

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 sur la xanthine oxydase humaine

Présenté par : Chine Iman

Ben saidane Hadjer

Membre du jury :

Président : Pr YOUSFI Mohamed (Pr)

Examinatrice : Dr NIA Samira (MCB)

Encadreur : Dr BENAROUS Khedidja (MCA)

Co-encadreur : Mr. LINANI Abderrahmane (Ing)

Soutenue publiquement le : 22/05/2019

Dédicaces

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

À ma très chère mère : Rebiha DEMMANA

Tu représente 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.

À mon très cher père : Ali

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

À mes frères et sœurs

Youcef, Kaltoum, Meriem et Nadjwa, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite

À mon cher binôme Hadjer avec laquelle j'ai partagé ce travail

À mes chères amies

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

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 2019

CHINE IMAN

Dédicaces

Aux êtres humains les plus précieux qui existent

Pour mes parents

Taher et Alia AOUISSI

Lorsque nous parlons de tendresse et d'amour,

nous entendons la mère

et lorsque nous parlons de sécurité et de générosité,

nous entendons le père,

C'est une des plus grandes bénédictions que Dieu a sur nous dans le monde,

si ce n'était pour eux, nous n'aurions pas été là et si ce n'était pour leur soin et leurs sacrifices

Grace, quoi que nous disions et quoi que nous écrivions à leur sujet, nous ne remplirons pas

leur droit envers nous

Quand on parle de soutien et de force, on parle des compagnons de la vie jusqu'à la fin nous

entendons les frères et sœurs

Le véritable ami est celui qui vous rejoint lorsque le reste du monde s'éloigne de vous et que

vous êtes avec moi

ma chérie Iman

Au cours de mon voyage universitaire, j'ai gagné quatre roses que mes amies ne pouvaient

décrire

Bouchemal Halima, Chaib Kheira, Chine Iman et Rabhi Faiza

je veux vous remercier pour les sympatiques moments qu'on a passé ensemble

Je souhaite plein succès à tous ceux qui m'ont soutenu et à tous ceux

qui m'ont souhaité du succès, à ma famille,

à mes amis et à mes collègues, et aux grands remerciements

au plus grand des deux personnes

ma mère et mon père.

HADJER BENS Aidane

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Au terme de la réalisation de ce mémoire, nous tenons à présenter nos remerciements les plus sincères à notre promotrice Dr. Khedidja BENAROUS, pour avoir dirigé ce travail, pour ces précieux conseils, son orientation, ses encouragements, sa disponibilité, son aide et sa patience avec nous.

Nous remercions également Monsieur Abderrahmane LINANI et Mademoiselle Leila BOU-SALAH, pour ses conseils et ses 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 Idris RAHMOUN qu'il trouve dans ce mémoire nos connaissances infinies.

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.

Nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Nous remercions aussi nos collègues et nos amies pour les sympatiques moments qu'on a passé ensemble.

IMAN ET HADJER

Résumé

La xanthine oxydase est une enzyme indispensable au métabolisme des purines, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, son hyperactivité entraîne le dépôt de cristaux d'urate dans les articulations et les reins, provoquant l'arthrite et néphrolithiase, c'est la maladie de la goutte. Le but principal de cette étude est de traiter cette maladie via le test de la capacité d'inhibition de l'activité enzymatique de la xanthine oxydase du lait humain par des molécules pures et de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition aussi de connaître la nature et les types d'interactions entre inhibiteur-enzyme en utilisant le docking moléculaire avec le programme AutoDock Vina. Les résultats obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 varient de 0,29 à 2,92 µg/ml contre la xanthine oxydase, ce qui est confirmé par les résultats de l'amarrage moléculaire. Nous confirmons que ces molécules peuvent être employées dans le traitement de la goutte.

Mots clés : xanthine oxydase humaine, goutte, inhibition, molécules pures, docking moléculaire.

Liste des abréviations

- XO : Xanthine oxydase
XDH : Xanthine déshydrogénase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
AU : Acide Urique
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS : Allopurinol Intolerance Syndrome
COX : Cyclo-oxygénase
IM : Intra-musculaire
AIA : asthme intolérant à l'aspirine
EDTA : Ethylene Diamine Tétracetic Acid
DMSO : Di-Methyl Sulfoxide
IC50 : la concentration inhibitrice à 50%.
I % : Pourcentage d'inhibition
ADT : Autodock tools

Liste des figures

Figure 1. Le dépôt d'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain.....	14
Figure 2. Cristaux d'urate mono sodique intracellulaire	16
Figure 3. Représentation de la structure 3D de la xanthine oxydase humaine (PDB ID: 2CKJ) en surface et affichage des acides aminés catalytiques en bâtonnet	18
Figure 4. Schéma réactionnel du processus enzymatique catalysé par la XO et XDH	19
Figure 5. Structure 2D de l'allopurinol	21
Figure 6. Effet de l'allopurinol sur la réaction de la xanthine oxydase	22
Figure 7. Structure 2D du fébuxostat	23
Figure 8. Structure 2D de la colchicine.....	24
Figure 9. Structure 2D des cinq médicaments AINS	26
Figure 10. Photos des médicaments anti-inflammatoires utilisés.	30
Figure 11. Protocole d'extraction de la xanthine oxydase	31
Figure 12. Action de l'uricase sur l'acide urique	32
Figure 13. Représentations graphiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la XO par les anti-inflammatoires utilisés.	39
Figure 14. Les meilleures poses de docking pour des médicaments inhibiteurs (Indométacine, Naproxène sodique) dans la XO. Les acides aminés catalytiques sont représentés en vert.	42
Figure 15. Les meilleures poses de docking pour des médicaments inhibiteurs (Ibuprofène, Célécoxib) dans la XO. Les acides aminés catalytiques sont représentés en vert.	43
Figure 16. Les meilleures poses de docking pour les médicaments inhibiteurs (Diclofénac de sodium, Allopurinol) dans la XO. Les acides aminés catalytiques sont représentés en vert.	44

Liste des tableaux

Tableau 1. Localisation de la xanthine oxydase.....	17
Tableau 2. Les codes PDB de la XO humaine.	20
Tableau 3. Doses usuelles et maximales des cinq médicaments AINS.....	27
Tableau 4. Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs.	36
Tableau 5. Les pourcentages d'inhibition de la XO humaine et bovine par des différentes molécules pures.	37
Tableau 6. Les valeurs des IC50 des inhibiteurs de la XO humaine.	37
Tableau 7. Les résultats de l'amarrage moléculaire.	45

Table des matières

<i>Dédicaces</i>	1
<i>Dédicaces</i>	2
<i>Remerciements</i>	3
Résumé	4
<i>Liste des abréviations</i>	5
<i>Liste des figures</i>	6
<i>Liste des tableaux</i>	7
INTRODUCTION GENERALE.....	10
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	13
I. Goutte	14
1. Définition	14
2. Causes (Facteurs potentiellement associés à une augmentation du risque de goutte) ...	15
3. Symptômes	16
4. Diagnostic	16
II. Xanthine oxydase	17
1. Distribution et Localisation	17
2. Structure de la xanthine oxydase	18
3. Mécanisme d'action de la xanthine oxydase	19
4. Conversion de la XDH en XO	19
5. Codes PDB de la XO humaine	20
III. Traitements de la goutte	21
1. Traitements non médicamenteux	21
2. Traitements médicamenteux	21
MATERIELS ET METHODES	29
I. Matériels	30
i. Matériel biologique	30
ii. Appareillages et réactifs	31
II. Méthodes	31
1. Extraction de la xanthine oxydase du lait humain	31
2. Test de l'activité de la xanthine oxydase	32
3. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysé par la xanthine oxydase	33
4. Docking moléculaire	34
RESULTATS ET DISCUSSION	35

1. Rendement d'extraction de l'enzyme	36
2. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase	36
3. Docking moléculaire	40
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49

INTRODUCTION GENERALE

Au fil des siècles en médecine, plusieurs maladies ont vu le jour, certaines ont disparu, mais d'autres ont su résister au temps. Parmi celles-ci, la goutte, qui demeure toujours un sujet d'actualité chez les professionnels de la santé. En fait, de l'Antiquité jusqu'aux temps modernes, la goutte a toujours été perçue comme la maladie des riches et des décadents, car seuls ces derniers pouvaient se procurer de la nourriture et de l'alcool en grande quantité **(Boileau, 2007)**.

La goutte était déjà connue dans l'antiquité. Elle a été décrite pour la première fois par les égyptiens, 2600 ans avant J.-C. Puis au Ve siècle avant J.-C, Hippocrate a décrit une affection articulaire sur laquelle il donne peu de détails cliniques. Il se rendit compte qu'elle touchait de préférence les hommes et il nota l'influence de l'hérédité et de la suralimentation. Elle était surnommée de « podagre » qui signifie : prise au piège par le pied. Vers le IXe siècle, est apparu le mot « goutte » expliquant, qu'un poison contenu dans les humeurs « pénètre goutte à goutte dans les jointures ».

Au XIXe siècle, le physicien Garrod, puis Charcot ont montré que le sérum des goutteux contenait une substance : l'acide urique, pouvant pénétrer dans les articulations et conduire à leur inflammation, et s'accumuler dans d'autres tissus pour former des tophi.

C'est seulement en 1961 que les américains Mc Carthy et Hollander redécouvrirent dans le liquide synovial de l'arthrite goutteuse des microcristaux d'urate de sodium dont l'injection intra-articulaire chez l'animal et chez l'Homme reproduisait l'inflammation aiguë **(Saderne, 2013)**.

La goutte est une forme courante d'arthrite causée par la réaction inflammatoire due à la formation des cristaux d'urate mono-sodique dans les articulations. Initialement, la maladie se présente comme une autolimitation des attaques d'inflammation articulaire sévère ; et en présence d'une hyperuricémie persistante, la goutte chronique peut également se développer avec les tophi et la synovite chronique **(Saidi et Zerrouki, 2013)**.

Le traitement de la goutte comprend d'une part, le traitement de l'accès goutteux, d'autre part, le traitement hypouricémiant qui permet à présent de guérir cette maladie ou du moins de diminuer la fréquence des crises aiguës.

Le traitement de l'accès goutteux doit être réalisé le plus précocement possible, dès le premier jour car tout retard thérapeutique augmente la résistance. L'objectif est de réaliser une action anti-inflammatoire ciblée. Les principaux médicaments utilisés en première intention sont la colchicine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les corticoïdes. Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont à utiliser en deuxième ligne à cause du phénomène de perte d'efficacité progressive sur une utilisation au long court. Le traitement de fond de la goutte est réalisé grâce aux hypo-uricémiants – l'allopurinol en première intention. Ils ont transformé le pronostic de la goutte en permettant de maintenir les concentrations sanguines en acide urique en delà d'un seuil de 360 $\mu\text{mol/L}$ (60 mg/L) (Calop et al., 2012).

L'objectif principal de cette étude est de tester le pouvoir d'inhiber de la xanthine oxydase humaine par quelques médicaments anti-inflammatoires afin d'étudier l'effet de ces derniers sur l'enzyme cible afin de chercher et de trouver un traitement efficace contre la maladie de la goutte.

Nous avons étudié 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 le docking moléculaire (avec le logiciel AutoDock Vina).

Le manuscrit est constitué de trois parties qui sont : rappels bibliographiques, matériels et méthodes, résultats et discussions et il se termine par une conclusion et perspectives.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Goutte

1. Définition

La goutte est une forme d'arthrite provoquée par l'accumulation et la précipitation de cristaux d'urate de sodium dans certaines articulations, surtout à la base du gros orteil, mais aussi aux chevilles, aux genoux, aux poignets, aux mains et aux coudes (au niveau des bourses olécraniennes) (Figure1) ; par contre, les épaules sont rarement atteintes. Il en résulte une douleur lancinante caractéristique avec une inflammation aux articulations atteinte (Boileau, 2007).

Elle affecte surtout les hommes entre 40 et 50 ans, mais elle peut également toucher les femmes, particulièrement après la ménopause. il existe quatre phases dont une phase asymptomatique d'une durée variable et trois phases cliniques : la crise aiguë, la période intercritique et la forme chronique tophacée (Choquette et Hazeltine, 2012).

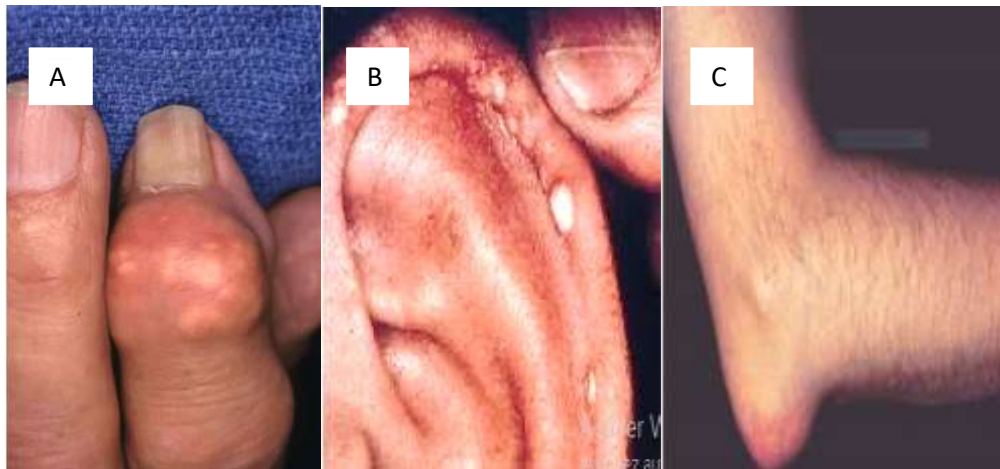


Figure 1. Le dépôt d'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain :

A : Tophus des doigts ; B : Tophus du pavillon de l'oreille ; C : Tophus du coude.

(Pessina, 2017 ; Leclerc, 2016).

2. Causes (Facteurs potentiellement associés à une augmentation du risque de goutte)

L'organisme synthétise normalement de l'acide urique lorsqu'il dégrade les protéines. L'acide urique reste généralement sous forme dissoute dans le sang, avant d'être éliminé par le rein. S'il y a une quantité excessive d'acide urique dans le sang (hyperuricémie), ou si les reins ne peuvent l'éliminer assez rapidement, le taux d'acide urique présent dans le sang atteint un niveau que le sang ne peut supporter. En conséquence, des cristaux se forment et s'accumulent dans les articulations, ou dans d'autres régions comme la peau. L'excès d'acide urique présent dans l'urine peut également se cristalliser et se déposer dans les reins et crée un terrain propice à la formation de calculs rénaux (<https://santecheznous.com>, consulté le 17/03/2019). Alors l'hyperuricémie représente le facteur de risque majeur dans le développement de la goutte, d'autres nombreux facteurs de risque ont été identifiés :

- **Les facteurs génétiques** : comme l'action régulatrice des concentrations sériques d'urates, par les gènes $SLC2A9$ et $ABCG2$, qui codent pour les transporteurs rénaux d'acide urique.
- **L'âge** : la prévalence de la goutte augmente avec l'âge (lenteur de formation des dépôts cristallins pathogènes d'urate mono sodique).
- **Le sexe** : les œstrogènes ont un effet uricosurique qui protège la femme jusqu'à la ménopause, ce qui rend l'uricémie est plus faible chez la femme adulte non ménopausée que chez l'homme.
- **L'alimentation** : l'incidence de la goutte augmente avec l'apport journalier de viande ou de produits de la mer, et la consommation de boisson tel que : l'alcool tandis que les produits laitiers avaient un effet protecteur en favorisant l'excrétion de l'acide urique.
- **La prise des Médicaments** : comme les diurétiques, l'aspirine à faible dose, en diminuant l'excrétion de l'acide urique, particulièrement chez les sujets âgés.
- **La masse corporelle** : où le risque de goutte augmente avec le poids corporel (Messili et Oulefki, 2013).

3. Symptômes

La goutte se traduit par des manifestations aiguë et chronique : La goutte aiguë est la conséquence d'une réaction inflammatoire consécutive à la précipitation de cristaux d'urate de sodium dans l'articulation, c'est une arthrite microcristalline qui entraîne une douleur, une inflammation et un œdème important. Au fil du temps, l'inflammation risque de causer une destruction articulaire surtout au niveau du gros orteil. La goutte chronique est la conséquence d'une surcharge uratique chronique et prolongée. Ses signes sont principalement cutanées (les tophus qui se localisent plus particulièrement sur le pourtour de l'oreille), articulaire et urinaire (**Messili et Oulefki, 2013**).

Au début, la personne a la sensation qu'un seau d'eau froide a été versé sur son articulation, mais une sensation très douloureuse de cisaillement apparaît bientôt, de même qu'une sensation de pression et d'oppression. La région devient rouge, chaude et très sensible au toucher, et même la présence d'un drap peut accroître les douleurs. Le gonflement s'étale souvent sur une large portion du pied, rendant impossible le port d'une chaussure. Une fièvre légère apparaît souvent (<https://santecheznous.com>, consulté le 17/03/2019).

4. Diagnostic

Bien que la présentation clinique soit très suggestive, le diagnostic définitif requiert habituellement l'analyse du liquide synovial qui démontrera la présence de cristaux d'urate mono sodique intracellulaire (Figure 2) (**Choquette et Hazeltine, 2012**).

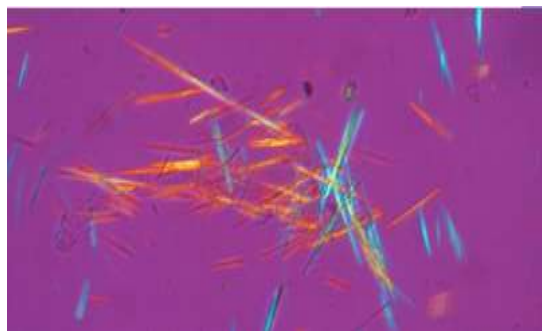


Figure 2. Cristaux d'urate mono sodique intracellulaire (**Choquette et Hazeltine, 2012**).

II. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est un complexe métaloflavoenzyme (Xu et al., 1994), identifiée pour la première fois il y a un siècle dans le lait (Saidi et Zerrouki, 2013).

Elle est obtenue par une transformation protéolytique de la xanthine déhydrogénase. En effet, on distingue deux types de XO dans les cellules, l'une la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) et l'autre, la xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22), les deux enzymes étant interconvertibles (Hamlaoui, 2014).

Depuis que McCord et Fridovich ont montré que la XO est une source de génération des radicaux libres, de nombreuses études ont été réalisées et montré son implication dans plusieurs pathologies telles que l'infection virale, l'inflammation, les tumeurs de cerveau, les problèmes cardiovasculaires et dans le processus de l'ischémie-reperfusion (Hamlaoui, 2014).

1. Distribution et Localisation

L'activité de la XO a été détectée dans toutes les espèces, y compris les bactéries. Dans les tissus des mammifères notamment chez l'Homme, l'activité est largement répandue (Tableau 1), avec un plus haut niveau dans le foie et l'intestin (Saidi et Zerrouki, 2013).

Tableau 1. Localisation de la xanthine oxydase (Saidi et Zerrouki, 2013).

Localisation tissulaire	Localisation subcellulaire
Le foie	Le cytoplasme
L'intestin grêle	Les membranes cellulaires
Les glandes mammaires	Les peroxysomes des hépatocytes
Les cellules endothéliales des vaisseaux vasculaires	Les cellules sinusoïdales
L'estomac	Le réticulum endoplasmique rugueux
Les cavités buccale et nasale, la langue	Les lysosomes
L'œsophage	Les vésicules d'endocytose
Le rein, le cœur, le cerveau, les poumons	
L'utérus, le plasma	

2. Structure de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme homotétramère ou complexe de protéines constitué de quatre sous-unités identiques (Figure3) (http://mammoth.bcm.tmc.edu/report_maker/reports/pdbreports/2ckj_report.pdf), de masse moléculaire de 290 kDa. Durant la catalyse de la dégradation des bases puriques, chacun des monomères agit seul. Elle possède deux sites actifs distincts, communiquant par une chaîne interne de transport d'électrons, utilisant les ponts de [2Fe-2S] (Hamlaoui, 2014) .

Le gène qui code pour la XO 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 XO humaine est de 1333 acides aminés, elle est de 91% d'homologie avec celle de la XO de la souris et du rat (Adjadj, 2009).

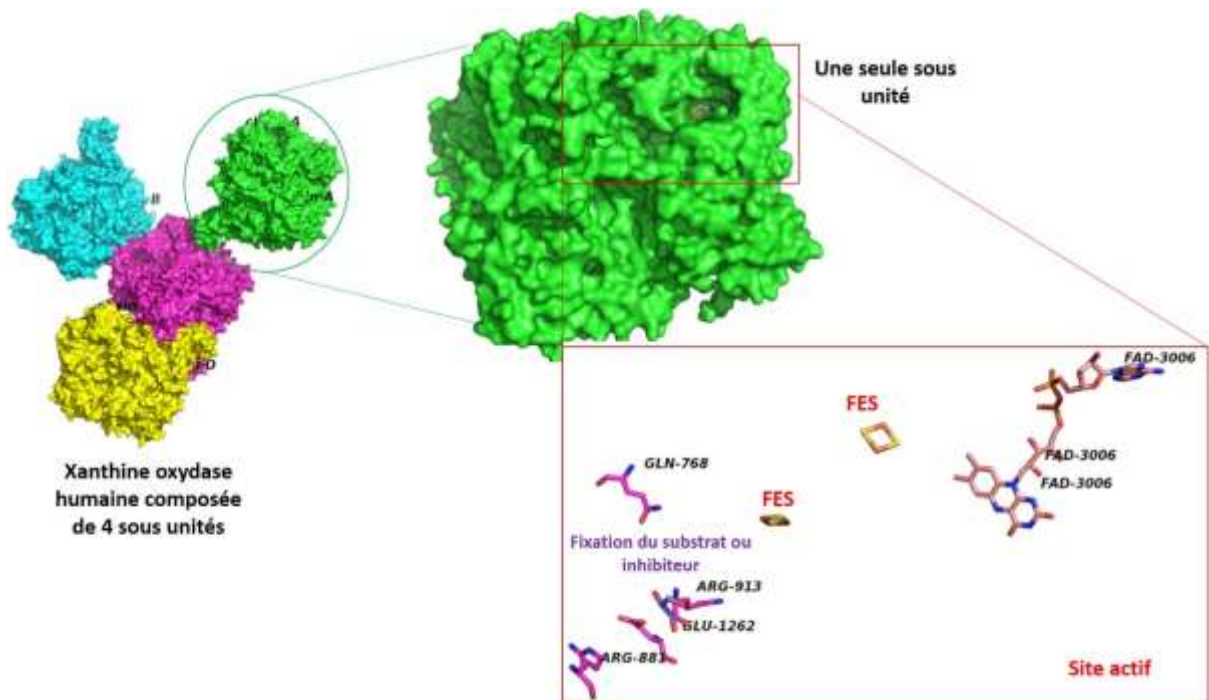


Figure 3. Représentation de la structure 3D de la xanthine oxydase humaine (PDB ID: 2CKJ) en surface et affichage des acides aminés catalytiques en bâtonnet (image réalisée avec le logiciel Pymol).

3. Mécanisme d'action de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme indispensable au métabolisme des purines, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. Quand la réaction est catalysée par la XO, elle est accompagnée par une génération de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène, selon le schéma réactionnel présenté dans la figure 4.

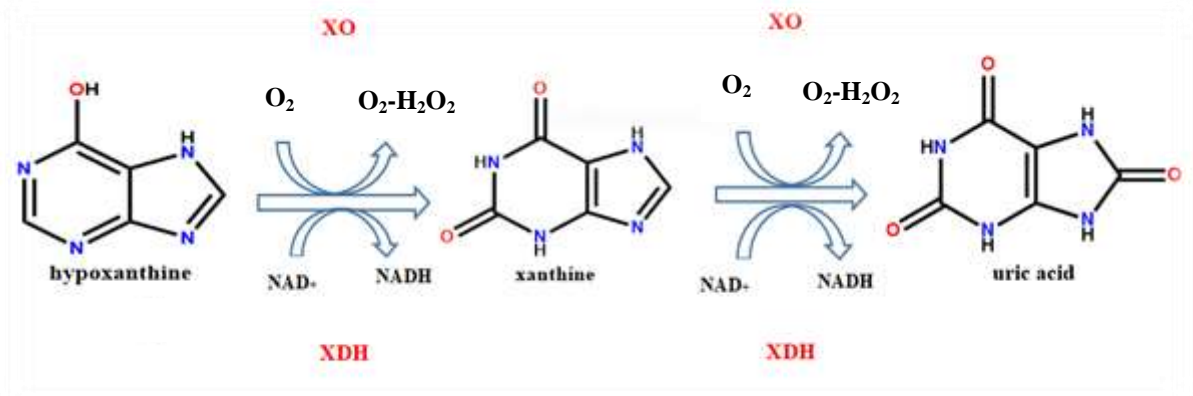


Figure 4. Schéma réactionnel du processus enzymatique catalysé par la XO et XDH (Messili et Oulefki, 2013).

La xanthine se fixe sur l'enzyme et donne le premier produit qui est l'acide urique ; ensuite l'oxygène se fixe comme un second substrat et produit le radical superoxyde, sachant que la xanthine oxydase utilise l'eau comme source d'oxygène, plutôt que l'oxygène moléculaire (Hamlaoui, 2014).

4. Conversion de la XDH en XO

La XO existe sous deux formes : type D et type O. La forme dominante de la XO qui se trouve in-vivo est le type D. Chacune des deux formes préfère un accepteur d'électrons différent de celui de l'autre forme. Le type D préfère la réduction du NAD⁺ et le type O préfère la réduction de l'O₂ (Adjadj, 2009).

La conversion de la XDH en XO se fait via différentes voies ; la première est dû au traitement de la XDH par les protéases, comme la trypsine, la chymotrypsine ou la pancréatine, elle est donc irréversiblement transformée en XO. La deuxième conversion de la XDH est réversible, elle est dû à l'oxydation des groupements sulfhydriles (SH) (Adjadj, 2009).

5. Codes PDB de la XO humaine :

La XO humaine possède deux codes PDB, 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 (ces données sont extraites à partir de la PDBsum).

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

III. Traitements de la goutte

1. Traitements non médicamenteux

Le traitement non pharmacologique consiste à la diminution de l'apport en purine pour diminuer le taux de formation de l'AU, et ce en ayant recours à des règles hygiéno-diététiques (modification des habitudes alimentaires, perte de poids) et un arrêt ou substitution de médicaments hyperuricémiants tels que les diurétiques ou l'aspirine (Saidi et Zerrouki, 2013).

2. Traitements médicamenteux

Le traitement de la goutte se réalise par deux traitements : le traitement de la crise de goutte aiguë et le traitement hypo-uricémiant. Le premier traitement se fait par la prise de la colchicine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ou les deux à la fois, alors le second se fait par prise de médicaments hypo-uricémiants 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 le fébuxostat et l'allopurinol. Ce dernier est recommandé pour être la première ligne de diminution de l'AU chez les patients goutteux et d'insuffisances rénales (Saidi et Zerrouki, 2013).

2.1 Allopurinol

L'allopurinol (Zyloprim®), utilisé depuis les années 1960, agit en empêchant la production d'acide urique par inhibition de l'enzyme xanthine oxydase (Boileau, 2007). C'est un composé aromatique possédant un cycle purine, (4-hydroxypyrazolo-(3,4-d)pyrimidine) (Figure 5), isomère de l'hypoxanthine (Messili et Oulefki, 2013).

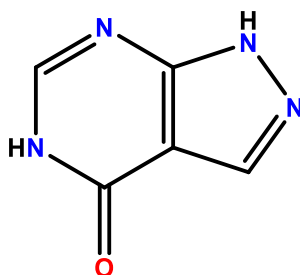


Figure 5. Structure 2D de l'allopurinol (ChemSpider).

L'allopurinol constitue le traitement de choix pour l'hyperuricémie, tant pour ceux qui produisent trop d'acide urique que pour ceux qui n'en éliminent pas assez. La dose de départ est de 100 mg pour ensuite augmenter graduellement par incrément de 100 mg jusqu'à l'atteinte des cibles thérapeutiques. En général, une dose de 300 mg permet de ramener les valeurs d'acide urique à un niveau acceptable pour la majorité des patients (Boileau, 2007).

Dans l'organisme et en présence de l'oxygène moléculaire, il est métabolisé par la xanthine oxydase en oxypurinol (inhibiteur non compétitif de la xanthine-oxydase donnant naissance à des molécules de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)), selon la réaction suivante :

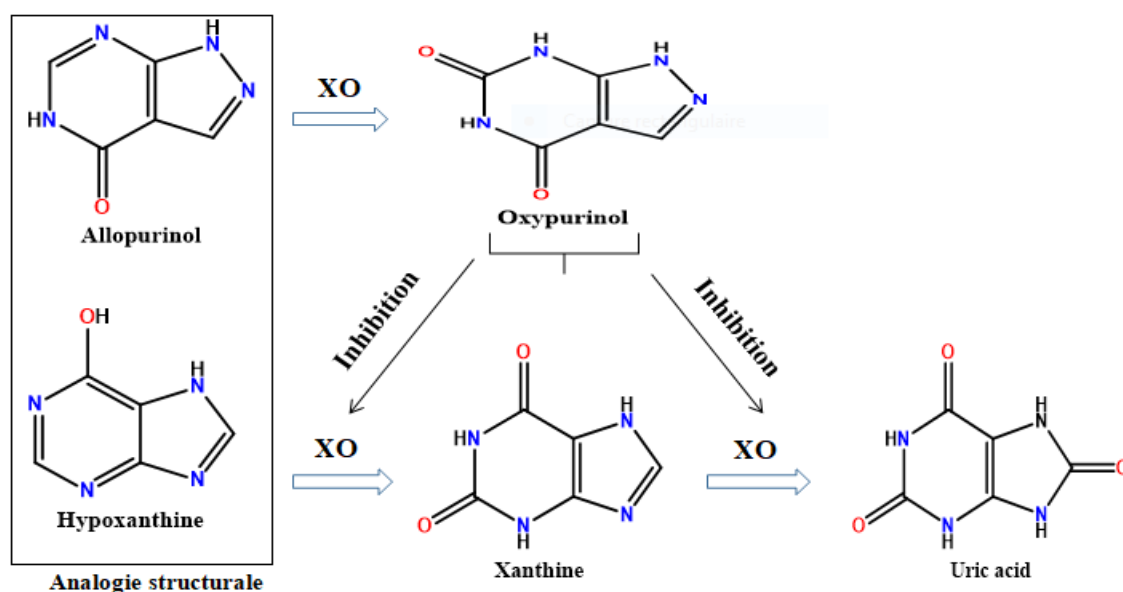
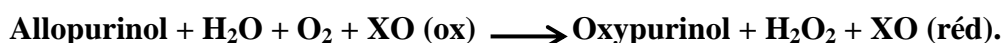


Figure 6. Effet de l'allopurinol sur la réaction de la xanthine oxydase (Hamlaoui, 2014).

Malheureusement, l'administration de l'allopurinol chez certains patients a conduit au développement de quelques réactions allergiques connues par l'AIS (Allopurinol Intolerance Syndrome). Ces symptômes sont dus au métabolite secondaire de l'allopurinol (oxypurinol) (Aoudéche et Haddadi, 2018).

2.2 Fébuxostat

Le fébuxostat (**Uloric®**); acide 2-[3-cyano-4-(2-méthylpropoxy) phényl]-4-méthylthiazole-5-carboxylique, est le premier nouveau médicament pour la goutte commercialisé depuis plus de 40 ans, est un inhibiteur synthétique non purinique (Figure 7) - agit comme un inhibiteur puissant de la xanthine oxydase (XO) 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, inhibe plusieurs autres enzymes du métabolisme des purines et des pyrimidines (**Boileau, 2007**).

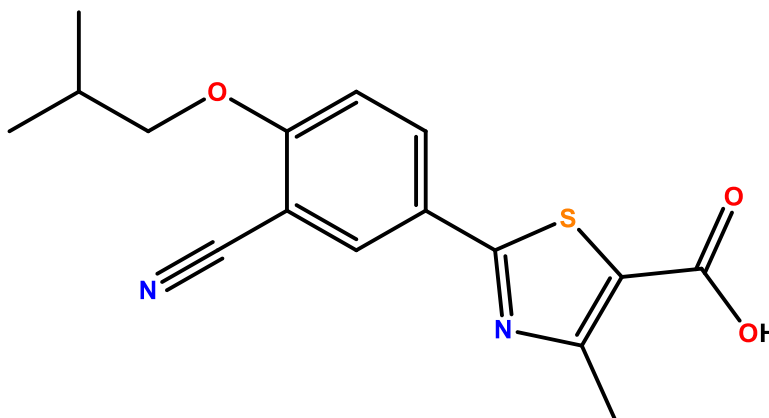


Figure 7. Structure 2D du fébuxostat (**ChemSpider**).

2.3 Colchicine

La colchicine correspond à un dérivé alcaloïde de la colchique d'automne (ou *Colchicum autumnale*) (Figure 8). 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 proinflammatoires tel que le leucotriène B₄ (LTB₄) et elle empêche le recrutement des autres globules blancs dans la réaction inflammatoire. Ainsi, pour que la colchicine soit efficace comme anti-inflammatoire, elle doit être amorcée très tôt dans le processus inflammatoire. Pour une crise de goutte, on devrait amorcer le traitement dans les 24 premières heures après le début de la crise; sinon, les effets bénéfiques seront moins importants et l'attaque pourrait être plus longue à traiter.

Généralement, la douleur commence à diminuer après 12 heures de traitement et disparaît complètement à l'intérieur de 48 heures. Un récent consensus international a standardisé la dose de départ à 1 mg deux à quatre heures avec un maximum de 4 mg par jour. Bien que la colchicine soit efficace, les effets indésirables gastro-intestinaux (nausées, vomissements et diarrhée) et musculaires (myopathies) sont nombreux, et constituent une cause majeure d'arrêt du traitement.

La colchicine peut provoquer des complications très graves au niveau hématologique si elle est utilisée à fortes doses (**Boileau, 2007**).

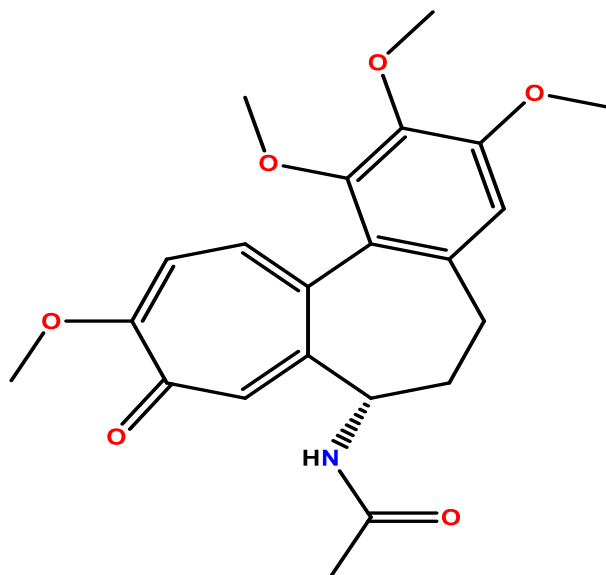


Figure 8. Structure 2D de la colchicine (**ChemSpider**).

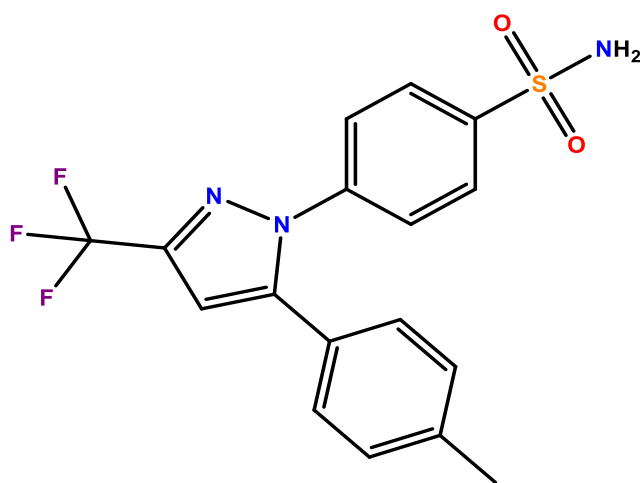
2.4 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont définis par opposition aux corticoïdes (anti-inflammatoires stéroïdiens). Les AINS sont des médicaments destinés à prévenir ou à contenir les manifestations inflammatoires. Ils ont une action uniquement symptomatique en agissant sur la physiopathologie de l'inflammation, sans agir sur son étiologie qui devra être traitée à part.

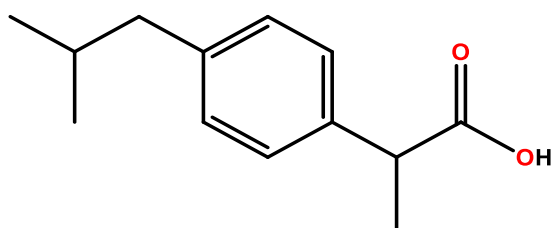
C'est une classe pharmaco-thérapeutique hétérogène très utilisée aussi bien en prescription qu'en automédication dans des syndromes aigus ou des affections chroniques, notamment rhumatismales.

Tous les AINS possèdent des propriétés communes: anti-inflammatoires, antalgiques, antipyrétiques et antiagrégants plaquettaires. Par ailleurs, les AINS sont responsables de très nombreux effets secondaires qui entraînent de nombreux effets indésirables souvent graves (<https://pharmacomedicale.org>, consulté le 13/03/2019)

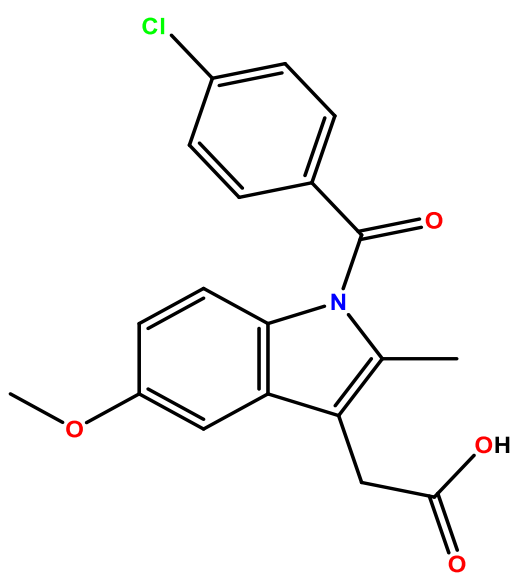
En l'absence de contre-indications, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent le traitement de première intention de la goutte aiguë. Ils agissent en diminuant la réaction inflammatoire dans les articulations atteintes par une inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX) responsable de la formation de médiateurs pro-inflammatoires. En général, on s'accorde pour dire que les AINS peuvent soulager les symptômes à l'intérieur des 24 premières heures d'administration. Ils présentent également un avantage étant donné leur faible coût. Par le passé et encore aujourd'hui, les cliniciens utilisent l'indométacine, le naproxène, l'ibuprofène, le célécoxib et le diclofénac (Figure 9) pour soulager la douleur et à interrompre la crise aiguë (Boileau, 2007).



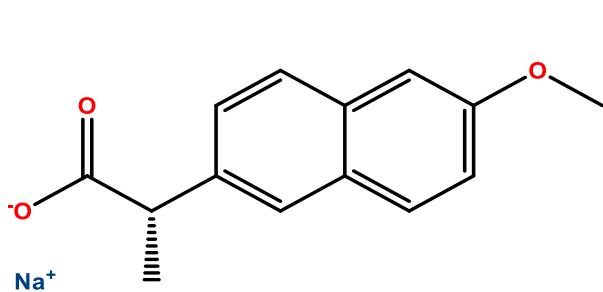
Celecoxib



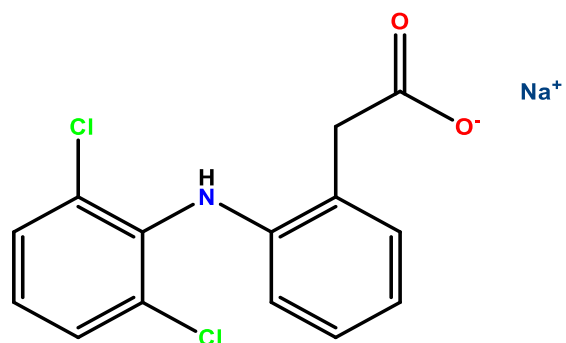
Ibuprofen



Indometacin



Naproxen sodium



Diclofenac sodium

Figure 9. Structure 2D des cinq médicaments AINS (ChemSpider).

Comme tous les médicaments, les AINS sont administrés avec des voies et des doses différentes, le tableau suivant représente les cinq molécules utilisés dans ce travail avec leurs voies et doses :

Tableau 3. Doses usuelles et maximales des cinq médicaments AINS (Grandin, 2013).

Molécule	Voie	Doses Usuelles	Doses Maximales
		Par 24h	Par 24h
Diclofénac	Orale	100 mg	150 mg
	IM		75mg
	Rectale	100 mg	150 mg
Indométacine	Orale	50 à 150 mg	200mg
Ibuprofène	Orale	1200 mg	2400mg
	Rectale	500 à 1000 mg	
Naproxène	Orale et Rectale	500 mg	1250 mg
Célécoxib	Orale	400 mg	400 mg

❖ Effets indésirables des AINS

- **Toxicité digestive :**

La toxicité gastro-duodénale est l'un des inconvénients majeurs des AINS.

- **Toxicité rénale :**

L'inhibition des prostaglandines rénales par les AINS peut conduire à une baisse du flux sanguin rénal et de la filtration glomérulaire (risque d'insuffisance rénale aiguë).

- **Toxicité cardiovasculaire :**

Ce risque a été initialement attribué aux inhibiteurs sélectifs de COX₂ (famille des COXIBS).

- **Réactions d'intolérance à l'aspirine :**

L'aspirine et les AINS sont à l'origine de réactions fréquentes correspondant à la survenue d'une bronchoconstriction, chez 20 % de sujets asthmatiques (AIA = asthme intolérant à l'aspirine). Tous les AINS peuvent être impliqués, bien que les anti-COX₂ soient moins concernés (**Nuhrich, 2015**).

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

i. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est le lait humain, choisi sur la base de sa richesse de l'enzyme (XO), ainsi, la facilité de son extraction. Il a été obtenu à partir d'une femme en maternité de 3 à 20 jours, de poids 62kg, âge 34ans, taille 1,5m. Son régime alimentaire était riche en source protéique et les dérivés laitiers, de la Wilaya de Laghouat.

Nous avons utilisé des médicaments anti-inflammatoires qui sont : l'indométacine, le naproxène sodique, l'ibuprofène, le célécoxib et le diclofénac de sodium, qui sont commercialisés sous le nom (INDOMET®, NOPAIN®, XYDOL®, Rumabrex®, CLOFENAL® L.P), respectivement, ils ont été acheté à partir d'une pharmacie (Figure 10).



Figure 10. Photos des médicaments anti-inflammatoires utilisés.

ii. Appareillages et réactifs

Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans cette expérimentation, parmi ces produits : le tampon phosphate de pH7 constitué de di-hydrogenophosphate de potassium (KH_2PO_4) et di-potassium monohydrogène phosphate (K_2HPO_4) et chlorure de potassium (KCl). Un autre tampon constitué de K_2HPO_4 et Ethylene Diamine Tétracetic Acid (EDTA), Di-Methyl Sulfoxide (DMSO), le réactif du dosage de l'acide urique de la marque BIOLABO, le substrat (la xanthine), l'eau distillée.

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

II. Méthodes

1. Extraction de la xanthine oxydase du lait humain :

L'extraction de la xanthine oxydase du lait humain a été réalisée selon le protocole d'extraction de (Nakamura et Yamazaki, 1982) modifiée par (Baghiani et *al.*, 2003) montré dans la figure11.

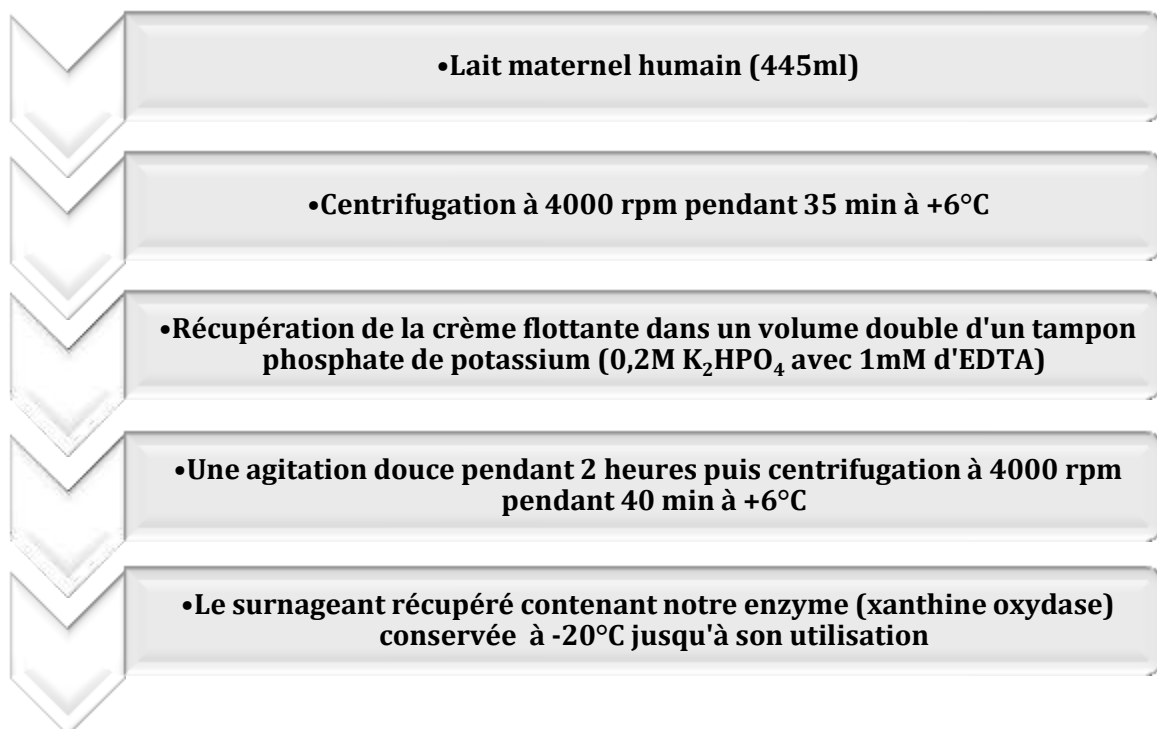


Figure 11. Protocole d'extraction de la xanthine oxydase (Nakamura et Yamazaki, 1982) modifiée par (Baghiani et *al.*,2003).

2. Test de l'activité de la xanthine oxydase :

Nous avons testé l'activité de la XO par l'ajout d'un réactif de dosage d'acide urique de la marque BIOLABO (de volume 160µl), qui donne une coloration rose indiquant la production de l'acide urique à 490 nm, avec un volume de 40µl du substrat (la xanthine) et de 20µl d'enzyme dilué dans le tampon phosphate à pH7 (K_2HPO_4 (0,435g), KH_2PO_4 (0,34g) et KCl (4,5g)) dans 500ml d'eau distillée). Après une incubation à 37 C° pendant 30 min, les valeurs des absorbances ont été obtenues à l'aide d'un lecteur à microplaque .

❖ 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'hyper uricémie 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'hyper uricémie peut aussi être attribuée à une défectuosité d'une des enzymes impliquées dans le métabolisme de purines ou à une hémopathie. L'hypouricémie est beaucoup moins courante que l'hyperuricémie (**Tietz et al., 1999**).

L'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (dichloro-hydroxy benzène sulfonate 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 (**Tietz et al., 1999**).

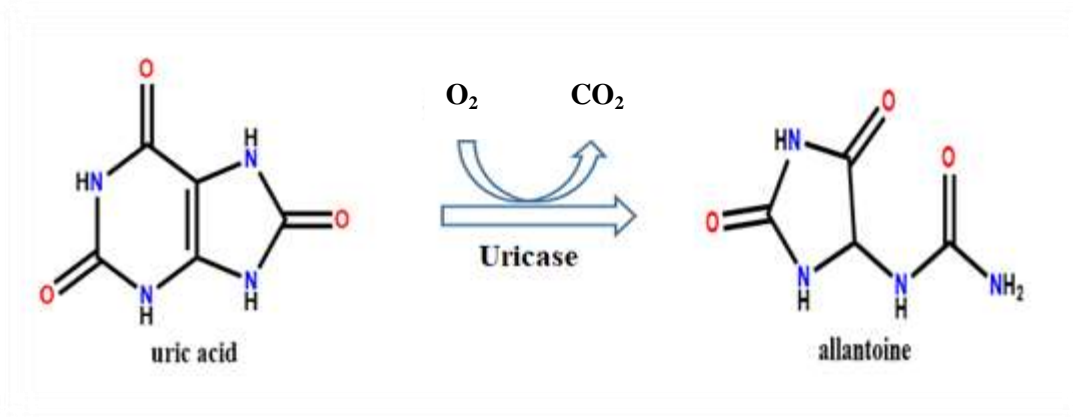


Figure 12. Action de l'uricase sur l'acide urique (**Messili et Oulefki, 2013**).

3. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysé par la xanthine oxydase :

Les médicaments sont solubilisés soit dans le tampon soit dans un pourcentage bien déterminé de DMSO, donc l'objectif est de s'assurer la solubilité totale.

L'activité inhibitrice de nos médicaments (molécules pures) a été testé 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 40µl de l'inhibiteur (la molécule pure dilué avec huit concentrations croissantes) est ajouté à 20µl de l'extrait enzymatique dilué dans le tampon, ce mélange est prè-incubé pendant 15 min à 37°C.

La réaction enzymatique est déclenché par l'ajout d'un volume 40µl du substrat (xanthine de 0,1g/l), le milieu est incubé à 37°C pendant 30 min. Après l'incubation, on ajoute 160µl du réactif de dosage de l'acide urique, dont le volume final du milieu réactionnel est égale à 260µl, le mélange est incubé pendant 10 min à 37°C, la lecture de l'absorbance est effectuée à 490 nm en utilisant le lecteur de microplaque .

Sachant que :

- Le blanc du test d'inhibition est dépourvu du substrat.
- Le contrôl de la réaction est dépourvu de l'inhibiteur.
- Le blanc de la plaque est dépourvu du substrat et de l'inhibiteur.

Toutes les expériences ont été répétées plusieurs fois pour la fiabilité des résultats obtenus (le test d'inhibition a été effectué avec 10 essais).

Les valeurs de l'IC50 (la concentration inhibitrice nécessaire pour inhiber l'activité enzymatique à la moitié 50%) ont été déterminées à partir de la représentation graphique $I \% = f(c)$, I % est calculé par la relation suivante :

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

Tel que :

I % : le taux d'inhibition .

$A_{\text{contrôl}}$: l'absorbance du contrôl (en absence de l'inhibiteur).

$A_{\text{médicament}}$: l'absorbance du médicament (en présence de l'inhibiteur).

4. Docking moléculaire :

Les structures 3D des médicaments : l'indométacine, le naproxène sodique, l'ibuprofène, le célécoxib et le diclofénac de sodium ont été obtenus à partir de la base de données PubChem compound, ils ont été assemblés avec le logiciel Discovery Studio v4. La structure 3D de la xanthine oxydase du lait humain (PDB ID: 2CKJ) 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 docking, 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. Nous avons amarré les médicaments testés dans la xanthine oxydase humaine pour étudier les interactions possibles au sein du site actif (**Benarous et al., 2018**).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. 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 32ml (obtenu à partir d'un 445ml du lait humain). Donc le rendement d'extraction est égale à 7,19% .

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

La XO est responsable à la formation d'acide urique donc de l'augmentation de ce dernier dans le sang (Adjadj, 2009). Par conséquent cette enzyme est la cible des médicaments contre la goutte et l'hyperuricémie (Nishino et al., 2008). Alors le but principal de ce travail est d'étudier ces anti-inflammatoires connus dans le traitement de l'inflammation goutteuse, comme des inhibiteurs contre la XO pour traiter la goutte.

Les résultats d'inhibition de la XO par les différents médicaments ont été résumés dans le tableau 4, 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 représentés dans la figure 13.

Tableau 4. Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs.

Inhibiteurs	IC50 (µg/ml)
Diclofénac de sodium	1,43±0,62
Naproxène sodique	2,19±0,29
Indométacine	0,29±0,13
Ibuprofène	2,92±0,86
Célécoxib	1,28±0,49

Les résultats obtenus montrent que toutes les molécules que nous avons testées ont un pouvoir inhibiteur important contre l'activité enzymatique de la xanthine oxydase. Les valeurs des IC50 varient selon la structure chimique des inhibiteurs et leurs constitution en groupements fonctionnels, ces valeurs varient entre 0,29 µg/ml (pour l'indométacine) à 2.92µg/ml (pour l'ibuprofène).

Dans le but de traiter la maladie de la goutte, beaucoup des études scientifiques ont été réalisées pour évaluer les effets antihyperurémie et anti-goutte, des molécules pures et des extraits des plantes médicinales sur l'activité de la xanthine oxydase. A fin de trouver un nouveau médicament que ce soit naturel ou synthétique contre ces maladies avec moins ou sans effets secondaires. Dans ce travail, nous voulons comparer nos résultats avec ces études antérieures.

Une étude qui compare entre l'inhibition de l'activité de la XO humaine et bovine par des différentes molécules pures, dont les pourcentages d'inhibition de cette enzyme sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Les pourcentages d'inhibition de la XO humaine et bovine par des différentes molécules pures (Sanders *et al.*, 1997).

Inhibiteur	Inhibition de l'activité de la XO (%)	
	Humaine	Bovine
Allopurinol (5 μ M=0,68 μ g/ml)	88.7	92.9
Oxypurinol (5 μ M=0,76 μ g/ml)	87.5	93.0
Amflutizole (1 μ M=0,28 μ g/ml)	96.8	88.7
Diphenyleneiodonium (1 μ M=0,31 μ g/ml)	90.4	93.9

Alors, à l'aide de ce tableau, nous pouvons déduire les valeurs des IC50 approximatives des différents inhibiteurs de la XO humaine. Le tableau 6 représente ces valeurs.

Tableau 6. Les valeurs des IC50 des inhibiteurs de la XO humaine.

Inhibiteur	IC50 (μ g/ml)
Allopurinol	0,38
Oxypurinol	0,43
Amflutizole	0,14
Diphenyleneiodonium	0,17

L'allopurinol est le médicament le plus utilisé contre la goutte, il présente une valeur d'IC50 contre la XO humaine égale à 0,38 μ g/ml. Si nous comparons nos inhibiteurs étudiés avec cette valeur, nous pouvons dire que l'indométacine (0,29 μ g/ml) est efficace que ce médicament, mais l'allopurinol est 4 à 9 fois efficace que nos autres inhibiteurs.

Concernant l'oxypurinol (0,43 μ g/ml), il est moins efficace que l'indométacine, mais il est plus efficace que nos autres inhibiteurs.

Pour l'amflutizole (0,14 μ g/ml) et le diphenyleneiodonium (0,17 μ g/ml) sont les plus efficaces que nos inhibiteurs étudiés.

Cette comparaison reste relative, dont l'objectif est de connaître l'efficacité de nos inhibiteurs par rapport aux inhibiteurs de référence de la XO. Sachant qu'on a pas trouvé des valeurs des IC50 d'inhibition de cette enzyme humaine avec notre méthode de détection d'inhibition, d'où l'originalité de ce travail.

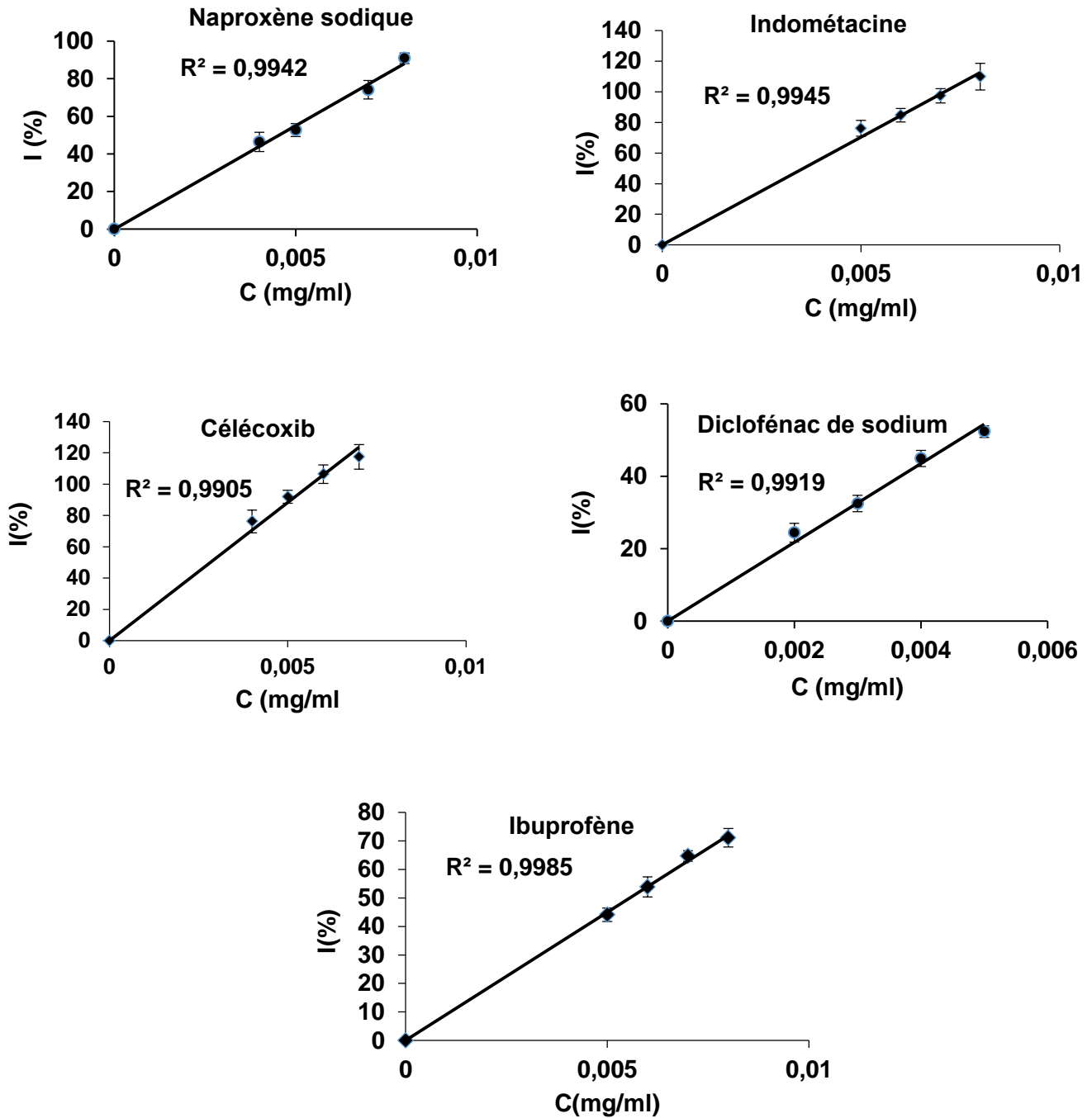


Figure 13. Représentations graphiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la XO par les anti-inflammatoires utilisés.

3. Docking moléculaire

Afin de définir la nature des interactions entre inhibiteur-enzyme, nous avons réalisé des expériences sur le docking des médicaments étudiés dans le site actif de l'enzyme (2CKJ) avec le programme AutoDock Vina (**Benarous et al., 2018**). Nous avons sélectionné la meilleure pose d'amarrage pour chaque inhibiteur, lié au nombre de répétitions et du type d'interaction existant dans 50 solutions (**Serseg et Benarous, 2018**).

A travers cette étude, nous détaillerons le type d'interactions pour les médicaments inhibiteurs: Indométacine, Naproxène sodique, Ibuprofène, Célécoxib, Diclofénac de sodium et l'allopurinol (Figure 14,15,16).

Les résultats de docking (tableau 7) liés au nombre de solutions obtenues montrent que les cinq médicaments ont une bonne activité d'inhibition de la XO, ce qui confirme les résultats expérimentaux.

Indométacine ($C_{19}H_{16}ClNO_4$, 357,79g/mol; 2-[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl] acide acétique, dont sa structure est représentée dans la figure 9, 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 Phe915, Ala1080, Ala1079, Met1039 et Phe799. Ces groupes interagissent avec les interactions hydrophobes face à alkyle. Nous avons enregistré une liaison hydrogène, située entre l'atome d'oxygène de l'indométacine avec l'atome d'hydrogène de Ser1083 d'une distance de $3,02\text{\AA}$. La conformation présentée est la plus répétée avec un taux de 98%.

Naproxène sodique ($C_{14}H_{13}NaO_3$, 252,245g/mol; sodium;(2S)-2-(6-methoxy-naphthalen-2-yl) propanoate, est composé de groupes naphthalène et carboxyl. Le mode de fixation adopté par cette molécule permet au groupe naphthalène de s'installer dans une cavité étendue de résidus d'acides aminés hydrophobes représentés par Phe915, Phe912, Gly800, Gly914, Met1039. Ces groupes interagissent avec les interactions hydrophobes face à alkyle. Une liaison hydrogène a été enregistré entre l'atome d'hydrogène de groupement carboxyle du naproxène avec l'atome d'oxygène de Glu1262 avec une valeur de distance est égale à $2,00\text{\AA}$. Nous avons sauvegardé une liaison de type π -sulfure entre le cycle aromatique de l'inhibiteur et le Met1039. La conformation présentée est d'un taux de répétition de 100%.

Ibuprofène ($C_{13}H_{18}O_2$, 206,285g/mol; 2-[4-(2-methylpropyl) phenyl] acide propanoïque, est composé d'un cycle aromatique et un groupement carboxyle, ce qui lui permet de former des liaisons hydrogènes avec les acides aminés du site actif. Nous avons enregistré deux liaisons

hydrogènes, la première est située entre l'atome d'oxygène du groupe carboxyl de l'ibuprofène avec l'atome d'hydrogène de Gln1195. Alors que la seconde est entre l'atome d'hydrogène du groupe carboxyle de l'ibuprofène et l'atome d'oxygène de Gly1040, dont les distances sont 3,06 et 2,13 Å[°], respectivement. La conformation présentée est la plus répétée avec un taux de 54%.

Célécoxib (C₁₇H₁₄F₃N₃O₂S, 381,373g/mol; 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl] benzène sulfonamide, est composé de deux cycles aromatiques et un groupe imidazole, ce qui lui permet de former des interactions avec les acides aminés du site actif. Le célécoxib a présenté une distance interatomique de 3,00Å[°] entre l'atome de fluorine de l'inhibiteur et l'atome d'hydrogène de Gly1261. De plus, le célécoxib forme une interaction hydrophobe de type π - π T-shaped, π -sigma avec Phe799, π -alkyle et π -sulfure avec Met1039. La conformation présentée est la plus répétée avec un taux de 52%.

Diclofénac de sodium (C₁₄H₁₀Cl₂NNaO₂, 318,129g/mol; sodium;2-[2-(2,6-dichloroanilino) phenyl] acétate, est composé de deux cycles aromatiques et un groupement carboxyle, le mode de fixation adopté par cette molécule permet aux cycles aromatiques et le groupement carboxyle de former des interactions hydrophobes avec Met1039, Phe799 et Gly1261. Des liaisons hydrogènes ont été enregistrées entre l'atome d'hydrogène de NH de l'inhibiteur et l'atome de carbone de Gln1195, et entre l'atome d'hydrogène de OH de l'inhibiteur et l'atome de d'oxygène de Gln1195, dont les distances sont 2,51 et 2,24Å[°], respectivement. Nous observons une interaction hydrophobe de type amide- π stacked avec Gly1261, π -alkyl avec Arg913 et Met1039, π - π stacked avec Phe799, π -sulfure avec Cys150. La conformation présentée à un taux de répétition de 100%.

Allopurinol (C₅H₄N₄O, 136,114g/mol; 1,5dihydropyrazolo [3,4-d] pyrimidin-4-one), est composé de deux groupes chimiques : pyrazol et pyrimidine, ce qui lui permet de former des interactions avec les acides aminés du site actif. Des liaisons hydrogènes ont été enregistrées entre l'atome d'hydrogène de l'inhibiteur et l'atome d'oxygène de Ser1081, et entre l'atome d'hydrogène de l'inhibiteur et l'atome d'oxygène d'Ala1079, et entre l'atome d'hydrogène de l'inhibiteur et l'atome d'oxygène de Glu1262, dont les distances sont 2,78, 2,55 et 2,96Å[°], respectivement. De plus l'allopurinol forme une interaction hydrophobe de type π -alkyle avec Ala1080 et Arg913. Nous observons une interaction hydrophobe de type π -anion avec Glu1262. La conformation présentée à un taux de répétition de 100%.

L'allopurinol présente trois liaisons d'hydrogène par contre les cinq autres inhibiteurs présentent une à deux liaisons d'hydrogène.

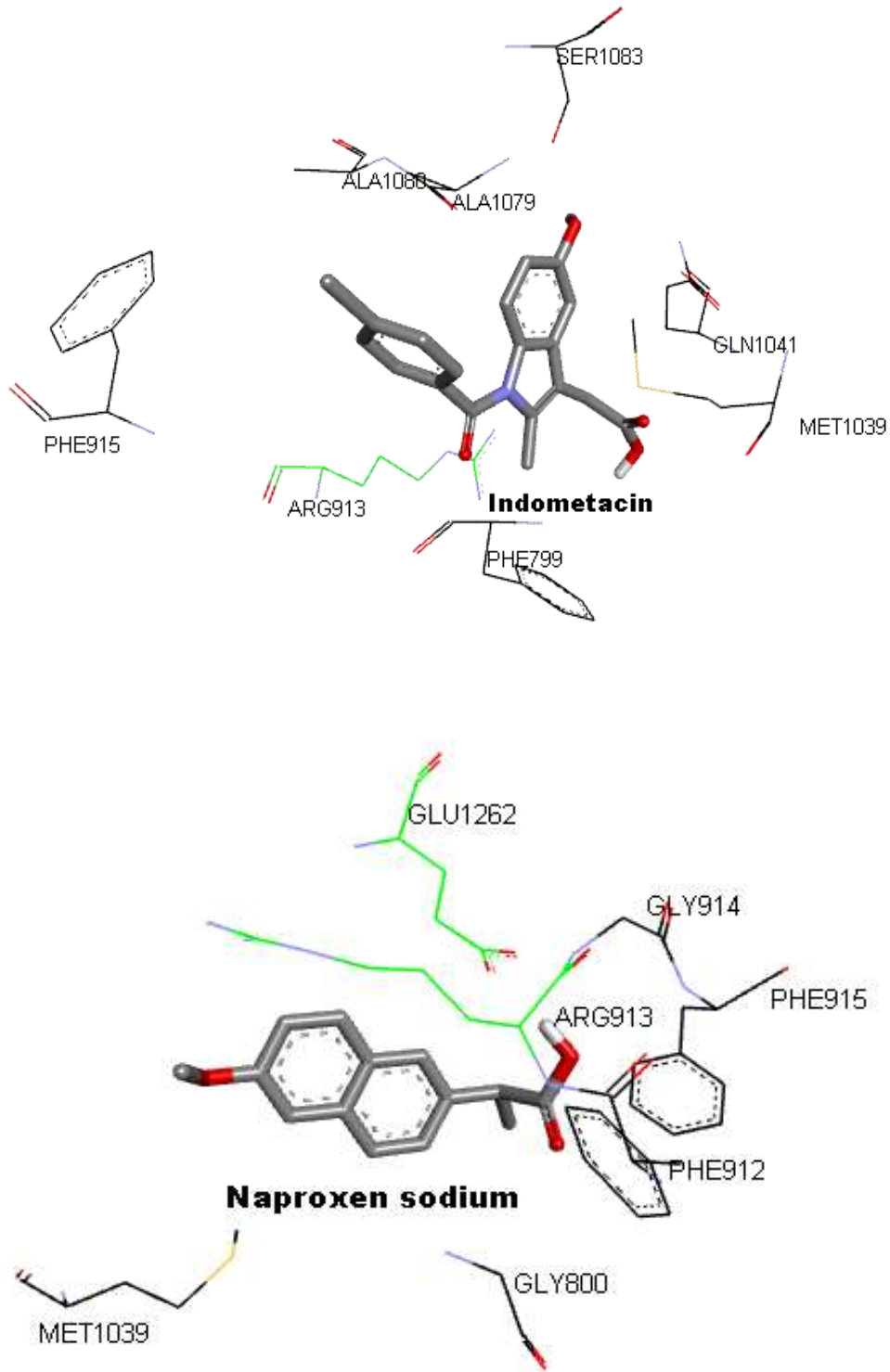


Figure 14. Les meilleures poses de docking pour des médicaments inhibiteurs (Indométacine, Naproxène sodique) dans la XO. Les acides aminés catalytiques sont représentés en vert.

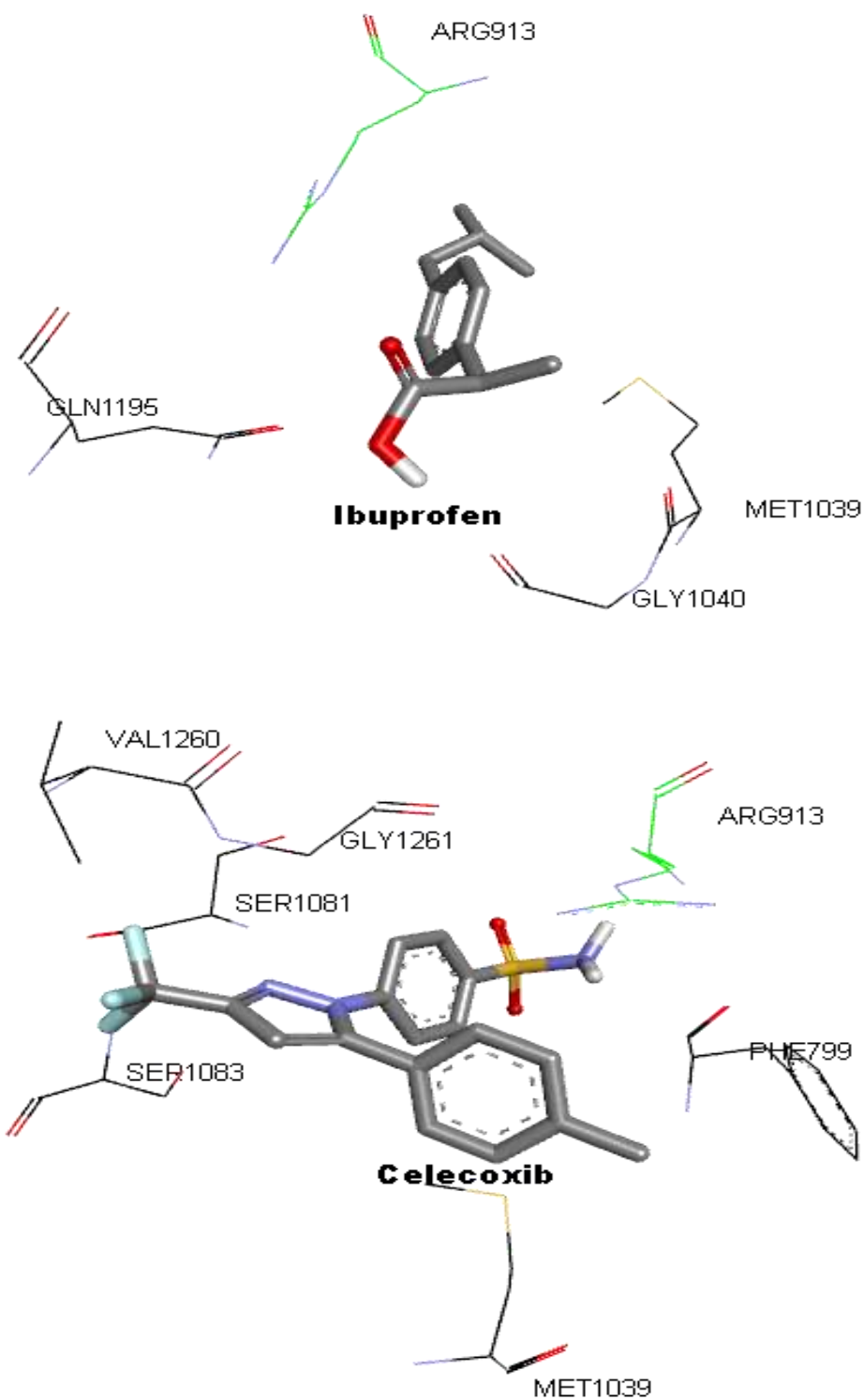


Figure 15. Les meilleures poses de docking pour des médicaments inhibiteurs (Ibuprofène, Célécoxib) dans la XO. Les acides aminés catalytiques sont représentés en vert.

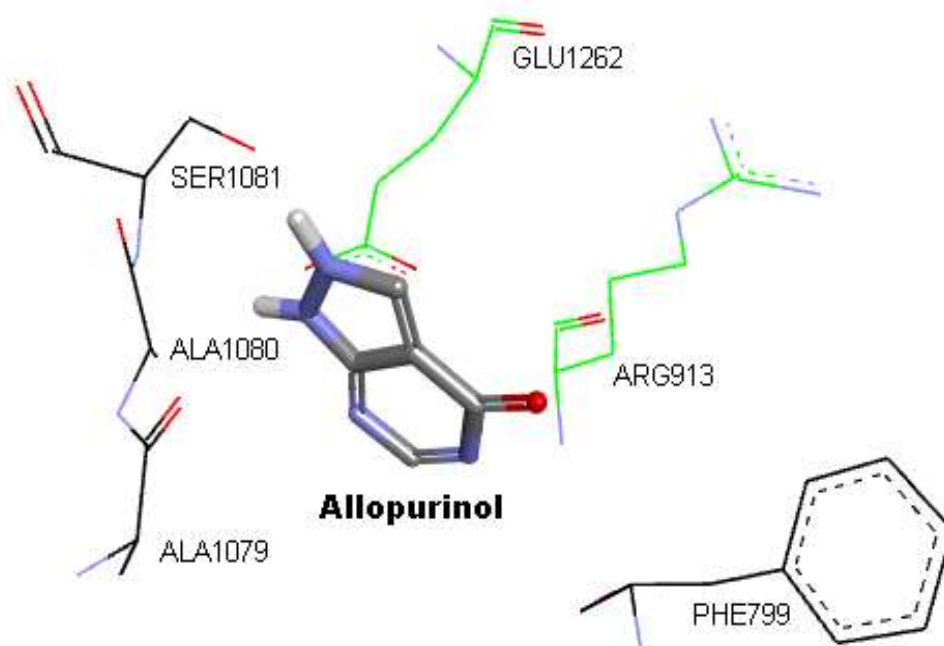
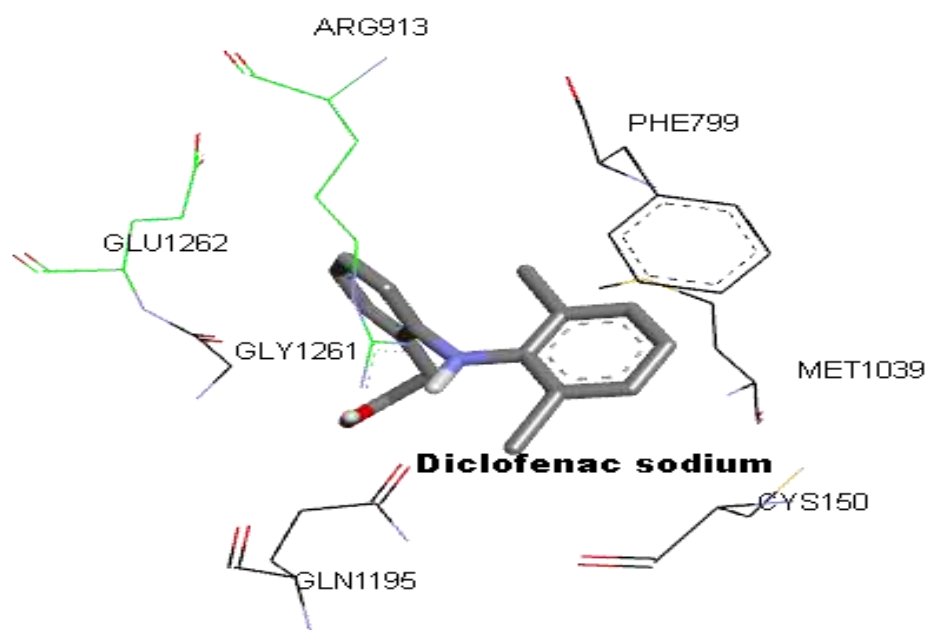


Figure 16. Les meilleures poses de docking pour les médicaments inhibiteurs (Diclofénac de sodium, Allopurinol) dans la XO. Les acides aminés catalytiques sont représentés en vert.

Tableau 7. Les résultats de l'amarrage moléculaire.

Médicament	Taux de répétition (%)	Les acides Aminés impliqués	Type d'interactions	Distance des liaisons hydrogènes (Å°)
Celecoxib	52	Arg913 , Phe799, Ser1081, Gly1261, Met1039, Val1260, Ser1083	Carbon, Fluorine, Conventional fluorine, Pi-Pi-T-shaped, Pi-sigma, Pi-alkyl, alkyl-alkyl, Pi-sulfur.	3,00
Indometacin	98	Arg913 , Phe915, Ala1080, Ala1079, Ser1083, Gln1041, Met1039, Phe799	Pi-alkyl, Carbon, Alkyl-Alkyl.	3,02
Ibuprofen	54	Arg913 , Met1039, Gly1040, Gln1195	Pi-cation, Pi-Alkyl, Alkyl-Alkyl.	3,06 2,13
Naproxen sodium	100	Phe915, Phe912, Gly800, Gly914, Glu1262 , Arg913 , Met1039.	Pi-sulfur, Pi-Alkyl, Carbon.	2,00
Diclofenac sodium	100	Met1039, Phe799, Arg913 , Gln1195, Glu1262 , Gly1261, Cys150.	Pi-Alkyl, Amide-Pi-Stacked, Pi- Pi-Stacked, Pi-sulfur, Alkyl-Alkyl.	2,51 2,24
Allopurinol	100	Glu1262 , Arg913 , Phe799, Ser1081, Ala1080, Ala1079	Carbon, Pi-Alkyl, Pi-anion,	2.55 2.78 2.96

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La goutte est l'une des arthropathies inflammatoires les plus fréquentes, liée au métabolisme de l'acide urique, causé par l'accumulation de cristaux d'urate de sodium dans les articulations. Sa fréquence augmente dans le monde entier, touchant entre 0,1 et 10% de la population mondiale. C'est une maladie curable, mais qui n'est traitée de façon optimale que dans 50% des cas. Elle est la conséquence d'une hyperuricémie chronique qui devient symptomatique par précipitation au niveau articulaire. Seuls environ 10 % des patients atteints d'hyperuricémie développent une goutte. Toutefois, la durée de l'hyperuricémie est associée à une symptomatologie plus marquée.

Notre but est de traiter cette maladie, via l'inhibition de la XO par nos médicaments anti-inflammatoires connus par leurs administration chez les goutteux. Nous voulons étudier leurs effets inhibiteurs contre la XO pour s'assurer de leurs pouvoirs contre l'enzyme. Aucune étude préalable n'a été trouvée sur ces anti-inflammatoires comme des inhibiteurs de cette enzyme, d'où vient l'originalité de ce travail.

Les résultats expérimentaux obtenus à travers ces tests montrent que tous les médicaments possèdent une activité inhibitrice importante ce qui est affirmé par les valeurs des IC50 dont les valeurs varient entre 0,29 et 2,92 $\mu\text{g/ml}$.

Les résultats de notre amarrage sont en corrélation avec l'étude expérimentale, qui confirme que l'amarrage moléculaire est un outil puissant pour la découverte de nouveaux médicaments à partir de différentes bases de données. Il permet de prédire la structure du complexe récepteur-ligand, et de prédire le potentiel de ligand pour inhiber les enzymes, et les types d'inhibition à partir de l'étude des interactions formées entre les enzymes et les ligands.

À travers cette étude, nous proposons comme des perspectives :

- D'utiliser ces médicaments comme médicaments anti-gouttes.
- De chercher et tester autres molécules qui peuvent inhiber la XO.

Pour les goutteux, nous proposons ces conseils :

- Réduire lentement un surpoids éventuel (max. 1/2 kg par semaine).
- Pas de jeûne.
- Eviter les boissons alcoolisées (surtout la bière et les spiritueux) mais aussi la bière sans alcool.

- Limiter la consommation de viande, abats, poisson et fruits de mer.
- Inscire des journées végétariennes dans son plan de menus.
- Lors d'une crise aiguë de goutte, boire le plus d'eau possible et consulter son médecin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adjadj, M.(2009).** propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva* (L.) Schreber. Université Mentouri Constantine, p4-14.
2. **Aoudéche, K., Haddadi, I.(2018).** Étude de l'effet inhibiteur de quelques extraits et molécules pures sur la xanthine oxydase: traitement de la goutte. Université Amar Telidji Laghouat, p12.
3. **Benarous, K., Benguechoua, M., Ghibeche, A.(2018).** Antiallergy Drugs as Potent Inhibitors of Lipase with Structure-Activity Relationships and Molecular Docking. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2018, 17, 1-7
4. **Boileau, J-M.(2007).** Le traitement de la goutte. Les pages bleues V 54 n° 11 Québec Pharmacie. P27-32.
5. **Calop, J., Limat, S., Fernandez, Ch., Aulagner, G.(2012).** Pharmacie clinique et thérapeutique. Elsevier Masson, Paris, p304.
6. **Choquette, D., Hazeltine, M.(2012).** La goutte : vieille maladie, nouveaux défis. M.D., FRCP(c), FACP Centre de rhumatologie de Laval. p2-4.
7. **Grandin, M.(2013).** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale. Université angers, p26-31.
8. **Hamlaoui, I. (2014).** Etude théorique des réactions enzymatiques : Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones. Université Constantine1, p7-20.
9. **Leclerc, V. (2016).** Comprendre la goutte.
10. **Messili, K., Oulefki, N.(2013).** Activités anti-hyperuricémique et antixanthine oxydoréductase *in vivo* de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Université Abderrahmane Mira-Bejaia, p10-17.
11. **Nishino, T., Okamoto, K., Bryan T. Eger2, Emil, F., Pai.(2008)** Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *the FEBS journal*. p 3279.
12. **Nuhrich, A.(2015).** Anti-inflammatoires non stéroïdiens. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/fr/>. p45-48.
13. **Pessina, P-A (2017).** Prise en charge de la goutte en 2017. <http://medecinsdefamillegeneve.ch>

14. **Saderne, S. (2013).** L'acide urique: une molécule physiologique pouvant être pathologique. Université de Limoges, P82-83.
15. **Saidi, M., Zerrouki, A.(2013).** Activité anti-hyperuricémique et anti xanthine oxydoréductase in vivo de l'extrait brut éthanolique de feuilles de Clematis flammula. Université Abderrahmane Mira–Bejaia, p8-10 ; 31-32.
16. **Sanders, S A., Eisenthal, R., Harrison, R.(1997).** NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase Generation of superoxide anion. the FEBS journal. p544.
17. **Serseg, T., Benarous, K.(2018).** The Inhibitory Effect of Some Drugs on *Candida rugosa* Lipase and Human Pancreatic Lipase: *In vitro* and *In silico* Studies. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets, 2018, 18, 000-000. p2.
18. **Tietz N.W, Burtis.C.A, Ashwood.E.R ,Saunders.W.B.** Test book of clinical chemistry, 3rd Ed (1999) p .1245-1250.
19. **Xu, P.,Thomas, P.,Huecksteadt., John, R., Hoidal.(1994).** Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase. Biochemical and biophysical research communications vol.199.No2. P998.
20. **<https://santecheznous.com>, consulté le 17/03/2019.**
21. **<https://pharmacomedicale.org>, consulté le 13/03/2019.**
22. **http://mammoth.bcm.tmc.edu/report_maker/reports/pdbreports/2ckj_report.pdf.**

Résumé

La xanthine oxydase est une enzyme indispensable au métabolisme des purines, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, son hyperactivité entraîne le dépôt de cristaux d'urate dans les articulations et les reins, provoquant l'arthrite et néphrolithiase, c'est la maladie de la goutte. Le but principal de cette étude est de traiter cette maladie via le test de la capacité d'inhibition de l'activité enzymatique de la xanthine oxydase du lait humain par des molécules pures et de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition aussi de connaître la nature et les types d'interactions entre inhibiteur-enzyme en utilisant le docking moléculaire avec le programme AutoDock Vina. Les résultats obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 varient de 0,29 à 2,92 µg/ml contre la xanthine oxydase, ce qui est confirmé par les résultats de l'amarrage moléculaire. Nous confirmons que ces molécules peuvent être employées dans le traitement de la goutte.

Mots clés : xanthine oxydase humaine, goutte, inhibition, anti-inflammatoires, docking moléculaire.

Abstract

Xanthine oxidase is an essential enzyme for the metabolism of purines, which catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid, its hyperactivity causes the deposition of urate crystals in the joints and kidneys, causing arthritis and nephrolithiasis. It is the disease of gout. The main aim of this study is to treat this disease by testing the ability to inhibit the enzymatic activity of human milk xanthine oxidase by pure molecules and to better understand the mechanism of inhibition also to know the nature and the types of interactions between inhibitor-enzyme using molecular docking with the AutoDock Vina program. The obtained results show that these molecules have an important inhibitory power with IC50 values ranging from 0.29 to 2.92 µg/ml against xanthine oxidase, which is confirmed by the results of molecular docking. We confirm that these molecules could be used for gout treatment.

Key words: human xanthine oxidase, gout, inhibition, anti-inflammatory, molecular docking.

ملخص

أوكسيداز الزانثين هو إنزيم ضروري لعملية الايض للبيورينات ، والذي يحفز أكسدة هيبوكزانثين إلى كزانثين وكزانثين إلى حمض اليوريك، كثرة نشاطه تؤدي إلى ترسب بلورات اليورات في المفاصل والكلى ، مما يسبب التهاب المفاصل وتشكل الحصى في الكلى، إنه مرض النقرس. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو علاج هذا المرض عن طريق اختبار القدرة المثبطة للنشاط الأنزيمي لأوكسيداز الزانثين المستخرج من حليب البشر بواسطة الادوية المضادة للالتهاب وفهم آلية التثبيط بشكل أفضل وايضا للتعرف على طبيعة وأنواع التفاعلات بين إنزيم- مثبط باستخدام الارساء الجزيئي مع برنامج اوتودوك فينا وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه الجزيئات لديها قوة تثبيط هامة مع قيم التركيز المثبط بنسبة 50% تتراوح بين 0,29 الى 2,92 مكغ/مل ضد أوكسيداز الزانثين، وهو ما تؤكدته نتائج الارساء الجزيئي. نأكد ان هذه الجزيئات يمكن استعمالها لاجل معالجة النقرس.

الكلمات المفتاحية: أوكسيداز الزانثين البشري، النقرس، التثبيط، الادوية المضادة للالتهاب ، الارساء الجزيئي.