

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 bovine

Présenté par : RABHI Faiza et CHAIB Kheira

Membre du jury :

Président : M^{elle} NIA Samira (MCB)

Examinatrice : M^{me} GACEMI Safia (MAA)

Encadreur : M^{me} BENAROUS Khedidja (MCA)

Co-encadreur : M^{elle} Bou-Salah Leila

Soutenue publiquement le : 22 / 05 / 2019

DÉDICACES

Au nom du Dieu tout puissant

Je dédie ce travail

À mes très chers et précieux parents qui m'ont toujours soutenue, et à l'intérêt qu'ils ont toujours porté pour mes études, que Dieu me les protège.

À mes très chers frères

À mes adorables et très chères sœurs

À ma très cher sœur chahra

À mes très chers à mon cœur Fatima et Fadila

À ma grande famille petits et grands.

À toutes mes amies : Hadjer, Iman, Halima , Houda, fatna ,meriem,Fatiha, Hadjer ,khoula

Et à mon cher binôme, ma sœur de cœur kheira chaib avec laquelle j'ai partagé ce travail.

À toutes les personnes que j'aime et qui m'aime

À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

À tous mes collègues de la promotion de Biochimie

Appliquée 2019

FAIZA

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : SADAoui Friha

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. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A MON TRÈS CHÈR PÈRE : Dahman

Disparu trop tôt. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A mes frères et sœurs Mouhamed, Djamal, Abderrahmane, Fatoum et Fatiha

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.

A mes amis Ben saidane Hadjer, Bouchmel Halima, Chine Iman ...A tous mes amis de la M2 biochimie

ma seconde famille, merci d'exister, mon monde sans vous sera sans goût.

A la sœur de cœur mon binôme RABHI Faiza

je ne trouve pas les mots pour te remercier de l'amour que tu m'as témoignés au cours des années, et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous aime

A toute personne qui me connaît.

je vous dis merci

KHEIRA

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce travail à terme. Au terme de la réalisation de ce mémoire, nous tenons à présenter nos remerciements les plus sincères à notre promotrice Docteur Khedidja BENAROUS, pour avoir dirigé ce travail, pour la confiance, pour ces précieux conseils, son orientation, ses encouragements, sa disponibilité, son aide et sa patience avec nous.

Merci

Nous voulons également remercier et exprimer notre profond respect à tous les membres de jury qui ont bien voulu nous faire l'honneur de juger la qualité de ce travail et de formuler leurs remarques constructives. Merci

Nous exprimons nos remerciements à notre Co-encadreur M^{elle} Leila BOU-SALAH pour les conseils qu'elle nous a accordé tout au long de ce travail. Nous n'oublierons jamais la disponibilité, la gentillesse, les encouragements. Merci

Un grand merci à toute l'équipe de laboratoire de sérologie, nous remercions Sincèrement Monsieur Abederrahmane LINANI pour toutes ses aides inestimables et leur soutien. Merci

Nous témoignons notre reconnaissance à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

UN GRAND MERCI

RÉSUMÉ

L'objectif principal de cette étude est de tester et évaluer l'effet inhibiteur des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens sur l'activité enzymatique de la xanthine oxydase du lait bovin, qui est une enzyme importante catalysant l'hydroxylation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique qui est excrété par les reins. Une production excessive et / ou une élimination inadéquate de l'acide urique entraîne une hyperuricémie. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition ainsi de savoir la nature des interactions entre ces inhibiteurs et la xanthine oxydase, nous avons utilisé le docking moléculaire avec le logiciel Autodock Vina. Les résultats *in vitro* obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 variant entre 0,96 µg/ml et 9,46 µg/ml contre la xanthine oxydase, ce qui est confirmé par les résultats du docking moléculaire. Ces médicaments nécessitent des études *in vivo* afin d'atteindre d'autre traitement plus efficace et avec moins d'effets indésirables contre la goutte et peuvent être utilisés pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XO.

Mots clés : Xanthine oxydase du lait bovin, anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibition, docking moléculaire, goutte, Autodock Vina.

Liste des abréviations

4-AF : 4-aminophenazone.

AA: acide aminé

ADT : Autodock Tools.

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens.

AU : Acide Urique

BMXO : Bovine Milk Xanthine Oxidase

COX : Cyclo-Oxygénase

DCHBSA : (3 ,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonic acid .

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Réduit

H₂O₂ : Peroxyde D'hydrogène

IC₅₀ : La Constante Inhibitrice A50%.

Mo : Molybdène

NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit

NO[°] : Radical Nitroxyle

NO²⁻ : Nitrite

ONOO⁻ : Peroxynitrite

NOS : NO Synthase

PDB : Protein Data Bank

POD : Peroxydase

TR % : Pourcentage du taux de répétitions

UMS : Urate Monosodique

XDH : Xanthine déshydrogénase

XO : Xanthine oxydase

XOI : Xanthine oxidase inhibitors

XOR : Xanthine oxydoréductase.

Liste des figures

Figure 1. Le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain.	5
Figure 2. Cristaux d'urate monosodique dans du liquide synovial (https://educalingo.com consulté le 16-06-2019).	8
Figure 3 . A) Goutte aiguë du gros orteil B) Tophus au niveau de l'hélix de l'oreille.....	9
Figure 4 .Structure de <i>la colchicine</i> (ChemDraw)	10
Figure 5. Photo des fleurs du colchique (https://123rf.com consulté le 08-05-2019)	11
Figure 6. Structure de quelques médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (ChemDraw) ..	13
Figure 7. Inhibition de la xanthine oxydase par l'allopurinol afin d'empêcher la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et / ou acide urique. (Danijela et al., 2015).	14
Figure 8. Structure du Febuxostat(ChemDraw).....	15
Figure 9. Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase (Adjadj, 2009).	16
Figure 10. Structure cristallisée de la xanthine oxydase bovine (3nrz) montrant le FAD (A), le cluster fer-soufre(B), le cofacteur à molybdène avec le molybdène (C) (photo réalisé avec le logiciel PyMol)	17
Figure 11 .Schéma de l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au niveau du site Mo et la réduction de l'O ₂ au niveau du site FAD (Adjadj, 2009).....	20
Figure 12 Rôle de la XO dans la génération du radical nitroxyde (NO [•]) et du peroxy-nitrite (ONOO ⁻) (Adjadj, 2009).	21
Figure 13. Mécanismes d'action de la XO (Adjadj, 2009).....	22
Figure 14. Photo représente les médicaments étudiés dans notre travail.	25
Figure 15. Procédure de l'extraction de la xanthine oxydase.	26
Figure 16. Schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes.....	28
Figure 17. Représentations graphiques de l'inhibition de la réaction catalysée par la XO.	33
Figure 18. Représentation de la meilleure pose de docking de l'Ibuprofène sur la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif	39
Figure 19. Représentation de la meilleure pose de docking du Naproxène sodique sur la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif et l'acide aminée catalytique Glu1261 en vert.	39
Figure 20. Représentation de la meilleure pose de docking de l'Indométacine avec la xanthine oxydase et ses acides aminés du site actif.	40
Figure 21 Représentation de la meilleure pose de docking du Célécoxib avec la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif et l'acide aminée catalytique Glu802 en vert.	40
Figure 22. Représentation de la meilleure pose de docking de le Diclofénac sodium avec la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif.	41
Figure 23. Représentation de la meilleure pose de docking de l'oxypurinol avec la xanthine oxydase (3BDJ) avec les acides aminés du site actif et les acides aminés catalytiques Arg880, Glu1261 et Glu802 en vert.	41

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste d'aliments selon leur concentration en purines (Jean et Pharm, 2007).	7
Tableau 2. Doses des cinq médicaments AINS (Jean et Pharm, 2007; Rubino, 2014).....	12
Tableau 3 .Codes PDB de l'enzyme XO bovine	18
Tableau 4. Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs.	32
Tableau 5. Les valeurs des IC50 pour la XO bovine à partir de quelques références bibliographiques.	34
Tableau 6. Les taux de répétition, les acides aminés impliqués, les types d'interactions et les distances des liaisons hydrogènes de nos médicaments.	38

Table des matières

<i>DÉDICACES</i>	II
<i>DÉDICACES</i>	III
<i>REMERCIEMENTS</i>	IV
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	1
<i>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	4
I. Goutte.....	5
II. Causes.....	6
III. Diagnostique.....	8
V. Traitement de la goutte :.....	9
VI.2.1. Mécanisme d'action de la XO.....	20
<i>MATERIELS ET METHODES</i>	24
I. Matériels.....	25
I.1 .Matériel biologique.....	25
I.2 Matériel chimique et instrumentation.....	25
II. Protocoles expérimentaux.....	26
II.1 Extraction de la xanthine oxydase du lait bovin.....	26
II.2. Test de l'activité de la xanthine oxydase (XO).....	27
II.4. Test de l'activité inhibitrice de la réaction catalysée par la xanthine oxydase.....	28
Les médicaments sont broyés puis solubilisés dans un volume approprié de tampon ou DMSO selon la structure chimique de chaque médicament.....	28
III. Docking moléculaire.....	29
<i>RESULTATS ET DISCUSSION</i>	31
I. Rendement d'extraction de la XO.....	32
II. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase.....	32
III. Docking moléculaire.....	35
<i>CONCLUSION GENERALE</i>	42
<i>ET PERSPECTIVES</i>	42
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	44

INTRODUCTION GENERALE

La goutte et l'hyperuricémie sont les troubles métaboliques courants chez l'homme, associés à un taux élevé d'acide urique dans le sang, ce qui entraîne le dépôt de cristaux d'urate dans les articulations et les reins, ce qui causé une arthrite goutteuse et une néphrolithiase de l'acide urique. Xanthine oxydase (XO) et la xanthine déshydrogénase (XDH) sont les deux formes inter convertibles du même produit génique connu sous le nom de xanthine oxydoréductase (XOR). Il catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine à la xanthine, puis à l'acide urique, dernières réactions du métabolisme des bases puriques. Le traitement contre la goutte consiste à augmenter l'excrétion d'acide urique ou à réduire la production d'acide urique.

XOI sont très utiles car ils possèdent moins d'effets secondaires que les agents uricosuriques et anti-inflammatoires. L'allopurinol est le seul XOI utilisé en clinique, qui souffre également de nombreux effets secondaires tels que le syndrome d'hypersensibilité, le syndrome de Stevens-Johnson et la toxicité rénale. Ainsi, il existe un besoin de développer des composés ayant une activité XOI qui soient exempts des effets secondaires indésirables de l'allopurinol (**Abdullahi et al. 2012**).

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 (**Jean et Pharm, 2007**).

L'objectif majeur de cette étude est de déterminer l'activité inhibitrice *in vitro* de la xanthine oxydase par de quelques médicaments anti-inflammatoires tels que (Célécoxib, Diclofénac de sodium, Ibuprofène, Indométacine et Naproxène sodique) et son mécanisme d'inhibition enzymatique afin d'atteindre d'autre traitement plus efficace et moins d'effets indésirables contre la goutte.

Le 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. 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. Les méthodes utilisées pour ces deux étapes diffèrent en fonction du programme de docking utilisé (**François, 2014**).

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires pédagogiques de département de biologie et le laboratoire de transfusion de sang (CTS) dans l'hôpital Ahmed BENADJILA de Laghouat.

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

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Goutte

La goutte est une maladie métabolique qui résulte d'une augmentation de la concentration d'acide urique dans le sang (hyperuricémie) au-delà de laquelle, il y a un risque significatif de crise de goutte. Cette hyperuricémie est définie comme une uricémie $> 420 \mu\text{mol/l}$ (70 mg/l) chez l'homme, et $> 360 \mu\text{mol/l}$ (60 mg/l) chez la femme (Askali, 2016).

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 (Figure 1) (au niveau des bourses olécraniennes) ; par contre, les épaules sont rarement atteintes. Il en résulte une douleur lancinante caractéristique avec une inflammation aux articulations atteintes. (Jean.et Pharm, 2007).

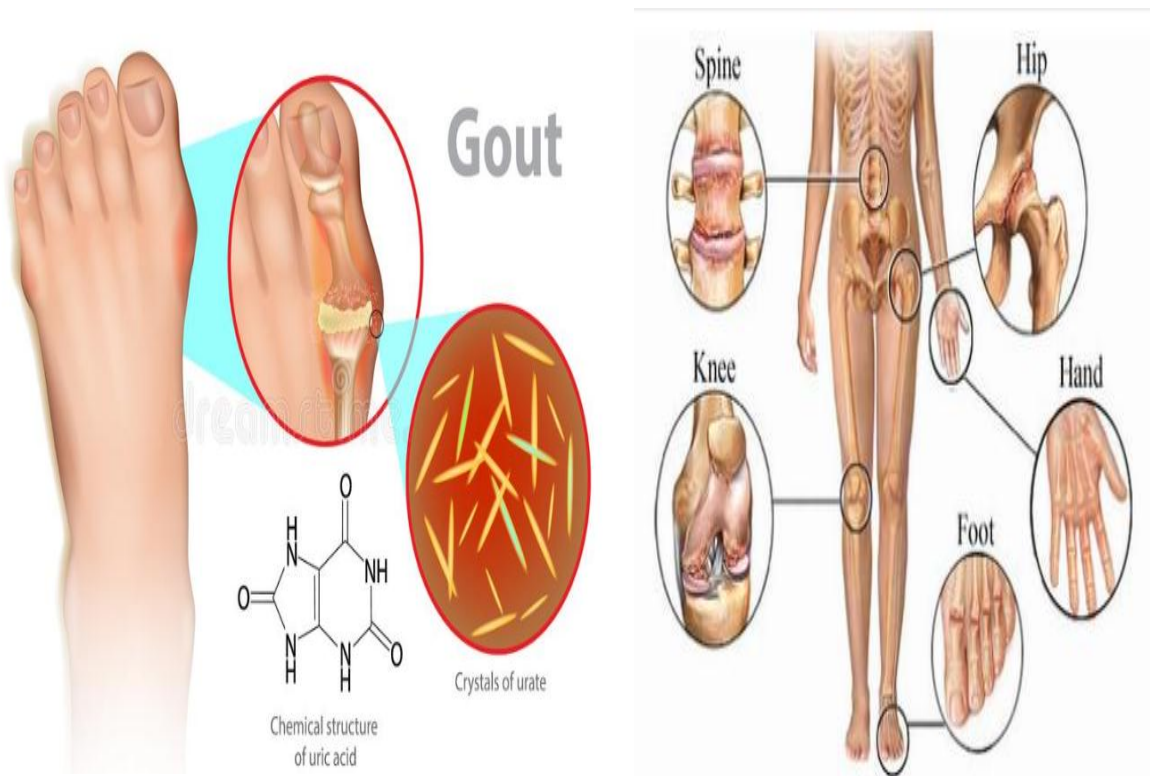


Figure 1. Le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain.

(<https://cn.dreamstime.com> , al3loom.com consulté le 09-04-2019)

II. Causes

La goutte est une maladie chronique fréquente liée au métabolisme de l'acide urique, causé par l'accumulation de cristaux d'urate de sodium (UMS) associée à une hyperuricémie chronique (**Messili et Oulefki, 2013**).

L'acide urique est produit par le foie après le catabolisme des purines endogènes ou alimentaires. Parmi les sources d'acide urique exogènes, certains aliments renferment de grandes quantités de purines, qui devront être métabolisées et qui entraîneront une production plus importante d'acide urique. Le tableau I présente une liste non exhaustive d'aliments avec différentes concentrations en purines (**Jean et Pharm, 2007; Messili et Oulefki, 2013**).

Initialement, l'AU a été considéré comme un déchet inerte qui se cristallise à des concentrations élevées pour former des calculs rénaux et provoquer l'arthrite goutteux (**Saidi et Zerrouki, 2013**).

II .1. Facteurs potentiellement associés à une augmentation du risque de goutte :

Bien que l'hyper-uricémie 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 monosodique)

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 (**Messili et Oulefki, 2013**).

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. Plus récemment, il a été montrer que la consommation de plus de deux sodas classiques ou édulcorés au fructose, ou de jus de fruits riches en fructose, augmentait le

risque de goutte, et que la consommation de café et l'apport de vitamine C diminuait ce risque, la liste d'aliments selon leur concentration en purines est représenté dans le tableau1 (Askali, 2016 ; Messili et Oulefki, 2013).

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 (Messili et Oulefki, 2013).

Masse corporelle, syndrome métabolique : (Askali, 2016)

La masse corporelle : où le risque de goutte augmente avec le poids corporel (Messili et Oulefki, 2013).

Le syndrome métabolique et l'hyperuricémie : L'hyperuricémie et la goutte sont aussi fortement associées au syndrome métabolique qui, par définition, correspond à la présence simultanée de trois facteurs parmi cinq, toutes les combinaisons étant possibles, ces facteurs sont : l'obésité, l'hypertension artérielle, l'intolérance au glucose ou le diabète, la dyslipémie avec hypertriglycéridémie, diminution du HDL et cholestérol (Askali, 2016).

Tableau 1. Liste d'aliments selon leur concentration en purines (Jean et Pharm, 2007).

Aliments riches en purines	Aliments à faible teneur en purines
anchois	pain
bière	beurre
bouillon	céréales
hareng	Fromage
viandes de cerveau, de foie	chocolat
Faisan	café
Sardines	Œufs
pétoncles	Fruits et jus de fruits
levures (suppléments) et extraits de levures	lait
Aliments à teneur modérée en purines	Nouilles
asperges	Noix
haricots	olives
lentilles	beurre d'arachides
champignons	riz
pois	Sel
Épinards	Sucreries
viandes et poissons en général	

III. Diagnostique

Le diagnostic de la goutte repose sur un ensemble de critères cliniques, biologiques et radiologiques. En effet plusieurs classifications de critères cliniques ont été établies afin d'aider au diagnostic de la goutte (**Askali, 2016**).

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 monosodique (Figure 2) intracellulaire (**Denis et Mark, 2012**).

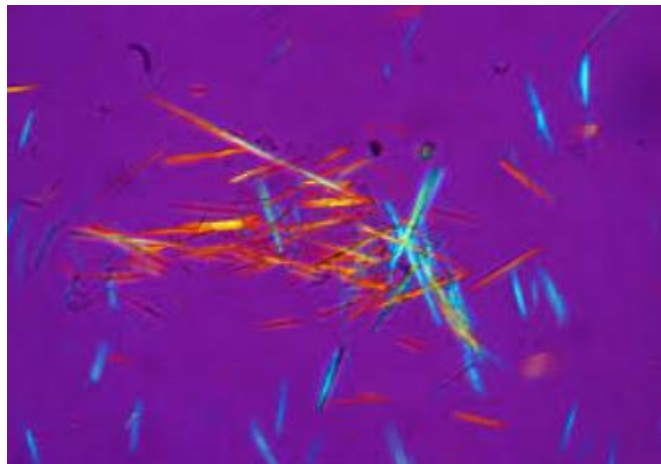


Figure 2. Cristaux d'urate monosodique dans du liquide synovial (<https://educalingo.com> consulté le 16-06-2019).

IV. 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 d'UMS 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 (Figure 3 A)
- 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) Figure 3B, articulaire et urinaire (**Messili et Oulefki., 2013**).

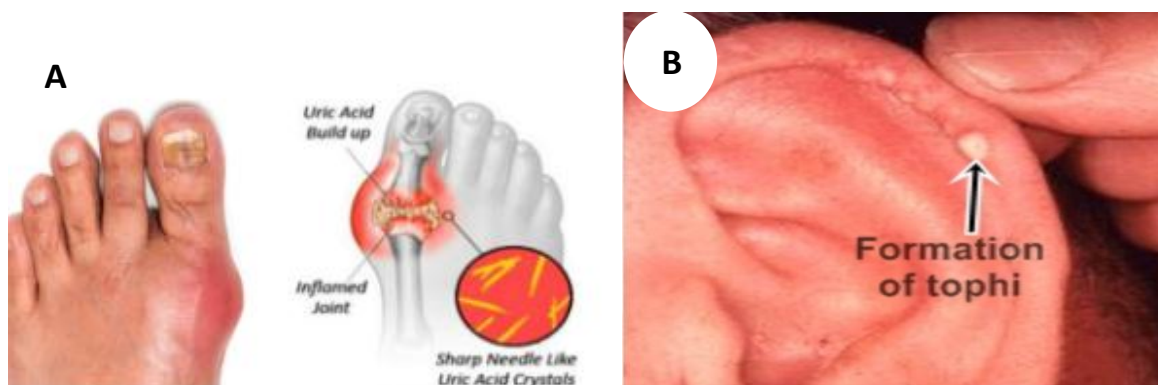


Figure 3 . A) Goutte aiguë du gros orteil B) Tophus au niveau de l'hélix de l'oreille

(www.middleeastmedicalportal.com ; <https://rheumatologistdurban.co.za> consulté le 6-04-2019).

V. Traitement de la goutte :

V.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 (**Saidi et Zerrouki, 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 par une restriction calorique en cas d'obésité où une perte de poids de plus de 10kg diminue l'uricémie d'environ $35 \mu\text{mol/l}$, mais cette perte doit être progressive, car l'amaigrissement rapide peut générer une cétose et augmenter ainsi l'uricémie II, est même conseillé de modifier les habitudes alimentaires par un arrêt définitif 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**).

V.2 Traitements médicamenteux :

Le traitement de la goutte comprend d'une part, le traitement de l'accès goutteux, d'autre part, le traitement hypo-uricémiant qui permet à présent de guérir cette maladie ou du moins de diminuer la fréquence des crises aiguës (**Richette et al., 2016**).

V.2.1 Médicaments de l'accès goutteux

V.2.1.1 Colchicine :

La colchicine, dont sa structure est représenté dans la figure 4, est un alcaloïde tricyclique isoquinoléique, extrait de plantes du genre *Colchicum* mais également d'autres plantes de la famille des *Colchicacées*, la meilleure source de Colchicine reste tout de même *Colchicum autumnal* (Figure 5) (Hervé, 2016). Elle interfère avec le recrutement et la fonction des leucocytes de neutrophiles dans l'articulation goutteuse. Il perturbe l'assemblage des microtubules dans les leucocytes neutrophiles en formant un complexe avec la tubuline dans la cellule. Les microtubules ont de nombreuses fonctions dans la cellule et l'action de la colchicine nuit à l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales, ce qui réduit leur recrutement dans l'articulation enflammée et altère également la phagocytose des cristaux si le neutrophile pénètre dans l'articulation (Derek et al., 2018).

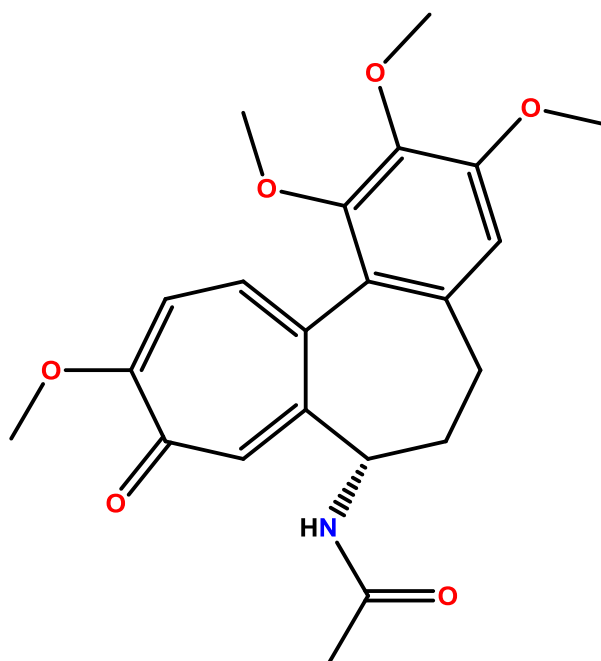


Figure 4 .Structure de la colchicine (ChemDraw)



Figure 5. Photo des fleurs du colchique (<https://123rf.com> consulté le 08-05-2019)

• Effets indésirables graves dose-dépendants

Les premiers signes d'intoxication sont des troubles digestifs, surtout diarrhée, nausées et vomissements. Ils constituent une alerte avant des troubles plus graves: des troubles hématologiques parfois mortels (agranulocytose, leucopénie, thrombopénie, anémie) et neuromyopathies réversibles à l'arrêt du traitement. Ces troubles sont favorisés par une insuffisance rénale, notamment chez les personnes âgées, ainsi que par l'association à certains médicaments (Askali, 2016).

V.2.1.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont utilisés en seconde intention. Ils agissent sur l'inflammation en soulageant et en réduisant le gonflement et la raideur articulaire. Ils n'ont, en revanche, aucune action sur les lésions articulaires. L'indométacine et le diclofénac (Figure 6), utilisés sur une courte durée (2 à 3 jours), sont les plus prescrits.

Tous les AINS peuvent être utilisés en prenant en compte les multiples risques d'interaction médicamenteuse (Askali, 2016). Par le passé et encore aujourd'hui, les cliniciens utilisent l'indométacine, le naproxène Figure 6 et l'ibuprofène Figure 6 Bien qu'elle soit efficace à de fortes doses Tableau 2. Une solution de rechange intéressante pour les patients intolérants aux AINS résiderait dans les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase-2 (COX- 2), qui provoquent moins d'effets indésirables gastro-intestinaux en raison de leur sélectivité pour la COX-2. Au Canada, il n'y a qu'une molécule de la sorte présentement sur le marché, soit le célécoxib (Figure 6) (Jean et Pharm, 2007).

- **Mécanisme d'action :**

Via un phénomène de compétition, les AINS inhibent la cyclo-oxygénase (COX) impliquée dans la formation de prostaglandines à partir d'acide arachidonique. Les AINS ont une activité anti-inflammatoire, antipyrétique et analgésique par inhibition de la synthèse de prostaglandines. En effet, ces dernières sont des médiateurs de l'inflammation : elles provoquent une vasodilatation locale et une perméabilisation des vaisseaux mais aussi une fièvre et de la douleur.

- **Effets indésirables**

Les effets indésirables digestifs sont les plus fréquents, ils sont soit d'ordres mineurs ou majeurs :

Mineurs: gastralgies, nausées, vomissements, dyspepsie.

Majeurs: à savoir Hémorragies digestives, ulcération de la muqueuse gastrique, perforations (apparaissent généralement au début de traitement) Aucun traitement ne prévient totalement les complications digestives graves chez les patients prenant des AINS

D'autres effets indésirables peuvent apparaître :

Rénale: Insuffisance rénale aigue, tous les AINS sont potentiellement susceptibles de provoquer une détérioration de la fonction rénale chez les sujets à risque

Allergiques: urticaire, prurit, crise d'asthme, syndrome de Lyell, choc anaphylactique

Neurologiques: vertiges, céphalées, troubles visuels bénins

Hématologiques: neutropénie, thrombopénie, agranulocytose (arrêt immédiat)... (Askali, 2016).

Tableau 2. Doses des cinq médicaments AINS (Jean et Pharm, 2007; Rubino, 2014)

Médicament	Doses
Indométacine	150 à 200 mg par jour pour 3 jours, puis 100 mg par jour pour 4 à 7 jours (divisés en 2 à 4 doses)
Naproxène	375 à 500 mg pour 3 jours, puis 250 à 375 mg pour 4 à 7 jours
Célécoxib	200 mg la première journée, puis 100 mg pour 6 à 10 jours
Diclofénac	150 à 200 mg par jour
Ibuprofène	2400 mg par jour

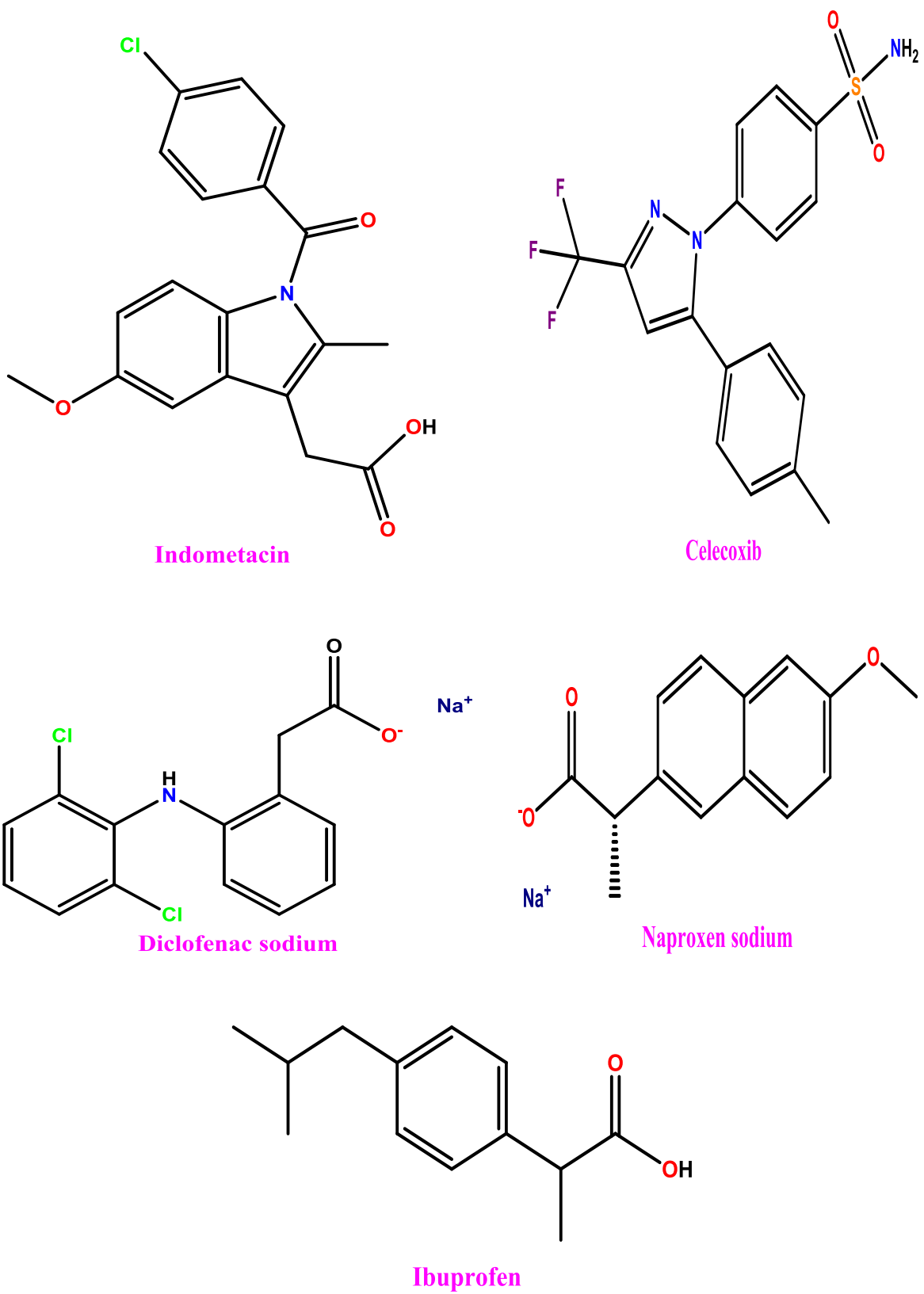


Figure 6. Structure de quelques médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (ChemDraw).

V.2.2 Médicaments de l'hyperuricémie :

V.2.2.1 L'allopurinol :

L'allopurinol (Zyloprim^{MD}), utilisé depuis les années 1960, agit en empêchant la production d'acide urique par inhibition de l'enzyme xanthine oxydase (XO) (Jean et Pharm, 2007). C'est un composé aromatique possédant un cycle purine, (4-hydroxypyrazolo-(3,4-d) pyrimidine), isomère de l'hypoxanthine. 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) Figure 7, selon la réaction suivante : (Messili et Oulefki, 2013).

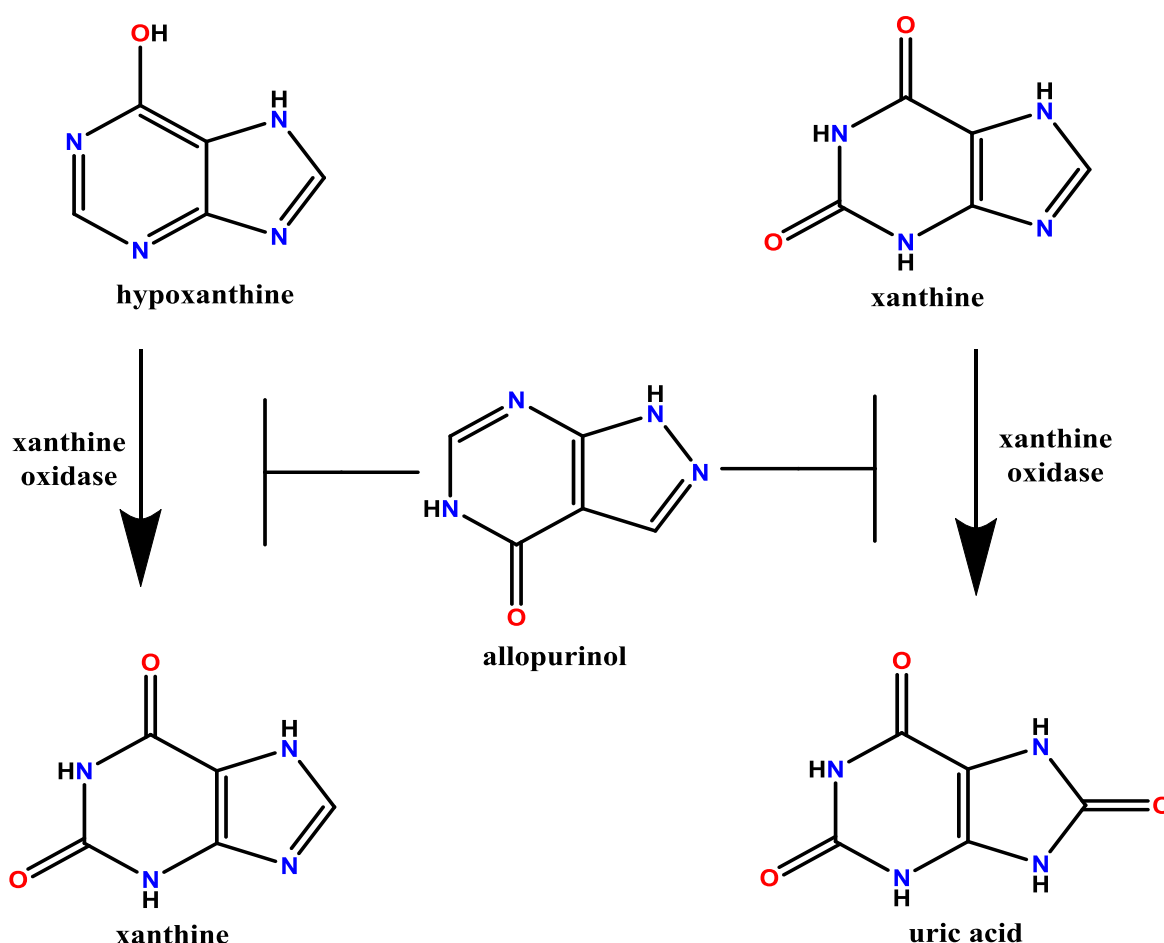


Figure 7. Inhibition de la xanthine oxydase par l'allopurinol afin d'empêcher la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et / ou acide urique. (Danijela et al., 2015).

- **Effets secondaires**

Les effets secondaires de l'allopurinol sont présents chez environ 2 % des patients. Il peut être associé à un syndrome rare potentiellement mortel, il s'agit de l'hypersensibilité à l'allopurinol, qui se caractérise par une éruption cutanée (par exemple, syndrome de Lyell et la dermatite exfoliative), éosinophilie, leucocytose, de la fièvre, l'hépatite et insuffisance rénale progressive (Saidi et Zerrouki, 2013).

V.2.2.2 Febuxostat :

L'année 2006 a été marquée pour le traitement de la goutte par l'apparition d'un nouveau médicament. Il s'agit de l'acide 2-[3-cyano-4-isobutoxyphenyl]-4-méthylthiazole-5-carboxylique appelé fébuxostat Figure 8, un inhibiteur sélectif de la XO. Contrairement à l'allopurinol, il peut s'attacher à la forme oxydée ou réduite du molybdène. En 2009, Edward et coll. ont confirmé son effet puissant sur la goutte par rapport à l'allopurinol. Nous trouvons que ce produit n'a pas assez de recul pour juger son efficacité et ses effets secondaires probables qui peuvent être observés à long terme (Hamlaoui, 2014).

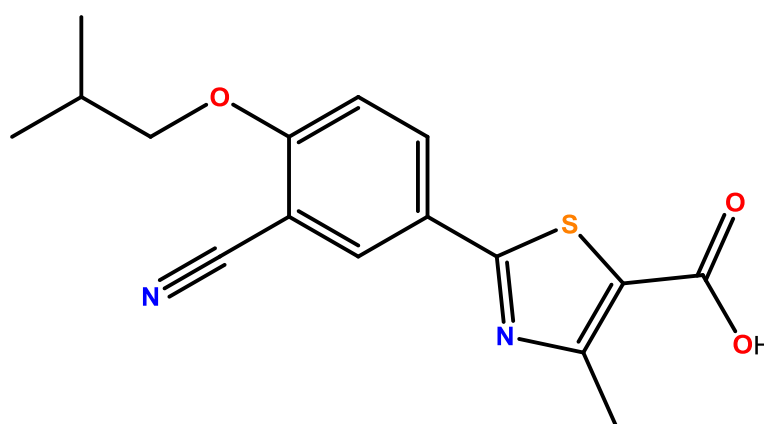


Figure 8. Structure du Febuxostat(ChemDraw).

VI. La xanthine oxydoréductase

VI.1 Généralité

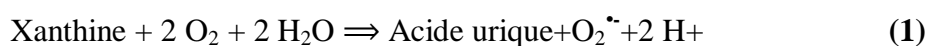
La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdo-flavo-protéique, qui a été identifié pour la première fois, il y a un siècle, dans le lait bovin (Trabsa, 2015). Elle comprend deux enzymes interconvertibles, la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) et la xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22) (Saidi et Zerrouki, 2013). Elle convertit l'hypoxanthine en xanthine et cette dernière en acide urique, deux dernières

étapes du catabolisme des purines chez les primates uricotéliques les plus hauts (**Battelli et al. 2016**). Elle est impliquée dans de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires de l'intestin, les accidents vasculaires cardiaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, l'athérosclérose et la goutte (**Saidi et Zerrouki, 2013**). Elle se synthétise sous forme appelée la xanthine déshydrogénase (XDH) qui peut convertir en xanthine oxydase (XO), ces deux formes ayant le même gène et les mêmes principaux domaines avec un changement structural (**Trabsa, 2015**).

VI .2. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase dans le lait est une enzyme archétypale, qui a été décrite à l'origine comme l'aldéhyde oxydase en 1902 et a depuis servi de référence pour toute la classe des métalloflavoprotéines complexes. (**Cristofer et al., 2000**). Elle est une enzyme cytosolique cruciale largement répandue dans les tissus des mammifères (**Liangliang, 2018**).

La XO est une enzyme indispensable au métabolisme des purines, qui catalyse l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine en acide urique, et la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (**Figure 9**) (**Adjadj, 2009**). Elle utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l' $O_2^{\cdot-}$ (**Eq1**) (**Trabsa, 2015**).



Des concentrations élevées d'acide urique entraîneraient l'hyper-uricémie et la goutte. En conséquence, l'inhibition de XO pourrait réduire la production d'acide urique et devenir une méthode thérapeutique de traitement de l'hyper-uricémie et de la goutte figure 9. (**Liangliang, 2018**).

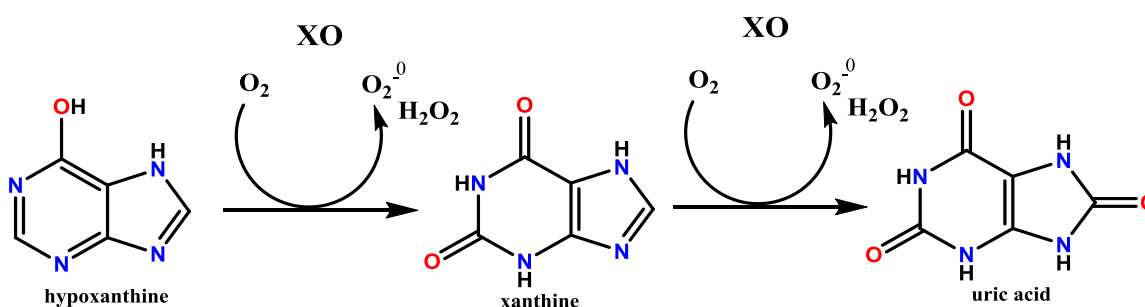


Figure 9. Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase (**Adjadj, 2009**).

Structurellement, XO est un homodimère largement distribué dans les tissus de mammifères, avec une masse moléculaire de 290 kDa. Chaque sous-unité contient un

molybdène molybdène (Mo-pt), centre dans lequel se produit le processus d'oxydation, un flavinadénine dinucléotide (FAD) et deux centres distincts [2Fe2S]. (Santi *et al.*, 2017).

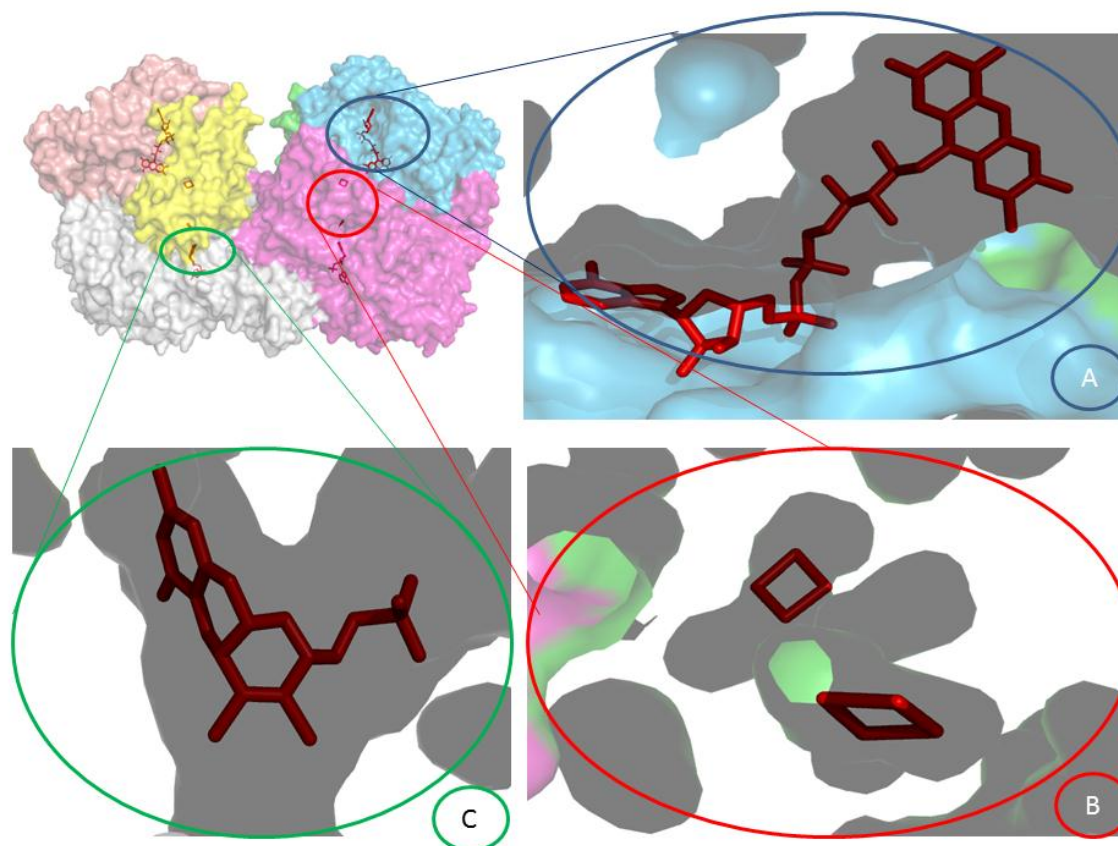


Figure 10. Structure cristallisée de la xanthine oxydase bovine (3nrz) montrant le FAD (A), le cluster fer-soufre(B), le cofacteur à molybdène avec le molybdène (C) (photo réalisé avec le logiciel PyMol)

Codes PDB de la XO bovin

Ils existent 23 codes d'enzyme XO bovine qui sont regroupés dans le tableau 3, qui ont les mêmes AA catalytiques (E802, R880 et E1261). Après l'étude de tous les codes, nous avons choisi le code 3NRZ car son structure cristalline de la xanthine oxydase bovine est complexée avec le substrat l'hypoxanthine.

Tableau 3 .Codes PDB de l'enzyme XO bovine

Caractéristique d'enzyme	Code PDB	Ligands	Nombre de chaines
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine dans un complexe avec l'hypoxanthine	3NRZ	FES ×4 FAD ×2 HPA ×2 MTE-MOS×2	Chaîne A & J (164 AA) Chaîne B & K (305 AA) Chaîne C & L (756 AA)
Structure cristalline de la xanthine oxydase à partir du lait bovin	1FIQ	FES ×2 FAD MTE-MOS SAL GOL	Chaîne A 164 AA Chaîne B 305 AA. Chaîne C 745 AA.
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine dans un complexe avec de l'arsénite	3NVV	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS-AST AST-MTE-MOS	Chaîne A & J (164 AA) Chaîne B (334 AA) Chaîne C & L (755 AA) Chaîne K (305 AA)
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine dans un complexe avec de la guanine	3NVW	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 GUN ×2	Chaîne A et J (164 AA) Chaîne B (334 AA) Chaîne C et L (756 AA) Chaîne K (305 AA)
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine dans un complexe avec la quercétine	3NVY	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 QUE ×2	Chaîne A et J (164 AA) Chaîne B (334 AA) Chaîne C et L (756 AA) Chaîne K (305 AA)
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine dans un complexe avec la 6-mercaptopurine	3NS1	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 PM6 ×2	Chaîne A - J (164 AA) Chaîne B-K (305 AA) Chaîne C-L (755 AA)
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine dans un complexe avec l'indole-3-aldéhyde	3NVZ	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 I3A ×2	Chaîne A-J (164 AA) Chaîne B-K (305 AA) Chaîne C-L (755 AA)
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine réduite dans un complexe avec de l'arsénite	3SR6	FES ×4 FAD ×2 MTE-RMO ×2	Chaîne A-J (164 AA) Chaîne B-K (305 AA) Chaîne C-L (745 AA)
Xanthine oxydase bovine, forme clivée par protéase	3AX7	FES ×4 - FAD ×2 XAX ×2 - SAL ×2 BCT ×2 - GOL ×5	Chaîne A & B (1225 AA)

Xanthine oxydase bovine, forme clivée par protéase	3AX9	FES ×4-FAD ×2 XAX ×2 - BCT ×2 GOL ×5 SAL ×2	Chaîne A & B (1225 AA)
Structure cristalline de la désulfo-xanthine oxydase avec la xanthine	3EUB	FES ×8 MTE-MOM ×4 FAD ×4 - XAN ×4	Chaîne A J-S-2 (162 AA) Chaîne B-K-T-3 (304 AA) Chaîne C-L-U-4 (753AA)
Structure cristalline de la xanthine oxydase en complexe avec la lumazine	3ETR	FES ×4 - FAD ×2 MTE-MOS ×2 LUZ ×2	Chaîne A & L (164 AA) Chaîne B & M (305 AA) Chaîne C & N (755 AA)
Structure de la xanthine oxydase avec la 2-hydroxy-6-méthylpurine	3B9J	FES ×4 - FAD ×2 MTE-MOS - 290 MTE-MOS-290	Chaîne A & I (162 AA) Chaîne B & J (305 AA) Chaîne C & K (758 AA)
Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase à partir du lait bovin	1FO4	FES ×4 MTE-MOS ×2 SAL ×2 - FAD ×2 GOL ×4	Chaîne A & B (1299 AA)
Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase du lait bovin avec une liaison NAD	3UNA	FES ×4 MTE-MOS ×2 FAD ×2 _ NAD ×2 CO3 ×2 SAL ×2 GOL ×13	Chaîne A & B (1286 AA)
Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase du lait bovin à résolution 1.65A	3UNC	FES ×4 MTE-MOS ×2 FAD ×2 _ SAL ×2 GOL ×24_ CO3 ×2	Chaîne A & B (1286 AA)
Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase du lait bovin avec NADH lié	3UNI	FES ×4_MTE-MOS FAD ×2- NAI ×2 GOL ×9- CO3 ×2 SAL ×2	Chaîne A & B (1289 AA)
Xanthine déshydrogénase Y-700 liée de lait bovin	1VDV	FES×4_MTE-MOS ×2_FAD ×2_YSH ×2_GOL ×21- ACY	Chaîne A & B (1299 AA)
Structure Cristalline De La Xanthine Déshydrogénase De Lait Bovin Avec Un Inhibiteur De L'oxipurinol Lié De manière Covalente	3BDJ	FES ×4 MTE-MOW ×2 FAD ×2 141 ×2 GOL×7- CO3 ×2	Chaîne A & B (1286 AA)
Xanthine déshydrogénase de lait de bovin avec un inhibiteur lié au TEI-6720	1N5X	FES ×4 MTE-MOS ×2 FAD ×2 TEI ×2	Chaîne A & B (1290 AA)
Structure cristalline de la forme liée de la xanthine déshydrogénase FYX-051 du lait bovin	1V97	FES ×4 MTE-MOS ×2 FAD ×2- FYX ×2 ACY ×2- GOL ×8	Chaîne A & B (1298 AA)
Complexe de xanthine déshydrogénase bovine et de trihydroxy FYX-051	3AM9	FES ×4- FAD ×2 BCT ×2 MTE-MOS-FYO×2 GOL ×2	Chaîne A & B (1293 AA)
Forme liée à l'urate de xanthine-oxydoréductase bovine	3AMZ	FES ×4- FAD ×2 NAI ×2- BCT ×2 GOL ×3 MTE-MOS-URC×2	Chaîne A & B (1291 AA)

VI.2.1. Mécanisme d'action de la XO

L'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine se fait au niveau du centre Mo de l'enzyme en le donnant deux électrons qui sont transférés au centre FAD par l'intermédiaire des centres Fe_2/S_2 , qui sont considérés comme réservoirs d'électrons (Figure 11). Ensuite l' O_2 accepte les électrons à partir du centre FAD (Figure 11). L'oxygène moléculaire (O_2) peut être réduit par la XO soit d'une manière bivalente pour donner le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou d'une manière univalente pour donner le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$). Le radical hydroxyle (OH°) peut donc se former à partir de l' H_2O_2 via les réactions de Fenton et Haber-Weiss. (Adjadj, 2009).

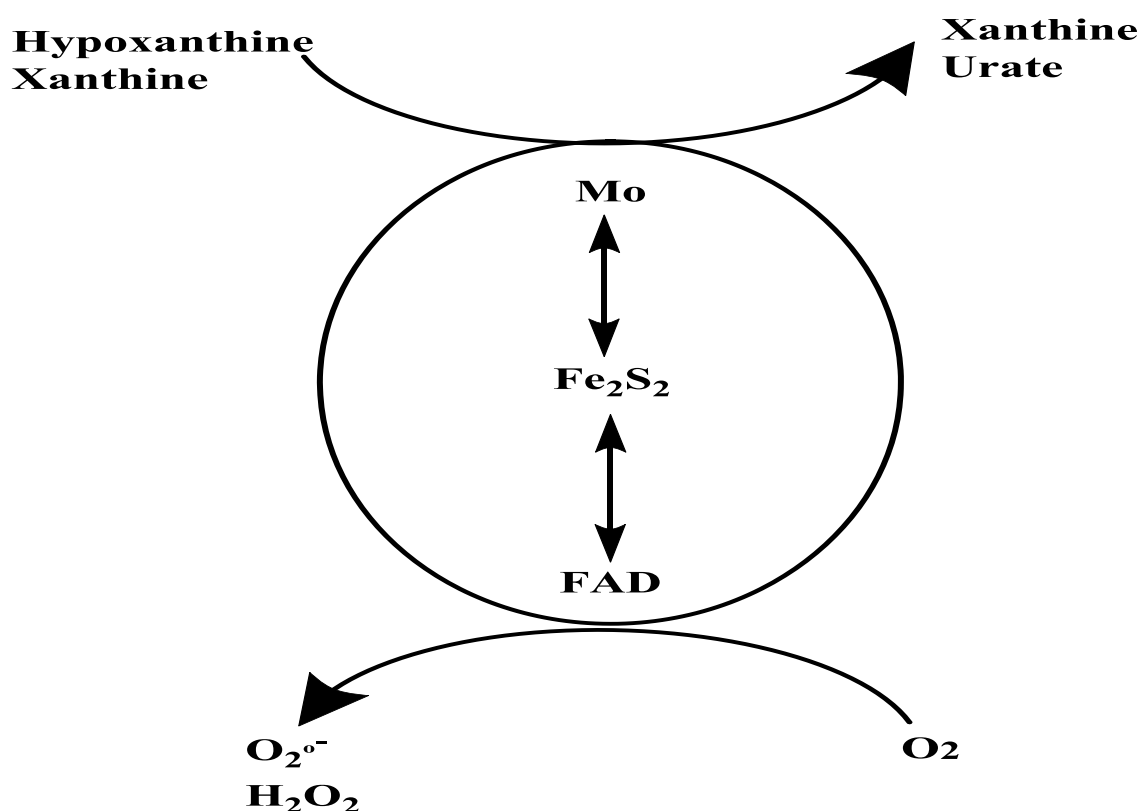


Figure 11 .Schéma de l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au niveau du site Mo et la réduction de l' O_2 au niveau du site FAD (Adjadj, 2009).

Le radical nitroxyde (NO°) est normalement produit par la NO synthase (NOS), mais dans les conditions hypoxiques (anaérobiques), cette enzyme ne peut pas le produire (Berry and Hare, 2004). Donc la XO joue le rôle du NOS. En présence de nitrite (NO^{2-}) et d'un substrat réducteur (Xanthine), le NO° est formé au niveau du site Mo Figure 12.

Ensuite, le site FAD catalyse la production de l' $O_2^{\bullet-}$ en présence de l'oxygène moléculaire. Le superoxyde produit se combine avec le NO^{\bullet} pour former le peroxyde (ONOO⁻), qui est une espèce oxydante non radicalaire extrêmement toxique (Adjadj, 2009).

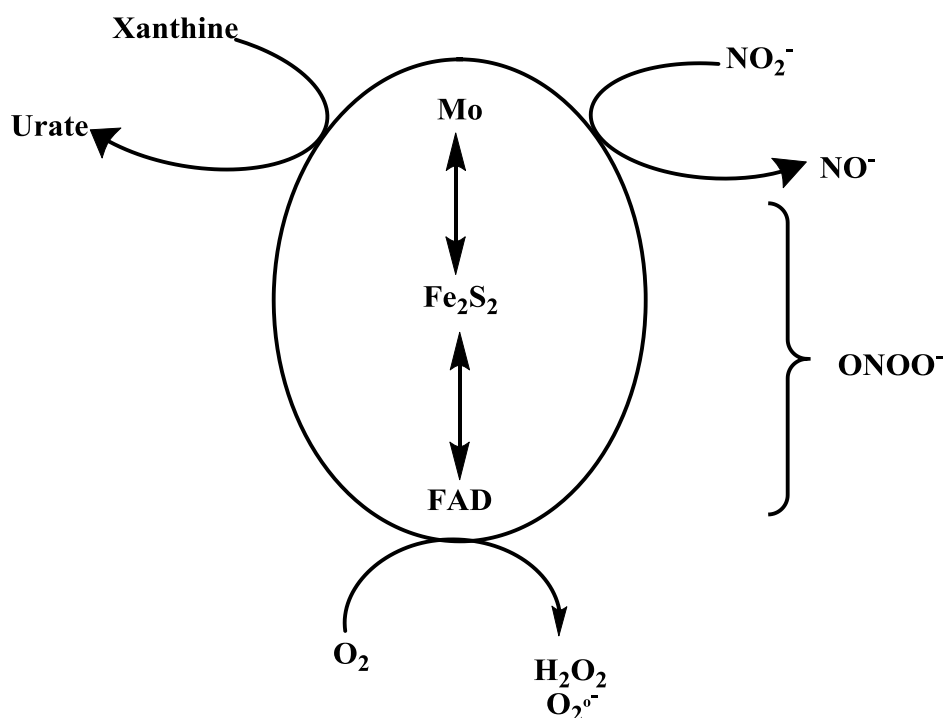


Figure 12 Rôle de la XO dans la génération du radical nitroxyde (NO^{\bullet}) et du peroxyde (ONOO⁻) (Adjadj, 2009).

Donc le mécanisme réactionnel de la XO consiste en deux demi-réactions, d'oxydation et de réduction. La demi-réaction de réduction se passe au niveau du site Mo où la xanthine subit une oxydation, de telle façon un hydrogène est transféré au site MoVI oxydé pour le réduire en MoIV Figure 13. En même temps, dans la même position de la xanthine, se fixe un groupement hydroxyle qui forme l'acide urique. Ce groupement hydroxyle est dérivé à partir d'une molécule d'eau (H_2O). La demi-réaction d'oxydation se passe au niveau du site FAD, où se fait un transfert intramoléculaire d'électrons entre les sites Mo et FAD médié par le site Fe_2/S_2 pour réoxyder le MoIV en MoVI avec une libération du produit (acide urique) suivie d'une réduction du FAD en $FADH_2$ (Figure 13). Le substrat oxydant est l' O_2 qui sera réduit soit d'une manière univalente pour donner l' $O_2^{\bullet-}$, soit d'une manière bivalente pour donner l' H_2O_2 (Adjadj, 2009).

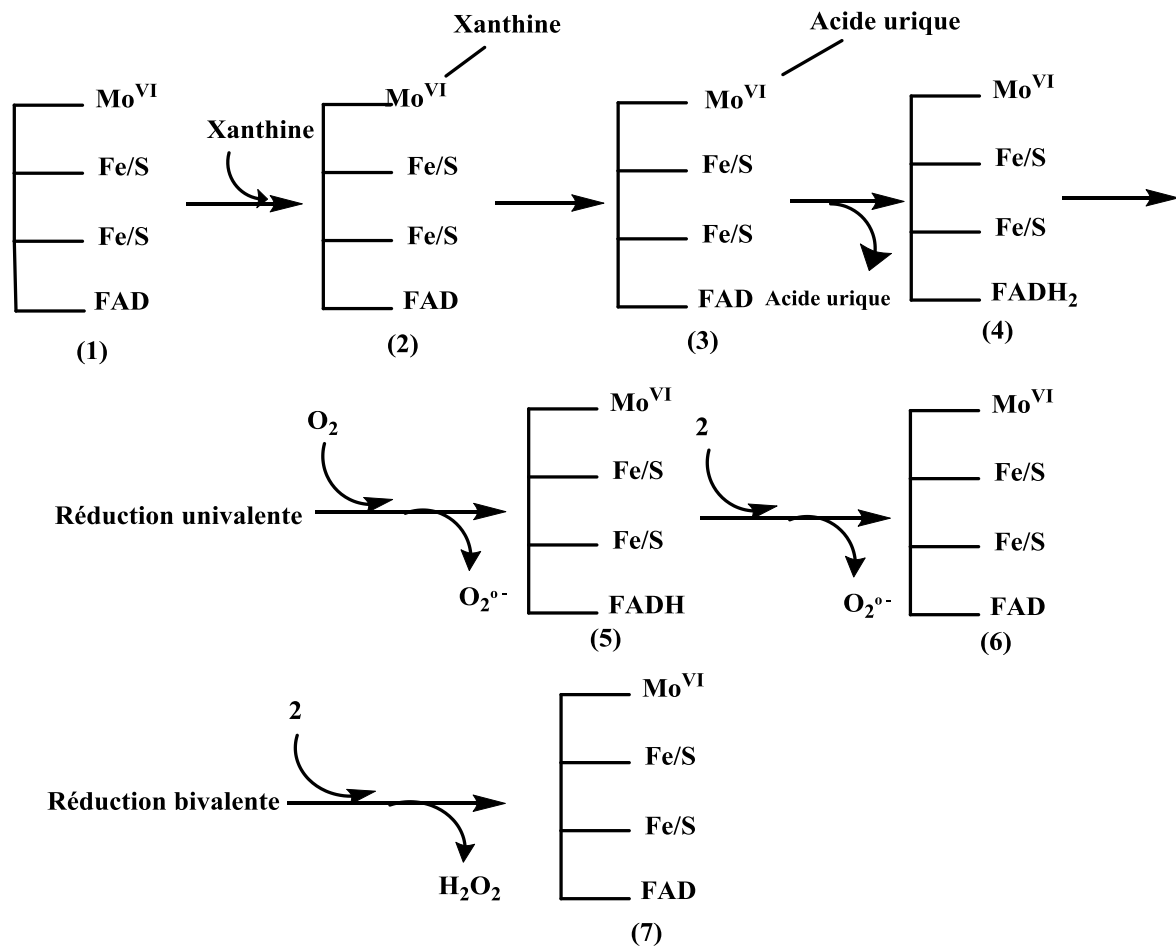


Figure 13. Mécanismes d'action de la XO (Adjadj, 2009).

VI .2.2. Inhibiteurs de XO

XOI peuvent être des analogues de substrats puriniques ou des molécules n'ayant aucune relation structurale avec les substrats biologiques de l'enzyme. Les deux types d'inhibiteurs réagissent au niveau ou pré du site Mo (Hille et Massey, 1981).

Les XOI sont très utiles pour cela. L'inhibition de XO réduit à la fois l'oxydation vasculaire stress et les niveaux circulants d'acide urique. L'inhibition de XO par l'allopurinol est présentée dans la (figure 7). Ainsi, les inhibiteurs de la XO peuvent être utiles pour le traitement de nombreuses autres maladies. Parmi les nombreux inhibiteurs de la XO connus, l'allopurinol, l'oxypurinol et le fébuxostat ont été largement utilisés pour le traitement de l'hyperuricémie et de la goutte. Au site de liaison de la purine tel que l'allopurinol ou au site du cofacteur FAD tel que le benzimidazole. (Danijela et al., 2015)

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels de la XOR isolés des plantes (Trabsa, 2015). En plus de leur activité antioxydant, les flavonoïdes inhibent diverses

enzymes telles que la cyclooxygénase et la lipoxygénase liées à l'inflammation (**Nagao et al. 1999**). Ainsi, Ils présentent des propriétés inhibitrices sur la XO (**Mahfoudi et al. 2017**)

Les polyphénols inhibent l'activité de la xanthine oxydase (**Hamlaoui, 2014**). les coumarines et les tannins sont aussi présentent une activité inhibitrice contre la XO (**Messili et Oulefki, 2013**).

XOI agissent en bloquant la biosynthèse de l'acide urique à partir de la purine dans le corps et on pense qu'augmenter l'excrétion de l'acide urique ou à en réduire la production contribue à réduire le risque de goutte. (**Danijela et al., 2015**)

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

I.1 .Matériel biologique

Le lait bovin frais a été obtenu d'une ferme qui se trouve aux environs de la ville Ksar el hirane, Laghouat.

Les médicaments anti-inflammatoires (Célécoxib, Diclofénac sodium, Ibuprofène, Indométacine et Naproxène sodique) commercialisés sous le nom de (Rumabrex® (ELKENDI Lab), CLOFENAL® L.P (SAIDAL Lab) , XYDOL® (MERINAL Lab) , INDOMET® (SAIDAL Lab) , NOPAIN® (HIKMA Lab)), respectivement , ont été acheté à partir d'une pharmacie (figure 14).



Figure 14. Photo représente les médicaments étudiés dans notre travail.

I .2 Matériel chimique et instrumentation

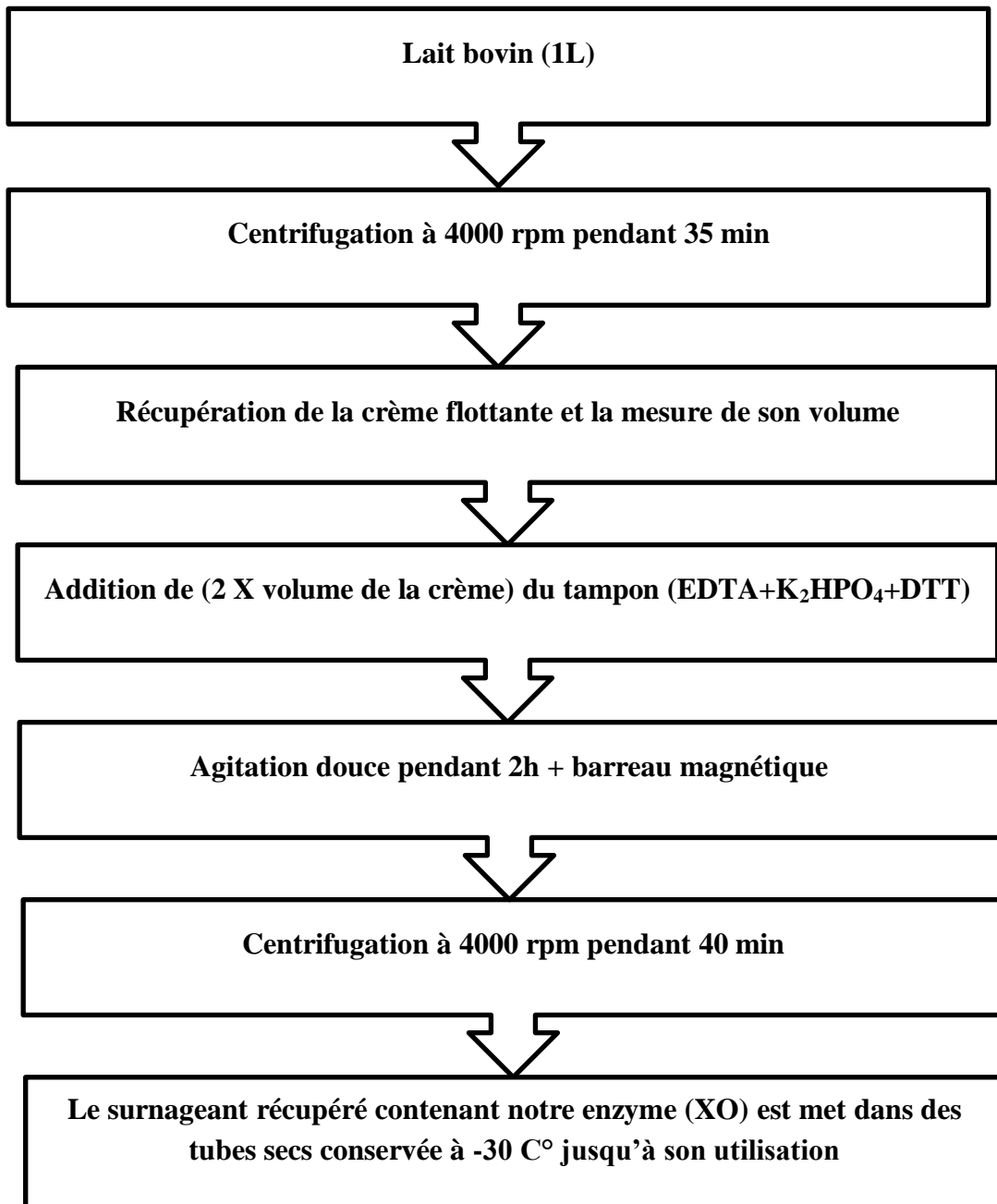
Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA), KCL, sulfate d'ammonium, xanthine, Acide urique, DMSO ont été obtenus de laboratoire de biologie - université Amar Telidji, Laghouat

Parmi l'appareillage utilisé : centrifugeuse 4-15 (Sigma), spectrophotomètre biochrom libra S6, lecteur à microplaques ELx800-uv (universal microplaque reader) accompagné avec une imprimante Epson Lq-2070.

II. Protocoles expérimentaux

II.1 Extraction de la xanthine oxydase du lait bovin

L'extraction de la xanthine oxydase du lait bovin (BMXO) a été réalisée selon le protocole d'extraction de (Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée par (Baghiani et al, (2003)) montré dans la (figure 15).



Remarque: toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C

Figure 15. Procédure de l'extraction de la xanthine oxydase.

(Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée par Baghiani et al. (2003)).

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

Les propriétés d'inhibition de la xanthine oxydase ont été évaluées en mesurant la formation d'acide urique à partir de xanthine à la température 37 C°. Nous avons testé l'activité de la XO par l'ajout d'un volume de 20 µl de l'enzyme dilué dans le tampon phosphate à pH 7 (KH₂PO₄ (0.34g), KCl (4.5g) et K₂HPO₄ (0.435g) dans 500ml d'eau distillée) avec un volume de 40 µl de xanthine comme substrat puis une incubation à 37 C° pendant 30 min. Puis l'ajout d'un volume de 160µl de réactif de dosage d'acide urique de la marque BIOLABO qui nous donne une coloration rose indiquant la production de l'acide urique. Après une incubation à 37 C° pendant 10 min. la lecture s'effectuée dans un lecteur à microplaque à 492 nm (Bou-Salah et al., 2019)

II.3. Principe du réactif du dosage

Chez les humains et les autres primates, l'acide urique est le produit terminal du catabolisme des purines. Il est transformé par une enzyme hépatique, l'uricase, en allantoiné qui est excrétée librement par le rein (Saderne, 2013). Nous avons utilisé le réactif de dosage de l'acide urique de la marque BIOLABO. Ce dernier est oxydé par l'uricase pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène (2H₂O₂). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonic acid (DCHBSA) et 4-aminophenazone (4-AF)) pour former une N-(4-antipyril)-3-chloro-5-sulfonate-ρ-benzoquinone-monoimine, complexe de couleur rouge. L'absorbance est mesurée à 490 nm, est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans l'échantillon testé (Fossati et al., 1980). Le schéma réactionnel est présenté dans la (figure 16).

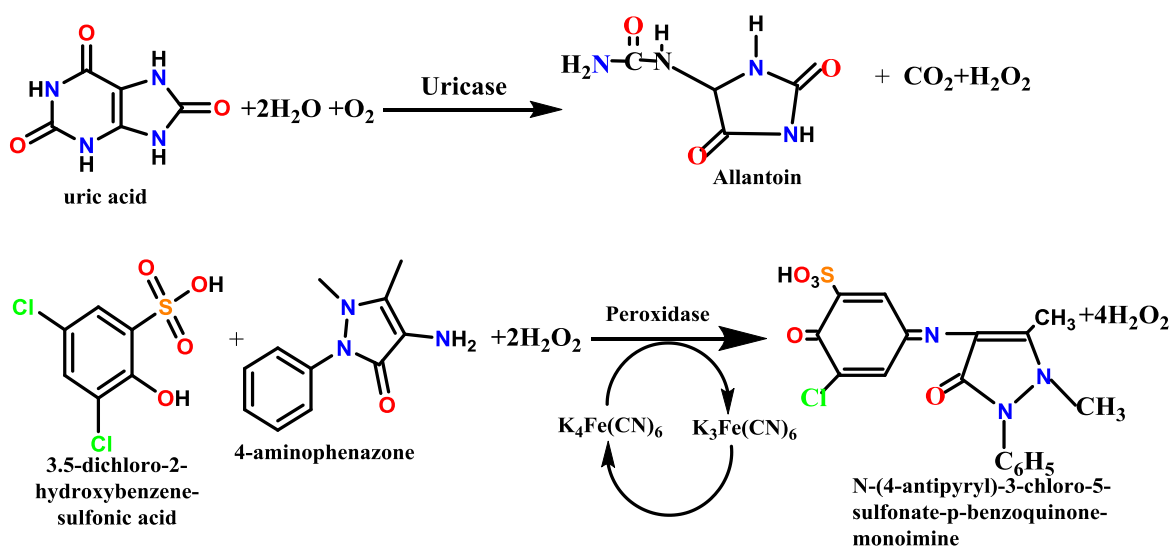


Figure 16. Schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes.
(Fossati *et al.*, 1980).

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

Les médicaments sont broyés puis solubilisés dans un volume approprié de tampon ou DMSO selon la structure chimique de chaque médicament.

Nous avons testé l'activité inhibitrice de nos médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (Célécoxib, Diclofénac sodium, Ibuprofène, Indométacine et Naproxène sodique), à l'aide d'un lecteur à microplaque à 96 puits, après plusieurs essais afin de déterminer les concentrations nécessaires de l'inhibiteur, dont le volume final du milieu réactionnel égale à 260µl.

Un volume de 20 µl de l'extrait enzymatique dilué dans le tampon est ajouté à 40 µl de l'inhibiteur (la molécule pure diluée avec 8 concentrations croissantes), ce mélange est pré-incubé pendant 15min à 37°C. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de 40µl de substrat (xanthine à 0,1 g/l), le mélange est incubé à 37°C pendant 30min, le réactif de dosage de l'acide urique est ajouté avec un volume de 160 µl, le milieu est incubé à température (37 °C) pendant 10 min, la lecture est effectuée à 492 nm dans le lecteur de microplaque à 96 puits. Le blanc de la plaque est dépourvu du substrat et de l'inhibiteur et le blanc de l'extrait est dépourvu de substrat et le control est dépourvu de l'inhibiteur.

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

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

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

Avec :

- I % : le pourcentage d'inhibition.
- $A_{inhibiteur}$: l'absorbance de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur.
- $A_{control}$: l'absorbance de l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur.

IC₅₀ : 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. Docking moléculaire

Célécoxib, Diclofénac sodium, Ibuprofène, Indométacine et Naproxène sodique ont été obtenues à partir de la banque de données PubChem, ils ont été assemblés avec le logiciel Discovery Studio 2016 Client. La structure 3D de la xanthine oxydase du lait bovin (PDB ID: 3NRZ) a été obtenu à partir de la banque de données de protéines (PDB). Cette structure est choisie car elle est cristallisée avec l'hypoxanthine qu'il sera éliminé dans l'étape de la préparation de la protéine.

Pour initialiser les études de docking, la protéine a été préparée en enlevant toutes les molécules d'eau, n'importe quels solvants co-cristallisés et ses ligands (HPA). En revanche, le cofacteur FAD est laissé dans le site actif, pour étudier les possibilités d'interactions. En citant que les hydrogènes sont absents dans les fichiers de PDB, par conséquent, les hydrogènes polaires ont été ajoutés à la structure en utilisant le logiciel Autodock Tools (ADT) (version 1.5.6), les calculs de docking ont été effectués avec le programme AutoDockVina. Parce qu'il utilise des boîtes rectangulaires pour le site de reliure, le centre de la boîte a été défini et la boîte d'amarrage a été affichée à l'aide de l'ADT.

L'amarrage était spécifique avec une grille de 20 x 22 x 22 et points de la grille séparés par 1 Å, qui a été placé au centre de la protéine (x = 37,338 ; y = 19,791 ; z = 17,854) pour la XO. Les paramètres par défaut ont été utilisés, à l'exception du nombre de

conformations de sortie défini sur 1. La valeur de départ de la recherche était aléatoire. Le nombre de tours d'amarrage était de 50 et les conformations de liaison finales obtenues étaient de 50. Toutes ont été bien traitées. Les conformations préférées étaient celles de la plus faible énergie de liaison dans le site actif.

Enfin, les résultats d'amarrage générés ont été directement chargés dans Discovery Studio 2016 Client. Le type d'inhibition a été confirmé par le rapport de répétition des conformations préférées pour chaque médicament. Le site actif du XO est constitué de trois acides aminés catalytiques tels que Glu802, Arg880 et Glu1261. Nous avons amarré les médicaments purs dans la xanthine oxydase bovine pour étudier les interactions possibles au sein du site actif. Cette dernière est décrite ici pour la première fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Rendement d'extraction de la XO

Dans la présente étude, le rendement de l'extraction est 5,4 % (un volume de 54ml de l'extrait enzymatique brut à partir de 1L de lait bovin).

II. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase

L'effet inhibiteur de nos molécules pures sur l'activité de la XO du lait bovin a été évalué par une méthode spectrophotométrique à 492 nm. Les résultats obtenus montrent que tous les médicaments anti-inflammatoires purs inhibent l'activité de la XO. Pour chaque inhibiteur, les valeurs IC50 ont été calculées.

Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction des concentrations des inhibiteurs exprimées en mg/ml, ce qui nous amène à déterminer la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de chaque médicament dont les courbes sont représentés dans la (figure 17). Ces représentations graphiques nous ont permis de déterminer les valeurs des IC50 où les valeurs sont enregistrées dans le tableau 4.

Tableau 4. Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs.

Inhibiteurs	IC50 (µg/ml)
Diclofénac de sodium	6,11±1,27
Naproxène sodique	3,12±1,06
Indométacine	0,96±0,11
Ibuprofène	9,46±4,29
Célécoxib	3,36±0,86

Les résultats obtenus montrent que tous les médicaments ont un pouvoir inhibiteur important contre l'activité enzymatique de la xanthine oxydase. Les valeurs des IC50 varient selon la nature et la structure chimique de chaque inhibiteur et les groupements fonctionnels que les constituent, dont les valeurs des IC50 varient entre 0,96 µg /ml pour l'indométacine à 9,46 µg/ml pour l'ibuprofène.

Des recherches scientifiques ont été réalisées sur l'inhibition de la xanthine oxydase dans le but de trouver des nouveaux médicaments pour le traitement de la goutte et l'hyperuricémie sans effets secondaires. Dans cette étude, nous avons fait la même chose et nous voulons comparer nos médicaments par ces travaux qui sont regroupés dans le tableau 5.

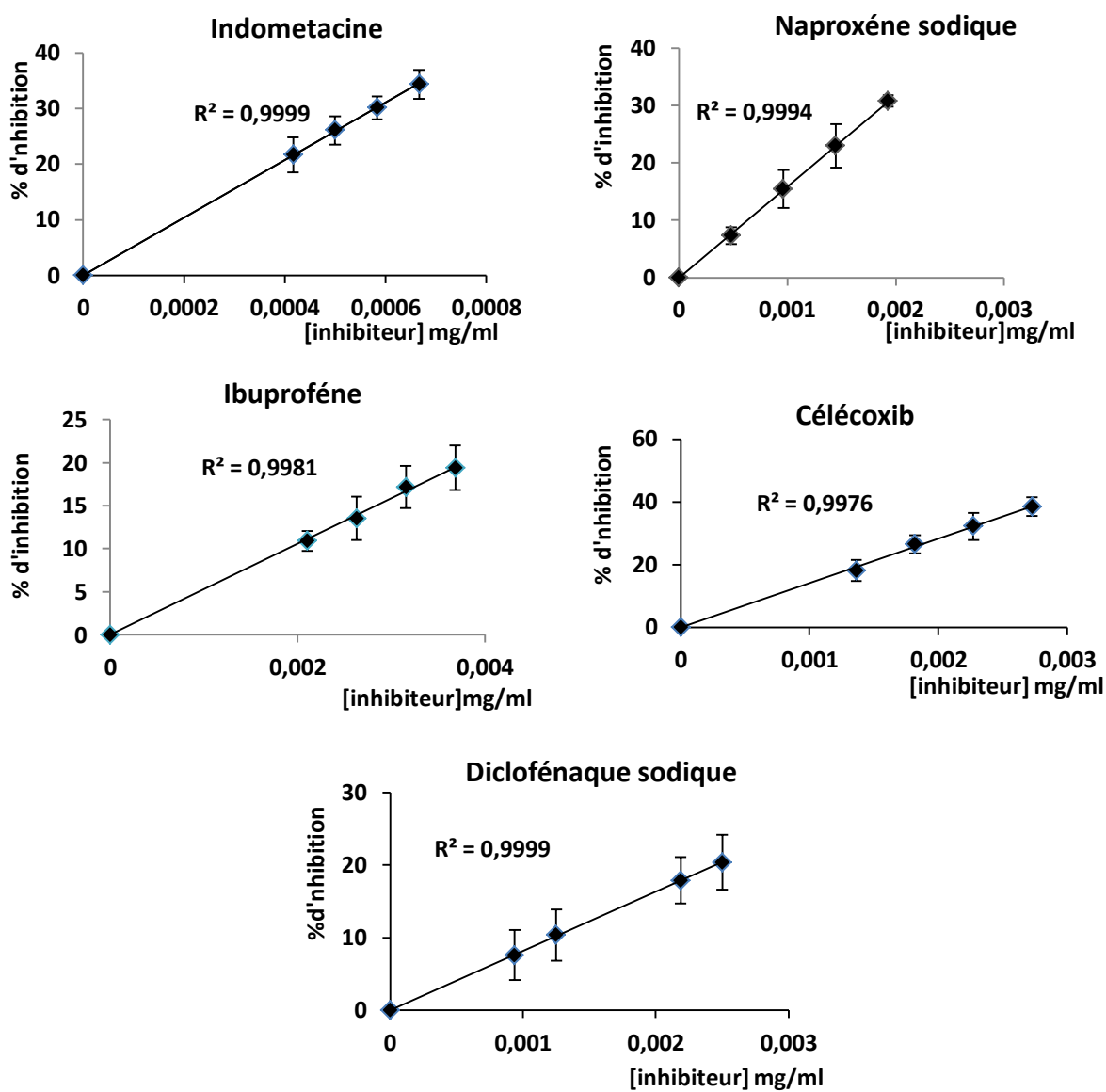


Figure 17. Représentations graphiques de l'inhibition de la réaction catalysée par la XO.

Tableau 5. Les valeurs des IC50 pour la XO bovine à partir de quelques références bibliographiques.

Inhibiteurs	IC50 (µg/ml)	Références
Febuxostat	0,076	(Kapoor et Saxena ., 2014)
Allopurinol	2,73	(Bousaleh et al., 2019).
Oxypurinol	4,31±0,5	(Heung et al ., 2018)
Fraxamoside	8,66±0,7	(Vitale et al., 2017)
Ursolic acid	10,3	(Eman et al ., 2018)
S-allyl cysteine	33	(preethi et al ., 2018)
Naringin decanoate	88,33	(Branco et al., 2017)
Naringin octanoate	79,865	(Branco et al., 2017)
Oleioside11-methyl ester	104,731±13	(Vitale et al., 2017)
Naringin	119,765	(Branco et al., 2017)
Hesperidin decanoate	155,55	(Branco et al., 2017)
Hydroxytyrosol	173,58±22	(Vitale et al., 2017)
Oleuropein	181,07±17	(Vitale et al., 2017)
Hesperidin	203,51	(Branco et al., 2017)

Le fébuxostat est l'inhibiteur de la XO le plus puissant, qui présente une valeur d'IC50 égale à 0,076 µg/ml. C'est le meilleur inhibiteur par rapport à nos inhibiteurs. Par contre si on compare nos inhibiteurs avec l'allopurinol qui est le plus utilisé cliniquement pour traiter l'hyperuricémie et la goutte, nous trouvons que notre médicament l'indométacine a une valeur d'IC50 (0,96 µg/ml) plus efficace à celle de l'allopurinol. En comparant l'oxypurinol qui a une IC50 égale à 4.31 µg/ml, nous trouvons que l'indométacine, le Célécoxib et le Naproxène sodique ont un effet inhibiteur contre la XO bovine plus important.

Le protocole que nous avons utilisé dans notre travail est encore nouveau et il est publié dans l'article de Bou-Salah et al., 2019 qui n'est pas encore en ligne. Ainsi, il est appliqué dans ce travail pour la première fois. C'est pourquoi nous n'avons pas trouvé autres médicaments pour la comparaison, mais nous voulons comparer nos inhibiteurs avec d'autres molécules pures celles présentés dans le tableau 5. Dans ce contexte, nous pouvons dire que nos inhibiteurs (Célécoxib, Diclofénac de sodium, Naproxène sodique et indométacine) ont une activité inhibitrice contre la XO bovine plus efficace que ces molécules pures.

III. Docking moléculaire

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

Pour réaliser le docking des cinq inhibiteurs (Ibuprofène, Naproxène sodique, Indométacine, Célécoxib et Diclofénac de sodium) au sein de l'enzyme xanthine oxydase, nous avons procédé à plusieurs étapes commençant le téléchargement des structures des inhibiteurs à partir de PubChem suivi de la préparation des inhibiteurs, à l'aide du logiciel « Autodock Tools ». Après ces étapes, nous avons préparé l'enzyme en téléchargeant le fichier à partir de la banque (PDB).

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

Nos médicaments forment des interactions avec les acides aminés du site actif. À travers le docking spécifique avec AutoDock Vina, nous avons obtenu 50 solutions, nous avons trouvé plusieurs interactions hydrogènes dont les distances sont représentées dans le tableau 6, les meilleures poses de docking de ces médicaments avec les acides aminés impliqués dans les interactions sont représentés dans les figures de 18 à 22.

Ibuprofène ($C_{13}H_{18}O_2$), 2-[4-(2-méthylpropyl) phényl] acide propanoïque, de masse moléculaire égale à 206,285g/mol, est composé d'un cycle aromatique et un groupement carboxyle. La conformation présentée dans la (figure 18) est la plus répétée avec un taux de 86%. L'inhibiteur a fait des interactions avec les acides aminés du site actif de la XO. Le cycle aromatique lié avec les AA (Ala1078 et Arg912) par des interactions hydrophobes de type alkyl-alkyl. Nous avons remarquées deux liaisons hydrogènes, l'une entre l'atome d'azote de la Thr1083 et l'atome hydrogène du groupement carboxyle de l'inhibiteur de 2,68 Å et l'autre entre l'atome d'hydrogène de la Ser1082 et l'atome oxygène du groupement carboxyle de l'inhibiteur de 3,05 Å.

Naproxène sodique ($C_{14}H_{13}NaO_3$), sodium; (2S)-2-(6-méthoxy-naphthalen-2-yl) propanoate, de masse moléculaire égale à 252,245g/mol, est composé de groupe naphthalène et un groupement carboxyle. La conformation présentée dans la figure 19 est la plus répétée avec un taux de 68%. L'inhibiteur a fait des interactions avec les acides

aminées du site actif de la XO. Le groupe naphthalène interagit avec l'Arg912 par interaction de type π -alkyl et avec Ser1080 par amide- π -stacked. Une liaison hydrogène de 2,26 Å a été enregistré entre l'atome d'azote de la Thr1083 et l'atome hydrogène du groupement carboxyle de l'inhibiteur et autre de 3,21 Å entre l'atome d'hydrogène de la Ser1082 et l'atome oxygène du groupement carboxyle de l'inhibiteur.

Indométacine ($C_{19}H_{16}ClNO_4$), 2-[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl] acide acétique, de masse moléculaire égale à 357,79g/mol, est composé de groupes benzène, indole et carboxyle. La conformation présentée dans la (figure 20) est la plus répétée avec un taux de 52%. L'inhibiteur a fait des interactions avec les acides aminés du site actif de la XO. Le cycle benzène interagit par des liaisons hydrophobes de type π -alkyl avec les AA Leu648 et Val1011. Pour le groupe indole, nous avons remarqué des liaisons hydrophobes de type π -sigma avec Leu648, π -alkyl avec Leu1014 et π - π -T-stacked avec Ph1013. Nous avons enregistré des liaisons hydrogènes de 2,87 Å entre l'atome d'hydrogène de la Ser876 et l'atome oxygène de l'inhibiteur, de 3,12 Å entre l'atome d'hydrogène de la Lys771 et l'atome oxygène de l'inhibiteur et de 3,25 Å entre l'atome d'hydrogène de l'Asn768 et l'atome oxygène du groupement carboxyle de l'inhibiteur.

Célécoxib ($C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S_2$), 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl) pyrazol-1-yl] benzène sulfonamide, de masse moléculaire égale à 381,373g/mol, est composé de deux cycles aromatiques, un groupe imidazole, 3 atomes du fluor et un groupement SO_2 . La conformation présentée dans la figure 21 est la plus répétée avec un taux de 78%. L'inhibiteur a fait des interactions avec les acides aminés du site actif de la XO.

Le premier cycle aromatique a fait des interactions hydrophobes de type π -cation avec Lys771 et π -alkyl avec Leu648, le deuxième cycle fait une liaison avec Val1011 de type π -sigma. Alors que le groupe imidazole enregistre des liaisons hydrophobes de type π -alkyl avec les AA Val1011, Leu1014 et Leu648. Des liaisons de type alkyl-alkyl ont été enregistrées entre l'atome de carbone qui porte les trois atomes de fluor et les AA : Leu873, Leu1014, Leu648 et Pro1076. Une liaison de fluorine de 3,25 Å a été remarqué entre l'atome de l'oxygène de la Glu802 et l'atome de fluor du l'inhibiteur.

Diclofénac de sodium ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$), sodium;2-[2-(2,6-dichloroanilino) phenyl] acétate, de masse moléculaire égale à 318,129g/mol, est composé de deux cycles aromatiques et un groupement carboxyle. La conformation présentée dans la figure 22 est la plus répétée avec un taux de 92%. L'inhibiteur a fait des interactions avec les acides aminés du site actif de la XO. Nous avons remarqués des liaisons hydrophobes entre le premier cycle aromatique de type π -alkyl avec les deux AA Pro1076 et Leu648 et de type π -

sigma avec Leu1014. Et le deuxième cycle aromatique a fait une interaction de type π -alkyl avec l'AA Leu648. Des liaisons de type alkyl-alkyl sont remarqués entre les deux atomes de chlore de l'inhibiteur et les AA Leu1014, Leu873, Leu648 et Val1011 et une liaison π -alkyl avec Phe1013.

Oxypurinol ($C_5H_4N_4O_2$), 1,2-dihydropyrazolo [3,4-d] pyrimidine-4,6-dione, est composé de deux cycles pyrazol et pyrimidine. L'inhibiteur a fait des interactions avec les acides aminés du site actif de la XO. Nous avons remarqué des liaisons hydrophobes entre le cycle pyrazol de type π -alkyl avec les deux AA Ala910 et Ala1079 et de type π -sigma avec Ala1078 et une liaison de type π - π -stacked avec Phe914. Et aussi entre le cycle pyrimidine et Phe914 de type π - π -stacked, Phe1009 de type π - π -shaped, Ala1078 de type π -alkyl et Ala1079 de type π -sigma. Nous avons enregistré des liaisons hydrogènes de $2,61 \text{ \AA}$ entre l'atome d'hydrogène de la Glu1261 et l'atome d'azote du cycle pyrazol de l'inhibiteur, de $3,08 \text{ \AA}$ entre l'atome d'hydrogène de la Thr1010 et l'atome oxygène du cycle pyrimidine de l'inhibiteur et de $2,81 \text{ \AA}$ entre l'atome d'hydrogène de l'Arg880 et l'atome oxygène du cycle pyrimidine de l'inhibiteur.

Nous avons remarqué que les interactions entre l'enzyme et l'oxypurinol sont nombreuses par rapport à leurs interactions avec nos inhibiteurs. Les interactions de l'enzyme qui contient l'oxypurinol sont avec les trois AA catalytiques par contre dans le cas de nos inhibiteurs, nous avons remarqué un AA au maximum pour le Célécoxib et le Naproxène sodique et les autres ne réagissent pas avec ces AA aminés catalytiques.

Tableau 6. Les taux de répétition, les acides aminés impliqués, les types d'interactions et les distances des liaisons hydrogènes de nos médicaments.

Médicament	Taux de répétition %	Acides aminés impliqués	Types des interactions	Valeurs des distances des liaisons hydrogènes en Å
Indometacine	52	Leu648, Val1011 Leu1014, Phe1013 Asn768, Lys771 Asp872, Ser876	π -alkyl π -sigma π - π -T-Shaped Alkyl-alkyl Conventional Carbon-carbon	2.87
Célécoxib	78	Lys771, Leu648 Val1011, Leu1014 Leu873, Pro1076	π -cation π -alkyl π -sigma Alkyl-alkyl Fluorine	/
Diclofénaque sodique	92	Pro1076, Leu1014 Leu648, Phe1013 Val1011, Leu873	π -alkyl π -sigma Alkyl-alkyl	/
Naproxène sodique	68	Arg912, Ser1080 Thr1083, Ser1082 Glu1261, Val1081	π -alkyl Amide- π -stacked Donor-donor Conventional Carbon-carbon	2.26
Ibuprofène	86	Ala1078, Arg912 Ser1082, Thr1083	Alkyl-alkyl Carbon-carbon Conventional Donor-donor	3.05
Oxypurinol		Glu802, Glu1261 Ala910, Phe914 Arg880, Ala1078 Ala1079, Thr1010 Phe1009	Conventional Water- Conventional π - π -T-stacked Acceptor- Acceptor π -sulfur Bump-bump π - π -T-shaped π -alkyl π -sigma	2.61 2.81 3.08

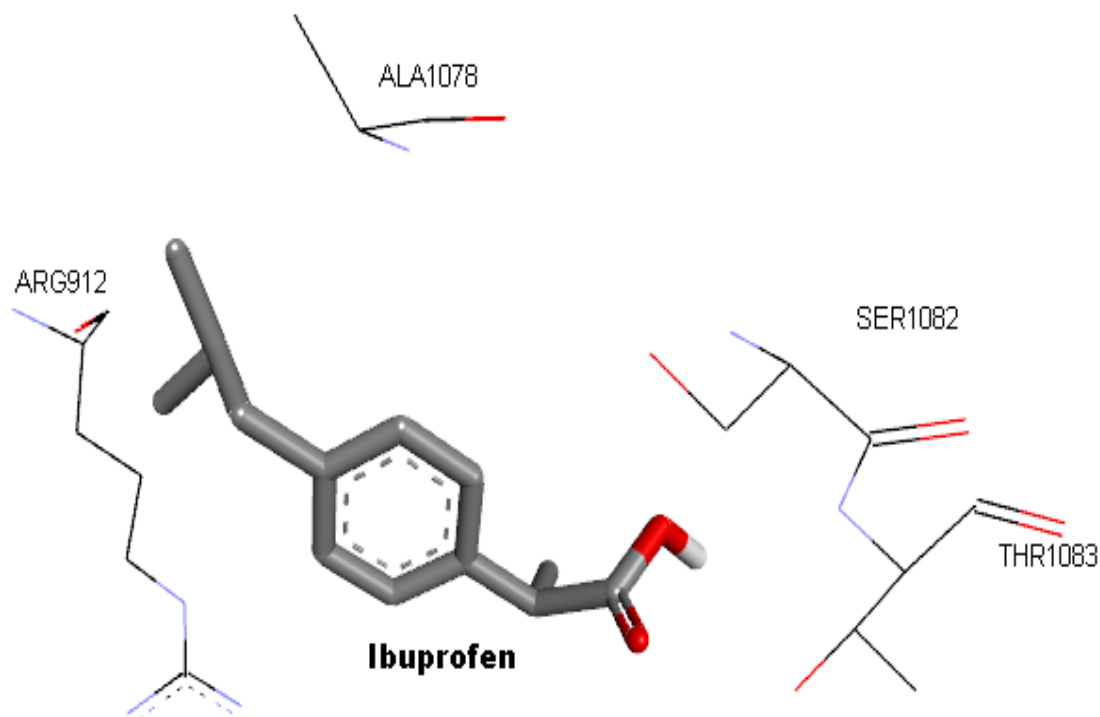


Figure 18. Représentation de la meilleure pose de docking de l'Ibuprofène sur la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif .

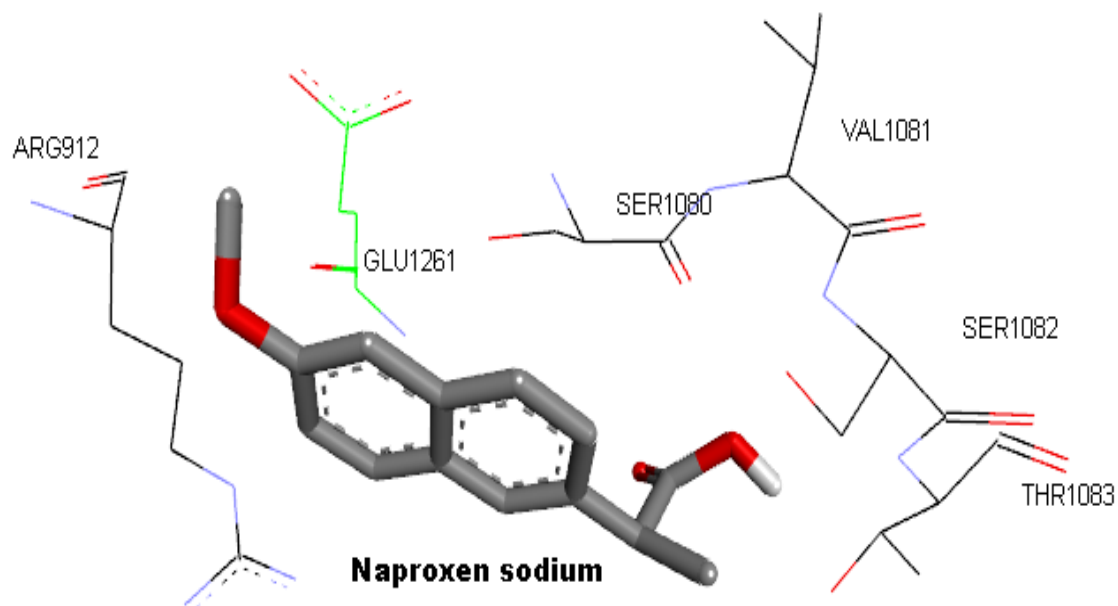


Figure 19. Représentation de la meilleure pose de docking du Naproxène sodique sur la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif et l'acide aminée catalytique Glu1261 en vert.

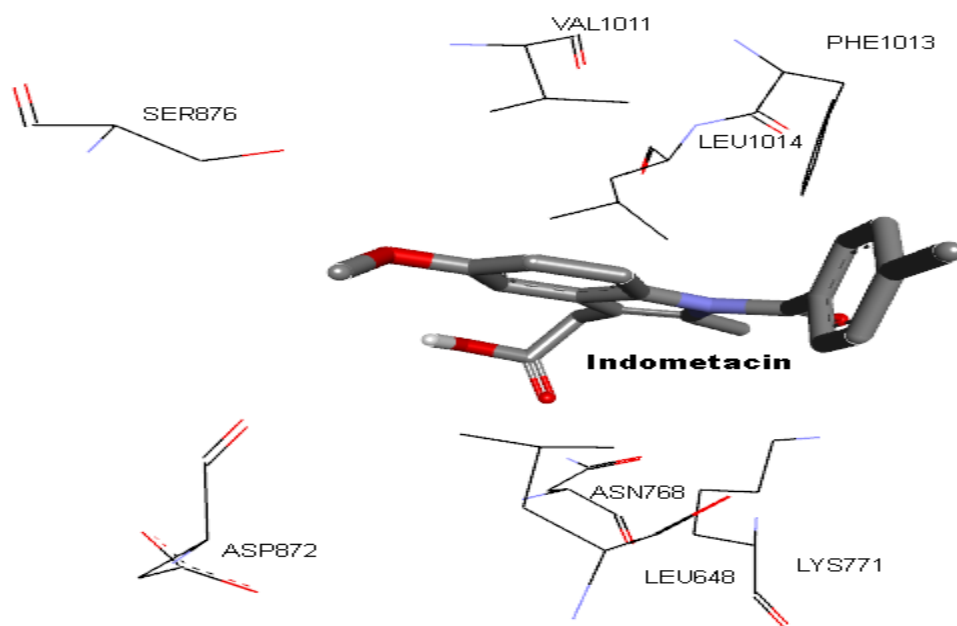


Figure 20. Représentation de la meilleure pose de docking de l'Indométagine avec la xanthine oxydase et ses acides aminés du site actif.

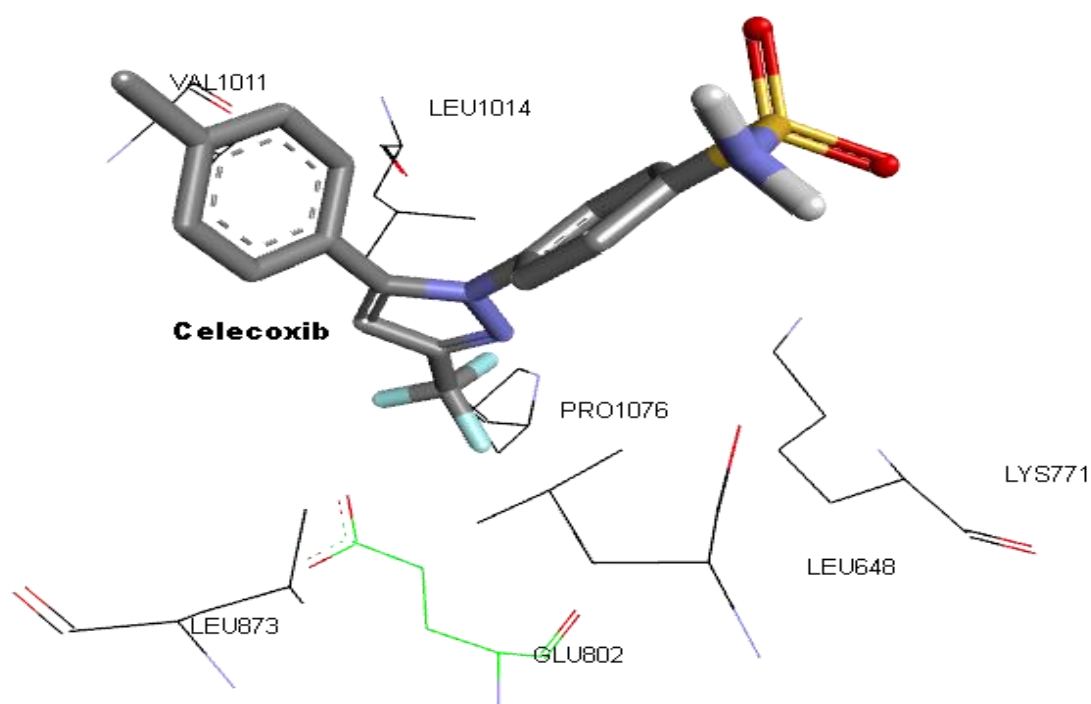


Figure 21 Représentation de la meilleure pose de docking du Célécoxib avec la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif et l'acide aminée catalytique Glu802 en vert.

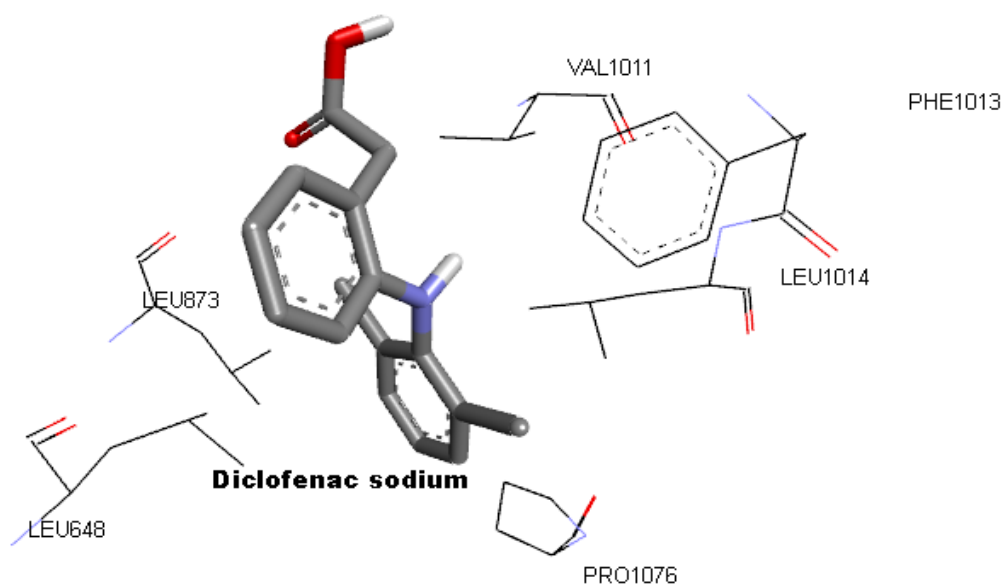


Figure 22. Représentation de la meilleure pose de docking de le Diclofénac sodium avec la xanthine oxydase avec les acides aminés du site actif.

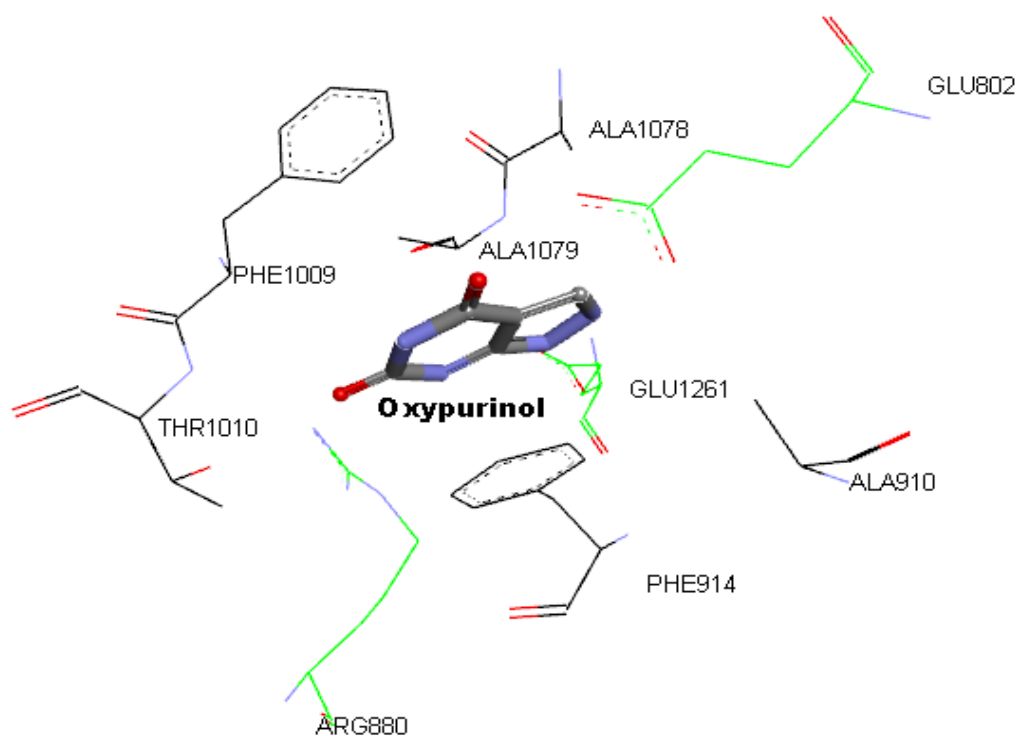


Figure 23. Représentation de la meilleure pose de docking de l'oxypurinol avec la xanthine oxydase (3BDJ) avec les acides aminés du site actif et les acides aminés catalytiques Arg880, Glu1261 et Glu802 en vert.

***CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES***

La goutte est reconnue depuis l'Antiquité. Cette maladie résulte d'un dépôt de cristaux d'urate de monosodium dans les structures articulaires, en raison des taux élevés d'acide urique sérique. L'acide urique est le produit final du catabolisme des purines chez l'homme; cette réaction est catalysée par la xanthine oxydase qui est une oxydoréductase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ainsi que l'oxydation de la xanthine en acide urique. Le traitement de la goutte implique l'utilisation d'agents thérapeutiques, tels que les inhibiteurs de la xanthine oxydase (XOI), qui agissent en bloquant la conversion de la purine en acide urique.

Dans notre étude, le choix des inhibiteurs à étudier est effectué selon leurs structures chimiques, qui sont des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS : Indométacine, Diclofénac sodium, Ibuprofène, Célécoxib et Naproxène sodique). Nous avons trouvé par les résultats expérimentaux obtenus à travers ce travail que ces inhibiteurs ont une activité inhibitrice importante sur la xanthine oxydase du lait bovin ce qui est confirmé par les valeurs des IC50 dont les valeurs varient de 0,96 à 9,46 µg/ml.

Les cinq médicaments ont un potentiel puissant d'inhibition de la XO et leurs effets ont été étudiés dans ce travail pour la première fois.

L'amarrage moléculaire est un outil essentiel en biologie moléculaire structurale et en conception de médicaments assistée par ordinateur. Le but de l'amarrage protéine-ligand est de prédire le ou les modes de liaison prédominants d'un ligand avec une protéine de structure tridimensionnelle connue.

Ces résultats sont prouvés par l'étude bioinformatique en déterminant le mécanisme d'inhibition et les interactions effectuées avec les acides aminés du site actif de la xanthine oxydase.

Des études supplémentaires sur les composés ci-dessus et des études *in vivo* sont nécessaires pour développer des entités chimiques potentielles pouvant être utilisées en clinique dans la prévention et le traitement des maladies de la goutte et des troubles inflammatoires associés.

À travers ce travail, nous proposons de chercher d'autres médicaments qui peuvent avoir des effets inhibiteurs de la XO, dans le but de trouver des traitements plus efficaces, moins d'effet secondaires et facile à administrer pour les gouteux.

Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications de ces médicaments en santé pour le traitement de certaines maladies où l'inhibition de la XO est nécessaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abdullahi A , Hamzah RU, Jigam AA, Yahya A, Kabiru AY1, Muhammad H, Sakpe S, Adefolalu FS, Isah MC, Kolo MZ** .(2012). Inhibitory activity of xanthine oxidase by fractions *Crateva adansonii*. Journal of Acute Disease, 126-129.
2. **Adjadj M.** (2009). PROPRIETES ANTIOXYDANTES ET ACTIVITE INHIBITRICE DE LA XANTHINE OXYDASE DES EXTRAITS DE LA PLANTE MEDICINALE *Ajuga iva* (L.) Schreber. Université Mentouri Constantine.P3, PP7-9
3. **Askali, B.** (2016). La goutte et le rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge. Thèse de doctorat, Université Mohammed V, Rabat.P4, 8, 9, 75, 93, 96, 97, 99
4. **Benarous Khedidja, Benguechoua Madjda and Ghibeche Abderrahmane.** (2018). Antiallergy Drugs as Potent Inhibitors of Lipase with Structure-Activity Relationships and Molecular Docking. Medicinal Chemistry, 17, 1-7.
5. **BOU-SALEH Leila, BENAROUS Khedidja , LINANI Abderahmane et YOUSFI Mohamed.**(2019).Analysis studies of five natural drugs against gout disease using molecular docking and innovative optical density method .journal of food and drug analysis (in press).
6. **Branco, M.E.M., Yollanda, E. M. F., Thiago, G. A., Marcia C. F. M., Camila W. L., Alexandra, C. F.S., Oliveira C.P.**(2017). Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by acylated derivatives of flavonoids synthesised enzymatically. JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY vol 32, 978–985
7. **Cristofer Enroth, Bryan T. Eger, Ken Okamoto, Tomoko Nishinoi, Takeshi Nishino, and Emil F. Pai.** (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase :Structure-based mechanism of conversion. BIOCHEMISTRY vol 97, 10723–10728.
8. **Danijela A. Kostić, Danica S. Dimitrijević, Gordana S. Stojanović, Ivan R. Palić, Aleksandra S. Yoržević, and Jovana D. Ickovski.**(2015). Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry Vol 2015, 294858, 8 pages

9. **Denis, C. et Mark, H.** (2012). La goutte : vieille maladie, nouveaux défis. Le Rhumatologue. www.rhumatologie.org
10. **Derek, G., Waller BSc (HONS), DM, MBBS (HONS), FRCP, Anthony, P. Sampson MA, PhD, FHEA, FBPhS.**(2018). Hyperuricaemia and gout. Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition) 2018, Pages 385-389.
11. **Eman, A., Naglaa, G., Shehab., Ihab M. A., Yasser ,B .**.(2018). Antihyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory activities of Tribulus arabicus and its isolated compound, ursolic acid: In vitro and in vivo investigation and docking simulations. PLOS ONE v16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone>.
12. **Fernanda Cristina Ferrari, Rita de Cássia Lemos Lima, Zilma Schimith Ferraz Filha, Camila Helena Barros, Marcela Carolina de Paula Michel Araújo, Dênia Antunes Saúde-Guimarães.**(2016). Effects of Pimenta pseudocaryophyllus extracts on gout: Anti-inflammatory activity and anti-hyperuricemic effect through xanthine oxidase and uricosuric action. Journal of Ethnopharmacology 180, 37–42.
13. **François, M.** (2014). Développement d'une nouvelle méthode de docking basée sur les mécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques. Thèse de doctorat, Université Paris Sud, P31, 32.
14. **Hamlaoui, I.** 2014. Etude théorique des réactions enzymatiques : Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones. Thèse de doctorat, Université Constantine 1. P18 ,22.
15. **Hervé, E.** (2016). Le colchique et la goutte. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Nantes. P16
16. **Heung, J.Y., Young,S.L., Hyung W. R., Seung-Hyung ,K., Dong-Seon ,K.**(2018). Effects of Toona sinensis Leaf Extract and Its Chemical Constituents on Xanthine Oxidase Activity and Serum Uric Acid Levels in Potassium Oxonate-Induced Hyperuricemic Rats. Molecules V23, 3254.
17. **Hille Russ et Massey Vincent .**(1981). Studies on the Oxidative Half-reaction of Xanthine Oxidase. The Journal Of Biological Biochemistry 256 ,9090-9095.
18. **Jean, M. B. et Pharm, B.** (2007). Le traitement de la goutte. les pages bleues vol 54, N° 11

- 19. Liangliang Liu , Mengmeng Yuan , Siqi Huang , Jianjun Li , Defang Li , and Lining Zhao .**(2018). Analysis of Xanthine Oxidase Inhibitors from *Clerodendranthus spicatus* with Xanthine Oxidase Immobilized Silica Coated Fe₃O₄ Nanoparticles. *Appl. Sci* vol 8, 158.
- 20. Maria Giulia Battelli, Letizia Polito-, Massimo Bortolotti and Andrea Bolognesi.**(2017). Xanthine Oxidoreductase in Drug Metabolism: Beyond a Role as a Detoxifying Enzyme. *Current Medicinal Chemistry* 23, 4027-4036.
- 21. M.D. Santi , M. Paulino Zunini , B. Vera , C. Bouzidi , V. Dumontet , A. Abin-Carriquiry , R. Grougnet , M.G. Ortega .**(2017). Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) in vitro and molecular docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 143, 577-582.
- 22. Messili, K. et Oulefki, N.** (2013). Activités anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydo- réductase in vivo de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira, Bejaia. P 2, 6,7 ;10, 12, 13,18,20.
- 23. NAGAO Akihiko ,SEKI Michiko et KOBAYASHI Hidetaka .**(1999).Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids.*Biotechnol.Biochem* 63(10),1787-1790.
- 24. Neha Kapoor & Sanjai Saxena.**(2014). Potential Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Endophytic *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. *Appl Biochem Biotechnol*. DOI: 10.1007/s12010-014-0927-x.
- 25. Piero Fossati, Lorenzo Prencipe, and Giovanni Berti .** (1980). Use of 3, 5-Dichloro- 2-hydroxybenzenesulfonic Acid/4-Amino phenazone Chromogenic System in Direct Enzymic Assay of Uric Acid in Serum and Urine. *CLIN. CHEM.* 26/2, 227-231.
- 26. Preethi, J., Chitral,L., Ancy Ruthayaraj., Kumaradhas, P., Palvannan., T.**(2018). S-allyl cysteine as potent anti-gout drug: Insight into the xanthine oxidase inhibition and anti-inflammatory activity. *Biochimie* v154, Pages 1-9
- 27. Reguia Mahfoudi , Amar Djeridane , Khedidja Benarous , Emile M. Gaydou , Mohamed Yousfi.**(2017). Structure-activity relationships and molecular docking of thirteen synthesized flavonoids as horseradish peroxidase inhibitors. *Bioorganic Chemistry* 74 , 201–211.

- 28. Richette, P., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Becce, F., Castañeda, S. J., Coyfish, M., Guillo, S., Jansen, T.L., Janssens, H., Lioté, F., Mallen, C., Nuki, G., Perez, R.F., Pimentao, J., Punzi, L., Pywell, T., So, A., Tausche, A.K., Uhlig, T., Zavada, J., Zhang, W., Tubach, F., Bardin, T.**(2016). 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Ann Rheum Dis* 2017 ;76, P29- 42.
- 29. RUBINO, M.** (2014). La goutte en 2014 : La pathologie et ses traitements, rôle du pharmacien d'officine. Thèse de doctorat, UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER, P106
- 30. SADERNE, S.** (2013). L'ACIDE URIQUE : UNE MOLÉCULE PHYSIOLOGIQUE POUVANT ÊTRE PATHOLOGIQUE. Université de Limoges.P26, 30et 108.
- 31. Saidi, M.et Zerrouki, A.** (2013). Activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydo- réductase in vivo de l'extrait brut éthanolique de feuilles de Clematis flammula. Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira, Bejaia. P 2 ,4, 8, 11, 13.
- 32. Talia Serseg and Khedidja Benarous.** (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*, 18, 000-000.
- 33. Trabsa H.** (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum*. Université Ferhat Abbas Sétif 1.P5,10,11,15.
- 34. Vitale, R.M., Lina, A., Margherita, G., Gennaro, R., Pietro, A.**(2017). Structure activity relationships of fraxamoside as an unusual xanthine oxidase inhibitor. *JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY*, 2017 VOL 32, 345–354

RÉSUMÉ

L'objectif principal de cette étude est de tester et évaluer l'effet inhibiteur des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens sur l'activité enzymatique de la xanthine oxydase du lait bovin, qui est une enzyme importante catalysant l'hydroxylation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique qui est excrété par les reins. Une production excessive et / ou une élimination inadéquate de l'acide urique entraîne une hyperuricémie. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition ainsi de savoir la nature des interactions entre ces inhibiteurs et la xanthine oxydase, nous avons utilisé le docking moléculaire avec le logiciel Autodock Vina. Les résultats *in vitro* obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 variant entre 0,96 µg/ml et 9,46 µg/ml contre la xanthine oxydase, ce qui est confirmé par les résultats du docking moléculaire. Ces médicaments nécessitent des études *in vivo* afin d'atteindre d'autre traitement plus efficace et avec moins d'effets indésirables contre la goutte et peuvent être utilisés pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XO.

Mots clés : Xanthine oxydase de lait bovin, anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibition, docking moléculaire, goutte, Autodock Vina.

Abstract

The main objective of this study is to test and evaluate the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the enzymatic activity of bovine milk xanthine oxidase, which is an important enzyme catalysing the hydroxylation of hypoxanthine to xanthine and the xanthine to uric acid that is excreted by the kidneys. Excessive production and/or inadequate uric acid removal leads to hyperuricemia. For better understanding of the inhibition mechanism thus knowing the nature of interactions between these inhibitors and xanthine oxidases, we have used molecular docking with AutoDockVina. The *in vitro* obtained results show that these molecules have an important inhibitory power with IC50 values ranging between 0.96 µg / ml and 9.46 µg/ml against xanthine oxidase, which is confirmed by the results of molecular docking. These drugs require *in vivo* studies in order to achieve treatment that is more effective with fewer secondary effects against gout and can be used to treat diseases that require inhibition of XO.

Key words: Bovine milk xanthine oxidase, non-steroidal anti-inflammatory drugs, inhibition, molecular docking, gout, AutoDockVina.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو اختبار وتقييم التأثير المثبط لعقاقير مضادات الالتهاب غير الستيرويدية على النشاط الأنزيمي للكرانتين أوكسيداز المستخلص من الحليب البقري ، وهو إنزيم مهم يحفز تفاعل الهيدروكسيل الهيبوكسانثين إلى الكرانتين ، ثم الكرانتين إلى حمض اليوريك الذي تطرحه الكلى. يؤدي الإنتاج المفرط و / أو عدم كفاية إزالة حمض اليوريك إلى فرط حمض يوريك الدم . من أجل فهم أفضل لآلية التثبيط ، وبالتالي معرفة طبيعة التفاعلات بين هذه المثبطات وأكسيداز الكرانتين، قمنا باستخدام تقنية الإرساء الجزيني مع برنامج الأوتودوك فينا. أظهرت النتائج المخبرية التي تم الحصول عليها أن هذه الجزينات لها قوة مثبطة مهمة حيث تتراوح قيم IC50 بين 0.96 ميكروغرام / مل و 9.46 ميكروغرام / مل ضد الكرانتين أوكسيداز ، وهو ما تؤكدته نتائج الإرساء الجزيني ، وتتطلب هذه الأدوية دراسات متعمقة في الجسم الحي من أجل تحقيق علاج أكثر فعالية وتقليل اثاره الضارة ضد النقرس ويمكن استخدامها لعلاج الأمراض التي تتطلب تثبيط هذا الإنزيم.

الكلمات المفتاحية: الكرانتين أوكسيداز المستخلص من حليب البقر ، مضادات الالتهاب غير الستيرويدية ، تثبيط ، الإرساء الجزيني ، النقرس ، الأوتودوك فينا.