

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

THEME

Etude in silico et in vitro de l'effet inhibiteur de quelques complexes organométalliques sur la xanthine oxydase humaine

Soutenu publiquement le : 23 / 06 / 2020

Par :

CHINE karima

MUSTEFAOUI Nadjat

NEBEG Kheira

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

Dr.NIA Samira

MCB Examineur

Dr.EL HOUTI Fatiha

MCA Président

Dr.BENAROUS Khedidja

MCA Encadreur

M^{elle} BOU-SALEH Leila

Doc. Co-encadreur

Année Universitaire 2019- 2020

Dedicace

Au nom d'Allah le Miséricordieux le très Miséricordieux Je dédie ce travail :

A la plus belle créature que Dieu a crée sur terre

A cette source de tendresse, de patience et de générosité, A ma mère

A mon très cher père Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour

mon éducation et mon bien-être, ce travail est le fruit de tes sacrifices

que tu as consentis pour mon éducation

A mon très cher unique frère Kouider

A mes très chères sœurs soumaia Fatima Khadidja Fatiha

A toute ma grande famille

et sans que j'oublie mes très chers amies

kheira Nadjat sofia

CHINE Karima

Dedicace

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : MUSTEFAOUI Rahmania

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A MON TRES CHER PERE Mohamed

De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières.. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

A MES SOEURS Meriem, Hadda et Aïcha

Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de tes avoir comme sœurs. Je ne pourrais jamais imaginer la vie sans vous, vous comptez énormément pour moi, vous êtes les sœurs qui assurent leurs rôles comme il faut, je n'oublierais jamais vos encouragements et vos soutiens le long de mes études, je vous estime beaucoup et je vous aime beaucoup. Je vous souhaite beaucoup de succès, de prospérité et une vie pleine de joie et de bonheur.

A mes frères Mohamed, Khadir, Kadeur, Ibrahim et Ahmed

A mes belles-sœurs Saadia, Saida, Saadia et Khedidja

À mes très chers à mon cœur mes nièces Fatima, Wahiba, Bothayna et Rahma

Et à mon cher trinôme, mes sœurs de cœur Nebeg kheira et Chine Karima avec lesquelles j'ai partagé ce travail.

À tous les membres de ma famille, petits et grands

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

À tous mes collègues de la promotion de Biochimie Appliquée 2020

MUSTEFAOUI Nadjat

Dedicace

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

Ma très chère mère (NEBEG Aicha)

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte

A mon très cher père (Miloud)

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation

A mes frères et sœurs Hadjer,Ibrahim,Naouia,Wafa, Abd El Hadi ,Djamel EL Dine .A la belle sœur (Sara) .

A les jeunes bourgeons Zoubir Ibn El aawam ,Habib Allah , Miloud ,Sliman ,Khadidja ,Raid ,Ibrahim

Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence par votre amour, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille, que ce travail vous témoigne de ma sincère affection

Sans Oublier ma sœur , ma camarede et ma compagnon Daloula

***À mon cher trinôme Nadjat et Krime avec laquelle j'ai partagé ce travail
À toutes les personnes que j'aime et qui m'aime***

A tous les membres de ma famille, petits et grands

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

À tous mes collègues de la promotion de Biochimie Appliquée 2020

je vous dis merci

NEBEG Kheira

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, nous remercions DIEU, le tout puissant, pour nous avoir donné le courage et la patience d'achever ce travail.

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadreur **Dr. Khedidja BENAROUS** qui a guidé, suivi le déroulement et l'exécution du travail de cette mémoire en nous prodiguant tout aide possible, et en nous consacrant son temps précieux. Nous remercions également Monsieur **Abderrahmane LINANI** et Mademoiselle **Leila BOU SALAH**, pour leur conseils et leur aides*

*Nous remercions infiniment madame **Khedidja RABHI** pour sa générosité incroyable de nous fournir le lait afin de réaliser notre étude. Ainsi, son nouveau-né **Mohamed bassem** qu'il trouve dans ce mémoire nos connaissances infinies.*

*Nous remercions infiniment **Professeur Luciano Saso** de l'université de Rome-Italie et **Professeur Irena Kostova** de l'université de Soia-Bulgaria pour avoir nous fournir les complexes organométalliques*

Un grand remercie aux membres de jury qui ont bien voulu nous faire l'honneur de juger la qualité de ce travail et de formuler leurs remarques constructives.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de notre très vifs remerciements.

Karima, Nadjat et Kheira

Résumé

La goutte est caractérisée par des taux élevés d'acide urique (AU) dans le sang, ces niveaux élevés d'AU sont associés à une ingestion et une métabolisation accrues des purines et / ou à une diminution de leur excrétion. Dans ce domaine, la xanthine oxydase (XO), en convertissant l'hypoxanthine et la xanthine en AU, joue un rôle important dans le contrôle de l'hyperuricémie. Sur la base des limites et des effets indésirables liés à l'utilisation de l'allopurinol et du fébuxostat, les médicaments approuvés les plus connus à effet inhibiteur de XO. Le but de cette étude est d'évaluer *in vitro* et *in silico* de l'activité inhibitrice par des complexes organométalliques synthétisés en Italie (Ce³ et La⁵), contre la xanthine oxydase humaine (XOH), à l'aide de l'amarrage moléculaire et d'une méthode d'analyse innovante basée sur la double détection enzymatique (DED). Les résultats montrent une inhibition modérée de la XOH avec une IC₅₀ de 261,1±9,91 µg/ml, 56,2±2,46 µg/ml ; pour Ce³ et La⁵, respectivement. Une étude *in silico* basée sur l'amarrage moléculaire à l'aide du programme GOLD a été réalisée pour étudier l'inhibition de XOH. Les résultats montrent que les deux complexes organométalliques utilisés donnent un effet inhibiteur important contre la XOH.

Mots clés : xanthine oxydase humaine, hyperuricémie, goutte, inhibition, lanthanides III, amarrage moléculaire.

Liste des abréviations

Ac : l'absorbance du contrôle
AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AE : l'absorbance de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur .
AU: Acide Urique
COX-2: cyclooxygénase-2
DCPS: Acide 2-4 Di chlorophenol sulfonate
DMSO : Di-Methyl Sulfoxide
EDTA : Ethylene Diamine Tétracetic Acid
FAD: flavin adénine dinucléotide
FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Réduit
I % : pourcentage d'inhibition
IC50 : concentration inhibitrice de 50 % de l'activité
KDa : Kilo Dalton
Mo: Molybdène
Mo-pt : molybdoptérine
NAD⁺: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
PDB:Protein Data Bank
SH : sulfhydriles
XO : Xanthine oxydase
XDH : Xanthine déshydrogénase
XOH : Xanthine oxydase Humain
XOR : xanthine oxydoréductase
4-AP : 4-amino phenasone

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain.....	14
Figure 2. (A) accès goutteux typique du gros orteil (Rubino, 2014)	17
Figure 3. Cristaux d'urate de monosodium sous microscopie à lumière polarisante (Delbeth, 2016)	17
Figure 4. Radiographie simple du pied d'un patient atteint de maladie chronique goutte tophacée montrant des gonflements asymétriques des tissus mous cohérents avec tophi, et perforé des changements «érosifs» autour du premier et du cinquième articulations métatarsophalangiennes (flèches) situées loin de la marge commune.....	18
Figure 5. Structure du XOR humain. La structure illustrée est celle d'un XDH dimère mutant humain (PDB: 2E1Q). Les domaines Fe / S, FAD et molybdoptérine sont respectivement de couleur rose clair, vert clair et bleu clair. La boucle interdomaine (résidus 533–590) est colorée en rouge. Le C-terminal est coloré en bleu. Une représentation schématique de la structure du domaine par rapport à la séquence primaire est présentée en bas (Kimiyoshi et al., 2012)	20
Figure 6. Schéma réactionnel du processus enzymatique catalysé par la XO et XDH.....	21
Figure 7. Représentation du mécanisme réactionnel de la XO (Adjadj, 2009)	21
Figure 8. Structure 2D de la colchicine	23
Figure 9. Structure de quelques médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens	25
Figure 10. Structure 2D de l'allopurinol.....	26
Figure 11. Effet de l'allopurinol sur la réaction de la xanthine oxydase (Hamlaoui, 2014).....	26
Figure 12. Structure du Febuxostat.....	27
Figure 13. Protocole d'extraction de la xanthine oxydase (Bou-Saleh et al., 2020).	31
Figure 14. Schéma réactionnel du processus enzymatique catalysé par l'uricase	32
Figure 15. Représentations graphiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la XHO par les deux complexes	39
Figure 16. La meilleure pose de docking pour le complexe La5	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Localisation de la XOR dans les tissus humains (Habib et Laidi, 2013)	19
Tableau 2. Les codes PDB de la XO humaine (données à partir de la PDBsum).	22
Tableau 3. Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs	37
Tableau 4. Les valeurs des IC50 des inhibiteurs de la XOH à partir de la littérature	38

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	10
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	13
I. Goutte	14
I.1. Définition	14
I.2. Les causes et les facteurs favorisants	15
I.3. les symptômes	16
I.4. Diagnostic	17
II. Xanthine oxydase	18
II. 1. Distribution et Localisation	19
II. 2. Structure de la xanthine oxydase	19
II.3. Mécanismes d'action de la XOR	20
II.4. La conversion de la XDH en XO	22
II.5. Codes PDB de la XO humaine :	22
III. Traitements de la goutte	22
III.1. Traitements non pharmacologiques	23
III.2. Traitements pharmacologiques	23
MATERIELS ET METHODES	28
I. Matériels	29
I.1. Matériel biologique	29
I.2. Réactifs et appareillage	29
II. Méthodes	31
I.1. Extraction de la xanthine oxydase du lait humain	31
II.2. Test de l'activité de la xanthine oxydase (XO)	32
II.3. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysé par la XO	33
III. Amarrage moléculaire :	34
RESULTATS ET DISCUSSION	36
I. Rendement d'extraction de l'enzyme	37
II. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase :	37
III. Amarrage moléculaire	39
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	41
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	43

INTRODUCTION GENERALE

Le mot médical «rhumatismal» est utilisé dans un sens très général pour désigner un groupe de maladies douloureuses invalidantes affectant avant tout le système locomoteur.

La plupart des maladies rhumatismales sont chroniques, c'est-à-dire qu'elles persistent ou tendent à récidiver, ainsi qu'à provoquer des modifications structurales ou fonctionnelles de l'organisme, qui se traduisent en fin de compte par une altération permanente. Les maladies rhumatismales regroupent diverses affections. Parmi elles, on trouve l'arthrose (usure des articulations), ou certaines maladies inflammatoires touchant les articulations comme l'arthrite, polyarthrite rhumatoïde, et la goutte (**Laribi et Rabahi, 2017**)

La goutte est une pathologie connue depuis l'Antiquité sous sa forme aiguë. Identifiée pour la première fois par les égyptiens en 2640 avant J.C., la crise de goutte, touchant prioritairement la première articulation métatarsophalangienne, fut renommée « podagra » ce qui signifie « pris au piège par le pied » par les médecins grecs en raison de la ressemblance du pied goutteux avec la patte d'un animal prise dans un piège. Plus tard, au Vème siècle avant J.C., Hippocrate décrit avec justesse certains aspects épidémiologiques de la goutte comme sa prédisposition pour l'homme, sa rareté chez l'enfant et la femme non ménopausée et son lien avec une alimentation riche en excès.

Six siècles plus tard, Galien fut le premier à décrire des tophi, dépôts sous-cutanés de cristaux d'acide urique apparaissant après des années d'hyperuricémie. En plus de l'association déjà connue de la pathologie goutteuse avec un mode de vie de débauche et d'intempérance, il reconnaît le caractère héréditaire de la maladie.

Au IXème siècle, le mot « goutte » voit le jour. En effet, un médecin grec intègre le rhumatisme (« rheuma ») dans la théorie antique des humeurs consistant à considérer le corps humain en quatre éléments fondamentaux devant être en équilibre pour être en bonne santé. Le rhumatisme est alors décrit comme un poison contenu dans les humeurs « pénétrant goutte à goutte dans les jointures » d'où le terme « goutte », dérivé du mot latin gutta. Tout d'abord utilisé pour désigner diverses pathologies rhumatologiques, ce n'est qu'au XVème siècle que le sens de ce mot ne se restreindra qu'à la pathologie goutteuse se substituant ainsi au terme « podagra ».

Tout au long de l'histoire, la goutte a été associée à une alimentation trop riche et à une consommation d'alcool immodérée. Et c'est parce qu'elle a été reliée à ce mode de vie accessible, du moins par le passé, uniquement aux personnes riches que cette maladie fut renommée la « maladie des rois » (**Rubino, 2014**)

Elle est caractérisée par un dépôt de cristaux d'urate monosodique aigue et récidivante susceptible de passer à la longue terme à la chronicité . L'hyperuricémie est identifiée comme le facteur de risque le plus important dans la survenue d'une goutte dont l'acide urique est le produit final du métabolisme des purines. Ces purines sont dégradées par une série de réactions enzymatiques par l'enzyme xanthine oxydase (XO). Les traitements chimiques actuels de cette maladie sont basés sur l'inhibition de la XO (**Laribi et Rabahi, 2017**)

L'inhibition de la XO peut avoir un double rôle en plus de lutter contre la maladie de la goutte et toutes les pathologies qui lui sont associées, elle peut prévenir le stress oxydant en réduisant les espèces réactives oxygénées produites. L'allopurinol, est l'un des puissants inhibiteurs de la XO et le plus utilisé, néanmoins, ce dernier présente des effets secondaires sur la santé humaine (**Habib et Laidi, 2013**).

L'axe principal de ce travail, plus précisément dans la recherche et la découverte de nouveaux médicaments pour les maladies chroniques comme la goutte par tester le pouvoir d'inhiber de la xanthine oxydase humaine par deux complexes organométalliques. L'inhibition de cette enzyme (XO) *in vitro* (dans le laboratoire de transfusion de sang (CTS) dans l'hôpital Ahmed Benadjila de Laghouat. Et *in silico* en utilisant l'amarrage moléculaire (avec le logiciel GOLD)

Le manuscrit se présente de la manière suivante :

- Dans une première partie Synthèse bibliographique
- Dans un second partie matériels et méthodes, résultats et discussion
- et le troisième une conclusion et perspectives.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Goutte

I.1. Définition

La goutte est une maladie rhumatologique, inflammatoire et métabolique touchant une ou plusieurs articulations (<https://www.creapharma.ch/goutte.htm>, consulté le 19/03/2020).

Il se caractérise par le dépôt de cristaux d'urate mono sodique dans les articulations et les tissus .elle se caractérise par l'apparition de crises soudaines de douleurs articulaires, que s'accompagnent de la rougeurs, d'un réchauffement et d'un gonflement de la région touchée.

De façon générale ,une seule articulation est attaquée a la fois .c'est le gros orteil qui est le plus souvent en cause mais d'autres articulations peuvent être touchées comme celle du pied ,genou , des doigts de la main, du coude, du poignet ,...etc.(<https://www.creapharma.ch/goutte.htm>, consulté le 19/03/2020)(Figure 1).

La goutte est plus fréquente chez les hommes, en particulier ceux âges de plusde 40 ans, mais peut aussi toucher des femmes surtout après la ménopause (<https://www.creapharma.ch/goutte.htm>, consulté le 19/03/2020).



Figure 1. Le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain

<https://www.santepusmag.com/3-boissons-puissantes-pour-traiter-larthrite-naturellement/>

I .2.Les causes et les facteurs favorisants

La goutte causée par une condition connue sous le nom d'hyperuricémie, où il y a trop d'acide urique dans le corps. Le corps fabrique de l'acide urique lorsqu'il décompose les purines, qui se trouvent dans notre corps et les aliments que nous mangons. Lorsqu'il y a trop d'acide urique dans le corps, des cristaux d'acide urique (urate mono-sodique) peuvent s'accumuler dans les articulations, les fluides et les tissus du corps, (<https://www.cdc.gov/arthritis/basics/gout.html> consulté le 25/04/2020).

Il n'y a pas de goutte sans hyperuricémie mais une hyperuricémie n'implique pas forcément l'apparition d'une goutte ce qui suppose l'implication d'autres facteurs dans le développement de la pathologie goutteuse (Rubino, 2014).

Parmi les quelles on peut citer :

- **Hyperuricémie** Plus l'uricémie augmente, plus le risque de goutte est élevé, particulièrement à partir d'une uricémie supérieure à 420 $\mu\text{mol/L}$ (soit 70 mg/L) (Rubino, 2014).
- **L'hérédité** : Il existe une prédisposition congénitale à la goutte. La plupart des personnes souffrant de goutte présentent un défaut d'excrétion de l'acide urique d'origine génétique. Celui-ci se traduit inévitablement par une concentration élevée d'acide urique dans le sang (hyperuricémie) (Frei *et al.*, 2017).
- **Médicaments** : Plusieurs médicaments couramment prescrits influencent positivement ou négativement la concentration plasmatique d'acide urique. Ils agissent plus souvent qu'autrement au niveau rénal en freinant ou en stimulant l'excrétion de l'acide urique. Par exemple, l'utilisation régulière de diurétiques provoque une augmentation de la concentration d'acide urique dans le sang (Laribiet Rabahi, 2017).
- **L'âge et le sexe** : Chez les hommes, le risque de goutte augmente régulièrement avec l'âge, mais chez les femmes, dont la prévalence de la goutte est inférieure à celle des hommes à tous les âges, le risque augmente fortement après la ménopause. La raison de la grande différence de risque de goutte entre les hommes et les femmes pourrait être liée en grande partie à l'action uricosurique des œstrogènes (Kuo *et al.*, 2015).

- **Une alimentation riche en purines** dans l'organisme, les purines présentes dans les aliments sont dégradées en acide urique. Les aliments riches en purines sont notamment la viande (en particulier la viande rouge, les abats et la charcuterie), les fruits de mer et des boissons sucrées avec du sucre de fruit (fructose). (<https://www.sante-sur-lenet.com/maladies/rhumatologie/goutte/>, consulté le 18/04/2020).
- Une consommation excessive d'alcool, qui réduit l'élimination de l'acide urique par les reins. (<https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/rhumatologie/goutte/>, consulté le 18/04/2020)
- Autre pathologies telles que l'obésité, l'arthrose, le syndrome métabolique, l'hypertension, le diabète, l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose (<https://lebonmedicament.org/goutte-symptome-traitement/>, consulté le 30/04/2020)

I.3. les symptômes

La goutte se manifeste sous deux formes cliniques, l'accès aigu, et la goutte chronique :

a) L'accès goutteux ou "la crise de la goutte" typique

Consiste en une inflammation très douloureuse d'une seule articulation du membre inférieur. La première articulation du gros orteil est la plus fréquemment touchée (**Figure 2(A)**), mais la crise peut concerner celles du pied, de la cheville ou du genou. Elle survient généralement de façon brutale. Les manifestations sont caractérisées par de très fortes douleurs articulaires, rendant insupportable jusqu'au poids d'un drap. L'articulation apparaît tuméfiée, gonflée, rouge-violette. Avec la résolution de la crise, en quelques jours, la peau de l'orteil desquamé et peut se détacher comme une pelure d'oignon (**Laribi et Rabahi, 2017**).

b) La goutte tophacée chronique

Elle est de survenue tardive puisqu'elle se manifeste habituellement huit à dix ans après le premier accès goutteux. À plus ou moins long terme et en l'absence de traitement, cela entraînant l'apparition des arthropathies chroniques, avec douleurs mécaniques chroniques, particulières par la présence de dépôts uratiques visibles sous la peau, les tophus (**Figure 2(B)**). Une destruction articulaire, un handicap fonctionnel important ainsi que chez certaines personnes, des calculs rénaux révélés par une crise de colique néphrétique, voire une insuffisance rénale (**Laribi et Rabahi, 2017**).

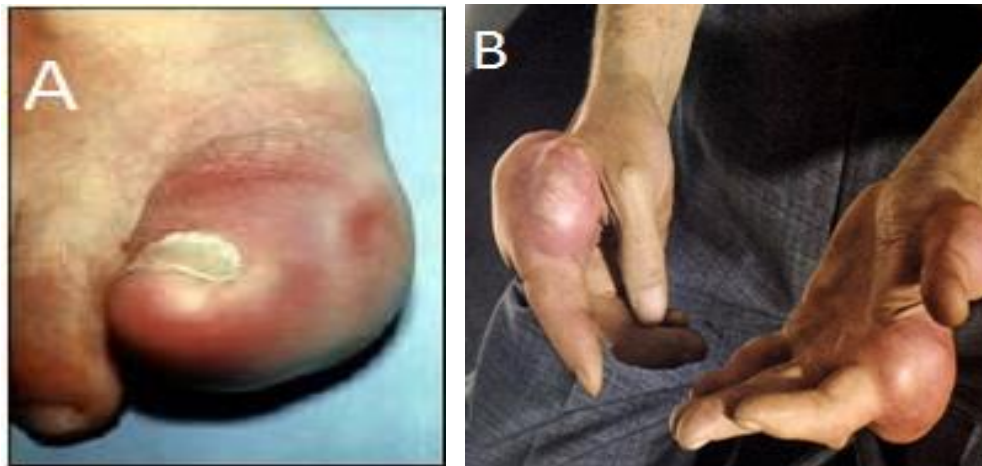


Figure 2. (A) accès goutteux typique du gros orteil (Rubino,2014)
(B)Goutte chronique. Enormes dépôts d'acide urique(tophus)
(<https://www.chu-toulouse.fr/-la-goutte-consulté le15/05/2020>)

I .4.Diagnostic

Deux types d'examen permettent de diagnostiquer la goutte : un examen biologique et un examen radiologique :

a) Examan biologique

La goutte est diagnostiquée avec un degré grand de confirmation et d'exactitude par aspiration ou la suppression du liquide dans le joint affecté et l'examiner pour des cristaux d'urate mono sodique (Figure 3).

Des cristaux d'urate sont également vus dans le tophi. L'infection doit être exclue avant que le diagnostic de la goutte soit effectué ([https://www.news-medical.net/health/Rheumatoid-Arthritis-and-Gout-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Rheumatoid-Arthritis-and-Gout-(French).aspx), consulté le 03/05/2020).



Figure 3. Cristaux d'urate de monosodium sous microscopie à lumière polarisante(Delbeth,2016)

b) Examen radiologique

Au stade de la goutte aiguë, la radiographie (Figure 4) des articulations touchées par les crises de goutte est normale. Au stade de goutte chronique, la destruction articulaire progressive est observée (<https://www.chu-toulouse.fr/-la-goutte-> consulté le 03/05/2020) .



Figure 4. Radiographie simple du pied d'un patient atteint de maladie chronique goutte tophacée montrant des gonflements asymétriques des tissus mous cohérents avec tophi, et perforé des changements «érosifs» autour du premier et du cinquième articulations métatarsophalangiennes (flèches) situées loin de la marge commune.

II. Xanthine oxydase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un nom commun utilisé pour englober deux formes interconvertibles de la même enzyme: la déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) et l'oxydase (XO) (EC 1.1.3.22)(Schimit,2019). est une molybdoflavoenzyme complexe, qui est abondant dans le lait de vache. Il a été connu depuis plus d'un siècle(Lespadeet al.,2010)les formes sont impliquées dans les deux dernières étapes du catabolisme de purines. Plus précisément, ils catalysent l'oxydation de l'hypoxanthine à la xanthine puis à l'acide urique(Luna,2019).

L'enzyme augmente l'accumulation d'acide urique dans le sang, qui est la cause de l'hyperuricémie, la goutte et les maladies cardiovasculaireset peut cause aussi une dépression de la moelle osseuse, des troubles hématologiques et rénaux(Kim, 2019).

II. 1. Distribution et Localisation

La XO est largement distribuée dans la plus part des êtres vivants , comme les bactéries, l'homme, les levures, les insectes, certain nombre d'espèces des plantes .

Chez les mammifères notamment l'homme, la quantité de XO varie suivant les organes (**Tableau 1**) : elle est localisée au niveau de la glande mammaire, très abondant dans le lait, le cytoplasme et la membrane cellulaire et surtout dans les cellules hépatiques et intestinale (l'intestin grêle) où elle possède une activité très élevée(**Laribi et Rabahi,2017**)

Tableau 1. Localisation de la XOR dans les tissus humains (**Habib et Laidi,2013**)

Tissus	Localisation
Foie	Hépatocytes pré portaux, cellules kuppfer
Jéjunum	Enterocytes, cellules endothéliales des capillaires
Glandes mammaires en non lactation	Quelques ascini dans les conduits terminaux, cellules endothéliales des capillaires et des artérioles
Glandes mammaires en lactation	Les ascini dans les conduits terminaux, dans les cellules des larges conduits, et dans les capillaires et les artérioles
Muscles squelettiques	Cellules endothéliales des capillaires et des vénules
Rein, coeur, cerveau et paumon	Cellules endothéliales des capillaires

II. 2. Structure de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) ayant un poids moléculaire d'environ 300 kDa est une enzyme oxydoréductase représentée sous la forme d'un homodimère. Les deux monomères de XO sont presque identiques et chacun d'eux contient trois domaines à savoir (a) le domaine de la molybdoptérine (Mo-pt) à l'extrémité C-terminale ayant 4 centres redox où l'oxydation a lieu (b) un domaine flavin adénine dinucléotide (FAD) au centre généralement considéré comme domaine de site de liaison et (c) 2 [Fe – S] / domaine soufre fer à l'extrémité N-terminale(**Figure 5**) (**Maliket al ., 2019**).

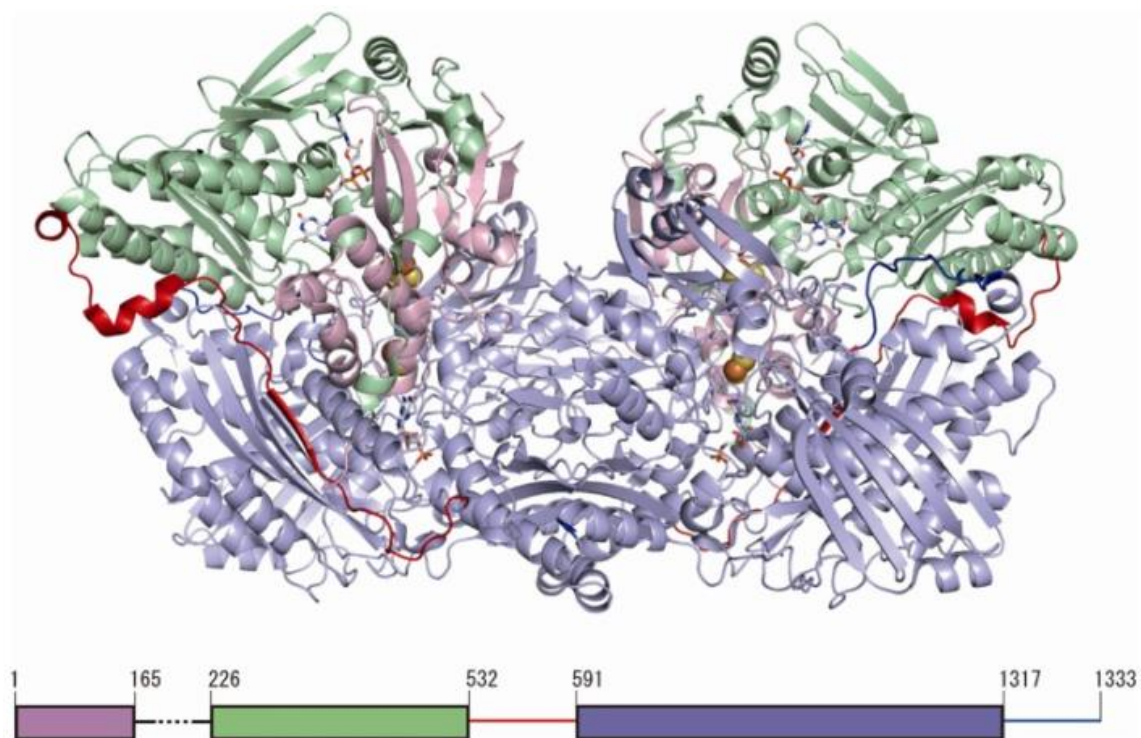


Figure 5. Structure du XOR humain. (Kimiyoishi *et al.*,2012)

Le gène qui code pour la XOR humaine a plus de 60 kb, il est composé de 36 exons et 35 introns. Ce gène est localisé dans la bande p22 du chromosome 2. La séquence de la XOR humaine est de 1333 acides aminés, elle est de 91% d'homologie avec celle de la XOR de la souris et du rat(Adjadj,2009).

II.3. Mécanismes d'action de la XOR

La xanthine oxydase est une enzyme indispensable au métabolisme des purines. Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acideurique comme le montre la figure6(Hamlaoui,2014).

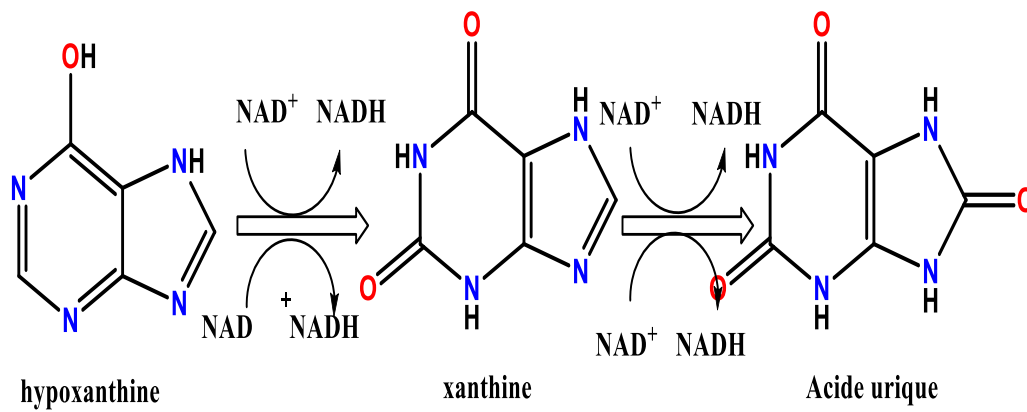


Figure 6. Schéma réactionnel du processus enzymatique catalysé par la XO et XDH

Le mécanisme d'action s'effectue en deux étapes représentées dans la **figure 7** :

- ✓ 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 deux 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, FADH₂ transfère les deux électrons au NAD⁺ pour donner NADH. Si elle est catalysée par la XO, les électrons seront transférés à l'oxygène moléculaire O₂ pour produire le radical superoxyde (O₂^{•-}) (Hamlaoui, 2014).

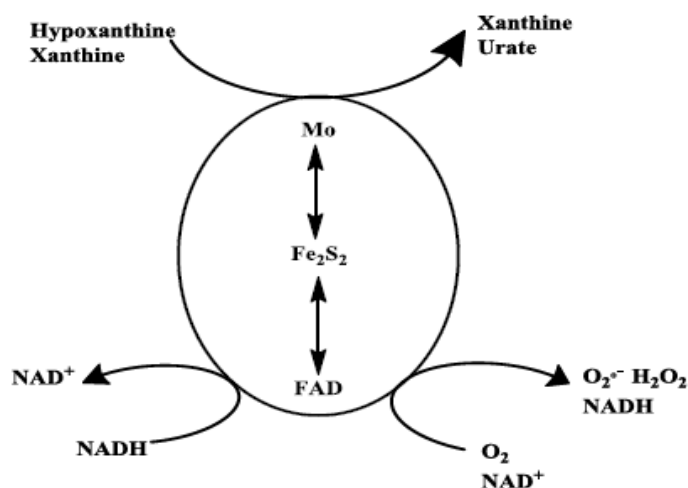


Figure 7. Représentation du mécanisme réactionnel de la XO (Adjadj, 2009)

II.4. La conversion de la XDH en XO

La XOR est présente dans la plupart des tissus des mammifères sous forme déshydrogénase (D), qui préfère le NAD⁺ comme accepteur final d'électrons, contrairement à la forme oxydase (O) qui préfère la réduction de l'O₂. La conversion de la forme D à la forme O de l'enzyme se fait par deux mécanismes enzymatiques : le traitement de la XOR par des protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine, ou la pancréatine conduit à la forme O irréversible. La conversion réversible se produit par l'oxydation des groupements sulfhydryles (SH) (Messili et Oulefki, 2013).

II.5. Codes PDB de la XO humaine :

Ils existent deux codes PDB d'enzyme humaine, l'un correspond à la forme non mutée (PDB ID : 2CKJ), mais l'autre, il correspond à la forme mutée (PDB ID : 2E1Q), le **tableau 2** représente les deux codes avec leurs ligands.

Tableau 2. Les codes PDB de la XO humaine (données à partir de la PDBsum).

Enzyme	PDB ID	Ligands	Nombre des acides aminés	Nombre de chaînes	Acides aminés catalytiques
Humanmilk xanthine oxidoreductase	2CKJ	FES×8 FAD×4 GOL×4 ACY PO4	1264	4 chaînes (A,B,C,D)	Glu1262 Arg913 Gln768 Arg881
Crystal structure of human xanthine oxidoreductase mutant, Glu803 Val	2E1Q	BCT ×4 FES×8 FAD ×4 MTE-MOM×4 SAL×4 CA×8	1307	4 chaînes (A,B,C,D)	Glu1262 Arg913 Gln768 Arg881

III. Traitements de la goutte

Il existe des nombreux traitements de la goutte classés en deux catégories : les traitements non pharmacologiques et les traitements pharmacologiques.

III.1. Traitements non pharmacologiques

Traitement non médicamenteux consiste à la diminution de l'apport en purine pour diminuer le taux de formation de l'AU (Messili et Oulefki, 2013).

- **Arrêt d'un médicament** en particulier les diurétiques ou l'aspirine à petite dose, car elles provoquent une insuffisance rénale et par conséquent un effet hyperuricémiant.
- **Règles hygiéno-diététiques** consiste en une perte de poids et modification des habitudes alimentaires ; en évitant de la bière, des alcools forts, et de sodas riches en fructose ainsi que la diminution de la consommation des aliments riches en purines (la viande, les abats, les poissons gras et les crustacés) (Messili et Oulefki, 2013).

III.2. Traitements pharmacologiques

La pharmacothérapie de la goutte est divisée en:

a) Traitement de la crise de goutte aiguë

Il se fait par la prise de la *colchicine* et les *anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)*.

La *colchicine* est un alcaloïde extrait du colchique d'automne (ou *Colchicum autumnale*) (Figure 8). Son utilisation thérapeutique est essentiellement liée à ses propriétés anti-inflammatoires, justifiant ses indications en prophylaxie et traitement de l'accès aigu de la goutte. Elle inhibe la motilité des leucocytes, ce qui les empêche d'affluer autour des cristaux d'acide urique (Laribiet Rabahi, 2017).

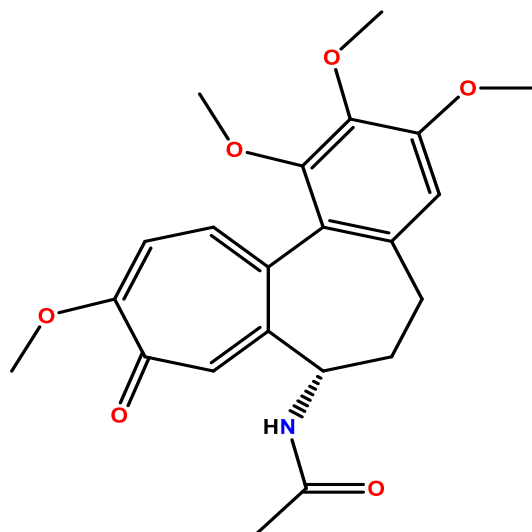


Figure 8. Structure 2D de la colchicine

Effets Secondaires

- ❖ Les premiers signes d'intoxication sont des troubles digestifs, surtout diarrhée, nausées et vomissements et aussi :
- ❖ Troubles hématologiques parfois mortels (agranulocytose, leucopénie, thrombopénie, anémie)
- ❖ Neuromyopathies réversibles à l'arrêt du traitement
- ❖ Ces troubles sont favorisés par une insuffisance rénale.
- ❖ Produit toxique qui pouvant entraîner la mort en cas de surdosage important(Laribi et Rabahi, 2017).

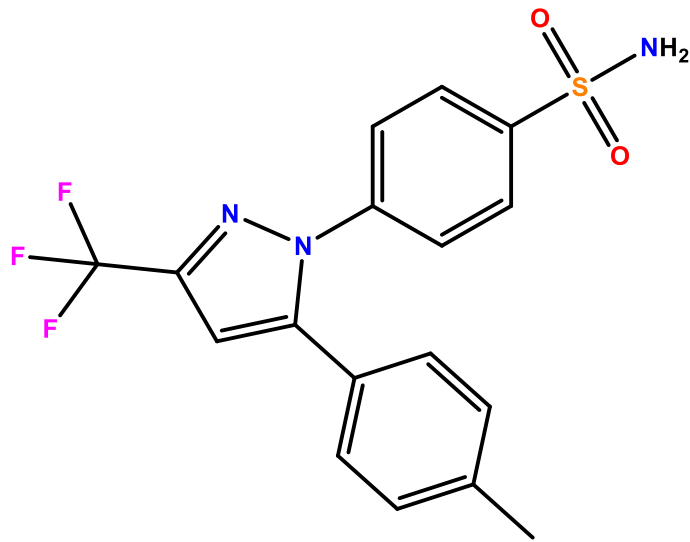
Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ayant une action anti-inflammatoire plus forte sont utilisés. Ils procurent un soulagement en inhibant la synthèse de prostaglandines médiée par la cyclooxygénase-2 (COX-2) au site de la blessure .

Il existe également certains mécanismes supplémentaires concernant certains médicaments. Les AINS procurent un soulagement symptomatique de la douleur et de l'inflammation. De plus, ils sont également utilisés initialement comme traitement de transition avec des inhibiteurs de la synthèse de l'acide urique pour prévenir le développement de symptômes de l'arthrite goutteuse aiguë en raison de la mobilisation de l'urate à partir des tissus. Les médicaments les plus utilisés sont le l'indométacine, le Naproxène, l'ibuprofène, le célécoxib et le diclofénac (Figure 10)(Sahai *et al.*,2019).

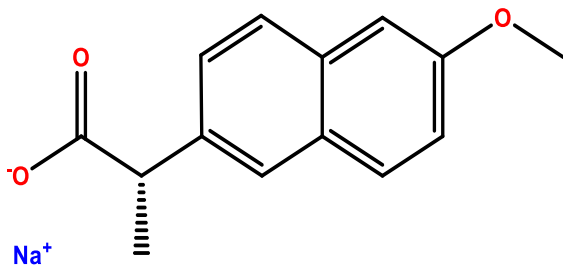
Effets Secondaires

les AINS sont responsables d'effets indésirables généralement digestifs et rénaux.

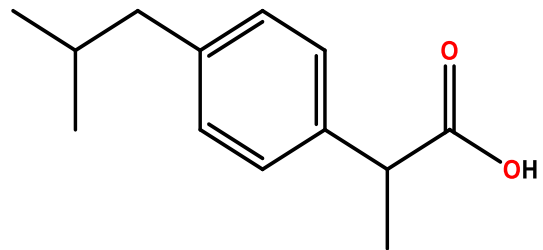
- ❖ Les effets indésirables digestifs sont les plus fréquents et peuvent être de plusieurs grades : intolérance digestive
- ❖ Au niveau rénal, sous l'effet des AINS, la perfusion rénale est diminuée et il y a donc un risque d'insuffisance rénale aiguë.
- ❖ D'autres effets indésirables peuvent apparaître :- des réactions d'hypersensibilité (surtout à l'aspirine). - respiratoires - effets anticoagulants - neurologiques (céphalées, acouphènes)- hématologiques (Laribi et Rabahi, 2017).



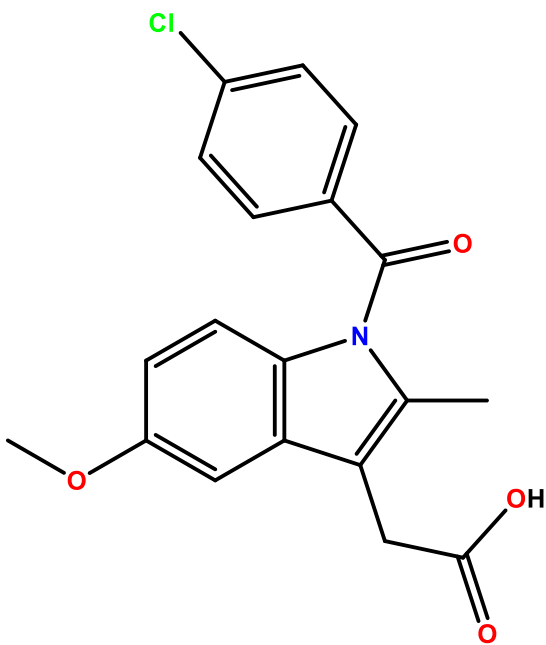
celecoxib



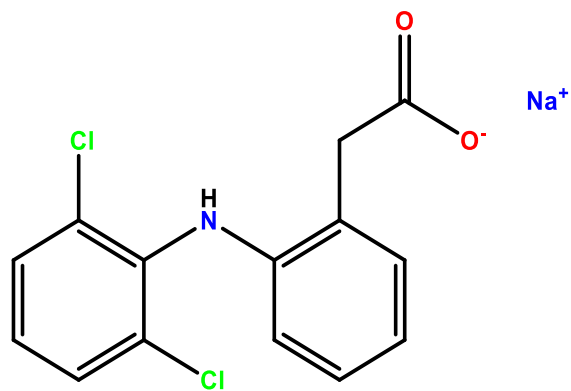
naproxen sodium



ibuprofen



indomethacin



diclofenac sodium

Figure 9. Structure de quelques médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens

b) Traitement de la goutte chronique

favorisant l'élimination ou la dégradation de l'AU, ou bien l'inhibition de la synthèse de l'AU via l'inhibition de la XO, en utilisant :

- **L'allopurinol** est un analogue de la purine (**Figure 10**) et un inhibiteur compétitif non spécifique de la xanthine oxydase (**Rubino,2014**), donc il empêche la synthèse de l'acide urique et diminue donc l'uricémie et l'uraturie. (Hervé, 2016) Son analogie structurale avec la xanthine et l'hypoxanthine lui permet d'être un inhibiteur compétitif de la XO. Lors de sa réaction avec la xanthine oxydase, il se transforme en oxypurinol (alloxanthine) selon la réaction représentée sur la **figure 11**, qui est métabolite actif agissant lui-même comme inhibiteur de la XO (**Hamlaoui,2014**).

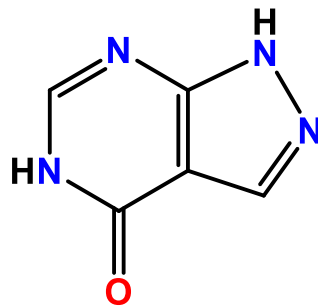


Figure 10. Structure 2D de l'allopurinol

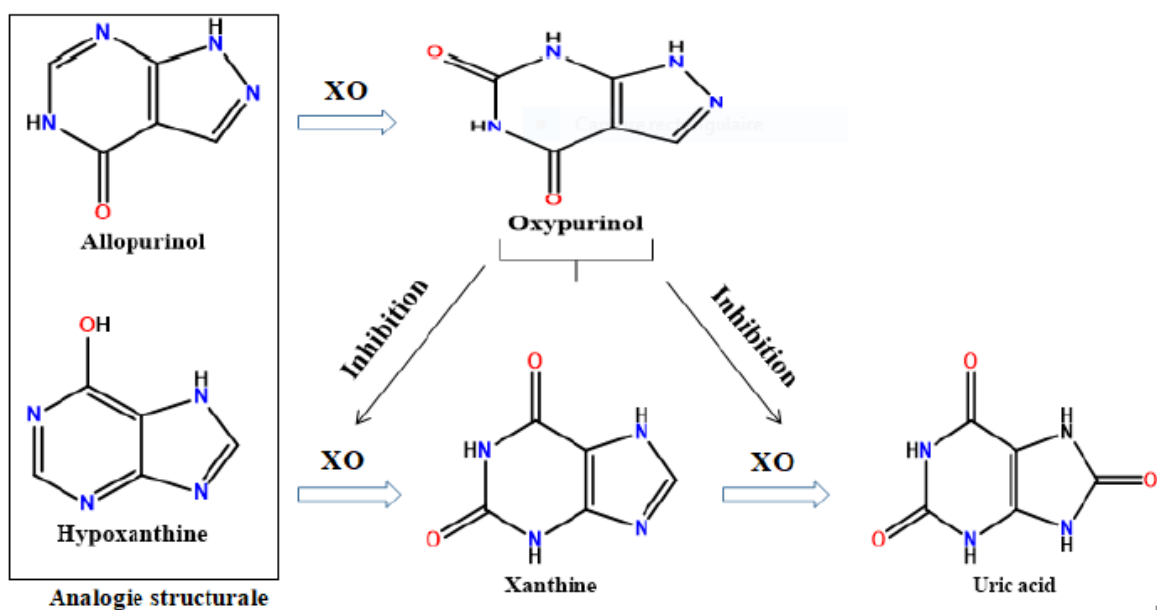


Figure 11. Effet de l'allopurinol sur la réaction de la xanthine oxydase (**Hamlaoui, 2014**).

Effets indésirables

- ❖ intolérance cutanée : le plus fréquemment de type éruption prurigineuse, vésiculeuse ou bulleuse. Des réactions allergiques cutanées
- ❖ Des effets indésirables hématologiques : leucopénie, thrombopénie, anémie
- ❖ Des effets indésirables digestifs : nausée, diarrhée, épigastralgies(**Rubino, 2014**).
- **Febuxostat(Adenuric®)** acide 2-[3-cyano-4-(2-méthylpropoxy)phényl]-4-méthylthiazole-5-Carboxylique(**Figure 12**),est un inhibiteur de la xanthine oxydase qui a été approuvé pour le traitement de l'hyperuricémie dans la goutte, ayant l'avantage d'être plus puissant, sélectif, sans réduction de dose chez les patients atteints de maladie rénale, et moins de chances de provoquer réactions allergiques.Il s'agit d'un inhibiteur non purique de l'enzyme xanthine oxydase inhibant à la fois les formes réduites et oxydées de l'enzyme (**Sahaietal.,2019**) .
Febuxostat est utilisé dans des conditions où le patient est intolérant à l'allopurinol ou lorsqu'il est contre-indiqué(**Sahaietal.,2019**) .

Effets indésirables

- ❖ Des effets indésirables le plus fréquemment observé est une anomalie des tests de la fonction hépatique
- ❖ Des effets indésirables digestifs : des nausées, diarrhées
- ❖ des éruptions cutanées
- Autres effets : céphalées, troubles cardiaques et thyroïdiens des douleurs articulaires(**Sahaietal.,2019**) .

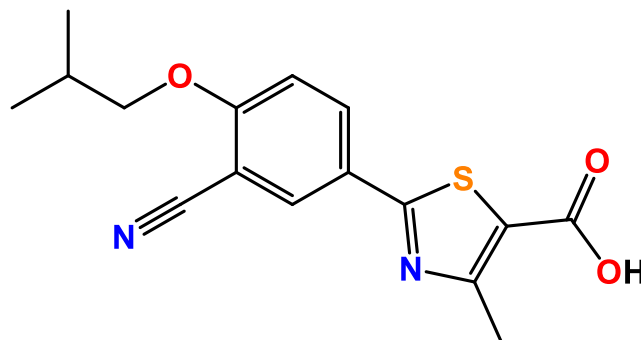


Figure 12. Structure du Febuxostat

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

I.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est le lait humain dû à sa richesse de l'enzyme et la facilité d'extraction. Il été obtenu à partir d'une femme volontaire de 3 à 15 jours après l'accouchement (poids :55kg , âge:34 ans et taille: 160 cm) ; son régime alimentaire était principalement moyen en protéine, glucides et graisses saines, dans la région de Laghouat, en Algérie .

les complexes organométalliques peut être défini comme un composé dans lequel il existe une liaison métal-carbone. e premier composé répondant à cette définition est un complexe du platine appelé sel de Zeise obtenu par le pharmacien danois William C. Zeise en 1827. Ce sel est préparé en faisant barboter de l'éthylène dans une solution de .tétrachloroplatinate (II) de potassium(**BOUKEBBOUS., 2009**)

Le cis platine est une complexe de platine à avoir été utilisé en chimiothérapie anticancéreuse (cancer de l'ovaire, de la vessie, du col de l'utérus ainsi que du testicule...etc) (**MECHERNENE et BOUHASSOUN .2018**)

Nous avons utilisé des complexes organométalliques, plus précisément des lanthanides ,(Ln), qu'on nomme souvent encore les terres rares (TR en y ajoutant le scandium l'yttrium et le lanthane), même si elles ne sont pas si rares que cela, représentent le groupe des éléments composés entre les numéros atomiques 57 et 71. C'est-à-dire entre le lanthane (57) et le lutécium (71). Dans ce travail, nous étudions l'effet inhibiteur de deux nouveaux lanthanides : le complexe de Cerium III (Ce³⁺) et de lanthane III (La³⁺) contre la xanthine oxydase humaine afin de traiter la maladie de la goutte.

I.2.Réactifs et appareillage

- **Réactifs chimiques et solvants**

Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans cette expérimentation, parmi ces produits : le tampon phosphate constituée de Di-hydrogenophosphate de potassium (KH₂PO₄),et di-potassium monohydrogène phosphate (K₂HPO₄) et chlorure de potassium (KCl).etEthylene Diamine Tétracétique (EDTA), Di-Methylsulfoxide (DMSO), le réactif du dosage de l'acide urique de la marque SPIN REACT, le substrat (la xanthine).

- **Appareillage**

Centrifugeuse réfrigérée (ROTANTA 460R), lecteur à microplaques elx800 BIOTEC-Uv(universal microplaque reader) accompagné d'une imprimante Epson Lq-2070.

II. Méthodes

I.1. Extraction de la xanthine oxydase du lait humain

Le procédé d'extraction de la xanthine oxydase du lait humain a été réalisé selon le protocole d'extraction (Nakamura et Yamazaki, 1982) modifié par (Baghianiet al, 2003) et Bou-Saleh *et al.*, 2020) montre les étapes illustrées dans la figure suivante :

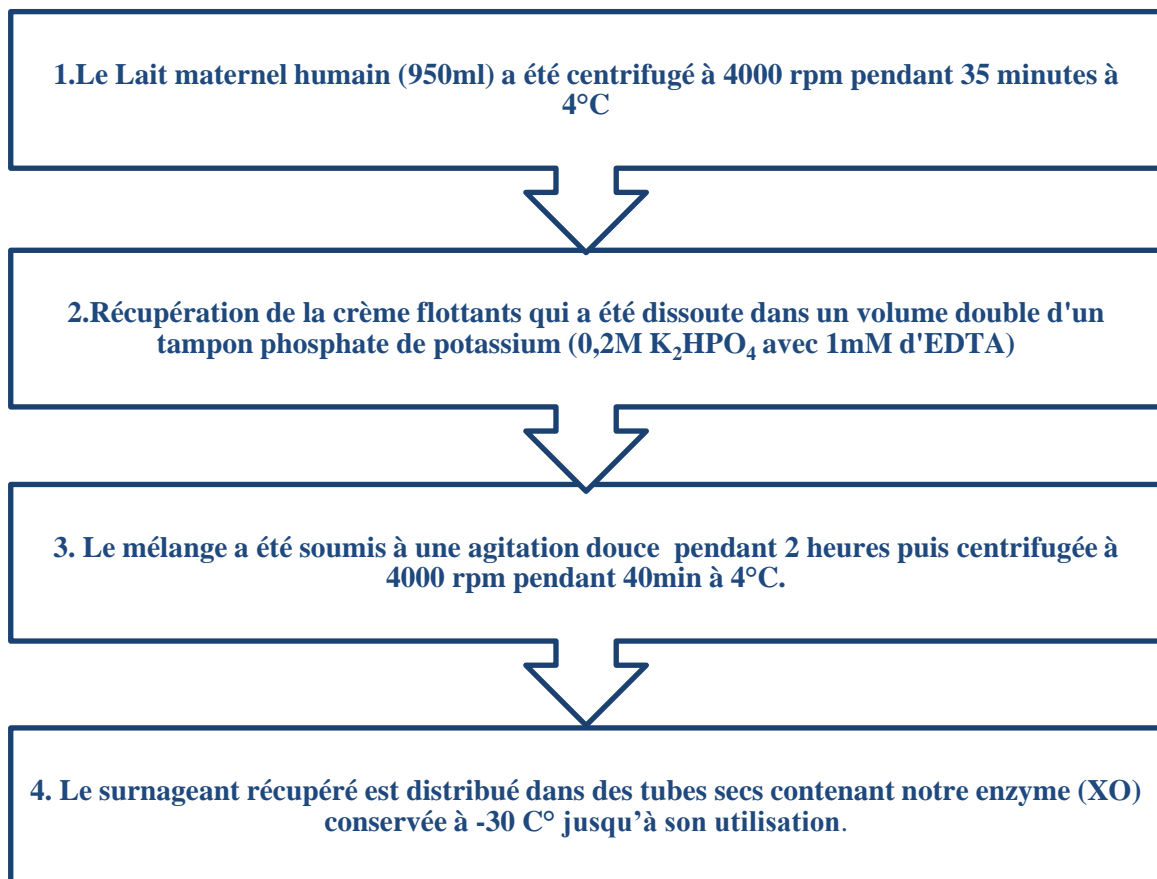


Figure 13. Protocole d'extraction de la xanthine oxydase (Bou-Saleh *et al.*, 2020).

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

Nous avons testé l'activité de la XO par l'ajout d'un volume de 22.6 µl de l'enzyme diluée dans le tampon phosphate à pH 7 (KH₂PO₄ (0,34g), KCl (4,5g) et K₂HPO₄ (0,435g) dans d'eau distillée jusqu'à 500ml) avec un volume de 45,2 µl de tampon après une incubation à 37 C° pendant 15 min puis ajout un volume 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 SPIN REACT qui nous donne une coloration rose indiquant la production de l'acide urique après une incubation à 37 C° pendant 30min la lecture à double longueur d'onde est effectuée à 360 et 490 nm.

- **Principe du réactif de dosage :**

Chez l'être humain, l'acide urique est le produit principal du catabolisme des nucléosides puriques, adénosine et guanosine. Les principales causes d'hyperuricémie sont la goutte primaire (hyperproduction métabolique des purines ou trouble de l'uricoélimination rénale), ou la goutte secondaire dont la cause peut être une maladie rénale ou l'administration de médicaments (diurétique, chimiothérapie...). L'hyperuricémie peut aussi être attribuée à une déficience d'une des enzymes impliquées dans le métabolisme de purines ou à une hémopathie. L'hypouricémie est beaucoup moins courante que l'hyperuricémie (Tietzel *al.*, 1999).

L'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène (Figure 14). En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (dichloro-hydroxy benzène sulfonates et amino-antipyrine) pour former une quinonéimine, complexe de couleur rouge. L'absorbance mesurée à 490nm, est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans le spécimen (Tietzel *al.*, 1999).

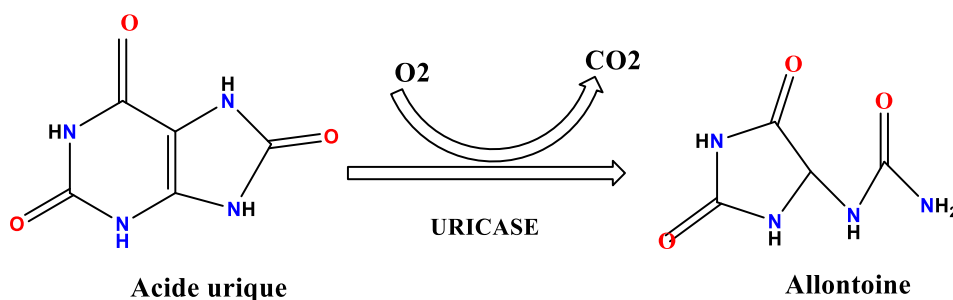


Figure 14. Schéma réactionnel du processus enzymatique catalysé par l'uricase

- **Principe de la méthode de détection des doubles enzymes (DED)**

Pour trouver un moyen efficace et nouveau de tracer le produit fabriqué parHXO et BXO puisque l'acide urique (cible du produit) n'a pas de couleur à la fin de la réaction. Nous avons proposé l'utilisation d'un réactif spécifique pour détecterl'acide urique sous forme de quinoneimine colorée en violet (**Wu et al., 2015**), nous avons donc utilisé le réactif commun pour la détermination quantitative de l'acide urique (SPINREACT LAB) qui se compose de troisbouteilles. La première est composée de deux enzymes, l'uricase (120 U/l) et peroxydase (450 U/l), ainsi que l'hexacyanoferrate (II) de potassium (42 µmol/L) avec l' amino-antipyrine (0,150 mmol/) nommée réactif 1.Le second est la solution tampon avec un pH7,4 à 25 °C (50 mmol/L) avec le réactif nommé dichlorohydroxybenzène sulfonate (2 mmol/L). 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 partir de HXO et de BXO pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. Hydrogène peroxyde en présence de peroxydase réagit avec un chromogène (aminoantipyrine et le dichloro-hydroxy benzène sulfonate) pour donner de la quinoneimine, un complexe de couleur violette. L'absorbance mesurée alors à510 nm (490-530) est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans le spécimen (**Bousaleh et al., 2020**).

II.3. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysé par la XO

L'effet inhibiteur des composés organométalliques sur l'activité de la XO est étudié à l'aide d'un lecteur à microplaque de 96 puits, après plusieurs essais afin de déterminer les concentrations nécessaires de l'inhibiteur.

Un volume de 22,6 µl de l'extrait enzymatique brut est ajouté à 45,2 µl de l'inhibiteur (solubilisé dans un pourcentage bien déterminé de DMSO, donc l'objectif est de s'assurer la solubilité totale) avec 8 concentrations croissantes, ce mélange est prêt-incubé pendant 15min à 37°C.

La réaction enzymatique est déclenché par l'ajout d'un volume 45,2µl du substrat(xanthine de 0,06g/l), le milieu est incubé à 37°C pendant 30 min. Après l'incubation, on ajoute 136µl du réactif de dosage de l'acide urique dont le volume final du milieu réactionnel est égale à 250µl, le milieu est incubé à température ambiante (37 °C) pendant 30min, la lecture à double longueur d'onde est effectuée à **360 et 490 nm** en utilisant le lecteur de microplaque.

Sachant que :

- Le blanc de la plaque est dépourvu du substrat et de l'inhibiteur.
- Le blanc de l'extrait est dépourvu de substrat.
- Le control est dépourvu de l'inhibiteur.

Les valeurs de l' IC_{50} (la concentration inhibitrice nécessaire pour inhiber l'activité enzymatique à la moitié 50%) ont été déterminées à partir de la représentation graphique $I \% = f(c)$ exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi:

$$I\% = \left[\frac{(A_C - A_E)}{A_C} \right] \times 100$$

- I % : le pourcentage d'inhibition.
- A_E : l'absorbance de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur.
- A_C : l'absorbance de l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur.

L' IC_{50} calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur ($Y = a X + b$). Elle a été exprimée en $\mu\text{g/ml}$. Le paramètre IC_{50} est 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. Amarrage moléculaire :

L'amarrage ou docking est une technique informatique qui permet de prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure d'une protéine, et optimiser aussi des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur. Il se déroule en deux étapes distinctes :

- Dans un premier temps une étape de positionnement du ligand dans le site choisi de la protéine.
- Puis dans un second temps, une étape d'évaluation des interactions énergétiques potentielles entre le ligand et la protéine (Laribi et Rabahi, 2017).

Nous avons choisi d'utiliser GOLD (Genetic Optimisation Ligand Docking) parmi plus de 30 logiciels de docking qui sont actuellement disponibles car il est le plus approprié pour

la reconnaissance des métaux. Ce logiciel a prouvé son efficacité et sa précision dans le docking d'un seul ou plusieurs ligands. GOLD considère le ligand comme flexible alors que la protéine est maintenue fixe sauf pour les groupements hydroxyles de certains résidus à savoir Tyrosine, Serine et Thréonine. Ce logiciel a été paramétré avec un jeu de données de 314 complexes issus de la PDB (Protein Data Bank, <http://www.pdb.org>), et la conclusion de ces tests est que GOLD prédit une solution similaire à la structure cristallographique dans 70-80% des cas (Benarous, 2014).

Le GOLD est constitué de trois principales parties:

- La fonction du score « *scoring function* » pour classer les différents modes de liaison
- Le mécanisme d'installation du ligand dans le site actif de la protéine, GOLD utilise une seule méthode basée sur l'ajustement de points « *fitting points* ».
- Un algorithme de recherche pour explorer les modes de liaisons possible, GOLD utilise l'algorithme génétique.

Dans ce travail, nous avons choisi la xanthine oxydase humaine de code PDB : 2CKJ et le ligand choisi est celui d'une valeur IC_{50} la plus faible représenté ici par le complexe La5. Sachant que le site actif de l'enzyme (2CKJ) est constitué de quatre acides aminés catalytiques tels que Glu1262, Arg913, Gln768 et Arg881.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Rendement d'extraction de l'enzyme

Après l'extraction, nous avons obtenu un liquide de couleur transparente représente l'extrait enzymatique brut d'un volume de 50 ml (obtenu à partir d'un volume de 950 ml de lait humain), donc le rendement d'extraction est égale à 5,26%.

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

Les résultats d'inhibition de la XO_H par les 2 complexes organométalliques ont été résumés dans le tableau 3, où l'inhibition de cette enzyme est exprimée en IC₅₀ qui est obtenu à partir de la représentation graphique de la variation du pourcentage d'inhibition (I %) en fonction de concentrations des inhibiteurs (en µg/ml), les courbes sont représentées dans la figure15.

Tableau 3. Les valeurs d'IC₅₀ des inhibiteurs

Inhibiteurs	IC ₅₀ (µg/ml)
Ce3	261,1±9,91
La5	56,2±2,46

Les résultats obtenus montrent que les deux complexes organométalliques que nous avons testés ont uneactivité inhibitrice modérée contre la xanthine oxydase avec des valeurs des IC₅₀ pour le Ce3 de 261,1±9,91 et La5 de 56,2±2,46 µg/ml. Cette activité est nettement inférieure de 652 et 160 fois, respectivement à celle présenté par le médicament Oxypurinol (0,43 µg/ml).

Dans le but de traiter la maladie de la goutte, beaucoup des études scientifiques ontété réalisées pour évaluer les effets antihyperurécimie et anti-goutte, des molécules puresetdes extraits des plantes médicinales sur l'activité de la xanthine oxydase. Afin de trouverun nouveau médicament que ce soit naturel ou synthétique contre ces maladies avec moins ousans effets secondaires. Dans ce travail, nous voulons comparer nos résultats avec ces étudesantérieurs. Les activités inhibitrices de cette enzyme sontregroupées dans le tableau 4.

Tableau 4. Les valeurs des IC₅₀ des inhibiteurs de la XOH à partir de la littérature

Inhibiteur	IC ₅₀ (µg/ml)	Références
Oxypurinol	0,43	(Chine et Ben saidane ,2019)
Amflutizole	0,14	(Chine et Ben saidane ,2019)
<i>Foeniculumvulgare</i> Mill	3,89	(Bousaleh <i>et al</i> ,2019)
<i>Pimpinellaanisum</i> L.	2,37	(Bousaleh <i>et al</i> ,2019)
Indométacine	0,29	(Chine et Ben saidane ,2019)
Célécoxib	1,28	(Chine et Ben saidane ,2019)
Diclofénac de sodium	1,43	(Chine et Ben saidane ,2019)
Naproxène sodique	2,19	(Chine et Ben saidane ,2019)
Ibuprofène	2,92	(Chine et Ben saidane ,2019)
<i>Carum carvi</i> L.	3,43	(Bousaleh <i>et al</i> ,2019)

Nous avons remarqué que les lanthanides étudiés sont des inhibiteurs modérés en les comparant avec les huiles essentielles des épices publié par **Bou-Saleh *et al.*, 2020** et les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens publié par **Chine et Bensaidane, 2019**.

Sachant que ce type de complexes a été déjà étudié par Kostova et al., 2005 pour leurs activités cytotoxiques, ils ont montré une activité anti-cancéreuse importante contre deux lignés cellulaires humaines (pour le cancer de sang).

Cette comparaison resterelative,dont l'objectif est de connaître l'efficacité de nos inhibiteurs par rapport aux inhibiteurs de référence de la XO. Sachant que nous n'avons

pas trouvé des valeurs des IC_{50} d'inhibition de cette enzyme humaine avec notre méthode de détection d'inhibition, d'où l'originalité de ce travail.

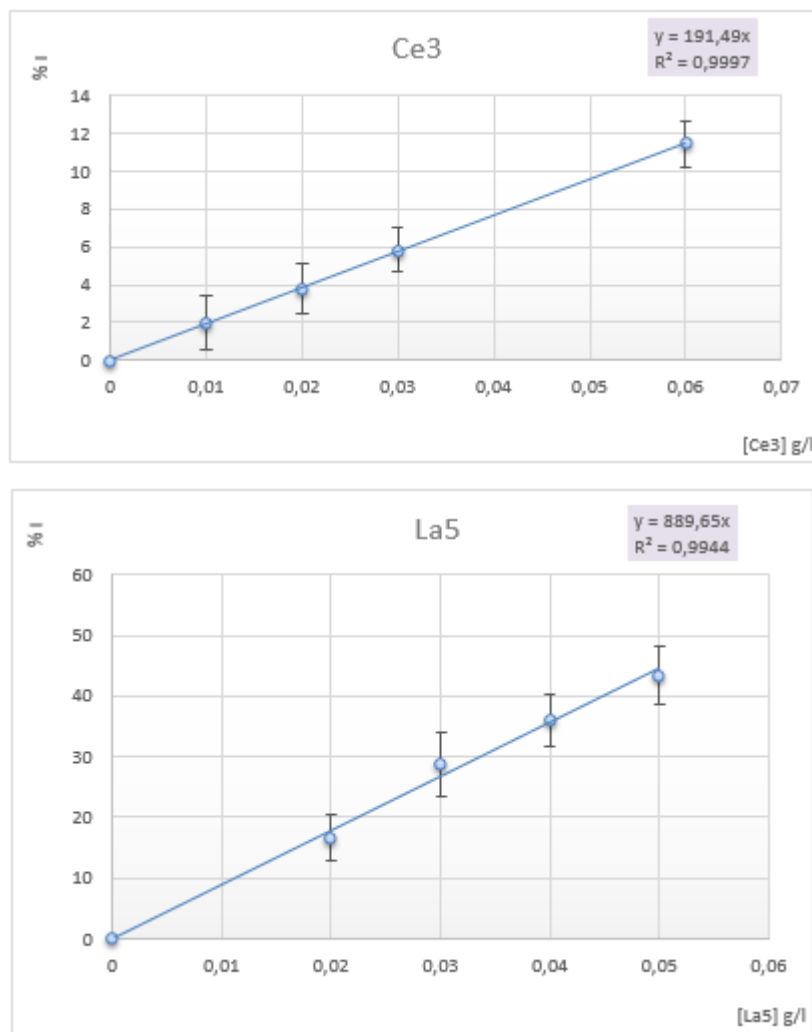


Figure 15. Représentations graphiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la XHO par les deux complexes

III. Amarrage moléculaire

Afin de définir la nature des interactions entre inhibiteur-enzyme, nous avons réalisé des expériences sur l'amarrage du meilleur complexe inhibiteur (La5) dans le site actif de l'enzyme (2CKJ) avec le programme GOLD. Nous avons sélectionné la meilleure pose d'amarrage, lié au score obtenu par le logiciel et du type d'interaction existant dans les solutions générés. A travers cette étude, nous détaillerons le type d'interactions pour le complexe La5 et l'allopurinol (Figure 16).

Le complexe La5, 591 g/mol; constitué de La^{3+} et le ligand bis(4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-(1H-pyrazol-3-yl)-methane, est composé de groupes benzène, indole et

carboxyle. Le mode de fixation adopté par cette molécule permet aux groupes benzène et indole de se déposer dans une cavité limitée de résidus d'acides aminés hydrophobes représentés par Ala1084, Met1039, Val1260 et Phe799. Ces groupes interagissent avec les interactions hydrophobes π -alkyle et π - π stacked. Nous avons enregistré une liaison hydrogène, située entre l'atome d'oxygène de La5 avec l'atome d'hydrogène de Gln1041 d'une distance de 2,30Å.

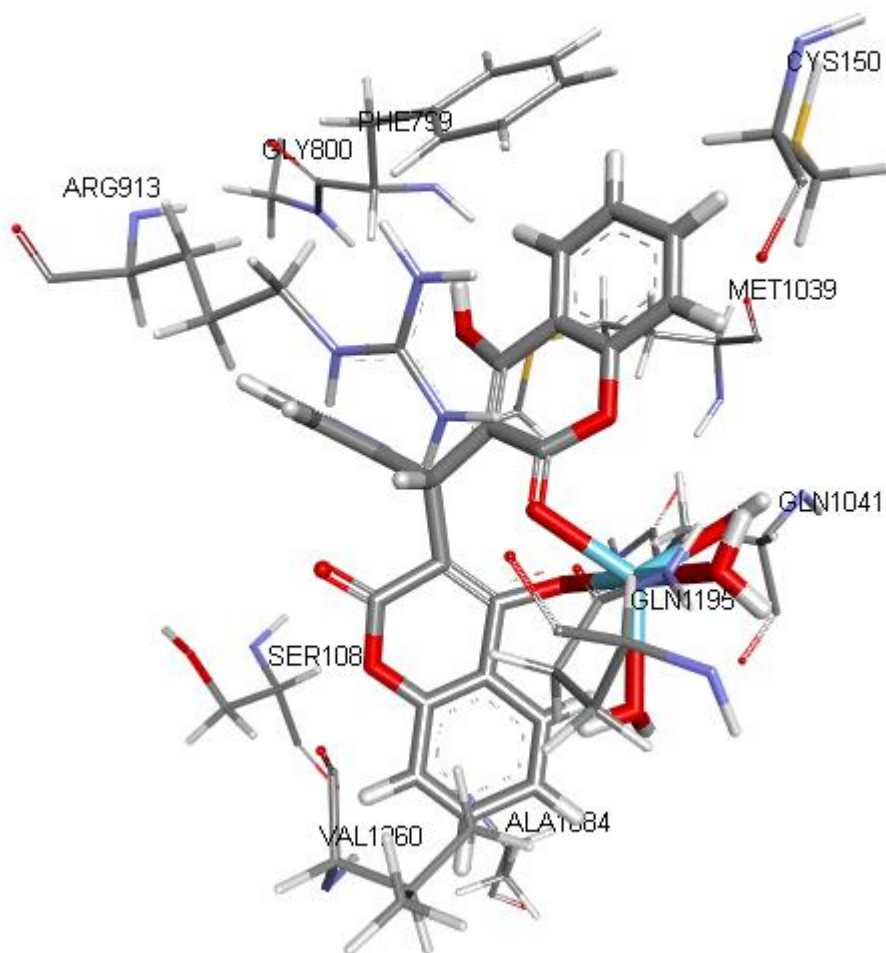


Figure 16. La meilleure pose de docking pour le complexe La5

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En conclusion, ce travail met en évidence l'importance de la prise en charge de la pathologie goutteuse souvent banalisée par la recherche de nouveaux inhibiteurs de la Xanthine Oxydase.

La xanthine oxydase qui après dégradation des nucléotides (AMP, GMP) agit sur les résidus résultants pour former l'acide urique. Elle est à l'origine de l'hyperuricémie, et une autre pathologie connue sous le nom de la goutte.

Notre étude propose de traiter cette maladie, via l'inhibition de la XO par deux complexes organometalliques de la famille des lanthanides *in vitro* et *in silico*.

Les résultats obtenus *in vitro* à travers ces tests montrent que les deux complexes possèdent une activité inhibitrice modérée ce qui est confirmé par les valeurs des IC₅₀ de 56,2 et 261,1 µg/ml pour La5 et Ce3, respectivement.

Les résultats de cette étude suggèrent que la méthode de la détection de double enzymes (DED) est exacte, précise et reproductible.

Les personnes souffrant de la goutte devraient consommer beaucoup de légumes et de salades fruits de mer. Elles ne doivent pas manger d'abats ni de foie, qu'ils soient de porc, de bœuf ou de veau. De manière générale, elles doivent consommer de petites portions de viande (100 g) et privilégier les viandes pauvres en purines, telles que les escalopes de dinde, la poitrine de bœuf, avec ces recommandations :

- Plus de produits laitiers
- Beaucoup de légumes
- Gare au sucre
- Boire de l'eau
- Perdre du poids

Nous envisageons à travers les études prochaines de tester d'autres complexes organométalliques pour déterminer leur pouvoir anti-xanthine oxydase et leur possibilité de les utiliser comme des futurs médicaments efficaces et avec moins d'effets secondaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1- **Adjadj, M(2009)**.Propriétés antioxydants et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale Ajugaiva (L.) Schreber Université Mentouri Constantine, P 4, 7

2- **Boukebbous,K.(2009)**.Etude de complexes métalliques des ligands soufrés ,azotés et d'autre molécules halogènes .Universite Mentouri Constantine,P12.

3- **Bou-Salah, L., Benarous, K., Linani, A., Bombarda, I., & Yousfi, M. (2020)**. In vitro and in silico inhibition studies of five essential oils on both enzymes human and bovine xanthine oxidase. Industrial Crops and Products, 143, 111949.

4-**Boukebbous ,K .(2009)**. Étudedes complexes mettaliqesdes ligandssoufres, azotesetd'autremoleculeshalogenes .universite MENTOURI CONSTANTINE ,P17.

5-**Mechernene, R.,Bouhassoun, I.(2018)**.Evaluationexvivodel'effetedel'albuminesurl'hematotoxiciteducisplatine . UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD ,P 1-93

6- **Dalbeth,N ., Merriman,T., Stamp,L.(2016)**.Gout. The lancet, 388, P5

7- **Frei P, B Möller, T Langenegger, I Gabellon et M Frick (2017)**. Goutte et pseudogoutte, Maladies rhumatismales 2éme éd. Ligue suisse contre le rhumatisme, 48p.

8- **Habib,L.,Laidi,L.(2013)**. Activite anti hyperurcémique et anti xanthine oxydoréductase in vivo de l'extrait aqueux d'acetate d'ethyle des feuilles de clematis flammula. Universite Abde rrahmane mira .Bejaia ,P 7.

9- **Hamlaoui, I. (2014)**. Etude théorique des réactions enzymatiques : Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones. Université Constantine1, P 9- 20.

10- **Hervé, E. (2016)** .La colchique et goutte .Université de Nantes UFR sciences pharmaceutique et biologique, P77.

11- **Khedidja Benarous**,Etude de l'activité antioxydante et de l'activitéinhibitrice des extraits de Peganum harmalaInonotus hispidus,

Marrubium vulgare, Ziziphus lotuset Achillea santolina sur la lipase de Candida rugosa, thèse de doctorat, ENS-kouba, 2014.

12- **Kim, J., Jin ,C.(2019).** Xanthine oxidase inhibitory activity of isoflavonoids from Apios americana. Computational Biology and Chemistry,83, 107137,P 3.

13- **Kimiyoshi ,I.,Yoshihiro ,A ., Ken, O .,Takeshi ,N.(2012).** Mutations Associated with Functional Disorder of Xanthine Oxidoreductase and Hereditary Xanthinuria in Humans. International Journal of Molecular Sciences. 2012, 21, P15481.

14- **Kuo,C., Grainge,M., Zhang,W et Doherty,M.(2015).**Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors.Nature Reviews Rheumatology,P 11.

15- **Larbi,A .,Rabahi,K.(2017).**etude in silico de l'inhibition de la xanthine oxydase .Universite akli mohand oulhadj .Bouira ,P4-10.

13- **Lespade, L., Bercion,S.(2010).**Theoretical Study of the Mechanism of Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids and Gallic Acid Derivatives.The journal Of physical Chemistry.B, 21, P921.

16- **Luna, G., Dolzhenko, A etMancera, R. (2019).**Inhibitors of xanthine oxidase: scaffold diversity and structure-based drug design.ChemMedChem, 14, P 1

17- **Malik ,N.,Dhiman ,P.,Khatkar, A.(2019).** In silico design and synthesis of targeted rutin derivatives as xanthine oxidase inhibitors. BMC Chemistry ,volume 13,P 1.

18-**Messili ,K.,Oulefki,N.(2013).** Activite anti hyperurcémique et anti xanthine oxydoréductase in vivo de l'extrait aqueux de l'ecorce de franinus angustifolia . Universite Abde rrahmane mira .Bejaia ,P8- 13.

19-**Mechernene,R.,Bouhassoun,I.(2018).**Evaluation ex vivo de l'effet de l'albumine sur l'hématotoxicite du cisplatine.Universite Abou Bekr Belkaid,P93.

20-**Rubino,M.(2014).**La goutte en 2014. la pathologie et ses traitements ,role du pharmcien d'officine . Universite toulouse III paul sabatier ,P 58- 120-124.

21- Sahai, R., Sharma, P. K., Misra, A., & Dutta, S. (2019). Pharmacology of the Therapeutic Approaches of Gout. In Gout. IntechOpen.P5,11.

22- Schmidt , H., Kelley,E., Straub ,A (2019).The Impact of Xanthine Oxidase (XO) on HemolyticDiseases.Redox Biology, 21, 101072, P 2.

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

24-<https://www.creapharma.ch/goutte.htm> consulté le 19/03/2020

25-<https://www.santepiusmag.com/3-boissons-puissantes-pour-traiter-larthrite-naturellement/>

26-<https://www.cdc.gov/arthritis/basics/gout.html> consulté le 25/04/2020

27-<https://www.sante-sur-lenet.com/maladies/rhumatologie/goutte/>, consulté le 18/04/2020.

28-<https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/rhumatologie/goutte/> consulté le18/04/2020.

29- <https://lebonmedicament.org/goutte-symptome-traitement/> consulté le30/04/2020.

30-<https://www.chu-toulouse.fr/-la-goutte-consulté> le15/05/2020.

21-[https://www.news-medical.net/health/Rheumatoid-Arthritis-and-Gout-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Rheumatoid-Arthritis-and-Gout-(French).aspx) consulté le 03/05/2020.

Résumé

La goutte est caractérisée par des taux élevés d'acide urique (AU) dans le sang, ces niveaux élevés d'AU sont associés à une ingestion et une métabolisation accrues des purines et / ou à une diminution de leur excrétion. Dans ce domaine, la xanthine oxydase (XO), en convertissant l'hypoxanthine et la xanthine en AU, joue un rôle important dans le contrôle de l'hyperuricémie. Sur la base des limites et des effets indésirables liés à l'utilisation de l'allopurinol et du fébuxostat, les médicaments approuvés les plus connus à effet inhibiteur de XO. Le but de cette étude est d'évaluer in vitro et in silico de l'activité inhibitrice par des complexes organométalliques synthétisés en Italie (Ce3 et La5), contre la xanthine oxydase humaine (XOH), à l'aide de l'amarrage moléculaire et d'une méthode d'analyse innovante basée sur la double détection enzymatique (DED). Les résultats montrent une inhibition modérée de la XOH avec une IC50 de 261,1±9,91 µg/ml, 56,2±2,46 µg/ml ; pour Ce3 et La5, respectivement. Une étude in silico basée sur l'amarrage moléculaire à l'aide du programme GOLD a été réalisée pour étudier l'inhibition de XOH. Les résultats montrent que les deux complexes organométalliques utilisés donnent un effet inhibiteur important contre la XOH.

Mots clés : xanthine oxydase humaine, goutte, inhibition, complexes organométalliques, amarrage moléculaire.

Abstract

Gout is characterized by high levels of uric acid (UA) in the blood. These high levels of UA are associated with increased purine ingestion and metabolism and/or a decrease in their excretion. In this area, xanthine oxidase (XO), by converting hypoxanthine and xanthine to AU, plays an important role in the control of hyperuricemia. Based on the limitations and adverse effects associated with the use of allopurinol and febuxostat, the most well known approved drugs with an inhibitory effect on XO. The aim of this study is to evaluate in vitro and in silico the inhibitory activity of organometallic complexes synthesized in Italy, against human xanthine oxidase (HXO), using molecular docking and an innovative analytical method based on double enzyme detection (DED). The results show a moderate inhibition to HXO with an IC50 of 261.1± 9.91 µg/ml, 56.2 ± 2.457 µg/ml ; for Ce3 & La5, respectively. An *in silico* study based on molecular docking using GOLD software have been realized to study the HXO inhibition. The results show that both complexes gave interesting inhibitory effect against HXO.

Key words: gout, Human xanthine oxidase, organometallic complexes, enzyme inhibition, docking molecular

ملخص

يتميز النقرس بمستويات عالية من حمض البوليك (UA) في الدم. ترتبط هذه المستويات العالية من UA بزيادة ابتلاع البيورين والتمثيل الغذائي و / أو انخفاض إفرازهم. في هذا المجال ، يلعب الكزانثينأوكسيداز (XO) ، عن طريق تحويل هيبوكسانثينوكزانثين إلى AU ، دورًا مهمًا في السيطرة على فرط حمض اليوريك في الدم. استنادًا إلى القيود والآثار السلبية المرتبطة باستخدام allopurinol و febuxostat ، وهي الأدوية الأكثر شهرة والتي لها تأثير مثبت على XO. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المثبط في المختبر وفي السليكون للمركبات المعدنية العضوية التي تم تصنيعها في إيطاليا ، ضد الكزانثينأوكسيداز البشري (HXO) ، باستخدام الإرساء الجزيئي وطريقة تحليلية مبتكرة تعتمد على الكشف بالإنزيم المزدوج (DED). أظهرت النتائج تثبيطًا معتدلًا لـ HXO مع IC50 من 261.1 ± 9.91 ميكروغرام / مل ، 56.2 ± 2.457 ميكروغرام / مل ؛ لـ Ce3 و La5. تم تحقيق دراسة في السليكون على أساس الإرساء الجزيئي باستخدام برنامج GOLD لدراسة تثبيط HXO. أظهرت النتائج أن كلا المركبين أعطيا تأثيرًا مهمًا ضد HXO.

كلمات مفتاحية: النقرس، الكزانثين أوكسيداز البشري، المركبات المعدنية، التثبيط الانزيمي، الإرساء الجزيئي.