

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

**Étude de l'effet inhibiteur de quelques extraits et
molécules pures sur la xanthine oxydase:
traitement de la goutte.**

Présenté par : Aoudéche Karima ; Haddadi Imane

Devant le jury :

Président(e) : Pr YOUSFI Mohamed (Pr)

Examinatrice : Dr NIA Samira (MCB)

Rapporteur : Dr BENAROUS Khedidja (MCA)

Co-rapporteur : M. LINANI Abderrahmane (Ing)

Soutenu publiquement le : 21/06/2018

Dédicaces

A mon très cher père : SAID

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai eu pour vous .Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A ma très chère mère : GUERMIT.M

Affable, honorable, aimable: vous représentez pour moi les symboles de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement. Vous n'avez pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mes très cher frères : ZINEDINNE ; FAYCEL ;

MOHAMED SALEH ; HOCINE

A ma très chère sœur : ZAHRA

A la femme de mon frère : Khedîdja

*Et sans oublier ma nièce TASNIME que j'adore
profondément.*

*A tous les membres de ma famille de LAGHOUAT et de
SKIKDA.*

A mon binôme: HADDADI IMANE

*En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments
que nous avons passé ensemble. Je te remercie.*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail
soit réalisé, merci.*

AOUDECHE KARIMA



Dédicaces

*Je dédie ce rapport de fin d'étude
A mon très cher père **MOUHAMEDE** qui est la source de ma réussite et ma
confiance, merci pour vos efforts déployés et ta prière, Je vous souhaite une
longue vie et une bonne santé et de bonheur*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de
mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman **REBBAHI. S** que j'adore.*

*A la source de ma force et ma fierté mes Chers frères
ABD EL WAHIDE et **OMAR**,
Merci pour tons amour fraternelle tons soutien et encouragement
A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de
ce projet : **mon mari** et A toute la famille **TRICHE***

*A la source de joie et d'optimisme mes chères sœurs
AMINA et **IKRAM**
sans oublier*

*La femme de mon frère : **Manel***

*A la sœur de cœur mon binôme **KARIMA** qui est
toujours à mes côtés, aidé, et qui m'accompagné durant mon chemin d'études
supérieures et A toute la famille **AOUDECHE**
, je vous dis merci.*

A toute personne qui me connait.

IMANE HADDADI



Remerciement

Ce travail a été réalisé en collaboration entre le laboratoire d'enzymologie du département de biologie Université Amar thelidji et le laboratoire de transfusion du sang (CTS) Ahmed ben Adjila de Laghouat

Nous remercions avant tout Allah le tout puissant de nous avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

*Nous exprimons nos remerciements à notre promotrice docteur **BENAROUS KHEDIDJA** pour la confiance et les conseils qu'elle nous a accordés tout au long de ce travail. Nous n'oublierons jamais la disponibilité, la gentillesse, les encouragements et les qualités scientifiques exceptionnelles qu'elle a mises au service de nos apprentissages tout au long de notre collaboration. Merci également pour votre encadrement.*

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.

*Un grand merci à toute l'équipe de laboratoire de sérologie, Nous remercions Sincèrement monsieur **Abderrahmane Linani** pour toutes ses aides inestimables et leur soutien. Bien que nous ayons eu peu de contacts, ils ont toujours été gentils, agréables et enrichissants.*

Enfin nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

Les Xanthines oxydases, sont des enzymes qui appartiennent à la classe des oxydoréductases, ils sont responsables de la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique. Ce dernier représente plus de la moitié de l'activité antioxydante. Cependant, l'élévation de son niveau dans le sang engendre une hyperuricémie qui peut s'aggraver et générer d'autres maladies telles que la goutte. L'objectif principal de cette étude est de tester la capacité d'inhibition de l'activité enzymatique de la xanthine oxydase du lait bovin par des extraits des graines de *Lepidium sativum* et des molécules pures comme les composés phénoliques et de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition ainsi de savoir la nature des interactions entre ces inhibiteurs et la xanthine oxydases en utilisant le docking moléculaire avec le logiciel GOLD. Les résultats obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 varient entre 0,012 mg/ml et 0,051 mg/ml contre la xanthine oxydase, ce qui est confirmé par les résultats du docking moléculaire. Nous proposons que ces molécules puissent être employées dans le traitement de la goutte après les tests in vivo.

Mots clés: Xanthine oxydase de lait bovin, *Lepidium sativum*, inhibition, composés phénoliques, alcaloïdes, docking moléculaire, goutte.

Liste des abréviations

- BMXO : Bovine milk xanthine oxidase
- AA % : pourcentage de l'activité anti oxydante
- ChE : Chloroform extract
- EAc : Extrait d'acétate d'éthyle
- ELS : Extraits de lipidium sativum
- EBr : Extrait brut
- ECh : Extrait de chloroforme
- EHx : Extrait d'héxane
- FAD : Flavine adénine dinucléotide
- FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide réduit
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
- I % : Pourcentage d'inhibition
- IC₅₀: la concentration inhibitrice à 50%
- MeOH : Méthanol
- Mo : Molybdène
- NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide
- NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
- NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
- NADPHO : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit oxydase
- XDH : Xanthine déshydrogénase
- XO : Xanthine oxydase
- XOR : Xanthine oxydoréductase
- AU : Acide urique

Liste des figures

Figure 1. Le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain.....	7
Figure 2. Cristaux d'urate monosodique intracellulaire typique de la goutte.....	9
Figure 3. Effet de l'allopurinol sur la réaction de la xanthine oxydase.....	12
Figure 4. Structure du Fébuxostat.....	13
Figure 5. Structure de la colchicine	13
Figure 6. Photo des fleurs du colchique	14
Figure 7. Photos représentant la partie aérienne et les graines de <i>Lepidium sativum</i>	16
Figure 8. Procédure de l'extraction de la xanthine oxydase.....	17
Figure 9. Schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes.....	19
Figure 10. Procédure de l'extraction des extraits : d'hexane (EHx), du chloroforme (ECh), d'acétate d'éthyle (EAc) de <i>Lepidium sativum</i>	20
Figure 11. Représentation graphique de l'inhibition de la réaction catalysée par la XO.	27
Figure 12. Représentation d'une pose de docking de l'acide gallique sur la xanthine oxydase	29
Figure 13. Représentation d'une pose de docking de la catéchine sur la xanthine oxydase.....	29

Liste des tableaux

Tableau 1. Les Facteurs de risque de crise de la goutte (Arthritis et Rheumatism .,2008).	9
Tableau 2. Les Phases de la goutte.	10
Tableau 3. Teneur, aspect et couleur des différents extraits de la plante <i>Lepidium sativum</i>	24
Tableau 4. Les valeurs d'IC50 des inhibiteurs.	25

Table des matières

<i>Dédicaces</i>	II
<i>Dédicaces</i>	III
<i>Remerciement</i>	IV
RÉSUMÉ.....	V
<i>Liste des abréviations</i>	VI
<i>Liste des figures</i>	VII
<i>Liste des tableaux</i>	1
INTRODUCTION GENERALE	3
Synthèse bibliographique	6
1. La goutte	7
2. Les causes	8
3. Diagnostique	9
4. Symptômes	10
5. Traitement de la goutte :	11
MATERIELS ET METHODES	15
1. Matériel	16
2. Protocoles expérimentaux	17
3. Docking moléculaire	21
RESULTATS ET DISCUSSION	23
1. Rendement d'extraction en métabolites secondaires	24
2. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase	25
3. Docking moléculaire :	28
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	33

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines (Nostro et al.,2000) ,parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique (Nostro et al., 2000),ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humainequi peuvent guérir les malades avec moins d'effets secondaires ,parmi ces composés bioactifs on a les polyphénols.Ces derniers possèdent un pouvoir inhibiteur de plusieurs enzymes (Van Hoorn et al. 2002).

La goutte est l'une des maladies les plus anciennes du monde animal, comme le montre le célèbre squelette de Sue (Tyrannosaures rex) avec des lésions osseuses caractéristiques. En outre, l'arthrite goutteuse a été parmi les premières maladies à être reconnu comme une entité clinique. D'abord identifiée par les Égyptiens à 2640 av. J.-C. ; elle a été reconnue plus tard par Hippocrate dans le Ve siècle avant J.-C. et, six siècles plus tard, par Galien (Nuki et Simkin, 2006 ; Punzi et al.,2012).

La goutte est une maladie chronique fréquente liée au métabolisme de l'acide urique, dont la manifestation clinique la plus caractéristique est une mono-arthrite aiguë de gros orteil. Elle est associée, bien que de façon inconstante, à une augmentation du taux circulant d'acide urique, l'acide urique est le dernier produit du métabolisme des composés puriniques dont l'élimination se fait par voie rénale. Il représente la moitié de la capacité antioxydant chez l'Homme. Cependant, son accumulation dans le sang induit une hyperuricémie, facteur de risque de plusieurs maladies (Kaur et Halliwell, 1990).dont la goutte.Son évolution sans traitement se fait vers le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain avec une prédilection pour les articulations (arthrite goutteuse),la peau (tophus) et les reins (néphropathie uratique)conduisant au maximum de destruction articulaire et une insuffisance rénale potentiellement fatale.

La thérapeutique 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, 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 (Dalbeth et Stamp, 2007 ; Richette, 2010 ; Ea, 2012). L'allopurinol est recommandé pour être la première ligne de diminution de l'AU chez les patients goutteux et d'insuffisances rénales (Dalbeth et Stamp, 2007).

En Algérie, beaucoup de plantes sont traditionnellement utilisées pour traiter les maladies inflammatoires, en particulier la goutte. Parmi ces plantes *Lepidium sativum*, appartenant à la famille des Brassicaceae et connue sous le nom commun «Habe erachade», cette plante est connue pour sa spécificité très répandue dans le soin de nombreuses maladies inflammatoires comme l'arthrite et la goutte, elle est largement utilisée, malgré son utilisation très vaste dans la médecine traditionnelle, *L. sativum* reste très peu étudiée et spécialement dans la lutte contre la goutte.

Un alcaloïde dénommé de manière générique diverses molécules à bases azotées, le plus souvent hétérocycliques, très majoritairement d'origine végétale (Arshad et al., 2008 ; Astulla et al., 2008).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, ce sont des composés mineurs par rapport aux composés des métabolites primaires, ils sont très répandus dans le règne végétal, ils possèdent des activités biologiques : antioxydants, anti radicalaire, anticancéreux, inhibiteurs d'enzyme...) (Benarous., 2007).

L'objectif majeur de cette étude est de chercher et d'analyser la capacité d'inhibition de la xanthine oxydase par des extraits naturels et quelques molécules pures y-compris des composés phénoliques et des alcaloïdes extraite à partir des grains de *Lepidium sativum* afin d'atteindre le but de trouver un traitement contre la goutte.

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

Synthèse bibliographique

1. La goutte

La goutte est une maladie chronique fréquente liée au métabolisme de l'acide urique, dont la manifestation clinique la plus caractéristique est une mono-arthrite aiguë de gros orteil (70 % des cas). Elle est associée, bien que de façon inconstante, à une augmentation du taux circulant d'acide urique (hyper uricémie) (Nuki et Simkin, 2006 ; Punzi et al.,2012). Son évolution sans traitement se fait vers le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain (figure 1) une prédilection pour les articulations (arthrite goutteuse) chevilles (7%) et genoux (5%) surtout, plus rarement une autre articulation du pied (4%), la peau (tophus) et les reins (néphropathie uranique), L'articulation devient alors rouge violacé et enflée. Conduisant au maximum de destruction articulaire et une insuffisance rénale potentiellement fatale (Nuki et Simkin, 2006 ; Rome et al.,2011).

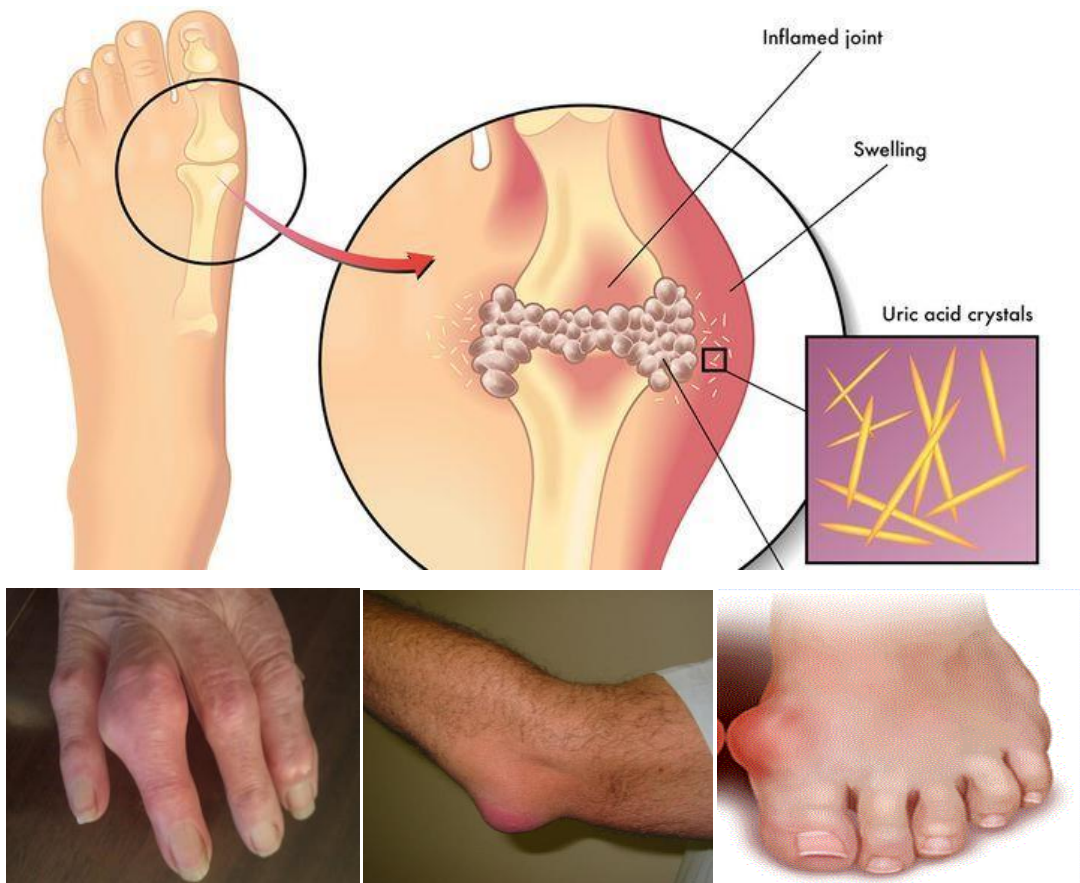


Figure 1. Le dépôt de l'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme humain.

(Nuki et Simkin, 2006 ; Rome et al.,2011)

2. Les causes

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 (Nuki et Simkin, 2006 ; Rome et al.,2011).

Les facteurs de risque sont énumérés dans (le tableau 01). On peut les diviser en deux catégories : facteurs de risque modifiables (la diète, la consommation de fructose et d'alcool, l'obésité et la médication) et non modifiables (le sex masculin, la ménopause, l'histoire familiale (40-70% Génétique) presque 28 gènes identifiés, l'insuffisance rénale et le statues post greffe) (Arthritis et Rheumatism .,2008).

Retenons que les principaux sont : la consommation des élément riche en purines qui sont en grande quantité dans le foie, les reins, le cerveau de bœuf, les extraits de viande ; les anchois, les sardines (Lippi et al.,2008), et dans les légumes tels que les haricots, les asperges, les épinards et les champignons (Lee et Terkeltaub, 2005).

L'apport excessif en fructose est directement lié à une augmentation de l'acide urique sérique et en cas de glycémie élevée (chez le diabétique) et de réserve de glycogène reconstituée, il y'aura une dérivation du métabolisme des nucléotides adényliques vers la production d'AU (Lecerf, 2009).

Les purines iatrogènes proviennent des traitements médicamenteux comme les chimiothérapies anticancéreuses et des traitements hypo-uricémiants. Les diurétiques sont les principaux pourvoyeurs d'hyper uricémies secondaires, avec singularité, la constitution silencieuse de tophus (Bannwarth, 2005) (Tableau 1).

Tableau 1. Les Facteurs de risque de crise de la goutte (Arthritis et Rheumatism .,2008).

Facteurs de risque modifiables	Facteurs de risque non-modifiables	Facteurs de risque déclencheurs
Diète riche purine	Sexe masculin	Chirurgie
Obésité	Ménopause	Trauma
AAS faible dose, diurétique	Histoire familiale	Introduction AAS à faible dose ou diurétique
Alcool : bière, spiritueux	Insuffisance rénale	Alcool : bière, spiritueux
Boisson sucrée riche en fructose	Statut postgreffe	Boisson sucrée riche en fructose Jeûne ou excès alimentaire (riche en purine : anchois, hareng, abat)

3. Diagnostique

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 intracellulaire (Figure 2).

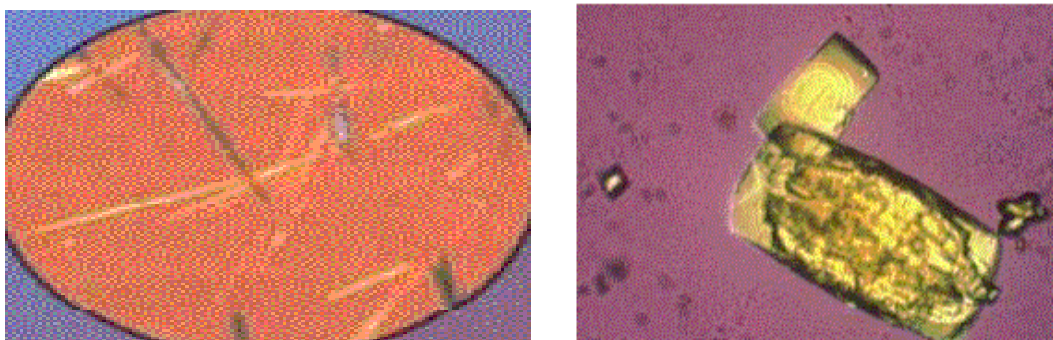


Figure 2. Cristaux d'urate monosodique intracellulaire typique de la goutte

(Louis et Guerne ;2014)

4. Symptômes

La goutte est l'une des arthropathies inflammatoires les plus fréquentes. Elle affecte surtout les hommes entre 40 et 50 ans, mais elle peut également toucher les femmes, particulièrement après la ménopause (Arthritis et Rheumatism .,2008).

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 (Tableau 02).

Tableau 2. les Phases de la goutte.

(Mark .H, M.D., FRCP(c), FACP ;2012)

Phase biologique	Les 3 phases cliniques		
	Goutte aiguë	Goutte intercritique	Goutte tophacée
Hyperuricémie asymptomatique	Douleur subite, fièvre possible jusqu'à 38 °C	Période asymptomatique entre les crises	Douleur chronique avec exacerbation aiguë possible
	Classiquement : gonflement, rougeur, chaleur	Durée variable (jusqu'à 20 ans sans crise)	Gonflement, chaleur
La grande majorité des hyperuricémiques n'auront pas de crise de goutte (~ 85 %) Voir : facteurs de risque hyperuricémie	Monoarticulaire, souvent oligoarticulaire (<5 art.) rarement polyarticulaire (<20 %)	60 % auront une 2e crise durant la première année 72 % en dedans de 2 ans 90 % en dedans de 10 ans	Atteinte polyarticulaire peut ressembler à la PAR
	Le plus souvent tarse, chevilles et genoux		Atteintes petites (mains-pieds) et grosses articulations
	Durée : 7 à 10 jours		Tophus : oreille, coudes, mains, pieds

Des données récentes issues de travaux de recherche humaine et animale soulèvent plusieurs questions quant à la relation entre l'hyperuricémie et le syndrome métabolique, l'hypertension artérielle, la maladie vasculaire athérosclérotique et l'insuffisance rénale (Arshad et al.,2008). Il serait possible que l'hyper uricémie ces

problèmes et joue un rôle pathogénique dans leur survenue. Par contre, il est encore prématuré pour justifier le traitement de l'hyperuricémie asymptomatique (Arthritis et Rheumatism .,2008). Effectivement, le lien de causalité n'est pas encore clairement documenté par des études à long terme.

5. Traitement de la goutte :

5.1 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 recouru 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 (Richette, 2011).

5.2 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, 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 (Figure 03) (Dalbeth et Stamp, 2007 ; Richette, 2010 ; Ea, 2012). L'allopurinol est recommandé pour être la première ligne de diminution de l'AU chez les patients goutteux et d'insuffisances rénales (Dalbeth et Stamp, 2007).

5.2.1 L'allopurinol :

L'inhibition de cette enzyme est une approche thérapeutique très utilisée dans le traitement ou la prévention de cette maladie.

L'allopurinol est le premier inhibiteur de la xanthine oxydase (Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis, 2007), le plus utilisé en médecine humaine et vétérinaire pour traiter l'hyperuricémie primaire et secondaire ; il appartient à la famille des purines et de structure analogue à l'hypoxanthine, Cette molécule s'attache d'une manière compétitive à la xanthine oxydase en inhibant la production de l'acide urique dans le foie .et diminue donc le taux d'AU dans le plasma et augmente les concentrations d'hypoxanthine et de xanthine. Ces derniers sont plus solubles que l'AU et sont éliminés par voie urinaire (Hitchings, 1966 ; Klein et

al.,1996 ; Dallwig, 2010 ; Faure, 2010).

Malheureusement, l'administration de l'allopurinol chez certains patients a conduit au développement de quelques réactions allergiques connues par l'AIS (Allopurinol Intolerance Syndrome) (Galbusera et coll.,2006). Ces symptômes sont dus au métabolite secondaire de l'allopurinol appelé oxypurinol qui joue aussi le rôle d'un inhibiteur non compétitif de la xanthine oxydase (figure 3)(Hitchings, 1966 ; Klein et al., 1996;Dallwig,2010;Faure,2010).

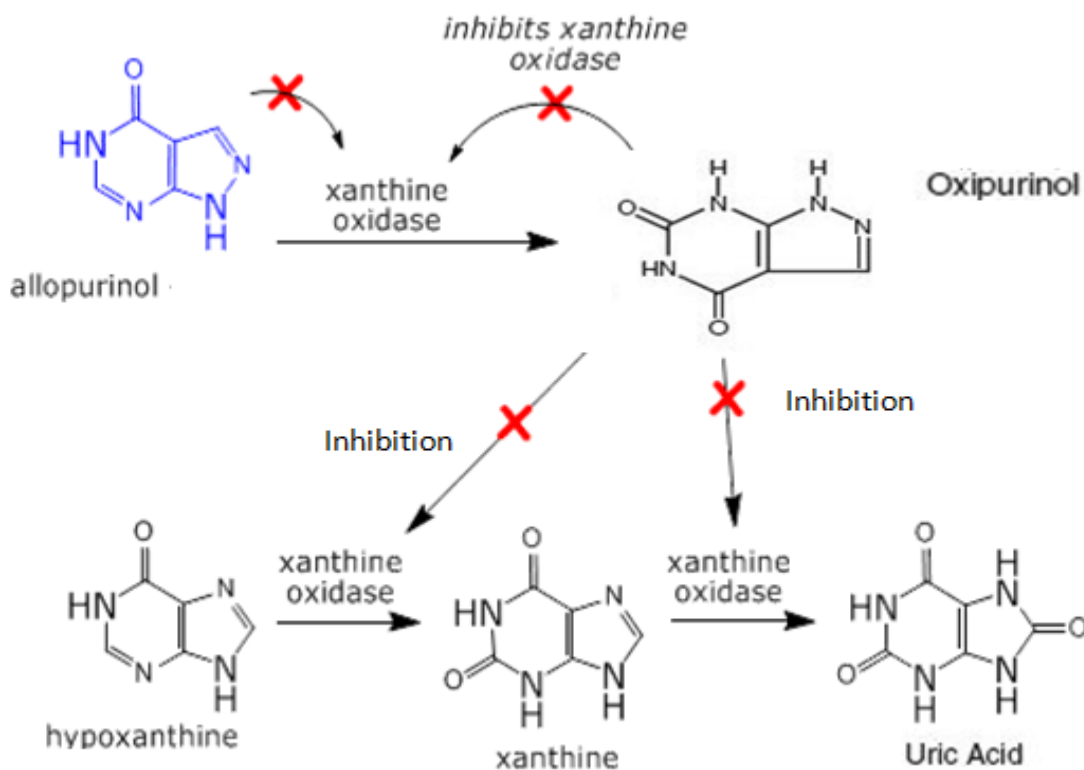


Figure 3. Effet de l'allopurinol sur la réaction de la xanthine oxydase

5.2.2 Fébuxostat

Le second inhibiteur est le fébuxostat (dérivé 2-arylthiazole), un inhibiteur sélectif de la xanthine oxydase (Edwards. N. L Rheumatology, 2009). En occupant le canal de l'enzyme conduisant au site actif, le fébuxostat (Figure 04) bloque l'accès du substrat naturel de la xanthine oxydase, ce qui réduit la production de l'acide urique. Cette molécule inhibe à la fois les formes réduite et oxydée de la xanthine oxydase. Bien qu'il soit efficace sur l'hyperuricémie, cet inhibiteur trouve des limites d'utilisation en cas d'insuffisance rénale sévère, de problème hépatique, et il est contre-indiqué chez les sujets

de moins de 18 ans (Edwards. N. L, Febuxostat hyperuricaemia in gout, RHEUMATOLOGY, 2009).

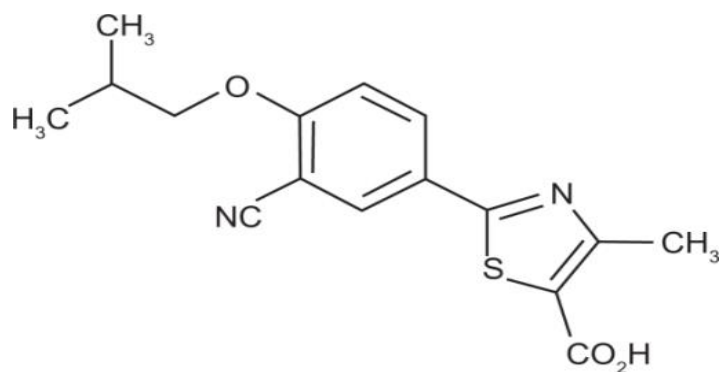


Figure 4. Structure du Fébuxostat

5.2.3 Colchicine :

La colchicine (figure 05), une molécule isolée du bulbe et des graines du colchique (figure 06). Bien qu'elle fût efficace contre l'inflammation goutteuse, elle était incapable de diminuer le taux élevé de l'acide urique (Gutman et coll ;1951). Ont mis au point le premier hypo-uricémiant appelé probénécide. Son mode d'action est basé sur l'inhibition de la réabsorption tubulaire des urates (colchicine BMJ,2005). Cependant, pour avoir des résultats meilleurs, les recherches sont dirigées vers l'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase.

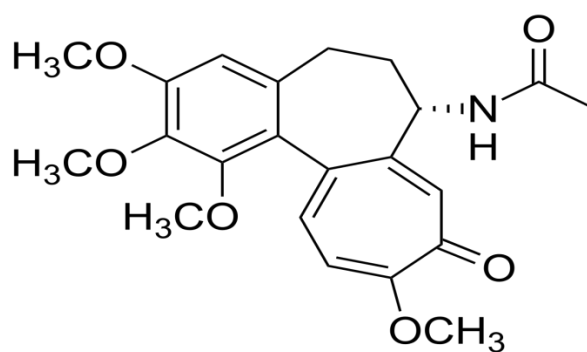


Figure 5. Structure de la colchicine



Figure 6. Photo des fleurs du colchique

(Pr Jean et Senard.M 2009)

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

Le lait bovin frais a été obtenu d'une ferme qui se trouve aux environs de la Wilaya de Laghouat.

Lepidium sativum (Haberachade), une plante médicinale appartenant à la famille des Brassicaceae a été achetée d'un vendeur d'herbe au centre-ville de Laghouat, au mois d'Avril 2018. Elle a été identifiée au Laboratoire de botanique, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Laghouat.

Noms communs : cresson alénois, cresson d'Inde, cresson des jardins, passerage cultivée, cresson de fontaine, cresson d'eau, cresson officinal.

Noms scientifiques : *Lepidium sativum*, *Nasturtium officinale* (*Rorippa nasturtium-aquaticum*).

Famille : brassicacées (crucifères).

Le mot « **cresson** » est apparu dans la langue française en 1130. Il vient du francique *kresso*, qui signifie rampant.

Il existe différentes variétés comestibles de cresson. Nous parlerons ici du cresson de **fontaine** : (cresson d'eau) et du cresson alénois. Le premier a un goût plutôt poivré et une saveur légèrement plus forte que le second. Les antioxydants du cresson préviendraient l'apparition de certains cancers et auraient des effets bénéfiques sur la santé de l'oeil. Le cresson serait aussi efficace contre les maladies cardio-vasculaires.

Pourvu de 93% d'eau, le cresson est un légume feuille parfait pour les régimes et idéal pour accompagner de façon diététique les viandes et poissons. D'ailleurs, ses fibres douces aident naturellement votre digestion (figure 07).



Figure 7. Photos représentant la partie aérienne et les graines de *Lepidium sativum*

1.2 Matériel chimiques et instrumentation

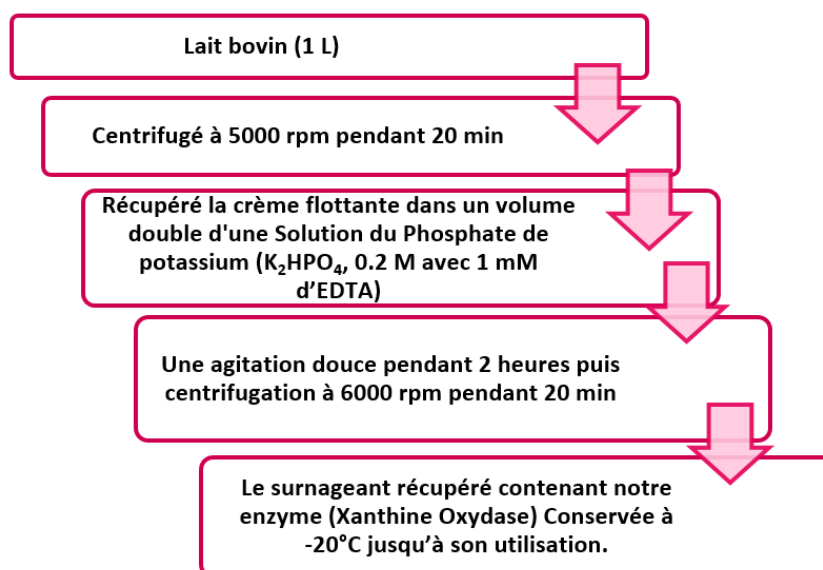
Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: phosphate de potassium, Ethylene Diamine Tetraacetic Acid , Chlorure de potassium, Acide chlorhydrique, sulfate d'ammonium, xanthine, quercétine, rutine, acide gallique, acide benzoïque, acide ascorbique, acide salicylique, les autres réactifs et solvants (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, diméthyl sulfoxyde) ont été obtenus de Pro labo.

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

2. Protocoles expérimentaux

2.1 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 figure8.



Remarque: toutes les étapes ont été effectuées à $4^\circ C$

Figure 8. Procédure de l'extraction de la xanthine oxydase

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

2.2 Test de l'activité de la xanthine oxydase (XO) :

L'activité de la XO a été testée par l'ajout d'un volume de 800µl de réactif de dosage d'acide urique de la marque SPINE qui donne une coloration rose indiquant la production de l'acide urique à 490 nm, avec un volume de 100 µl de xanthine comme substrat et de l'enzyme dilué dans le tampon phosphate à pH 7. Après une incubation à 37 C° pendant 30 min, le facteur de dilution de l'extrait enzymatique brut est fixé avec une absorbance équivalente à 0,800.

2.3. Principe du réactif du dosage :

Chez l'être l'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'urico-élimination 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 de l'hyperuricémie (Bernard.,1989; Tietz., 1999).

Nous avons utilisé le réactif de dosage de l'acide urique de la marque SPINE, largement utilisés dans les analyses médicales pour doser l'acide urique. Ce dernier est oxydé par l'uricase 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 520nm (490-530), est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans les spécimen (Tietz.,1999 ;Fossati et al.,1980). Le schéma réactionnel est présenté dans la figure 9.

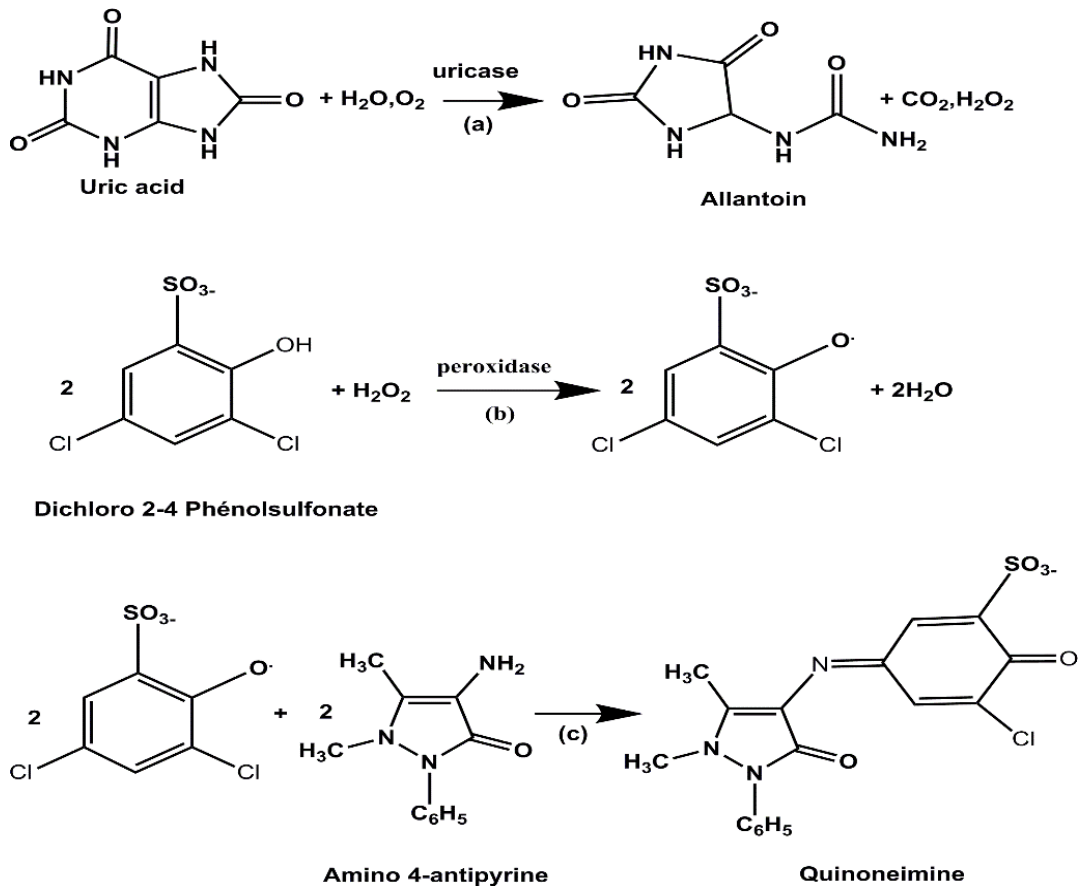


Figure 9. Schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes.
(Fraise et al., 2002)

- (a) Incubation de l'acide urique avec l'uricase. **1**
- (b) L'oxydation de Dichloro 2-4 Phénolsulfonate par la peroxydase. **2**
- (c) L'association de radical phénoxy avec Amino 4-antipyrine. **3**

L'acide urique et ses sels sont le produit final de la dégradation des purines. Dans une insuffisance rénale progressive, il y a une rétention dans le sang d'urée, créatinine et acide urique. Des niveaux élevés d'acide urique indiquent une pathologie rénale et sont généralement associés à la goutte. Le diagnostic clinique doit être réalisé en tenant compte de toutes les données cliniques et de laboratoire.

2.4 L'extraction des extraits de *Lepidium sativum* :

Les extraits de la plante *Lepidium sativum* : ont été obtenus selon les protocoles d'extractions montrés dans la figure 9.

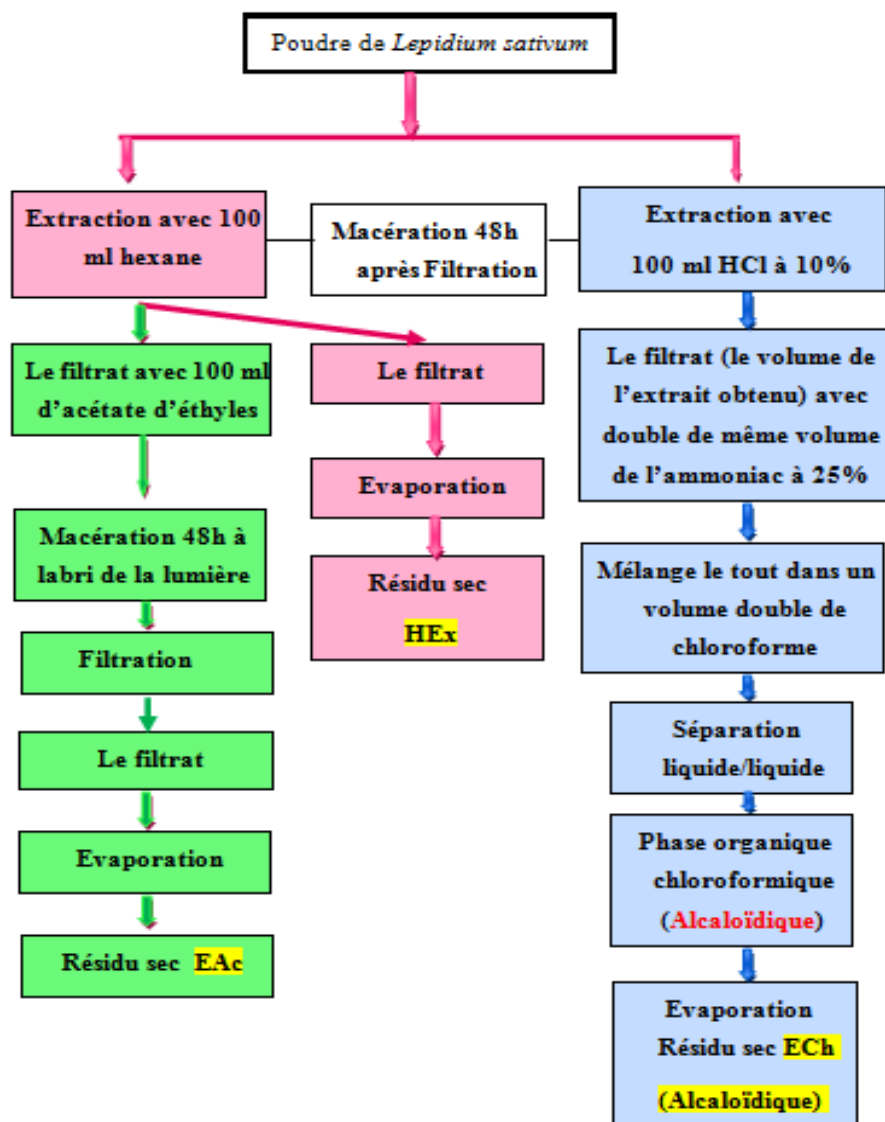


Figure 10. Procédure de l'extraction des extraits : d'hexane (EHx), du chloroforme (ECh), d'acétate d'éthyle(EAc) de *Lepidium sativum*.

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

Nous avons testé l'activité inhibitrice de nos extraits et quelques molécules pures à l'aide d'un lecteur à microplaque à 96 puits, après plusieurs essais afin de déterminer les concentrations nécessaires de l'inhibiteur, dont le volume final du milieu réactionnel égale à 250µl.

Un volume de 40 µl de l'extrait enzymatique dilué dans le tampon est ajouté à 20 µl de l'inhibiteur (la molécule pure ou extrait dilué avec 8 concentrations croissantes), ce mélange est prè-incubé pendant 10minà37°C. La réaction enzymatique est déclenché par l'ajout de 20µl 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 ambiante (25 °C) pendant 5 min, la lecture est effectuée à 490 nm dans le lecteur de microplaque. Le blanc de la plaque est dépourvu du substrat et de l'inhibiteur et celui de l'inhibiteur est dépourvu de substrat.

Ce protocole est optimisé pour la première fois et aucune étude préalable n'a été trouvé, rappelons que l'utilisation des trois extraits ainsi les molécules pures est appliquée pour la première fois avec ce protocole. Toutes les expériences ont été répétées plusieurs fois pour s'assurer des résultats obtenues (plus de 5 fois).

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

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

Avec :

- I % : le pourcentage d'inhibition.
- A extrait : l'absorbance de l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur.
- A control : l'absorbance de l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur.

Le paramètre d'inhibition IC₅₀ se définit par la concentration nécessaire de l'inhibiteur pour inhiber 50 % de l'enzyme ou diminuer 50% de l'activité enzymatique (IC₅₀).

3. Docking moléculaire

Lepidine B, catéchine et acide gallique ont été obtenues à partir de la banque de données de PubChem, ils ont été assemblés avec le logiciel Discovery Studio visualizer v4.0. La structure 3D de la xanthine oxydase du lait bovin (PDB ID: 3NVY) a été obtenu à partir de la banque de données de protéine (PDB). Cette structure est choisie car elle est cristallisée avec l'inhibiteur quercétine 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 (quercétine). En revanche, le co-facteur 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 pymol, le fichier de configuration utilisé dans le logiciel GOLD est préparé ou nous avons fixé les acides aminés du site actif, afin de spécifier le docking. Le nombre de solutions est fixé à 10, chaque inhibiteur donne ses propres solutions en se basant sur l'énergie d'association entre l'enzyme et l'inhibiteur. Toutes les solutions ont été bien traitées et les

conformations préférées étaient celles de la plus basse énergie de liaison avec le site actif. Les résultats de docking produits ont été directement étudiés dans le pymol. Les interactions hydrogènes avec leurs distances interatomiques exactes a été déterminés avec le logiciel Pymol.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendement d'extraction en métabolites secondaires

Les extraits obtenus, présentent des différents aspects et des couleurs différentes. Les teneurs de ces différentes fractions, leurs couleurs ainsi que leurs aspects sont consignés dans le Tableau 03.

Tableau 3. Teneur, aspect et couleur des différents extraits de la plante *Lepidium sativum*.

<u>Nom de l'extrait</u>	<u>Couleur</u>	<u>Aspect</u>	<u>Teneur (%)</u>
<u>Hexanique</u> (Pigment apolaire)	Jaune	Huileux	2,72
<u>Chloroformique</u> (Alcaloïdes)	Beige	Cristaux	0,06
<u>Acétate d'éthyle</u> (Les terpènes +les composés phénoliques)	Jaune	Visqueux	3,74

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que tous les extraits ont montré différentes couleurs variant du beige au jaune. Ainsi, que la teneur d'extrait acétate d'éthyle (3,76 %) est la plus élevée suivie par celle de l'extrait hexanique est de 2,72 % et de l'extrait chloroformique 0,06%

En comparant ces résultats avec d'autres travaux, nous pouvons dire que l'extrait hexanique présente une teneur plus élevée que les mêmes extraits pour les plantes suivantes : *Globularia alypum* (1,78%), *Teucrium polium* (2,01 %), *Juniperus oxycedrus* (1,244), *Ajuga iva* (2,38%), En revanche, cette teneur est plus faible que celle du *Juniperus phoenicea* (2,90%), (Serseg, 2017). Ces résultats peuvent être interprétés par la partie de la plante utilisée (graines) qui sont connues de leurs réserves en lipides, alors, que les autres parties des plantes, c'étaient des parties aériennes. La même observation est enregistrée pour les extraits d'acétate d'éthyle par rapport aux même plantes.

Pour l'extrait des alcaloïdes, nous avons enregistré une faible teneur par rapport à celle enregistrée pour la plante de *Peganum harmala* (5,6%), (Benarous et al, 2013 et 2015). Ceci est expliqué par la différence de la méthode d'extraction ainsi la richesse des graines de chaque plante.

Ces différences de rentabilité des métabolites s'expliquent par la méthode d'extraction et le type de solution utilisée, ainsi que la date et la région de récolte des plantes. Dont les facteurs externes affectent le type, la qualité et la quantité des métabolites de la plante.

2. Inhibition de la réaction catalysée par la xanthine oxydase

Afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur de nos molécules et extraits sur l'activité de cette enzyme dans le but de trouver un traitement de la goutte, l'activité de la xanthine oxydase du lait bovin a été inhibée par les différents inhibiteurs, avec une inhibition de 50% de l'activité originale de l'enzyme, 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 échantillon dont les courbes sont représentés dans la figure 11. Ces représentations graphiques nous a permis de déterminer les valeurs des IC₅₀ où les valeurs sont enregistrés dans le tableau 4.

Tableau 4. Les valeurs d'IC₅₀ des inhibiteurs.

Inhibiteurs	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait hexanique	0,026±0,002	26±2
Extrait chloroformique	0,023±0,001	23±1
Extrait acétate d'éthyle	0,018±0,002	18±2
Acide ascorbique	0,048±0,001	48±1
Acide gallique	0,051±0,003	51±3
Acide benzoïque	0,019±0,009	19±9
rutine	0,012±0,002	12±2

Les résultats obtenus montrent que tous extraits et les molécules pures 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 12µg /ml (pour la rutine) à 51 µg /ml (pour l'acide gallique).

Beaucoup de recherches scientifiques ont été réalisées pour évaluer les effets anti-hyperurécémie et anti-goutte, des extraits des plantes médicinales sur l'activité de la xanthine oxydase dans le but de trouver un nouveau médicament naturel traitant ces maladies sans effets secondaires. Dans cette étude, nous avons fait la même chose et nous voulons comparer nos extraits naturels et molécules pures par ces travaux antérieurs.

Le médicament le plus utilisé contre la goutte est l'Allopurinol, qui présente une valeur d'IC₅₀ contre la XO bovine égale à $0,33 \pm 0,011 \mu\text{g} / \text{ml}$ (Fernanda *et al.*, 2016), mais l'inconvénient majeur de ce médicament est son temps $\frac{1}{2}$ court, c'est-à-dire chaque 4h, il faut administrer le médicament en plus il est hépatotoxique. Si nous comparons nos

inhibiteurs étudiés, nous pouvons dire que ce médicament est 10 fois plus efficace que nos inhibiteurs. En revanche, nos inhibiteurs et spécifiquement nos extraits naturel de Cresson sont plus efficaces que les extraits naturels de la plante *Pimenta pseudocaryophyllus* à savoir : l'extrait aqueux des feuilles ($IC_{50} = 109,7 \pm 3,92 \mu\text{g} / \text{ml}$) et l'extrait aqueux des branches de la même plante ($IC_{50} = 54,65 \pm 1,30 \mu\text{g} / \text{ml}$) (Fernanda *et al.*, 2016).

Selon Zhang *et al.*, 2018, la quercétine présente un IC_{50} de $0,82 \mu\text{g} / \text{ml}$, en la comparant avec nos composés phénoliques, elle plus 14 fois plus efficace que la rutine et 62 fois plus efficace que l'acide gallique.

L'objectif de cette comparaison est de savoir l'efficacité de nos extraits rappelant que la méthode de détection de l'inhibition est complètement nouvelle, elle est utilisée dans ce travail pour la première fois.

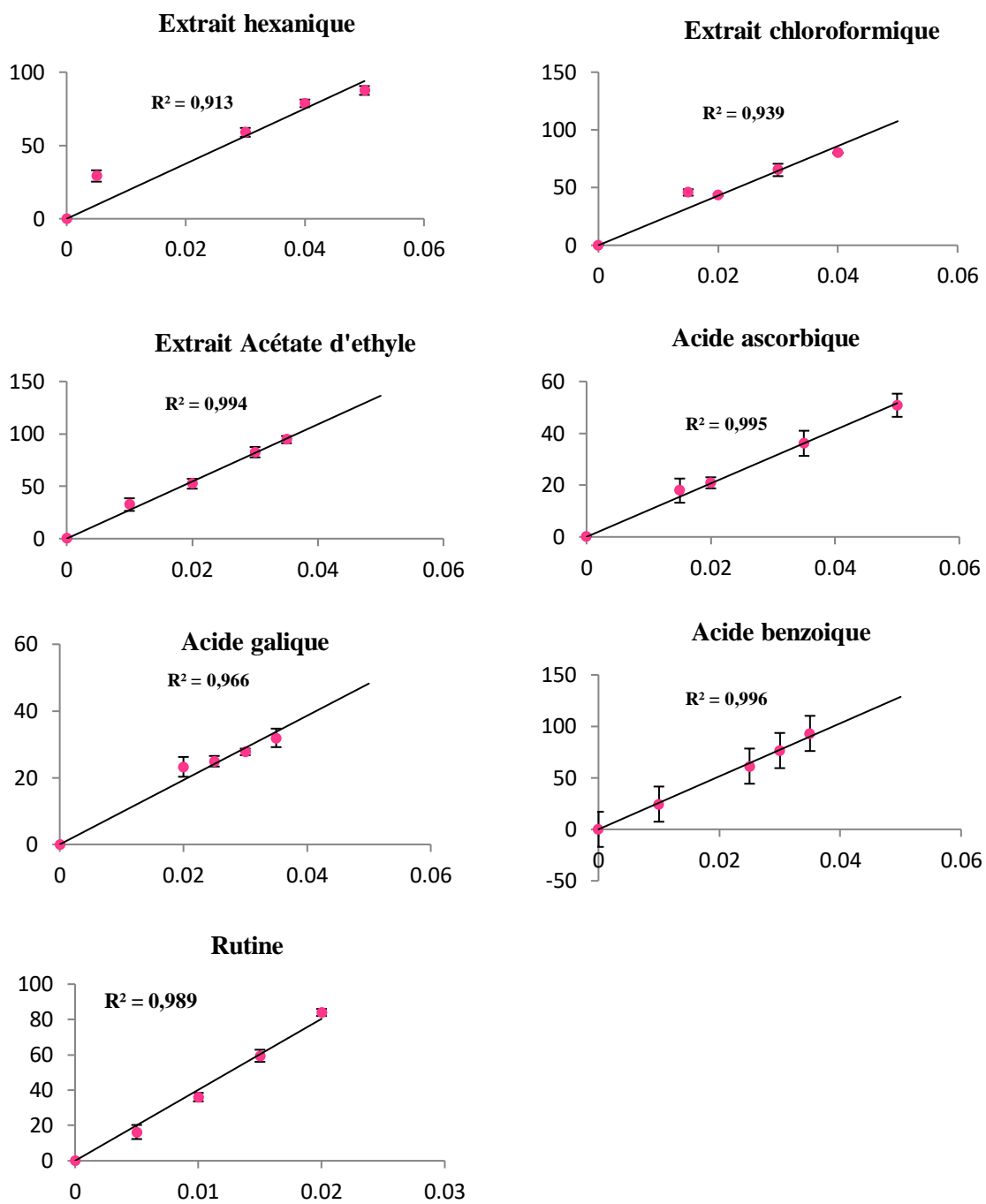


Figure 11. Représentation graphique de l'inhibition de la réaction catalysée par la XO.

3. Docking moléculaire :

Le docking est l'insertion d'un ligand au niveau d'un site récepteur d'une macromolécule en utilisant des logiciels bioinformatiques en collaboration avec l'algorithme génétique, cette méthode est utilisée pour l'étude des réactions de complexation généralement dans le domaine pharmacologique afin de déterminer les différents paramètres de cette fixation ainsi que son mécanisme catalytique, à titre d'exemple l'étude du complexe inhibiteur–transcriptase inverse du virus de SIDA afin de trouver un nouveau médicament contre cette maladie mortelle (Sealet *al.*, 2011).

Afin de réaliser le docking des deux inhibiteurs (catéchine et l'acide gallique) (figure 12 et 13) aux niveaux de l'enzyme xanthine oxydase, nous avons procédé à plusieurs étapes commençant par la préparation des inhibiteurs, à l'aide du logiciel « chembiooffice » selon la structure de lewis. Après ces étapes, nous avons préparé l'enzyme en téléchargeant le fichier à partir de la banque « pdb » suivant les mêmes étapes de la préparation des deux inhibiteurs.

Après le docking, nous avons obtenu de nombreuses solutions, nous allons accepter et refuser les solutions selon des critères bien déterminées qui se basent principalement sur l'énergie d'association du complexe enzyme-inhibiteur.

L'acide gallique est un composé phénoliques riche en groupements hydroxyles ce qui lui permet de former des liaisons hydrogènes avec les acides aminés du site actif. À travers le docking spécifique avec le GOLD, nous avons obtenu 10 solutions, nous avons trouvé plusieurs interactions hydrogènes dont les distances sont représentées dans la figure 12. L'acide gallique a présenté une distance interatomique de 2,4 Å entre l'atome d'oxygène du groupement carboxyle de la Glu 802 et l'une des deux extrémités hydroxyle de l'inhibiteur. Les autres sont de 3,8 et 3,4 Å comme ils sont présentés dans la figure 12.

La catéchine est flavonoïde composé de deux cycles aromatiques et un pyrone, ce qui lui permet de former des liaisons hydrogènes avec les acides aminés du site actif. Nous avons obtenu 10 solutions, nous avons trouvé plusieurs interactions hydrogènes dont les distances sont représentées dans la figure 13. La catéchine a présenté une distance interatomique de 1,6 Å entre l'atome d'oxygène du groupement carboxyle de la Glu 802 et l'une des deux extrémités hydroxyle de l'inhibiteur. Les autres sont de 2,2 et 3,6 Å comme ils sont présentés dans la figure 13.

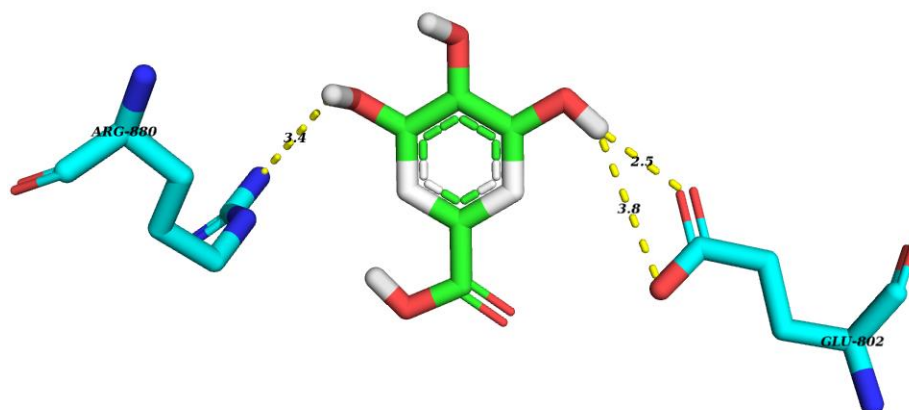


Figure 12. Représentation d'une pose de docking de l'acide gallique sur la xanthine oxydase avec les distances interatomiques des liaisons hydrogènes entre les acides aminés du site actif et l'inhibiteur.

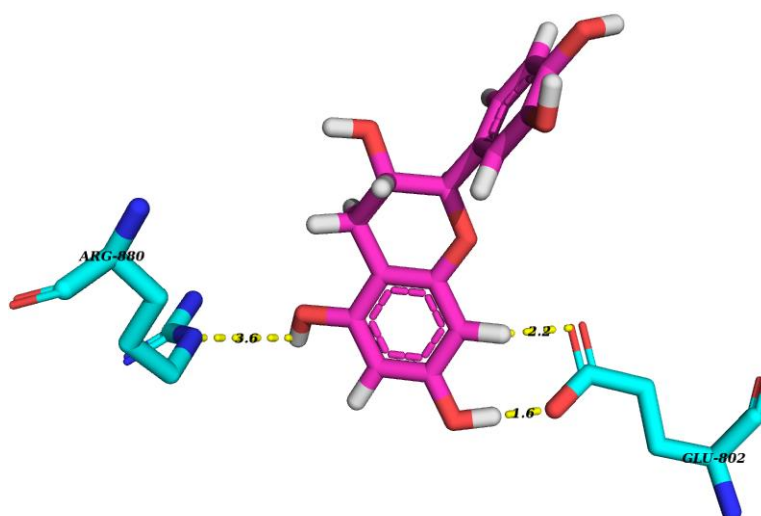


Figure 13. Représentation d'une pose de docking de la catéchine sur la xanthine oxydase avec les distances interatomiques des liaisons hydrogènes entre les acides aminés du site actif et l'inhibiteur.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La goutte est l'une des maladies les plus anciennes du monde animal, c'est une maladie caractérisée par une réaction inflammatoire, est le résultat de l'élévation de l'acide urique sérique jusqu'à formation de cristaux d'urate et déposition de ce dernier dans divers tissus et plus généralement les articulations.

C'est le domaine de recherche le plus impliqué actuellement. De cette approche, nous avons pensé de trouver un traitement de cette maladie à base des substances naturelles y-compris les composés phénoliques et les alcaloïdes ayant des propriétés pharmacologiques contre certaines maladies.

Dans notre étude, le choix des inhibiteurs à étudier est effectué selon leurs structures chimiques, nous nous sommes intéressées d'étudier leurs effets inhibiteurs contre la xanthine oxydase du lait bovin.

Les résultats expérimentaux obtenus à travers ce test montrent que tous les inhibiteurs possèdent une activité inhibitrice importante ce qui est affirmé par les valeurs des IC_{50} dont les valeurs varient de 12 à 51 $\mu\text{g/ml}$.

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.

L'ensemble de ce travail a permis donc de mieux connaître l'intérêt de l'étude des plantes médicinales de la région de Laghouat et les caractéristiques chimiques de certaines de leurs substances d'intérêt bioactif. De même, la modélisation par amarrage moléculaire présente une actualité importante vis-à-vis sa rapidité en le comparant avec les tests *in vitro* ou *in vivo*.

Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les molécules inhibitrices de la XO des extraits du *Lepidium sativum* doivent être isolées et identifiées, ainsi, ça nécessitent leurs tests *in vivo* afin d'étudier leurs potentialités comme des futurs médicaments contre la goutte.

Il reste encore beaucoup de plantes utiles locales qui n'ont pas été analysées et qui mériteraient de l'être afin de déterminer leurs potentialités dans les domaines étudiés. Ces plantes peuvent présenter plusieurs types d'activités biologiques par exemple des anti-inflammatoires, des antifongiques, des inhibiteurs d'enzymes, antibactériens, des anti

toxicités etc... Ainsi, il existe plusieurs molécules naturelles dans les différentes bases de données nécessite leurs modélisation moléculaire afin de déterminer les meilleurs inhibiteurs de la Xanthine oxydase.

Cette étude ne reste que préliminaire et peut servir de référence de base pour d'autres recherches et plusieurs perspective peuvent être envisagées :

- L'utilisation des extraits d'autre plantes riches en alcaloïdes, terpènes et composées phénolique ;
- L'étude et la détermination des principaux composés de *L. sativum*, ainsi que leur structure pour un résultat plus précis d'inhibition de la XO ;
- L'utilisation d'autre source d'enzyme par exemple le lait maternel ;
- Dosage des molécules responsables dans l'élimination et la réabsorption de l'acide urique sérique notamment les transporteurs ;
- Détermination de taux d'acide urique hépatique et l'activité de la XO/XDH sérique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arshad,N.,Zitterl-Eglseer,K.,Hasnain,S.,Hess,M.,2008.Effectof*Peganumharmala* or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytother. Res.* 22, 1533–1538.451 : 111-118.
2. Astulla, A., Zaima, K., Matsuno, Y., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Cholies Zaini, N., Morita, H., 2008. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities, *J Nat Med.*, 62:470–472.
3. Bannwarth, B. (2005). Problèmes rhumatologiques iatrogènes. *EMC-Médecine.* 2 : 378–384.
4. Benarous Khedidja, Isabelle Bombarda, Isabel Iriepa, Ignacio Moraleda, Herbet Gaetan, Abderrahmane Linani, Djillali Tahri, Mohamed Sebaa, Mohamed Yousfi, Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: *In silico* and *in vitro* studies, *Bioorganic Chemistry* 62 (2015) 1–7.
5. Bernard S, *Biochimie clinique-Instruments et technique de laboratoire diagnostique médicaux chirurgicaux.* 2^{cd} Ed.1989 p153-156 Ed. MALOINE PARIS.
6. Cen Zhang a,1 , Rui Wang a,1 , Guowen Zhang a, *, Deming Gong, Mechanistic insights into the inhibition of quercetin on xanthine oxidase. *International Journal of Biological Macromolecules* 112 (2018) 405–412.
7. Dalbeth, N. et Stamp, L. (2007). Allopurinol Dosing in Renal Impairment: Walking the Tightrope Between Adequate Urate Lowering and Adverse Events. *Seminars in Dialysis.* 20 (5) : 391-395.
8. Dallwig, R. (2010). Allopurinol. *Journal of Exotic Pet Medicine.* 19 (3) : 255-257.
9. determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters, *Analytical Biochemistry* 309 (2002) pp173–179.
10. Fernanda Cristina Ferrari, Rita de Cássia Lemos Lima, Zilma Schimith Ferraz Filha, Camila Helena Barros, Marcela Carolina de Paula Michel Araújo and Dênia Antunes Saúde-Guimarães, Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* extracts on gout: Anti-inflammatory activity and antihyperuricemic effect through xantine oxidase and uricosuric action, *Journal of Ethnopharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.007>
11. Galbusera. C, Orth. P, Fedida. D, Spector. T, Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase, *Biochemical Pharmacology*, 2006; 71: 1747-1752.
12. Hitchings, G.H. (1966). Effects of allopurinol in relation to purine biosynthesis. *Ann. rheum.Dis.* 25 : 601-607.

13. Hyperuricemia, *Arthritis Rheum.* 52 : 283-289.
14. K. BENAROUS, A. DJERIDANE, A. KAMELI, M. YOUSFI. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by secondary metabolites extracts of three Algerian plants and their antioxidant activities, *Current enzyme inhibition*, 2013, 9 (1): 75-82
15. Kaur, H. et Halliwell, B. (1990). Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem.-Biol Interactions.* 73 : 235-247.
16. Laurent Fraisse, Marie Claude Bonnet, Jacques Philippe de Farcy, Christophe Agut, Didier Dersigny et Alain Bayol, A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters.
17. Lecerf, J.M. (2009). Effets métaboliques du fructose et du miel. *Phytothérapie.* 7 : 83-86.
18. Lee, S.J. et Terkeltaub, R.A. (2005). Does Diet Contribute to the Development of hyperuricemia?, 2006, *Current Rheumatology Reports*, Vol8, Issue 3, pp207-208.
19. Nostro A., Germanò M.P., D'Angelo V., Marino A. and Cannatelli M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters en Microbiologie Appliquée* 30, 379.
20. Nuki, G. (2006). Metabolic and endocrine arthropathies: Gout. *Medicine.* 34 (10) : 417-723.
21. Nuki,G. et Simkin, P. (2006). A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Research & Therapy.* 8 (Suppl 1) : S1.
22. Richette, P. (2011). Goutte : mise en place et suivi du traitement hypo-uricémiant. *Revue du Rhumatisme.* 78 : S142-S147.
23. Seal, A., Aykkal, R., Babu, R. O., Ghosh, M., 2011. Docking study of HIV-1 reverse transcriptase with phytochemicals, *Bioinformation*5(10), pp 430-439.
24. Serseg Talia, Etude in silico et in vitro de l'effet inhibiteur de quelques molécules pures sur l'activité de la lipase de *Candida rugosa*: Traitement de l'obésité, Novembre 2017, mémoire de magister en biologie, ENS-Laghouat.
25. Tietz N.W, Burtis.C.A, Ashwood.E.R ,Saunders.W.B, Test book of clinical chemistry, 3rd Ed (1999) p .1245-1250.
26. Van Hoorn, D.E.C., Nijveldt, R.J., Van Leeuwen, P.A.M., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D.B.A. et Van Norren, K.. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology.*

RÉSUMÉ

Les Xanthines oxydases, sont des enzymes qui appartiennent à la classe des oxydoréductases, ils sont responsables de la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique. Ce dernier représente plus de la moitié de l'activité antioxydante. Cependant, l'élévation de son niveau dans le sang engendre une hyperuricémie qui peut s'aggraver et générer d'autres maladies telles que la goutte. L'objectif principal de cette étude est de tester la capacité d'inhibition de l'activité enzymatique de la xanthine oxydase du lait bovin par des extraits des graines de *Lepidium sativum* et des molécules pures comme les composés phénoliques et demi-comprendre le mécanisme d'inhibition en sachant la nature des interactions entre ces inhibiteurs et la xanthine oxydases en utilisant le docking moléculaire avec le logiciel GOLD. Les résultats obtenus montrent que ces molécules ont un pouvoir inhibiteur important avec des valeurs des IC50 varient entre 12 µg/ml et 51 µg/ml contre la xanthine oxydase, ce qui est confirmé par les résultats du docking moléculaire. Nous proposons que ces molécules puissent être employées dans le traitement de la goutte après les tests *in vivo*.

Mots clés: Xanthine oxydase de lait de bovin, *Lepidium sativum*, inhibition, composés phénoliques, alcaloïdes, docking moléculaire, goutte.

Abstract

Xanthines oxidases, are enzymes that belong to the class of oxido reductases, they are responsible for the conversion of hypoxanthine to xanthine, and xanthine to uric acid. The latter represents more than half of the antioxidant activity. However, the elevation of its level in the blood causes a hyperuricemia that can worsen and generate other diseases such as gout. The main objective of this study is to test the ability to inhibit the enzymatic activity of bovine milk xanthine oxidase by extracts of *Lepidium sativum* seeds and pure molecules such as phenolic. Hence, to better understand the mechanism of inhibition by knowing the nature of the interactions between these inhibitors and xanthine oxidase using molecular docking with GOLD software. The obtained results show that these molecules have an important inhibitory power with IC50 values ranging between 12 µg/ml and 51 µg/ml against xanthine oxidase, which is confirmed by the results of molecular docking. We propose that these molecules can be used in the treatment of gout after *in vivo* tests.

Keywords: Xanthine oxidase of bovine milk, *Lepidium sativum*, inhibition, phenolic compounds, alkaloids, molecular docking, gout.

ملخص

الكزانثين أوكسيداز هي إنزيمات تنتمي إلى صنف الأنزيمات المؤكسدة المرجعة و أنها مسؤولة عن تحويل هيبوكزانثين إلى الكزانثين والكزانثين إلى حمض اليوريك، هذا الأخير يمثل أكثر من نصف نشاط مضادات الأوكسدة. ومع ذلك ، فإن ارتفاع مستواه في الدم يسبب فرط حمض يوريك الدم التي يمكن أن تتفاقم وتولد أمراض أخرى مثل النقرس. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو اختبار القدرة المثبطة للنشاط الأنزيمي لكزانثين أوكسيداز المستخرج من حليب البقر بالمستخلصات الطبيعية لبذور حب الرشاد مثل المركبات الفينولية والقلويدات، والحصول على مفهوم أفضل لآلية التثبيط وأيضاً معرفة طبيعة التفاعلات بين هذه المواد والكزانثين أوكسيداز استناداً على الإرساء الجزيئي مع برنامج GOLD. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه الجزيئات لديها قوة تثبيط هامة مع قيم IC50 تتراوح بين 12 مكغ / مل و 51 مكغ / مل ضد الكزانثين أوكسيداز ، وهو ما تؤكدته نتائج الإرساء الجزيئي. نقترح أن هذه الجزيئات يمكن استخدامها في علاج النقرس بعد تجربتها على الحيوانات.

الكلمات المفتاحية: الكزانثين أوكسيداز من حليب الأبقار ، بذور حب الرشاد، التثبيط، المركبات الفينولية، القلويدات، الإرساء الجزيئي والنقرس.