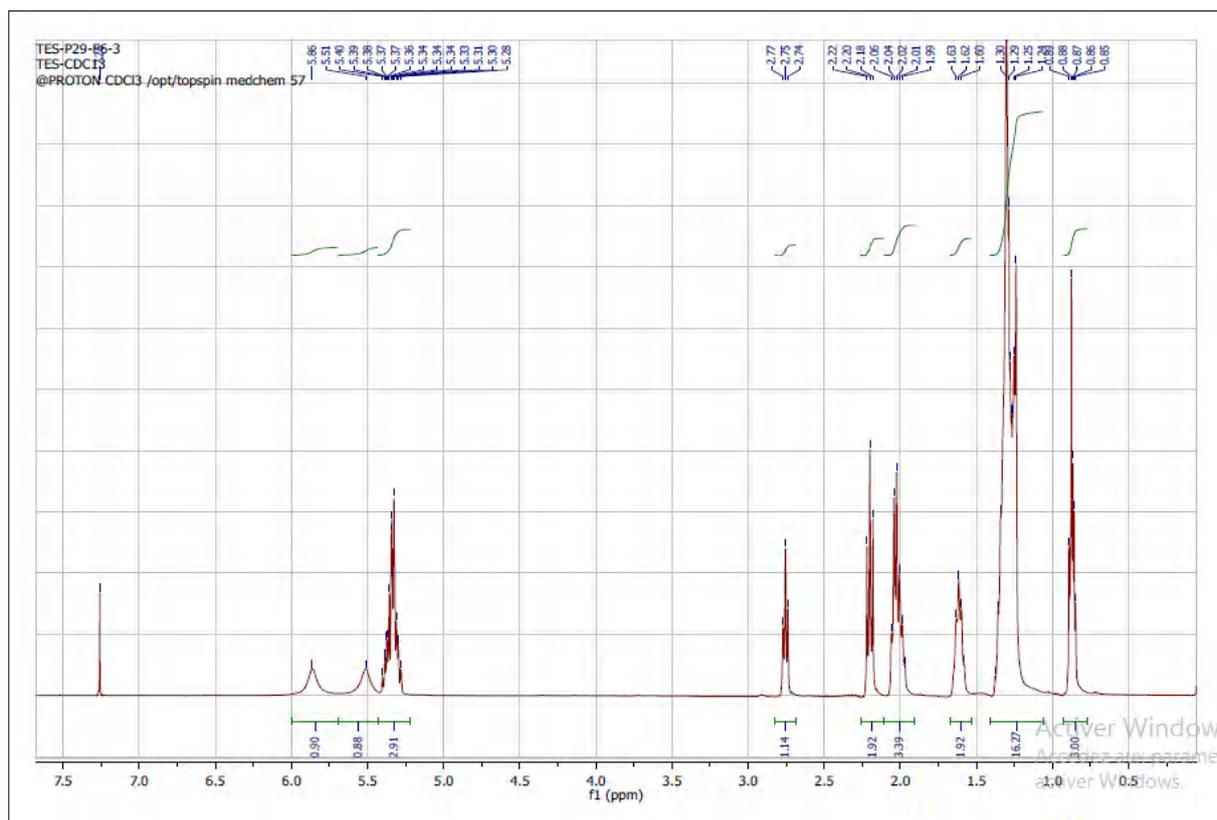
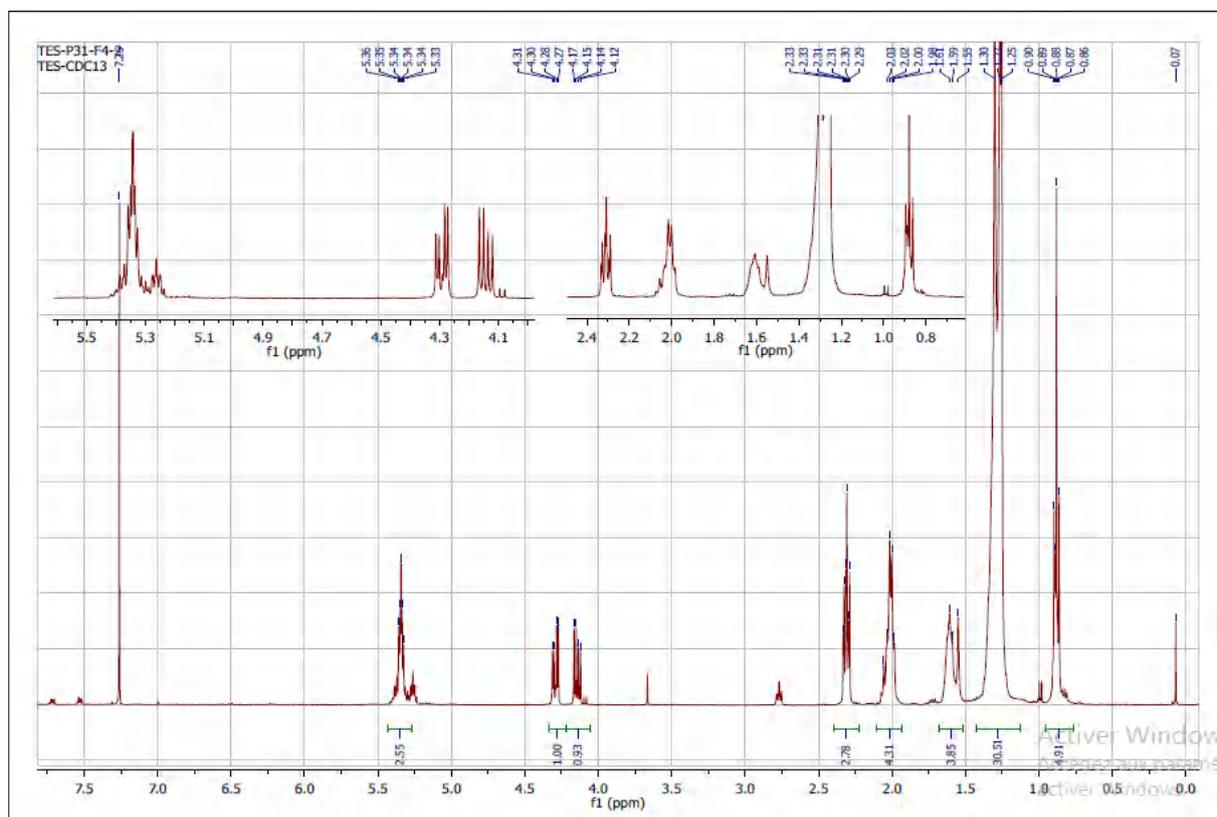
A notre connaissance, une telle étude sur l'extraction des alcaloïdes du champignon *Pleurotus eryngii* et l'isolement du N-acétyl tryptamine n'a jamais été rapportée auparavant. Sachant que la N-acétyltryptamine a été isolée pour la première fois à partir de la plante *Prosopis nigra* récolté en Argentine (Gloria et al., 1975). En plus de la source naturelle de N-acétyltryptamine, ce dernier est un produit qui peut être synthétisé à partir du Tryptophane (Backlund et al., 2017).

Le N- acétyltryptamine est un analogue structural de l'hormone de sommeil : la mélatonine : 5-méthoxy N acétyltryptamine. Alors que des milliers de publications au cours du dernier demi-siècle se sont concentrées sur la mélatonine et le rôle qu'elle joue en tant que signal de sortie hormonal du système circadien (Wood & Loudon, 2014), la N-acétyltryptamine a reçu beaucoup moins d'attention. Ceci est surprenant car il est connu depuis des décennies à partir d'études pharmacologiques que la N-acétyltryptamine est un agoniste-antagoniste mixte des récepteurs de la mélatonine, bien qu'avec une affinité beaucoup plus faible que la mélatonine (Backlund et al., 2017).

1.4.2. Détermination structurale des produits P3 et P4

A partir des purifications réalisées sur l'extrait E2 nous avons isolé les deux produits P3 et P4 (voir figure 24), tout en sachant que le produit P3 a également été isolé de l'extrait E1. Une grande similitude est observée par comparaison des spectres de RMN ^1H des produits P3 et P4 (Figure 29 et 30). L'étude du spectre RMN ^1H du P4 a montré diverses régions spectrales qui contiennent les signaux des hydrogènes correspondants :

- $\delta = 5,3 - 5,4$ ppm désignent les hydrogènes éthyléniques.
- $\delta = 5,2$ ppm : hydrogènes du motif glycérique en (H- β).
- $\delta = 4,1 - 4,3$ ppm : hydrogènes du motif glycérique du carbonyle de la position (H- α) et (H- γ).
- $\delta = 2,7-2,8$ ppm : hydrogènes bis-allyliques.
- $\delta = 2,3$ ppm : hydrogènes en position α du carbonyle.
- $\delta = 2,0$ ppm : hydrogènes allyliques.
- $\delta = 1,6$ ppm : hydrogènes en position β du carbonyle.
- $\delta = 1,2-1,4$ ppm : hydrogènes aliphatiques.
- $\delta = 0,8-0,9$ ppm : hydrogènes des méthyles.

Figure 29: Spectre RMN ^1H du produit P3 (DMSO- d_6 , 500 MHz)Figure 30: Spectre RMN ^1H du produit P4 (DMSO- d_6 , 500 MHz)

Rappelons que sur le spectre RMN ^1H du P4 (fig 30), on retrouve le massif à 4,1 - 4,3 ppm correspondant aux protons du motif triglycéride. L'aire de ces différents pics cités précédemment et la comparaison à la bibliographie (Vlahov, 1999) (fig 31), nous donnent des indications quant à la structure de la molécule qui correspond à un triglycéride (triacylglycérol) (fig 30). Sachant que les triglycérides sont des lipides indispensables à l'organisme, permettant le stockage des acides gras, ils constituent une réserve importante d'énergie. Les triglycérides peuvent provenir de l'alimentation mais peuvent également être synthétisés au sein de l'organisme.

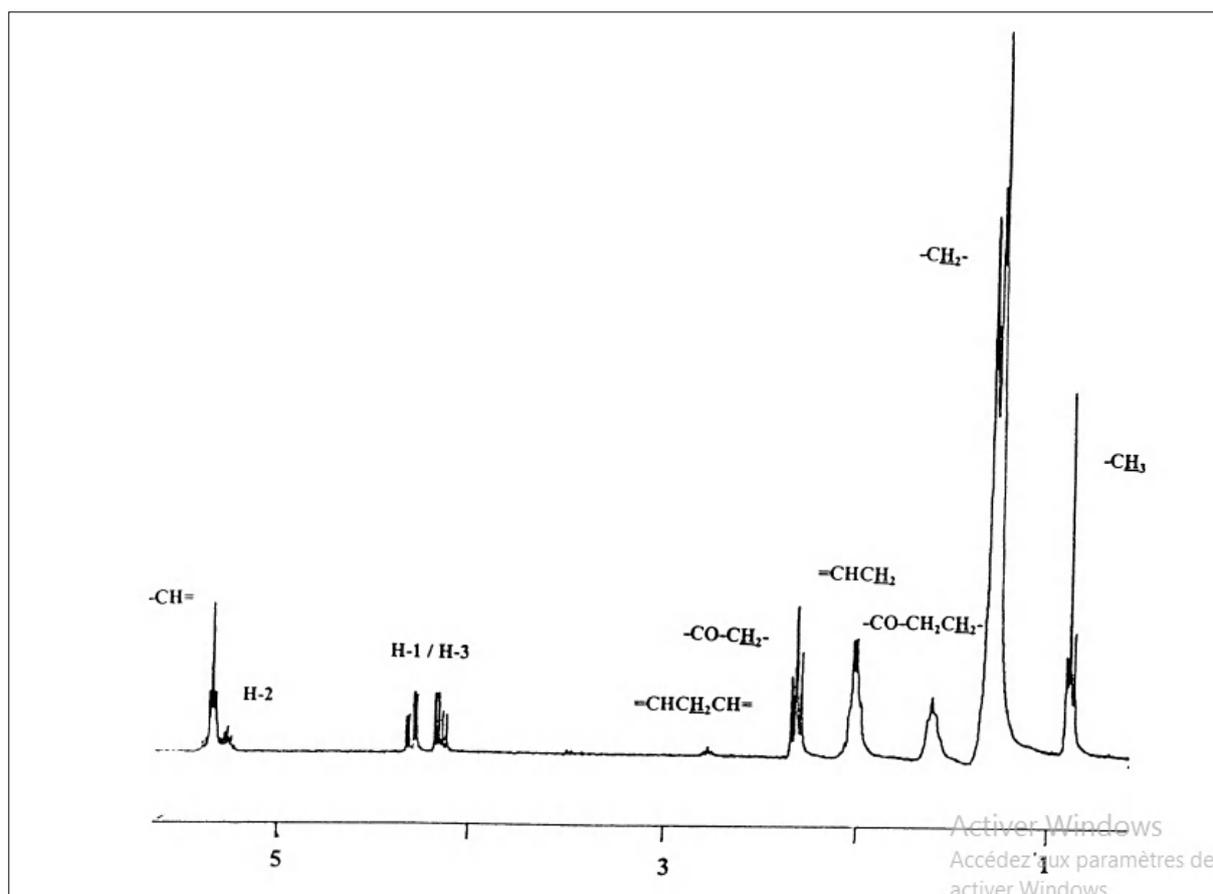


Figure 31: Spectre RMN ^1H (DMSO, 300 MHz) d'un triglycéride (Vlahov, 1999).

D'après la figure 31 les marqueurs H-1, H-2 et H-3 indiquent les résonances des noyaux de protons de la fraction glycérol, tandis que les résonances protoniques des chaînes acyles de triglycérides sont soulignées dans les fragments moléculaires auxquels les protons sont attachés.

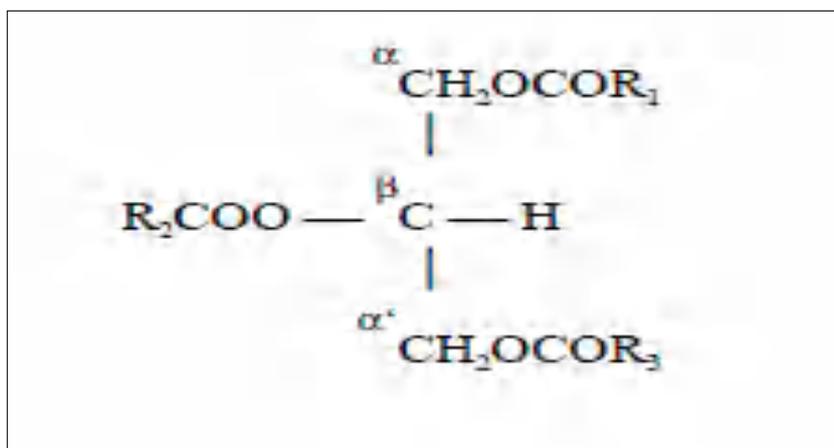


Figure 32: Formule chimique générale des triglycérides, R_1 , R_2 et R_3 sont des résidus d'acides gras

Néanmoins nous remarquons l'absence du massif à 4,1 - 4,3 ppm correspondant aux protons du motif triglycéride et les signaux situés en position $\delta = 5,2$ ppm désignant les hydrogènes du motif glycérique en position β , et nous observons l'apparition de deux signaux en position $\delta = 5,5$ ppm et $\delta = 5,9$ ppm désignant les protons de la fonction acide COOH par comparaison du spectre RMN ^1H du P3 (fig 29) avec celui du RMN ^1H du P4 (figure 30). En se basant sur ces données on peut conclure que la nature de P3 est un acide gras, et l'apparition de deux pics des protons de la fonction acide nous indique que c'est un mélange de deux acides gras, dont l'un est majoritaire et l'autre est minoritaire. Ces informations ont été confirmées par le spectre de masse (fig 33) qui montre deux pics, l'un majoritaire à $m/z = 280$ et l'autre minoritaire à $m/z = 282$ correspondant aux formules brutes respectives $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (acide linoléique) et $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (acide oléique) (fig 34).

Rappelons qu'une grande similitude est observée entre les spectres RMN ^1H des P3 (acide gras : acide linoléique) et P4 (triglycéride), cela nous permet de conclure que les trois groupes hydroxyle du glycérol sont estérifiés par le même acide gras qui est l'acide linoléique.

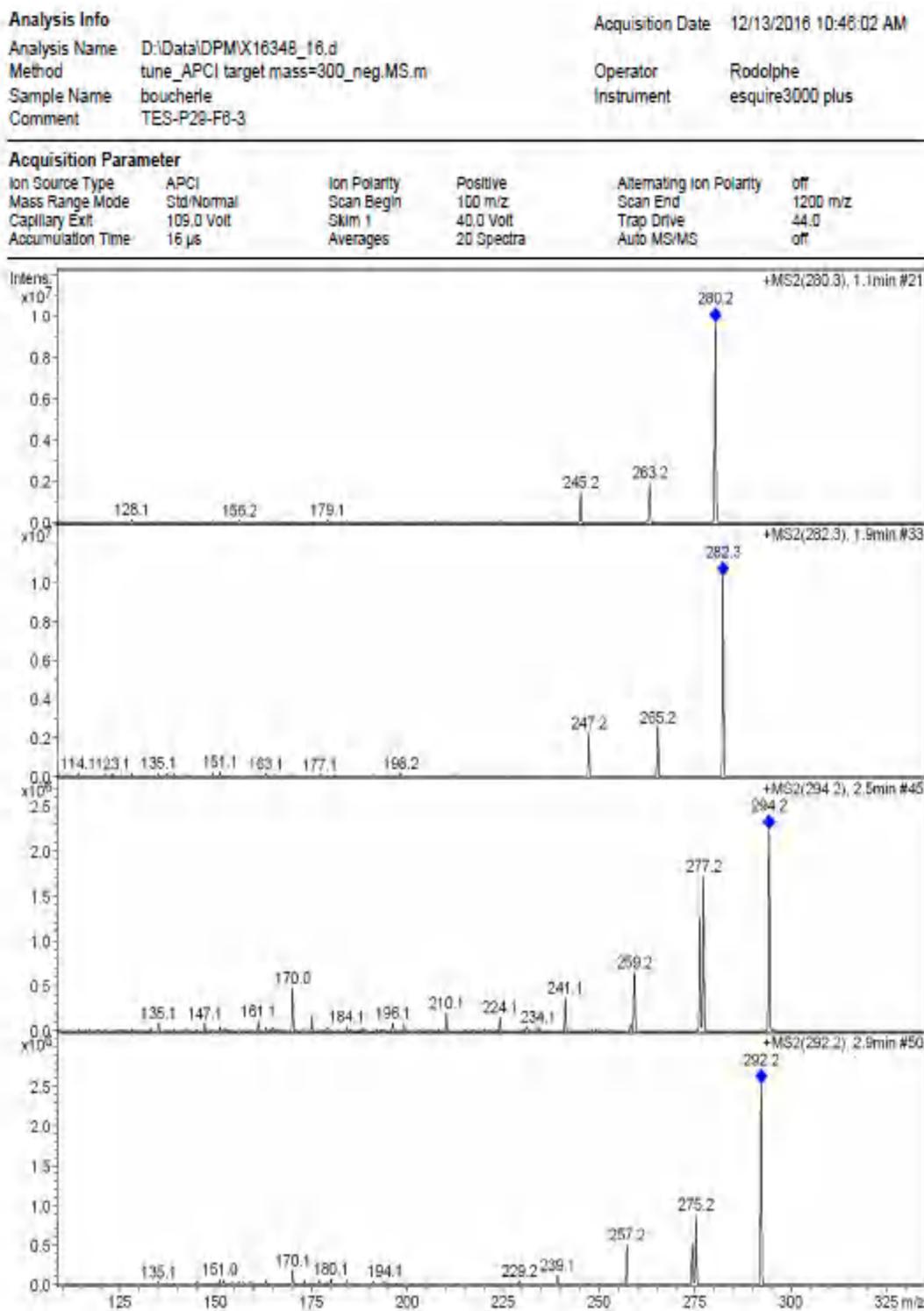


Figure 33: le spectre de masse de P3

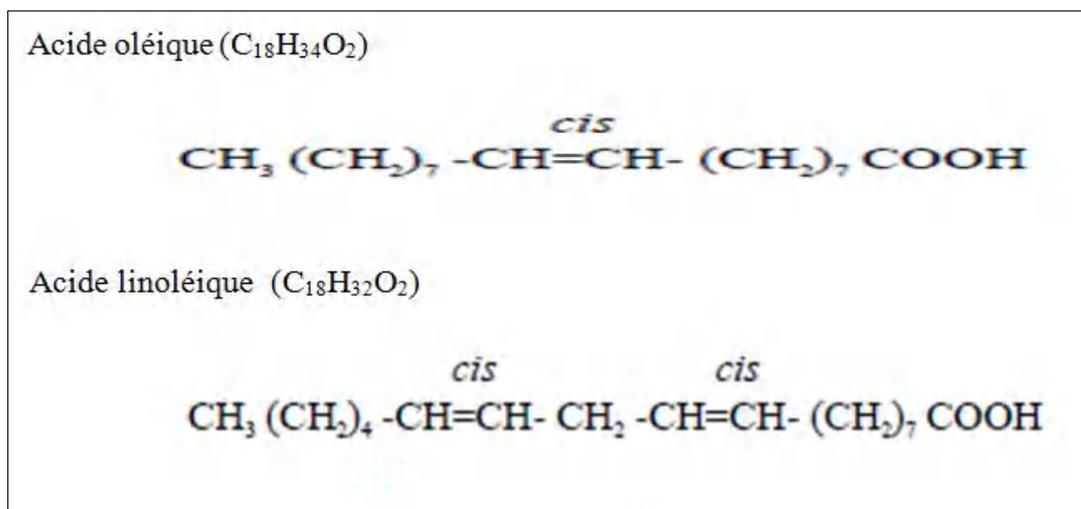


Figure 34: A : Structure de l'acide oléique et l'acide linoléique

La figure 34 représente les structures des acides oléiques et linoléique rencontrés dans le champignon *P. eryngii*. L'acide oléique est un acide gras monoinsaturé à une double liaison *cis* en 9^{ème} position (fig 34). La caractéristique principale de l'acide oléique est qu'il s'agit de l'acide insaturé le plus stable. Il fait partie de la série Omega 9 qui est très connu par ses bienfaits sur la santé (Ziar et *al.*, 2022). Il est principalement présent dans les huiles d'origine végétale telles que l'huile d'olive, l'huile d'avocat, l'huile de carthame, ou l'huile de canola. L'huile d'olive contient entre 61 et 83% d'acide oléique; ce pourcentage varie en fonction de la variété et du climat (Ag, 2002).

L'acide linoléique est un acide gras polyinsaturé présentant la particularité d'être le seul acide gras essentiel des oméga-6 (Ziar et *al.*, 2022), à deux liaisons éthyléniques situées sur les carbones 9 et 12 (fig 34). L'acide linoléique ne peut pas être synthétisé par l'organisme, on le trouve en grande quantité dans les huiles végétales, sa teneur moyenne varie d'une huile à une autre : 40 % dans l'huile de tournesol, 52 % dans l'huile de coton, 51 % dans l'huile de soja, 58 % dans l'huile de maïs, 41 % dans l'huile de sésame (Cuvelier et *al.*, 2004).

2. Activités biologiques

2.1. Evaluation de l'effet anticholinestérasique des d'extraits alcaloïdiques E1 et E2 et du composé N-acétyltryptamine

2.1.1. Effet sur l'acétylcholinestérase

les inhibiteurs de l'AChE font partie des médicaments clés approuvés par l'agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux (US-FDA) pour la prise en charge de la maladie d'Alzheimer (MA) (Hampel et *al.*, 2018). Dans ce contexte, les produits naturels d'origine alimentaire renouvellent leur intérêt contre la MA (Ahmed et *al.*, 2021). Dans notre travail il nous a semblé judicieux d'évaluer l'activité inhibitrice des extraits E1 et E2, et du composé N-acétyltryptamine (NAT) envers l'AChE, en comparaison avec celle de la galantamine utilisée ici comme standard.

Selon Delogu G.L. et *al* (2016), tout composé dont le pourcentage d'inhibition à une concentration maximale n'atteint pas 50% est considéré comme inactif.

L'activité inhibitrice des deux extraits E1 et E2 et NAT a d'abord été testée par leur pourcentage d'inhibition à sept concentrations différentes allant de 3 à 200 $\mu\text{g/mL}$ (Tableau 5).

Tableau 5. Pourcentage d'Inhibition de l'acétylcholinestérase par les deux extraits E1 et E2 et le NAT

| Produits | Concentration en $\mu\text{g/mL}$ | | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| | Inhibition % | | | | | | |
| E1 | NA | NA | 42,04 \pm 0,43 | 64,20 \pm 1,89 | 65,00 \pm 1,87 | 83,59 \pm 0,73 | 86,27 \pm 3,73 |
| E2 | NA | 23,27 \pm 0,86 | 28,80 \pm 3,87 | 58,12 \pm 0,82 | 63,61 \pm 1,13 | 74,16 \pm 2,37 | 87,04 \pm 1,23 |
| NAT | 6,81 \pm 3,04 | 28,63 \pm 3,05 | 30,59 \pm 0,98 | 53,90 \pm 1,31 | 67,65 \pm 1,86 | 77,86 \pm 1,96 | 85,03 \pm 1,81 |
| Galantamine | 35,93 \pm 2,28 | 43,77 \pm 0,00 | 68,50 \pm 0,31 | 80,69 \pm 0,41 | 85,78 \pm 1,63 | 91,80 \pm 0,20 | 94,77 \pm 0,34 |

NA: pas d'absorbance

Il ressort du tableau 5 que l'activité inhibitrice de E1 et E2 et du NAT devient effective à partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ où le pourcentage d'inhibition dépasse la barre de 50 % et va en augmentant avec la concentration pour atteindre dans les 3 cas une moyenne de 85 % à la concentration maximale utilisée dans ce travail qui est de 200 $\mu\text{g/mL}$. Obtenir un même pourcentage d'inhibition dans les 3 cas à cette concentration signifie probablement que l'activité inhibitrice de E1 et E2 revient essentiellement à la présence du composé NAT dans

ces 2 extraits. Il faut également souligner que de par ce même pourcentage d'inhibition, l'activité inhibitrice de E1 et E2 et du NAT se révèle très proche celle la galantamine qui affiche à cette concentration maximale de 200 $\mu\text{g/mL}$ un pourcentage d'inhibition voir fin 95%.

Sur la base du pourcentage d'inhibition, la concentration qui inhibe 50 % de l'AChE (IC_{50}) a été calculée à partir des pourcentages d'inhibition (tableau 6).

Tableau 6. Valeurs des IC_{50} de la galantamine des deux extraits E1 et E2 et du NAT

| | E1 | E2 | NAT | Galantamine |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| $\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL})$ | 15.79 ± 1.21 | 21.43 ± 0.38 | 23.32 ± 1.04 | 6.27 ± 1.15 |

Le tableau ci-dessus montre que les valeurs de IC_{50} de E1, E2, et NAT, bien que plus élevées que l' IC_{50} de la galantamine qui dispose d'un fort pouvoir inhibiteur, témoignent de l'existence d'un potentiel inhibiteur plus modéré à l'égard de l'AChE.

Il ressort également que E1 est plus actif que E2 qui est lui-même plus actif que NAT. Sachant que les 2 extraits E1 et E2 sont issus des protocoles d'extractions spécifiques des alcaloïdes, on peut alors supposer que leur activité inhibitrice envers l'enzyme AChE est probablement due à une présence importante de molécules alcaloïdiques dans ces extraits.

Concernant le NAT il est utile de rappeler qu'il a été isolé de l'extrait E1 et présente par conséquent un effet inhibiteur relativement plus faible. Ceci nous amène à conclure que d'autres molécules de nature alcaloïdiques agissant en synergie avec le NAT seraient responsables du pouvoir inhibiteur relativement plus élevé de l'extrait E1.

2.1.2. Butyrylcholinestérase

L'activité inhibitrice des extraits E1 et E2, et le NAT a aussi été testée à l'égard de la Butyrylcholinestérase (BChE). Comme pour l'AChE, le test à l'égard de la BChE a également été réalisé à 7 concentrations différentes (tableau 7).

Tableau 7. Inhibition de la butyrylcholinestérase par les deux extraits E1 et E2 et le NAT

| Produits | Concentration en µg/mL | | | | | | | IC ₅₀ µg/mL |
|-------------|------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| | 3.125 | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 | |
| | Inhibition% | | | | | | | |
| E1 | NA | NA | NA | 36,94± 1,07 | 57,34± 0,60 | 70,19± 1,18 | 73,19± 1,34 | 47,76±0,64 |
| E2 | NA | NA | NA | NA | 17,84± 4,24 | 23,55± 2,36 | 47,67± 0,31 | ND |
| NAT | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 31,89±4,40 | ND |
| Galantamine | 3,26± 0,62 | 6,93± 0,62 | 24,03± 2,94 | 45,13± 2,60 | 63,87± 2,85 | 73,57± 0,77 | 78,95± 0,58 | 34.75±1.99 |

NA: pas d'absorbance

Les résultats montrent que l'extrait E2 et le NAT avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 47,67± 0,31 et 31,89±4,40%, tous 2 inférieurs à 50% à la concentration la plus élevée (200 µg/mL) sont totalement inactifs à l'égard de la BChE.

En revanche, l'extrait E1 induit une forte activité anticholinestérasique, à l'encontre de cette enzyme, qui commence à apparaître nettement à partir de la concentration de 50 µg/mL où le pourcentage de l'inhibition enregistre une valeur supérieure à 50% équivalente à 57,34± 0,60%. Cette valeur s'élève au fur et à mesure que la concentration augmente pour arriver à 73,19± 1,34% à la concentration maximale de 200 µg/mL, valeur qui se rapproche fortement de celle de la galantamine qui affiche à cette même concentration 78,95± 0,58% d'inhibition. Ceci témoigne que l'extrait E1 dispose d'un fort et même pouvoir inhibiteur que la galantamine, dû à la présence de molécules alcaloïdiques autre que le NAT qui lui rappelons-le, est totalement inactif à l'encontre de la BChE.

2.1.3. Étude *in silico*

2.1.3.1. Etude des modes d'interaction du NAT et de la galantamine avec le site actif de l'AChE

L'étude *in silico* par docking moléculaire a été réalisée afin de prédire les modes de liaison de la N-acétyltryptamine et de la galantamine avec le site actif de l'AChE. A cet effet nous avons utilisé le programme GOLD version 5.2.2.

Cette méthode a généré un score de 57.02 pour la galantamine légèrement plus élevé que celui de la NAT qui n'atteint que 51.64. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec les données expérimentales *in vitro* de l'activité inhibitrice de la galantamine à l'égard de l'AChE que enregistre un IC_{50} de 6.27 ± 1.15 $\mu\text{g/mL}$ contre un IC_{50} plus élevé allant jusqu'à 23.32 ± 1.04 $\mu\text{g/mL}$ pour le NAT (tableau 8).

Tableau 8. Evaluation *in vitro* et *in silico* de l'activité inhibitrice du NAT et de la galantamine à l'égard de l'AChE

| Composés | AChE IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Gold score AChE |
|-------------|--|--------------------|
| NAT | 23.32 ± 1.04 | 51.64 |
| Galantamine | 6.27 ± 1.15 | 57.02 |

Cette différence d'activité entre les deux composés peut être expliquée par prédiction de leur mode de positionnement dans la cavité catalytique de l'enzyme AChE (fig 35). En effet, la galantamine se distingue par une forte activité anticholinestérasique en étant bien enfouie dans le site catalytique ou CAS (bleue) de l'AChE (Mokrani et *al.*, 2019) et ce contrairement au NAT qui lui est principalement situé dans le site périphérique ou PAS (en rouge) de l'enzyme.

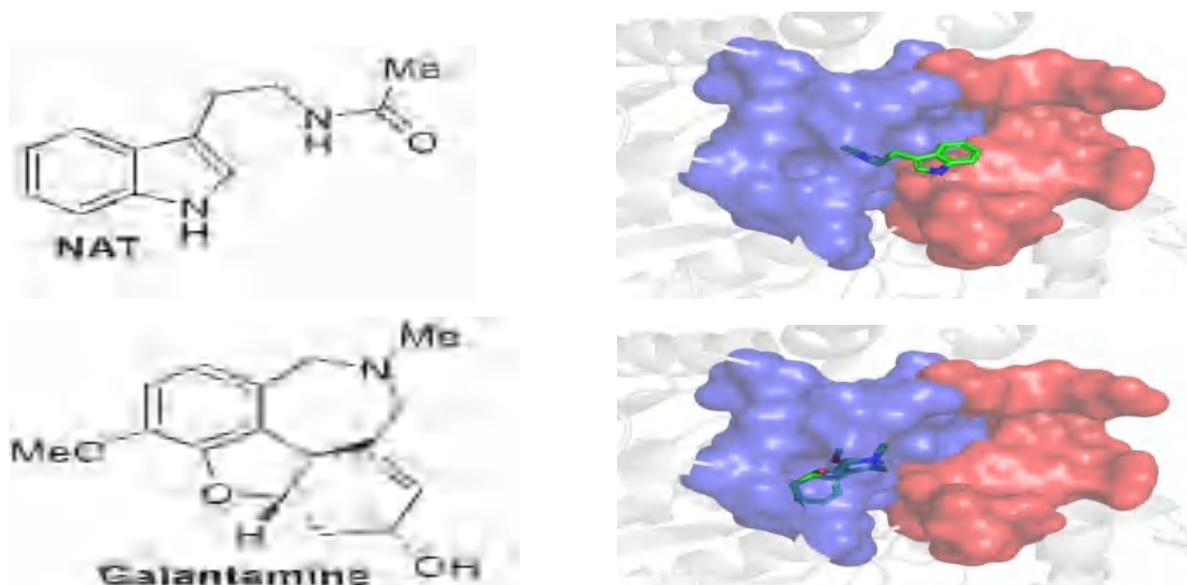
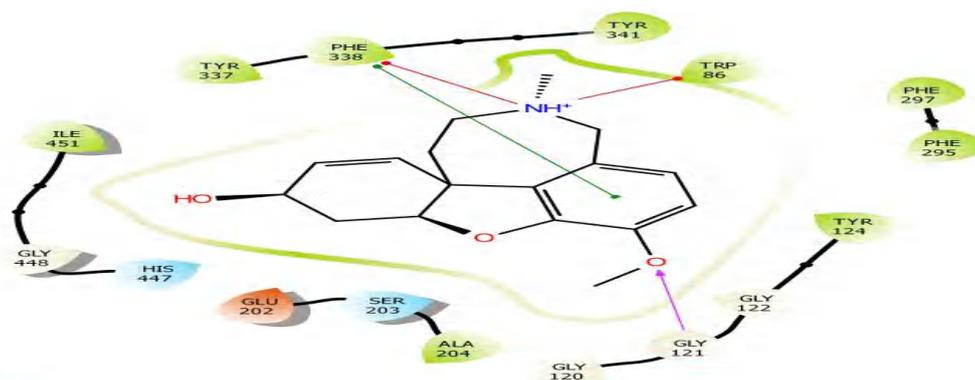


Figure 35. Modes de positionnement de NAT et de la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Le CAS est représenté en mode surface bleue et le PAS en mode surface rouge.

La représentation graphique 2D de ces 2 modes de positionnement permet de mieux appréhender cette différence d'activité en mettant en exergue le nombre et la nature de liaisons ainsi que les résidus d'acides aminés qu'implique chaque molécule dans la cavité catalytique de AChE (fig 36).

Galantamine



NAT

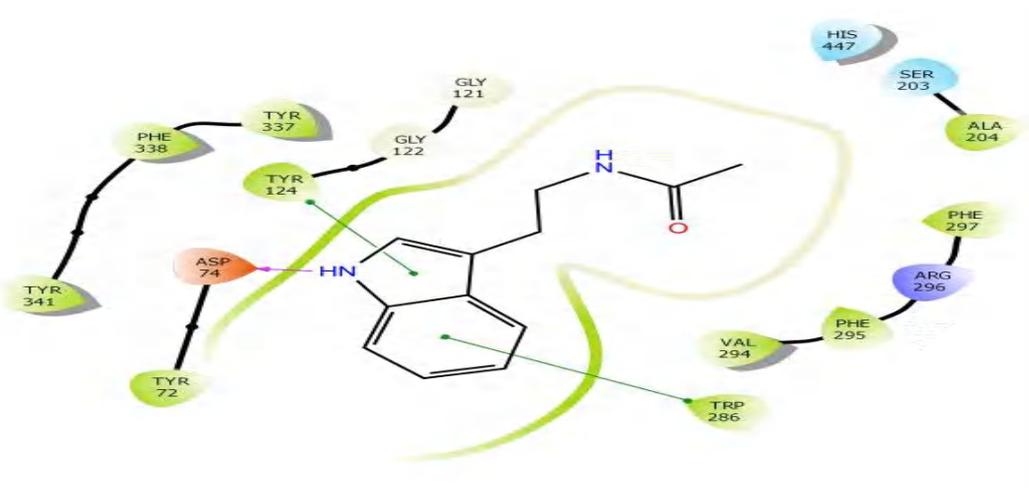


Figure 36. Mode d'interaction de NAT et la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Les liaisons hydrogène sont représentées en mauve, les interactions π -cation en rouge, les interactions π - π en vert.

Suivant la nature des résidus d'acides aminés impliqués dans l'activité inhibitrice du NAT et de la galantamine, nous avons pu déterminer l'appartenance des différentes interactions engendrées par ces 2 composés, à l'un ou l'autre des 2 sites PAS ou CAS de l'enzyme, que nous avons regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 9. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AChE par la galantamine et le NAT.

| Cavité catalytique | Type d'interactions | Nombre d'interactions | | Résidus d'AA |
|--------------------|---------------------|-----------------------|-----|------------------|
| | | galantamine | NAT | - |
| CAS | π - π | 1 | 0 | Phe338 |
| | π -cation | 2 | 0 | Trp86 Phe338 |
| | hydrogène | 1 | 0 | Gly121 |
| | Total 1 | 4 | 0 | - |
| PAS | π - π | 0 | 2 | Tyr124 Trp286 |
| | π -cation | 0 | 0 | |
| | hydrogène | 0 | 1 | Asp74 |
| | Total 2 | 0 | 3 | - |
| CAS + PAS | T1+T2 | 4 | 3 | - |

D'emblée, il ressort que la galantamine établit dans le CAS quatre interactions dont deux de type π -cation avec les résidus Trp86 et Phe338 via son groupement aminium, une de type π - π avec le résidu Phe338 et une autre de type hydrogène avec le résidu Gly121. A ce titre, il est important de rappeler que le résidu Trp86 appartient à la poche anionique du site actif qui contribue à la fixation de l'acétylcholine (Ordentlich, et *al.*, 2004 ; Kwasnieski, 2010) et que les deux résidus Phe338 et Gly121 sont respectivement responsables de la sélectivité et de la réactivité de l'AChE (Vagedes, et *al.*, 2000; Colletier, et *al.*, 2006).

En revanche le NAT ne forme aucune interaction avec le site catalytique (CAS), mais engage trois interactions au niveau du PAS dont deux de type π - π avec les résidus Tyr124 et Trp286, et l'autre de type hydrogène avec le résidu Asp74.

2.1.3.2. Prédiction des propriétés ADMET

Suite aux résultats des tests *in vitro* du tableau 8, montrant les potentialités inhibitrices prometteuses du NAT, il nous a semblé judicieux d'approfondir cette étude par une analyse *in silico* prédictive de ses propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques ainsi que sa toxicité potentielle. En effet un bon candidat médicament doit être, non seulement actif, mais

aussi capable d'atteindre sa cible dans l'organisme avec la concentration nécessaire pour assurer la fonction biologique escomptée sans effets toxiques.

a/ Propriétés physicochimiques

en utilisant le serveur SwisseADME sur (<http://www.swissadme>) (Daina et al., 2017), nous avons pu prédire les paramètres physicochimiques du NAT en comparaison avec ceux de la galantamine.

Les propriétés physico-chimiques du NAT et de la galantamine ont été évaluées conformément aux règles de Lipinski et de Veber (tableau 10).

Tableau 10. Prédiction des propriétés physico-chimiques du NAT et de la galantamine

| Composés | Formules | Propriétés physico-chimiques | | | | | | | | |
|-------------|--|------------------------------|-----|-----|-------|------|-------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|
| | | PM (g/mol) | nLF | nON | nOHNH | LogP | Règle de Lipinski | Règle de Veber | Solubilité dans l'eau | Accessibilité à la synthèse |
| NAT | C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O | 202.25 | 4 | 1 | 2 | 1.72 | conforme | conforme | moyenne | 1.51 |
| Galantamine | C ₁₇ H ₂₁ NO ₃ | 287.35 | 1 | 4 | 1 | 1.91 | conforme | conforme | moyenne | 4.57 |

Comme le montre ce tableau, le NAT comme la galantamine est parfaitement conforme à la règle de Lipinski (Lipinski et al., 1997). Cette règle a pour but de nous renseigner sur la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D), s'il respecte au moins 3 des 5 critères suivants :

- Le poids moléculaire (PM) doit être inférieur ou égal à 500 Da.
- Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / n-octanol, noté logP, doit être compris entre -2 et 5.
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène (nOHNO) doit être inférieur ou égal à 5.
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (nON) doit être inférieur ou égal à 10.

Il ressort également de ce tableau que le composé NAT répond favorablement à la règle de Veber (Veber et al., 2002) qui complète celle de Lipinski par les deux critères suivants :

- L'aire de surface polaire (TPSA) doit être inférieure ou égale à 140 Å² (NAT : 44.89 Å² et galantamine : 41.93 Å²).
- Le nombre de liaisons flexibles (nLF) doit être inférieur ou égal à 15.

En revanche, le NAT comme la galantamine répond par une moyenne solubilité dans l'eau. La solubilité dans l'eau est l'un des paramètres importants dont doit disposer un candidat-médicament pour atteindre sa cible avec la concentration souhaitée (Savjani et *al* 2012). Concernant leur synthèse celle-ci semble être plus facile à mettre en œuvre comme en témoignent leurs faibles valeurs qui sont dans les deux cas inférieures à 5 sur l'échelle d'accessibilité à la synthèse qui indique que la difficulté de synthèse va crescendo de la valeur 1 à 10 (Daina et *al* 2017).

b/ Propriétés pharmacocinétiques

Le serveur ADMETlab 2.0 a été utilisé pour prédire les propriétés pharmacocinétiques du NAT et de la galantamine, notamment en ce qui concerne l'absorption intestinale (AGI), la perméabilité hémato-encéphalique (PHE) et l'inhibition du cytochrome P450 (tableau 11). Il s'agit d'une étude complémentaire de l'analyse précédente permettant de vérifier si le NAT peut être effectivement être considéré comme un inhibiteur potentiel de l'AcChE.

Tableau 11. Prédiction des propriétés pharmacocinétiques

| Composés | Propriétés pharmacocinétiques | | | | | | |
|-------------|-------------------------------|--------|-----------|------------|----------|----------|----------|
| | AGI | PHE | I- CYP1A2 | I -CYP2C19 | I-CYP2C9 | I-CYP2D6 | I-CYP3A4 |
| NAT | élevée | élevée | positive | négative | négative | négative | négative |
| Galantamine | élevée | élevée | négative | négative | négative | positive | négative |

AGI : Absorption Gastro-Intestinale; CYP : Cytochrome P450; PHE : Perméabilité Hémato-Encéphalique ;
I : inhibiteur

Il ressort du tableau que la perméabilité gastro-intestinale du NAT est autant élevée que celle de la galantamine témoignant d'un passage facile à travers la paroi intestinale pour arriver à la circulation générale. Sachant que l'absorption gastro-intestinale est l'un des paramètres qu'il est important de prédire car un bon candidat-médicament doit être capable de surmonter l'environnement gastrique acide et la sécrétion continue de mucus qui protège le tractus gastro-intestinal pour atteindre sa cible (Daina et *al.*, 2016).

La barrière hémato-encéphalique (PHE) est une barrière physique et métabolique isolant et protégeant le cerveau du reste de l'organisme. Elle intervient quotidiennement dans la régulation de l'homéostasie cérébrale. À cause de cette barrière, de nombreux médicaments

potentiels pour le traitement des maladies du système nerveux central, telle que la MA, ne peuvent pas atteindre leur lieu d'action avec des concentrations suffisantes (Wohlfart et *al.*, 2012). D'où l'intérêt de vérifier ce paramètre qui dans le cas du NAT montre, comme la galantamine une capacité élevée à franchir cette barrière.

Concernant les enzymes CYP (Cytochrome P450) celles-ci sont considérées comme l'une des familles d'enzymes les plus importantes car jouant un rôle important dans la biotransformation d'un grand nombre de médicaments. Elles existent sous plusieurs isoformes, dont les principaux qui sont impliqués dans le métabolisme de la plupart des médicaments sont : CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 et CYP3A4. Il à noter que les interactions médicamenteuses résultent de l'induction ou l'inhibition par des médicaments d'une ou de plusieurs enzymes du cytochrome P450. Cela entraîne une diminution du métabolisme des autres molécules métabolisées par les isoformes inhibés, d'en augmenter leurs concentrations plasmatiques, de prolonger leurs effets thérapeutiques et de déclencher éventuellement des effets indésirables voir même toxiques (Raunio et *al.*, 2015).

C'est pour cela que l'évaluation du potentiel d'un médicament candidat à inhiber ou à inactiver les enzymes du cytochrome P450 (CYP) demeure une partie importante dans le processus de découverte et de développement de médicament pharmaceutique (Nettlon & Einolf., 2011). Le tableau 11 montre que le NAT n'exerce aucune activité inhibitrice des CYP sauf dans le cas du CYP 1A2. Il en est de même pour la galantamine qui inhibe uniquement le CYP 2D6. À priori, cette inhibition ne semble pas avoir de conséquences fâcheuses sur le métabolisme des médicaments du fait que le CYP3A4 soit épargné car c'est par l'intermédiaire de ce dernier que sont notamment métabolisés au niveau du foie la plupart des médicaments chez l'homme. Son inhibition aurait pour conséquences un ralentissement de l'élimination du médicament avec une élévation de sa concentration plasmatique et un risque accru de survenue d'effets indésirables.

c/ Toxicité potentielle

Dans cette étude prédictive, divers aspects de la toxicité potentielle du NAT et de la galantamine ont été traités en utilisant le serveur ADMETlab 2.0 (tableau 12).

Tableau 12. Prédiction de la toxicité potentielle

| Composés | Toxicité potentielle | | | | | | |
|-------------|----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| | Inhibition de hERG | hépatotoxicité humaine | sensibilisation cutanée | Cancérogénicité | Corrosion de l'œil | irritation de l'œil | Toxicité respiratoire |
| NAT | négative | risque faible | risque faible | négative | négative | négative | négative |
| Galantamine | risque faible | risque moyen | risque moyen | négative | négative | négative | positive |

Les résultats des tests du tableau ci-dessus révèlent que le NAT est un composé non toxique qui peut être aisément utilisé en tant qu'inhibiteur potentiel de l'AChE. Concernant la galantamine qui est la molécule de référence actuellement utilisée en tant qu'inhibiteur de l'AChE pour traiter la maladie d'Alzheimer, nous constatons que parmi les 7 tests étudiés, celle-ci présente, contrairement au NAT, des risques moyens à élevés de toxicité hépatique, cutanée et respiratoire.

Les résultats promoteurs de l'étude *in silico* des propriétés ADMET du NAT témoignent de ses fortes potentialités pharmacologiques qu'il est nécessaire d'optimiser en améliorant son affinité envers l'AChE et donc de son activité anticholinestérasique par des modifications structurales de son squelette de base.

2.1.3.3. Modifications structurales du NAT

Cette étape a pour objectif d'améliorer le pouvoir inhibiteur du NAT à l'égard de l'AChE lequel est évalué selon le tableau 8 (page 6) par une $IC_{50} = 23.32 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$ qui est nettement plus élevé que celle de la galantamine dont la $IC_{50} = 6.27 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$.

Pour des raisons pratiques, cette étape sera strictement théorique pendant la quelle nous envisagerons de faire une évaluation prédictive de l'affinité des produits pouvant provenir des modifications structurales du NAT. A ce titre, différents groupements fonctionnels tels que OH (alcool), SH (thiol), COOH (acide), NH₂ et -CH₃-NH₂ (amine) qui sont susceptibles d'engager notamment des liaisons hydrogènes avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions de la chaîne latérale du NAT (fig.37).

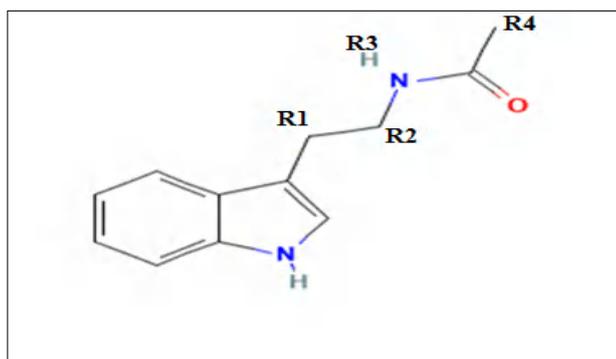
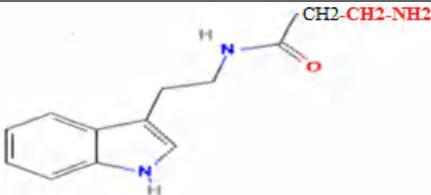
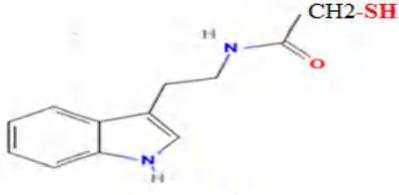
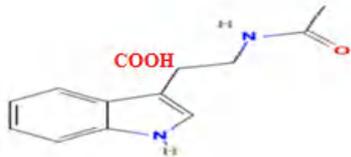
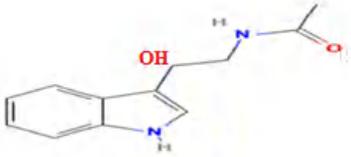
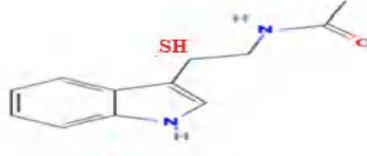
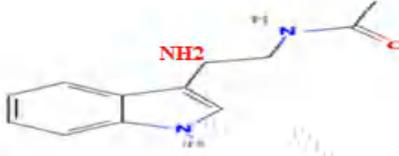
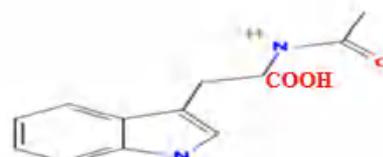


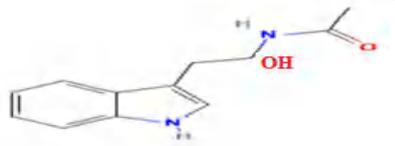
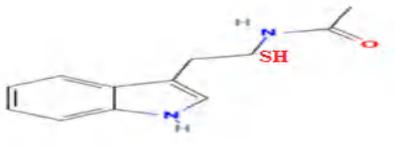
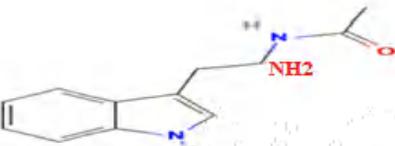
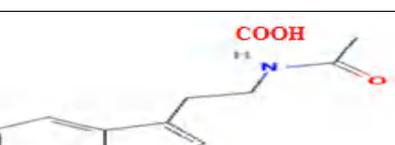
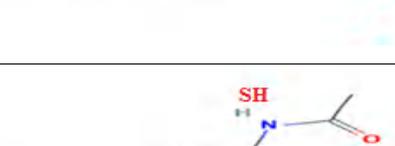
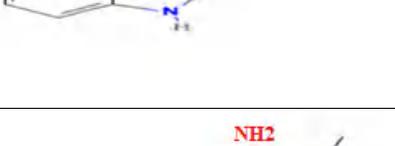
Figure 37. Représentation des positions des radicaux (R1, R2, R3 et R4) sur la structure du NAT

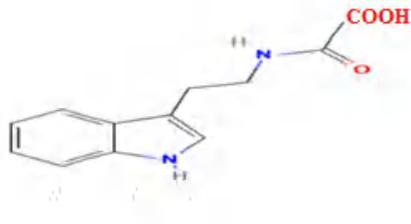
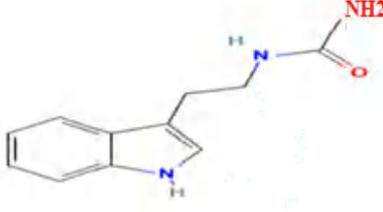
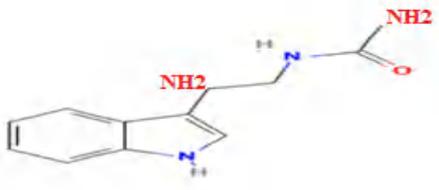
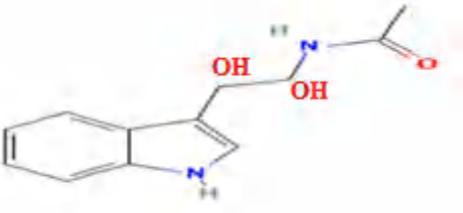
Pour chaque position (R1, R2, R3 et R4), nous avons à chaque fois ajouté l'un des groupements fonctionnels précités, ce qui nous a permis d'obtenir 19 composés différents dont l'affinité a été évaluée par docking moléculaire avec Gold (tableau 13).

Tableau 13. Les scores des composés substitués, NAT et la galantamine envers AChE

| Composés | Substitutions | Structures | Gold score AChE |
|-------------|-----------------|------------|-----------------|
| Galantamine | --- | | 57.02 |
| NAT | --- | | 51.64 |
| 1 | R4 : -OH | | 66.60 |

| | | | |
|---|---------------|--|-------|
| 2 | R4 : -CH2-NH2 |  | 64.16 |
| 3 | R4 : -SH |  | 63.71 |
| 4 | R1 : -COOH |  | 58.23 |
| 5 | R1 : -OH |  | 54.54 |
| 6 | R1 : -SH |  | 57.42 |
| 7 | R1 : -NH2 |  | 58.02 |
| 8 | R2 : -COOH |  | 58.99 |

| | | | |
|----|------------|--|-------|
| 9 | R2 : -OH |  | 58.73 |
| 10 | R2 : -SH |  | 59.01 |
| 11 | R2 : -NH2 |  | 55.11 |
| 12 | R3 : -COOH |  | 55.76 |
| 13 | R3 : -OH |  | 56.42 |
| 14 | R3 : -SH |  | 56.01 |
| 15 | R3 : -NH2 |  | 56.10 |

| | | | |
|----|------------------------|--|-------|
| 16 | R4 : -COOH |  | 59.10 |
| 17 | R4 : -NH2 |  | 58.88 |
| 18 | R1 : -NH2 R4 : -NH2 |  | 58.21 |
| 19 | R1 : -OH R2 : -OH |  | 58.72 |

Ce tableau montre que les affinités des 3 composés 1,2 et 3 sont nettement supérieures à celle du NAT et même à celle de la galantamine.

Si le changement de structure du NAT a permis d'améliorer son affinité pour l'AChE ; celle-ci ne peut en aucun cas servir à elle seul de critère essentiel de qualification des 3 composés précités en candidats médicaments. Afin de mieux d'appréhender les mécanismes d'interaction qui régissent l'activité des trois composés 1, 2 et 3 nous avons jugé utile d'entreprendre une analyse visuelle comparative de leur positionnement dans la cavité catalytique de l'AChE avec la pose cristallographique de la galantamine.

Comme le montre la figure 38, les 3 composés 1, 2 et 3 occupent les deux sites PAS et CAS responsables de l'activité de l'AChE et ce contrairement à la galantamine qui est enfouie uniquement dans le CAS.

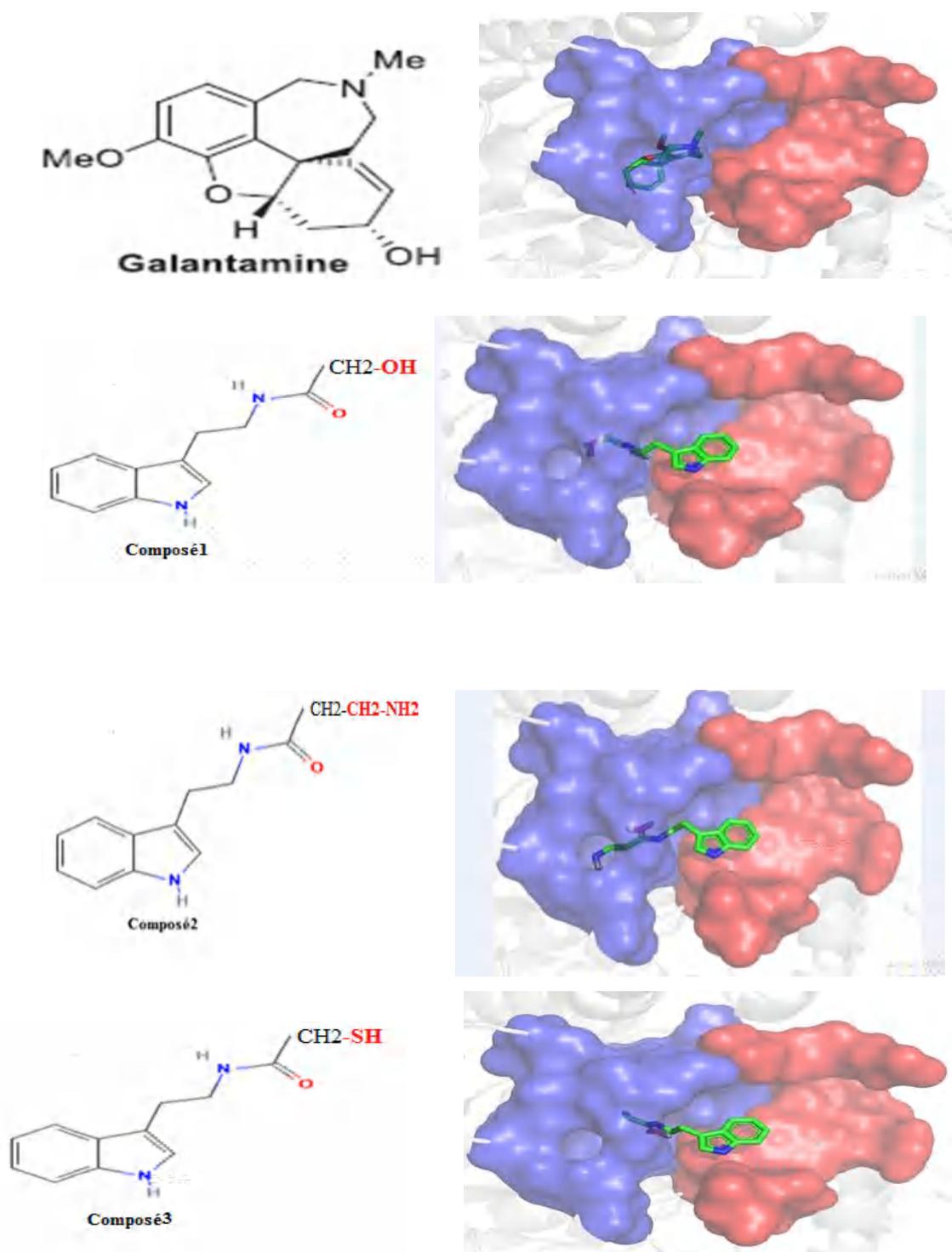
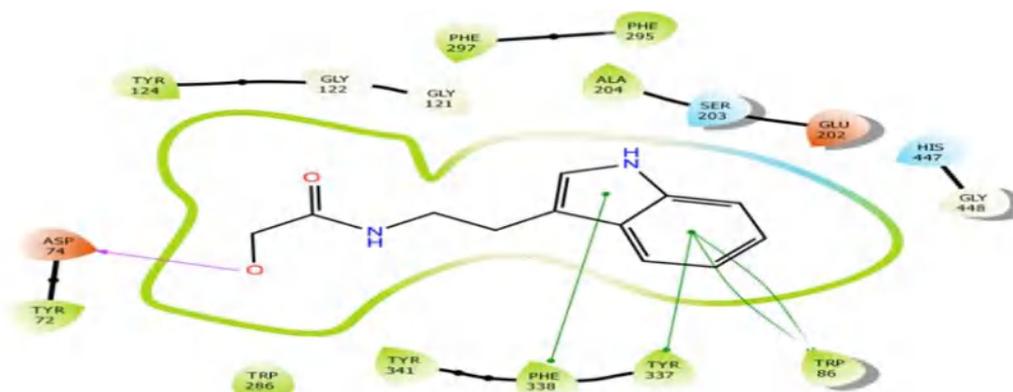
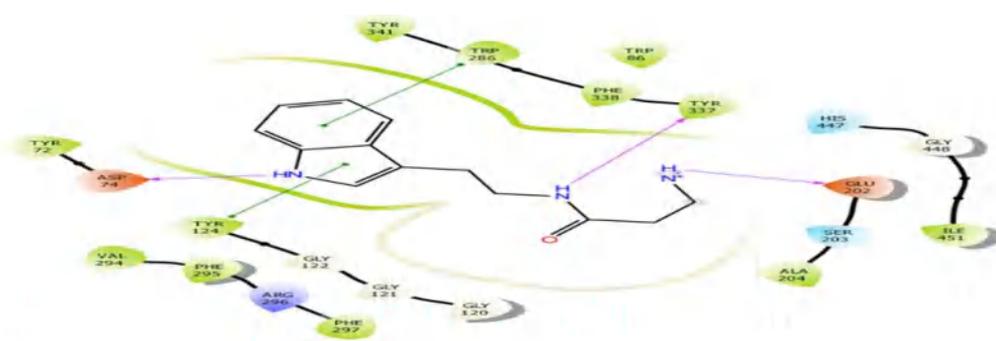


Figure 38. Mode de positionnement des composés 1, 2, 3 et de la galantamine dans la cavité catalytique de l'AChE. Le CAS est représenté en mode surface bleu et le PAS en mode surface rouge.

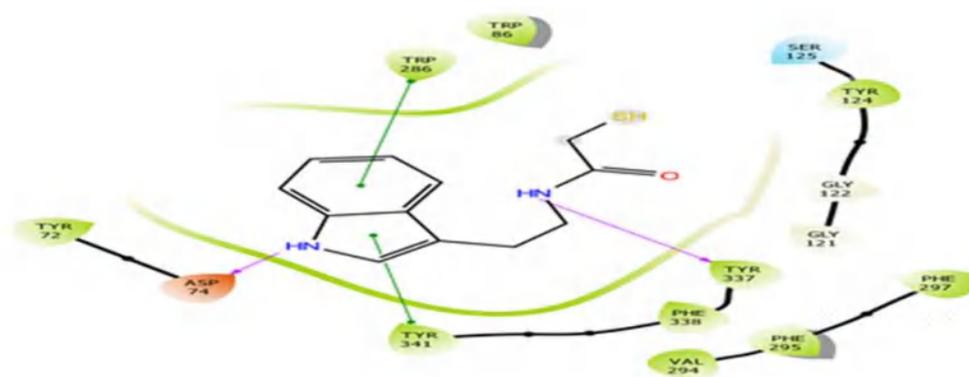
Ce mode de positionnement privilégié qu'adoptent les 3 composés 1, 2 et 3 par rapport à la galantamine, leur confère une plus forte activité à l'égard de l'ACHé qui s'exprime par la mise en place de différentes interactions dans la cavité catalytique de l'enzyme (fig 39).



Composé 1



Composé 2



Composé 3

Figure 39. Mode d'interaction des composés 1, 2 et 3 dans la cavité catalytique de l'ACHé. Les liaisons hydrogène sont représentées en mauve, les interactions π - π en vert.

Le nombre, la nature et l'appartenance au site PAS ou CAS de l'enzyme de différentes interactions engendrées par chacun des 3 composés substitués, sont représentées dans le tableau 14 suivant :

Tableau 14. Récapitulatif des interactions impliquées dans le site actif de l'AcHé par les composés 1, 2, 3 et la galantamine

| Cavité catalytique | Type d'interactions | Nombre d'interactions | | | |
|--------------------|---------------------|-----------------------|---|-------------------|-----------|
| | | galantamine | Composé 1 | Composé 2 | Composé 3 |
| CAS | π - π | 1 | 4 | 1 | 1 |
| | Résidus d'AA | Phe338 | Trp86 -Tyr337- (poche anionique) Phe338 (poche acyle) | Trp286 | Trp286 |
| | π -cation | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | Résidus d'AA | Trp86 Phe338 | - | - | - |
| | Hydrogène | 1 | 0 | 2 | 1 |
| | Résidus d'AA | Gly121 | - | Glu 202 Tyr337 | Tyr337 |
| | Total 1 | 4 | 4 | 3 | 2 |
| PAS | π - π | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | Résidus d'AA | - | - | Tyr124 | Tyr341 |
| | π -cation | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Hydrogène | 0 | 1 | 1 | 1 |
| | Résidus d'AA | - | Asp74 | Asp74 | Asp74 |
| | Total 2 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| CAS + PAS | T1+T2 | 4 | 5 | 5 | 4 |

AA : aide aminé

En considérant séparément les deux sites de la cavité catalytique de l'enzyme, on constate que la galantamine engage différentes liaisons le site CAS mais aucune avec le site PAS et ce contrairement aux trois composés 1, 2 et 3 qui établissent de nombreuses et diverses interactions au niveau de ces deux sites. Ceci revient sans nul doute au rôle essentiel

que joue la position R4 du NAT dont la substitution a conduit à des dérivés avec une meilleure affinité à l'égard de l'ACHÉ en mettant en jeux de nombreuses interactions de nature différentes notamment de type hydrogène et π - π dans les 2 sites PAS et CAS de la cavité catalytique de l'enzyme.

En effet le composé 1 se distingue numériquement de la galantamine en en gageant 5 interactions dont l'une de type hydrogène est située dans le PAS et les 4 autres de type π - π sont localisées dans le CAS. La galantamine, par contre ne forme que 4 interactions toutes situées dans le CAS parmi les quelles l'une est de type hydrogène, une autre de type π - π et les 2 autres de type π -cation.

En se référant au nombre et à la nature des interactions qu'implique chacun des 2 composés, on constate qu'en dehors de la liaison H qu'on retrouve chez les deux, le composé 1 forme 4 liaisons de type π - π contre une seule liaison π - π et 2 liaisons π -cation dans le cas de la galantamine. A ce titre, il est utile de rappeler que du point de vue énergétique, la liaison H est relativement la plus forte, suivie de la liaison π - π puis de la liaison π -cation. Ceci explique en partie la meilleure stabilité du complexe que forme l'enzyme avec le composé 1 qui s'exprime par un meilleur score d'affinité que lorsqu'elle se complexe avec la galantamine.

Un autre argument qui plaide en faveur du composé 1 est son interaction avec 3 des plus importants résidus d'acides aminés du site CAS. Il s'agit en l'occurrence des résidus Trp86 et Tyr337 qui forment le sous-site anionique et le résidu Phe338 qui appartient à la poche acyle. Il faut souligner que les 2 résidus Trp86 et Tyr337 sont responsables de la fixation de la choline dans le site CAS en contribuant jusqu'à concurrence de 50 % de l'énergie d'interaction entre l'enzyme et le substrat (Harel et al., 1996). Une autre étude par mutagenèse a montré l'importance du rôle que joue le résidu Trp86 dont le remplacement par l'alanine a engendré une diminution considérable de l'activité enzymatique par un facteur de 1000 (Ordentlich et al., 2004 ; Kwasnieski., 2010).

Dans le cas de la galantamine, on constate que celle-ci fait abstraction du Tyr337 du sous-site anionique mais fait appel aux 2 résidus Trp86 et Phe 338 avec les quels elle implique une interaction π -cation avec chacun d'eux et une seule interaction π - π avec le dernier.

En dehors de la liaison H que forme la galantamine et le composé 1 avec l'enzyme, les 3 autres interactions de la galantamine sont du point de vue énergétique plus faible que les interactions que met en jeu le composé 1 dans le même site CAS.

Concernant les 2 composés 2 et 3, ceux-ci mettent en jeu dans la cavité catalytique de l'enzyme respectivement 5 et 4 interactions de même nature que celles du composé 1. Dans le CAS, ces 2 composés impliquent chacun une liaison π - π avec le résidu Trp286 et une liaison H avec le résidu Tyr337 de la poche anionique. Cependant le composé 2 se distingue par une liaison H supplémentaire avec le résidu Glu202 engendrant probablement un score d'affinité légèrement supérieur à celle du composé 3. Dans le site PAS les 2 composés forment chacun une liaison H avec le résidu ASP74 et une liaison π - π respectivement avec les résidus Tyr124 et Tyr341.

Il faut souligner que le composé 1 se distingue par un score d'affinité nettement supérieur (66.60) à celui des composés 2 et 3 (respectivement 64.16 et 63.71), probablement en raison de son interaction avec les 2 résidus Trp86 et Phe 338 des 2 sous-sites anionique et acyle du site CAS mais qu'on ne retrouve nullement chez les composés 2 et 3 qui font appel à leur place à d'autres résidus d'acides aminés tels que Trp286 et Glu202 qui sont situés à l'extérieur de ces deux poches.

Si le changement de structure du NAT a permis d'obtenir à 3 composés avec une meilleure affinité pour l'AChE, celle-ci ne peut en aucun cas servir à elle seule de critère essentiel de qualification de ces 3 composés en candidat-médicaments. À ce titre il nous semble judicieux de mener une analyse complémentaire également prédictive en vue de déterminer cette fois-ci les propriétés ADMET de ces 3 composés. En premier lieu nous avons testé les propriétés physico-chimiques représentées par les règles de Lipinski et Veber ainsi que la solubilité dans l'eau et l'accessibilité à la synthèse (tableau 15).

Tableau 15. Prédiction des propriétés physico-chimiques des composés 1, 2 et 3 par le serveur SwissADME

| Composés | Propriétés physico-chimiques | | | | | | | | |
|-------------|------------------------------|-----|-----|-------|------|-------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|
| | PM (g/mol) | nLF | nON | nOHNH | LogP | Règle de Lipinski | Règle de Veber | Solubilité dans l'eau | Accessibilité à la synthèse |
| Galantamine | 287.35 | 1 | 4 | 1 | 1.92 | conforme | conforme | moyenne | 4.57 |
| 1 | 218.25 | 5 | 2 | 3 | 0.95 | conforme | conforme | soluble | 1.60 |
| 2 | 231.29 | 6 | 2 | 3 | 1.15 | conforme | conforme | moyenne | 1.77 |
| 3 | 234.32 | 5 | 1 | 2 | 1.73 | conforme | conforme | moyenne | 1.69 |

Ce tableau montre que les propriétés physico-chimiques des 3 composés 1, 2 et 3 sont conformes aux règles de Lipinski et Veber témoignant aussi de leur biodisponibilité en cas

d'administration par voie orale. Concernant le critère de solubilité, le composé 1 semble plus apte à se solubiliser dans l'eau que les composés 2 et 3, qui sont, à l'instar du NAT et de la galantamine, moyennement solubles. Enfin avec de très faibles valeurs sur l'échelle de référence qui indique que la difficulté de synthèse va en augmentant de 1 à 10, la synthèse expérimentale des 3 composés 1,2 et 3 semble aisément accessible.

Suites aux résultats positifs des propriétés physico-chimiques des 3 composés 1,2 et 3, nous avons jugé utile d'approfondir cette étude préliminaire des propriétés ADMET par une autre analyse complémentaire se rapportant cette fois ci à leurs propriétés pharmacocinétiques (tableau 16).

Tableau 16. Prédiction des propriétés pharmacocinétiques des composés 1, 2 et 3 par le serveur ADMETlab 2.0

| Composés | Propriétés pharmacocinétiques | | | | | | |
|-------------|-------------------------------|--------|-----------|------------|----------|----------|----------|
| | AGI | PHE | I- CYP1A2 | I -CYP2C19 | I-CYP2C9 | I-CYP2D6 | I-CYP3A4 |
| Galantamine | élevée | élevée | négative | négative | négative | positive | négative |
| 1 | élevée | élevée | positive | négative | négative | négative | négative |
| 2 | élevée | élevée | négative | négative | négative | positive | négative |
| 3 | élevée | élevée | positive | positive | négative | négative | négative |

AGI : Absorption Gastro-Intestinale; CYP : Cytochrome P450; PHE : Perméabilité Hémo-Encéphalique ; I : inhibiteur

Il ressort de ce tableau que les 3 composés présentent une capacité élevée à franchir les barrières gastro-intestinale (AGI) et hémo-encéphalique (PHE) leur permettant un passage facile vers la circulation sanguine et le système nerveux central. Ceci constitue un atout majeur jouant en faveur de ces 3 composés en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'AChE. Concernant l'inhibition du cytochrome P450, les résultats montrent qu'à l'instar de la galantamine qui n'inhibe qu'un seul CYP, les composés 1 et 2 aussi, n'inhibent respectivement que les CYP 1A2 et 2D6 et ce contrairement au composé 3 qui lui inhibe à la fois les 2 isomères CYP 1A2 et CYP 2C19. Cependant il faut souligner que le CYP 3A4 dont la concentration est la plus importante car impliqué dans la métabolisation d'un grand nombre de xénobiotiques, se trouve épargné, ce qui encore une fois plaide en faveur de ces 3 composés en qualité d'inhibiteurs potentiels de l'AChE.

Enfin une ultime analyse des propriétés ADMET des 3 composés 1, 2 et 3 a été réalisée en vue de prédire leur éventuelle toxicité par différents tests et de déterminer lequel d'entre eux sera prédisposé à être un candidat médicament (tableau 17).

Tableau 17. Prédiction de la toxicité potentielle des composés 1, 2 et 3 par le serveur ADMETlab 2.0

| Composés | Toxicité potentielle | | | | | | |
|-------------|----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| | Inhibition de hERG | hépatotoxicité humaine | sensibilisation cutanée | Cancérogénicité | Corrosion de l'œil | irritation de l'œil | Toxicité respiratoire |
| Galantamine | risque faible | risque moyen | risque moyen | négative | négative | négative | positive |
| 1 | négative | négative | risque faible | négative | négative | risque faible | négative |
| 2 | négative | négative | risque faible | négative | négative | négative | négative |
| 3 | négative | négative | risque élevé | négative | négative | négative | risque élevé |

Les résultats des différents tests de ce tableau montrent que les composés 1 et 2 ne présentent aucun risque, si non des risques faibles de toxicité, et ce contrairement à la molécule de référence, la galantamine, qui elle révèle des risques moyens à positifs de toxicité dans les cas hépatique, cutané, et respiratoire. Il y va autrement pour le composé 3 qui se révèle être aussi toxique que la galantamine, de part sa toxicité élevée dans les 2 cas hépatique et respiratoire.

En conclusion, les composés 1 et 2 ont présenté des profils ADMET favorables, pour une application biologique, en tant que candidat médicament. En revanche les résultats de la toxicité potentielle du composé 3 ont montré que ce dernier présente des risques élevés envers la sensibilisation cutanée et la toxicité respiratoire.

2.2. Evaluation de l'activation du facteur Nrf2

L'extrait brut alcaloïdique E1 et le NAT ont été testés pour l'activation du facteur nucléaire érythroïde 2 lié au facteur 2 (Nrf2), le régulateur clé de la réponse antioxydante cellulaire. Pour ce faire nous avons utilisé le test *in vitro* ARE-Nrf2 luciférase. Rappelons qu'ARE-Nrf2 Luciférase est une méthode *in vitro* utilisée pour analyser l'activation de la voie protectrice ARE-Nrf2 par détection lumineuse. La luminescence

engendrée par la luciférase est donc ici dépendante de l'expression de Nrf2. Par conséquent, un inducteur de Nrf2 entrainera une augmentation de la lumière produite par l'oxydation.

L'extrait E1 a présenté une bonne activité sur Nrf2, Les résultats obtenus sur cet extrait présentent une activation dose-dépendante de Nrf2 jusqu'à 100 µg/mL sans effet toxique (fig 40), par contre le NAT n'a pas montré d'activité pertinente indiquant ainsi que l'activation de Nrf2 observée avec E1 n'est pas due à la présence de NAT mais probablement à un composé non identifié ou à une combinaison des composés dans cet extrait.

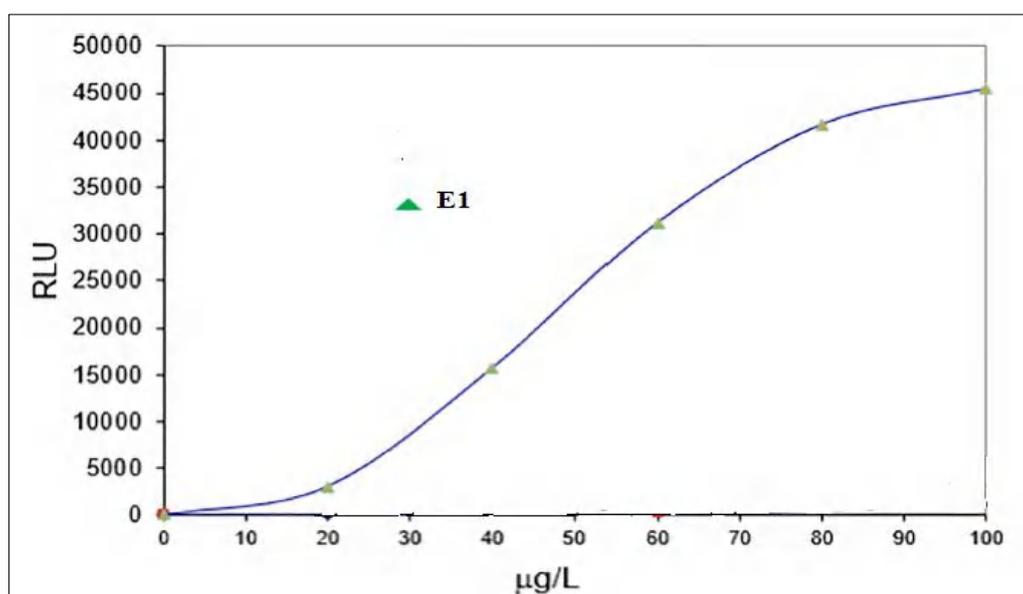


Figure 40. Activation de Nrf2 par l'extrait E1

Comme le montre la figure 40, l'extrait E1 a été testé sur une gamme de concentration de 0 à 100 µg/mL sur une lignée de cellules HepG2 transfectées avec le gène de la luciférase. L'activation de Nrf2 a été mesurée en suivant la chimioluminescence dépendante de la luciférase en unités lumineuses relatives (RLU). L'activité de l'extrait E1 est très intéressante, la luminescence exprimée en RLU augmente proportionnellement avec la concentration jusqu'à la concentration maximale 100 µg/mL, dont RLU atteint 45000.

Nos résultats sont en accord avec la littérature montrant que *P. eryngii* présente une bonne activité antioxydante (Zhang et al., 2014). Li, S. et Shah, N. P. (2017) ont prouvé aussi que *P. eryngii* est un stimulateur de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD : superoxyde dismutase, GPx : glutathion peroxydase et CAT : chloramphénicol acétyltransférase) qui sont conformes à nos données sur l'activation Nrf2. Nrf2 qui est un régulateur principal de la réponse antioxydante, modulant l'expression de centaines de gènes, y compris non seulement

les enzymes antioxydantes, mais un grand nombre de gènes qui contrôlent des processus apparemment disparates tels que les réponses immunitaires et inflammatoires, le remodelage tissulaire et la fibrose, la carcinogenèse et les métastases, et même les dysfonctionnements cognitifs et les comportements addictifs (Hybertson et *al.*, 2011).

Il a été démontré que l'inactivation totale du gène Nrf2 chez les souris (Nrf2 KO) a conduit à une augmentation significative d'un large éventail de toxicité et maladies associées au stress oxydatif (Akiyama et *al.*, 2019). De plus en plus des preuves indiquent un déclin lié à l'âge de la capacité à répondre au stress oxydatif avec activation de la signalisation Nrf2 et l'expression de ses gènes antioxydants cibles (Zhang, et *al.*, 2015) et pourrait exacerber la fragilité en fonction de l'âge (Huang et *al.*, 2019).

Très récemment, l'activation de Nrf2 par des extraits alimentaires a été proposée comme approche thérapeutique potentielle contre l'infection au COVID-19 par régulation à la baisse des gènes codant pour les protéines de pointe, nécessaire pour l'entrée du SRAS-CoV-2 dans les cellules hôtes (McCord et *al.*, 2020).

2.3 Analyses d'expression différentiels des gènes (DEGs)

En raison des bons résultats de l'extrait alcaloïdique E1 sur l'activation du facteur nucléaire érythroïde 2 lié au facteur 2 (Nrf2), nous nous sommes intéressés à son effet transcriptionnel sur les cellules humaines. Pour ce faire nous avons testé l'effet de l'extrait E1 du notre champignon (*P. eryngii*) sur les niveaux d'expression génique, en utilisant les cellules HepG2 (cellules humaine du carcinome hépatocellulaire) par La méthode RNA-seq. Rappelons que le RNA-Seq est une méthode centrale pour l'étude du fonctionnement biologique et elle est la plus utilisée à ce jour. En plus d'identifier les espèces d'ARN produites par les cellules, elle permet de détecter l'édition des ARN (Ramaswami et al. 2013) mais surtout d'estimer leur abondance en distinguant les différents transcrits d'un même gène. Le RNA-Seq est donc l'outil le plus adapté pour l'étude de l'épissage alternatif et la quantification des ARNm résultants (Uhel et al., 2019).

Les cellules (HepG2) ont été traitées avec E1 à 60 µg/mL, et ont été ensuite soumises à l'extraction d'ARN et l'analyse d'ARN-seq. DEGs (*differentially expressed genes*) a été analysé entre les cellules témoins (cellules non traitées) et celles exposées au E1.

Sur 14278 transcrits exprimés dans les échantillons, 4857 étaient exprimés de manière significativement différentielle entre les cellules témoins et les cellules traitées à partir

desquelles 2375 transcrits étaient régulés positivement (expression génique élevée) et 2482 transcrits étaient régulés négativement (expression génique faible) après traitement avec l'extrait E1. Le diagramme en volcan (fig 41) montre un effet distinct clair sur l'expression des gènes entre les cellules témoins et les cellules traitées.

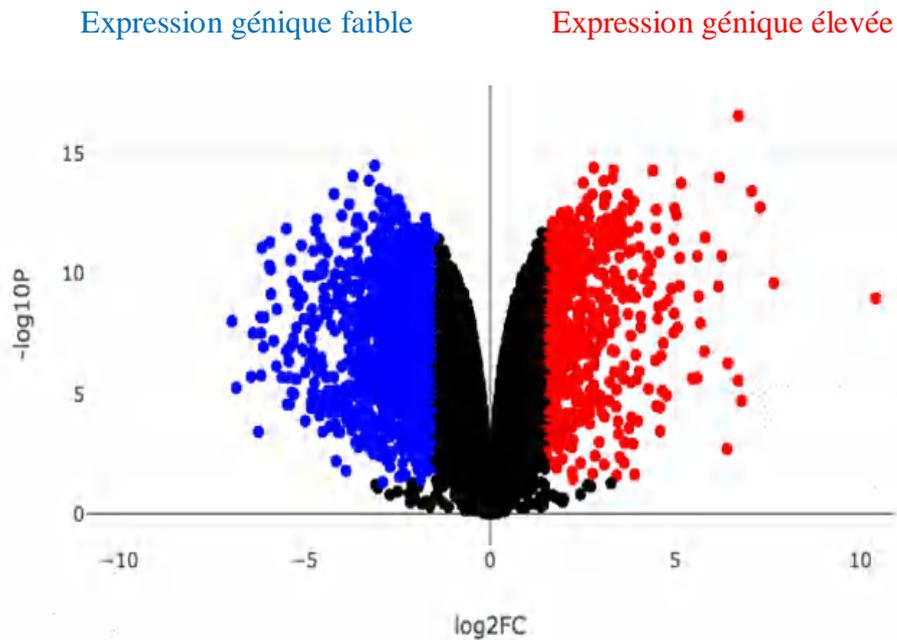


Figure 41. Diagramme en volcan des gènes différentiellement exprimés (DEGs) entre les échantillons présentant l'Effet de l'extrait E1 sur les cellules HepG2. L'axe X représente le changement de pli des DEGs dans différents groupes expérimentaux ; L'axe Y $-\log_{10}$ représente les DEGs de plus en plus significatifs à mesure que la valeur augmente. Les points représentent les gènes ; les points noirs indiquent des gènes exprimés de manière non différentielle ; les points rouges représentent des gènes exprimés différentiellement régulés positivement ; les points bleus représentent des gènes exprimés différentiellement régulés négativement. ($p < 0,05$, changement de pli : élevé $> 1,5$ ou faible $< 1,5$).

Afin de comparer l'effet sur le transcriptome de l'extrait actif E1 sur Nrf2 avec un extrait inactif, nous avons choisi un extrait méthanolique (extrait MeOH), sachant que cet extrait a été obtenu par 20 g du champignon *P. eryngii*, qui ont été mélangés avec 200 mL du méthanol, et le mélange a été agité à 40°C pendant 24 h. Après filtration, la solution est évaporée à 40 °C, puis séchée une nuit sous vide. Ce dernier a été testé pour l'activation du Nrf2 et il a été inactif, pour cela nous l'avons choisi pour cette comparaison.

L'analyse génique confirme les résultats observés sur l'activité de Nrf2 avec une expression plus élevée de Nrf2 avec E1 (*transcriptional activation by Nrf2 Homo sapiens WP3*) (fig 42. A) alors que Nrf2 n'est pas régulé positivement avec l'extrait méthanolique (extrait inactif) (fig 42. B).

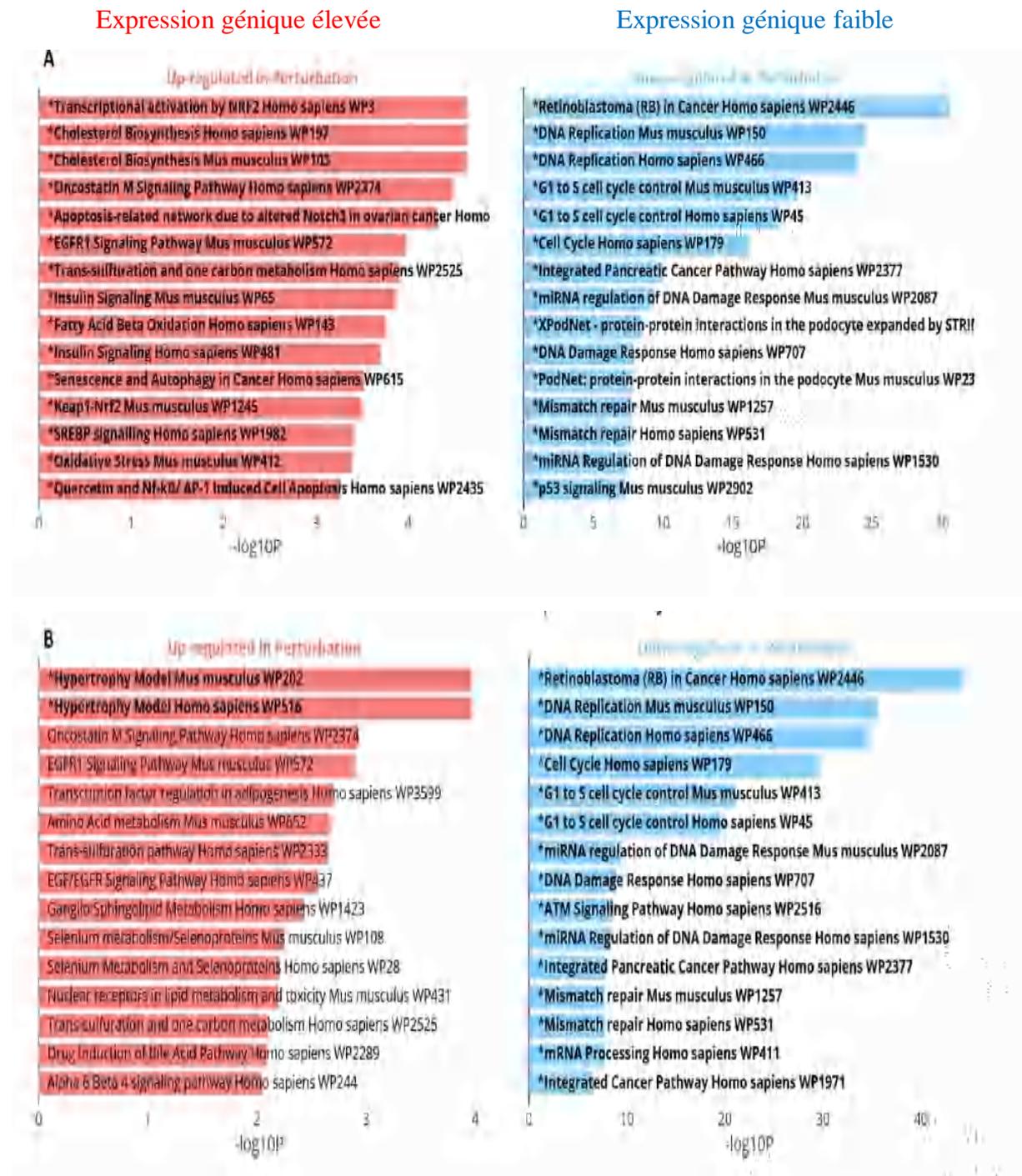


Figure 42. (A) Gènes régulés (élevée et faible) par l'extrait E1 ; (B) gènes régulés (élevée et faible) par l'extrait méthanolique. L'axe des x indique le $-\log_{10}$ (P-valeur) pour chaque terme. Les termes significatifs sont mis en évidence en gras.

D'après les résultats mentionnés dans la figure 42, globalement, le nombre de gènes régulés par l'extrait inactif (méthanolique) est inférieur à ceux affectés par E1. L'expression des gènes modifiée positivement (expression génique élevée) sous l'effet de l'extrait E1 est supérieure à celle de l'extrait méthanolique. Par contre les deux extraits ont diminué l'expression des mêmes gènes impliqués dans le cycle cellulaire (expression génique faible), citons à titre d'exemples, les gènes responsable de la réplication de l'ADN (*DNA Replication Mus musculus WP150; DNA Replication Homo sapiens WP466*) et l'apparition du cancer (*Retinoblastoma (RP) in caner Homo sapiens WP2446; Integrated Pancreatic Cancer Pathway Homo sapiens WP2377*), cet effet de régulation des deux extraits pourrait être l'un des mécanismes moléculaires soutenant à la consommation du *P. eryngii* qui réduit le risque d'un cancer (Ba et al., 2021). Ces résultats donnent à notre champignon des valeurs nutritionnels et thérapeutiques de plus, et confirment les données de la littérature (Bellettini et al., 2018, Valverde et al., 2015, Sharma et al., 2021).

Les principaux gènes modulés par E1 et leurs fonctions ont été regroupés en cinq groupes (tableau 18).

Tableau 18. Sélection de gènes modulés après traitement des cellules HepG2 avec l'extrait E1

| Gènes | Protéines |
|--|---|
| Groupe 1 : Défense contre le stress | |
| <i>Nrf2 or NFE2L2</i> | Le facteur de transcription Nrf2 |
| <i>Keap-1</i> | protéine Keap1 |
| <i>HMOX-1</i> | l'hème-oxygénase-1 |
| <i>NUPR1</i> | protéine nucléaire 1 |
| <i>ATF6</i> | Activation du facteur de transcription 6 |
| <i>XBPI</i> | Protéine de liaison <i>X-box</i> 1 |
| Groupe 2 : Métabolisme du cholestérol | |
| <i>SREBF</i> | Protéine de liaison à l'élément régulateur du stérol |
| <i>SCAP</i> | Protéine d'activation du clivage <i>SREBP</i> |
| <i>CYP7A1</i> | Cholestérol 7 alpha-hydroxylase |
| <i>PPARG</i> | Protéine gamma du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes |
| <i>NPC2</i> | Protéine Niemann Pick C1 |

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>LDLR</i> | Protéines réceptrices de <i>LDL</i> |
| <i>CEPT</i> | Protéine de transfert des esters de cholestérol |
| <i>APOE</i> | Apolipoprotéine E |
| <i>Taurine</i> | Taurine |
| Groupe 3 : Santé de la peau | |
| <i>Collagénase IV</i> | Collagénase IV |
| <i>Collagene(s) complex</i> | Collagène complex |
| <i>ATP7B</i> | ATPase de type P |
| Groupe 4 : Inflammation | |
| <i>InFB1</i> | Interféron bêta |
| <i>NFkB</i> | Facteur de transcription <i>Nfkb</i> |
| Groupe 5 : Cancer | |
| <i>BRCA1</i> | protéine du cancer du sein 1 |
| <i>HMGA1</i> | Protéine de groupe A1 à haute mobilité |

Le premier groupe est lié aux régulateurs de transcription qui convertissent les signaux de stress en un programme d'expression génique qui renforce les cellules avec une résistance au stress induit par un changement dans leur microenvironnement. Il ressort du tableau 17 que l'extrait E1 a augmenté l'expression des gènes *Nrf2* (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), ainsi que l'expression de la sous-unité Keap-1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Rappelons que lors d'une exposition à un stress oxydatif ou d'une activation des éléments de réponse antioxydants (ARE), *Nrf2* est libéré de Keap1 lui permettant de se déplacer jusqu'au noyau où il peut se lier aux ARE entraînant ainsi l'expression des enzymes antioxydantes qui protègent la cellule contre des effets oxydatifs. *Nrf2* peut réduire les dommages oxydatifs et maintenir l'homéostasie redox cellulaire. Comme il est mentionné précédemment, ces résultats sont en accord avec l'activité induite par le *Nrf2* observée avec cet extrait (E1).

La surexpression de *HMOX1*, le gène codant pour l'hème-oxygénase-1 (*heme oxygenase (decycling)1*) est en accord avec la régulation positive de *Nrf2* sachant que cette enzyme antioxydante est considérée comme une caractéristique de l'activation de *Nrf2*. L'hème oxygénase 1 est l'une des trois isoformes de l'hème oxygénase qui est une enzyme cytoprotectrice induite en réponse au stress cellulaire. Elle catalyse la dégradation de l'hème

en biliverdine, du monoxyde de carbone (CO) et ion Fe²⁺, et augmente le pool labile de fer pour améliorer la ferroptose qui est une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers (Chang *et al.*, 2018).

La protéine nucléaire 1 (Nuclear protein 1) (*NUPR1*) est un régulateur de transcription répondant ainsi à divers types de stress cellulaire, y compris le stress du réticulum endoplasmique (RE) et le stress oxydatif. Elle convertit les signaux de stress en un programme d'expression génique qui renforce les cellules avec une résistance au stress induit par une modification de leur microenvironnement. Elle participe ainsi à la régulation de nombreux processus, à savoir le cycle cellulaire, l'apoptose, l'autophagie et les réponses de réparation de l'ADN. Des preuves suggèrent l'implication de *NUPR1* dans la ferroptose par diverses voies de régulation (Huang *et al.*, 2021). Nous observons ci-dessus (tableau 17) que E1 est également un inducteur de la ferroptose suggérant un réseau entre ces voies de signalisation.

L'activation du facteur de transcription 6 (*Activating transcription factor 6*) (*ATF6*) est l'un des médiateurs de signalisation du stress du réticulum endoplasmique (RE). Une étude a suggéré que l'activation de l'*ATF6* pourrait être une stratégie thérapeutique potentielle pour la maladie d'Alzheimer (Du *et al.*, 2020). Il pourrait être intéressant au futur de déchiffrer si le NAT présent dans l'extrait pourrait être impliqué dans la surexpression d'*AFT6*. *ATF6* est l'un des trois principaux capteurs de la membrane de RE qui sont connus pour initier l'activation de la protéine de liaison X-box 1 (*X-box binding protein 1*) (He *et al.*, 2010) codé par *XBPI*, qui est l'un des processus de signalisation adaptative les plus conservés en réponse au stress du réticulum endoplasmique, appelé réponse protéique dépliant. Ce rôle évite l'accumulation de protéines dépliées ou mal repliées et maintient l'homéostasie intracellulaire et la survie (Xu *et al.*, 2021).

Le deuxième groupe concerne la régulation d'expression positive des gènes du métabolisme tels que ceux impliqués dans la bêta-oxydation des acides gras, la signalisation de l'insuline et le métabolisme du cholestérol. Les données sont en accord avec des études révélant l'effet alimentaire hypolipidémiant de *P. eryngi* (Wei *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2012, Alam *et al.*, 2011).

Parmi les gènes activés dans ce groupe : *SREBF*, un gène codant pour la protéine de liaison à l'élément régulateur du stérol (*Sterol regulatory element-binding Transcription*

factor 1) (*SREBP*) qui sont des facteurs de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme lipidique puisqu'ils contrôlent l'expression des gènes du métabolisme des acides gras, des triglycérides et du cholestérol. L'expression du récepteur des LDL-cholestérol est contrôlée de façon prédominante par le facteur de transcription (*SREBP*), sachant que les concentrations de LDL-cholestérol sont considérées comme un facteur de risque majeur du développement des maladies cardiovasculaires. Le récepteur des LDL maintient l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'organisme en jouant un rôle-clé dans la régulation du catabolisme des LDL.

La libération de *SREBP* liée à la membrane nécessite la protéine d'activation du clivage *SREBP* (*Sterol regulatory element-binding protein Cleavage-activating protein*), codé par le gène *SCAP*, qui est nécessaire pour le métabolisme du cholestérol ainsi que pour l'homéostasie des lipides. Ce dernier a été activé aussi par E1 ainsi que le gène *CYP7A1* qui code pour le cholestérol 7 alpha-hydroxylase (*Cholesterol catabolism*), en tant qu'enzyme P450 appartenant à la classe des oxydoréductases, que convertit le cholestérol en 7-alpha-hydroxycholestérol, la première étape limitante de la synthèse des acides biliaires.

On peut également mentionner la régulation positive du gène *PPARG*, codant pour la protéine gamma du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ*) (*PPAR*), un récepteur nucléaire qui se lie aux proliférateurs de peroxysomes tels que les médicaments hypolipidémiants et les acides gras. Une fois activé par un ligand, le récepteur nucléaire se lie aux éléments de réponse *PPAR* spécifiques de l'ADN (*Peroxisome proliferator response élément*) (*PPRE*) et module la transcription de ses gènes cibles, tels que l'acyl-CoA oxydase. Par conséquent, il contrôle la voie de bêta-oxydation peroxysomale des acides gras et est un régulateur clé de la différenciation des adipocytes et de l'homéostasie du glucose.

D'autres gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol ont subi une surexpression sous l'effet de l'extrait E1, tous ces résultats vont dans le sens de l'utilisation de ce champignon comme aliment hypocholestérolémiant. Cela comprend le gène *NPC2* codant pour la protéine Niemann Pick C1 (*Niemann Pick C1 protein*), et le gène *LDLR* codant pour les protéines réceptrices de *LDL* (*receptor proteins*). La protéine de transfert des esters de cholestérol, abrégée en *CETP* (*Cholesteryl ester transfer protein*) est une protéine facilitant les échanges de cholestérols estérifiés entre les différentes lipoprotéines; son gène est le *CETP*. L'apolipoprotéine E qui est une protéine essentielle au catabolisme (la destruction

métabolique normale) des constituants des lipoprotéines riches en triglycérides qui est codée par le gène *APOE*. Comme mentionné au tableau 17, le gène taurine qui code pour la taurine ou acide 2-aminoéthanesulfonique a été aussi régulé positivement par E. La taurine est un acide aminé indispensable à l'absorption des matières grasses par l'intestin et à la maturation du système nerveux. On la trouve en grande quantité dans le cerveau, la rétine et les muscles. Le lait maternel en contient et les laits destinés aux bébés sont enrichis en taurine, indispensable à leur développement.

Le troisième groupe de gènes qui ont subi une surexpression génique sous l'effet du E1 concerne les gènes impliqués dans la santé de la peau tels que l'activation du *Collagénase IV*, codant pour l'enzyme collagénase IV, sachant que les collagénases sont des enzymes capables de rompre les liaisons peptidiques du collagène. Elles facilitent la destruction des structures extracellulaires lors de la pathogenèse bactérienne. La production de collagénases peut être induite lors d'une réponse immunitaire. L'activation du collagène a été observée aussi par notre extrait (tableau 17), qui est une protéine fibreuse dite structurale. Avec l'élastine, l'acide hyaluronique et les glycoprotéines, elle est responsable de la cohésion des tissus et des organes, dont la peau. Il confère à cette dernière hydratation, résistance et souplesse. Cependant, au fil des années, la synthèse de collagène diminue et la peau devient plus fine et ridée. Cela soutient la nouvelle tendance à considérer divers composés pharmacologiques de champignons comme des produits nutraceutiques et utiles pour une peau saine (Hsu & Cheng, 2018). Il est à noter d'associer à la santé de la peau d'autres gènes tels que *ATP7B*, qui code pour une ATPase de type P, responsable d'un transport actif du cuivre, ce dernier un micronutriment essentiel à la synthèse du collagène et au métabolisme du fer.

Le quatrième groupe concerne les gènes responsables des réponses en cas d'une inflammation. Le gène *InFBI* (interféron bêta 1) code pour la protéine interféron bêta (*Interferon B protein*) qui est une cytokine médiatrice d'activités antivirales libérée dans le cadre de la réponse immunitaire innée aux agents pathogènes. En plus du gène *InFBI*, nous avons observé l'activation du facteur de transcription *Nfkb* codé par le gène *NFkB*. Ce facteur est un régulateur essentiel des gènes impliqués dans la réponse à l'infection, à l'inflammation et au stress.

Le cinquième et dernier groupe traite des gènes qui pourraient être protecteurs contre le cancer. Parmi ces gènes, nous avons observé de manière intéressante l'activation de la

protéine du cancer du sein 1 (*Breast-Cancer susceptibility gene 1*) codé par le gène *BRCA1* (tableau17). Ce dernier est un gène suppresseur de tumeur humaine (également connu sous le nom de gène gardien) est impliqué dans les fonctions cellulaires de base nécessaires à la réplication cellulaire et est responsable de la réparation de l'ADN endommagé ou à détruire les cellules si l'ADN ne peut pas être réparé. Cependant, une expression réduite de *BRCA1*, due à des mutations ou à une inactivation épigénétique, entraîne une altération de la différenciation des glandes mammaires et un risque accru de développement de cancers du sein et de l'ovaire (Romagnolo et al., 2015).

De plus, l'extrait E1 a inhibé la protéine de groupe A1 à haute mobilité (*High Mobility Group A1*) codé par le gène *HMGAI*, une protéine de chromatine non histone impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment la régulation de la transcription génique inductible, la réplication de l'ADN, l'organisation de l'hétérochromatine, l'intégration des rétrovirus dans les chromosomes et la progression métastatique des cellules cancéreuses (Pujals et al., 2021). Elle est exprimé dans diverses tumeurs, comme par exemple le cancer du sein (Zanin et al., 2019). Une régulation opposée d'extrait E1 sur ce facteur peut indiquer un effet favorable de *P. eryngii* comme agent protecteur contre le cancer du sein.

L'évaluation de l'enrichissement de la voie génique par E1 avec BioJupies basée sur les données de Wikipathways avec Enrichr a également soutenu le rôle de la voie du facteur de transcription Nrf2 dans les données d'expression génique différentielle après traitement avec E1 (fig 43). On peut supposer que l'extrait E1 pourrait avoir un intérêt pour la santé cérébrale puisque Nrf2 est une cible bien connue pour le développement du traitement des maladies neurodégénératives. De plus, E1 a induit l'expression différentielle des gènes de la voie de la ferroptose. Au cours des dernières années, la ferroptose est devenue un domaine de recherche intéressant dans les domaines de la thérapie du cancer et de la gestion des maladies neurodégénératives (Morris et al., 2018). Le facteur de transcription Nrf2 est considéré comme un important facteur de régulation de la ferroptose (Song & Long., 2020). La ferroptose pourrait participer à un effet apoptotique indirect sur les cellules défiées par les ROS pour empêcher l'initiation. Récemment, il a été rapporté que Nrf2 pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans les maladies de dysfonctionnement moteur liées à l'âge grâce à son rôle dans la régulation de l'homéostasie cérébrale du fer (Han et al., 2021).

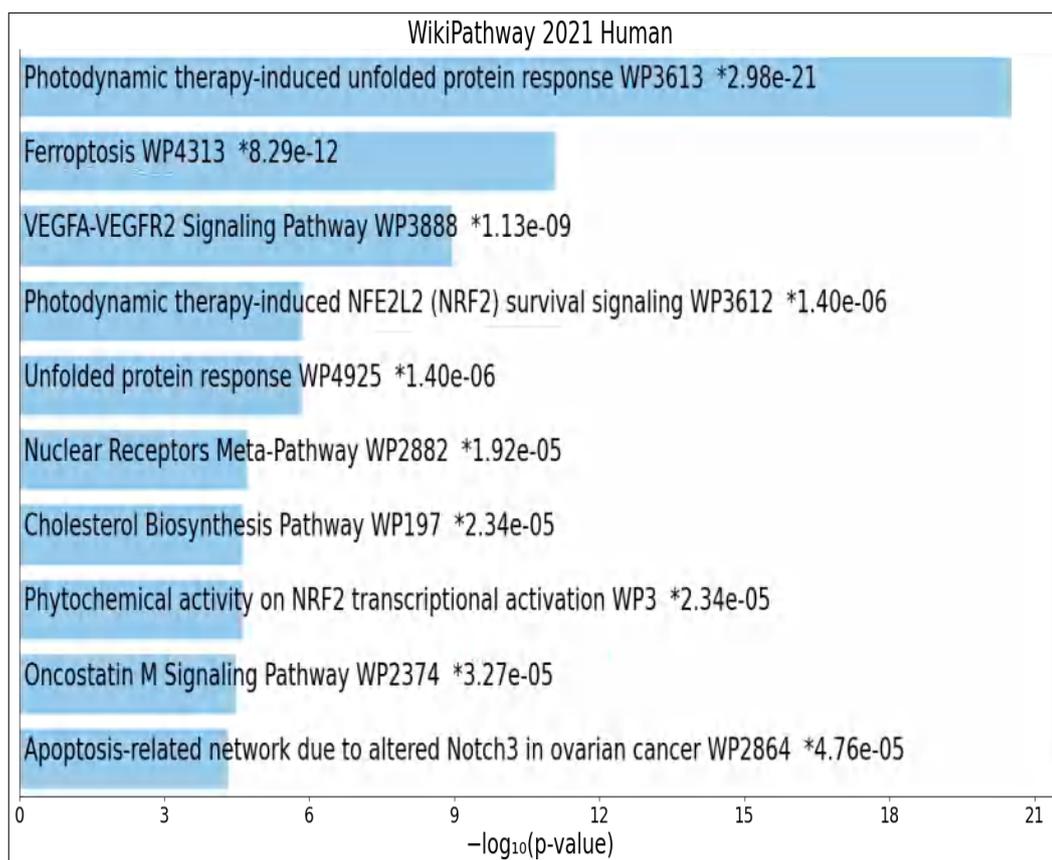


Figure 43. Voies génétiques régulées positivement par E1, évaluées avec une analyse d'enrichissement des voies générée à l'aide d'Enrichr. L'axe des x indique le $-\log_{10}(P\text{-value})$.

2.4 Activité antibactérienne

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien de l'extrait E1 par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélose (Muller Hinton) (Biondi et *al.*, 1993). L'activité antibactérienne est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques (mm), contenant l'extrait à tester vis-à-vis de quatre germes pathogènes : *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (fig 44).

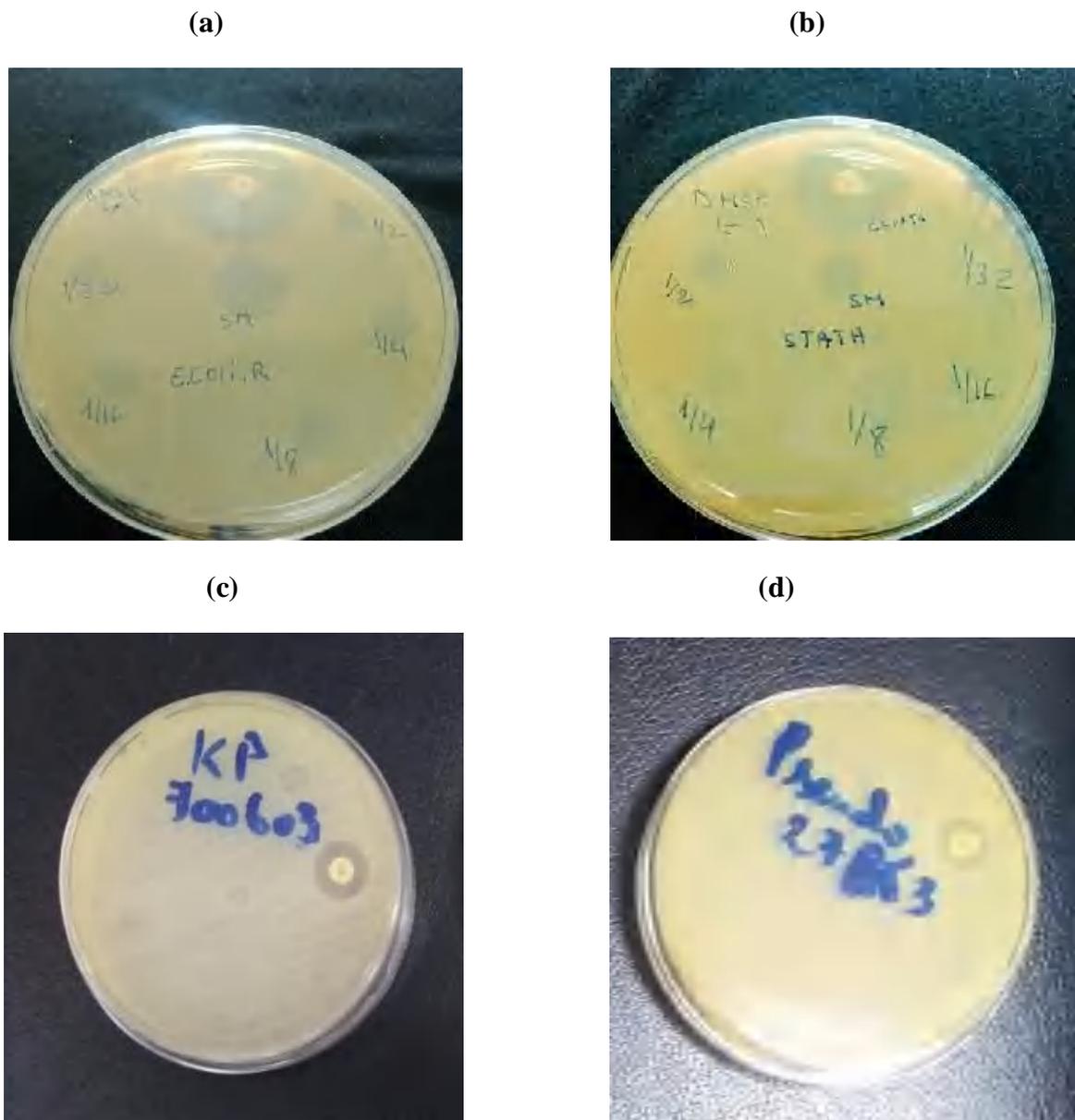


Figure 44. Photographies montrant l'action de l'extrait 1 sur les souches bactériennes : (a) *E.coli*, (b) *S.aureus*, (c) *K. pneumonia*, (d) *P. aeruginosa*.

Le diamètre de la zone d'inhibition observée autour des puits de la solution mère, et leurs dilutions (nous avons réalisé une série de dilution au demi afin d'obtenir une gamme de dilution allant de 60 mg/mL à 1.875 mg/mL) après 24 h d'incubation à 37C, sont reportés dans le tableau 18 suivant :

Tableau 19. Valeurs des diamètres des zones d'inhibition engendrées par l'extrait E1 vis-à-vis des quatre bactéries

| Souches | Témoign négatif (DMSO) | Témoign positif gentamycine | (SM) (mg/mL) 60 | Dilutions (mg/mL) | | | | |
|---|------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | | (1/2) 30 | (1/4) 15 | (1/8) 7.5 | (1/16) 3.75 | (1/32) 1.875 |
| <i>Escherichia coli</i> (G ⁻) | - | 30 mm | 25mm (+++) | 20mm (+++) | 20mm (+++) | 12mm (+) | 8mm (-) | 7mm (-) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (G ⁺) | - | 25 mm | 15mm (++) | 15mm (++) | 7mm (-) | NA | NA | NA |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (G ⁻) | - | 17 mm | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G ⁻) | - | 16 mm | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

mm : millimètre, NA : non active ; SM : solution mère

Rappelons que la lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions autour des disques (Ponce et al., 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

Il ressort du tableau 14 que l'extrait E1 est actif sur les deux bactéries *Escherichia coli* (G⁻) et *Staphylococcus aureus* (G⁺). Cette sensibilité est plus marquée avec *Escherichia coli* qui donne des zones d'inhibitions très importantes (25 et 20mm) pour les concentrations 60, 30, et 15mg/mL, et une inhibition modéré (12mm) à la concentration 7.5 mg/mL. L'extrait E1 a inhibé la croissance de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* avec de diamètre de zone d'inhibition de 15 millimètres pour les deux concentrations 60, 30mg/mL. Par contre aucune activité n'a été observée avec les souches *Klebsiella pneumoniae* (G⁻) et *Pseudomonas aeruginosa* (G⁻).

Jusqu'à nos jours, très peu de recherches concernant les activités antibactériennes du champignon *Pleurotus eryngii* ont été étudiés. Citons à titre d'exemple, l'eryngéolysine qui est une hémolysine produite par PE, ayant effets antibactériens à l'égard du genre *Bacillus* (Ngai & Ng, 2006).

Des extraits protéiques de quelques espèces du genre *Pleurotus* dont *Pleurotus eryngii* ont été testés pour leur activité inhibitrice de croissance *in vitro* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 et *Escherichia coli* ATCC10536. Toutes les espèces de *Pleurotus* analysées ont inhibé les microorganismes testés à des degrés divers (Schillaci et *al.*, 2013).

Conclusion

générale

Aujourd'hui, les aliments fonctionnels suscitent un grand intérêt car, en plus de fournir les avantages nutritionnels de base, ils ont un impact positif sur la santé humaine. Depuis l'Antiquité, la nutrition et les valeurs de prévention des maladies du champignon *Pleurotus eryngii* ont été mis en évidence, mais ils demeurent encore relativement peu étudié et ne connaît pas d'application en médecine traditionnelle dans notre pays.

De par ces valeurs nutritionnelles et thérapeutiques nous avons choisi de travailler sur ce champignon comestible sauvage du nord-est d'Algérie, avec l'objectif de réaliser une étude phytochimique spécifique aux alcaloïdes suivie d'une étude de leurs activités biologiques.

Concernant l'étude phytochimique, à partir des résultats positifs du screening phytochimique spécifique des alcaloïdes de *P. eryngii*, nous avons utilisé deux méthodes d'extractions liquide-liquide des alcaloïdes, basées sur la différence de solubilité de ces derniers en milieux acide et alcalin et ce par l'utilisation de solvants organiques apolaires (E1) et polaires (E2). En faisant appel à des techniques d'identification de pointe telles que la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone, nous avons pu identifier la structure de quatre molécules purifiés à partir des deux extraits E1 et E2, dont deux sont des acides gras : l'acide linoléique et l'acide oléique, un triglycéride et une de nature alcaloïdique correspondant au N-acétyltryptamine.

D'un point de vue phytochimique, cette identification structurale correspond à une première citation de ces 4 molécules à l'état naturel à l'égard du champignon *P. eryngii*. Il s'agit donc d'une contribution tout à fait originale pour l'espèce et pour la littérature.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes aussi penchés sur l'évaluation de certaines propriétés biologiques des extraits alcaloïdiques E1 et E2 et de l'alcaloïde N-acétyltryptamine (NAT) issus de ce champignon. Dans ce contexte une étude sur l'inhibition des deux enzymes l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) fut menée à partir des deux extraits E1 et E2 et la NAT en faisant appel à la méthode d'Ellman sur microplaques. Les résultats montrent que nos extraits (E1, E2) et NAT étaient actifs contre l'AChE avec des IC_{50} : 15.79 ± 1.21 , 21.43 ± 0.38 et 23.32 ± 1.04 $\mu\text{g/mL}$ respectivement, mais moins actifs que la galantamine (molécule de référence) dont l' IC_{50} : 6.27 ± 1.15 $\mu\text{g/mL}$. Aucune activité n'a été observé pour l'extrait E2 et NAT contre l'enzyme BChE,

alors que E1 a présenté une bonne activité inhibitrice contre la BChE avec une $IC_{50}=47,76\pm 0,64$ $\mu\text{g/mL}$ qui malheureusement reste plus élevée que celle de la galantamine dont l' $IC_{50}=34,75\pm 1,99$ $\mu\text{g/mL}$. Dans le but d'étudier le mode de liaison possible de la N-acétyltryptamine et de la galantamine dans le site actif de l'AChE, nous avons réalisé une étude *in silico* par docking moléculaire en utilisant le programme GOLD version 5.2.2. Les données expérimentales (*in vitro*) de l'activité inhibitrice de la NAT et de la galantamine à l'égard de l'AChE ont montré un accord satisfaisant avec les résultats du docking moléculaire. L'analyse *in silico* des propriétés ADMET de NAT en comparaison avec celles de la galantamine a conduit à des résultats positifs en faveur de son utilisation en tant qu'inhibiteur potentiel de l'AChE sans risque majeur de biodisponibilité par voie orale ou de toxicité. Afin d'améliorer le pouvoir inhibiteur du NAT à l'égard de l'AChE, nous avons réalisé *in silico* des modifications structurales du NAT, et parmi les structures réalisées, trois composés 1, 2 et 3 ont présenté des affinités nettement supérieures à celle du NAT et même à celle de la galantamine (scores générés par le programme Gold : 66.60, 64.16, 63.71, 51.64 et 57.02 respectivement). Les composés 1 et 2 ont présenté des profils ADMET favorables, pour une application biologique, en tant que candidat médicament. En revanche les résultats de la toxicité potentiels du composé 3 ont montré que ce dernier a présenté des risques élevés envers la sensibilisation cutanée et la toxicité respiratoire.

Dans cette étude, nous rapportons que l'extrait alcaloïdique E1 de ce champignon est un puissant activateur du facteur de transcription Nrf2. Connaissant le rôle crucial joué par Nrf2 et du fait que son activité décline avec l'âge, l'activation de Nrf2 apparaît comme une stratégie thérapeutique importante pour lutter contre les troubles neurologiques où le stress oxydatif est omniprésent.

Fait important, nous avons examiné les niveaux d'expression génique de l'extrait E1 induisant une régulation positive du Nrf2 par la méthode ARNm-seq. L'analyse génique de notre extrait confirme les résultats observés sur l'activité de Nrf2 avec une expression plus élevée de ce facteur. Plusieurs gènes, leur expression a été modifiée positivement sous l'effet de l'extrait E1, notamment les gènes de défense contre le stress oxydatif, les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, les gènes responsables de la réplication de l'ADN et l'apparition du cancer.

De plus, E1 a induit l'expression différentielle des gènes de la voie de la ferroptose, qui faut-il le souligner est devenue un domaine de recherche intéressant en tant que nouvelle alternative pour le traitement du cancer et de gestion des maladies neurodégénératives, où le facteur de transcription Nrf2 joue un rôle prépondérant dans la régulation de la ferroptose.

Enfin le test d'activité antibactérienne de l'extrait E1 sur quatre souches : *Klebsiella pneumoniae* (G⁻), *Pseudomonas aeruginosa* (G⁻), *Escherichia coli* (G⁻) et *Staphylococcus aureus* (G⁺), a montré que cet extrait est actif uniquement sur les deux bactéries *Escherichia coli* (G⁻) et *Staphylococcus aureus* (G⁺).

Nos résultats apportent un soutien encourageant à la consommation du champignon *Pleurotus eryngii* en raison de ses propriétés bénéfiques, il peut être revendiqué comme aliment fonctionnel.

Les résultats de ce travail ouvrent un large champ d'étude dans le cadre de la valorisation du champignon *Pleurotus eryngii*, dont les activités biologiques n'ont fait l'objet d'aucune étude préalable.

Dans le prolongement de ce travail :

- Il conviendrait d'identifier un plus grand nombre d'alcaloïdes et d'autres métabolites secondaires afin d'atteindre de nouvelles structures, notre étude ici n'étant qu'initiale.

- L'extrait E1 présentant une bonne activité sur Nrf2, suggère ainsi que des efforts supplémentaires de purification de molécules sont à fournir afin d'identifier des composés avec une forte induction d'activation.

- Nos résultats ouvrent des perspectives sur l'utilisation de la N-acétyltryptamine comme composé clé pour le développement de candidats médicaments ciblant l'AChE, en améliorant son pouvoir inhibiteur avec moins d'effets indésirables. L'étude des modifications structurales du NAT, n'étant qu'initiale, une étude expérimentale complémentaire *in vitro* et/ou *in vivo* devra permettre de vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

- Réaliser des études *in vivo* complémentaires aux études *in vitro* réalisées.

Références

bibliographiques

A

Abedini, A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit.(Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse doctorat d'université de la Santé-Lille II. France.

Ag, L. (2002). Acides gras alimentaires et cancers : état des connaissances et perspectives. *nutrition et acides gras*, 26:149-157.

Ahmad, S., Waheed, Y., Ismail, S., Bhatti, S., Abbasi, S.W., & Muhammad, K. (2021). Structure-based virtual screening identifies multiple stable binding sites at the RecA domains of SARS-CoV-2 helicase enzyme. *Molecules*, 26.

Akiyama, M., Unoki, T., Shinkai, Y., Ishii, I., Ida, T., Akaike, T., Kumagai, Y. (2019). Environmental Electrophile-Mediated Toxicity in Mice Lacking Nrf2, CSE, or Both. *Environmental Health Perspectives*, 127(6), 67002.

Akyuz, M., & Yildiz, A. (2008). Evaluation of cellulosic wastes for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. *Afr. J. Biotechnol*, 7, 10.

Alam, N., Yoon, K. N., Lee, J. S., Cho, H. J., Shim, M. J., & Lee, T. S. (2011). Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(4), 403–409.

Anthony Boulant, (2009). Contribution à la caractérisation de poudres micro et nanostructurées de $\text{Li}_0,3\text{La}_0,570,13\text{T iO}_3$ par RMN ^1H et ^7Li . Importance de l'échange ionique Li^+/H^+ . Thèse de doctorat de l'université du Maine. France.

Aniszewski, T. (2007). Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Application and Ecological Role. Ed. *Elsevier*, 316 p.

Atanasova, M., Stavrakov, G., Philipova, I., Zheleva, D., Yordanov, N., & Doytchinov, I. (2015). Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design,

synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 5382-5389.

B

Backlund, P. S., Urbanski, H. F., Doll, M. A., Hein, D. W., Bozinoski, M., Mason, C. E., Coon, S. L., & Klein, D. C. (2017). Daily Rhythm in Plasma N-acetyltryptamine. *Journal of Biological Rhythms*, 32(3), 195–211.

Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat d'université de Bamako. École doctorale des sciences fondamentales. Mali.

Baird, N. L., Bowlin, J. L., Cohrs, R. J., Gilden, D., & Jones, K. L. (2014). Comparison of varicella-zoster virus RNA sequences in human neurons and fibroblasts. *Journal of Virology*, 88 (10), 5877–5880.

Barak, D., Kaplan, D., Ordentlich, A., Ariel, N., Velan, B., & Shafferman, A. (2011). The Aromatic “Trapping” of the Catalytic Histidine Is Essential for Efficient Catalysis in Acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 41, 8245-8252.

Bellettini, M. B., Bellettini, S., Fiorda, F. A., Pedro, A. C., Bach, F., Fabela-Morón, M. F., & Hoffmann-Ribani, R. (2018). Diseases and pests noxious to *Pleurotus* spp. mushroom crops. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50(2), 216–226.

Bernard, P.F. (2003). Beans, roots and leaves: a history of the chemical therapy of Parkinsonism. Thèse de doctorat de l'université de Bavière Julius Maximilian, Würzburg. Allemagne.

Biondi, D., Cianci, P., Gerad, C., Rubertof, G., and Piattelli, M. (1993). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Sicilian Aromatic Plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 8, 331–337.

Boisselier, M.C., & Raymond, B. (2011). Contribution de l'étude du polymorphisme enzymatique à la systématique des Pleurotes des Ombellifères. *Canadien Journal of Botany*, 64 (7), 1467-1473.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, Phytochimie - Plantes médicinales- Techniques et documentations, 2ème Edition, *Lavoisier*, 1120 pages.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie - Plantes médicinales- Techniques et documentations, 3ème Edition, *Lavoisier*, 1120 pages.

Burley, C., Berman, S. K., Christie, H. M., Duarte, C., Feng, J. M., Westbrook, Z., & Zardecki, J. (2017). Tools for Protein Science. *Protein Sci.* 3730.

C

Chaput, L., Martinez-Sanz, J., Saettel, N., & Mouawad, L. (2016). Benchmark of four popular virtual screening programs: construction of the active/decoy dataset remains a major determinant of measured performance. *J Cheminform*, 8, 56.

Chen, J., Mao, D., Yong, Y., Li, J., Wei, H., & Lu, L. (2012). Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*, 130 (3), 687–694.

Chen, J., Yongjian, Z., Yongcheng, W., Ping, J. Guofeng, Z. Zhaoyu, L., Jinlong, Y.g., & Xiao, L. (2021). Potential mechanisms of Guizhi decoction against hypertension based on network pharmacology and Dahl salt-sensitive rat model. *Chin. Med*, 16, 1–19.

Cohen, N., Cohen, J., Asatiani, MD., Varshney, V.K., Yu, H.T., Yang, Y.C., Li, Y.H., Mau, J.L., & Wasser, SP. (2014). Chemical composition and nutritional and medicinal value of fruit bodies and submerged cultured mycelia of culinary-medicinal higher Basidiomycetes mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16 (3), 273-291.

Cordell, G.A. (1981). Introduction to alkaloids, a biogenetic approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72, 1055.

Cuvelier, C., Cabaraux, J. F., Dufresne, I., Hornick, J. L., & Istasse, L. (2004). Acides gras: Nomenclature et sources alimentaires. *Annales de Médecine Veterinaire*, 148(3), 133–140.

D

Daoyuan, R., Ning, W., Jianjun, G., Li, Y., & Xingbin, Y. (2016). Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharides and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells. *Elsevier :Carbohydrate Polymer*, 138, 123–133.

Darvesh, S., Grantham, D.L., & Hopkins, D.A. (1998), Distribution of Butyrylcholinesterase in the Human Amygdala and Hippocampal Formation, *Journal of Comparative Neurology*, 393, 374–390.

Darvesh, S., Hopkins, D.A., & Geula, C. (2003), Neurobiology of Butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 131–138.

D'Autreaux, B., & Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10), 813-824.

Derabli, C., Boulebd, H., Abdelwahab, A. B., Boucheraine, C., Zerrouki, S., Bensouici, C., Kirsch, G., Boulcina, R., & Debache, A. (2020). Synthesis , biological evaluation and molecular docking studies of novel 2-alkylthiopyrimidino-tacrines as anticholinesterase agents and their DFT calculations. *Journal of Molecular Structure*, 1209, 127902.

De-Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. & Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol*, 7, 725–737.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 2ème Edition. Chichester - New York: John Wiley et Sons Ltd, 507p.

Douguet, D. (2007). Etude des interactions protéine-protéine et protéine-ligand par bio- et chimie-informatique structurale : Identification de petites molécules bio-actives. Thèse de doctorat d'université de Nice-Sophia Antipolis. France.

Du, Y., Liu, X., Zhu, X., Liu, Y., Wang, X., & Wu, X. (2020). Activating transcription factor 6 reduces A β 1–42 and restores memory in Alzheimer's disease model mice. *International Journal of Neuroscience*, 130 (10), 1015–1023.

E

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr.V. & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-90.

G

Gachkar , L., Yadegari, D., Bagher Rezaei, M., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. *Food Chem*, 102, .898-904.

Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., & Niedzielski, P. (2016). Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology*, 242 (5), 723-732.

Ge, Y.C., & Wang, K.W. (2018). New Analogues of Aporphine Alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18 (19), 1590-1602.

Giacobini, E. (2004). Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res*, 50 (4), 433-40.

Goodsell, D. S. Christine, Z., Luigi, D. C., Jose, M. D., Brian, P. H., Irina, P., Joan, S., Chenghua, S., Maria, V., John, D. W., Jasmine, Y. Y., & Stephen, K. B. (2020). RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. *Protein Sci*, 29, 52–65.

Gutberlet, K., & Rudolph, R. (2004) Angiosis carcinomatosa bei Mammatumoren der Hündin-Häufigkeit und Verbindung mit prognostisch wichtigen Faktoren. *Kleintierpraxis*, 41, 473–482.

H

Han, K., Jin, X., Guo, X., Cao, G., Tian, S., Song, Y., & Chang, Y. Z. (2021). Nrf2 knockout altered brain iron deposition and mitigated age-related motor dysfunction in aging mice. *Free Radic Biol Med*, 162, 592-602.

Hanson, J.R. (2003). Natural products: the secondary metabolites. *Royal Society of Chemistry*. (ISBN : 0854044906).

Harborne, J.B. (1998). Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. *Thomson science. Ed. Chapman and Hall*, London.

Harel, M., Quinn, D. M., Nair, H. K., Silman, I., & Sussman, J. L. (1996). The X-ray Structure of a Transition State Analog Complex Reveals the Molecular Origins of the Catalytic Power and Substrate Specificity of Acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc*, 118, 2340-2346.

Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P. H., Silman, I., & Sussman, J. L. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 90 (19), 9031.

He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., & Qi, L. (2010). Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expression*, 15(1), 13–25.

Heberle, G., & deAzevedo, W. F. (2011). Bio-Inspired Algorithms Applied to Molecular Docking Simulations. *Curr. Med. Chem.*, 18, 1339–1352.

Herbert, R.B. (2003). The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 494–508.

Hesse, M. (2002). Alkaloids : Nature's Curse Or Blessing?. John Wiley & Sons. Edition, illustrated, Publisher, *John Wiley & Sons*, (ISBN, 3906390241, 9783906390246 ; Length, 413 pages).

Hibbett, D. S., Bauer, R., Binder, M., Giachini, A. J., Hosaka, K., Justo, A., Larsson, E., Larsson, K. H., Lawrey, J. D., Miettinen, O., Nagy, L. G., Nilsson, R. H., Weiss, M., & Thorn, R. G. (2014). Agaricomycetes. In D. McLaughlin, & J. Spatafora (Eds.), *The Mycota: Systematics and Evolution* (2nd ed., Vol. 7A, pp. 373-429).

Hsu, K. D., & Cheng, K. C. (2018). From nutraceutical to clinical trial: frontiers in Ganoderma development. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(21), 9037-9051.

Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., & Graham, C.R. (2005). The orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom*, 40, 430-443.

Huang, C., Santofimia-Castano, P., & Iovanna, J. (2021). NUPR1: A Critical Regulator of the Antioxidant System. *Cancers (Basel)*, 13 (15).

Huang, D. D., Fan, S. D., Chen, X. Y., Yan, X. L., Zhang, X. Z., Ma, B. W., Yu, Z. (2019). Nrf2 deficiency exacerbates frailty and sarcopenia by impairing skeletal muscle mitochondrial biogenesis and dynamics in an age-dependent manner. *Experimental Gerontology*, 119, 61–73.

Huerta, C., Jiang, X., Trevino, I., Bender, C. F., Ferguson, D. A., Probst, B., Swinger, K. K., Stoll, V. S., Thomas, P. J., Dulubova, I., Visnick, M., & Wigley, W. C. (2016). Characterization of novel small-molecule NRF2 activators: Structural and biochemical validation of stereospecific KEAP1 binding. *Biochim. Biophys. Acta*, 1860, 2537-2552.

Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S., & McCord, J. M. (2019). Phytochemical Combination PB125 Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection against Oxidative Injury. *Antioxidants (Basel)*, 8(5), 119.

I

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 313-322.

J

Jau, T. L., Cheng, W. L., Yi-Chen, Chen., Chao-Chin, Hu., Lao-Dar, Juang., Ching Chang, Shiesh., & Deng-Jye, Y. (2014). Chemical composition; antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 374-382.

Jeznabadi, E. K., Jafarpour, M., & Eghbalsaied, S. (2016). King oyster mushroom production using various sources of agricultural wastes in Iran. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 5(1), 17-24.

Jean, B. (2011). Implication de NRF2 dans le métabolisme oxydatif des cellules leucémiques. Thèse de doctorat d'université François Rabelais : Faculté de médecine de Tours. Académie Orléans-Tours. France.

Jiang, Z.Y., Xu, L., Lu, M.C., Chen, Z.Y., Yuan, Z.W., Xu, X.L., Guo, X.K., Zhang, X.J., Sun, H.P., & You, Q.D. (2015). Structure-Activity and Structure-Property Relationship and Exploratory in Vivo Evaluation of the Nanomolar Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction Inhibitor. *J. Med. Chem.*, 58, 6410-6421.

Jie, D., Ning-Ning, W., Zhi-Jiang, Y., Lin, Z., Yan, C., Defang, O., Ai-Ping, L. (2018). ADMETlab a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *J. Cheminformatics*, 29.

Jingjing, C., Yangyang, Y., Meichun, X., Yifan, G., Zhao, Z., Shizhu, Z., & Ling, Lu. (2013). Characterization of polysaccharides with marked inhibitory effect on lipid accumulation in *Pleurotus eryngii*. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 604–613.

Jones, G., Willett, P. & Glen, R.C. (1995). Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology*, 245, 43-53.

Josep, M. (2013). Cultiu extensiu de la gírgola de panical (*Pleurotus eryngii* (D.C. : Fr.) Quél.). Thèse de doctorat d'université de Barcelona. Espagne.

Joshi, G. & A. Johnson, J. (2012). The Nrf2-ARE Pathway: A Valuable Therapeutic Target for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Recent Pat. CNS Drugs Disc*, 7, 218–229.

K

Kalac, P.A. (2013). Review of chemical composition and nutritional value of wildgrowing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (2), 209-218.

Kikuchi, T., Maekawa, Y., Tomio, A., Masumoto, Y., Yamamoto, T., In, Y., Yamada, T., & Tanaka, R. (2016). Six new ergostane-type steroids from king trumpet Kikuchi, T., Maekawa, Y., Tomio, A., Masumoto, Y., Yamamoto, T., In, Y., Yamada, T., & Tanaka, R. (2016). Six new ergostane-type steroids from king trumpet mushroom (*Pleurotus eryngii*) and their inhibitory ef. *Steroids*, 115, 9–17.

Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2010). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov*, 3, 935 - 949.

Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., Pendlebury, W.W., Davis, C.S., Gracon, S.I., Apter, J.T., Lazarus, C.N., Baker, K.E., & Barnett, M. (2000).

A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *Jama*, 271, 985–991.

KoneKouwelton, P. F. O. (2018). Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne. Thèse de doctorat d'Ecole doctorale polytechnique. Institut national polytechnique. France.

Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toker, L., Velan, B., & Lazar, A. (2000), Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snakevenom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 56, 1385- 1394.

Kwasnieski, O. (2010). Etude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun. Thèse de doctorat d'université : Pierre et Marie Curie. France.

L

Larbi, N. B., Angelo, B., Gabriele, G., Marco, D., Canini, A., & Atik, F. (2019). GC / MS analysis , and antioxidant and antimicrobial activities of alkaloids extracted by polar and apolar solvents from the stems of *Anabasis articulata*. *Medicinal Chemistry Research*, 28, 754–767.

Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., & Masson, P. (2005). Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, 70 (11), 1673-1684.

Li, S., & Shah, N. P. (2016). Anti-inflammatory and anti-proliferative activities of natural and sulphonated polysaccharides from *Pleurotus eryngii*. *Journal of Functional Foods*, 23, 80–86.

Li, S., & Shah, N. P. (2017). Sulphonated modification of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 and antioxidant activities investigation using CCD and Caco-2 cell line models. *Food Chemistry*, 225, 246–257.

Li, X., Feng, T., Zhou, F., Zhou, S., Liu, Y., Li, W., Ye, R., & Yang, Y. (2015). Effects of drying methods on the tasty compounds of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*, 166, 358-36.

Lin, J. T., Liu, C. W., Chen, Y. C., Hu, C. C., Juang, L. D., Shiesh, C. C., & Yang, D. J. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 374–382.

Lockridge, O. (2015). Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther*, 148, 34–46.

Loudon, A.G., & Maccoll, A. (1970). The mass spectrometry of the double bond. *The chemistry of the Alkenes*, (2) 1970 327–358.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., & Feeney, P.J.(2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46, 3-26.

Lynch, T.J., Mattes, C.E., Singh, A., Bradley, R.M., Brady, R.O. & Dretchen, K.L. (1997). Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145 (2), 363-371.

M

Ma, G., Yang, W., Mariga, A. M., Fang, Y., Ma, N., Pei, F., & Hu, Q. (2014). Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. *Carbohydrate Polymers*, *114*, 297–305.

Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E.X., & Zerlin, M. (2001). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*, *49*, 279–288.

Magesh, S., Chen, Y. & Hu, L. (2012). Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Medicinal research reviews*, *32*(4), 687-726.

Mangoni, M., Roccatano, D., & DiNola, A. (1999). Docking of flexible ligands to flexible receptors in solution by molecular dynamics simulation. *Proteins Struct. Funct. Genet*, *35*, 153–162.

Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chemistry*, *65*(4), 477–482.

Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: Nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, *84*(2), 201–206.

Masson, P., Legrand, P., Bartels, C.F., Froment, M.T., Schopfer, L.M. & Lockridge, O. (1997). Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylcholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, *36* (8), 2266-2277.

Mathieu, A. (2020). Contribution à l'étude de l'origine naturelle du tramadol et étude phytochimique de deux plantes alpines. Thèse de doctorat d'université Grenoble Alpes. France.

McCord, J. M., Hybertson, B. M., Cota-Gomez, A., Geraci, K. P., & Gao, B. (2020). Nrf2 Activator PB125((R)) as a Potential Therapeutic Agent against COVID-19. *Antioxidants (Basel)*, 9(6).

Mccord, J. M., Hybertson, B. M., Cota-gomez, A., Gao, B., & Bioscience, P. (2020). *Nrf2 Activator PBI25 ® as a Potential Therapeutic Agent Against COVID-19*. 1–16.

McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J.D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *The Journal of biological chemistry*, 279 (30), 31556-67.

Meriane, D. (2018). Etude biologique et phytochimique de *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E. van Wyk. Thèse de doctorat de l'université Ferhat Abbas Sétif 1. Algérie.

Michael, J.P. (2003). Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Product Reports*, 20, 476-493.

Michael, J.P. (2004). Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Product Reports*, 21, 650–668.

Michael, J.P. (2003). Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*, 20, 458–475.

Michael, J.P. (2004). Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*, 21, 625–649.

Miyazawa, M., & Usami, A. *Character impact odorants from mushrooms [Pleurotus citrinopileatus , Pleurotus eryngii var . ferulae , Lactarius hatsudake , and Hericium erinaceus (Bull .: Fr .) Pers .]. Japanese traditional food*. 50(2), 1–24.

Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y.W. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that

binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9926-30.

Mokrani, E. H. (2020). Identification par criblage virtuel et analyses biologiques de la maladie d'Alzheimer. Thèse doctorat d'université : Frères Mentouri Constantine 1. Algérie.

Mokrani, E. H., Bensegueni, A., Chaput, L., Beauvineau, C., & Djeghim, H. (2019). Identification of New Potent Acetylcholinesterase Inhibitors Using Virtual Screening and In Vitro Approaches. *Molecular informatics*, 38, 1–11.

Mollerup, H.M. & Gätke, M.R.(2011). Butyrylcholinesterase gene mutations in patients with prolonged apnea after succinylcholine for electroconvulsive therapy. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 55(1), 82-88.

Morris, G., Berk, M., Carvalho, A. F., Maes, M., Walker, A. J., & Puri, B. K. (2018). Why should neuroscientists worry about iron? The emerging role of ferroptosis in the pathophysiology of neuroprogressive diseases. *Behav Brain Res*, 341, 154-175.

N

Nettlon, D.O., & Einolf, H.J (2011). Assessment of Cytochrome P450 Enzyme Inhibition and Inactivation in Drug Discovery and Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 382-403.

Ng, T. B., & Wang, H. X. (2004). A novel ribonuclease from fruiting bodies of the common edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 25(8), 1365–1368.

Ngai, P. H. K., & Ng, T. B. (2006). A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(6), 1185–1191.

Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., & Hayes, J.D. (2003). Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD (P)

H: quinine xidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J*, 374, 337.

Nuhu, A., Ki, N. Y., Jae, S. L., Hae, J. C., Mi, J. S., & Tae, S. L. (2011). Dietary effect of pleurotus eryngii on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 403-409.

O

Obtenir, P. (2020). Modèles poisson zèbre de l' intoxication aux organophosphorés cholinergiques et neuropathiques et évaluation de l' efficacité d' antidotes. Thèse de doctorat d' université de Bordeaux. France.

Oei, P., & Nieuwenhijzen, B. van. (2005). *La culture des champignons à petite échelle La culture des champignons à petite échelle* (Issue 40) (Première édition : 2005).

Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., & Franken, S.M. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5, 197-211.

Ophélie., K. (2013). Etude théorique de la réactivation de l' AChE inhibée par le tabun. Thèse de doctorat d' université : Pierre et Marie Curie – Paris. France.

Ordentlich, A., Barak, D., Sod-Moriah, G., Kaplan, D., Mizrahi, D., Segall, Y. et al. (2004), Stereoselectivity toward VX is determined by interactions with residues of the acyl pocket as well as of the peripheral anionic site of AChE, *Biochemistry*, **43**(35), 11255-11265.

Oukoloff, K., Coquelle, N., Bartolini, M., Naldi, M., & LeGuevel R. (2019), Design, biological evaluation and X-ray crystallography of nanomolar multifunctional ligands targeting simultaneously acetylcholinesterase and glycogen synthase kinase-3. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 168, 58-77.

Ow, D. W., DE-Wet, J. R., Helinski, D.R., Howell, S.H., Wood, K. V., & Deluca, M. (1986). Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. *Science*, 234, 856–859.

P

Palsson, B. (2000). The challenges of in silico biology. *Nat. Biotechnol*, 18, 1147–1150.

Park, Y.-S., Jang, S., Lee, H., Kang, S., Seo, H., Yeon, S., Lee, D., & Yun, C.-W. (2021). Identification of the Antidepressant Function of the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(3).

Parsons, C.G., Stöffler, A. & Danysz, W. (2007). Memantine: A NMDA Receptor Antagonist That Improves Memory by Restoration of Homeostasis in the Glutamatergic system- too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, 53, 699-723.

Ponce, A.G., Fritz, R., del-Valle, C., & Roura, S.I. (2007). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Food Science and Technology*, 36, 679-684.

Pope, CN., & Brimijoin, S. (2018). Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem Pharmacol*, 153, 205–16.

Pujals, M., Resar, L., & Villanueva, J. (2021). Hmga1, moonlighting protein function, and cellular real estate: Location, location, location! *Biomolecules*, 11(9), 1–14.

Q

Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev*, 87, 955-979.

Quiroga, R., & Villarreal, M.A. (2016). Vinardo: A scoring function based on autodock vina improves scoring, docking, and virtual screening. *PLoS One*, 11, 1–18.

R

Raman, J., Jang, K., Oh, Y., Oh, M., & Im, J. (2020). Cultivation and Nutritional Value of Prominent Pleurotus Spp .: An Overview Cultivation and Nutritional Value of Prominent Pleurotus Spp .: *Mycobiology*, 0(0), 1–14.

Ren, D., Wang, N., Guo, J., Yuan, L., & Yang, X. (2016). Chemical characterization of Pleurotus eryngii polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells. *Carbohydrate Polymers*, 138, 123–133.

Richter, G. (1993). Métabolisme des végétaux–physiologie et biochimie, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne. (ISBN : 2-88074-231-5).

Roberts, M.F., Michael, W. (2013). Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications. *Springer Science & Business Media*, (ISBN: 978-1-4757-2905-4).

Rodrigues, D. M. F., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A. P., Vasconcelos, M. W., Roriz, M., Rodríguez-Alcalá, L. M., Gomes, A. M. P., & Duarte, A. C. (2015). Chemical composition and nutritive value of Pleurotus citrinopileatus var cornucopiae, P. eryngii, P. salmoneo stramineus, Pholiota nameko and Hericium erinaceus. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 6927–6939.

Rodríguez-Seoane, P., Díaz-Reinoso, B., González-Muñoz, M. J., Fernández de Ana Portela, C., & Domínguez, H. (2019). Innovative technologies for the extraction of saccharidic and phenolic fractions from Pleurotus eryngii. *Lwt*, 101, 774–782.

Romagnolo, D. F., Papoutsis, A. J., Laukaitis, C., & Selmin, O. I. (2015). Constitutive expression of AhR and BRCA-1 promoter CpG hypermethylation as biomarkers of ERalpha-negative breast tumorigenesis. *BMC Cancer*, 15, 1026.

Rose, P.W., et al. (2017). The RCSB protein data bank: Integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res*, 45, 271–281.

Rushmore, T.H., Morton, M.R., & Pickett, C.B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*, 266, 11632-11639.

S

Sardar, H., Ali, M. A., Anjum, M. A., Nawaz, F., Hussain, S., Naz, S., & Karimi, S. M. (2017). Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). *Scientia Horticulturae*, 225, 327–334.

Schillaci, D., Arizza, V., Gargano, M. L., & Venturella, G. (2013). Antibacterial activity of mediterranean oyster mushrooms, species of genus *Pleurotus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(6), 591–594.

Sharma, A., Sharma, A., & Tripathi, A. (2021). Biological activities of *Pleurotus* spp polysaccharides. *Food Biochemistry*, 45, 1–16.

Siqian, L., & Nagendra, P. S. (2016). Anti-inflammatory and anti-proliferative activities of natural and sulphonated polysaccharides from *Pleurotus eryngii*. *Journal of Functional Foods*, 23, 80–86.

Song, X., & Long, D. (2020). Nrf2 & Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci*, 14, 267.

Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews : Neurosciences*, 2, 294-302.

Stajic, M., Vukojevic, J., & Duletic-Lausevic, S. (2009). Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 55–66.

Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., & Toker, L. (1991), Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholinebinding protein, *Science*, 253 (5022), 872-881.

T

Tadeusz, A. (2007). Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role, 1ère Edition (ISBN: 9780080475332).

Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 16(2), 123-140.

Taylor, P. (1991). The Cholinesterase. *J. Biol. Chem*, 266, 4025-4028.

Taylor, P., & Radic, Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 34, 281-320.

Thompson, J.M., (2018). Infrared Spectroscopy. 1ère Edition, Jenny Stanford Publishing, (ISBN9781351206037).

Tijani, S. (2016). Etude Phytochimique et Evaluation Biologique de L'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl. Thèse doctorat de l'université des frères Mentouri Constantine 1. Algérie.

Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28 (5), 511–515.

Torre, D., Lachmann, A., & Ma'ayan, A. (2018). BioJupies: Automated Generation of Interactive Notebooks for RNA-Seq Data Analysis in the Cloud. *Cell System*, 7 (5), 556–561

Tyagi, A., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126, 228–235.

U

Uhel, F., Zafrani, L., De, C., Société, D., & De, D. (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation*, 28, 464 - 472.

Urbain, A. (2007). Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de "*Gentianella campestris*" (L.) Börner et "*Gentianella amarella*" (L.) Börner ssp. "*acuta*" (Michx.) J.M. Gillett (Gentianaceae), et "*Peucedanum ostruthium*" (L.) Koch (Apiaceae). Thèse de doctorat d'université de Genève. Suisse.

V

Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015, 376387.

Vellom, D. C., Radic, Z., Li, Y., Pickering, N. A., Camp, S., & Taylor, P. (1993). Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32 (1), 12-7.

Vlahov, G. (1999). Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 35(4), 341–357.

Vollhardt, S. (2004). *Traité de chimie organique*. 4^{ème} Edition De Boeck, pp 1125-1126. France.

Vukojevic, J., & Duletic, S. (2009). Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes. *Review in Biotechnologie*. 29 (1), 55–66.

W

- Wang, H., & Ng, T. B. (2001). Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(3), 750–755.
- Weidenhammer, E., & Tsongalis, G. J. (2005). An overview of molecular genetics. *Mol. Diagnostics Clin. Lab*, 4, 259–266.
- Wei, H., Yue, S., Zhang, S., & Lu, L. (2018). Lipid-Lowering Effect of the *Pleurotus eryngii* (King Oyster Mushroom) Polysaccharide from Solid-State Fermentation on Both Macrophage-Derived Foam Cells and Zebrafish Models. *Polymers (Basel)*, 10(5).
- Wink, M. (1998). Chemical ecology of alkaloids, in: *Alkaloids*. Springer, pp. 265–300.
- Wood, S., & Loudon, A. (2014). Clocks for all seasons: Unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *Journal of Endocrinology*, 222(2).
- Woodruff-Pak, D.S., Vogel, R.W., & Wenk, G.L. (2001). Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 98, 2089–2094.
- Wright, G.D., Sutherland, A.D. (2007). New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends in Molecular Medicine*, 13 (6), 260–7.
- Wu, S., & Chen, L. (2017). Preparation and Antioxidant Activities of Oligosaccharides Derived from *Pleurotus eryngii* Polysaccharides. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), 1–5.
- Wu, T. D., & Nacu, S. (2010). Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*, 26 (7), 873–881.

X

Xu, W., Wang, C., & Hua, J. (2021). X-box binding protein 1 (XBP1) function in diseases. *Cell Biology International*, 45(4), 731–739.

Xue, Z., Li, J., Cheng, A., Yu, W., Zhang, Z., Kou, X., & Zhou, F. (2015). Structure Identification of Triterpene from the Mushroom *Pleurotus eryngii* with Inhibitory Effects Against Breast Cancer. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 291–296.

Xue, Z., Zhai, L., Yu, W., Wang, H., Kou, X., Peng, L., & Hu, D. (2015). Antitumor and Immunomodulatory Activity of *Pleurotus eryngii* Extract. *Journal of Food Biochemistry*, 39(1), 19–27.

Y

Yang, Z. Y., Xu, J., Fu, Q., Fu, X. L., Shu, T., Bi, Y. P. (2013). Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydrate Polymers*, 95, 615–620.

Z

Zanin, R., Pegoraro, S., Ros, G., Ciani, Y., Piazza, S., Bossi, F. & Manfioletti, G. (2019). HMGA1 promotes breast cancer angiogenesis supporting the stability, nuclear localization and transcriptional activity of FOXM1. *J Exp Clin Cancer Res*, 38(1),

Zhang, A., Li, X., Xing, C., Yang, J., & Sun, P. (2014). Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 28–32.

Zhang, D.D., & Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 23, 8137-8151.

Zhang, H., Davies, K. J. A., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 314–336.

Zhaohui, X., Jiaomei, L., Aiqing, C., Wancong, Y., Zhijun, Z., Xiaohong, K., & Fengjuan, Z. (2015). Structure Identification of Triterpene from the Mushroom *Pleurotus eryngii* with Inhibitory Effects Against Breast Cancer. *Plant Foods Hum Nutr*, 70 (3), 291-6.

Zhaohui, X., Lijuan, Z., Wancong, Y., Hua, W., Xiaohong, K., Lvyang, P., & Dongmei, H. (2015). Antitumor and Immunomodulatory Activity of *Pleurotus eryngii* Extract. *Journal of Food Biocchemistry*, 39 (1), 19–27.

Zhiming, F., Zhang, Q., & Yi, L. (2016). Fungal Genomics & Biology A Potent Pharmacological Mushroom : *Pleurotus eryngii*. *Fungal Genomics & Biologie*, 6 (1), 1–5.

Ziar, H., Yahla, I., & Riazi, A. (2022). Conjugated isomers of linoleic acid and health: What about those of bacterial origin. *Nutrition & Santé*, 11(01), 1–11.

*Travaux
scientifiques*

Publications

Soumia Teniou, Abderrahmane Bensegueni, Brooks M. Hybertson , Bifeng Gao, Swapan K. Bose, Joe M. McCord, Benoît Chovelon, Chawki Bensouici, Ahcène Boumendjel, Isabelle Hininger-Favier. Biodriven investigation of the wild edible mushroom *Pleurotus eryngii* revealing unique properties as functional food. *Journal of Functional Foods*. 2022 ; 89 : 104965.

EL Hassen Mokrani, **Soumia Teniou**, Rym Gouta Demmak, Guendouze Assia, Abdelouahab Chikhi, Abderrahmane Bensegueni. Molecular Docking and Drug Likeness Prediction of New Potent Sars Cov-2 Main Protease Inhibitors. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*. 2022 ; 14 : 111-116.

El Hassen Mokrani, Abdelhak Djekrif, **Soumia Teniou**, Yousra Nouadri, Rym Gouta Demmak, Abdelouahab Chikhi, Abderrahmane Bensegueni. Virtual screening and drug likeness prediction of new potent TMPRSS2 inhibitors as a potential treatment of COVID-19. *South Asian Journal of Experimental Biology*. 2022; 12: 533-539.

Mokrani El Hassen, Abdelaziz Mohamed Amine, Akakba Naamane, **Teniou Soumia**, Rym Gouta Demmak, Bensegueni Abderrahmane. Molecular Docking and Drug-likeness Prediction of New Potent Tubulin Colchicine Binding Site Inhibitors for Potential Antitumor Drug. *Cumhuriyet Science Journal*. 2022; 43: 398-403.

Benhamoud Amina, Boufrah Mohsane, Mokrani El Hassen, **Teniou Soumia**, Bensegueni Abderrahmane. Research of New Class C beta-Lactamase Inhibitor by Molecular Docking's Method. *Journal of Computational Methods in Molecular Design*. 2017; 7 : 26-32.

Communications

Soumia Teniou, Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, Abdelouahab Chikhi. Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase pour le traitement du cancer du sein. The first national seminar of bioactive molecules entitled :

Valorisation of medicinal plants to fight cell damage. Oum El Bouaghi. 18 et 19 novembre 2019.

I. Hininger-Favier, **S. Teniou**, A. Benseguenic, C. Bensouici, B. Chovelon, A. Boumendjel. Trace Element Investigation of the wild edible mushroom *Pleurotus eryngii*. 8th FESTEM CONGRESS held. Madrid, Spain. September 28th to 1st October, 2022.

Guendouze Assia, **Soumia Teniou**, Mokrani El Hassen, Benabid Malak, Benlaib Nerdjes. Identification *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la monoamine oxydase B pour le traitement de la maladie de Parkinson. Journées nationales en : Biotechnologies et Bioinformatique. Constantine. 10 et 11 octobre 2022.

Cheima Djehiche, **Soumia Teniou**, Nadia Benzidane, Lekhmissi Arrar. Extraction des alcaloïdes et évaluation d'activité antimicrobienne du champignon *Pleurotus eryngii*. 1^{er} séminaire national de phytochimie, pharmacognosie et phytothérapie. Batna.

Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, **Soumia Teniou**, Rym Gouta Demmak. Identification par docking moléculaire et analyses biologiques de nouveaux inhibiteurs de la butyrylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'alzheimer. Séminaire international sur la chimie organique et pharmaceutique. Skikda. 11 et 12 Octobre 2022.

Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, **Soumia Teniou**, Rym Gouta Demmak. Conception par docking moléculaire et tests biologiques et de nouveaux inhibiteurs de la butyrylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'alzheimer. 1^{er} Séminaire national sur l'évaluation des Activités Biologiques des Plantes Médicinales et Docking Moléculaire SNABPMDM-1. Batna. 22 mars 2022.

Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, **Soumia Teniou**. Identification de nouveaux inhibiteurs de la butyrylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'alzheimer par criblage virtuel et analyses biologiques. 37^{ème} journée nationale de neurochirurgie. Constantine. 15 et 16 décembre 2021.

Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, **Soumia Teniou**. Conception

in silico de nouveaux inhibiteurs de la Transmembranaire Protéase Sérine 2 (TMPRSS2) pour lutter contre le SARS-cov-2. 5^{ème} congrès international de pharmacie hospitalière et oncologique. Hotel marriott, Alger. 09, 10 et 11 décembre 2021.

Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, **Soumia Teniou**, Chawki Bensouici. Identification de nouveaux inhibiteurs de l'Acétylcholinestérase en combinant le criblage virtuel *in silico* et les testes biologiques *in vitro*. *International Bioinformatics day*. Boumerdes. 05 novembre 2019.

Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, **Soumia Teniou**, Chawki Bensouici. Mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'alzheimer. 3^{ème} Congrès de biochimie et de génétique médicales et des 4^{ème} journées de génétique moléculaire. Hotel Marriott, Constantine. 09, 10 mai 2018.

Mokrani El Hassen, Abderrahmane Bensegueni, **Soumia Teniou**, Chawki Bensouici. Criblage virtuel : une nouvelle approche pour la conception de nouveaux médicaments anti-alzheimer. 7^{ème} congrès national de biologie médicale et de médecine de laboratoire. Alger, 07 mai 2018.

Mokrani El Hassen, Abdelaziz Mohamed Amine, Akakba Naamane, **Teniou Soumia**, Bensegueni Abderrahmane. Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Tubiline pour le traitement potentiel du cancer. At the 13th Oncology Meeting. Sheraton Hotel, Algiers. 16-17 December 2021.

Publication



Biodriven investigation of the wild edible mushroom *Pleurotus eryngii* revealing unique properties as functional food

Soumia Teniou^{a,b}, Abderrahmane Bensegueni^a, Brooks M. Hybertson^c, Bifeng Gao^{c,d}, Swapan K. Bose^c, Joe M. McCord^c, Benoît Chovelon^b, Chawki Bensouici^e, Ahcène Boumendjel^{f,*}, Isabelle Hininger-Favier^{d,g,*}

^a Laboratory of Applied Biochemistry, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology Faculty of Natural and Life Sciences, Mentouri Brothers University, Constantine 1, Algeria

^b Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DPM, 38000 Grenoble, France

^c Pathways Bioscience, Aurora, CO, USA

^d University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, USA

^e Laboratory of Biochemistry, Division of Biotechnology and health Biotechnology research Center (CRBt), Constantine, Algeria

^f Univ. Grenoble Alpes, INSERM, LRB, 38000 Grenoble, France

^g Univ. Grenoble Alpes, INSERM, LBFA, 38000 Grenoble, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Pleurotus eryngii
Nrf2
N-acetyltryptamine
Acetyl cholinesterase
Trace elements
Gene expression

ABSTRACT

Pleurotus eryngii (*P. eryngii*) is largely represented among consumed mushrooms. We conducted an investigation dealing with its antioxidant potential, the presence of essential trace elements and its contribution to the management of brain-related disorders. A bio-guided extraction revealed that one extract was highly effective on activation of the nuclear factor Nrf2, the regulator of the cellular resistance to oxidants. Its analysis revealed the presence of *N*-acetyltryptamine (NAT), a precursor of the neurotransmitters, melatonin and serotonin. Both extract and NAT, were found as competitive inhibitors of acetylcholinesterase. The essential trace elements analyses showed the presence of high amounts of zinc. RNA-seq technology confirmed upregulates expression of Nrf2 on HepG2 cells and revealed key genes involved in anticholesterolemic, antioxidant effects, cancer and brain disorders. Our study achieved a comprehensive strengthening of the nutritional health-benefit properties of *P. eryngii* largely used in folk medicines and open perspectives for investigation in food and medicine.

1. Introduction

In nutrition, mushrooms have been widely consumed worldwide, not only because of their distinctive flavors and textures, but also for their medicinal properties. One of the most consumed, is the genus *pleurotus* which comprises a diverse groups of cultivated mushroom species with high nutritional values. Among *Pleurotus* species, *Pleurotus eryngii* (*P. eryngii*) also known as king trumpet or king oyster mushroom is native to southern Europe, North Africa and Middle East. It is widely cultivated worldwide and is considered as one of the most commercially important species in the *pleurotus* genus due to its excellent taste, flavor and longer shelf life. One of the characteristic of wild *P. eryngii* is its growing near the roots of thistle plant (genus *Eryngium*, Family Apiaceae), hence its name *Pleurotus eryngii*. Since ancient times, the nutritional and diseases prevention values of *P. eryngii* were highlighted

(Valverde, Hernandez-Perez, & Paredes-Lopez, 2015). In the past decade, several studies indicated that *P. eryngii* may have several biological functions (Sharma, Sharma, & Tripathi, 2021). The multiple biological functions highlighted above were mostly explained by the presence of polysaccharides, peptides, sterols, vitamins and lipids (Stajic, Vukojevic, & Duletic-Lausevic, 2009).

Being interested by the nutritional and therapeutic values of wild *P. eryngii*, we underwent a global study aiming to bring scientific facts supporting the consumption of this mushroom as a functional food. The main interest of our study was focused on the antioxidant activity potential of this mushroom. Moreover, we were interested by the analyses of essential trace elements that may contribute to vital bodily functions. Finally, our interest focused on the effect of *P. eryngii* on neurotransmission and particularly the cholinergic enzyme, acetylcholinesterase (AChE). Given that *P. eryngii* is not reputed for its high countenance in

* Corresponding authors at: Université Grenoble Alpes, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, 38000 Grenoble, France.
E-mail address: isabelle.hininger@univ-grenoble-alpes.fr (I. Hininger-Favier).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104965>

Received 25 November 2021; Received in revised form 6 January 2022; Accepted 15 January 2022

Available online 22 January 2022

1756-4646/© 2022 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

polyphenols, our HYPOTHESIS was that the potential antioxidant protection of *P. eryngii* might be mediated by other compounds to activate the nuclear transcription factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is known as the regulator of cellular resistance to oxidants as it regulates the expression of many antioxidant enzymes and a wide variety of cytoprotective phase II detoxification enzymes (Zhang et al., 2020). A decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes function is admitted as a critical component of the aging process (Zhang et al., 2020). This leads to the unfortunate situation where aging-related stressors occur during a time of diminished responses. In the present work, we conducted the effect of different extracts of *P. eryngii* on the Nrf2-activation. The active extract was investigated for its phytochemical and trace elements compositions. The active extract and the purified compound isolated from it were investigated as inhibitors of acetylcholinesterase with the aim to shed light on the potential of *P. eryngii* to manage neurological disorders such as dementia, Alzheimer's and Parkinson's diseases. Finally, we conducted deep investigation on the effect of the active extract on human gene expression using RNA-seq technology to identify activated genes and their link to the added-value of this mushroom for the human health.

2. Materials and methods

2.1. Material

Wild *Pleurotus eryngii* was harvested in Hammam-Grouz area near province of Mila (North-East Algeria, 36° 14' 59" north, 6° 17' 10" east). A voucher specimen was deposited at the University of Constantine herbarium under the reference BATS/PE/09.2016. Solvents, sulfuric acid, ammoniac used for the extraction were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and were used as received. Thin-layer chromatography (TLC) used Merck silica gel F-254 plates (thickness 0.25 mm). Flash chromatography column was conducted on Merck silica gel 60, 200–400 mesh. NMR analyses were performed at the University of Geneva on a Bruker Avance III HD 600 MHz NMR spectrometer equipped with a QCI 5 mm Cryoprobe. Chemical shifts are reported in ppm relative to CDCl₃ [¹H: δ (CDCl₃) = 7.27 ppm; ¹³C: δ (CDCl₃) = 77.0 ppm]. Cell culture: media and antibiotics were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). The stably transfected HepG2-ARE Nrf2 reporter gene cell line was kindly provided by Steven Simmons (Simmons, Fan, Yeoman, Wakefield, & Ramabhadran, 2011). Copper, zinc and selenium were determined using a quadrupole ICP-MS Perkin Elmer NexION 2000 (Waltham, MA, USA). AChE (Type-VI-S, EC3.1.1.7, 425.84 U/mg) was purchased from Sigma (St. Louis, MO). 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide and galantamine were obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Germany).

2.2. Extraction procedures

The mushroom material was washed with water, dried at room temperature then grounded to a fine powder. In total, six extracts, namely PEE (1–6) were prepared:

- PEE1 (AcOEt extract): 20 g of *P. eryngii* were mixed with 200 mL of ethyl acetate and the mixture was stirred at 40 °C for 24 h. After filtration, the solution was evaporated at 40 °C under reduced pressure, then dried overnight under vacuum.
- PEE2 (EtOH extract): It was prepared in the same conditions as PEE1 where ethanol (96%) was used as the solvent.
- PEE3 (MeOH Extract): It was prepared in the same conditions as PEE1 where methanol was used as the solvent.
- PEE4 (Supercritical CO₂ extraction): This was realized by Innovation Fluides Supercritiques (Alixan, France) through provision of services. The study was conducted starting from 162.4 g of mushroom powder at 60 °C under 200 bar pressures for 2.5 h.

- PEE5 (Supercritical CO₂ extraction in the presence of EtOH): The material left after PEE4 was subjected to another round of extraction (in the same conditions), in the presence of 10% Ethanol (96%).
- PEE6 (Dichloromethane-NH₄OH Extract): 100 g of *P. eryngii* were mixed with ammonia (NH₄OH 32%, 150 mL) then suspended in dichloromethane (600 mL) and the mixture was stirred for 48 h. After filtration, the solution was acidified by adding sulfuric acid (H₂SO₄, 98%, 50 mL) until pH ~ 2. The aqueous solution was separated and alkalized with NH₄OH (32%, 200 mL). The obtained solution was extracted with dichloromethane (CH₂Cl₂) and the obtained organic solution was washed with H₂O, dried over magnesium sulfate (MgSO₄) then evaporated to provide 300 mg of crude extract.

2.3. Purification of the active extract

The extract PEE6 (250 mg) was submitted to purification by flash chromatography on silica gel eluted with (CH₂Cl₂/MeOH, 100:0 to 80:20) and 8 fractions (100 mL each) were collected. Fraction 3 was subjected to purification on preparative TLC using (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to provide pure compound (R_f = 0.29, CH₂Cl₂/MeOH, 97:3). The pure compound was analyzed by NMR and mass spectrometry and compared to synthetic authentic samples.

2.4. Nrf2 activation assays

For the activation of Nrf2, we used the *in vitro* ARE-Nrf2 Luciferase test for the measurement of the activation of the protective ARE-Nrf2 (Hybertson, Gao, Bose, & McCord, 2019). The extract (50 mg) was solubilized in 1 mL of ethanol and the supernatant was separated to be used for the evaluation of Nrf2 activation. A stably transfected human hepatocellular carcinoma (HepG2-ARE) cell line with an ARE-regulated firefly luciferase gene construct was used (Hybertson et al., 2019). The HepG2 and HepG2-ARE cells were cultured and maintained by standard methods using Opti-MEM medium with 4% fetal bovine serum (FBS) and geneticin/penicillin/streptomycin. The HepG2-ARE cells were seeded (20,000 cells in 400 μL of Opti-MEM medium, 4% FBS, with geneticin/penicillin/streptomycin) in 24-well plates and incubated at 37 °C with 10% CO₂. After 24 h, the cells were treated with the *P. eryngii* extract (0 to 100 μg/mL) for 18 h. The cells were lysed with 100 μL of a lysing buffer that contains 3.5 mM sodium pyrophosphate to stabilize light output by luciferase. The firefly luciferase catalyzes the light-producing oxidation of luciferin in the presence of ATP and oxygen (de Wet, Wood, DeLuca, Helinski, & Subramani, 1987). An aliquot (20 μL) of cell lysate was removed and placed in a BD Monolight® 3010 luminometer (BD Biosciences), background luminescence was measured, then luciferin (50 μL of 1 mM) was injected and luciferase-dependent chemiluminescence was measured and reported as Relative Light Units (RLU).

2.5. Essential trace elements analyses

Copper, zinc and selenium were determined using a quadrupole ICP-MS. The collision cell technology (CCT) was used with only Helium. Mushroom powder was weighted and immediately mineralized at atmospheric pressure in 67% nitric acid for 24 h at room temperature then 24 h in the oven at 60 °C. The mineralization was diluted (1:100) before analysis. Standard solutions were prepared in nitric acid 1% (v/v). ⁶⁵Cu, ⁷⁸Se, ⁶⁶Zn isotopes were measured and ⁸⁹Y at 472 nmol/L was used as internal standard.

2.6. Acetylcholinesterase inhibition

2.6.1. AChE inhibition assays

Acetylcholinesterase inhibitory activity was measured by adaptation of the spectrophotometric method of Ellman. Briefly, 150 μL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0), 10 μL of sample solution at different concentrations and 20 μL AChE (5.32 × 10⁻³ U) solution were mixed

with tested compound at different concentration and incubated at 25 °C for 15 min, then DTBN [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)] (10 µL of 0.5 mM) was added. The reaction was initiated by the addition of 10 µL of acetylthiocholine iodide (0.71 mM). The hydrolysis of the substrate was monitored spectrophotometrically at 412 nm by the formation of yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion. Inhibition of AChE enzyme was determined by comparison of reaction rates of samples relative to blank sample using the formula $[(E-S)/E] \times 100$, where: E is enzyme activity without tested sample; S is the activity in the presence of tested sample. The experiments were carried out in triplicate and galantamine was used as a reference inhibitor of AChE.

2.6.2. Molecular docking

Molecular docking studies were conducted in order to investigate the possible binding mode of the *N*-acetyl tryptamine and galantamine into AChE active site. In this purpose, program GOLD version 5.2.2 in which the target atoms are fixed and the ligands are flexible, was used. The Gold score scoring function was employed for the ranking of molecules according to their score which is given as fitness. Best cluster poses were saved and visually analyzed by PyMol version 2.2.3 (<https://pymol.org>) and Maestro version 11.3 of Schrodinger suite (Maestro, version 11.3, 2015). Before starting the docking process, the 3D coordinates of human AChE (PDB ID: 4MOE) was retrieved from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>). The binding site of this enzyme was defined by selecting all the residues with at least one heavy atom within 6 Å from the inhibitor of the crystal structure. This selection was refined by adding every residue beyond 6 Å considered as essential for the continuity of the cavity. Then, AChE was prepared using Protein Preparation Wizard of Schrodinger by removing their Chain B, water molecules, hetero atoms and co-factors. Hydrogen and missing atoms were added and bonds charges were computed. Finally, the intra-molecular energy was minimized and a mol2 file was exported and used as a starting structure for docking. The 3D structures of the studied compounds were drawn, minimized and exported as mol2 files using Chem3D 16.0 (<http://www.cambridgesoft.com>).

2.7. Gene expression assays

Gene expression in cultured HepG2 cells was measured by mRNA-seq

assay as previously described by three authors of this article (Hybertson et al., 2019).

2.7.1. Cell culture and RNA isolation

HepG2 cells were cultured overnight in 24-well plates with control vs. 60 µg/mL PEE6 extract. The cultured cells were washed twice with PBS in the wells, then total RNA was isolated using Qiagen RNeasy Mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). The RNA concentration of each sample was determined based on the absorbance at 260 nm (A260) using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The integrity of total RNA samples was examined by Agilent Tape Station 4200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

2.7.2. mRNA-seq assay

mRNA-seq Library preparation. 100 ng of total RNA was used to prepare the Illumina NovaSeq libraries according to manufacturer's instructions for NuGEN Universal Plus mRNA-Seq (Tecan Genomics, Redwood City, CA, USA). This kit first isolates mRNA from total RNA using polyA selection, then fragments and primes the mRNA for creation of double-stranded cDNA fragments which are subsequently amplified, size selected, and purified for sequencing cluster generation.

Sequencing. The mRNA template libraries were then sequenced as paired end 150 bp reads on the Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) at the University of Colorado Genomics and Microarray Core facility (Aurora, CO, USA). We sequenced at a depth that provides ~ 40 M 2X150 bases reads per sample.

mRNA-seq profiling. Derived sequences were analyzed by applying a custom computational pipeline consisting of the open-source gSNAP, Cufflinks, and R for sequence alignment and ascertainment of differential gene expression (Baird, Bowlin, Cohrs, Gilden, & Jones, 2014). In short, reads generated were mapped to the human genome (GRCH38) by gSNAP (Wu & Nacu, 2010), expression (FPKM) derived by Cufflinks (Trapnell et al., 2010), and differential expression analyzed with ANOVA in R. Raw data FastQ files were also submitted for genomic analysis using Biojupies (Torre, Lachmann, & Ma'ayan, 2018). Genes significant at an FDR < 0.05 were submitted to pathway analysis using Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Germantown, MD) to identify pathways of interest that were modified by PEE6.

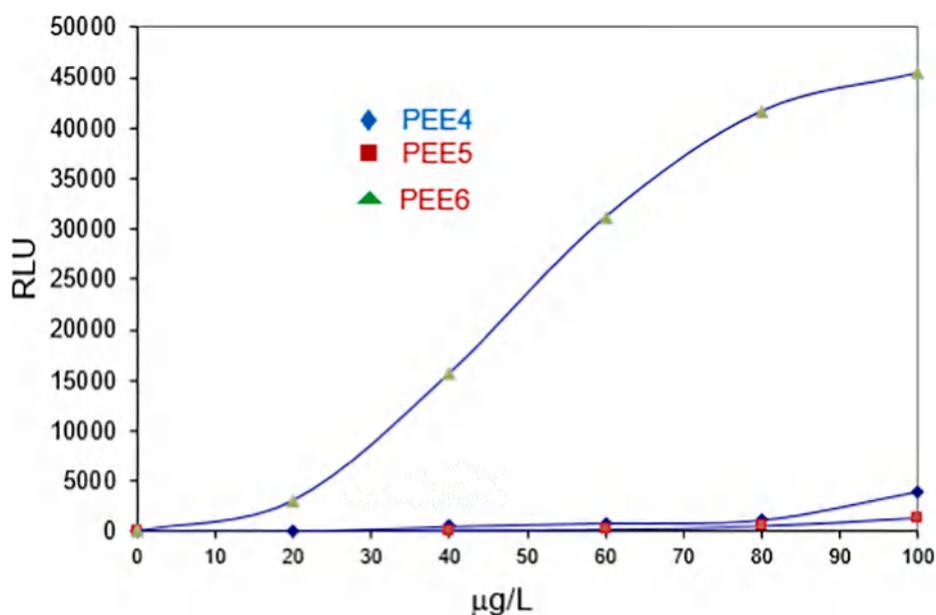


Fig. 1. Nrf2 activation by extracts: PEE4, PEE5 and PEE6. Extracts PEE1, PEE2 and PEE3 were tested in the same conditions and were inactive (data not shown). The extracts were tested at a range of concentration from 0 to 100 µg/L on HepG2 cells line transfected with luciferase gene. Nrf2 activation was measured by following luciferase-dependent chemiluminescence as Relative Light Units (RLU).

2.7.3. Gene ontology and pathway enrichment analysis

Gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) was implemented by the GOrse R packages that was based on a Wallenius non-central hypergeometric distribution, which can adjust for gene length bias in DEGs. Biological pathways are sequences of interactions between biochemical compounds which play a key role in determining cellular behavior. Databases such as KEGG, Reactome and WikiPathways contain a large number of associations between such pathways and genes. These database resources for understanding high-level functions and utilities of the biological system such as the cell, the organism, and the ecosystem from molecular level information, particularly large-scale molecular datasets generated by genome sequencing and other high-throughput experimental technologies were assessed using BioJupies (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30447998>).

2.8. Statistical analysis

All measurements were done at least in triplicate in independent experiments. The data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences were determined by one-way ANOVA and post hoc Tukey multiple comparisons testing, using GraphPad Prism 7.00 Software. A p value < 0.05 was considered statistically significant. Principal Component Analysis (PCA) is a statistical technique used to identify global patterns in high-dimensional datasets. It is commonly used to explore the similarity of biological samples in RNA-seq datasets.

3. Results and discussion

3.1. Extraction of *P. eryngii* and evaluation on the Nrf2 activation

In total, six extracts of *P. eryngii* were prepared, namely PEE (1 to 6). Three of them were made by using ethyl acetate, ethanol and methanol as solvents (PEE1, 2, 3 respectively), two were prepared according to eco-friendly conditions by using supercritical-CO₂ technology (one with supercritical-CO₂ alone and the other with supercritical-CO₂ in the presence of 10% ethanol) (PEE4 & 5). Extract PEE1 (ethyl acetate) is supposed to contain medium polarity compounds such as terpenes. The polar extracts PEE2 and PEE3 (ethanol and methanol extracts, respectively) must contain polar compounds such as polyphenols. Extracts PEE4 and PEE5 (eco-friendly prepared extracts) are supposed to contain roughly the same class of compounds as PEE2 and PEE3. The extract PEE6 was obtained by using dichloromethane in the presence of ammonia. The latter conditions are suited for the selective extraction of alkaloids class of metabolite. All the extracts were screened for the activation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), the key regulator of the cellular antioxidant response. The evaluation of the six extracts revealed that PEE6 is the only one exhibiting the activation of Nrf2 transcription factor pathway (Fig. 1 For PEE1, PEE2 and PEE3, data not shown). The extract exhibits Nrf2 activation in a dose-response manner (up to 100 μ g/mL). Our results are in agreement with a large body of literature showing that *P. eryngii* exhibits good antioxidant activity not only as scavenger (Zhang, Li, Xing, Yang, & Sun, 2014) but also as a regulator of the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx and CAT) (Li & Shah, 2017) which are in accordance with our data on Nrf2 activation. Nrf2 controls the basal and induced expression of antioxidant response element-dependent genes to regulate the physiological and pathophysiological outcomes of oxidant exposure (Hybertson, Gao, Bose, & McCord, 2011). It was demonstrated that knockout of Nrf2 in mice (Nrf2 KO) led to a significant increase of a broad range of chemical toxicity and diseases associated with oxidative stress (Akiyama et al., 2019). Accumulating evidence points to an age-related decline in the ability to respond to oxidative stress with activation on Nrf2 signaling and expression of its target antioxidant genes (Zhang, Davies, & Forman, 2015) and might exacerbate frailty in an age-dependent manner (Huang

Table 1

Inhibition of acetylcholinesterase by PEE6, NAT and galantamine (the reference inhibitor).

| Extract (PEE6) | NAT | | Galantamine |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| IC ₅₀ (μ g/mL) | 15.8 \pm 1.21 ^a | 23.3 \pm 1.04 ^b | 6.3 \pm 1.15 ^c |
| IC ₅₀ (mM) | NA | 0.11 \pm 0.005 ^b | 0.02 \pm 0.004 ^c |

Values expressed are means \pm SEM of three parallel measurements (data not sharing the same letter are statistically different $p < 0.05$). NA (Not applicable).

et al., 2019). Very recently, the activation of Nrf2 by food extracts was proposed as potential therapeutic approach against COVID-19 infection through downregulation of genes coding for spike proteins, necessary for SARS-CoV-2 entry into host cells (McCord, Hybertson, Cota-Gomez, Geraci, & Gao, 2020).

3.2. Purification of PEE6 and structural identification of the isolated compound

PEE6 was purified by flash chromatography to afford one pure compound. The NMR and mass spectrometry analysis (Supplementary Material, Fig. S1) confirmed the structure of the compound to be *N*-acetyltryptamine (NAT) (Table 1). The compound authenticity was confirmed by comparison to a synthetic sample. The other constituents of the extract are unsaturated fatty esters and a mixture of polar compounds. NAT was evaluated on the Nrf2 activation in the same conditions described above (Section 3.1) and did not show relevant activity indicating that the Nrf2 activation observed with PEE6 is not due to the presence of NAT but probably to an unidentified or a combination of compounds in this extract (data not shown).

Very recently, *in vivo* studies conducted on extracts from green-house cultivated *P. eryngii* showed protective effects on Alzheimer disease (AD) and depression (Liang, Huang, Mau, & Chiang, 2020; Zhang et al., 2020) and this activity was linked to the presence of tryptamine (Park et al., 2021). Hence, it would be interesting to investigate the effect of NAT on AD and depression. Otherwise, 4-hydroxy-*N*-methyltryptamine (*N*-methylserotonin) was isolated from mushrooms (Lenz, Wick, & Hoffmeister, 2017). NAT is a structural analog of melatonin (5-methoxy *N*-acetyltryptamine) and its likely to act as evolutionary precursor. It is known from pharmacological studies that NAT is a mixed melatonin receptor agonist-antagonist, albeit with much lower affinity than melatonin (Backlund et al., 2017). Hence, tryptamine and NAT isolated from *P. eryngii* and their very close pattern with melatonin and serotonin suggests their potential link to these neurotransmitters that are involved in appetite, mood and sleep. These observations prompted us to evaluate PEE6 and NAT on acetylcholinesterase, one of the key enzymes involved in the neurotransmission at the cholinergic synapses.

3.3. Effect of the active extract and NAT on acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase (AChE) is a key enzyme in the nervous system that catalyze the hydrolysis of acetylcholine (ACh) that is involved in the neurotransmission at the cholinergic synapses. In humans, AChE is more abundant in the central nervous system, end plate of skeletal muscle and erythrocytes membranes. AChE is a target for various cholinergic toxins, such as natural snake venom and plant glycoalkaloids and also as drug target for therapeutically active compounds, including anti-Alzheimer's disease drugs (AD). In AD, neurofibrillary tangles and amyloid plaques are known to express acetylcholinesterase (Campanari et al., 2014). Therefore, inhibitors of AChE are among the key drugs approved by the

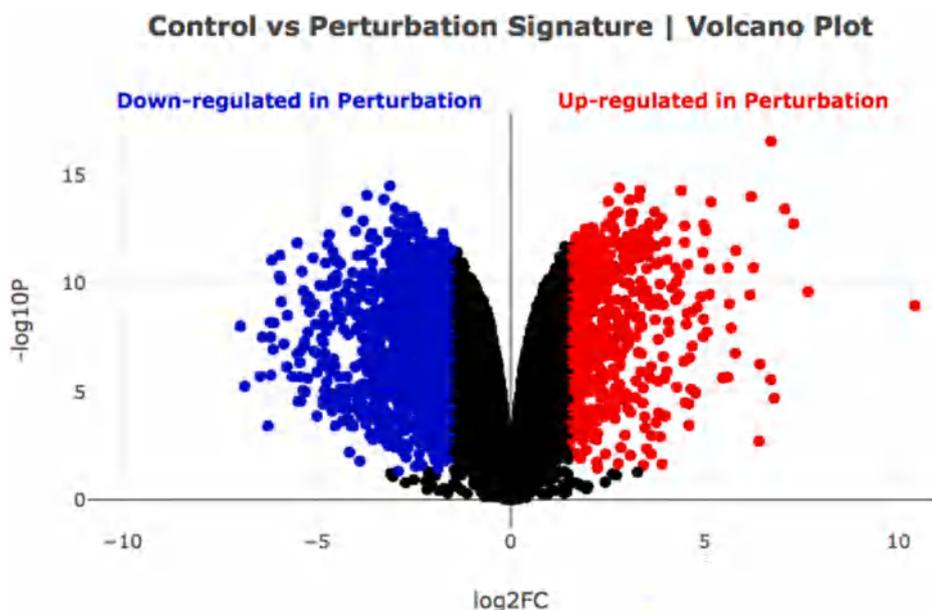


Fig. 2. Effect of PEE6 extract on HepG2 cells. Volcano plot of differentially expressed genes (DEGs) between samples. The X-axis represents fold change of DEGs in different experimental groups; The Y-axis $-\log_{10}$ (adjusted p-value) represents DEGs were more and more significant as the value increases. The dots represent the genes; the black dots indicate non-differentially expressed genes; the red dots represent up-regulated differentially expressed genes; the blue dots represent down-regulated differentially expressed genes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

FDA for management of AD (Hampel et al., 2018). Within this context, food-derived natural products are renewing interest against AD with reference to AChE (Ahmed et al., 2021). Owing to the lack of information regarding the activity of *P. eryngii* on cholinesterase, we evaluated the extract PEE6 and NAT on the inhibition of AChE and compared the activity to galantamine, a known inhibitor of AChE. Tested at seven different concentrations ranging from 3 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, both PEE6 extract and NAT showed a dose response inhibition activity (Supplementary Material, Table S1). At the highest concentration (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PEE6 and NAT induced 86 and 85% inhibition, respectively whereas galantamine has reached 94%. Based on the inhibition activity, the concentration that inhibits 50% of AChE (IC_{50}) was calculated (Table 1). As shown in Table 1, both the extract and NAT were active against AChE. Although, being less active than the reference galantamine, higher activity could be reached if the poor solubility of PEE6 and NAT in the test medium can be optimized. Our results open perspectives on using *N*-acetyltryptamine as a lead compound for development of drug candidates targeting AChE.

Having the 3D-structure of AChE, we conducted molecular docking studies to rationalize the inhibition effect of NAT and compared them to galantamine using the Gold program. The results showed a satisfactory agreement between the experimental and calculated activity (Supplementary Material, Table S2). It was found that NAT covers both the catalytic anionic site (CAS) and the peripheral anionic site (PAS) of AChE (Supplementary Material, Fig. S2). This may explain the difference of the inhibitory potency in comparison with galantamine, which binds only to the CAS. In addition, the difference between these two compounds may be explained by the different number of interactions with the enzyme active site (Supplementary Material, Fig. S3). Indeed, whereas galantamine is involved in four interactions (two π -cation stacking with Trp86 and Phe338, and one hydrogen bond with Gly121), NAT is involved in three interactions (two π - π stacking with Tyr124 and Trp286 and one hydrogen bond with Asp74).

3.4. Analysis of essential trace elements

Trace elements (TEs) are vital for cell functions where they mediate key biochemical reactions by acting as cofactors for many enzymes, as well as stabilizers for structures of enzymes and proteins. TEs can be involved in the control of biological processes by binding to drugs or by alternating the structure of membrane to prevent entry of specific molecules into the cell (Taheri et al., 2021). TEs are supplemented by

food and beverages and recommended daily intake are frequently updated by the world health organization. Among essential TEs, zinc, copper and selenium are considered as the most important. Hence, the contribution of TEs to human health drove us to measure them in *P. eryngii* using the inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The results indicate that this edible wild mushroom has a high level of Zn ($74,34 \pm 5.34$ $\mu\text{g}/\text{g}$ of mushroom), important quantities of Cu ($8,04 \pm 0,29$ $\mu\text{g}/\text{g}$ of mushroom) and selenium Se ($0,33 \pm 0.04$ $\mu\text{g}/\text{g}$ of mushroom). The detected amount of Zinc ranks the king oyster mushroom among the top richest aliments with oyster being the first one. Interestingly, a recent study reported the high efficiency of cultivated *P. eryngii* to concentrate Zn and Se. (Zieba et al., 2020). One can tell that king oyster mushroom has never deserved its name more than it does following this work. *P. eryngii* is known as immunity inducer (Sharma et al., 2021). This property could be explained by the rich content in essential micronutrients such as Cu, Se and Zn. In particular, Zn is a well-known essential trace element for immunity as a cofactor of thymulin. Therefore, *P. eryngii* can be recommended as a functional food to struggle Zn deficiency. Moreover, due to the decrease of TEs status with age as it was recently observed in the EPIC-Potsdam cohort study over a 20-year period (Baudry et al., 2020) and based on the amount of TEs level in *P. eryngii*, a claim as a functional food might be proposed for this mushroom, especially in elderly.

3.5. Analysis of differentially expressed genes (DEGs)

Owing to the effect of PEE6 on the activation of Nrf2, we were interested by its transcriptional effect on human cells. Hence, the human cells (HepG2) were treated with PEE6 at 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, then subjected to RNA extraction and RNA-seq analysis. DEGs between control cells (untreated cells) and those exposed to PEE6 were enriched in the cluster of molecular function. Out of the 14,278 transcripts expressed in samples, 4857 were significantly differentially expressed ($p < 0.05$, fold change up > 1.5 or down < 1.5) between control and treated cells from which 2375 transcripts were upregulated and 2482 transcripts were down-regulated after treatment with PEE6. The volcano plot (Fig. 2) showed a clear distinct effect on gene expression between control cells and cells treated with PEE6.

In order to compare the effect on transcriptome of the active extract PEE6 on Nrf2 with an inactive one, we selected the methanolic extract (PEE3) because of its higher solubility compared to the other extracts. The gene analysis shows less differentially expressed genes (Fig. S3,

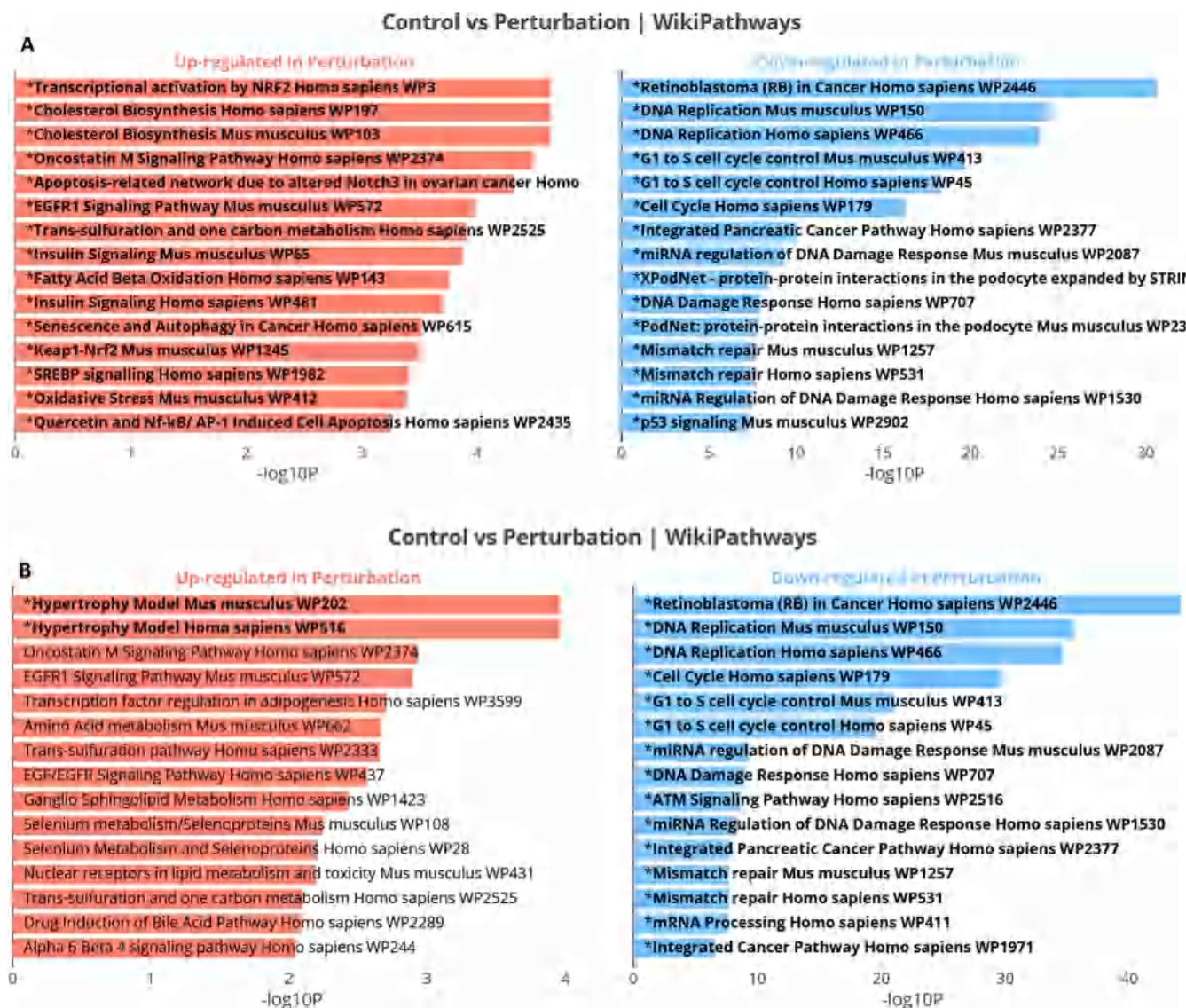


Fig. 3. (A) Genes up- and down- regulated by extract PEE6; (B) genes up- and down- regulated by extract PEE3. The x axis indicates the $-\log_{10}(P\text{-value})$ for each term. Significant terms are highlighted in bold.

Supporting Material). Furthermore, more data confirm the results observed on Nrf2 activity with a higher expression of Nrf2 with PEE6 (Fig. 3A) while Nrf2 is not up-regulated with PEE3 (Fig. 3B). Globally, the number of genes regulated by PEE3 are lower than those affected by PEE6. Furthermore, while the upregulated genes were different between these two extracts, on the contrary, both extracts down-regulate the same genes involved in cell cycle, DNA replication and cancer. This down-regulation effect by *P. eryngii* might be one of the molecular mechanism supporting that consumption of mushrooms lower the risk of cancer (Ba et al., 2021). Finally, it should be mentioned that the differences in the regulatory genes of PEE6 and PEE3 can be related to differences in the components of PEE6 and PEE3. Indeed, extract PEE3 was highly rich in polysaccharides as deduced by ^1H NMR analysis. However, the purification attempts failed to provide pure components.

The main relevant upregulated and downregulated genes were grouped in five clusters (Table 2). The first cluster is related to transcription regulators that converts stress signals into a program of gene expression that empowers cells with resistance to the stress induced by a change in their microenvironment. As expected, Nrf2 and its subunit Keap-1 expressions are upregulated. This result is in accordance with the Nrf2 induced activity observed with this extract (PEE6). Nrf2 can reduce

oxidative damage by regulating the constitutive expression of several antioxidant genes, and maintaining cellular redox homeostasis. The overexpression of HMOX1, the gene encoding for heme-oxygenase-1, in accordance with the Nrf2 upregulation since this antioxidant enzyme is considered a hallmark of Nrf2 activation. HMOX1 is a cytoprotective enzyme induced in response to cell stress. It catalyzes the degradation of heme to biliverdin, carbon monoxide (CO), and Fe^{2+} , and thereby increase iron labile pool to enhance ferroptosis (Chang et al., 2018). Nuclear protein 1 (NUPR1) is a transcription regulator that in response to various types of cellular stress, including endoplasmic reticulum (ER) stress and oxidative stress converts stress signals into a program of gene expression that empowers cells with resistance to the stress induced by a change in their microenvironment. Thus, it participates in regulation of many process namely cell-cycle, apoptosis, autophagy and DNA repair responses (Huang, Santofimia-Castano, & Iovanna, 2021, Huang et al., 2021). Evidence suggests the involvement of NUPR1 in ferroptosis through a variety of regulatory pathways. We will see below that PEE6 is also an inducer of ferroptosis suggesting a network between these signaling pathway. Activating transcription factor 6 (ATF6) is one of the signaling mediators of ER stress and it has been recently be seen as a potential hub for targeting treatment of the Alzheimer's disease [Du

Table 2
Selection of modulated genes following treatment of HepG2 cells with extract PEE6.

| Genes | Proteins | Z - score | Favorable (F) Unfavorable (U) |
|--|--|-----------|----------------------------------|
| <i>Cluster 1: Stress defense</i> | | | |
| <i>Nrf2</i> or <i>NFE2L2</i> | Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 | 4,39 | F |
| <i>Keap-1</i> | Kelch-like ECH-associated protein 1 | 2,31 | F |
| <i>HMOX-1</i> | heme oxygenase (decycling)1 | 4,38 | F |
| <i>NUPR1</i> | Nuclear protein 1 | 4,38 | F |
| <i>XBP1</i> | X-box binding protein 1 | 5,31 | F |
| <i>AFT6</i> | Activating transcription factor 6 | 2,22 | F |
| <i>Cluster 2: Cholesterol metabolism</i> | | | |
| <i>NPC2</i> | Niemann Pick C1 protein | -1,73 | F |
| <i>APOE</i> | ApoE Protein | -0,79 | F |
| <i>SREBF1</i> | Sterol regulatory element-binding Transcription factor 1 | 3,8 | F |
| <i>SCAP</i> | Sterol regulatory element-binding protein Cleavage-activating protein, | -0,82 | F |
| <i>LDLR</i> | LDL receptor proteins | -0,7 | U |
| <i>CYP7A1</i> | Cholesterol catabolism | 1,41 | F |
| <i>PPARG</i> | Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ | 1,42 | F |
| <i>CEPT</i> | Cholesteryl ester transfer protein | 1,28 | F |
| <i>taurine</i> | Taurine | 1,4 | F |
| <i>HDL cholesterol</i> | | -3,16 | U |
| <i>Cluster 3: Skin</i> | | | |
| <i>CollagenaseIV</i> | Collagenase IV | 1,41 | F |
| <i>Collagene(s) complex</i> | Collagene complex | 1,15 | F |
| <i>ATP7B</i> | ATPase Cu ²⁺ transporting beta | 2,53 | F |
| <i>Cluster 4: Inflammation</i> | | | |
| <i>NF-kB</i> | Nuclear factor-kappa B | 1,18 | F |
| <i>IL1B</i> | Interleukine 1 béta | 3,57 | U |
| <i>InFB1</i> | Interferon B protein | -2,63 | F |
| <i>Cluster 5: Cancer</i> | | | |
| <i>HMGA1</i> | High Mobility Group A1 | -2,39 | F |
| <i>BRCA1</i> | Beast-Cancer susceptibility gene 1 | 2 | F |
| <i>ABC-7</i> | ABC Subfamily B Member 7 | 1,31 | F |
| <i>ABC-1</i> | ABC Subfamily B Member 1 | -1,66 | F |

et al., 2020). It might be interesting to decipher if the NAT present in the extract might be involved in the overexpression of AFT6. Interestingly, ATF6 is one of the three major sensors at the endoplasmic reticulum (ER) membrane that are known to initiate the activation of the X-box binding protein 1 (He et al., 2010). Among the other upregulated genes, there is XBP1 (Table 2). XBP1 is one of the most conserved adaptative signaling process in response to endoplasmic reticulum stress (ERS), named unfolding protein response (UPR) (Xu, Wang, & Hua, 2021). UPR avoid accumulation of unfolded or misfolded proteins and maintains intracellular homeostasis and survival.

The second cluster concerns the upregulation of genes of metabolism such as those involved in fatty acid beta-oxidation, insulin signaling and cholesterol metabolism. The data are in agreement with studies revealing the hypolipidemic dietary effect of *P. eryngii* (Wei, Yue, Zhang, & Lu, 2018). Among the pathway activation, the sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) is an important transcriptional factor that bind to specific sterol regulatory element DNA sequences, thus upregulating the synthesis of enzymes involved in sterol biosynthesis. Genes of the cholesterol metabolism are also activated. This include *SCAP* gene coding for protein escort protein SCAP that is required for cholesterol as well as lipid homeostasis and *CYP7A1* gene which codes for the cholesterol 7 alpha-hydroxylase, which play important role in cholesterol metabolism. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase as a P450 enzyme belonging to the oxidoreductase class, converts cholesterol to 7-alpha-hydroxycholesterol, the first and rate-limiting step in bile acid synthesis. It can also be mentioned the up-regulation of the *PPARG* gene, encoding for the protein peroxisome proliferator-activated receptor gamma, a nuclear receptor that binds peroxisome proliferators such as hypolipidemic drugs and fatty acids. Once activated by a ligand, the nuclear receptor binds to DNA specific PPAR response elements (PPRE) and modulates the transcription of its target genes, such as acyl-CoA oxidase. Therefore, it controls the peroxisomal beta-oxidation pathway of fatty acids and is a key regulator of adipocyte differentiation and glucose homeostasis. All these results are in line with the use of this mushroom as cholesterol-lowering food.

The third cluster of genes upregulated by PEE6 concern those involved in skin health such as the activation of collagen. This supports the new trend to consider various pharmacological compounds of mushrooms as a nutraceutical and useful products for healthy skin (Hsu & Cheng, 2018). It is noteworthy to associate to skin other genes such as *ATP7B*, that encodes for a copper transporting P-Type ATPase expressed

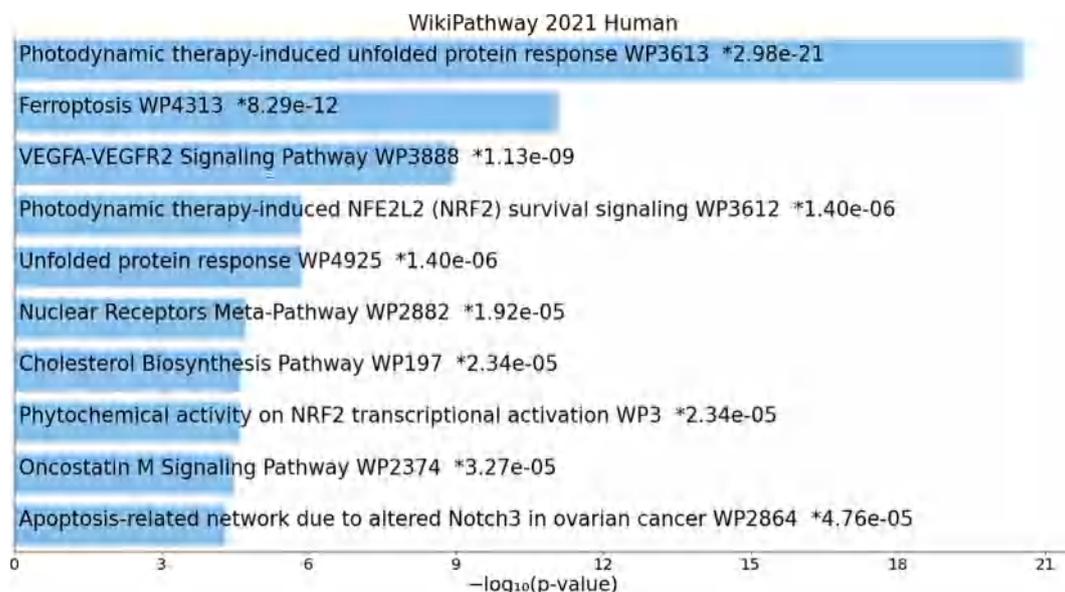


Fig. 4. Gene pathways up-regulated by PEE6 as assessed with pathway enrichment analysis generated using Enrichr. The x axis indicates the $-\log_{10}(P\text{-value})$ for each term.

since copper is an essential micronutrient for collagen synthesis and iron metabolism.

The fourth cluster concern genes involved in inflammation. The IFNB1 (Interferon Beta 1) encodes a cytokine that belongs to the interferon family of signaling proteins, which are released as part of the innate immune response to pathogens. The protein encoded by this gene belongs to the type I class of interferons, which are important for defense against viral infections. The transcription factor NF- κ B is a well-known important regulator of inflammation, which is both favorable and unfavorable for health, depending of its intensity and chronicity.

The fifth and last cluster deals with genes that might be protective against cancer. Among this genes, interestingly we observed activation of the Breast Cancer 1 protein (BRCA1) (Table 2). This tumor suppressor is involved in basic cellular functions necessary for cell replication and DNA synthesis. However, reduced expression of BRCA1, due to mutations or epigenetic inactivation, leads to impaired mammary gland differentiation and increased risk of breast and ovarian cancer development (Romagnolo, Papoutsis, Laukaitis, & Selmin, 2015). Furthermore, PEE6 inhibited HMGA1 an oncogene factor in adults. This architectural transcription factor is highly expressed during embryogenesis, while its expression decreases or is absent in adults. It is expressed in a variety of tumors, including breast cancer (Zanin et al., 2019). The opposite regulation of PEE6 on these factors may indicate a favorable effect of *P. eryngii* as protective agent against breast cancer.

The evaluation of gene pathway enrichment by PEE6 with BioJupies based on Wikipathways data with Enrichr also supported the role of the Nrf2 transcription factor pathway in the differential gene expression data after treatment with PEE6 (Fig. 4). We can assume that PEE6 might have an interest for health brain since Nrf2 is as a well-known target for development of neurodegenerative diseases treatment. Furthermore, PEE6 induced differential gene expression of ferroptosis pathway. In the recent years, ferroptosis has emerged as an interesting research area in the fields of cancer therapy and neurodegenerative diseases management (Morris et al., 2018). The transcription factor Nrf2 is considered to be an important regulatory factor for ferroptosis (Song & Long, 2020). Ferroptosis might participate on indirect apoptotic effect on cells challenged by ROS to prevent initiation. Recently, it was reported that Nrf2 may be a potential therapeutic target in age-related motor dysfunction diseases through its role in regulating brain iron homeostasis (Han et al., 2021).

4. Conclusions

Pleurotus. eryngii also known as the king oyster is an edible mushroom worldwide consumed due to its flavor. Owing to its popularity, it is extensively cultivated worldwide. Due to its richness in fibers, carbohydrates, vitamins and minerals, *P. eryngii* acts as a health beneficial food. Within this study, we report that this mushroom is a strong activator of Nrf2. Knowing the crucial role played by Nrf2 and the fact that its activity declines with age, the activation of Nrf2 is emerging as an important therapeutic strategy for fighting against neurological disorders where oxidative stress is omnipresent. The presence of trace elements such as Zinc in high quantities makes *P. eryngii* as a food that can be recommended among people suffering from Zinc deficiencies. Importantly, we examined gene expression levels by mRNA-seq. We found that the active extract (PEE6) induced upregulation of the Nrf2 transcriptome and interestingly on ferroptosis pathway both might have a key role in the process to prevent neurodegenerative process, but also genes involved in cholesterol metabolism. It will be pertinent to repeat our investigation on cultivated *P. eryngii* in order to promote added-value of this mushroom among consumers. Our results bring support to encourage the consumption of *P. eryngii* due to its beneficial properties as antioxidant through Nrf2 activation and up-regulation, lipid-lowering and immunity modulator due to its richest in trace element. *P. eryngii* can be claimed as a functional food in accordance with the WHO definition that the benefit should not be limited to struggle disease

but to afford a mental well-being.

Ethical Statement for Solid State Ionics

Hereby, I /insert author name/ consciously assure that for the manuscript /insert title/ the following is fulfilled:

- (1) This material is the authors' own original work, which has not been previously published elsewhere.
- (2) The paper is not currently being considered for publication elsewhere.
- (3) The paper reflects the authors' own research and analysis in a truthful and complete manner.
- (4) The paper properly credits the meaningful contributions of co-authors and co-researchers.
- (5) The results are appropriately placed in the context of prior and existing research.
- (6) All sources used are properly disclosed (correct citation). Literally copying of text must be indicated as such by using quotation marks and giving proper reference.
- (7) All authors have been personally and actively involved in substantial work leading to the paper, and will take public responsibility for its content.

The violation of the Ethical Statement rules may result in severe consequences.

To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

CRediT authorship contribution statement

Soumia Teniou and Abderrahmane Bensegueni: Conceptualization, Methodology and validation of the extractions procedures. **Isabelle Hininger-Favier, Brooks Hybertson, Bifeng Gao, Swapon Bose, Joe McCord:** Coordination of the study, conceptualization of the Nrf2 study and gene expression studies, Data analysis, writing, review & editing. **Chaouki Bensouici:** Designed and conducted the inhibition activity on AChE. **Ahcène Boumendjel:** Conceptualization, work-coordination, Methodology, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

Authors thank Dr Aik Choon Tan from Dept. biostatistics and bioinformatics. Moffitt Cancer Center, Tampa, FL USA for the statistical analysis, Dr. Mathieu Agostini for remaking extracts of *P. eryngii*. We thank Dr. Laurence Marcourt, Dr. Emerson Ferreira Queiroz and Prof. Jean-Luc Wolfender from the University of Geneva for the analytical support during the isolation and structural identification of *N*-acetyl tryptamine. Dr. Basile Peres is thankful for the preparation and providing a synthetic sample of *N*-acetyltryptamine used for the authenticity of the isolated compound. Authors thank Dr. Kim-Anh Nguyen for her assistance in the preparation of extracts and HPLC-MS analysis. Soumia Teniou and Abderrahmane Bensegueni Thank the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria, for the financial support.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi>.

org/10.1016/j.jff.2022.104965.

References

- Ahmed, S., Khan, S. T., Zargaham, M. K., Khan, A. U., Khan, S., Hussain, A., ... Al-Harasi, A. (2021). Potential therapeutic natural products against Alzheimer's disease with Reference of Acetylcholinesterase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, Article 111609. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111609>
- Akiyama, M., Unoki, T., Shinkai, Y., Ishii, I., Ida, T., Akaike, T., ... Kumagai, Y. (2019). Environmental Electrophile-Mediated Toxicity in Mice Lacking Nrf2, CSE, or Both. *Environmental Health Perspectives*, 127(6), 67002. <https://doi.org/10.1289/EHP4949>
- Ba, D. M., Ssentongo, P., Beelman, R. B., Muscat, J., Gao, X., & Richie, J. P. (2021). Higher Mushroom Consumption Is Associated with Lower Risk of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Advances in Nutrition*, 12(5), 1691–1704. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab015>
- Backlund, P. S., Urbanski, H. F., Doll, M. A., Hein, D. W., Bozinoski, M., Mason, C. E., ... Klein, D. C. (2017). Daily Rhythm in Plasma N-acetyltryptamine. *Journal of Biological Rhythms*, 32(3), 195–211. <https://doi.org/10.1177/0748730417700458>
- Baird, N. L., Bowlin, J. L., Cohrs, R. J., Gilden, D., & Jones, K. L. (2014). Comparison of varicella-zoster virus RNA sequences in human neurons and fibroblasts. *Journal of Virology*, 88(10), 5877–5880. <https://doi.org/10.1128/JVI.00476-14>
- Baudry, J., Kopp, J. F., Boeing, H., Kipp, A. P., Schwerdtle, T., & Schulze, M. B. (2020). Changes of trace element status during aging: Results of the EPIC-Potsdam cohort study. *European Journal of Nutrition*, 59(7), 3045–3058. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02143-w>
- Campanari, M. L., Garcia-Ayllon, M. S., Blazquez-Llorca, L., Luk, W. K., Tsim, K., & Saez-Valero, J. (2014). Acetylcholinesterase protein level is preserved in the Alzheimer's brain. *Journal of Molecular Neuroscience*, 53(3), 446–453. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0183-5>
- Chang, L. C., Chiang, S. K., Chen, S. E., Yu, Y. L., Chou, R. H., & Chang, W. C. (2018). Heme oxygenase-1 mediates BAY 11–7085 induced ferroptosis. *Cancer Letters*, 416, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.025>
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 7(2), 725–737. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.2.725-737.1987>
- Du, Y., Liu, X., Zhu, X., Liu, Y., Wang, X., & Wu, X. (2020). Activating transcription factor 6 reduces Aβ1–42 and restores memory in Alzheimer's disease model mice. *International Journal of Neuroscience*, 130(10), 1015–1023. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1715977>
- Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Han, K., Jin, X., Guo, X., Cao, G., Tian, S., Song, Y., ... Chang, Y. Z. (2021). Nrf2 knockout altered brain iron deposition and mitigated age-related motor dysfunction in aging mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 592–602. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.019>
- He, Y., Sun, S., Sha, H., Liu, Z., Yang, L., Xue, Z., ... Qi, L. (2010). Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expression*, 15(1), 13–25. <https://doi.org/10.3727/105221610x12819686555051>
- Hsu, K. D., & Cheng, K. C. (2018). From nutraceutical to clinical trial: Frontiers in Ganoderma development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9037–9051. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9326-5>
- Huang, C., Santofimia-Castano, P., & Iovanna, J. (2021). NUPR1: A Critical Regulator of the Antioxidant System. *Cancers (Basel)*, 13(15). <https://doi.org/10.3390/cancers13153670>
- Huang, D. D., Fan, S. D., Chen, X. Y., Yan, X. L., Zhang, X. Z., Ma, B. W., ... Yu, Z. (2019). Nrf2 deficiency exacerbates frailty and sarcopenia by impairing skeletal muscle mitochondrial biogenesis and dynamics in an age-dependent manner. *Experimental Gerontology*, 119, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.01.022>
- Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S., & McCord, J. M. (2019). Phytochemical Combination PB125 Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection against Oxidative Injury. *Antioxidants (Basel)*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/antiox8050119>
- Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., & McCord, J. M. (2011). Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4–6), 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.006>
- Lenz, C., Wick, J., & Hoffmeister, D. (2017). Identification of omega-N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norsiloin) as a Psilocybe Natural Product. *Journal of Natural Products*, 80(10), 2835–2838. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00407>
- Li, S., & Shah, N. P. (2017). Sulphonated modification of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 and antioxidant activities investigation using CCD and Caco-2 cell line models. *Food Chemistry*, 225, 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.037>
- Liang, C. H., Huang, P. C., Mau, J. L., & Chiang, S. S. (2020). Effect of the King Oyster Culinary-Medicinal Mushroom *Pleurotus eryngii* (Agaricomycetes) Basidiocarps Powder to Ameliorate Memory and Learning Deficit in Ability in Abeta-Induced Alzheimer's Disease C57BL/6J Mice Model. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(2), 145–159. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2020033766>
- McCord, J. M., Hybertson, B. M., Cota-Gomez, A., Geraci, K. P., & Gao, B. (2020). Nrf2 Activator PB125(R) as a Potential Therapeutic Agent against COVID-19. *Antioxidants (Basel)*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060518>
- Morris, G., Berk, M., Carvalho, A. F., Maes, M., Walker, A. J., & Puri, B. K. (2018). Why should neuroscientists worry about iron? The emerging role of ferroptosis in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Behavioural Brain Research*, 341, 154–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.036>
- Park, Y. S., Jang, S., Lee, H., Kang, S., Seo, H., Yeon, S., ... Yun, C. W. (2021). Identification of the Antidepressant Function of the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *Journal of Fungi (Basel)*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/jof7030190>
- Romagnolo, D. F., Papoutsis, A. J., Laukaitis, C., & Selmin, O. I. (2015). Constitutive expression of AhR and BRCA-1 promoter CpG hypermethylation as biomarkers of ERalpha-negative breast tumorigenesis. *BMC Cancer*, 15, 1026. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-2044-9>
- Sharma, A., Sharma, A., & Tripathi, A. (2021). Biological activities of *Pleurotus* spp. polysaccharides: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 45(6), Article e13748. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13748>
- Simmons, S. O., Fan, C. Y., Yeoman, K., Wakefield, J., & Ramabhadran, R. (2011). NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Current Chemical Genomics*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.2174/1875397301105010001>
- Song, X., & Long, D. (2020). Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 267. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00267>
- Stajic, M., Vukojevic, J., & Duletic-Lausevic, S. (2009). Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 55–66. <https://doi.org/10.1080/07388550802688821>
- Taheri, S., Asadi, S., Nilashi, M., Ali Abumalloh, R., Ghabban, N. M. A., Mohd Yusuf, S. Y., ... Samad, S. (2021). A literature review on beneficial role of vitamins and trace elements: Evidence from published clinical studies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 67, Article 126789. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126789>
- Torre, D., Lachmann, A., & Ma'ayan, A. (2018). BioJupies: Automated Generation of Interactive Notebooks for RNA-Seq Data Analysis in the Cloud. *Cell System*, 7(5), 556–561 e553. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.10.007>
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., ... Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Valverde, M. E., Hernandez-Perez, T., & Paredes-Lopez, O. (2015). Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015, Article 376387. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
- Wei, H., Yue, S., Zhang, S., & Lu, L. (2018). Lipid-Lowering Effect of the *Pleurotus eryngii* (King Oyster Mushroom) Polysaccharide from Solid-State Fermentation on Both Macrophage-Derived Foam Cells and Zebrafish Models. *Polymers (Basel)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/polym10050492>
- Wu, T. D., & Nacu, S. (2010). Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*, 26(7), 873–881. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq057>
- Xu, W., Wang, C., & Hua, J. (2021). X-box binding protein 1 (XBP1) function in diseases. *Cell Biology International*, 45(4), 731–739. <https://doi.org/10.1002/cbin.11533>
- Zanin, R., Pegoraro, S., Ros, G., Ciani, Y., Piazza, S., Bossi, F., ... Manfioletti, G. (2019). HMG1A1 promotes breast cancer angiogenesis supporting the stability, nuclear localization and transcriptional activity of FOXM1. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1307-8>
- Zhang, A., Li, X., Xing, C., Yang, J., & Sun, P. (2014). Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus eryngii* using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.013>
- Zhang, C. J., Guo, J. Y., Cheng, H., Lin, L., Liu, Y., Shi, Y., ... Yu, H. T. (2020). Protective Effects of the King Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus eryngii* (Agaricomycetes), Polysaccharides on beta-Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells and Aging Rats, In Vitro and In Vivo Studies. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(4), 325–333. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2020033990>
- Zhang, H., Davies, K. J. A., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Pt B), 314–336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036>
- Zieba, P., Kala, K., Włodarczyk, A., Szewczyk, A., Kunicki, E., Sekara, A., & Muszynska, B. (2020). Selenium and Zinc Biofortification of *Pleurotus eryngii* Mycelium and Fruiting Bodies as a Tool for Controlling Their Biological Activity. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040889>

Annexes

Annexe 1. Méthode de préparation des réactifs de la mise en évidence des alcaloïdes totaux

- **Réactif de Mayer :**

Chlorure de mercure 1.36g, iodure de potassium 5g, l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

- **Réactif de Wagner :**

Iode 1.27g, iode de potassium 2g, l'eau distillée jusqu'à 100ml.

- **réactif de Hager :**

Acide picrique 105g, l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

- **Réactif de Dragendorff :**

Il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions A et B.

-**Solution A :**

Nitrate de bismuth 1.7g, acide tartrique concentré 20g, l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

-**Solution B :**

Iodure de potassium 10g, l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

Le mélange est ensuite additionné de 10 g d'acide tartrique.

Annexe 2. Contenu des fichiers comportant la liste des résidus du site actif de l'AcHé.

| | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| TYR73 | ASP74 | GLY82 | TRP86 | GLY120 | GLY121 | GLY122 | TYR124 | SER125 | TYR133 |
| GLU200 | SER203 | TRP286 | LEU289 | GLU290 | SER293 | VAL294 | PHE295 | ARG296 | PHE297 |
| GLU334 | TYR337 | PHE338 | TYR341 | GLY342 | HIS447 | GLY448 | TYR449 | ILE451 | WAT701 |
| WAT702 | WAT703 | WAT704 | | | | | | | |

Format Gold : chaque acide aminé du site actif est représenté par son abréviation en 3 lettres majuscules suivie par son numéro (attachés). Les acides aminés sont séparés par des espaces

Annexe 3. Paramètres par défaut de l'algorithme génétique de Gold.

GOLD CONFIGURATION FILE

AUTOMATIC SETTINGS

autoscale = 1

POPULATION

popsiz = auto

select_pressure = auto

n_islands = auto

maxops = auto

niche_siz = auto

GENETIC OPERATORS

pt_crosswt = auto

allele_mutatewt = auto

migratewt = auto

FLOOD FILL

radius = 10

origin = 0 0 0

do_cavity = 0

floodfill_atom_no = 0

cavity_file =

../../../../structure_pdb/liste_residues_rayon_format_gold.dat

floodfill_center = list_of_residues

DATA FILES

ligand_data_file

/home/lchaput/chimiotheques/Preparation_ICC_decembre2013/Preparation
_schrodinger/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_1.sdf 10

.

.

ligand_data_file

/home/emokrani/Projet/Preparation_actives_DUDE/split_chimiotheque_sdf/ICC2014_ligid_CHEMBL9751.sdf 10

param_file = DEFAULT

set_ligand_atom_types = 1

set_protein_atom_types = 0

directory = results/

tordist_file = DEFAULT

make_subdirs = 1

save_lone_pairs = 1

fit_points_file = fit_pts.mol2

read_fitpts = 0

FLAGS

internal_ligand_h_bonds = 1

flip_free_corners = 0

match_ring_templates = 0 flip_amide_bonds = 0

flip_planar_n = 1 flip_ring_NRR flip_ring_NHR

flip_pyramidal_n = 1

```
rotate_carboxylic_oh = flip
use_tordist = 1
postprocess_bonds = 1
rotatable_bond_override_file = DEFAULT
solvate_all = 1
```

TERMINATION

```
early_termination = 1
n_top_solutions = 3
rms_tolerance = 1.5
```

CONSTRAINTS

```
force_constraints = 0
```

COVALENT BONDING

```
covalent = 0
```

SAVE OPTIONS

```
save_score_in_file = 1
save_protein_torsions = 1
clean_up_option save_top_n_solutions 20
clean_up_option delete_redundant_log_files
clean_up_option delete_empty_directories
save_option save_clustered_solutions 0.75
output_file_format = MOL2
```

FITNESS FUNCTION SETTINGS

```
initial_virtual_pt_match_max = 3
relative_ligand_energy = 1
gold_fitfunc_path = consensus_score
start_vdw_linear_cutoff = 6
score_param_file = DEFAULT
docking_fitfunc_path = plp
docking_param_file = DEFAULT
rescore_fitfunc_path = goldscore
rescore_param_file = DEFAULT
```

PARALLEL OPTIONS

```
hostfile = gold2.hosts
```

RUN TYPE

```
run_flag = CONSENSUS
```

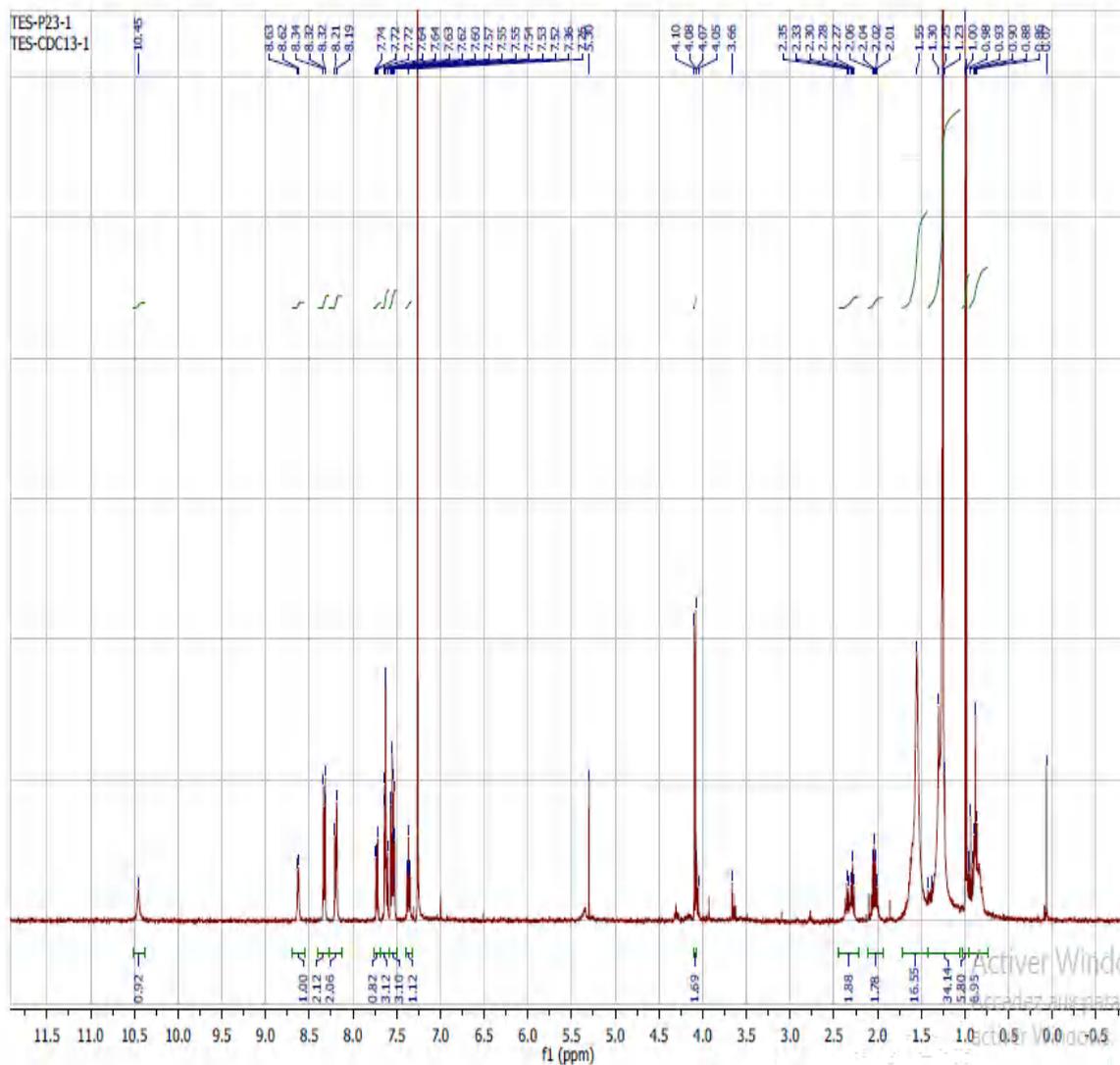
WATER DATA

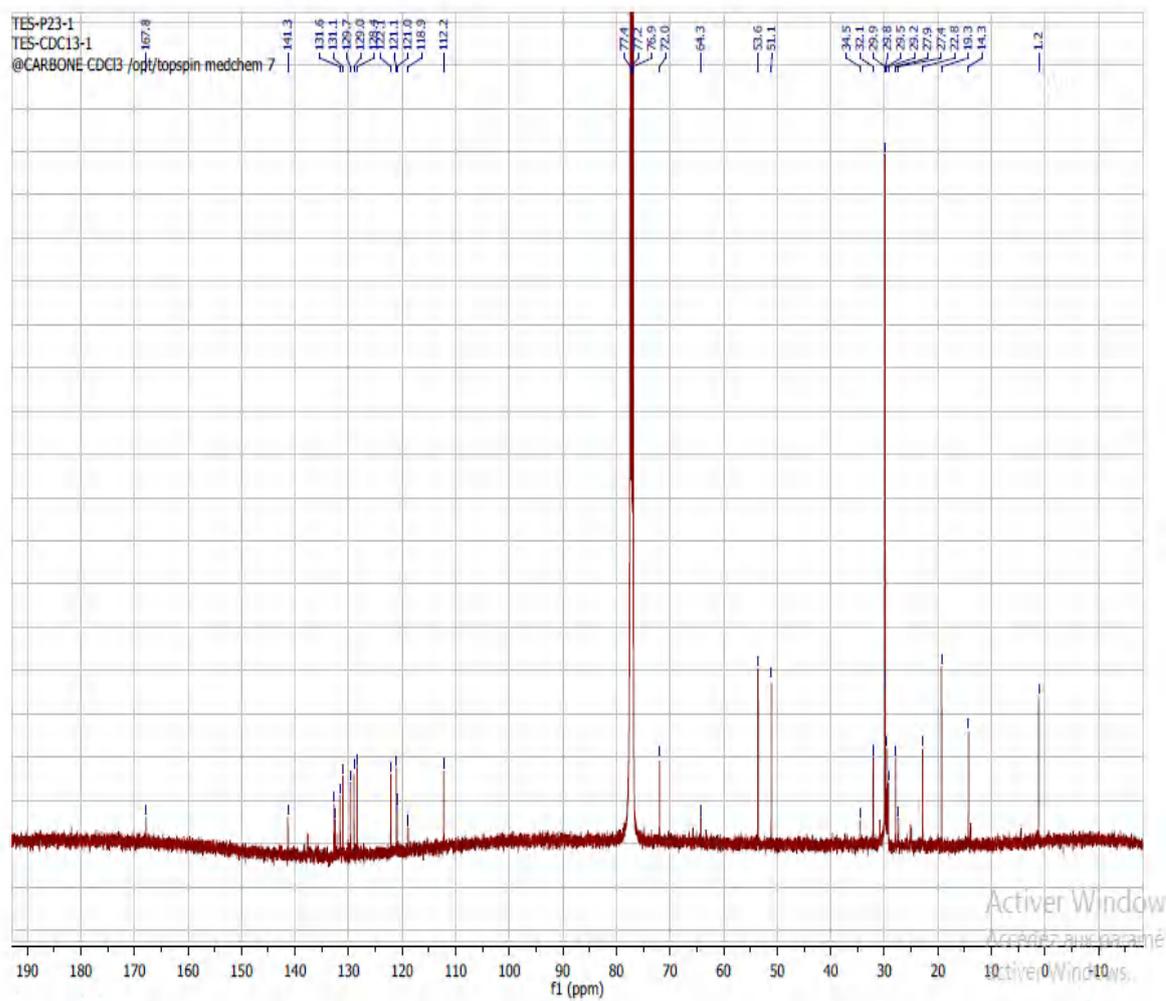
```
water 4189 on toggle
water 4190 on toggle
water 4191 on toggle
water 4192 on toggle
```

PROTEIN DATA

```
protein_datafile =
../././structure_pdb/4M0E_ligprep_4H2O_sidechains_optimized_orient
_correct.mol2
```

Annexe 4. Les spectres du composé P1

Spectre RMN ^1H du composé P1

Spectre RMN ^{13}C du composé P1

Résumés

Le champignon *Pleurotus eryngii* est largement représenté parmi les champignons consommés. Une extraction liquide-liquide a révélé que l'extrait alcaloïdique E1 était très efficace sur l'activation du facteur nucléaire Nrf2, régulateur de la résistance cellulaire aux oxydants. L'analyse de l'extrait E1 a révélé la présence de l'alcaloïde N-acétyltryptamine (NAT), précurseur des neurotransmetteurs mélatonine et sérotonine. L'extrait E1 et le NAT, ont montré une certaine activité inhibitrice à l'égard de l'acétylcholinestérase. La technologie RNA-seq a confirmé l'activation de l'expression de Nrf2 sur les cellules HepG2 et a révélé l'expression des gènes clés impliqués dans les effets anticholestérolémiques, antioxydants, le cancer et les troubles cérébraux.

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, Nrf2, N-acétyltryptamine, Acétylcholinestérase, Expression des gènes.

Abstract

The mushroom *Pleurotus eryngii* is widely represented among the mushrooms consumed. A liquid-liquid extraction revealed that the E1 alkaloid extract was very effective in activating nuclear factor Nrf2, the regulator of cellular resistance to oxidants. Analysis of the E1 extract revealed the presence of the alkaloid N-acetyltryptamine (NAT), a precursor of the neurotransmitters, melatonin and serotonin. Both E1 extract and NAT were found as competitive inhibitors of acetylcholinesterase. RNA-seq technology confirmed upregulates expression of Nrf2 on HepG2 cells and revealed key genes involved in anticholesterolemic, antioxidant effects, cancer and brain disorders.

Keywords : *Pleurotus eryngii*, Nrf2, N-acetyltryptamine, Acetylcholinesterase, Gene expression.

الملخص

يعتبر الفطر *Pleurotus eryngii* من الفطريات الأكثر استهلاكاً. أظهرت نتائج الاستخلاص أن المستخلص القلوي E1 فعالاً للغاية في تنشيط العامل النووي Nrf2، منظم المقاومة الخلوية للمؤكسدات. كشف تحليل المستخلص E1 عن وجود المركب القلوي N-acetyltryptamine (NAT)، الذي يعتبر المركب الأولي للناقلات العصبية الميلاتونين والسيروتونين. أظهر المستخلص E1 والمركب NAT بعض النشاط التثبيطي ضد الانزيم أستيل كولينستراز. أكدت تقنية RNA-seq تنشيط تعبير Nrf2 على الخلايا HepG2 وكشفت عن تعبير الجينات الرئيسية المشاركة في مضادات الكوليسترول، تأثيرات مضادات الأكسدة، السرطان، اضطرابات الدماغ.

الكلمات الرئيسية: *Pleurotus eryngii* ، Nrf2 ، N-acetyltryptamine ، أستيل كولينستراز ، تعبير الجينات.

Nom : TENIOU
Prénom : Soumia

Date de soutenance : 29-01-2024
Année universitaire : 2023/2024

**Intitulé : Isolement d'alcaloïdes à partir du champignon Algérien « *Pleurotus eryngii* » :
analyse structurale et études *in vitro* et *in silico* de leurs activités biologiques.**

Le champignon *Pleurotus eryngii* est largement représenté parmi les champignons consommés. Une extraction liquide-liquide a révélé que l'extrait alcaloïdique E1 était très efficace sur l'activation du facteur nucléaire Nrf2, régulateur de la résistance cellulaire aux oxydants. L'analyse de l'extrait E1 a révélé la présence de l'alcaloïde N-acétyltryptamine (NAT), précurseur des neurotransmetteurs mélatonine et sérotonine. L'extrait E1 et le NAT, ont montré une certaine activité inhibitrice à l'égard de l'acétylcholinestérase. La technologie RNA-seq a confirmé l'activation de l'expression de Nrf2 sur les cellules HepG2 et a révélé l'expression des gènes clés impliqués dans les effets anticholestérolémiques, antioxydants, le cancer et les troubles cérébraux.

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, Nrf2, N-acétyltryptamine, Acétylcholinestérase, Expression des gènes.

Laboratoire de recherche : Biochimie Appliquée.

| | | |
|---|------------|--|
| Président : CHIKHI A. | Professeur | Université Frères Mentouri Constantine 1 |
| Directeur de thèse : BENSEGUENI A. | Professeur | Université Frères Mentouri Constantine 1 |
| Examinatrice : SOBHI W. | Professeur | CRBt Constantine |
| Examinatrice : BENLOUNISSI A. | MCA | ENSB Taoufik Khaznadar |
| Examinatrice : BENSLAMA O. | MCA | Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi |