

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Amar Telidji -Laghouat  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie



## **Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de Master

**Filière** : Biologie

**Option** : Biochimie appliquée

**Thème**

---

**Etude *in silico* et *in vitro* de l'effet inhibiteur de quelques médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens sur la xanthine oxydase bovine**

---

**Présenté par** : BENFRIHA Leila

MOUSSAOUI Meriem

**Membres du jury** :

**Président de jury** : Dr. SIFI Ibrahim (MCA)

**Examinatrice** : Dr. Nia Samira (MCB)

**Encadreur** : Dr. BENAROUS Khedidja (MCA)

**Co-encadreur** : M. LINANI Abderrahmane (Doc.)

**2019/2020**

# DÉDICACE

À ma famille entière qui m'a soutenue tout au long de mes études et plus particulièrement :

À Maman et Papa : cela fait bientôt 23 ans que vous me témoignez quotidiennement votre amour. Vous m'avez toujours encouragée et supportée dans les bons comme dans les moments difficiles. Je n'aurais jamais pu réaliser ces études sans vous. Merci pour tout.

À mes frères : **MOUSSA; ZAKARIA, YACINE, ANTER, ALI.**

et mes sœurs : **NADJET ,WAFFA ,NADIA MANAR ,FERYEL**

À Mon chère binom et fidèle ami **BENFRIHA LEILA**

À tous mes collègues de la spécialité de Biochimie.

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

À toute ma famille **MOUSSAOUI** et **GHOZLEN.**

**MOUSSAOUI**

**MERIEM**

# DÉDICACES

Je remercie le bon dieu de m'avoir donné le courage pour réaliser ce travail et la patience pour aller jusqu'au bout du parcours de mes études. Je dédie du plus profond de mon Cœur ce manuscrit.

À mon cher père **BOUDALI** qui ma toujours soutenu et conseille dans ma vie.

À ma chère mère **FATIMA** qui a toujours été la pour moi, je la remercie pour ses encouragements et son soutien.

Que dieu leurs accorde une longue vie :

À mon marié **MOURADE KHOULDI**.

À mes sœurs : **IKRAM, BOUCHRA, HOUDA, KHAOUTER** et **ICHREK**.

À mon binôme et fidèle amie **MERIEM** ; je la remercie d'avoir était présente à chaque moment de ma vie.

**BENFRIHA**

**LEILA**

# REMERCIEMENTS

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Nous commençons par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements au **Dr. BENAROUS KHEDIDJA** pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Nous avons été satisfaites de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante, merci de notre avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; nous ne pouvons, Madame, que sincèrement vous exprimer notre respect et notre gratitude.

Je remercie M<sup>elle</sup>. **BOU-SALEH LEILA**. Le temps que vous avez partagé avec nous, ses conseils lors de notre projet et votre patience avec nous.

Et que vous avez accepté de faire partie du superviser et de l'examination.

Je tiens à remercier Dr. **LINANI ABEDERRAHMENE** d'avoir accepté d'avoir accepté de co-encadrer ce travail. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous avez apporté tout au long de notre travail. Nous avons pu partager votre expérience et vos conseils dans le monde de la recherche scientifique et nous avons fourni de nombreuses informations.

**Dr. SIFI IBRAHIME** et **Dr. NIA SAMIRA**, Nous vous remercions beaucoup d'avoir accepté de juger ce travail. Nous aussi Nous sommes honorés de pouvoir bénéficier de vos commentaires éclairés.

Je tiens à remercier également le Laboratoire de Biochimie, à l'université Amar Telidji, et Un grand merci à toute l'équipe de laboratoire de transfusion de sang (CTS) dans l'hôpital Ahmed Benadjila de Laghouat.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des enseignants de notre département de séance de Biologie, et à tous ceux contribué de près ou de loin a la réalisation de ce travail.

**LEILA \* MERIEM**

## *Résumé*

La xanthine oxydase est une protéine cytoplasmique ubiquitaire qui catalyse les deux dernières étapes du catabolisme des purines. Les dernières études ont montré son implication dans plusieurs pathologies telles que l'hyperuricémie et la goutte. L'inhibition de cette enzyme est ainsi nécessaire dans le traitement ou la prévention de plusieurs maladies. L'intérêt de notre travail repose sur la mise au point de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydase qui peuvent jouer le rôle de précurseurs dans l'élaboration d'un nouveau médicament capable d'interagir avec cette cible d'une manière sélective et avec moins d'effets indésirables. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition ainsi de savoir la nature des interactions entre ces inhibiteurs et la xanthine oxydase, nous avons utilisé l'amarrage moléculaire avec le logiciel Autodock Vina. Les résultats obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 variant de  $25,29 \pm 3,79$  à  $61,71 \pm 1,24$   $\mu\text{g/ml}$  contre la xanthine oxydase. La betaméthasone présente plusieurs interactions hydrophobes au sein du site actif de la xanthine oxydase. Nous confirmons que ces inhibiteurs peuvent être employés dans le traitement de la goutte.

**Mots clés :** Xanthine oxydase, inhibition, goutte, anti-inflammatoires, amarrage moléculaire.

# *Liste des abréviations*

**AA** : acide aminé .  
**AINS** : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens  
**ANS** : Anti-Inflammatoire Stéroïdiens  
**AU** : Acide Urique  
**BMXO** : Bovine Milk Xanthine Oxidase  
**COX** : Cyclo-oxygénase  
**DCHBSA** : 3 ,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique acide  
**EDTA**: Ethylene Diamine Tétracétique Acid  
**FAD** : Flavine Adénine Dinucléotide  
**FADH<sub>2</sub>** : Flavine Adénine Dinucléotide Réduit  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**IC<sub>50</sub>** : la concentration inhibitrice à 50%.  
**LTB<sub>4</sub>** : Leucotriène B4  
**Mo** : Molybdène  
**NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
**NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit  
**NO<sup>-2</sup>** : Nitrite  
**ONOO<sup>-</sup>** : Peroxynitrite  
**PEG** : Polyéthylène glycol  
**POD** : Peroxydase  
**TR %** : Pourcentage du taux de répétitions  
**UMS** : Urate Monosodique  
**XDH** : Xanthine déshydrogénase  
**XO** : Xanthine oxydase  
**XOI** : Xanthine oxydase inhibiteurs  
**XOR** : Xanthine oxydoréductase.

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Le dépôt de l'acide urique dans différents sites du corps humain.....	11
<b>Figure 2.</b> Examen de liquide articulaire (Pessina, 2017) .....	12
<b>Figure 3.</b> Microcristaux d'urate de sodium visibles (ici en vert) obtenus par tomodynamométrie (Girou, 2018) .....	13
<b>Figure 4.</b> Cristaux d'urates monosodique observé au microscope en lumière polarisé.....	13
<b>Figure 5.</b> Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine obtenu par le logiciel PyMol .....	14
<b>Figure 6.</b> Structure 2D du molybdoptérine .....	15
<b>Figure 7.</b> Le processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase (Sylvain, 2013).....	15
<b>Figure 8.</b> Représentation du mécanisme réactionnel de la XO (Hamlaoui I.2014) .....	16
<b>Figure 9.</b> Structure 2D de la colchicine .....	17
<b>Figure 10.</b> Colchique d'automne (Jean, 2015).....	18
<b>Figure 11.</b> Structure 2D des cinq médicaments AINS (ChemSpider database, 2020) .....	20
<b>Figure 12.</b> Structure 2D de fébuxostat.....	22
<b>Figure 13.</b> Structure 2D de l'allopurinol .....	23
<b>Figure 14.</b> Inhibition de la xanthine oxydase par l'allopurinol afin d'empêcher la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et / ou acide urique .....	23
<b>Figure 15.</b> Photo représentant les médicaments étudiés dans notre travail et leurs structures 2D .....	25
<b>Figure 16.</b> Schéma réactionnel de l'uricase sur l'acide urique .....	27
<b>Figure 17.</b> Représentations graphiques de l'inhibition de la réaction catalysée par la XO .....	33
<b>Figure 18.</b> Représentation de la meilleure pose de docking de la bêta-méthasone sur la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif .....	36

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principaux AINS utilisés dans la crise de goutte (Marion, 2014) .....	19
<b>Tableau 2.</b> Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs.....	32
<b>Tableau 3.</b> Les valeurs des IC50 pour la XO bovine à partir de quelques références bibliographiques. ....	34

# *Table des matières*

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	8
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	10
<b>I. Définition de la goutte</b> .....	11
<b>II. Les causes et les facteurs favorisants :</b> .....	11
<b>III. Diagnostique :</b> .....	12
<b>IV. Symptômes</b> .....	13
<b>V. La xanthine oxydase</b> .....	13
<b>VI. Traitement de la goutte</b> .....	17
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	24
<b>I. Matériel</b> .....	25
<b>II. Protocoles expérimentaux</b> .....	26
<b>III. L'amarrage moléculaire</b> .....	29
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	30
<b>I. Rendement d'extraction de la XO</b> .....	32
<b>II. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase</b> .....	32
<b>III. l'amarrage moléculaire</b> .....	35
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	37
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	39

# ***INTRODUCTION GENERALE***

L'arthropathie microcristalline est caractérisée par la formation de cristaux à l'intérieur de l'articulation entraînant des crises d'arthrite chroniques telle que la goutte, Cette maladie était déjà connue dans l'antiquité. Les Grecs l'ont nommée « podagre », ce mot signifiant « prise au piège par le pied », le mot goutte n'étant apparu que vers le IXème siècle. **(Hamlaoui, 2014).**

La goutte est une arthropathie liée à une anomalie du métabolisme de l'acide urique à l'origine d'une hyperuricémie; est souvent vue comme une maladie touchant surtout l'homme de 40-50 ans, bon vivant, en surpoids et au faciès rouge **(Marion, 2014)**, et dont la manifestation clinique la plus caractéristique est une monoarthrite aiguë du gros orteil. Elle est associée, bien que de façon inconstante, à une augmentation du taux circulant d'acide urique (hyperuricémie) **(Jean et al, 2015).**

La xanthine oxydase est une oxydoréductase XOR qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ainsi que l'oxydation de la xanthine en acide urique et c'est la réaction du métabolisme des bases puriques.

Les découvertes récentes relatives à la pathogénie de la goutte ont mené à l'exploration de nouvelles thérapeutiques. Ainsi, de nouveaux traitements de crise ou de fond voient le jour au fur et à mesure que les connaissances génétiques, physiologiques et biochimiques de la goutte augmentent ; et viennent élargir l'arsenal thérapeutique antigoutteux bien connu constitué essentiellement de la colchicine et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et stéroïdiens (AIS) pour la crise de goutte et de l'allopurinol pour la goutte chronique **(Marion, 2014).**

L'objectif principal de cette étude est de tester le pouvoir d'inhiber la xanthine oxydase bovine par quelques médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens afin d'étudier l'effet de ces derniers sur l'enzyme cible et afin de chercher et de trouver un traitement efficace contre la maladie de la goutte. Nous rappelons que c'est une continuité des travaux antérieurs réalisés par les encadreurs au sein de notre laboratoire de recherche.

Nous avons étudié l'inhibition de cette enzyme (XOB) *in silico, et in vitro* (dans le laboratoire de transfusion de sang (CTS) dans l'hôpital Ahmed Benadjila de Laghouat.

Le mémoire est constitué d'un rappel bibliographique, matériels et méthodes, résultats et discussions et se termine par une conclusion et perspectives.

# ***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

## I. Définition de la goutte

La goutte est une pathologie rhumatismale chronique, qui appartient aux hyperuricémies, c'est-à-dire aux pathologies associées à un taux anormalement élevé d'acide urique dans le sang, c'est ce qu'on appelle l'hyperuricémie (Hygo, 2017) ; Cette hyperuricémie est définie comme une uricémie  $> 420 \mu\text{mol/l}$  (70 mg/l) chez l'homme, et  $> 360 \mu\text{mol/l}$  (60 mg/l) chez la femme (Girou, 2018).

La goutte se manifeste classiquement par des poussées inflammatoires successives au niveau des articulations, l'articulation la plus touchée est celle du gros orteil (Figure 1) (Hygo, 2017).

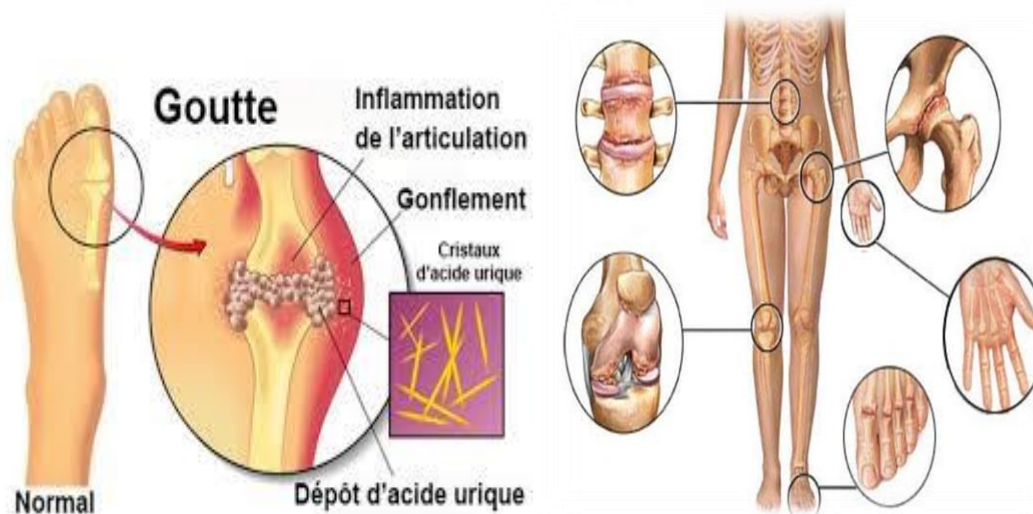


Figure 1. Le dépôt de l'acide urique dans différents sites du corps humain

(<https://www.sciencesetavenir.fr/sante/la-crise-de-goutte-definition-symptomes-traitement>, 2015)

## II. Les causes et les facteurs favorisants :

Si la goutte a pour origine un excès d'acide urique dans le sang, plusieurs causes ou facteurs de risque ont pu être identifiés :

-Une **prédisposition génétique** : caractérisée par une réduction congénitale de la capacité des reins à éliminer l'acide urique présent dans le sang.

-L'**âge et le sexe** : avant 65 ans, la goutte est quatre fois plus fréquente chez l'homme, et reste trois fois plus fréquente après cet âge. Chez la femme, le développement de la goutte est intimement lié à l'âge de la ménopause.

-Une **alimentation riche en purines** : dans l'organisme, les purines présentes dans les aliments sont dégradées en acide urique. (En particulier la viande rouge, les abats et la charcuterie), certains poissons et les fruits de mer.

-**Une consommation excessive d'alcool** : qui réduit l'élimination de l'acide urique par les reins.

-**L'obésité et le syndrome métabolique** : (association d'obésité, d'hypertension artérielle, de troubles lipidiques et de troubles glucidiques), puisque 75 % des patients gouteux présentent un syndrome métabolique. Inversement, les maladies cardiovasculaires peuvent être une conséquence de la goutte (**Estelle, 2015**).

### **III. Diagnostique :**

Le diagnostic de goutte repose sur un certain nombre d'éléments cliniques, biologiques et radiologiques et d'examens complémentaires de différents liquides biologiques exemple le sang et le liquide articulaire (Figure 2) (**Mario, 2014**).



**Figure 2.** Examen de liquide articulaire (**Pessina, 2017**)

-Une ou plusieurs crises de goutte caractéristiques et l'existence d'un ou de plusieurs facteurs de risque de goutte.

-Un dosage sanguin du taux d'acide urique, révélant une hyperuricémie, c'est-à-dire un taux d'acide urique supérieur à 6 mg/dl.

-Des examens d'imagerie (radiographie, échographie) pour visualiser les articulations atteintes (Figures 3 et 4)

-Une ponction de l'articulation, pour détecter les cristaux d'acide urique et différencier la goutte de la chondrocalcinose (**Estelle, 2018**).



**Figure 3.** Microcristaux d'urate de sodium visibles (ici en vert) obtenus par tomodensitométrie (Girou, 2018)



**Figure 4.** Cristaux d'urates monosodique observé au microscope en lumière polarisé (Marion, 2014)

#### IV. Symptômes

Les signes inflammatoires sont intenses avec gonflement, rougeur des téguments, élévation de la température cutanée, douleurs vives à l'origine d'une impotence fonctionnelle. La température peut atteindre 39 °C. Le liquide articulaire, lorsqu'il peut être prélevé, montre la présence de nombreuses cellules constituées en majorité de polynucléaires et celle de cristaux d'urates monosodique (UMS) (Aurélien et al, 2018).

Si la goutte est chronique et mal prise en charge, des dépôts d'acide urique peuvent se former dans l'appareil urinaire (uretères, vessie, ...), provoquant des calculs rénaux, à l'origine de coliques néphrétiques. La goutte chronique peut aussi évoluer vers des formes secondaires d'arthrose. (Estelle, 2018).

#### V. La xanthine oxydase

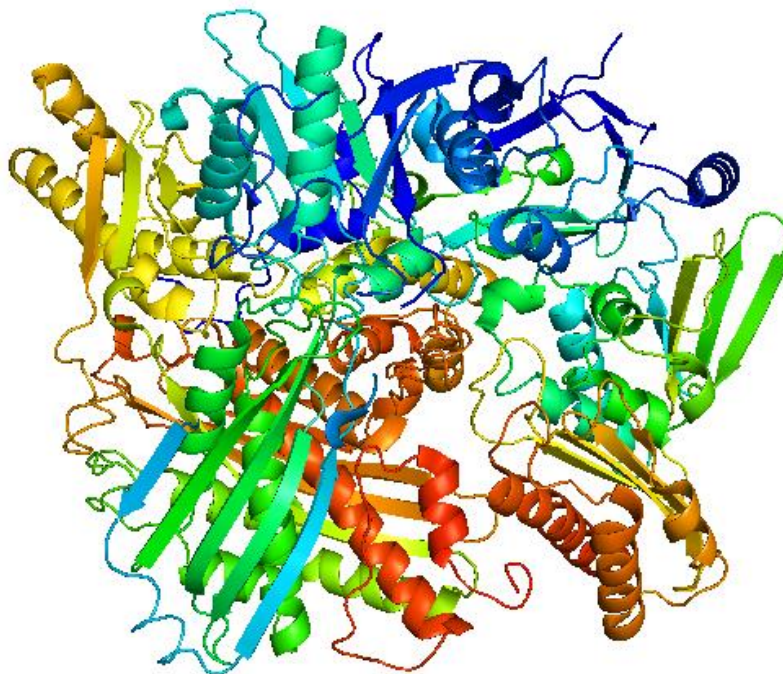
La xanthine oxydase (XO) est une molybdoflavoenzyme qui a été identifiée par Schardinger en 1902, Sa structure cristalline représentée sur la **Figure 5** a été déterminée en

2000 par Enroth et coll, (**Hamlaoui, 2014**), Elle est obtenue par une transformation protéolytique de la xanthine déshydrogénase. En effet, on distingue deux types d'OX dans la cellule :

La xanthine déshydrogénase (XD) et l'autre, la xanthine oxydase (XO), les deux enzymes étant inter-convertibles (**Marion, 2014**).

La Xanthine oxydoréductase est présent dans le lait de vache à des concentrations élevées et d'où elle a été purifié il y a plus de 60 ans ; elle reste la principale source de cette enzyme la mieux étudiée (**Hamlaoui, 2014**).

La distribution cellulaire de XO a été mise en évidence en 1981 par Jarasch et coll ; chez les bovins pour lesquels ils ont montré la présence de cette enzyme, en particulier dans l'endothélium capillaire des cellules mammaires (**Marion, 2014**).



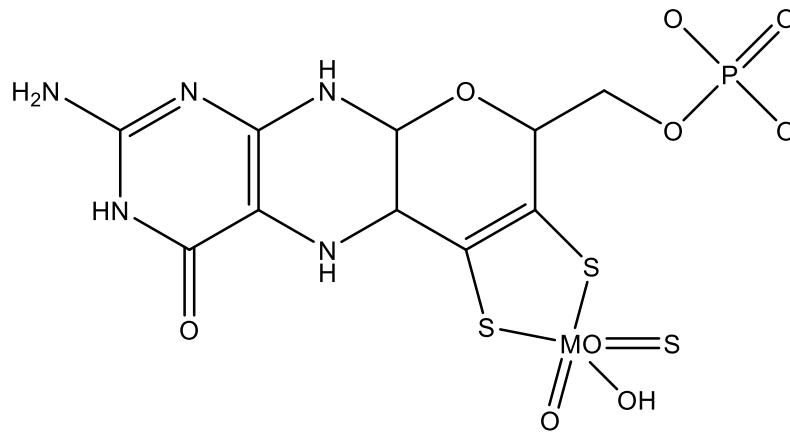
**Figure 5.** Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine obtenu par le logiciel PyMol

### **V.1 Définition de XO et leur structure :**

La xanthine oxydase est un enzyme homodimère ou complexe de protéines constitué de deux sous-unités identiques, de masse moléculaire de 290 kDa (**Marion, 2014**).

Chaque unité contient un dinucléotide adénine-flavine (FAD) et un molybdène molybdène (Mo-pt) (Figure 6). La xanthine, ou le xanthinus, azotée est un composé chimique qui désigne une base azotée (3,7-dihydropurine-2,6-dione) de la famille des purines. Elle se forme au cours du catabolisme des protéines. C'est un intermédiaire dans la dégradation de la purine et est

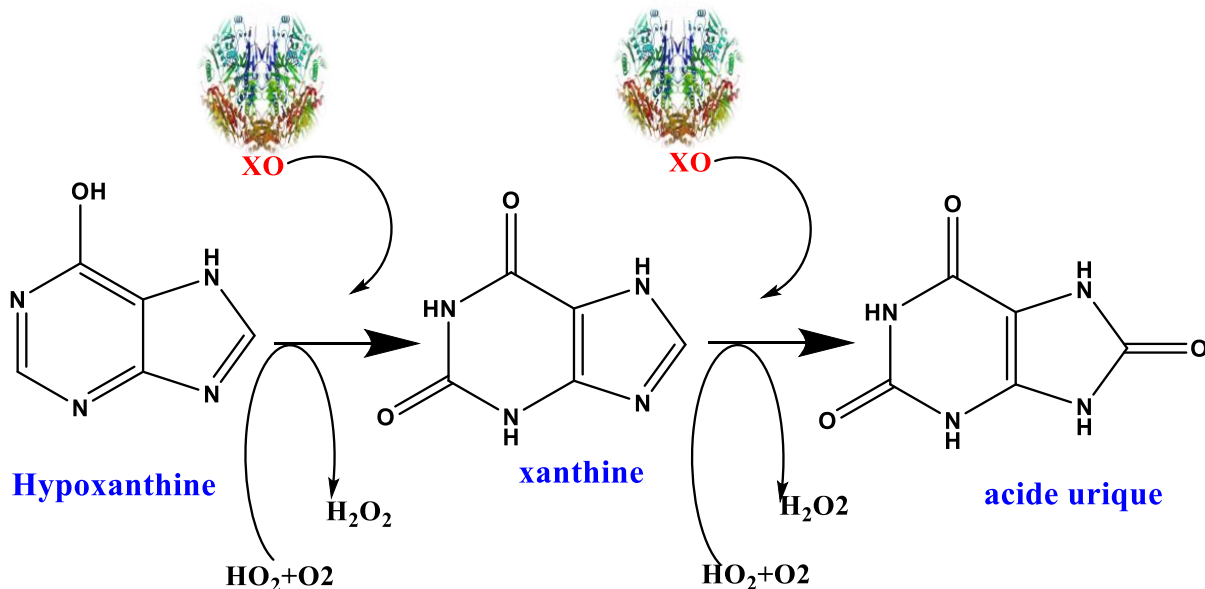
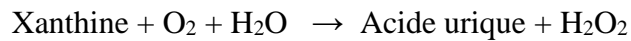
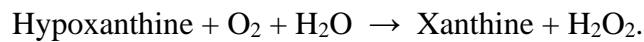
converti en acide urique par la xanthine oxydase (<https://www.aquaportail.com/definition-4348-xanthine.html>)



**Figure 6.** Structure 2D du molybdoptérine

## V.2. Mécanisme d'action de la xanthine oxydase (XO)

La xanthine oxydase, est une oxydoréductase XOR qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ainsi que l'oxydation de la xanthine en acide urique (Figure 7) (Bousaleh et al, 2019) :



**Figure 7.** Le processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase (Sylvain, 2013)

Le mécanisme d'action s'effectue en deux étapes représentées sur la **Figure 8**.

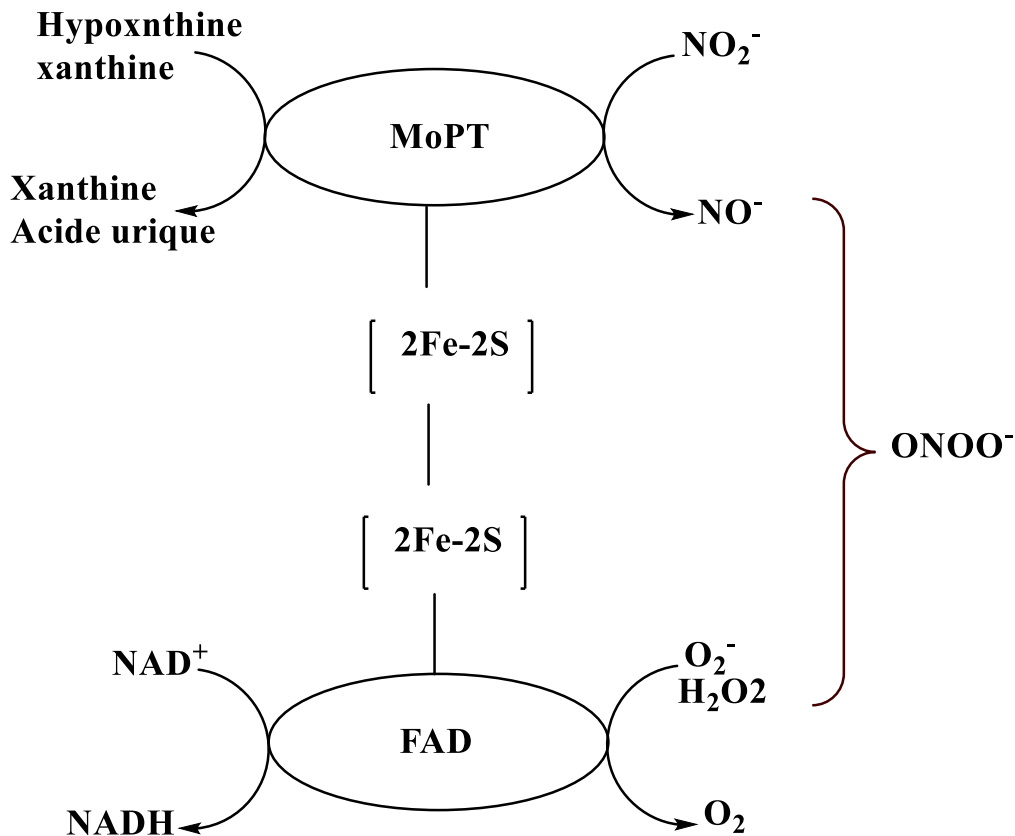
- La première étape est une demi-réaction de réduction qui a lieu au niveau du centre Mo, Elle est caractérisée par la réduction de Mo(VI) en Mo(IV) et l'oxydation de la xanthine en acide urique. Pour continuer sa fonction catalytique, le molybdène perd les deux électrons.

Ces derniers sont transférés au centre FAD par l'intermédiaire des clusters  $Fe_2/S_2$  Sachant que les centres  $Fe_2/S_2$  peuvent être considérés comme des pompes d'électrons.

- La deuxième est une demi-réaction d'oxydation qui se déroule au centre FAD.

Dans cette étape, si la réaction est catalysée par la XDH,  $FADH_2$  transfère les deux électrons au  $NAD^+$  pour donner  $NADH$ . Si elle est catalysée par la XO, les électrons seront transférés à l'oxygène moléculaire  $O_2$  pour produire le radical superoxyde ( $O_2^-$ ).

d'une manière univalente, ou d'une manière bivalente en donnant le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ce dernier forme, par les réactions de Fenton et/ou Haber Weiss, le radical hydroxyle ( $OH$ ). (Hamlaoui, 2014).



**Figure 8.** Représentation du mécanisme réactionnel de la XO (Hamlaoui I.2014)

## VI. Traitement de la goutte

### VI. 1 Traitements non médicamenteux :

Au traitement de fond de la goutte, des mesures hygiéno-diététiques sont nécessaires pour réduire le taux d'acide urique dans le sang, corriger les facteurs de risque de la maladie goutteuse et réduire le risque cardiovasculaire. Ces mesures sont les suivantes : la pratique d'une activité physique régulière et adaptée à la condition physique du patient ; Une alimentation saine et équilibrée, avec une baisse de la consommation des aliments riches en purines, Une augmentation des apports laitiers pauvres en graisses, Une alimentation riche en légumes et en fruits frais, Une consommation de viandes maigres (**Estelle, 2015**).

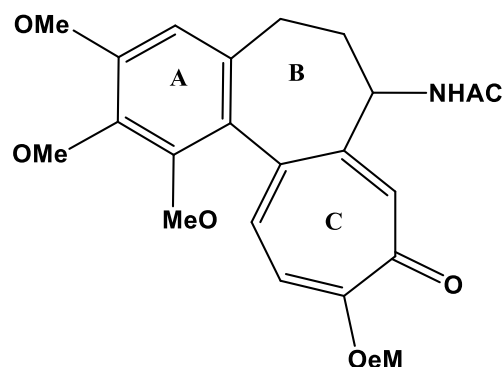
En particulier un arrêt de la consommation de bière, très riche en purines, et d'alcools forts, une perte de poids en cas de surpoids, ou un maintien du poids corporel (**Corinne, 2018**).

### VI. 2 Traitement médicamenteuse :

Le traitement de la goutte comprend d'une part, le traitement de l'accès goutteux, d'autre part, le traitement hypo-uricémiant qui permet à présent de guérir cette maladie ou du moins de diminuer la fréquence des crises aigue (**Michel et al, 2018**).

#### VI. 2 .1 Médicaments de l'accès goutteux :

**VI.2.1.1 Colchicine** : La colchicine est un alcaloïde liposoluble à structure tricyclique (Figure 9) (**Jean, 2015**) ; très toxique, extrait au départ des colchiques, principalement le colchique d'automne (Figure 10); utilisé à faible dose pour le traitement des crises de goutte (**Marion, 2014**).



**Figure 9.** Structure 2D de la colchicine



**Figure 10.** Colchique d'automne (Jean, 2015)

### **Mécanismes d'action de la colchicine**

La colchicine présente une activité anti-inflammatoire par différents mécanismes. Elle bloque la formation de microtubules à l'intérieur des neutrophiles, elle inhibe la libération de facteurs pro inflammatoires tel le leucotriène B4 (LTB4) et elle empêche le recrutement des autres globules blancs dans la réaction inflammatoire (Jean et Pharm, 2007).

La colchicine est très efficace contre l'inflammation goutteuse en empêchant indirectement la phagocytose des cristaux d'urate monosodique par les polynucléaires. Cette action est obtenue par la diminution de la mobilité des polynucléaires et par l'altération des microtubules du cytosquelette. En effet, la colchicine a une forte capacité à se lier à la tubuline. (Michel et al, 2018).

### **Les effets indésirables**

- Affections gastro-intestinales (fréquents) : Diarrhée, nausées, vomissements.
- Affections musculo-squelettiques et systémiques (peu fréquents) : Troubles neuromyopathiques réversibles à l'arrêt du traitement.
- Affections hématologiques et du système lymphatique (peu fréquents) : Leucopénie, neutropénie, thrombopénie. ; De très rares cas de pancytopenies par toxicité médullaire.
- Affections de la peau et du tissu sous- cutané (rares) : Urticaire et éruptions morbilliformes.
- Troubles des organes de la reproduction (exceptionnels) : Azoospermie, réversible à l'arrêt du traitement (Jean, 2015).

### VI.2.1.2 Les anti inflammatoire non stéroïdien :

En l'absence de contre-indications, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent le traitement de première intention de la goutte aiguë (Tableau 1 et Figure 11). Ils agissent en diminuant la réaction inflammatoire dans les articulations atteintes par une inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase (Cox) responsable de la formation de médiateur pro-inflammatoire (**Jean et Pharm, 2007**). De plus ils ont tendance à agir plus rapidement et possèdent de propriété antalgique (**Mechl et al, 2018**).

**Tableau 1.** Principaux AINS utilisés dans la crise de goutte (**Marion, 2014**)

<b>Spécialités pharmaceutiques</b>	<b>DCI</b>	<b>Posologie</b>	<b>Modalités de prise et adaptations posologiques</b>
VOLTARENE® FLECTOR®	Diclofénac	150à 200 mg/jour de J1 à J3 puis diminution de posologie	A prendre de préférence au milieu de repas En 1 à 3 prises
TOPREC® PROFENID® BI- PROFENID®	Kétoprofène	200mg/jour de J1 à J3 puis 100 mg de J4 à J7	Maximum 200mg/j en 1 à 2 prise. Adaptations posologiques en cas d'insuffisance rénale ou hépatique
BRUFEN®	Ibuprofène	2400mg/jour de J1 à J3 puis diminution de posologie	A prendre de préférence au milieu de repas En 3 prises
INDOCID®	Indométacine	150mg/jour de J1 à J3 puis 100 mg de J4 à J7	Adaptation posologiques en cas d'insuffisance rénal ou hépatique

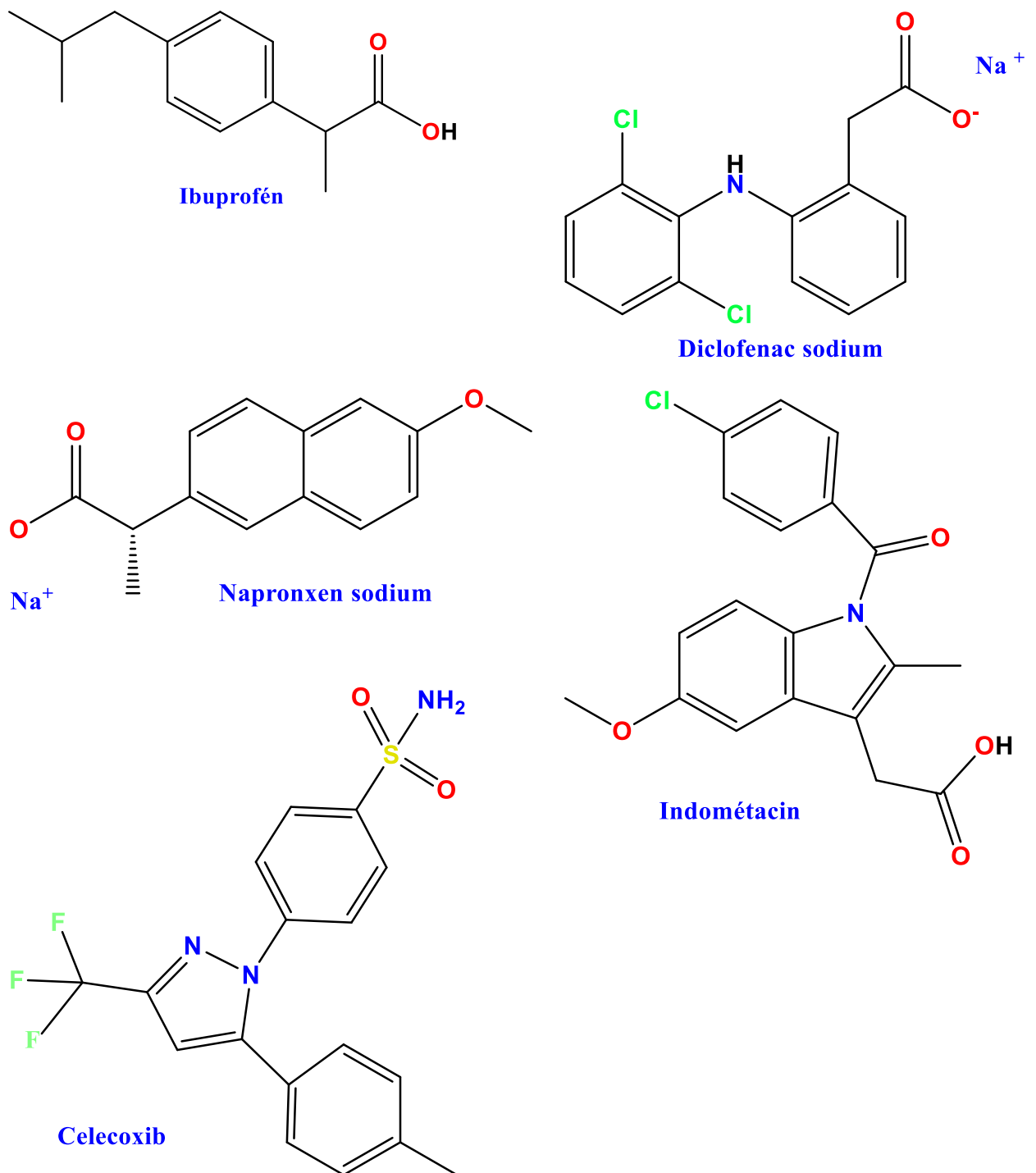


Figure 11. Structure 2D des cinq médicaments AINS (ChemSpider database, 2020)

**-Les effets indésirables :**

Les effets indésirables digestifs sont les plus fréquents et peuvent être de plusieurs grades : intolérance digestive (nausées, vomissements, douleurs épigastriques, diarrhée) ; voire érosion de la muqueuse digestive menant à un risque hémorragique (Jean et Pharm, 2007)

Au niveau rénal, sous l'effet des AINS, la perfusion rénale est diminuée et il y a donc un risque d'insuffisance rénale aigue mais seulement chez le patient à risque. Une aggravation d'insuffisance rénale pré-existante peut se produire (**Marion, 2014**).

### **VI.2.1.3 les anti-inflammatoires stéroïdiennes (AIS)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou (gluco) corticoïdes sont des dérivés synthétiques des hormones naturelles, cortisol et cortisone dont ils se distinguent par un pouvoir anti inflammatoire. Plus marqué et, à l'inverse, un moindre effet minéral corticoïde (**François, 2015**).

#### **La principale classe d'AIS : -**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens désignent les médicaments à base de Corticoïdes. Ils incluent trois classes de médicaments :

**\*Les Corticoïdes en association :** Celestamine®, Ciloxadex®.\*

**\*Les Glucocorticoïdes non associés :** Altim®, Betamethasone®, Betnesol®, Celestene®, Cortancyl®, Decadron®, Dectancyl®, Depo-Medrol®, Dexamethasone®, Diprostene®, Hexatrione®, Hydrocortancyl®, Kenacort Retard®, Medrol®, Methylprednisolone®, Neodex®, Neofordex®, Prednisolone®, Solumedriol®, Solupred®.

**\*Les Minéralocorticoïdes non associés :** Adixon®, Florinef®, Flucortac®.(**Tomase B.2017**).

#### **-Mécanisme d'action :**

Les corticostéroïdes représentent une bonne solution de rechange chez les patients pour qui les AINS et la colchicine sont inefficaces ou contre-indiqués Les stéroïdes dérivés de la cortisone (prednisone, méthylprednisolone) agissent comme anti-inflammatoire par leur action glucocorticoïde. Ils inhibent les événements moléculaires liés à l'activation des globules blancs et leur migration vers le site inflammatoire (**Jean et Pharm, 2007**). Les glucocorticoïdes présentent aussi à des degrés variables des propriétés inhibitrices des COX-2 et des effets minéralocorticoïdes (**Michel et al, 2018**).

#### **-Principaux effets indésirables :**

Des réactions cutanées, une tendance à gonfler des joues et une rétention d'eau, un risque plus élevé d'infections du fait de la diminution de l'immunité, des troubles digestifs,

l'apparition ou l'aggravation d'un état diabétique, l'apparition ou l'augmentation d'une hypertension artérielle, A plus haute dose et sur le long terme, on peut avoir des troubles de la vision (Jesus, 2015).

## VI. 2 .2 Médicaments de l'hyperuricémie :

### VI. 2 .2.1 Le fébuxostat

Le fébuxostat est un nouveaux médicament (Figure 12), il agit comme inhibiteur non purinique plus récent et plus puissant de la xanthine-oxydase du même ressort que l'allopurinol, sauf que le fébuxostat est sélectif à la XO, tandis que l'allopurinol, en raison de sa structure chimique analogue aux purines (Jean et Pharm, 2007). Il possède des propriétés hypo-uricémiante plus marquée que l'allopurinol sans toutefois montrer un gain sur la diminution des symptômes. Il peut constituer une alternative intéressante à l'allopurinol (Michel, 2018).

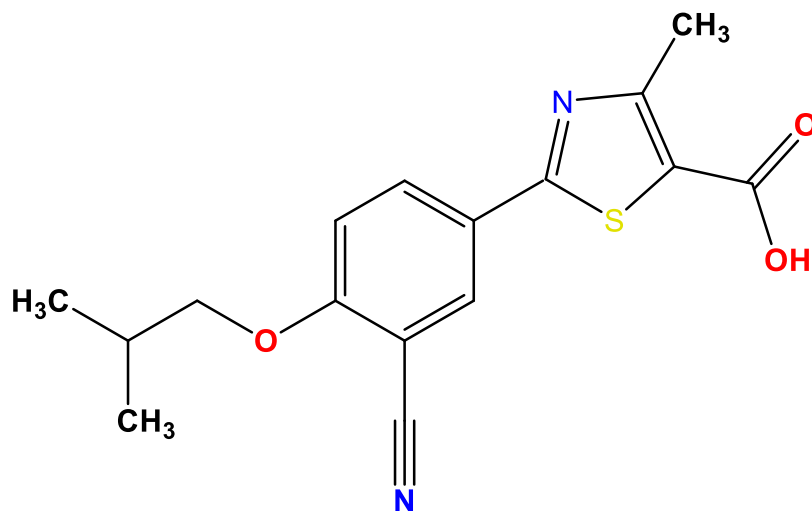


Figure 12. Structure 2D de fébuxostat

#### -Les effets indésirables :

Les effets indésirables fréquents sous fébuxostat sont :

Digestifs : nausées, diarrhées.\*

Cutanés : éruptions cutanées et risque de réactions cutanées graves ; réaction hypersecibilité.\*

\*Autres : céphalées, perturbation du bilan hépatique, troubles cardiaques et thyroïdiens .

(Marion, 2014).

### VI. 2 .2.3 Allopurinol

L'allopurinol ou 4-hydroxypyrazolo-(3,4-d) pyrimidine (Figure 13), analogue chimique de l'hypoxanthine (Michel et al, 2018) et son dérivé l'oxypurinol inhibent la xanthine-oxydase, enzyme qui assure la transformation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, le schéma réactionnel est présenté dans la Figure 14 (Jean et Pharm, 2007) .

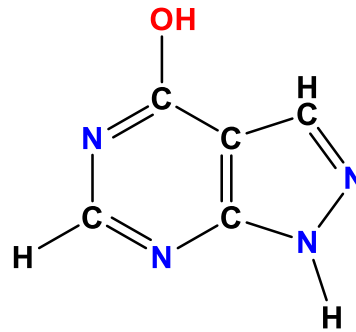


Figure 13. Structure 2D de l'allopurinol

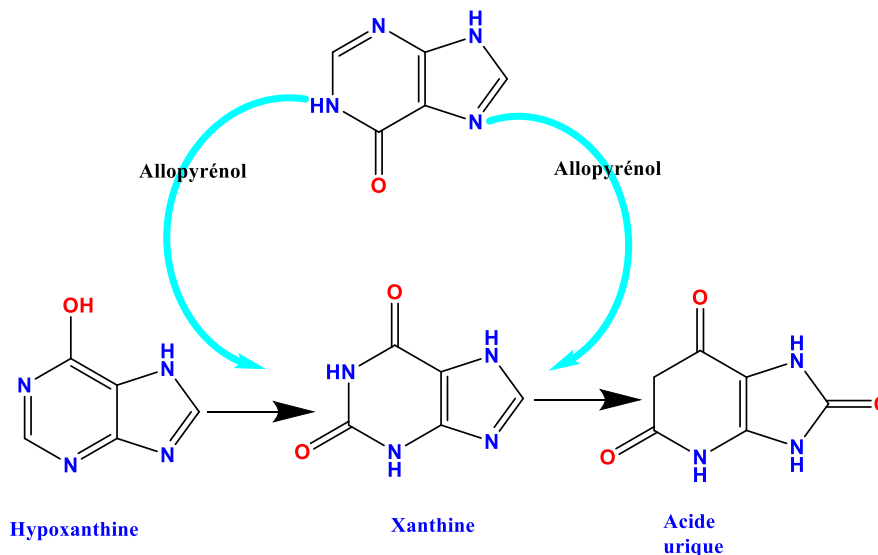


Figure 14. Inhibition de la xanthine oxydase par l'allopurinol afin d'empêcher la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et / ou acide urique

#### Les effets indésirables :

Le principal effet indésirable à redouter sous allopurinol est une intolérance cutanée ; Des réactions allergiques cutanées surviendraient en effet chez un peu moins de 5% des patients goutteux sous allopurinol ; Plus rarement, des éruptions cutanées graves de type toxidermie bulleuse (syndrome de Stevens-Johnson, syndrome de Lyell) ou réaction d'hypersensibilité généralisée (syndrome DRESS) (Girou, 2018).

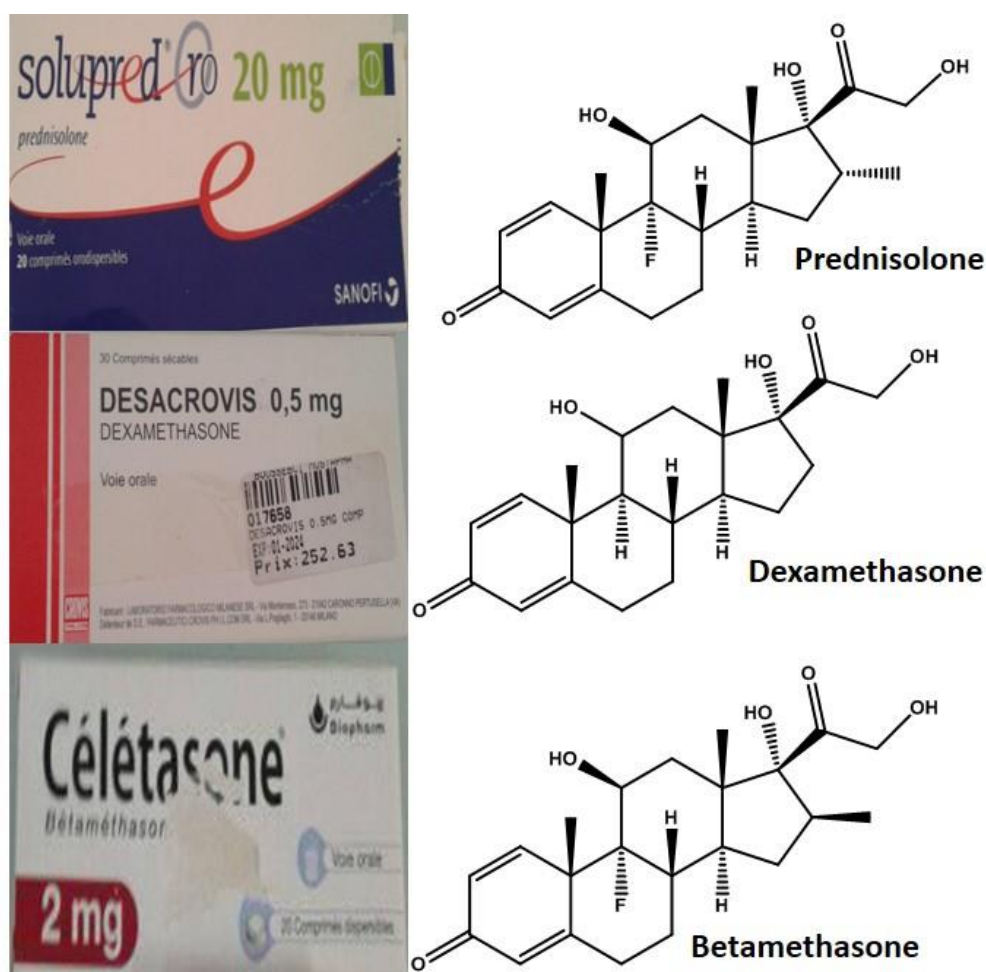
# **MATERIELS ET METHODES**

## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique

Le lait bovin choisi sur la base de sa richesse de l'enzyme (XO), ainsi, la facilité de son extraction, il a été obtenu d'une ferme qui se trouve aux environs de la commune de Ksar El Hirane, de la Wilaya de Laghouat.

Nous avons utilisé des médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens qui sont : Prédnisolone (SOLUPRED®), Dexaméthasone (DESACROVIS®), Betaméthasone (CELETASON®) ; ils ont été acheté à partir d'une pharmacie (**Figure 15**).



**Figure 15.** Photo représentant les médicaments étudiés dans notre travail et leurs structures 2D

## I.2. Appareillages et réactifs

L'appareillage utilisé est : centrifugeuse réfrigérée (ROTANTA 460R), lecteur à microplaques ELx800 biotec-uv (universal microplaque reader) accompagné avec une imprimante Epson Lq-2070.

\* Préparation de solution tampon pour l'extraction de l'enzyme constitué de : Di-potassium monohydrogène phosphate ( $K_2HPO_4$ ) et l'acide Ethylène Diamine Tétra-acétique (EDTA).

\* Préparation de solution tampon phosphate à pH 7 pour les tests d'inhibition constitué de : Di-potassium monohydrogène phosphate ( $K_2HPO_4$ ) et di-hydrogenophosphate de potassium ( $KH_2PO_4$ ) et chlorure de potassium (KCl).

\* Di-Methyl Sulfoxide (DMSO) ; l'eau distillée ; le substrat (la xanthine) ; le réactif du dosage de l'acide urique de la marque SPIN REACT LAB, été obtenus de laboratoire de biologie, université Amar Telidji, Laghouat

## II. Protocoles expérimentaux

### II.1 Extraction de la xanthine oxydase du lait bovin

Le processus d'extraction a été effectué selon Bou-Saleh et al , dans des conditions très strictes en utilisant une centrifugeuse réfrigérée et un lait bovin frais.

1- Le lait (1 L) a été centrifugé à 4000 tr/min pendant 35 min à 4 ° C puis exposé à plusieurs étapes de séparation et à différentes vitesses allant de 1800 tr / min à 4500 tr / min à 4 ° C.

2- La crème flottante a été récupérée et dissoute dans un double volume de phosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ , 0,2 M) contenant 1 ml (EDTA). Le mélange a été soumis à une agitation douce pendant deux heures, puis centrifugé à 4000 tr / min pendant 40 min à 4 ° C.

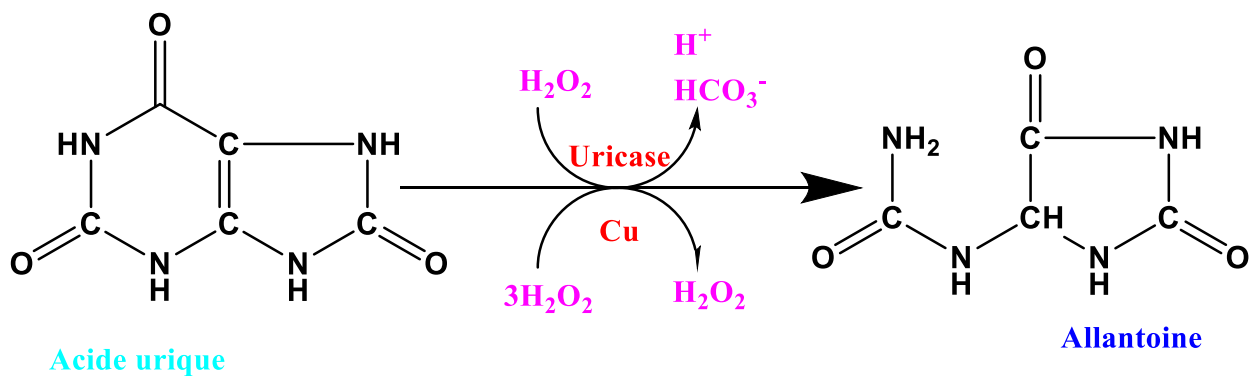
3- Nous obtenons des fractions d'enzymes, puis le surnageant a été filtré, collecté et conservé sous -30 ° C pour les tests. Nous décidons de travailler avec des extraits d'enzymes brutes pour rapprocher des conditions de l'organisme humain (*in vivo*) où les enzymes ne sont pas libres ou purifiées mais mélangées avec de nombreuses protéines (**Bou-Saleh et al, 2020**)

### II.2. Test de l'activité de la xanthine oxydase (XO)

Les propriétés d'inhibition de la xanthine oxydase ont été évaluées en mesurant la formation d'acide urique à partir de xanthine à la température ambiante. Nous avons testé l'activité de la XO par l'ajout d'un volume de 22,6 µl de l'enzyme dilué dans le tampon phosphate à pH 7 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,34g), KCl (4,5g) et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,435g) dans 500ml d'eau distillée) avec un volume de 45,2 µl de xanthine comme substrat puis une incubation à 37 °C pendant 30 min. Puis l'ajout d'un volume de 136µl de réactif de dosage d'acide urique de la marque BIOLABO qui nous donne une coloration rose indiquant la production de l'acide urique. La lecture s'effectue dans un lecteur à microplaque à 492 nm (**Bou-Saleh et al, 2020**)

### II.3. Principe du réactif du dosage

Chez certains mammifères, une autre enzyme, l'uricase, dégrade l'acide urique en allantoiné, un produit de dégradation inoffensif. L'humain n'exprime pas cette enzyme à l'état physiologique (figure 16), (**Jean et Pharm, 2007**).



**Figure 16.** Schéma réactionnel de l'uricase sur l'acide urique

Nous avons proposé l'utilisation d'un réactif spécifique pour détecter l'acide urique sous forme de quinoneimine colorée en rose, nous avons donc utilisé le réactif commun pour la détermination quantitative de l'acide urique (SPIN REACT Lab) qui consiste en trois bouteilles. Le premier est composé de deux enzymes, l'uricase (120 U / l) et la peroxydase (450 U / l), ainsi que l'hexacyanoferrate (II) de potassium (42µmol / L) avec l' amino-antipyrine (0,150 mmol/L), c'est le premier réactif. La seconde est la solution tampon avec un pH 7,4 à 25 °C (50 mmol/L) et le dichlorohydroxybenzène sulfonate (2 mmol / L) c'est le deuxième réactif. Le troisième constitue le produit, qui est l'acide urique avec une concentration de 100 mg / l (595 µmol/L). L'uricase agit sur l'acide urique produit à la fois par BXO pour produire de l'allantoiné, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène en présence de peroxydase réagit avec un chromogène (aminoantipyrine et dichloro-hydroxy benzène sulfonate) pour donner de la quinoneimine, un complexe de couleur pourpre. L'absorbance alors

est mesurée à 510 nm (490–530) est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans l'échantillon (Bou-Saleh et al, 2020).

#### II.4. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysé par la xanthine oxydase

Nous avons testé l'activité inhibitrice de nos médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens : Prédnisolone, Dexaméthasone, et Betaméthasone à l'aide d'un lecteur à microplaque à 96 puits, après plusieurs essais afin de déterminer les concentrations nécessaires de l'inhibiteur, dont le volume final du milieu réactionnel égale à 250µl.

Un volume de 22,6 µl de l'extrait enzymatique dilué dans le tampon est ajouté à 45,2 µl de l'inhibiteur (la molécule pure dilué avec 8 concentrations croissantes), ce mélange est pré-incubé pendant 15min à 37°C. La réaction enzymatique est déclenché par l'ajout de 45,2 µl de substrat (xanthine à 0,06 g/l), le mélange est incubé à 37°C pendant 30min, le réactif de dosage de l'acide urique est ajouté avec un volume de 136 µl, le milieu est reposé à température ambiante (25 °C) pendant 30 min, la lecture est effectuée à 492 nm dans le lecteur de microplaque à 96 puits. Le blanc de la plaque est dépourvu du substrat et de l'inhibiteur et le blanc de l'extrait est dépourvu de substrat et le control est dépourvu de l'inhibiteur.

Toutes les expériences ont été répétées plusieurs fois (10 fois) pour s'assurer des résultats obtenues.

La valeur de IC50 a été déterminée de la représentation graphique I % = f (I) tel que I% est déterminée suivant cette relation :

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

Avec :

**I%** : le pourcentage d'inhibition.

**A médicament** : l'absorbance de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur.

**A control** : l'absorbance de l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur.

**IC<sub>50</sub>** : la concentration inhibitrice médiane. Elle mesure la quantité d'une substance (inhibiteur) qu'elle est nécessaire pour inhiber l'activité enzymatique à la moitié 50%.

### III. L'amarrage moléculaire

Pour réaliser la modélisation moléculaire, nous avons choisi le meilleur inhibiteur et l'enzyme humaine pour comprendre le mécanisme d'inhibition. La structure 3D de la bétaméthasone a été obtenue à partir de la base de données PubChem compound, elle a été assemblée avec le logiciel Discovery Studio v4. La structure 3D de la xanthine oxydase du lait humain (PDB ID : 2C KJ) a été obtenue à partir de la banque de données des protéines (PDB). Cette structure est choisie car elle est la seule qui est non mutée. Pour les études de l'amarrage, la protéine a été préparée en éliminant toutes les molécules d'eau, les hétéroatomes, n'importe quels solvants co-cristallisés et les ligands. Il est bien connu que les fichiers PDB ne contiennent pas d'hydrogènes. Par conséquent, les hydrogènes polaires et les charges partielles ont été ajoutés à la structure en utilisant Autodock tools (ADT) (version 1.5.6). Les calculs d'amarrage ont été effectués avec le programme AutoDock Vina. Parce qu'il utilise des boîtes rectangulaires pour le site de fixation, le centre de la boîte a été défini et la boîte de docking a été affichée en utilisant ADT. Le docking était spécifique avec une boîte de grille de 22 x 22 x 22 et des points de grille séparés de 1Å, positionnés au centre de la protéine (x =79,017 ; y =77,284 ; z = 141,85). Les paramètres par défaut ont été utilisés, à l'exception du nombre de conformations résultantes défini en 1. Le nombre de tours de docking était de 50 et les conformations finales obtenues étaient de 50. Toutes ont été bien traitées. Les conformations préférées étaient celles de la plus faible énergie de fixation dans le site actif. Enfin, les résultats de docking générés ont été directement chargés dans le logiciel Discovery Studio, v4 (**Serseg et Benarous, 2018**). Le type d'inhibition a été confirmé par le taux de répétition des conformations préférées pour chaque médicament. Le site actif de l'enzyme (2CKJ) est constitué de quatre acides aminés catalytiques tels que Glu1262, Arg913, Gln768 et Arg881. Ces paramètres sont les mêmes suivies dans le travail publié par **Bou-Saleh et al, 2020**.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**



## I. Rendement d'extraction de la XO

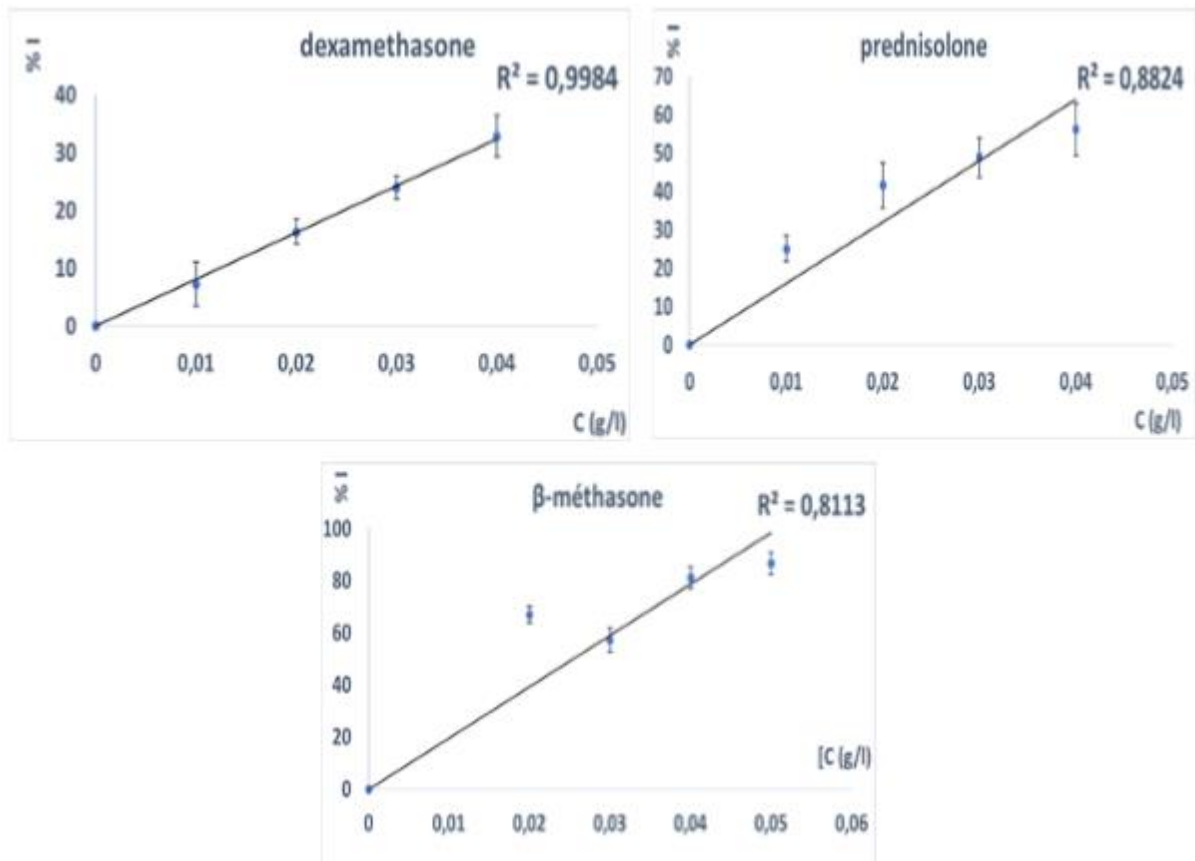
Le rendement de l'extraction qui nous avons obtenu dans un notre étude est 5,1 % (un volume de 51ml de l'extrait enzymatique brut à partir de 1L de lait bovin).

## II. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase

L'effet inhibiteur de nos molécules pures sur l'activité de la XO du lait bovin a été évalué par une méthode spectrophotométrique à 492 nm. Les résultats obtenus montrent que tous les médicaments anti-inflammatoires purs inhibent l'activité de la XO. Pour chaque inhibiteur, les valeurs IC50 ont été calculées. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations des inhibiteurs exprimées en µg/ml, ce qui nous amène à déterminer la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de chaque médicament dont les courbes sont représentés dans la (figure 17). Ces représentations graphiques nous a permis de déterminer les valeurs des IC50 où les valeurs sont enregistrés dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs

Les inhibiteurs	Les valeurs d'IC50 (µg/ml)
Dexaméthasone	61,71 ± 3,79
Prednisolone	31,30 ± 1,19
β-méthasone	25,39 ± 1,24



**Figure 17.** Représentations graphiques de l'inhibition de la réaction catalysée par la XO

Dans un notre expérience, nous constatons des résultats bien précises que les trois médicaments ont un pouvoir inhibiteur important contre l'activité enzymatique de la xanthine oxydase et chaque inhibiteur a donné une valeur de IC<sub>50</sub> différente selon la spécificité structurale et fonctionnelle. Les valeurs des IC<sub>50</sub> varient entre 25,39 µg /ml pour la β-méthasone à 61,715 µg/ml pour la Dexaméthasone.

Des recherches scientifiques ont été réalisées sur l'inhibition de la xanthine oxydase afin de trouver des nouveaux médicaments pour le traitement de la goutte et l'hyperuricémie sans effets secondaires. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet des anti-inflammatoires stéroïdiens et nous voulons comparer nos médicaments par ces travaux qui sont regroupés dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Les valeurs des IC50 pour la XO bovine à partir de quelques références bibliographiques.

<b>Inhibiteurs</b>	<b>IC50 (µg/ml)</b>	<b>Références</b>
Febuxostat	0,076	<b>(Bou-Saleh et al., 2020)</b>
Allopurinol	2,73	
Diclofénac de sodium	6,11±1,27	<b>(Rabhi et Chaib, 2019)</b>
Naproxène sodique	3,12±1,06	
Indométacine	0,96±0,11	
Ibuprofène	9,46±4,29	
Célécoxib	3,36±0,86	
Oxypurinol	4,31±0,5	
Fraxamoside	8,66±0,7	<b>(Vitale et al., 2017)</b>
acide ursolique	10,3	<b>(Eman et al., 2018)</b>
S-allyl cysteine	33	<b>(Preethi et al., 2018)</b>
Naringine decanoate	88,33	<b>(Branco et al., 2017)</b>
Naringine octanoate	79,865	<b>(Branco et al., 2017)</b>
Oleioside 11-methyl ester	104,731±13	<b>(Vitale et al., 2017)</b>
Naringine	119,765	<b>(Branco et al., 2017)</b>
Hesperidin decanoate	155,55	<b>(Branco et al., 2017)</b>
Hydroxytyrosol	173,58±22	<b>(Vitale et al., 2017)</b>
Oleuropein	181,07±17	<b>(Vitale et al., 2017)</b>
Hesperidin	203,51	<b>(Branco et al., 2017)</b>

Le fébuxostat, allopurinol et l'oxypurinol sont les inhibiteurs de la XO commercialisés comme des médicaments les plus puissants. C'est le meilleur inhibiteur par rapport à nos inhibiteurs. Nous remarquons d'après les travaux de Rabhi et Chaib, 2019, que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) présentent un effet inhibiteur plus puissant que les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS). Ce résultat peut être interprété par l'existence des cycles benzéniques dans les AINS et qui sont absents chez les AIS.

En revanche, si nous comparons nos inhibiteurs avec la naringin decanoate, la naringine octanoate, l'oleioside 11-methyl ester, la naringine, l'hesperidin decanoate,

l'hydroxytyrosol, l'oleuropeine et l'hesperidine, nous trouvons que nos médicaments AIS sont plus efficaces avec des valeurs de IC50 de deux à trois fois nettement supérieures.

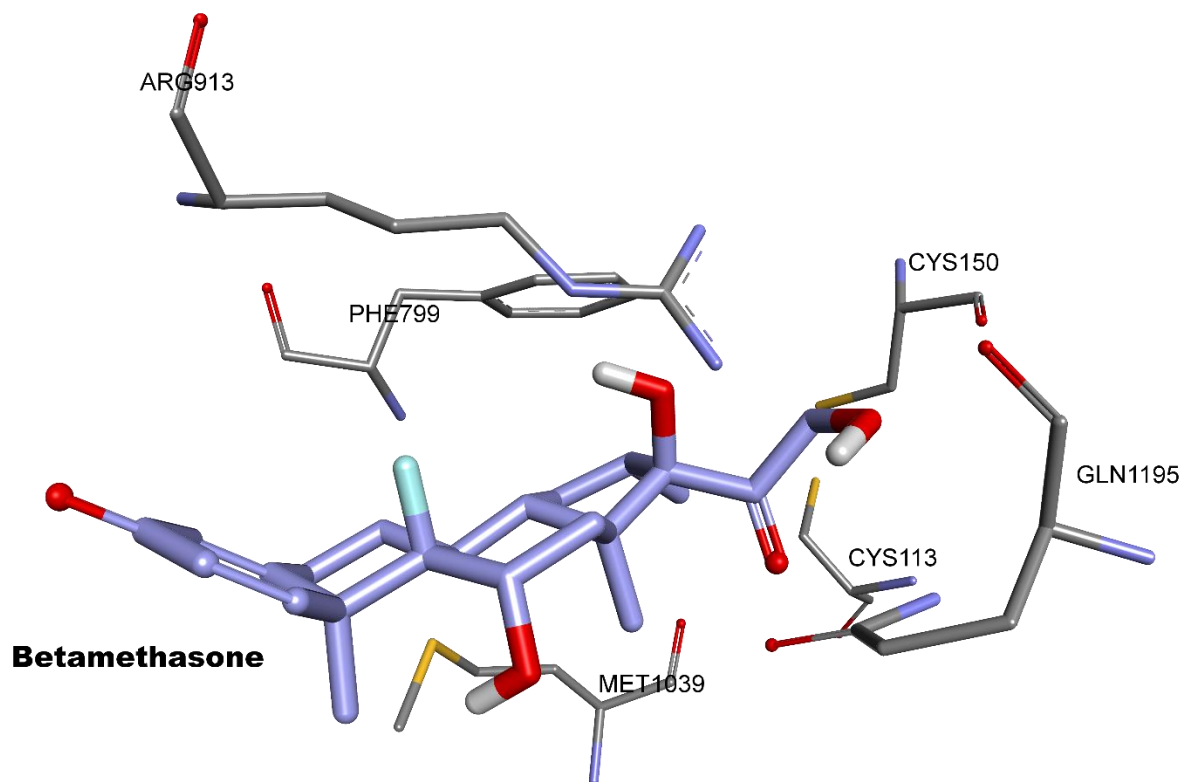
Le protocole que nous avons utilisé dans notre travail est encore nouveau et il est publié dans l'article de **Bou-Salah et al., 2020**. C'est pourquoi nous n'avons pas trouvé autres médicaments ou molécules pures pour la comparaison.

### **III. l'amarrage moléculaire**

Afin de définir la nature des interactions entre inhibiteurs et enzymes, nous avons mené des expériences d'amarrage des médicaments étudiés dans le site actif de XO avec le programme AutoDock Vina (**Benarous et al., 2018**).

Après l'amarrage, nous avons obtenu de nombreuses solutions, nous allons accepter et refuser les solutions selon des critères bien déterminés qui se basent principalement sur l'énergie d'association du complexe enzyme-inhibiteur la plus faible correspondant à un complexe plus stable.

La bétaméthasone (C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>), est un glucocorticoïde synthétique, ou nommé aussi stéroïde 20-oxo, de masse moléculaire égale à 206,285g/mol, est composé de 4 cycles et des groupements carboxyle, carbonyle et hydroxyles et un atome de fluor. La conformation présentée dans la (figure 18) est la plus répétée avec un taux de 100%. L'inhibiteur a fait 12 interactions hydrophobes de type  $\pi$ -alkyle et alkyle-alkyle avec les acides aminées du site actif de la XO qui sont Cys113, Cys150, Phe799, Arg913, Met1039 et Met1195. Aucune interaction hydrogène n'est trouvé dans ce complexe.



**Figure 18.** Représentation de la meilleure pose de docking de la bêta-méthasone sur la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif .

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

La goutte est une maladie chronique fréquente liée au métabolisme de l'acide urique dont la manifestation clinique la plus caractéristique est une monoarthrite aiguë du gros orteil. Elle est associée, bien que de façon inconstante, à une augmentation du taux circulant d'acide urique (hyperuricémie). Son évolution sans traitement se fait vers le dépôt d'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme avec une prédilection pour les articulations (arthrite goutteuse).

Souvent considérée comme une affection non grave, elle a en fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières décennies. Les connaissances physiopathologiques de la goutte ont évolué pour mieux comprendre ses origines et ainsi mieux la traiter et trouver des médicaments plus efficaces.

Dans nos expériences, les AIS ( $\beta$ -méthasone, Dexaméthasone et Prednisolone) ont été sélectionnés pour voir leur efficacité contre la xanthine oxydase car ils sont utilisés pour calmer les douleurs dans les crises goutteuses. Nous avons trouvé à travers des résultats expérimentaux obtenus grâce à ce test que ces inhibiteurs ont une activité inhibitrice sur la xanthine oxydase bovine, ce qui est confirmé par les IC50 dont les valeurs varient de 25,392 à 61,715  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Ces résultats sont confirmés par l'amarrage moléculaire où nous avons déterminé les interactions établies dans le complexe enzyme-inhibiteur.

Nos trois médicaments sont des inhibiteurs modérés de la xanthine oxydase. Par conséquent, nous avons trouvé la  $\beta$ -méthasone avec IC50 de 25,392  $\mu\text{g}/\text{ml}$  comme un meilleur inhibiteur.

Des études sont toujours continues au développement d'un traitement de la goutte et à la production de nouveaux médicaments plus efficaces et moins d'effets secondaires.

Nous envisageons de chercher et d'étudier d'autres molécules pures, synthétiques ou naturelles qui peuvent présenter des effets inhibiteurs contre la xanthine oxydase et qui peuvent servir comme des potentiels médicaments contre la goutte avec moins d'effets secondaires.

# Références bibliographiques

- 1-Aurélien Mary ; Amélie Boursier ; Michel Brazier et Patrice Fardellone.** (2018) .  
Traitement de la goutte. Article. P3,6,8,9.
- 2-Branco, M.E.M., Yollanda, E. M. F., Thiago, G. A., Marcia C. F. M., Camila W. L., Alexandra, C. F.S., Oliveira C.P.** (2017). Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by acylated derivatives of flavonoids synthesised enzymatically. JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY vol 32, 978-985.
- 3-Bou-saleh Leila, Benarousse khadidja, Isabelle Bombarda, Mohamed Yousfi and linani Abed elrahmen.** (2020). In vitro and in silico inhibition studies of five essential oils on both enzymes human and bovine xanthine oxidase. Article in press. Université Amar tlidji.
- 4-Corinne T.** (2018). Nouvelle traitement de la goutte. Congrès français de rhumatologie. [www.egora.fr](http://www.egora.fr).
- 5- Estelle B.** (2015). La goutte : un rhumatisme inflammatoire. <https://www.futura-sciences.com>.
- 6- François R.** (2015). Traitements corticoïdes", Union Nationale des Pharmacies de France (accessible en ligne). <https://www.pourquoidoctor.fr/Articles/Question-d-actu/6896-Goutte-450-000-personnes-touchees/amp>
- 7- Girou J.** (2018). Prise en charge de l'hyperuricémie en médecine générale : approche qualitative. Médecine humaine et pathologie. Dumas. P24,27,32,33.
- 8- Hamlaoui I.** (2014). Etude théorique des réactions enzymatiques : Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones. Thés de doctorat. L'Université Constantine. P7,8 ,10,16.
- 9- Hygo J.** (2017). Quels sont les symptômes de la goutte ? – AlloDocteurs. <https://mobile.allodocteurs.fr>.
- 10- Jean M.** (2015). Médicament de la goutte .pdf de Pharmacologie Médicale Toulouse. Université de Toulouse. P10,15.
- 11- Jean-Michel Boileau , B. Pharm., Pharmacie Chantal Ratelle .**(2007). Le traitement de la goutte.les page bleu. P30,31,32,33.
- 12- Jésus C.** (2015). "Cortisone-info, le site d'information sur la cortisone et la corticothérapie", Assistance publique-Hôpitaux de Paris (accessible en ligne). Magazine 10 juin 2015.
- 13- Marion R.** (2014). La pathologie et ses traitements, rôle du pharmacien d'officine. Thés de doctorat, université Toulouse paul. P 20,78,81,90,106,107,120,128,131,138.
- 14- Pessina A.** (2017). Prise en charge de la goutte en 2017.pdf page bleu. P9.
- 15- Preethi Johnson, Chitra Loganathan, Ancy Iruthayaraj, Kumaradhas Poomani et Palvannan Thayumanavan.** 2018. S-allyl Cysteine as Potent Anti-Gout Drug : Insight Into the Xanthine Oxidase Inhibition and Anti-Inflammatory Activity.2018.
- 16- Rabhi f, chaibe K .**2019. Etude in silico et in vitro de l'effet inhibiteur de quelques médicaments anti-inflammatoires sur la xanthine oxydase bovin. Université Ammar tlidji. P41.

**17- Sylvain S.** (2013). L'acide urique : une molécule physiologique pouvant être pathologique. Thèse de doctorat. L'université Limoges. P45.

**18- Thomas B.** (2017). Pharmacologie anti-inflammatoire. Pdf. IFSI. P37

**19- <https://www.aquaportail.com/definition4348-xanthine.html>.**

## Résumé

La xanthine oxydase est une protéine cytoplasmique ubiquitaire qui catalyse les deux dernières étapes du catabolisme des purines. Les dernières études ont montré son implication dans plusieurs pathologies telles que l'hyperuricémie et la goutte. L'inhibition de cette enzyme est ainsi nécessaire dans le traitement ou la prévention de plusieurs maladies. L'intérêt de notre travail repose sur la mise au point de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydase qui peuvent jouer le rôle de précurseurs dans l'élaboration d'un nouveau médicament capable d'interagir avec cette cible d'une manière sélective et avec moins d'effets indésirables. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition ainsi de savoir la nature des interactions entre ces inhibiteurs et la xanthine oxydase, nous avons utilisé l'amarrage moléculaire avec le logiciel Autodock Vina. Les résultats obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 variant de  $25,29 \pm 3,79$  à  $61,71 \pm 1,24$  µg/ml contre la xanthine oxydase. La betaméthasone présente plusieurs interactions hydrophobes au sein du site actif de la xanthine oxydase. Nous confirmons que ces inhibiteurs peuvent être employés dans le traitement de la goutte.

Mots clés : Xanthine oxydase, inhibition, goutte, anti-inflammatoires, amarrage moléculaire.

## المخلص

يعمل الكزاننتين اكسيداز والذي هو بروتين سيتوبلازمي موجود في كل أجزاء الجسم على تحفيز آخر مرحلتين من مراحل استقلاب اليورينات. أظهرت الدراسات الأخيرة مشاركتها في أحداث العديد من الأمراض منها مرض فرط حمض اليوريك أو ما يعرف بمرض النقرس، وبالتالي فإن تثبيط عمل هذا الانزيم هو من الوسائل الضرورية للعلاج والوقاية من العديد من الأمراض. ركزنا في دراستنا هذه على تطوير مثبطات لأنزيم الكزاننتين اكسيداز مما يساعد على تطوير أدوية جديدة قادرة على التداخل مع الهدف بطريقة اختيارية وبأقل آثار جانبية ممكنة. من أجل فهم أفضل لآلية التثبيط ومعرفة طبيعة التفاعلات بين هذه المثبطات و الكزاننتين أكسيداز، استخدمنا الإرساء الجزيئي مع برنامج الأوتو دو ك فينا.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه الجزيئات لها قوة مثبطة هامة مع قيم تركيز المثبط بنسبة 50% تتراوح بين 25.29 و 61.71 مل/كغ ضد الكزاننتين اكسيداز. كما تؤكد أن هذه المثبطات يمكن استعمالها في معالجة مرض النقرس. يظهر البيتاميثازون عدة تفاعلات كارهة للماء داخل الموقع النشط لكزاننتين الأكسيداز. تؤكد أنه يمكن استخدام هذه المثبطات في علاج النقرس.

الكلمات المفتاحية: الكزاننتين أكسيداز، التثبيط، النقرس، الالتهابات الستيرويدية، الإرساء الجزيئي.

## Abstract

Xanthine oxidase is a ubiquitous cytoplasmic protein that catalyzes the last two stages of purine catabolism. The latest studies have shown its involvement in several pathologies such as hyperuricemia and gout. Inhibition of this enzyme is therefore necessary in the treatment or prevention of several diseases. The interest of our work is based on the development of new inhibitors of xanthine oxidase that can play the role of precursors in the development of a new drug capable of interacting with this target in a selective way and with less side effects. In order to better understand the inhibition mechanism and to know the nature of the interactions between these inhibitors and xanthine oxidase, we used molecular docking with Autodock Vina software. The obtained results show that these molecules have a significant inhibitory power with IC50 values varying from  $25.29 \pm 3.79$  to  $61.71 \pm 1.24$  µg / ml against xanthine oxidase. Betamethasone has several hydrophobic interactions within the active site of xanthine oxidase. We confirm that these inhibitors may be used in the gout treatment.

Key words: Xanthine oxidase, inhibition, gout, anti-inflammatories, molecular docking.