

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOuat
FACULTE DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Thèse de doctorat

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Doctorat

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Connaissance et Valorisation des Produits Naturels Vivants

Par :

BOU-SALAH Leïla

Étude de l'effet inhibiteur de quelques huiles essentielles et molécules pures contre deux sources de xanthine oxydase avec l'amarrage moléculaire

Soutenue en Juin 2021 devant le jury composé de :

SIFI Ibrahim	MCA	Univ. Laghouat	Président
BENHAMMOU Nabila	Prof.	Univ. Tlemcen	Examinatrice
BOUSSOUSSA Hadjer	MCA	Univ. Laghouat	Examinatrice
MAHFOUDI Reguia	MCA	ENS. Laghouat	Examinatrice
BENAROUS Khedidja	Prof.	Univ. Laghouat	Directrice de Thèse

Année universitaire 2020/2021

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,

L'amour, le respect, la reconnaissance...

Je dédie cette

Thèse ...

A Ma Très Chère Maman

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

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de consentir depuis ma naissance.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

A Mon Très Cher Papa

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Tu peux être fière et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie.

Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mon très cher frère Mounir

Mon cher frère présent dans tous mes moments d'examens par son soutien moral et ses belles surprises sucrées.

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A mes très cher(e)s tantes et oncles

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

Une spéciale dédicace à ces deux personnes qui m'ont toujours encouragé et énormément soutenu, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect.

A mes chers oncles Ahmed et Aïssa.

A ma grand-mère paternelle

A la mémoire de la grande dame qui a tant sacrifié pour nous. Que Dieu ait ton âme dans sa sainte miséricorde.

A ma grand-mère maternelle

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

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

***À TOUS CEUX QUE J'AI
OMIS DE CITER***

Remerciements

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire des Sciences fondamentales de l'université Amar Telidji. Et au niveau du centre de transfusion de sang (CTS) à l'hôpital Ahmida Benadjila de Laghouat.

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement

Madame Khedidja BENAROUS Ep KAOUKA, Professeur à l'université Amar Telidji et ma directrice de thèse

Ce travail est le vôtre. Vous m'avez fait honneur en me confiant ce travail original tout en mesurant l'ampleur des difficultés. Malgré vos multiples occupations vous m'avez ouvert grandement vos portes ce qui a donné à ce travail toute sa valeur, Je saisis cette occasion pour vous exprimer ma profonde gratitude tout en vous témoignant mon respect.

A Mesdames et Messieurs les membres de jury

Vous me faites l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de siéger parmi mon jury de thèse.

Veillez accepter ce travail, en gage de mon grand respect et ma profonde reconnaissance. Je vous remercie pour votre estimable participation.

Veillez trouver ici l'expression de mon estime et ma considération.

Je tiens aussi à remercier

***Professeur Yousfi Mohamed, Directeur du laboratoire des sciences
fondamentales***

Qui m'a accueilli au sein de son laboratoire. C'est grâce à lui que j'ai pu concilier avec bonheur recherche théorique et appliquée pendant cette thèse.

Je remercie également tous les membres du laboratoire des sciences fondamentales, en particulier mes collègues ; Bekhaoua Abir, Chelghoum Manel et Tahri Djillali.

J'exprime mes plus vifs remerciements aux ingénieurs de laboratoires : Renane Zohra et Aouissi Fatima Zohra d'avoir mis à mon entière disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.

Je ne manquerai pas de remercier Dr. Mahfoudi Reguia qui sans elle, ce travail n'aurait pas pu aller loin, merci de nous avoir fournis le substrat (Xanthine).

Je voudrais, transmettre par ailleurs, mes remerciements à tous les membres du centre de transfusion de sang, particulièrement, Monsieur Bouaïcha Mohamed et Monsieur Hamel Khaled pour m'avoir accueilli et donné l'occasion extraordinaire de réaliser mon travail au sein du centre.

Mes derniers remerciements vont à

M. Linani Abderahmane

Qui a tout fait pour m'aider, qui m'a soutenu et surtout supporté dans tout ce que j'ai entrepris. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Résumé

Des facteurs comme la prise de poids constante, l'abus d'alcool et la surconsommation de viandes, provoquent la goutte. L'excès de purine présente dans ces aliments entraîne une suractivité de la xanthine oxydase qui est responsable de la production de l'acide urique. Ce dernier déposé dans les articulations provoque les attaques de goutte. Nous visons à tester *in vitro* et *in silico* l'effet d'inhibition de trois sources de composés, tel que les huiles essentielles (HE), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), et les complexes organométalliques (CO) contre la xanthine oxydase du lait humain (XOH) et bovin (XOB) en utilisant une nouvelle approche de détection par double enzyme. L'étude *in silico* a été réalisée à l'aide du docking moléculaire (DM), y compris une étude détaillée de la relation entre l'activité et la structure (SAR), avec les logiciels Autodock vina, GOLD, et Discovery Studio visualizer. Les meilleurs inhibiteurs sélectionnés ont été choisis en fonction de leur énergie de liaison la plus faible en Kcal/mol, leur meilleur PLPchem score et leur meilleur taux de répétition (TR). Les inhibiteurs utilisés sont cinq HEs : *Carum carvi* L., *Pimpinella anisum* L., *Coriandrum sativum* L., *Foeniculum vulgare* Mill., et *Cuminum cyminum* L., présentant six composés majoritaires tels que Carvone, Limonène Anéthol, Linalool, Estragole et 2-méthyl-3-phenylpropanal comme étant des ligands libres pour le DM. Les AINS sont cinq médicaments connus comme l'Indométacine, Celecoxib, Ibuprofène, Diclofénac de sodium, et Naproxène de sodium. De plus, les CO utilisés sont les bis-coumarines de Lanthanum (III), le Cérium (III), et le Néodymium (III). Les résultats *in vitro* montrent une activité inhibitrice importante pour XOH et XOB avec un IC_{50} allant de 0,31 μ g/ml à 14,49 μ g/ml. L'indométacine est le meilleur inhibiteur pour la XOH et la XOB avec un IC_{50} de 0,31 $\pm$ 0,13 μ g/ml et 0,83 $\pm$ 0,11 μ g/ml respectivement. L'inhibiteur le plus faible était le Néodymium (L2) (III) avec un IC_{50} de 14,49 $\pm$ 1,94 μ g/ml. Les résultats *in silico* montrent un important nombre et types d'interaction, les CO ont été classés les meilleurs dans les deux cas (XOH) et (XOB) en termes d'affinité, avec les valeurs de TR les plus élevées. Les médicaments AINS sont trouvés plus stables dans le XOH avec les meilleures valeurs d'énergie enregistrées. De l'autre côté, les composés majoritaires des HE sont plus stables dans la XOB avec des valeurs de TR modérées.

Mots-clés : Goutte, AINS, Xanthine Oxydase, Indométacine, Docking, Huile Essentielle, Inhibition enzymatique.

Abstract

Factors like constant weight gain, alcohol abuse and overconsumption of meats, cause the gout disease. The excess purines found in these foods leads to over-activity of the Xanthine oxidase which is responsible of producing the uric acid. The latter deposited in the articulations and cause gout attacks. We aim to test *in vitro* and *in silico* inhibition effect of three different compounds sources like essential oils (EO), Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and the Organometallic complexes (OC) against the human milk xanthine oxidase (HXO) and bovine (BXO) using the new double enzyme detection approach. The *in silico* study was performed using the molecular docking (MD) including detailed Structural Activity Relationship study (SAR), with Autodock vina, GOLD, and Discovery studio visualizer softwares, the best-selected inhibitors were chosen based on their lowest binding energy in Kcal/mol with the best PLPchem score and the best repetition ratio (RR). The used inhibitors were five EOs from *Carum carvi* L., *Pimpinella anisum* L., *Coriandrum sativum* L., *Foeniculum vulgare* Mill., and *Cuminum cyminum* L. with their six majoritory compounds such as Carvone, Limonene Anethole, Linalool, Estragole and 2-methyl-3-phenylpropanal as a free ligands for the MD. The NSAIDs were five known drugs such as Indomethacin, Celecoxib, Ibuprofen, Sodium Diclofenac, and Sodium Naproxen. Additionally, the used OC were Lanthanum (III), Cerium (III), and Neodymium (III) bis-coumarins. The *in vitro* results show important inhibition activity to both HXO and BXO with an IC_{50} ranging from 0.31 $\mu\text{g/ml}$ to 14.49 $\mu\text{g/ml}$, Indomethacin was the best inhibitor to the HXO and BXO with an IC_{50} of $0.31 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ and $0.83 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$, respectively. The weakest inhibitor was the Neodymium (L2) (III) with an IC_{50} of $14.49 \pm 1.94 \mu\text{g/ml}$. The *in silico* results show significant interaction types and number, the OC were ranked the best in both HXO and BXO in term of affinity with the higher recorded RR values. While the NSAIDs drugs were found more stable in the HXO with the best-saved energy values, on the other side, the EO majority compounds were more stable in the BXO with moderate RR values.

Keywords: Gout, NSAIDs, Xanthine oxidase, Indomethacin, Docking, Essential oil, Enzymatic inhibition

توجد عوامل كثيرة مثل زيادة الوزن المستمر، شرب الكحول والإفراط في استهلاك اللحوم، تسبب مرض النقرس. البيورينات الزائدة الموجودة في هذه الأطعمة تؤدي إلى فرط نشاط إنزيم زانثين أوكسيداز المسؤول عن إنتاج حمض اليوريك. هذا الأخير يترسب في المفاصل ويسبب نوبات النقرس. نهدف إلى اختبار التأثير التشبيطي لثلاثة مصادر مختلفة من المركبات مثل الزيوت العطرية، مضادات الالتهاب اللاستيرويدية ومركبات المعادن العضوية مخبريا للزانثين أوكسيداز حليب الإنسان والأبقار باستخدام طريقة الكشف الجديدة بالإنزيم المزدوج، بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء دراسة السيليكو باستخدام الالتحام الجزئي بما في ذلك دراسة مفصلة لعلاقة النشاط بالبنية مع البرامج اتودوك فينا، قولد، وديسكوفيري ستوديو. تم اختيار أفضل المثبطات بناءً على أقل طاقة ربط ممكنة (بالكيلو كالوري لكل مول) مع أفضل قيمة جهد خطي وأفضل نسبة تكرار. المثبطات المستخدمة كانت خمسة زيوت عطرية من الكروية، حبة الحلوة، الكسير، البساس، والكمون مع مركباتها الستة التي هي انيثول، كرفون، ليمونين، استراقول، لينالول و2-ميثيل-3-فينيلبروبانال باعتبارها مثبطات حرة للالتحام الجزئي. مضادات الالتهاب اللاستيرويدية المستعملة كانت خمسة عقاقير معروفة مثل إندوميثاسين، سيليكوكسيب، ديكلوفيناك الصوديوم، ونابروكسين الصوديوم. بالإضافة إلى ذلك، كانت مركبات المعادن العضوية المستخدمة هي اللانثانم (III)، السيريوم (III)، ونيوديميوم (III). أظهرت النتائج المخبرية نشاط تثبيط مهم لكل من زانثين أوكسيداز الإنسان والأبقار مع قيمة تركيز المادة الموافق للتثبيط النصفية (ت.م50) تتراوح من 0.31 ميكروغرام / مل إلى 14.49 ميكروغرام / مل، وكان إندوميثاسين أفضل مثبط لكرانتين أوكسيداز الإنسان والأبقار مع قيم ت.م50 مساوية لـ 0.31 ± 0.13 ميكروغرام / مل و 0.83 ± 0.11 ميكروغرام / مل على التوالي. كان أضعف مثبط هو نيوديميوم (III) بقيمة ت.م50 مساوية لـ 14.49 ± 1.94 ميكروغرام / مل، وتظهر النتائج في السيليكو أنواعاً مختلفة وعدداً كبيراً من التفاعلات، وقد تم تصنيف مركبات المعادن العضوية الأفضل في كل من زانثين أوكسيداز الإنسان والأبقار من حيث اللفة. بحيث سجلت نسبة التكرار الأعلى، من جهة أخرى كانت أدوية مضادات الالتهاب اللاستيرويدية هي الأكثر استقراراً في زانثين أوكسيداز الإنسان مع أفضل قيم للطاقة المحفوظة، على الجانب الآخر، كانت مركبات الأغلبية للزيوت العطرية أكثر استقراراً في زانثين أوكسيداز الأبقار مع قيم نسبة التكرار معتدلة.

الكلمات المفتاحية: نقرس، أدوية مضادات الالتهاب اللاستيرويدية، زانثين أوكسيداز، إندوميثاسين، الالتحام، الزيوت العطرية، تثبيط انزيمي.

Liste des travaux scientifiques achevés dans le cadre de cette thèse de Doctorat

Publications internationales

- **Leila BOU-SALAH**, Khedidja BENAROUS, Abderahmane LINANI, Isabelle Bombarda, Mohamed YOUSFI. *In vitro* and *in silico* inhibition studies of five essential oils on both enzymes human and bovine xanthine oxidase. *Industrial Crops and Products* 143 (2020) 111949.
- Khedidja BENAROUS, **Leila BOU-SALAH**, Abderahmane LINANI, Mohamed YOUSFI, Luciano SASO, Irena KOSTOVA. Lanthanide (III) complexes of bis-coumarins as strong inhibitors of bovine xanthine oxidase - molecular docking and SAR studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2020).
- **BOU-SALAH Leila**, BENAROUS Khedidja, LINANI Abderahmane, RABHI Faiza, CHAIB Kheira, CHINE Imane, BENSAIDANE Hadjer and YOUSFI Mohamed. Anti-inflammatory drugs as new inhibitors to xanthine oxidase: *in vitro* and *in silico* approach with SAR study. (*In press*).

Communications Internationales

- **Leila BOU-SALAH**, Abderahmane LINANI, Khedidja BENAROUS, Et Mohamed YOUSFI. Études *in silico* et *in vitro* de l'effet inhibiteur des huiles essentielles de *pimpinella anisum* L. et de *carum carvi* L. sur la xanthine oxydase humaine et bovine : traitement de la goutte. Third International Symposium: Medicinal Plants and Materials (MPM-2020): Tebessa, Algeria.
- Abderahmane LINANI, Khedidja BENAROUS, **Leila BOU-SALAH**, Et Mohamed YOUSFI. *In vitro* and *in silico* inhibition study of the garlic essential oil against human xanthine oxidase: gout treatment. Third International Symposium: Medicinal Plants and Materials (MPM-2020): Tebessa, Algeria.

Communications Nationales

- **Leila BOU-SALAH**, Abderahmane LINANI, Khedidja BENAROUS, Et Mohamed YOUSFI. Étude de l'effet des extraits à base de plantes médicinales sur le traitement de la goutte. Séminaire National de Biochimie & Doctoriales Biologie et Santé, 1 juin FSNV-USD Blida 1, 2018.
- **Leila BOU-SALAH**, Abderahmane LINANI, Khedidja BENAROUS, Et Mohamed YOUSFI. Évaluation *in vitro* et *in silico* de l'activité inhibitrice de l'huile essentielle de *Coriandrum sativum* L. sur la xanthine oxydase humaine et bovine. Chimie analytique, matériaux et substances naturelles, Décembre 2019.
- Abderahmane LINANI, Khedidja BENAROUS, **Leila BOU-SALAH**, Et Mohamed YOUSFI. Potent gout treatment using ginger and camphor essential oils: *in vitro* and *in silico* inhibition study. Chimie analytique, matériaux et substances naturelles, Décembre 2019.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les aphorismes d'Hippocrate sur la goutte.	5
Tableau 2 : Estimation de la prévalence de la goutte aux Nouvelle Zélande, USA, Royaume Uni, Chine et Taiwan.....	12
Tableau 3 : Variation de l'uricémie avec le poids.	15
Tableau 4 : Les définitions du syndrome métabolique utilisées par l'ATP et l'IDF.	15
Tableau 5 : Existence in vivo et interconversion des différentes formes de la XOR.	30
Tableau 6 : Quantité en Molybdène et pourcentage de forme inactive dans l'enzyme bovine et humaine.....	31
Tableau 7 : La nomenclature botanique des plantes.....	47
Tableau 8 : Informations structurales de la XO Bovine et Humaine disponibles dans la PDB.	61
Tableau 9 : Informations structurales des ligands.	64
Tableau 10 : Rendements et valeurs de densité des huiles essentielles extraites pendant 180 min.	68
Tableau 11 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites.	68
Tableau 12 : Composition chimique de l'huile essentielle d'anis.	69
Tableau 13 : Composition chimique et teneur des différents constituants de l'huile essentielle de cumin.	69
Tableau 14 : Composition chimique et teneur des différents constituants de l'huile essentielle de carvi.	70
Tableau 15 : Composition chimique et teneur des différents constituants de l'huile essentielle de coriandre.	70
Tableau 16 : Composition chimique et teneur des différents constituants chimique de l'huile essentielle de fenouil.	70
Tableau 17 : Effet de la teneur en solvants organiques sur l'activité enzymatique de la XO.....	72
Tableau 18 : Rendements des extraits enzymatiques obtenues des deux sources de lait (bovin et humain) à partir d'un volume de 1000 ml.	73
Tableau 19 : Valeurs d'IC ₅₀ des inhibiteurs étudiés et des deux médicaments commerciaux.	73
Tableau 20 : Les différentes interactions obtenues après le Docking moléculaire pour les deux sources de xanthine oxydase.....	75
Tableau 21 : Rendements des huiles essentielles issues de notre étude et de la littérature.	79
Tableau 22 : Valeurs de densité des huiles essentielles issues de notre étude et de la littérature.....	79
Tableau 23 : Caractéristiques organoleptiques de notre étude et de littérature.	80
Tableau 24 : Composés majoritaires de nos HES comparé à la littérature.	84

Liste des équations

Équation 1	22
Équation 2	27
Équation 3	50
Équation 4	51
Équation 5	51
Équation 6	53
Équation 7	53
Équation 8	53
Équation 9	58

Liste des Figures

Figure 1: Dessin satyrique anglais illustrant la crise de goutte du gros orteil.	4
Figure 2 : Caricature sur la goutte montrant qu'elle était autrefois un stéréotype social.	7
Figure 3 : Estimation de la prévalence de la goutte à travers le monde.	10
Figure 4 : Représentation de la prévalence de la goutte en fonction de l'âge et sexe au Royaume Uni en 2012.	16
Figure 5 : Chronologie de découverte des gènes impliqués dans la pathogenèse de l'hyperuricémie/goutte.	17
Figure 6 : Photo qui représente la goutte aiguë du gros orteil.	19
Figure 7 : Photo qui représente des tophi au niveau de l'oreille, du coude et de la main.	20
Figure 8 : Photo qui représente un Tophus mis à nu après une infection cutanée.	21
Figure 9 : Structure cristalline de la Xanthine oxydase du lait bovin (PDB ID : 1FIQ).	22
Figure 10 : Localisation de la XO dans les globules gras du lait.	24
Figure 11 : (A) Structure du molybdoptérine, (B) Structure du cofacteur de molybdène, où le Mo est lié au molybdoptérine par les atomes de soufres.	25
Figure 12 : Structure cristalline de la Xanthine oxydase du lait bovin (PDB ID : 1FIQ).	26
Figure 13 : Cheminement des 2 électrons e^- vers l'accepteur final A. Celui-ci peut-être soit NAD^+ , soit O_2	27
Figure 14 : Oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique avec réduction du NAD (a.déshydrogénase) ou de l'oxygène moléculaire (b.oxydase).	28
Figure 15 : Rôle de la XOR dans l'oxydation du NADH et la génération du radical nitroxy ($NO^\bullet$) et du peroxylnitrite ($ONOO^-$).	29
Figure 16 : Le processus d'ischémie-reperfusion.	33
Figure 17 : Effet de l'allopurinol et de son métabolite (Oxypurinol) sur la réaction de la xanthine oxydase.	34
Figure 18 : Les programmes de Docking les plus cités.	39
Figure 19 : Principales étapes des méthodes de Docking.	42
Figure 20 : Graines des cinq épices utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.	50
Figure 21 : Classification périodique des éléments de Mendeleïev.	53
Figure 22 : Diagramme qui représente la démarche expérimentale de l'extraction de la XO.	55
Figure 23 : Schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes.	56
Figure 24 : Diagramme qui représente la démarche expérimentale de l'inhibition de la XO.	57
Figure 25 : Tableau affichant les résultats d'absorbance d'une microplaque étudiée.	58
Figure 26 : Interface de la banque de donnée protéique PDB.	59
Figure 27 : Interface de PubChem.	60
Figure 28 : Les différents paramètres de la grille (Grid box).	66
Figure 29 : Effet des différentes teneurs du DMSO et du Tampon sur la XO.	72
Figure 30: Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de coriandre.	81
Figure 31 : Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de carvi.	82
Figure 32 : Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de cumin.	83
Figure 33 : Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de fenouil.	84
Figure 34 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de l'Anéthol avec la XOB (A) et XOH (B).	90
Figure 35 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de la Carvone avec la XOB (A) et XOH (B).	92
Figure 36 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du D-limonène avec la XOB (A) et XOH (B).	93
Figure 37 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de l'estragol avec la XOB (A) et XOH (B).	95
Figure 38 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Linalol avec la XOB (A) et XOH (B).	97
Figure 39 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du 2-méthyl-3-phenylpropanal avec la XOB (A) et XOH (B).	98
Figure 40 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de l'Indométacine avec XOB (A) et XOH (B).	100
Figure 41 : Les acides aminés impliqués dans des interactions du Celecoxib avec la XOB (A) et XOH (B).	102
Figure 42 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Diclofénac sodique avec la XOB (A) et XOH (B).	103
Figure 43 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Naproxène sodique avec la XOB (A) et XOH (B).	105
Figure 44 : Les acides aminés impliqués dans des interactions de l'Ibuprofène avec la XOB (A) et XOH (B).	106
Figure 45 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Lanthanum (III) avec la XOB (A) et XOH (B).	109
Figure 46 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Cérium (III) avec la XOB (A) et XOH (B).	111
Figure 47 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Neodymium (III) avec la XOB (A) et XOH (B).	113

Liste des abréviations

A

AA : acide aminé
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
ANOVA : Analyse de la variance
AFNOR : Association Française de Normalisation
Å : Angstrom

B

BD : Base de données

C

°C : degré celsius
CG : Chromatographie en phase gazeuse
CG/SM : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

D

3D : Structures tridimensionnelles
DMSO : Dimethyl sulfoxide

E

EDTA : Acide éthylène Diamine Tétra acétique
EMBL : European Molecular Biology Laboratory

F

FID : Détecteur à Ionisation de Flamme
FAD : Flavine Adenine Dinucléotide

G

g/L : gramme / litre
GOLD : Genetic Optimisation for Ligand Docking

H

HE : Huile Essentielle
HTA : Hypertension artérielle

I

I % : Pourcentage d'inhibition
IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 % de l'activité
IR : Indice de rétention

K

K₂HPO₄ : Phosphate de potassium dibasique
Kcal : Kilocalorie
KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique

L

L : Litre
Ln (III) : Cations lanthanides (III)

M

MFGM : Milk Fat Globule Membrane (membrane des globules gras du lait)
ml : Millilitre
mmol : Millimole
Mo : Molybdène

P

Pb : Paire de base
pH : Potentiel Hydrogène
PDB : Protein Data Bank
PDBQT : Protein Data Bank, Partial Charge (Q), &Atom Type (T)

R

RMSD : Ecart quadratique moyen (Root Mean Square Deviation)
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

S

SDF : Spatial Data File

T

tr : Temps de rétention

U

UMS : Urate Mono Sodique
UV : Ultraviolet

V

v/v : volume / volume

X

XDH : Xanthine deshydrogenase
XO : Xanthine oxydase
XOB : Xanthine oxydase Bovine
XOH : Xanthine oxidase Humaine
XOR : Xanthine oxidoreductase

Table des matières

Table des matières

INTRODUCTION	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

PARTIE 1 : Présentation de la Goutte

I. HISTORIQUE	4
II. LA GOUTTE	8
II. 1 Définition.....	8
II. 2 Goutte primitive et goutte secondaire	8
II. 3 Physiopathologie de la goutte.....	8
III. EPIDEMIOLOGIE DE LA GOUTTE.....	9
III. 1 Prévalence de la goutte.....	10
III. 2 Incidence de la goutte.....	13
IV. FACTEURS POTENTIELLEMENT ASSOCIES A UNE AUGMENTATION DU RISQUE DE GOUTTE.....	14
IV. 1 Modifiables	14
IV. 2 Non modifiables	15
V. MANIFESTATIONS CLINIQUE DE LA GOUTTE	18
V. 1 Goutte typique	18
V. 1. a Hyperuricémie asymptomatique	18
V. 1. b Goutte aiguë.....	18
V. 1. c Goutte subaigüe	19
V. 1. d Goutte chronique	19
V. 2 Goutte atypique	21

PARTIE 2 : Xanthine Oxydase

I. GENERALITES	22
II. DISTRIBUTION ET LOCALISATION DE LA XO	23
III. STRUCTURE DE LA XANTHINE OXYDASE.....	24
IV. MECANISME REACTIONNEL ET PROPRIETES ENZMATIQUES DE LA XANTHINE OXYDASE.....	26
V. LES DIFFERENTES FORMES DE LA XOR	29
VI. XANTHINE OXYDASE DU LAIT HUMAIN	30
VII. ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA XO	31
VIII. ROLE PATHOLOGIQUE DE LA XO.....	32
IX. INHIBITEURS DE LA XO.....	34
IX. 1 Analogues de substrats	34
IX. 2 Autres inhibiteurs de la XO.....	35

PARTIE 3 : Modélisation Moléculaire

I. INTRODUCTION	37
II. DOCKING MOLECULAIRE.....	38
II.1 Types du Docking.....	39
II.2 Les étapes de Docking moléculaire	40
III. LES PROGRAMMES DE DOCKING MOLECULAIRE UTILISES.....	43
III. 1 Autodock Vina (Adv).....	43
III. 2 GOLD	44
IV. APPLICATIONS DU DOCKING.....	45

Partie expérimentale

PARTIE 1: MATERIELS ET METHODES

IN VITRO	46
I. MATERIELS.....	46
I. 1 Matériel biologique	46
I. 2 Matériel chimique	47
I. 3 Instrumentation	48
I. 4 Autres	49
II. METHODES	49
II. 1 Contrôle de qualité des équipements	49
II. 2 Préparation des huiles essentielles et molécules à tester	49
II. 2. a Extraction des huiles essentielles.	49
II. 2. b Molécules pures et médicaments.	52
II. 2. c Effet du solvant sur l'activité enzymatique.....	54
II. 3 La Xanthine oxydase (XO).....	54
II. 3. a Préparation de l'extrait brut de la XO.....	54
II. 4 Test d'effet des molécules/extraits sur la XO	55
II. 4. a Principe de la méthode de détection à double enzyme (DED).	55
II. 4. b Préparation des molécules et extraits à tester.	56
II. 4. c Inhibition de la réaction catalysée par la XO.	57
II. 5 Recueil traitement et analyse des données.....	58
IN SILICO	59
I. MATERIEL	59
I. 1 Moyen informatique.....	59
I. 2 Logiciels	59
I. 3 Les banques des données	59
II. METHODES	60
II. 1 Préparation des molécules	60
II. 1. a Préparation et choix du récepteur.....	60
II. 1. b Préparation des ligands.	63
II. 2 Docking moléculaire.....	65

PARTIE 2: Résultats et Discussion

IN VITRO	68
I. Huiles Essentielles.....	68
II. Caractérisation des complexes de lanthanide (III)	71
III. Effet du solvant sur l'activité enzymatique	71
IV. Extraction de l'enzyme xanthine oxydase.....	72
V. Inhibition de la réaction catalysée par la Xanthine oxydase.....	73
IN SILICO	75
I. Docking moléculaire	75
IN VITRO	78
I. Huiles Essentielles.....	78
II. Inhibition de la Xanthine oxydase	85
IN SILICO	89
I. Huiles essentielles (composés majoritaires)	89
II. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	99
III. Les complexes de lanthanides (III).....	107
CONCLUSION	116
Références Bibliographiques	118
Annexes	129

INTRODUCTION

Pathologie décrite depuis l'antiquité, la goutte est une maladie qui reste très actuelle ^[1] du fait de sa fréquence et des problèmes de diagnostic et de traitements qu'elle peut encore posée ^[2].

Historiquement connu sous le nom de « maladie des rois » ^[3]. La goutte est la plus fréquente des arthrites microcristallines touchant l'homme adulte ^[4]. Elle est liée à une anomalie du métabolisme de l'acide urique, dont la manifestation clinique la plus caractéristique est une mono-arthrite de l'hallux. ^[5].

Elle est la conséquence bien que de façon inconstante, d'une augmentation du taux circulant d'acide urique (hyperuricémie), dont la formation est principalement liée à une enzyme dite Xanthine oxydase (XO) : une oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ainsi que l'oxydation de la xanthine en acide urique ^[6].

La goutte n'est pas une maladie bénigne ^[7]. L'évolution sans traitement de cette maladie tend vers le dépôt d'acide urique dans plusieurs sites de l'organisme avec une prédilection pour les articulations (goutte articulaire), la peau (tophus), et les reins (néphropathie goutteuse) en engendrant souvent des destructions articulaires invalidantes et des atteintes rénales pouvant être fatale ^[5].

Bien que les facteurs de risque sont bien connus, de même que la maladie dans sa globalité ^[8], sa gestion est souvent complexe, car souvent intriquée avec d'autres pathologies chroniques tout aussi peu aisées à prendre en charge (insuffisance rénale chronique, diabète, hypertension artérielle...) ^[9].

Par ailleurs, il existe des traitements pour la goutte, non médicamenteux qui consiste généralement dans des habitudes et conseils alimentaires à adopter, et médicamenteux qui deviennent problématiques, voire contre-indiqués dans certains cas, ce qui rend la prise en charge de cette pathologie compliquée en particulier chez la personne âgée polypathologique.

Dans ce contexte, la recherche de nouveaux traitements pour la goutte est au cœur des préoccupations de nombreux chercheurs, à savoir, par l'inhibition de la xanthine oxydase (XO) qui semble être une cible prometteuse pour développer de nouveaux médicaments. Mais la conception de nouveaux médicaments reste une procédure qui est en général un processus long et très onéreux qui prend des années et coute des milliards.

C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom de « amarrage » ou « Docking » moléculaire ont été développées. Ces techniques sont considérablement plus faciles à mettre en œuvre, moins chères et plus rapide, mais qui restent prédictive et qui nécessitent leur combinaison avec des approches expérimentales *in vitro*.

Les études déjà menées sur les molécules et extraits que nous avons testés montrent qu'ils possèdent déjà une activité anti-inflammatoire [10, 11], anticancéreuse [12-14] et antibactérienne [15]. Mais peuvent-ils être de nouveaux inhibiteurs potentiels de la xanthine oxydase ?

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, ces molécules et extraits ont été soumis aux tests *in vitro*, par la méthode DED (Double Enzyme Detection) [16], ensuite, afin de s'approfondir encore plus dans le sujet nous avons essayé de comprendre le mécanisme mis en jeu lors de leur interaction avec la XO. Cela, implique l'utilisation des méthodes *in silico* (Docking moléculaire), par l'évaluation d'énergie d'interaction de ces ligands d'une part, et d'autre part, par l'identification des liaisons impliquées avec le site actif de l'enzyme.

Dans notre laboratoire de recherche, cette thématique de la goutte est étudiée pour la première fois ainsi que les méthodes d'évaluation *in vitro* et *in silico*, ce travail est couronné de deux publications internationales (Catégorie A+ et A) avec cinq communications nationales et internationales, avec des perspectives importantes qui permettront la continuité de cette recherche.

Le manuscrit se présente de la manière suivante :

La première partie, est dédiée à la **bibliographie** que nous avons divisée en trois (03) chapitres, où les concepts généraux regroupant les informations essentielles pour cette étude sont décrits.

- Dans un premier chapitre, et après un peu d'histoire, nous verrons la maladie goutteuse, de sa physiopathologie à ses manifestations clinique en passant par son épidémiologie et ses facteurs de risque.
- Dans un second chapitre, nous présentons la xanthine oxydase, l'enzyme utilisée dans cette étude, avec sa structure, sa localisation dans l'organisme et son implication directe dans certaines pathologies.
- Dans un troisième chapitre, nous décrivons la technique de modélisation que nous avons utilisée dans la détermination des interactions de la xanthine oxydase ainsi que les logiciels utilisés.

La deuxième partie, révèle la démarche **expérimentale** qui est constituée elle aussi de trois (03) parties ;

- Dans un premier chapitre, le matériel et les méthodes utilisés tout au long de cette étude sont décrits.
- Le second chapitre, est consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus
- Le troisième chapitre, est consacré à la discussion des résultats de l'évaluation *in vitro* et *in silico* de l'activité inhibitrice de nos molécules et huiles essentielles vis-à-vis des deux sources de l'enzyme xanthine oxydase : bovine et humaine.

Nous terminerons ce manuscrit par une conclusion et des perspectives de recherche.

Synthèse bibliographique

PARTIE 1

Présentation de la Goutte

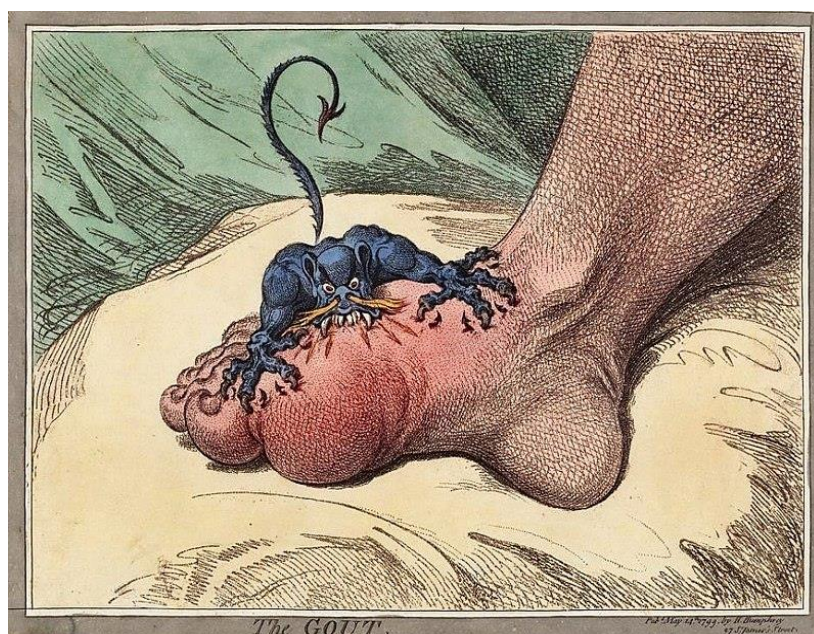
I. HISTORIQUE

➤ Une maladie qui date

L'histoire de la goutte, souvent confondue avec d'autres affections rhumatismales, a connue de nombreux rebondissements, tant dans sa compréhension que dans sa prise en charge. Elle illustre de façon exemplaire les rapports de l'homme à une maladie longtemps considérée comme un marqueur de réussite sociale.

Les premiers éléments pouvant se rapporter à la goutte sont signalés dès la haute Antiquité Egyptienne en 2640 avant J.C. ^[17].

Plus tard, au Vème siècle avant J.C., Hippocrate, père de la médecine en fait une description remarquable, il la dénomma « podagra » « podagre » en français, grecs (τοδάγρα : poûs = pied et agra = chasse, prise, capture), qui signifie « pris par le pied », en raison de la ressemblance du pied goutteux à ce qui pouvait arriver aux pattes des animaux quand ils étaient pris dans un piège (**Figure 1**) ^(^[1], ^[18]).



(D'après James Gillray, 1799)^[19]

Figure 1 : Dessin satyrique anglais illustrant la crise de goutte du gros orteil.

Il rattacha la maladie qui « empêche de marcher » à l'oisiveté et l'intempérance, et il a fait quelques aphorismes tels que sa prédisposition pour l'homme, sa rareté chez l'enfant et la femme non ménopausée (**Tableau 1**), il insistait aussi sur le rôle de l'hérédité et l'influence néfaste de la suralimentation sur la maladie^[7].

NB : (Chiagra et gonagra étaient les termes donnés aux personnes atteintes de goutte affectant le poignet ou le genou)^[20].

Tableau 1 : Les aphorismes d'Hippocrate sur la goutte.

Aphorismes	Détails
VI-28	Les Eunuques ne font points travaillent de la goutte, et ne deviennent points chauves.
VI-29	Les femmes ne font points travaillés de la goutte, jusqu'à ce qu'elles cessent d'avoir leurs mois.
VI-30	Un enfant n'est point travaillé de la goutte avant l'usage de venu.
VI-40	Les maladies qui sont causées par la goutte après que l'inflammation est apaisée, sont guéries en quarante (40) jours.
XI-55	Les affections gouteuses sont actives au printemps et à l'automne.

(Hippocrate, 1829)^[21]

Six siècles plus tard, Galien fut le premier à décrire parfaitement les tophi, qu'il associe à la débauche et aux libations excessives, tout en soulignant l'existence d'un trait héréditaire qui en favorise la survenue ^[22].

Au moyen âge (V-Xvème Siècle), les médecins arabes, particulièrement ERRAZI au Xème siècle en fait une description précise et remarquable, ERRAZI lui consacre une MAQALA, dont un manuscrit dans la bibliothèque d'Alexandrie s/no 6418 composée de 40 pages et publié pour la 1^{ère} fois en 2003. Il subdivise son traité en 20 chapitres (**Annexe 1**)^[23].

Randolphe de Bocking (1197-1258), moine dominicain, chapelain à Chichester, fut le premier à employer le mot « Goutte » pour décrire « Podagre » : (gutta quam podagram vel artiticam vocant) (la goutte que l'on appelle « podagra » ou « arthrite »)^[24] et, probablement, d'autres formes de rhumatismes.

Le rhumatisme est alors décrit comme un poison contenu dans les humeurs qui « tombait telle une goutte de la tête dans une articulation » d'où le terme « goutte », dérivé du mot latin gutta ^[1].

Ce n'est qu'au Xvème siècle que la distinction entre la goutte et les rhumatismes ne sera faite formellement par Guillaume de Baillou (1538-1616), doyen de la Faculté de Paris et médecin du dauphin ^[22].

L'histoire moderne de la goutte commence probablement par Sir Thomas Sydenham (1624-1689) grand clinicien, nommé l'Hippocrate anglais, qui était lui-même affligé d'une podagre depuis l'âge de 30 ans. Il lui consacra un traité, paru en 1683 « Tractatus de Podagra et Hydropse

» ouvrage entièrement dédié à la goutte, où figure une remarquable auto-observation : (**Annexe 2**)^[25, 26].

« Le sujet s'est couché bien portant et s'est abandonné au sommeil mais, vers deux heures après minuit, il est réveillé par une douleur occupant le plus souvent le gros orteil, quelque fois le talon, la jambe ou la cheville. Cette douleur rappelle celle de l'entorse et il s'y ajoute la sensation comme d'une eau à peine dégourdie répandue sur la région. Bientôt surviennent une sensation de froid, de frisson et un léger mouvement fébrile. La douleur, d'abord modérée, augmente par degrés en même temps que le froid et les frissons disparaissent et cela d'heure en heure, jusqu'à ce qu'elle parvienne à son comble à la tombée de la nuit : elle embrasse merveilleusement les petits os du tarse et du métatarse dont elle occupe les ligaments »^[23].

Au siècle suivant, la compréhension de la genèse de la maladie, a beaucoup évolué grâce au chimiste suédois Carl Wilhelm Scheele (1632–1723) et à son microscope que fut découverte la présence de cristaux dans les tophi^[27]. Louis Jacques Thénard, célèbre chimiste français, attribua au chimiste suédois Carl-Wilhelm Scheelé (1742-1786) la découverte de l'acide urique à partir de calculs urinaires provenant d'un goutteux, et le nomma successivement acide bazoardique et lithique^[7]. Par la suite, William Hyde Woolaston, médecin et chimiste anglais, démontra la présence d'acide urique dans un tophus retiré de sa propre oreille^[25].

Au XIX^e siècle, la description clinique de la goutte fut parachevée par Sir Alfred Baring-Garrod, médecin de la reine Victoria, qui a mis au point un dosage biologique de l'acide urique, ou il montre qu'il est augmenté dans le sang et l'urine des goutteux. Il affirma, dès lors, que la goutte était la conséquence et non la cause d'un excès d'acide urique. Dont la formule chimique fut décrite par Hermann Fischer (1852-1919), prix Nobel de chimie en 1902^[17].

À partir de 1913, grâce aux travaux de Folin et Denis, le dosage de l'acide urique dans les liquides biologiques permit de montrer que les goutteux sont hyperuricémiques^[25].

Il resta alors à confirmer son origine héréditaire, affirmée dès le I^{er} siècle par Aretarus de Cappadoce, et confirmée par William Cullen, au XVIII^e siècle^[22].

Cette quête ne trouvera son épilogue qu'en 1967, J.E. Seegmiller et son équipe identifient le premier déficit enzymatique du métabolisme des purines.^[28]

➤ **Maladie des rois**

On la surnomme « la maladie des rois » : de Charlemagne à Louis XIV, la goutte a terrassé de douleur des grands noms de l'histoire.

Charlemagne, Charles Quint (dont un doigt goutteux est conservé au monastère royal San Lorenzo de l'Escorial) et son fils Philippe II d'Espagne étaient touchés ainsi qu'Henri VIII,

Louis XIV, Louis XVIII et son cousin anglais le roi Georges IV. Mais aussi Léonard de Vinci, Christophe Colomb, Martin Luther, le grand Condé, le cardinal Mazarin, Isaac Newton, Benjamin Franklin ainsi que Darwin^[25].

On la croyait réservée aux rois, la goutte était aussi la maladie des bourgeois, des obèses, des gros mangeurs de viande et de gibier, des sédentaires (**Figure 2**). ^[29]



(D'après Melissa Robitaille, 2018)^[29]
Figure 2 : Caricature sur la goutte montrant qu'elle était autrefois un stéréotype social.

II. LA GOUTTE

II. 1 Définition

La goutte est le rhumatisme inflammatoire de l'homme adulte le plus fréquent, résultant d'un trouble du métabolisme des purines, dont la conséquence est une hyperuricémie qui se définit par l'augmentation de la concentration d'acide urique dans le sang au-delà de $360\mu\text{mol/l}$ (60mg/l) chez la femme et $420\mu\text{mol/l}$ (70mg/l) chez l'homme. Cette hyperuricémie peut être asymptomatique, ou entraîner la formation de cristaux d'urate monosodique (UMS), d'abord au niveau des articulations, provoquant alors une réponse inflammatoire douloureuse, responsable de la crise de goutte aiguë, puis, sans prise en charge, et après plusieurs années dans les tissus mous et le rein, caractéristique de la goutte chronique [2, 5, 7, 18, 30].

II. 2 Goutte primitive et goutte secondaire

La goutte peut être classée comme primaire ou secondaire, selon la présence ou l'absence d'une cause identifiée d'hyperuricémie :

- La goutte est dite primitive lorsqu'elle est due à ;
 - Un excès de synthèse, par une altération du métabolisme des purines endogènes se traduisant par une hyper-purino synthèse hépatique de novo ou d'un excès d'apport en purine (exogène) par le biais d'une alimentation trop riche ;
 - Un défaut d'élimination de l'acide urique.

Ces deux mécanismes sont liés et il est impossible de connaître la part respective de chacun d'entre eux^[1, 7].

- La goutte est dite secondaire lorsqu'elle est due à certaines pathologies (tel que les affections rénales) ou à la prise de certains médicaments^[1].

II. 3 Physiopathologie de la goutte

La goutte étant due à la cristallisation d'urate monosodique (UMS). Son origine est multiple. En temps normal, l'acide urique provient du métabolisme des bases puriques de l'ADN (Adénine/Guanine) qui ont diverses origines : Alimentation, catabolisme des cellules de l'organisme ou synthèse hépatique de novo. Sa concentration plasmatique dépend d'un équilibre entre sa synthèse et son élimination qui sont régulées par des facteurs génétiques et diététiques^[31].

Dans le cas de la goutte ; elle est due généralement, dans plus de 90 % des cas, à une élimination rénale diminuée de l'acide urique^[31], cette diminution de l'excrétion rénale a de multiples causes : génétique, vieillissement, maladie rénale, alimentation, médicaments.

Ainsi, la physiopathologie de la crise de goutte peut être vue comme un cercle vicieux constitué d'une part d'une phase de cristallogenèse et d'autre part d'une phase inflammatoire^[1].

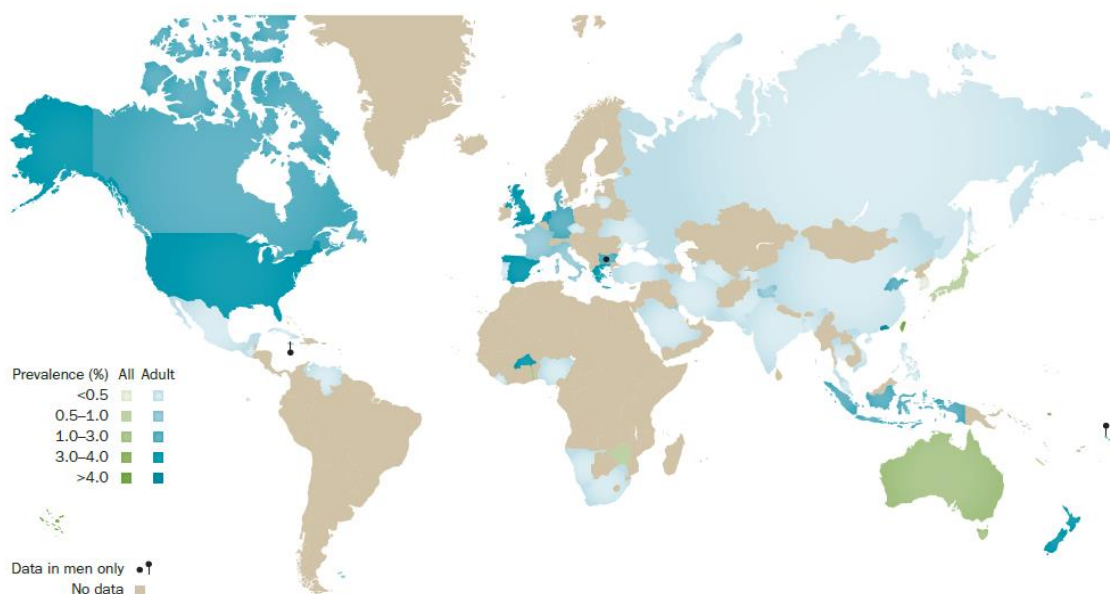
- **La phase de cristallogenèse** ; lorsque l'hyperuricémie devient trop importante, l'acide urique risque alors de précipiter sous forme de cristaux^[1].

À 37°C, la limite de solubilité de ces cristaux d'UMS dans les liquides biologiques et les tissus est atteinte lorsque l'uricémie est > 60 mg/L. Cette solubilité diminue en fonction de la température, ce qui pourrait expliquer que la goutte touche surtout des articulations distales et froides (principalement l'hallux)^[1, 7].

- **La phase inflammatoire** ; La formation puis l'introduction des cristaux d'UMS au niveau de l'articulation est un facteur déclenchant de la réaction inflammatoire^[18]. Qui se déroule selon 3 étapes ; le déclenchement, l'amplification et la résolution spontanée^[7].

III. EPIDEMIOLOGIE DE LA GOUTTE

Au cours des 50 dernières années la prévalence et l'incidence de la goutte semblent avoir augmenté dans de nombreuses régions du monde (**Figure 3**)^[32]. De très nombreux facteurs de risque de goutte ont été identifiés chez l'homme et chez la femme dans des études épidémiologiques prospectives^[33] : Hyperuricémie, facteurs génétiques, vieillissement des populations, facteurs alimentaires (mauvaises habitudes diététiques, sodas sucrés, régime occidental), certaines comorbidités (incluant hypertension, obésité, diabète, insuffisance cardiaque, insuffisance rénale chronique) et l'augmentation de l'utilisation des diurétiques en particulier comme traitement de l'HTA semblent les principaux facteurs influant sur l'apparition de la maladie ^[30, 34].



(Kuo et al., 2015) [32]

Figure 3 : Estimation de la prévalence de la goutte à travers le monde.

La prévalence de la goutte est plus élevée dans les pays développés et dans les populations océaniques que dans d'autres régions du monde, malgré l'absence de données disponibles pour une grande partie du monde en développement.

III. 1 Prévalence de la goutte

Les estimations de la prévalence de la goutte varient selon les études, en raison des différences dans les tranches d'âge étudiées, la répartition par sexe, les emplacements géographiques, les méthodes d'échantillonnage, la définition de la condition utilisée, l'ethnicité des participants à l'étude et l'année de l'enquête^[32].

Dans le cas en Algérie, il n'existe pas de données épidémiologiques à grande échelle concernant cette pathologie. Mais une chose est sûre, la prévalence mondiale est en hausse très significative, ou elle a été signalée dans différents pays et régions du monde comme le cas des pays océaniques où on constate une forte prévalence, en particulier ;

En Nouvelle Zélande, où la prévalence a quasiment décuplé en 30 ans, en passant de 3,1 ‰ en 1958 à 29 ‰ en 1992 dans la population d'origine européenne, et a presque doublé dans la population Maori en passant de 27 ‰ à 64‰. (**Tableau 2**)^[35, 36]. Aussi au Japon et à la Chine continentale dont la goutte pour eux était une maladie inconnue au début des années 1980 mais qui a montré une augmentation significative de 3,6‰ à 11,4‰ dans les années 2002-2004 (**Tableau 2**)^[37, 38]. Cette augmentation semble être due au développement de l'économie et aux changements de mode de vie que ces pays ont subis ces dernières décennies^[38].

Aux états Unis, en utilisant les données de systèmes de remboursement des soins, K.L. Wallace *et al* ont confirmé l'augmentation de la fréquence de la maladie de presque le double

en dix ans, passant de 2,9 ‰ en 1990 à 5,2 ‰ en 1999 (**Tableau 2**)^[39] notamment chez les hommes de plus de 75 ans^[40].

L'étude de Lawrence *et al* basée sur la *National Health Interview Survey* (NHIS), montre aussi une prévalence croissante de la goutte en 20 ans passée de 4,8 ‰ en 1969 à 9,9 ‰ en 1983 à 1985, puis en diminuant légèrement pour atteindre 9,4 ‰ en 1996 (**Tableau 2**)^[41, 42].

Au Royaume Uni, la prévalence de la goutte a été multipliée par 5 en allant de 2,6‰ en 1975 à 14‰ en 2005 (**Tableau 2**)^[43, 44].

Une autre étude de Kuo *et al*, basé sur le *Clinical Practice Research Datalink* (CPRD) a estimé que la prévalence avait augmenté de 1,52 à 2,49 % entre 1997 et 2012 (**Tableau 2**)^[4].

Cette augmentation de prévalence de la goutte peut être expliquée globalement par l'augmentation de l'espérance de vie, l'accroissement de comorbidités, les prescriptions de plus en plus fréquentes de diurétiques et à une modification de l'alimentation amenant à une élévation d'uricémie^[8].

Tableau 2 : Estimation de la prévalence de la goutte aux Nouvelle Zélande, USA, Royaume Uni, Chine et Taiwan.

Etudes	Période de l'enquête	Nombre de sujets	Vérification des cas	Définition des cas	Prévalence
Nouvelle Zélande					
Lennane ^[36]	1958	641 186	Échantillon randomisé de population	Interview et examen clinique	Européens 3,1/1000 Maori 27/1000
Chales ^[33]	1966	532 747	Échantillon randomisé de population	Interview et examen clinique	Européens 9/1000 Maori 60/1000
Klemp ^[35]	1992	315 342	Échantillon randomisé de population	Interview et examen clinique Critères ARA 1977	Européens 29/1000 Maori 64/1000
USA					
Wallace ^[39]	1990 1999	8 millions	Données de remboursement des soins	- Diagnostique de goutte ou de THU - ICD	2,9/1000 5,2/1000
Lawrence ^[41, 42]	1969	100 000	NHIS NHANES III	Déclaration goutte	4,8/1000
	1976				7,8/1000
	1980				8,3/1000
	1983-1985				9,9/1000
	1988				8,5/1000
	1992 1996				8,4/1000 9,4/1000
Royaume Uni					
Currie ^[43]	1975	374 832	Dossier du médecin généraliste	Diagnostic du médecin généraliste	2,6/1000
Steven ^[45]	1987	35 251	Dossier du médecin généraliste (Ecosse)	Revue des dossiers cliniques	3,4/1000
Harris ^[46]	1993	300 376	Dossier du médecin généraliste (Angleterre)	Diagnostic du médecin généraliste	9,5/1000
Mikuls ^[47]	1991 1994 1999	1,8 millions	Base UK GPRD	Diagnostic du médecin généraliste	NR NR 14/1000
Annemans ^[44]	2000-2005	2,5 millions	IMS Disease	Diagnostic du médecin généraliste	14/1000
Kuo ^[48]	1997 2012	12 millions	CPRD	Dossiers Cliniques	1,52/100 2,49/100
Chine					
Nan ^[37]	2002	2438	Échantillon randomisé de population	Déclaratif confirmé sur dossier médical	3,6/1000
Miao ^[38]	2004	5003	Échantillon randomisé de population	Questionnaire, examen physique Critères ARA 1977	11,4/1000
Taiwan					

Chou ^[49]	NR	8998	Échantillon randomisé de population	Questionnaire, examen physique Hyperuricémie Ex. liquide synovial	Rural 1,6/1000 Suburbain 6,7/1000 Urbain 6,7/1000
Chang ^[50]	1993-1995	9961	Échantillon randomisé de population	Interview Critères ARA 1997	Aborigène 91/1000 Non-aborigène 3/1000
Lin ^[51]	1993-1996	3178	Nutrition & Health survey	Interview Examen physique	34/1000

Abbreviations:

ARA: American Rheumatism Association; **CPRD:** Clinical Practice Research Datalink; **ICD:** International Classification of Disease; **UK GPRD:** United Kingdom General Practice Research Database; **NHANES:** National Health And Nutrition Examination Survey; **NHIS:** National Health Interview Survey; **NR:** Non Renseigné; **THU:** Traitement Hypo-Uricémiant.

III. 2 Incidence de la goutte

Plusieurs études montrent une augmentation de l'incidence de la goutte entre les années 50 et 90, et une relative stabilisation depuis les années 90/2000. Elles soulignent aussi le sex/ratio penchant nettement du côté des hommes, et la survenue de goutte chez le patient âgé en grande majorité.

Au Etats Unis, d'après l'étude de Arromdee *et al*, basée sur le Rochester Epidemiology Project qui a comparé l'incidence de la maladie dans la région de Rochester et ont noté une augmentation de 45/100 000 en 1977–1978 à 62,3/100 000 en 1995–1996^[52].

L'étude de Kuo *et al* analysant les données du CPRD au Royaume-Uni, a mis en évidence une incidence de survenue de la goutte de 1,36‰ en 1997 et de 1,77‰ en 2012, soit une augmentation de 29,6%^[48].

En revanche, dans une autre étude au Royaume Uni basée sur la GPRD, l'incidence de la goutte restait relativement stable avec 1,2‰ en 1991 et 1,3‰ en 1999 ^[47] et 1,29‰ en 2001 et 1,23‰ en 2007^[53].

D'après les données de cohortes longitudinales américaines, l'incidence et dans une fourchette allant de 1,73 ‰ à 2,8‰^[33].

IV. FACTEURS POTENTIELLEMENT ASSOCIES A UNE AUGMENTATION DU RISQUE DE GOUTTE

C'est l'association de plusieurs facteurs chez un même patient qui conduit au développement de la pathologie goutteuse. Cependant, il existe des facteurs de risque modifiables et des facteurs de risque non modifiables.

IV. 1 Modifiables

➤ Hyperuricémie

Une hyperuricémie n'implique pas forcément l'apparition d'une goutte mais Il n'y a pas de goutte sans hyperuricémie.

Il est bien établi que l'hyperuricémie est le principal facteur de risque dans la survenue et le développement d'une goutte. Plusieurs études ont démontré une relation directe (exponentielle) entre le taux d'acide urique sérique et un risque futur de goutte.

Chose confirmé dans l'étude de Framingham^[54] et la Normative Aging Study^[55].

➤ Médicaments

L'utilisation de certains médicaments a aussi un impact sur le taux d'acide urique sérique^[8]. Il a été démontré que l'utilisation de diurétiques pouvait avoir un effet hyper-uricémiant ^[56]. De même pour l'aspirine a de faible dose (1 à 2g/L), mais a forte dose (>3g/l) elle a l'effet inverse^[8].

➤ Alimentation

Un tiers de l'acide urique est formé à partir du catabolisme des purines alimentaires, ce qui fait qu'une alimentation riche en purine (tel que les fruits de mer, quelques viandes, boissons alcoolique) peut contribuer au développement d'une hyperuricémie, de même pour les boissons contenant du Fructose qui peut favoriser la précipitation de cristaux d'urate ^[1, 57].

A l'inverse, la consommation de produits laitiers allégés, de café et de vitamine C, diminuerait le risque d'hyperuricémie et de goutte.

➤ Syndrome métabolique

La goutte est fortement associée à des comorbidités incluant le syndrome métabolique, défini par une obésité abdominale, une hypertriglycéridémie, de faibles taux de cholestérol HDL, une hypertension artérielle, et une hyperglycémie^[58]. Alors que la perte de poids est importante (Tableau 3)^[59].

La relation entre le syndrome métabolique et la goutte est supposée être médiée par l'hyperuricémie ; les concentrations sériques d'acide urique sont corrélées au degré d'adiposité abdominale et aux mesures d'insulino-résistance, et l'insuline inhibe l'excrétion rénale tubulaire d'acide urique^[60].

Tableau 3 : Variation de l'uricémie avec le poids.

Variations du poids	Variations de L'uricémie
Perte de poids de 5 à 10 Kg	-19 $\mu\text{mol/L}$ (-20; -17)
Perte de poids > 10 Kg	-37 $\mu\text{mol/L}$ (-40; -35)
Prise de poids de 5 à 10 Kg	+17 $\mu\text{mol/L}$ (+16; +19)
Prise de poids > 10Kg	+26 $\mu\text{mol/L}$ (+23; +29)

(Adapté Chales et Richette., 2016)^[61]

Il existe plusieurs définitions du syndrome métabolique. Cependant les plus utilisées sont deux ; l'une proposé par le *National Cholesterol Education Program* (NCEP) en 2001 dite ATP III (*Adult Treatment Panel III*), utilisé dans l'étude précédente et l'autre plus récente en 2005 dite IDF (*International Diabetes Federation*) (**Tableau 4**)^[1].

D'après une étude basée sur les données de la NHANES III, la prévalence du syndrome métabolique chez les patients atteints de goutte pourrait atteindre 62,8% ^[62], et 61% dans une autre étude CACTUS^[63].

Tableau 4 : Les définitions du syndrome métabolique utilisées par l'ATP et l'IDF.

Critères de diagnostic	NCEP-ATP 2001	IDF 2005
Tour de taille	≥ 88 cm femmes	≥ 80 cm femmes
	≥ 102 cm hommes	≥ 94 cm hommes
Hypertriglycéridémie	$\geq 1,5$ g/l	$\geq 1,5$ g/l
HDL cholestérol	$< 0,5$ g/l femmes	$< 0,5$ g/l femmes
	$< 0,4$ g/l hommes	$< 0,4$ g/l hommes
Pression artérielle	$\geq 135/85$ mmHG	$\geq 130/85$ mmHG
Glycémie à jeun	$\geq 1,1$ g/l	$\geq 1,0$ g/l

(Grundy *et al.*, 2005 ; Guize *et al.*, 2008)^[64, 65]**Abbréviations:**

ATP: Adult Treatment Panel; **IDF:** International Diabetes Federation; **NCEP:** National Cholesterol Education Program.

IV. 2. Non modifiables➤ **Age**

La prévalence de la goutte augmente de façon linéaire avec l'âge (**Figure 4**), en effet cela peut s'expliquer par la lenteur de formation des dépôts cristallins pathogènes d'urate monosodique. Le risque de goutte dépend donc du degré et de la durée de l'hyperuricémie^[66].

La NHANES de 1996, la prévalence était de 22,4% chez les sujets âgés de 45 à 64 ans, et de 31,7% chez les sujets âgés de 65 à 74 ans alors qu'elle était chiffrée de 1,8% chez les sujets âgés de 18 à 44 ans^[5, 8].

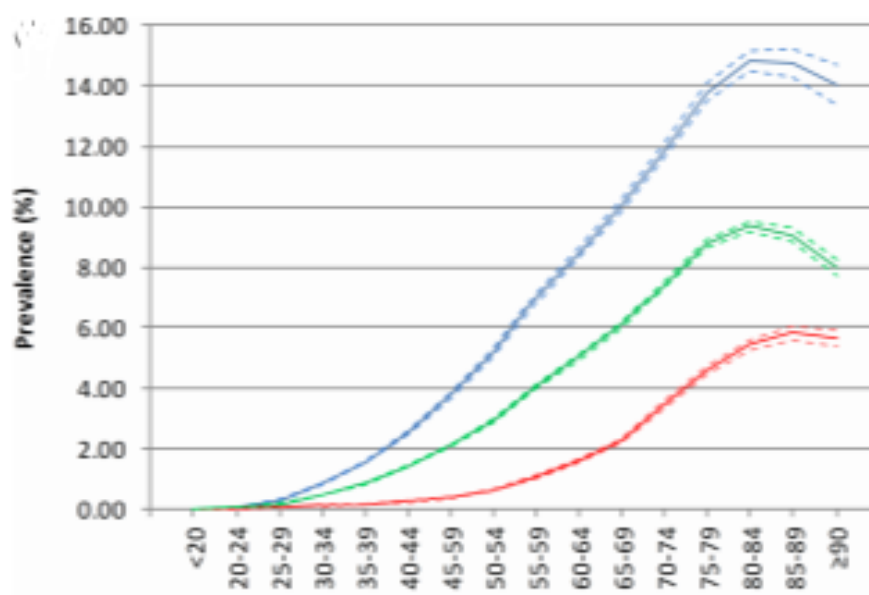
➤ Sexe

Dans toutes les tranches d'âge, L'uricémie est physiologiquement plus élevée chez l'homme que chez la femme (**Figure 4**) (Jusqu'à la ménopause en raison de l'effet uricosurique des œstrogènes, ces derniers diminuent après la ménopause)^[6]. Où l'uricémie de la femme tend à se rapprocher des valeurs de l'uricémie de l'homme.

Cette goutte féminine tardive peut s'expliquer par des facteurs liés à l'âge ; problèmes rénaux, HTA et prise de traitement diurétique, de plus de la diminution de l'usage de traitements hormonaux^[67].

En France, une prédominance masculine retrouvée par l'étude GOSPEL dans laquelle 88,3% des goutteux étaient des hommes^[68].

Une autre étude en Nouvelle Zélande, ou the *Health Quality and Safety Commission* estimait que les hommes étaient trois fois plus atteints que les femmes^[69].



(Kuo et al.,2015)^[48]

Figure 4 : Représentation de la prévalence de la goutte en fonction de l'âge et sexe au Royaume Uni en 2012.

(En bleu : Hommes ; En vert : Total ; En rouge : Femmes)

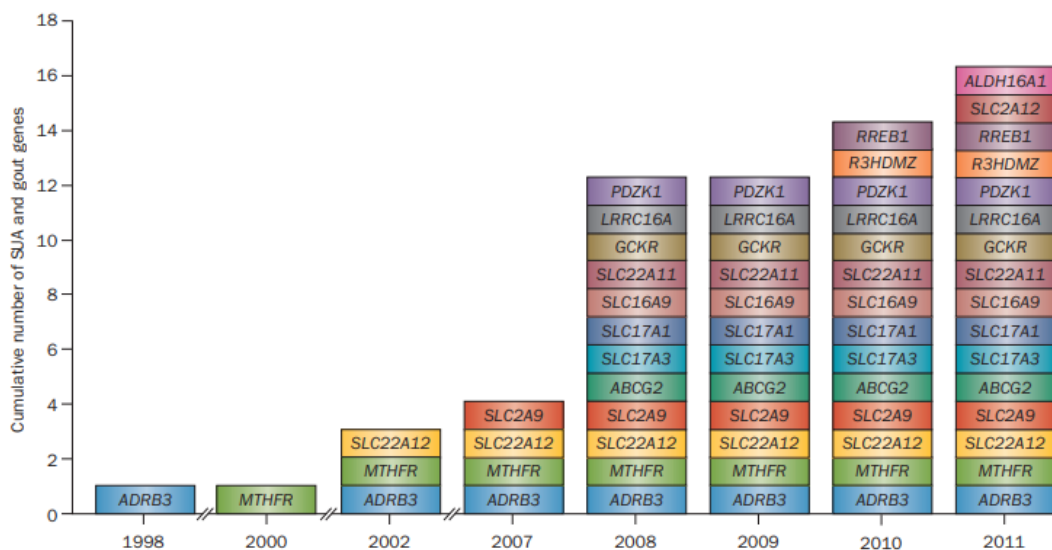
➤ Implication des facteurs génétiques

Quarante 40% des patients atteints de goutte ont un parent également goutteux^[66]. Une étude a identifié trois loci génétiques majeurs en association avec la concentration d'acide urique et la probabilité de survenue de la goutte^[70]. C'est trois loci sont :

- SLC2A9 codant la protéine GLUT9, un transporteur de glucose et de fructose, mais aussi de l'acide urique dans le tubule rénal proximal^[71].
- ABCG2, transporteur par efflux de l'acide urique au niveau des cellules du tubule collecteur.
- SLC17A3, codant NPT4, un co-transporteur Na/P du tubule proximal.

Par la suite, de nombreuses études ont découvert plus de 40 gènes (**Figure 5**) et leur association avec l'hyperuricémie et la goutte^[72].

La découverte de ces gènes et l'influence de leur polymorphisme sur le taux d'acide urique ne peut expliquer qu'une petite partie de la variation de l'uricémie dans les populations étudiées^[73].



(Adapté de Reginato et al., 2012)^[73]

Figure 5 : Chronologie de découverte des gènes impliqués dans la pathogenèse de l'hyperuricémie/goutte.

V. MANIFESTATIONS CLINIQUE DE LA GOUTTE

Les manifestations cliniques de la goutte peuvent être très variées, Nous pouvons distinguer plusieurs stades d'évolution, dans l'ordre chronologique d'apparition : hyperuricémie asymptomatique ; goutte aiguë ; phase subaiguë ; goutte chronique ou tophacée^[74].

V. 1 Goutte typique

V. 1. A Hyperuricémie asymptomatique

Condition fondamentale pour le développement de la maladie, elle constitue un stade précoce de la goutte. C'est au cours de cette phase que va s'accumuler, de manière silencieuse, des cristaux d'urate monosodique au sein des tissus dont le tissu articulaire, ces dépôts asymptomatiques ne présente pas de manifestations cliniques rhumatologiques et ne nécessite aucun traitement médicamenteux^[1, 7].

V. 1. B Goutte aiguë

➤ Facteurs déclenchants

Même si la crise de goutte survient habituellement sans cause connue, plusieurs facteurs peuvent la déclencher tels que des stress physique ou psychique ; comme elle peut être précédée de prodromes constitués d'une sensation de malaise et d'irritabilité, et la survenue de paresthésies à type de picotements locaux ^[74, 75].

➤ Localisation

Il s'agit typiquement d'une mono-arthrite aiguë, inflammatoire, touchant surtout les articulations des membres inférieurs et en particulier la métatarso-phalangienne de l'hallux, ou, à part le gros orteil, elle peut atteindre le tarse, la cheville et le genou.

Elle peut intéresser aussi les membres supérieurs, en particulier les mains et les poignets. Les épaules sont rarement atteintes, tandis que les coudes sont touchés, surtout au niveau des bourses olécraniennes.

La pathologie goutteuse chez les sujets âgés, surtout de sexe féminin a quelques particularités. Les localisations diffèrent quelque peu, il est possible que les premières crises soient d'emblée polyarticulaires et touchent le membre supérieur, la main en particulier ^[74-76].

➤ Signes cliniques et symptômes

Elle est caractérisée par un début brusque le plus souvent nocturne accompagné de douleurs vives et intenses, très violentes, qui se développent très rapidement en 6–12 heures. Celle-ci peut être associée à ;

- Une hyperesthésie cutanée rendant insupportable le moindre contact du drap contre l'articulation touchée.

- Une tuméfaction, une rougeur, une chaleur locale et un érythème marqué comparable à une cellulite.

L'inflammation est tellement violente qu'elle est capable de « brûler » littéralement la peau de la zone atteinte qui, au bout d'un jour ou deux, se détache en peau d'oignon (**Figure 6**) [74, 75].

➤ Signes biologiques

Etant donnée la réaction inflammatoire locale et systémique déclenchée par les cristaux d'UMS, Les bilans biologiques peuvent présenter une augmentation de la vitesse de sédimentation (VS), de la protéine C (CRP) et une hyperleucocytose. Le niveau d'uricémie peut rester (faussement) normale ou peu augmentée [1, 74].



(D'après Punzi et Oliviero, 2007)^[74]

Figure 6 : Photo qui représente la goutte aiguë du gros orteil.

V. 1. C Goutte subaigüe

Après la résolution de l'accès aiguë, le patient entre dans une phase subaigüe asymptomatique jusqu'à la prochaine crise de goutte. Durant ces intervalles libres et en absence de prise en charge, les dépôts de cristaux d'urate de sodium se poursuivent et donc la pathologie évolue.

La progression de la maladie goutteuse se traduit par des accès goutteux de plus en plus fréquents avec diminution progressive des périodes intercritiques puis passage à l'atteinte chronique^[7].

V. 1. D Goutte chronique

➤ Facteurs déclenchants

La phase chronique s'installe généralement après plusieurs années d'évolution d'une goutte non diagnostiquée ou non traitée^[77].

➤ Tophi

L'apparition de tophus est caractéristique de la goutte chronique. Il s'agit de dépôts organisés en nodules ferme, indolores et blanchâtre. Ils sont de taille variable, de quelques millimètres à plusieurs centimètres de diamètre. La consistance au début est généralement molle et ensuite devient plus dure^[74, 75].

➤ Localisation

Elle est caractérisée par l'apparition de dépôts d'urate de sodium

- Au niveau sous-cutané à l'origine de tophi sous-cutanés « Goutte Tophacée » qui se localisent préférentiellement au pavillon de l'oreille, les coudes et les mains (**Figure 7**).
- Au niveau articulaire et osseux à l'origine de complications ostéoarticulaires variées dite « Goutte articulaire », qui siège particulièrement aux mains et pieds.
- Au niveau rénal à l'origine de « Lithiases urique ou Néphropathie urique »^[1, 74].



(Hervé, 2016)^[8]



(Punzi et Oliviero, 2007)^[74]



(D'après Minesh Khatri, MD, 2020)^[78]

Figure 7 : Photo qui représente des tophi au niveau de l'oreille, du coude et de la main.

➤ Complications

Le tophus est parfois le siège de poussées inflammatoires et douloureuses. Il peut s'ulcérer en laissant sourdre une matière blanchâtre et crayeuse qui constitue une porte d'entrée pouvant se surinfecter (**Figure 8**), mais la surinfection est rare^[5, 77].

Des atteintes neurologiques peuvent aussi apparaître lorsque le tophus comprime des structures nerveuses (rachis, canal carpien) ^[77].



(D'après Sculler et al., 2020)^[77]

Figure 8 : Photo qui représente un Tophus mis à nu après une infection cutanée.

➤ Signes Biologiques

La présence de l'hyperuricémie est le marqueur le plus important, par contre l'augmentation de la VS et de la CRP peut manquer ou être seulement peu élevée. L'analyse du liquide synoviale et l'étude du tophus restent les examens décisifs.^[74]

V. 2 Goutte atypique

Avec le vieillissement de la population, nous assistons de plus en plus souvent à des présentations atypiques qui peuvent intéresser de façon inhabituelle une autre articulation, ces localisations atypiques peuvent se voir au niveau du rachis, des articulations sacro-iliaques, des hanches ou des épaules, rendant le diagnostic plus difficile ^[5, 77]. Des manifestations ORL de type dysphagie, ou de dyspnée aiguë, secondaires à une atteinte des cartilages et des cordes vocales par des dépôts tophacés, ainsi qu'une déformation du nez avec «bosse» nasale peuvent également se voir^[79].

PARTIE 2

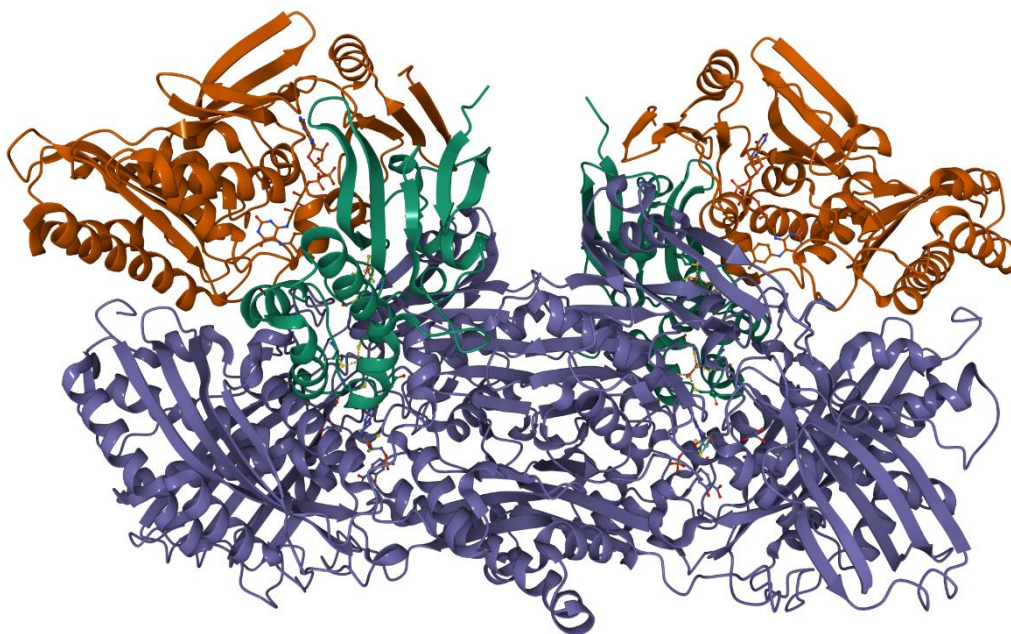
Xanthine Oxydase

I. GENERALITES

En 1902, Schardinger^[80] a montré que le lait de vache contient une enzyme capable d'oxyder les aldéhydes en acides, accompagnée de la réduction du bleu de méthylène, cette enzyme était alors communément appelée « Enzyme de Schardinger ». Plus tard en 1922, Morgan *et al.*,^[81] ont montré que le lait contient une enzyme capable d'oxyder la xanthine et l'hypoxanthine, avec réduction d'O₂ en H₂O₂, cette enzyme a été alors appelée Xanthine Oxydase 'XO'.

Ce n'est qu'en 1938 que Booth^[82] a présenté des preuves montrant que « l'enzyme de Schardinger » était en fait « la Xanthine Oxydase ».

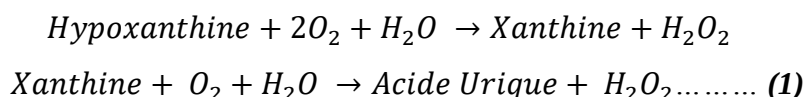
La XO est un complexe molybdo-flavo-protéique^[6]. Sa structure cristalline représentée sur la **Figure 9** a été déterminée en 2000 par Enroth *et al.*,^[83] c'est l'une des enzymes les plus importantes présentes dans le lait des mammifères mais elle ne se limite pas qu'au lait, elle est également répandue dans nombreux organismes allant des bactéries aux humains^[84, 85].



(Enroth *et al.*, 2000)^[83]

Figure 9 : Structure cristalline de la Xanthine oxydase du lait bovin (PDB ID : 1FIQ).

Sa propriété catalytique principale est le catabolisme des purines, à savoir l'oxydation successive de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique (**Équation 1**)^[84, 86].



Elle est nommée ainsi parce que la xanthine était considérée comme son substrat physiologique^[3]. Ce n'est que plus tard qu'il a été trouvé que la XO dans certaines conditions peut oxyder une grande variété de substrats : purines, ptéridines et aldéhydes^[18].

La xanthine oxydase (XO) [EC 1.1.3.22] est une forme de la xanthine oxydoréductase (XOR), tout comme la xanthine déshydrogénase (XDH) [EC 1.1.1.204]^[87]. Ses deux formes, XO dite type O, et XDH dite type D (plus dominante *in vivo*), sont interconvertibles^[88].

II. DISTRIBUTION ET LOCALISATION DE LA XO

L'activité XOR a été détectée dans toutes les espèces étudiées à ce jour, y compris les bactéries ^[89].

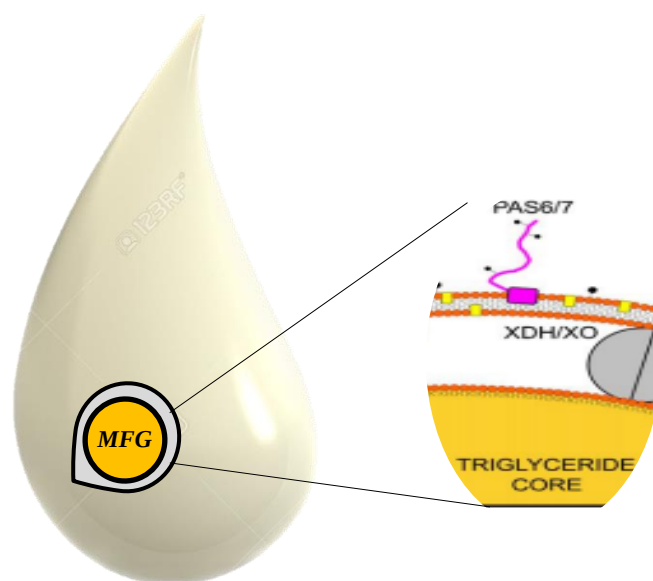
Dans les tissus des mammifères, les études ont montré que l'activité est largement distribuée, en particulier au niveau des cellules hépatiques et endothéliales des capillaires sanguins ^[90, 91]. Dans les tissus humains, la XOR se trouve dans le foie, l'intestin grêle et la glande mammaire ^[92].

La XOR a été détecté principalement dans les hépatocytes et des cellules de Kupffer du foie, dans les anthérocytes et des cellules de gobelet de jéjunum, et dans la glande mammaire^[92, 93]. Elle a aussi été détecté dans les macrophages humains et les mastocytes^[94].

Les méthodes de localisation intracellulaire montrent que la XOR se trouve à fortes concentrations dans le cytoplasme et au niveau de la membrane cellulaire et elle est très abondante dans le lait ^[95, 96].

Dans le cas du lait (notre source d'enzyme dans cette thèse), la XO se trouve dans la membrane des globules gras du lait (**MFGM** : Milk Fat Globule Membrane), ou elle représente 20% des protéines totales (**Figure 10**)^[85, 97].

La MFGM est une enveloppe protectrice partiellement dérivée de la membrane plasmique de la cellule sécrétrice de la glande mammaire, qui entoure chaque gouttelette lipidique^[98].



Adapté de (Danthine et al., 2000 ; Vallée, 2015 ; Harrison, 2006)^[85, 99, 100]

Figure 10 : Localisation de la XO dans les globules gras du lait.

MFG : Milk Fat Globule.

III. STRUCTURE DE LA XANTHINE OXYDASE

La forme de cette enzyme se présente par un homodimère de deux (02) sous unités identiques de 150Kda chacune. L'interface entre les sous-unités se produit de telle sorte que le complexe global a une forme de papillon (butterfly shape).

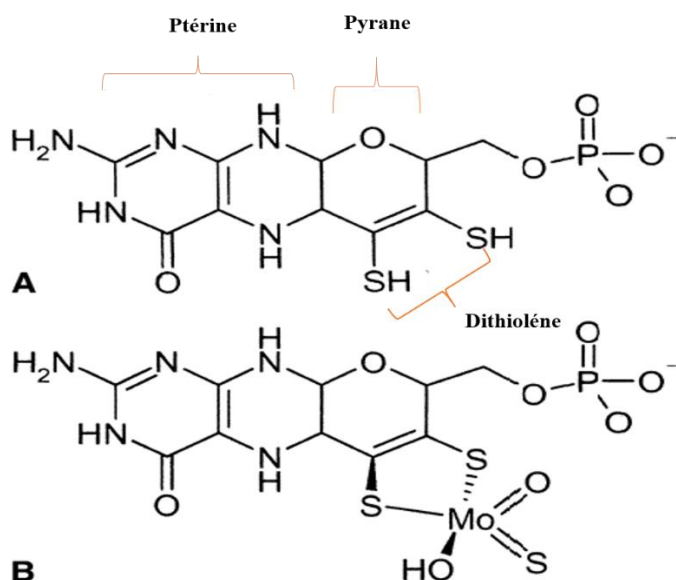
Chaque sous-unité est partagée en trois (03) domaines ;

- **Le domaine N-terminal** : de 20 Kda présente deux centres de soufre et de fer distinct (de type [2Fe-2S]) (1-165 acides aminés) ;
- **Le domaine intermédiaire (central)** : de 40 Kda qui contient une molécule de Flavine Adénine Dinucléotide FAD (226-531 acides aminés) ;
- **Le domaine C-terminal** : de 85 Kda qui contient le cofacteur de molybdène (Mo-Co). Ce dernier est biologiquement inactif s'il n'est pas attaché au pyranoptérine.

Le pyranoptérine (ou molybdoptérine) est une molécule organique hétérocyclique composé d'un cycle pyrane attaché à un motif ptérine, le cycle pyrane porte un groupement dithiolène ainsi qu'un groupement phosphate (**Figure 11**), cette molécule est nécessaire à l'activité de l'enzyme.

Dans son état oxydé, le Mo se lie au pyranoptérine par une liaison dithiolène, formant une géométrie carrée pyramidale comme présentée sur la **Figure 11**. (590-1332 acides aminés) ^[94, 101] (**Figure 12**).

La distance la plus proche entre les atomes des cofacteurs de chaque sous unité est de 50 Å, ce qui fait que chaque sous unité est indépendante de l'autre avec aucun échange d'électron entre les deux ^[83, 85, 87, 88].



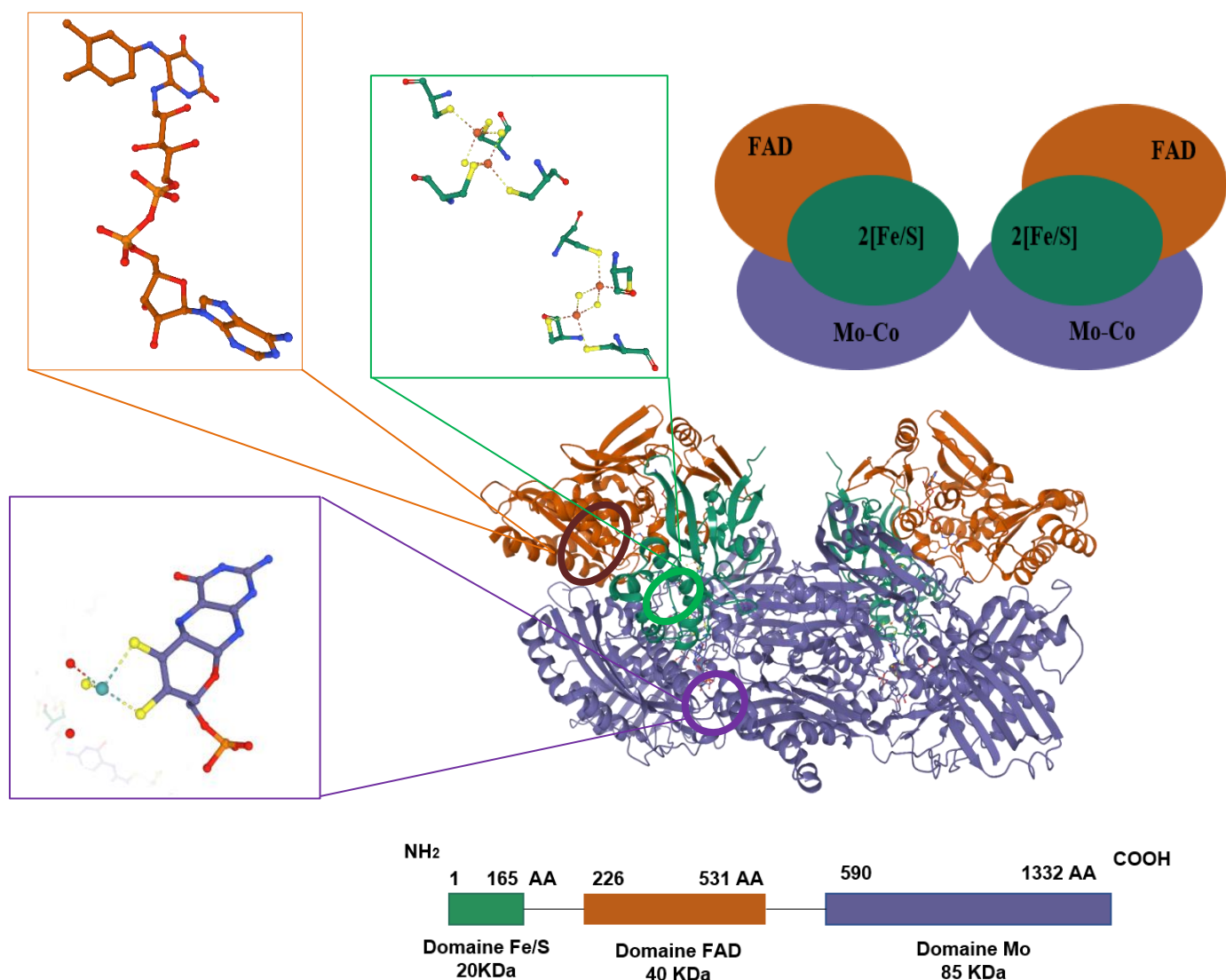
(Harrison, 2002)^[94]

Figure 11 : (A) Structure du molybdoptérine, (B) Structure du cofacteur de molybdène, où le Mo est lié au molybdoptérine par les atomes de soufres.

La forme active (forme sulfu) du cofacteur est représentée. Dans la forme inactive (forme désulfo) le Mo=S et remplacé par Mo=O.

Mo : Molybdène

Le gène codant pour la XO humaine, est situé sur le bras court du chromosome 2 en position 2p22 ou 2p23 ^[102-104]. Il s'étend sur plus de 60 000 paires de bases de l'ADN qui ont été divisés en 36 exons, la structure d'exon-intron est fortement conservée. L'exon 36 est de plus de 700 pb et contient quelques derniers acides aminés traduits et 3% c'est l'ensemble des régions non traduites. Chacun des 35 exons restants sont constitués de 50 à 280 pb ^[89].



Adapté de (Enroth et al., 2000)^[83]

Figure 12 : Structure cristalline de la Xanthine oxydase du lait bovin (PDB ID : 1FIQ).

Les deux monomères ont trois domaines symétriques représentés ici par les mêmes couleurs ; ces domaines sont : le domaine à cluster fer-soufre (**en vert**), le domaine contenant le FAD (**en orange**) et le domaine contenant le molybdène (**en violet**)

Abréviations : FAD : Flavine Adénine Dinucléotide; Mo-Co : Molybdène-cofacteur; Fe/S : Fer-Soufre

IV. MECANISME REACTIONNEL ET PROPRIETES ENZMATIQUES DE LA XANTHINE OXYDASE

Bien que les deux formes de l'enzyme effectuent des réactions similaires de catabolisme des purines, des différences existent selon la forme de l'enzyme ; oxydase ou déshydrogénase^[105].

Les études ont montré que l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine se fait au niveau du centre Mo de l'enzyme. Les électrons sont transmis au centre FAD soit de NAD (cas de XDH) ou de l'oxygène moléculaire (cas de XO) par l'intermédiaire des centres Fe₂/S₂ qui sont considérés comme réservoirs d'électrons (**Figure 13**)^[6, 105].

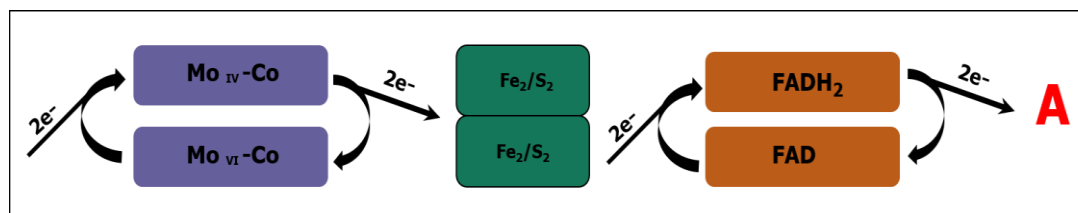
(Trabsa, 2011)^[106]

Figure 13 : Cheminement des 2 électrons e^- vers l'accepteur final **A**. Celui-ci peut-être soit NAD^+ , soit O_2 .

Le mécanisme d'action s'effectue en deux demi réactions, d'oxydation et de réduction.

▪ **LA PREMIERE** étant la demi réaction de réduction, qui s'effectue au niveau du : **Site actif** (molybdoptérine) ; où la xanthine subit une oxydation, de telle façon un hydrogène est transféré au site Mo^{VI} oxydé pour le réduire en Mo^{IV} . 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) (**Équation 2**)



Pour continuer sa fonction catalytique, le molybdène perd deux électrons qui vont être repris par la chaîne de transport et acheminés vers l'accepteur final^[107].

▪ **LA DEUXIEME** étant la demi réaction d'oxydation, qui s'effectue au niveau du : **Centre FAD**, où se fait un transfert intramolécule d'électrons entre les sites Mo et FAD médié par le site Fe_2 / S_2 pour réoxyder le Mo^{IV} en Mo^{VI} avec une libération du produit (acide urique) suivie d'une réduction du FAD en $FADH_2$.

✓ Dans les cas de la XDH :

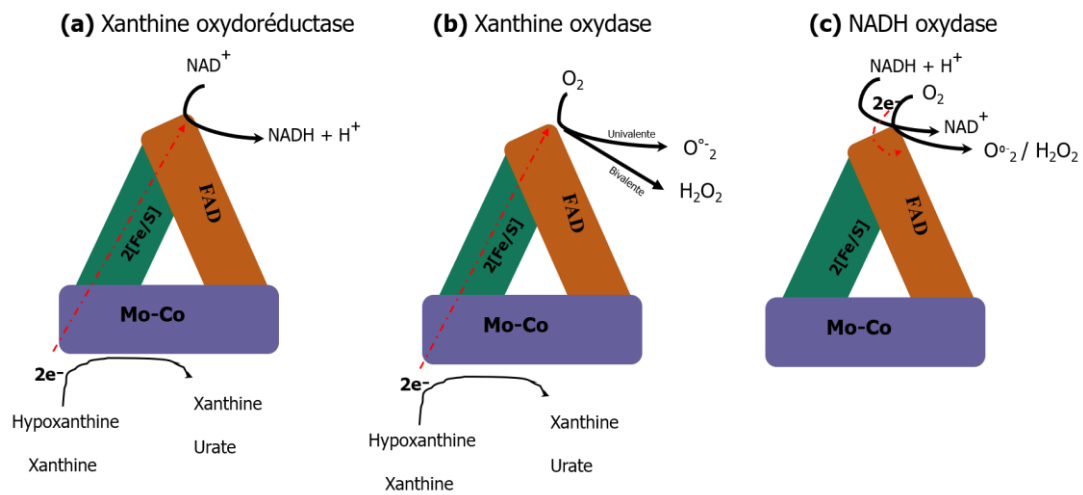
Si la demi-réaction d'oxydation est catalysée par la XDH, le NAD^+ est fixé sur le $FADH_2$ et donc subit une réduction bivalente par les deux électrons du $FADH_2$ ^[46].

✓ Dans le cas de XO :

Si la demi-réaction d'oxydation est catalysée par la XO le substrat oxydant est l' O_2 qui sera réduit soit d'une manière univalente pour donner l' $O_2^{\cdot -}$, soit d'une manière bivalente pour donner l' H_2O_2 .

✓ Autres cas :

Les deux formes de la XOR peuvent également agir comme une NADH oxydase. Comme la **Figure 14** le montre, la plupart des substrats réduits agissent au site Mo bien que, uniquement, le NADH réagit directement avec le centre FAD. Après une rapide équilibration entre les centres redox, les électrons sont habituellement passés de FAD au NAD^+ ou à l'oxygène moléculaire^[6, 106].

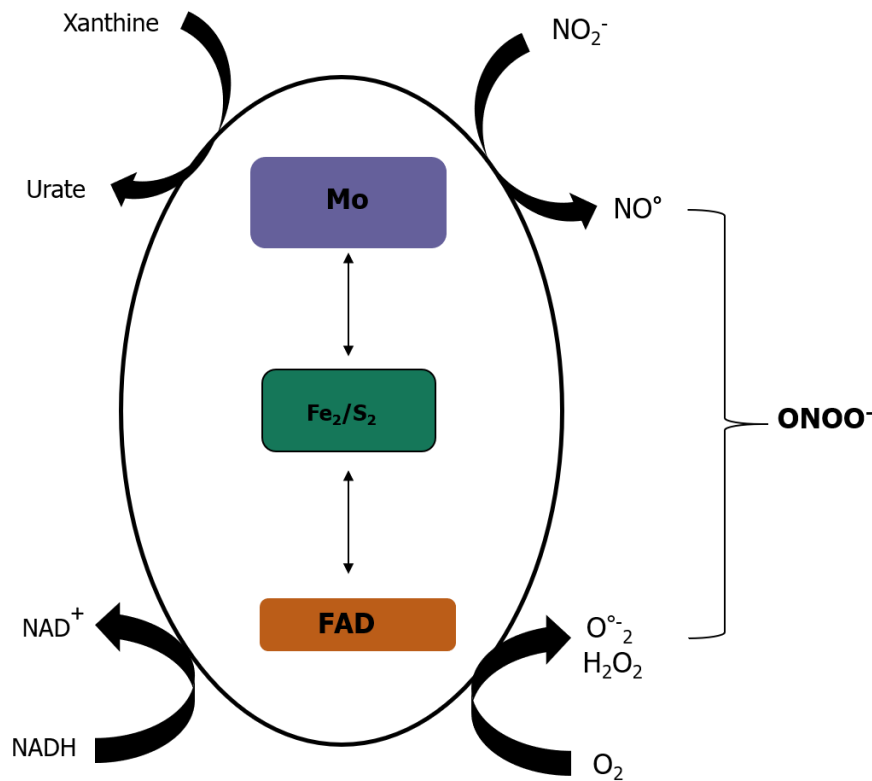


(Adaptée de Benabdelhak, 2015 ; Harrison, 2002)^[94, 105]

Figure 14 : Oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique avec réduction du NAD (a.déshydrogénase) ou de l'oxygène moléculaire (b.oxydase).

✓ Dans les conditions hypoxiques :

Le radical nitroxy ($NO^\bullet$) est normalement produit par la NO synthase (NOS), mais dans les conditions hypoxiques (anaérobiques), cette enzyme ne peut pas le produire^[102]. Donc la XOR joue le rôle du NO synthase (NOS). En présence de nitrite (NO_2^-) et d'un substrat réducteur (Xanthine ou NADH), le $NO^\bullet$ est formé au niveau du site Mo. Ensuite, Ce radical se lie au radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ produit par le site FAD pour donner une molécule oxydante non radicalaire très toxique : le peroxynitrite ($ONOO^-$) comme le montre **la Figure 15** ^[6, 94, 108].



(Adaptée de Harrison, 2002)^[94]

Figure 15 : Rôle de la XOR dans l'oxydation du NADH et la génération du radical nitroxy ($\text{NO}^\bullet$) et du peroxynitrite (ONOO^-).

V. LES DIFFERENTES FORMES DE LA XOR

Sa terminologie peut être parfois troublante, car toutes les formes de l'enzyme (y compris XOR, XDH et XO) sont largement désignées sous le nom de « Xanthine Oxydase », ce qui est le cas dans le titre de cette thèse. Cependant, l'appellation la plus correcte pour cette enzyme est « Xanthine oxydoréductase XOR », car « la XO » est surtout réservée à la forme de « XOR » qui ne peut pas réduire le NAD^+ .

L'enzyme se trouve sous deux formes : active et inactive.

➤ La forme active

Il existe deux formes actives interconvertibles : la xanthine déshydrogénase (XDH ; EC 1.1.1.204), qui prédomine *in vivo* ; et la xanthine oxydase (XO ; EC 1.1.3.22) qui résulte après des modifications post traductionnelles, qui est vue aux concentrations élevées dans certaines conditions physiologiques et pathophysiologiques^[106].

Ces deux formes peuvent être interconvertibles, soit d'une façon réversible par oxydation des groupements sulfhydryles $-\text{SH}$ en pont disulfures S-S (par des réactifs de sulfure ou autres tel

que, stockage à -20°C et incubation à 37°C), ou de manière irréversible par protéolyse (trypsine, chymotrypsine, pancréatine...) (**Tableau 05**) [84, 87, 102, 109].

La XDH réduit préférentiellement le NAD⁺ et l'oxygène, tandis que la XO ne peut pas réduire le NAD⁺, préférant l'oxygène moléculaire^[106].

➤ La forme inactive

L'enzyme peut se trouver naturellement sous deux formes inactives, la Démolybdo-XO, dépourvu de Mo, et l'autre, la Désulfo-XO, dans laquelle le groupe Mo=S (indispensable à l'activité catalytique) et remplacé par Mo=O [85]. Il existe une troisième forme inactive de l'enzyme qui n'a pas été bien décrite jusqu'ici, c'est la Déflavo-XO (dépourvue de FAD) (**Tableau 5**)^[110].

Tableau 5 : Existence *in vivo* et interconversion des différentes formes de la XOR.

Formes de XOR	Existence <i>in vivo</i>	Interconversion
FORMES ACTIVES		
Xanthine déshydrogénase HDX	Approximativement 80% <i>in vivo</i>	<i>HDX</i> → <i>XO</i>
		1/ irréversiblement par protéolyse 2/ réversiblement par réactifs de sulfure
Xanthine oxydase XO	Approximativement 20% <i>in vivo</i>	<i>XO</i> → <i>HDX</i> Réactifs de sulfure
FORMES INACTIVES		
Démolybdo	0-95%	<i>Démolybdo</i> → <i>active</i> Incorporation du Mo (mais pas possible dans tous les cas)
Désulfo	Approximativement dans 40% des formes contenant Mo	<i>Désulfo</i> ↔ <i>active</i> Sulfuration, désulfuration
Déflavo	0%	<i>Flavo</i> → <i>Déflavo</i> /

(Adapté de Harrison 2002)^[94]

VI. XANTHINE OXYDASE DU LAIT HUMAIN

Pendant de nombreuses années, la XO bovine a suscité l'intérêt de plusieurs études, et est devenue l'archétype des molybdoenzymes^[86]. Cependant, peu a été connue des autres sources a XO, notamment celle du lait maternel, qui n'a été caractérisée que récemment^[111]. Et qui s'est avéré avoir une activité étonnamment faible comparer à celle du lait bovin^[110, 112, 113] un fait

attribué à sa faible teneur en molybdène^[112, 114]. En effet, la XO du lait bovin présente une teneur en Mo la plus élevée comparé aux autres sources a XO (0,61 atomes de Mo/ sous unité)^[185, 114], tandis que la XO du lait humain présente une nette déficience en Mo (0,04 atomes de Mo/sous unité) (**Tableau 6**)^[108]. Ceci nous amène à dire que la XO du lait bovin a une activité enzymatique et une teneur en Mo 15 fois plus élevées que celle de la XO du lait humain^[108].

Tableau 6 : Quantité en Molybdène et pourcentage de forme inactive dans l'enzyme bovine et humaine.

	Xanthine oxydase bovine	Xanthine oxydase humaine
Quantité en Mo	0,61 atomes/sous unité	0,04 atomes/sous unité
% en forme Démolybdo-XO	45,2%	97,1%

(Adapté de Atmani et al., 2004)^[111].

Cette faible activité enzymatique du lait maternel a soulevé plusieurs questions sur son rôle physiologique^[113], amenant à dire qu'il y'est une possibilité que l'enzyme du lait humain sois programmée pour qu'elle puisse répondre (post-traditionnellement) à différentes situations métaboliques, et que le cofacteur n'est incorporé que lorsque cela est fonctionnellement requis^[110]. En effet l'activité enzymatique dans le lait maternel n'est nécessaire que dans les premières semaines post-partum, afin de remplir son rôle d'antimicrobien (mentionner dans le titre suivant) dans l'intestin du bébé. Elle diminue par la suite jusqu'à 50 fois moins que les valeurs maximales ^[110].

VII. ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA XO

Pendant de nombreuses décennies, la XOR est présumée être l'enzyme intervenant dans le catabolisme des purines, mais plus de preuves suggèrent un rôle biologique beaucoup plus large pour cette enzyme qui commence maintenant à élargir notre compréhension de son rôle physiologique ^[105, 115].

Il a été suggéré que l'expression accrue de XO peut jouer un rôle dans l'effet immunomodulateur, et antivirale en catalysant la conversion du retinaldéhyde en acide rétinoïque. Les dérivés de cet acide peuvent inhiber la réplication virale empêchant ainsi la propagation de l'infection ^[89, 116].

XOR a longtemps été connu pour avoir des propriétés bactéricides en présence de l'hypoxanthine, L'enzyme est régulée par les cytokines pro-inflammatoires, considéré comme un agent de défense, en grande partie en raison de sa capacité à générer les ROS, le superoxyde, et le peroxyde d'hydrogène ^[106]. Dans des conditions hypoxiques (0,5-3% O₂), la XOR catalyse

la réduction de nitrite inorganique à l'oxyde nitrique (NO), une molécule de signalisation avec des propriétés bactéricides. D'ailleurs, si l'oxygène est présent, également il est réduit, formant le superoxyde, lequel réagit rapidement avec le NO pour donner le peroxynitrite, un agent bactéricide plus efficace^[106].

Plusieurs études ont aussi pu montrer une activité antimicrobienne de la XOR du lait humain et bovin qui inhibe la croissance bactérienne *in vitro* d'une manière nitrite-dépendante. *In vivo*, les nourrissons ayant reçu du lait maternel riche en XOR ont moins de risques de développer des gastroentérites que ceux ayant reçu la formule infantile^[45].

L'acide urique, produit de la XOR et un antioxydant général, c'est un piègeur efficace de peroxynitrite et se produit à des concentrations relativement élevées, dans le plasma de l'homme et les primates supérieurs, qui n'ont pas l'urate oxydase. Offrant une protection contre le vieillissement et le cancer ou le stress oxydatif dans le système nerveux central^[94].

VIII. ROLE PATHOLOGIQUE DE LA XO

Depuis que McCord et Fridovich ont montré que la XO est une source de génération des radicaux libres^[117], de nombreuses études ont été réalisées et ont montré son implication dans plusieurs pathologies telles que l'infection virale, l'inflammation^[118], les tumeurs de cerveau^[119], les problèmes cardiovasculaires^[120] et dans le processus de l'ischémie-reperfusion^[121].

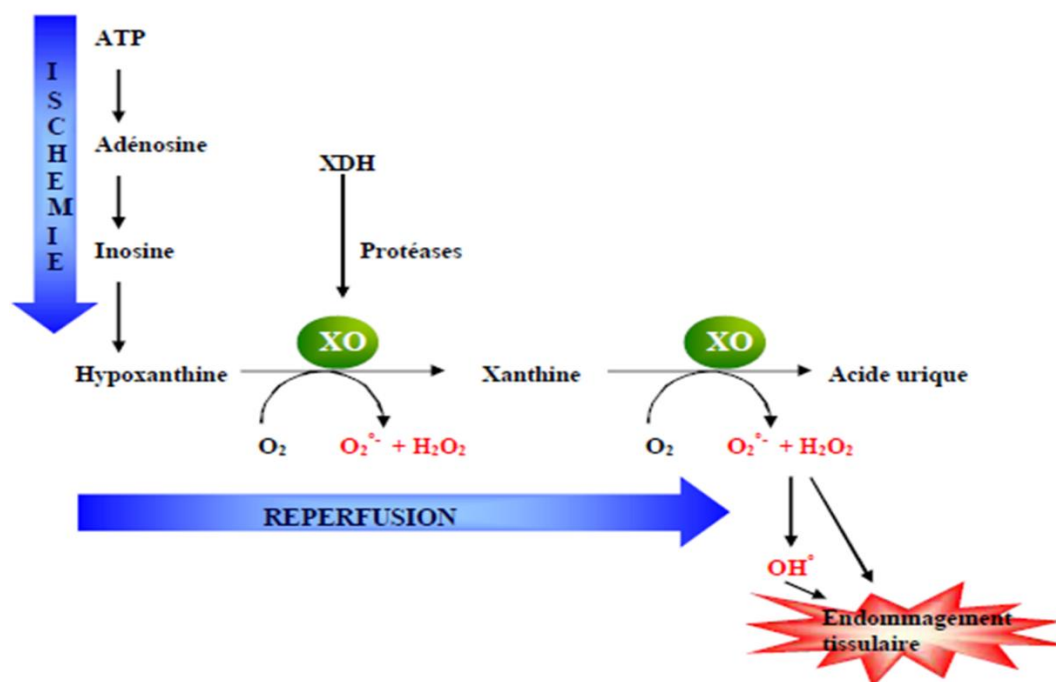
Il est admis que cette dernière est à l'origine de l'ensemble des pathologies citées précédemment et à bien d'autres^[101].

➤ Rôle de la XOR dans l'ischémie / reperfusion

La XO est une source importante des espèces oxygénées réactives (ROS) dans l'ischémie reperfusion^[121]. C'est un phénomène où la lésion du tissu peut être causée suite à la reperfusion d'un organe par le sang oxygéné après une période d'ischémie^[122].

Durant l'ischémie, le catabolisme de l'ATP pendant l'hypoxie, conduit à l'augmentation de concentration de l'hypoxanthine et lorsque la concentration intracellulaire de L'ATP est diminué, les gradients ioniques transmembranaire augmentent menant à une élévation des niveaux du calcium intracellulaire, qui implique l'activation d'une protéase responsable de la conversion irréversible de la XDH en XO (**Figure 16**)^[6, 101, 106].

Dans la reperfusion, l'oxygène encore disponible est réduit par la XO, et l'hypoxanthine accumulée est oxydé aussi par la XO en xanthine, et la xanthine en acide urique, produisant ainsi des radicaux oxygénés, provoquant la lésion tissulaire. Cette lésion peut être localisée au niveau de différents tissus tels que : l'intestin grêle, le cœur, le cerveau, le rein et au niveau des cellules hépatique^[6, 101, 106].



D'après (Granger et al., 1981)^[121]

Figure 16 : Le processus d'ischémie-reperfusion.

➤ Rôle dans l'inflammation

L'inflammation est une réaction physiologique de défense contre les invasions externes mais elle peut s'amplifier d'une manière incontrôlable conduisant à l'apparition de différents désordres et maladies inflammatoires^[106].

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents interférons, qui provoquent la conversion de la XDH en XO^[123], ainsi l'élévation de la production des ROS^[124, 125]. Les ROS produites par la XOR peuvent également réagir avec les composés de la membrane cellulaire, tel l'acide arachidonique, pour produire des lipides chimio attractants des neutrophiles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire^[126].

➤ Rôle dans d'autres maladies

Des niveaux élevés de xanthine oxydoréductase ont été observés dans le plasma de patients atteints de différents types de cancer^[127], notamment dans les carcinomes épidermoïdes bien différenciés du larynx humain^[128]. Une autre étude dans les tissus humains a rapporté une augmentation des activités de la XO dans certaines lignées cellulaires de cancer du sein^[129].

IX. INHIBITEURS DE LA XO

Les inhibiteurs de la XO sont divisés en deux catégories majeures ;

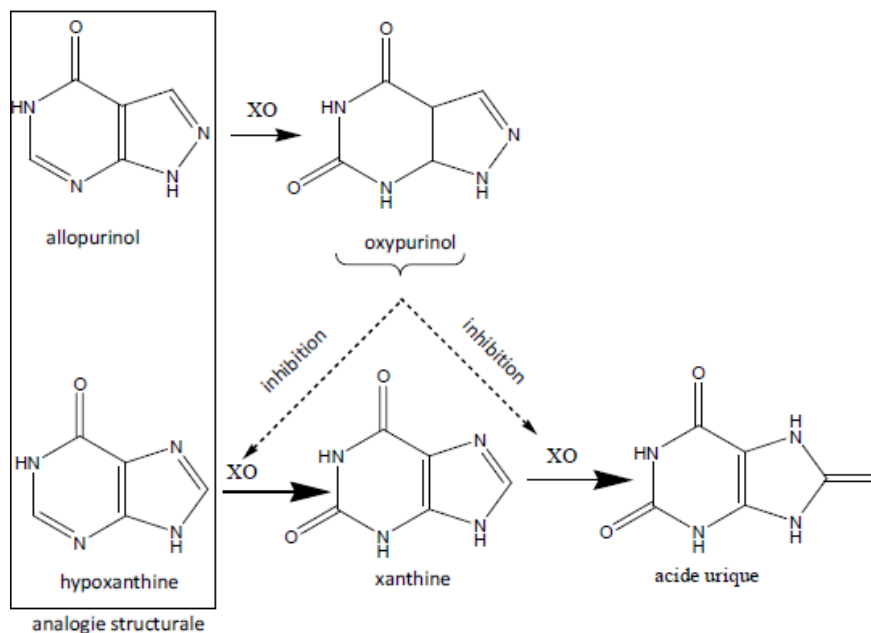
- Analogues de substrats puriniques ;
- Molécules n'ayant aucune relation structurale avec les substrats biologiques de l'enzyme^[130].

IX. 1 Analogues de substrats

Allopurinol ; ou 1,2-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d] pyrimidin-4-one), l'allopurinol a été approuvé par la Food and Drug Administration en 1966 pour le traitement de la goutte et demeure une pierre angulaire dans le traitement de l'hyperuricémie^[131].

L'allopurinol est un inhibiteur non sélectif de la XO^[7], il conduit à une diminution de la synthèse de l'acide urique, conduisant ainsi à une augmentation des concentrations d'hypoxanthine et de xanthine qui sont sans conséquence pathologique, puisqu'elles sont facilement éliminées par le rein.

Il est également un substrat pour la XO qui la métabolise en Oxypurinol (alloxanthine), agissant lui-même comme inhibiteur de cette enzyme et responsable en grande partie de l'effet thérapeutique de l'allopurinol ^[5, 132] (**Figure 17**).



Depuis (Hamlaoui, 2014)^[101]

Figure 17 : Effet de l'allopurinol et de son métabolite (Oxypurinol) sur la réaction de la xanthine oxydase.

IX. 2 Autres inhibiteurs de la XO

Febuxostat ou l'acide 2-[3-cyano-4-isobutoxyphenyl] -4-méthyl thiazole-5-carboxylique.

Le febuxostat, comme l'allopurinol, empêche la synthèse d'acide urique via l'inhibition de la xanthine oxydase. C'est un inhibiteur non purinique puissant et sélectif de la xanthine oxydase^[1].

Il existe d'autres inhibiteurs de la XO tels que : le Cyanure, l'Arsenite.

Le cyanure inhibe la XO en libérant le soufre du site Mo, donnant naissance à la forme désulfo inactive de la XO.^[130]

Alors que **l'arsenite** interagit avec le molybdène de l'enzyme et bloque le transfert d'électrons du centre molybdène vers les centres Fe₂ / S₂ et FAD^[133].

LE SAVIEZ VOUS !

- La xanthine oxydase peut avoir plusieurs origines, dont la plus simple est celle obtenue par la purification du lait des bovins ^[101].
- La xanthine-oxydase est relativement thermostable. Ce n'est qu'après un chauffage à 75° C pendant 5 min ou à 85° C pendant 5s ou dans du lait *U.H.T.* (stérilisé par Upérisation à Haute Température) que l'enzyme est inactivée ^[134].
- L'activité réductase xanthine/NAD⁺ est plus élevée que celle xanthine/O₂ même en présence de l'oxygène ^[101].
- Une variabilité d'activité inter-individuelle a été mise en évidence avec une activité XO hépatique en moyenne 21 % plus élevée chez les hommes que celle des femmes (ce qui pourrait expliquer la prédominance de la maladie de la goutte chez les hommes) ^[135].
- Une variabilité d'activité inter-ethnique a également été mise en évidence, avec 11 % de métaboliseurs lents dans la population japonaise contre 20 % dans la population caucasienne ^[135].
- Les facteurs nutritionnels déterminent la quantité de la forme Demolybdo-XO présente ^[136].
- Dans la structure de la XO, La distance la plus proche entre les atomes des cofacteurs de chaque sous unité est de 50 Å, ce qui fait que chaque sous unité est indépendante de l'autre avec aucun échange d'électron entre les deux ^[85].

- La XOR a deux formes inactives, l'une est démolymbo-XOR et l'autre est désulfo-XOR. Ces formes représentent environ 60 % de l'enzyme du lait bovin ^[137] et plus de 97 % du lait humain ^[138].
- La forme Desulfo-XOR peut être convertie en sulfo-XOR active *in vitro* par incubation de l'enzyme réduite avec des ions sulfurique mais ne l'activant qu'à la moitié de son maximum d'activité théorique ^[105, 138].
- L'omission du dithioérythritol (DTT) du milieu lors de l'extraction conduit à une enzyme 100% de type O ^[112].

PARTIE 3

Modélisation Moléculaire

Nous nous limiterons à une description assez générale sur le Docking (Amarrage), afin de situer le contexte de ce travail. Cette partie n'a donc pas vocation de s'ajouter aux nombreuses revues publiées sur les caractéristiques détaillées des différents programmes de Docking ou sur l'évaluation de ces derniers.

I. INTRODUCTION

Le terme de modélisation moléculaire *in silico* est assez général, et sous cette étiquette, nous trouvons un certain nombre de techniques : mécanique moléculaire, chimie quantique, simulation de dynamique moléculaire, construction par homologie, criblage virtuel, chemoinformatique, etc. Ces méthodes théoriques et/ou empiriques appartiennent toutes à la famille des techniques informatiques, par opposition aux méthodes expérimentales.

Les études menées ces dernières années dans le domaine de la biologie ont suscité un intérêt tout particulier à la modélisation moléculaire et cela grâce à son large champ d'applications possibles. En effet, Elle peut en particulier, s'avérer précieuse lors de la mise au point d'inhibiteurs pour une cible thérapeutique, par le biais du criblage virtuel, souvent par l'utilisation des algorithmes d'amarrage moléculaire ou « Docking ». Cela en cherchant à comprendre les mécanismes qui permettent aux protéines d'assurer leurs fonctions, et en comprenant comment elles interagissent entre elles ou avec d'autres molécules ^[139-142].

Les années 80 ont été marquées par l'écriture des premiers codes du Docking moléculaire tel que la première version du logiciel Dock ^[143]. Ces programmes ont été conçus à partir du modèle "clé-serrure" proposé en 1890 par Emil Fisher ^[101].

Au cours des années 90, les nouveaux logiciels du Docking prenaient en considération la flexibilité du ligand en se basant sur la théorie dite "de la conformation induite" proposé en 1958 par Daniel Koshland ^[144].

Pour ce travail de thèse, nous nous contenterons de décrire la méthode du Docking Moléculaire, qui est couramment utilisée en biologie.

II. DOCKING MOLECULAIRE

Le Docking moléculaire ou (Amarrage moléculaire en français) est l'ensemble de méthodes algorithmiques et géométriques qui proposent l'identification des modes d'interaction entre deux biomolécules quelles que soient leurs tailles (protéines, acides nucléiques, sucres, lipides).

Dans le contexte d'un Docking protéine/petite molécule (aussi appelée ligand), cette méthode permet de modéliser les meilleures orientations et conformations du ligand sur une surface protéique (aussi appelé récepteur ou cible), et d'évaluer sous la forme d'un score la capacité qu'ont ces deux objets à se « lier » et à « interagir » ensemble.

Le Docking est également utilisé en « Drug design » ou (« Computer-Aided Drug Design », CADD) dans le but d'optimiser la structure du ligand et de l'adapter à la protéine [145].

Ces techniques de Docking sont basées sur des logiciels. Ces logiciels sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée [146].

Plus d'une centaine de logiciels référencés dans la littérature proposent aux utilisateurs plus ou moins aguerris les outils nécessaires pour réaliser des simulations de Docking moléculaire [147].

Les deux les plus fréquemment cités pèsent à eux seuls presque la moitié (42 %) du total de citations trouvées dans la littérature : AutoDock (27 %) [148], GOLD (15 %) (**Figure 18**) [149].

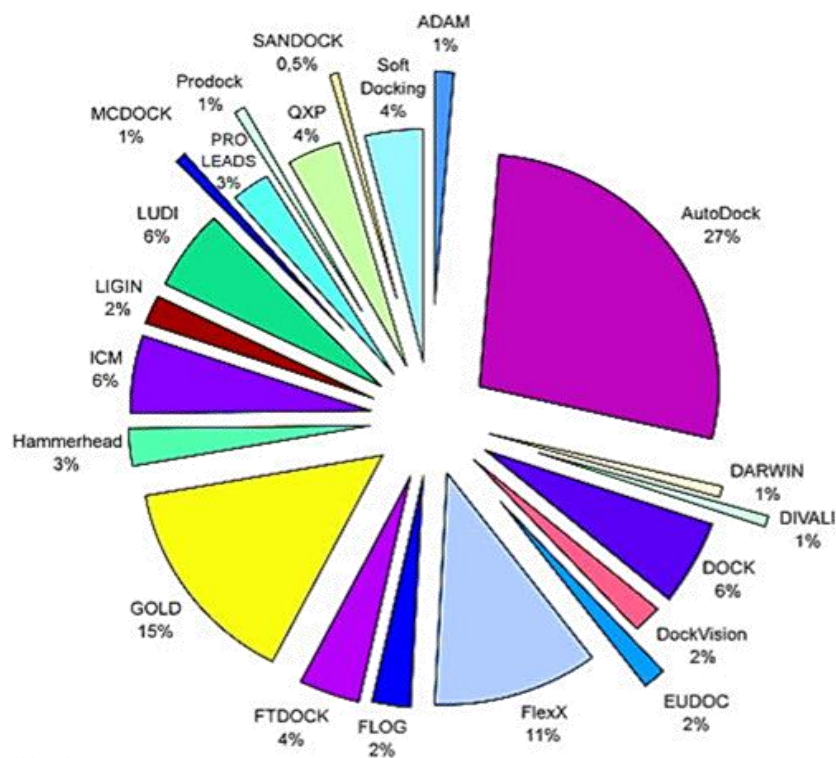
(Sousa et al., 2006)^[150]

Figure 18 : Les programmes de Docking les plus cités.

II. 1 Types du Docking

La flexibilité d'un objet se définit par sa capacité à se déformer. En effet, les protéines et les ligands ne sont pas des objets rigides, ils sont capables de s'adapter à leur environnement. Cet aspect peut poser un problème pour déterminer le meilleur mode d'interaction protéine/ligand. En effet, la présence d'un nouvel élément sur la surface protéique peut perturber localement cette même surface et vice versa^[145].

- Le ligand et la protéine étaient traités comme des objets rigides dans **Le Docking rigide** qui consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système protéine-ligand en considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte ^[140, 145].
- Cependant, il est tout à fait concevable que les structures de la protéine et du ligand soient modifiées durant le processus de Docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités. On parle, dans ce cas, de **Docking flexible** ^[140].
- Entre les deux modes existe le **Docking semi-flexible**, où les partenaires d'interaction sont partiellement déformables. En général, le récepteur est traité

comme étant rigide et le ligand comme étant totalement flexible, se sont imposés, résolvant en partie le problème ^[151].

Les algorithmes utilisés pour le traitement de la flexibilité du ligand sont :

- **Les algorithmes de recherche systématique**

Ils sont basés sur les méthodes de la reconstruction incrémentales. Il consiste à couper le ligand en fragments rigides, à placer le fragment de base et ensuite de reconstituer le ligand de départ en ajoutant les fragments de manière incrémentale. Au cours de cette étape toutes les coordonnées géométriques sont prises en considération. Cette méthode est utilisée dans les programmes LUDI ^[152] et FLEXX ^[153].

- **Les algorithmes de recherche aléatoire ou les algorithmes stochastiques**

Dans ce cas, il y a les algorithmes génétiques (AG) ^[148] et les algorithmes basés sur la méthode Monté Carlo (MC) ^[154].

Le principe de ces programmes consiste à imposer au ligand des changements conformationnels aléatoires, puis en utilisant une fonction de probabilité notée "fitness function" élire la meilleure conformation possible. La première conformation acceptée sera le point de départ pour un nouveau changement aléatoire. Cette technique est utilisée dans le programme ICM (Internal Coordinate Mechanics) ^[155].

- **Les algorithmes génétiques** Sont utilisés par les programmes Autodock et Gold. Afin de limiter le calcul, le programme PRO_LEAD utilise l'algorithme de recherche nommé Tabou. Il consiste à explorer l'espace conformationnel en interdisant les zones de l'espace déjà explorées dites (tabou). Les nouvelles conformations acceptées sont celles qui présentent un RMSD (Root Mean Square Deviation) proche des conformations précédentes ^[101].

- **Les algorithmes déterministes ou de simulation**

La méthode la plus connue est la dynamique moléculaire ^[156]. Cette technique est rarement utilisée en Docking à cause des problèmes rencontrés lors des barrières énergétiques.

II. 2 Les étapes de Docking moléculaire

Le Docking moléculaire peut se rapporter à un problème d'optimisation selon une valeur numérique qui rendrait compte de la conformation plus ou moins favorable de deux entités (e.g. l'énergie libre totale du système protéine-ligand). Cette valeur numérique sera appelée score de Docking (ou simplement score) par la suite. Sa définition est essentielle à tout programme de Docking moléculaire car elle détermine le résultat de la prédiction.

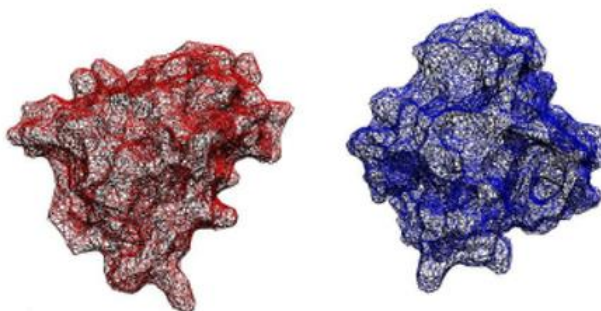
Pour cela le Docking moléculaire se base sur quatre étapes majeures ;

(a) la description de la surface ou du volume des protéines, (b) un algorithme de recherche destiné à représenter les différents modes d'association des partenaires, (c) une étape de filtration destinée à réduire le nombre de solutions potentielles, (d) une étape de raffinement ne concernant que les modèles les plus probables (scoring)^[157] (**Figure 19**).

➤ **La fonction du Score**

Le score est une donnée numérique qui permet une approximation de l'énergie libre ΔG résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à la formation du complexe. En d'autres termes, elle donne une approximation de l'affinité entre la protéine et le ligand et permet de classer les ligands les uns par rapport aux autres et ainsi d'avoir une idée des molécules ayant potentiellement le plus d'effets (inhibition ou induction) sur leurs cibles biologiques. ^[158, 159]

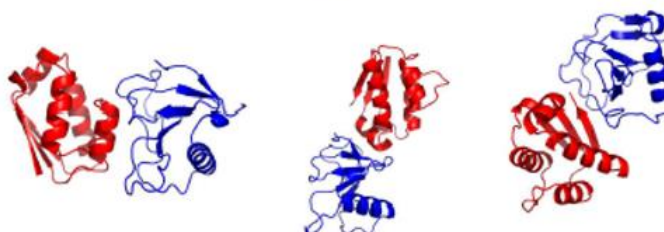
Représentation de la surface des protéines



Algorithme de recherche

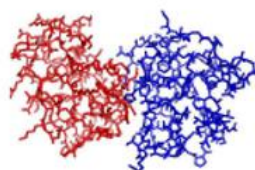


Filtration des modèles



Raffinement des solutions

Sélection du meilleur modèle



(Madaoui, 2007)^[157]

Figure 19 : Principales étapes des méthodes de Docking.

A l'issue des deux premières étapes, un grand nombre de solution sont générés, puis évalués par une fonction de score propre à chaque programme. Les meilleures solutions sur la base de ce score sont retenues pour une dernière étape d'optimisation, suivie à nouveau d'une évaluation des solutions et de la sélection d'un ou plusieurs modèles d'assemblage.

III. LES PROGRAMMES DE DOCKING MOLECULAIRE UTILISES

III. 1 Autodock Vina (Adv)

La première version d'AutoDock est initialement développée en 1990 par l'institut de recherche Scripps à San Diego ^[145].

Il fera l'objet d'un certain nombre de mises à jour jusqu'à la version la plus récente sortie en 2007 qu'est AutoDock 4 (AD4). Il est construit autour d'un algorithme de recherche conformationnelle du ligand et d'une fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction entre le ligand et sa cible. Il fournit une interface graphique permettant de visualiser les structures des molécules et les résultats tout en mettant en évidence les interactions intermoléculaires grâce à l'outil AutoDock Tools (ADT) ^[160].

AutoDock Vina (ADV) est un programme de Docking introduit en 2010 et est la seconde génération du logiciel AutoDock (AD4) publié en 2007 par le même institut de recherche que son prédécesseur ^[145].

La nature de l'algorithme de recherche et la fonction de score qui sont implémentés dans ADV sont totalement différents. Il s'agit en effet des algorithmes d'exploration conformationnelle recuit simulé et d'optimisation locale Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS), rendant le logiciel ADV plus efficace dans ses prédictions que son prédécesseur. Contrairement à AD4, ce logiciel est développé pour le calcul parallèle, ce qui le rend beaucoup plus efficace et adapté pour le criblage virtuel haut débit ^[161].

La fonction de score empirique d'ADV a été déterminée selon la même méthode que la fonction d'AD4, c'est-à-dire en établissant un modèle de régression linéaire multiple mais en se basant sur un jeu de données beaucoup plus important : environ 1 300 complexes protéine/ligand (contre 188 pour AD4) issus de la PDBind. ^[145].

Autodock vina impose au système l'exploration de l'espace conformationnel en autorisant certains degrés de libertés au ligand, tout en maintenant fixe le « récepteur ».

Il réalise, parmi les différentes méthodes utilisées pour représenter la cible, une grille du récepteur.

➤ La grille (the grid box)

Une grille est une matrice tridimensionnelle qui englobe l'intégralité (Blind Docking) ou une région choisie intéressante du récepteur étudié (Specific Docking).

Chaque point de la grille enregistre le potentiel d'interaction entre une sonde, (constituée d'un ou de plusieurs atomes) et l'ensemble des atomes du récepteur. L'énergie calculée par

AutoGrid, qui est un programme d'Autodock, en chaque point de la grille, dépend du type atomique, de la charge et de la position de la cible ^[158].

III. 2 GOLD

Le programme GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) provient d'une collaboration entre l'Université de Sheffield et la CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*)^[162].

C'est un programme de calcul des modes de docking de petites molécules dans le site catalytique d'une protéine. Le logiciel est fourni sous forme d'un ensemble de programme (HERMES) pour la visualisation et la manipulation des structures. ^[142].

Il est basé sur trois parties majeures ;

- Un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison.

GOLD utilise un algorithme génétique pour le docking de petites molécules (ligand) dans le site actif d'une protéine. Il considère le ligand comme flexible alors que la protéine est maintenue fixe sauf pour les groupements hydroxyles de certains résidus à savoir Tyrosine, Serine et Thréonine^[163]

- Un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison
- Une fonction de score pour classer les différents modes de liaison.

GOLD utilise différentes fonctions de score pour le processus d'optimisation : GoldScore (une fonction de score basée sur le champ de force), ChemScore, ASP (Astex Statistical Potential), CHEM PLP (Piecewise Linear Potential) et User Defined Score^[151, 164].

➤ **Hermes**

Hermes est un programme permettant de visualiser la structure des protéines en trois dimensions. Ses caractéristiques comprennent ;

- La capacité de visualiser les structures 3D des récepteurs et de ligand à partir de fichiers pdb ;
- Une gamme d'options de visualisation 3D, y compris le choix des modèles d'affichage, les couleurs, la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les atomes, les résidus, les ligands, les molécules d'eau etc ... ;
- La capacité de mesurer et afficher les distances, les angles et les angles de torsion ;
- La capacité de trouver et montrer les liaisons hydrogène ;
- La possibilité d'enregistrer les fichiers ;
- La possibilité de modifier les ligands.^[142]

IV. APPLICATIONS DU DOCKING

Il y a au moins deux applications principales au programme de Docking. La plus ancienne est :

- La prédiction du mode d'interaction, qui consiste à déterminer le positionnement possible du ligand par rapport à son récepteur.

L'autre utilisation consiste à

- Optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur.

L'optimisation de la structure de ligands déjà connus peut avoir plusieurs raisons : l'amélioration de son affinité, de sa spécificité, de sa synthèse ou encore de ses propriétés **ADME-T** (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité) [165].

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer les performances des différents programmes de Docking pour chaque application. L'aptitude d'un algorithme à trouver l'emplacement possible du ligand par rapport à son récepteur est habituellement déterminée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square deviation) qui consiste à quantifier la modification que va subir la protéine au cours de la simulation. La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate [158, 166, 167].

Partie expérimentale

PARTIE 1

MATERIELS ET METHODES

Nous avons vu dans l'introduction que l'enzyme Xanthine oxydase est une cible thérapeutique intéressante dans la maladie de la goutte. Dans ce cadre, plusieurs molécules ont été testées dans le but d'identifier des inhibiteurs.

Le projet de recherche d'inhibiteurs a été initié par des essais *in vitro*. Les molécules semblent avoir des effets d'inhibition sur les deux sources de la XO (humaine et bovine) avec des IC₅₀ de l'ordre de µg/ml.

Dans la continuité du projet de recherche d'inhibiteurs sélectifs de l'enzyme XO, et pour approfondir le sujet, nous avons utilisé l'étude *in silico* par Docking moléculaire pour chercher à comprendre pourquoi les molécules présentent des effets d'inhibition peu similaires sur l'enzyme humaine et bovine.

IN VITRO

Notre travail a été réalisé au niveau du Centre de Transfusion du Sang (CTS) de l'établissement public hospitalier EPH-Ahmida Benadjila et au laboratoire de recherche des Sciences Fondamentales à l'Université Amar Telidji-Laghouat.

I. MATERIELS

I. 1 Matériel biologique

➤ Lait

Le lait maternel humain a été généreusement obtenu par des mères volontaires (primipares et multipares), durant les premières semaines *post-partum*, elles étaient toutes en bonne santé, et âgées de moins de 40 ans. Tous les échantillons ont été conservés entre -10°C et -17°C jusqu'à l'obtention du volume voulu.

Le lait bovin utilisé pour l'extraction a été obtenu d'une ferme à Dhaya-Laghouat. Après avoir été fraîchement tiré, le lait est directement mis dans une cuvette à 02°C (Alfa Laval. Lund, Suède.). Il n'a subi aucun traitement thermique. Avant distribution il est soumis à un contrôle de qualité de pH et de matière grasse.

➤ Plantes

Les plantes étudiées dans ce travail appartiennent à la famille des Apiacées, nous avons utilisés les graines car elles sont connues par leur richesse en huiles essentielles, ce sont des épices utilisés au quotidien, ces dernières ont été fournis par le Pr. YOUSFI Mohammed. Nous représentons dans le **Tableau 7** ; le nom scientifique, le nom connu, ainsi le nom arabe.

Tableau 7 : La nomenclature botanique des plantes.

Nom scientifique des plantes	Nom arabe	Nom connu
<i>Carum carvi</i> L.	كروية	Carvi
<i>Pimpinella anisum</i> L.	حبة الحلوة	Anis
<i>Coriandrum sativum</i> L.	كسبر	Coriandre
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	بسباس	Fenouil
<i>Cuminum cyminum</i> L.	كمون	Cumin

I. 2 Matériel chimique

Les réactifs de dosage d'acide urique sont de *Spinreact* (Vall D'En Bas, Girona, Espagne) et *BIOLABO* (Les Hautes Rives, Maizy, France). La xanthine, DMSO (diméthyle sulfoxyde), K_2HPO_4 (Phosphate de potassium dibasique), KH_2PO_4 (Phosphate de potassium monobasique), EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) et tous autre produit utilisé dans cette étude est fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, États-Unis).

Les complexes organométalliques de lanthanide (III) sont : Ce $(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, La $(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, Nd $(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$. Obtenus du Pr. Luciano SASO et Pr. Irena KOSTOVA.

Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

I. 3 Instrumentation

➤ Pour l'extraction enzymatique

- Clampeuse-soudeuse électrique BIOSEALER CR 4 – *Ljungberg & Kögel AB*, est un équipement compact pour sceller les poches à sang par le système d'étanchéité à haute fréquence. Cet équipement nous a permis de souder et couper les tubulures des poches contenant le lait.
- Extracteur de plasma Semi-automatic-extractor BMS, permet d'appliquer une pression proportionnelle sur la poche contenant notre lait pour détecter toute éventuelle fuite au niveau des poches.
- Balance électronique ACS-B, Permet de mesurer le poids de la poche contenant le lait pour calculer secondairement le volume.
- Centrifugeuse réfrigérée de type *ROTANTA 460R – HETTICH*, cette centrifugeuse permet d'effectuer presque toutes les tâches de séparation du laboratoire. Une nacelle spéciale permet de centrifuger des systèmes pour poches à sang de 450 ml. La température peut être réglée entre -20°C et +40°C et la programmation du temps peut aller jusqu'à 99 h 59 min avec une vitesse maximum de 15 000 rpm.
- Agitateur magnétique Heidolph-MR 3001 K, utilisé dans le protocole d'extraction de l'enzyme.
- Congélateur pour plasma sanguin SUPERARTIC ECT-F- *Fiocchetti*, Ce congélateur pour plasma conçu pour les Banques de Sang d'haute gamme, fournit un environnement de congélation idéal pour la conservation de notre extrait enzymatique à une température de -30°C.
- Etuve MEMMERT, pour toute incubation à 37°C.
- Lecteur de microplaques URIT UV-660. Cet appareil est utilisé en conjonction avec des plaques à multipuits, comme la plaque à 96 puits, ainsi, il permet pour beaucoup d'échantillons d'être mesurés simultanément avec de petits volumes.

➤ Pour les molécules/extraits à tester

- Balance électronique KERN ABS et ADVENTURER PRO.
- Chauffe ballon WISD WISE THERM et Clevenger, pour l'extraction des Huiles essentielles.
- Chromatographe de type Perkin Elmer Clarus680 couplé au spectromètre de masse Clarus SQ 8 0 t.

- Chromatographe de type Skyray instruments GC5400.

I. 4 Autres

Ciseaux, Tubes, Eppendorf, Microplaques à 96 puits, poches de sang vide, micropipettes, Barreau magnétique, spatule, portoirs, bocaux en verre.

II. METHODES

II. 1 Contrôle de qualité des équipements

➤ Contrôle de la balance numérique

L'étalonnage de la balance ou la tare se fait à l'aide d'un objet de mesure qui a un poids prédéfini pour s'assurer de la précision de cette balance.

Le calibrage de la balance (la remise à zéro) doit se faire avant chaque série de mesure.

➤ Soudure et détection des fuites

Après la séparation et la soudure de tubulure des poches du lait, on doit exercer une pression à l'aide d'extracteur de plasma sur la poche pour vérifier leur intégrité et l'absence des fuites dans leurs différentes parties.

II. 2 Préparation des huiles essentielles et molécules à tester

II. 2. A Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été faite par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger, pendant une durée de trois (03) heures.

L'opération consiste à introduire 250g des graines de chaque plante (cumin, fenouil, coriandre, anis et carvi) (**Figure 20**), dans un ballon en verre de capacité de deux litres, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition et le phénomène de stagnation. L'ensemble est placé dans le Clevenger, et porté à ébullition, à l'aide d'un chauffe-ballon. En traversant un réfrigérant, les vapeurs chargées d'huile se condensent et décantent ; l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Le temps d'extraction est mesuré à partir de la chute de la première goutte dans l'ampoule. Les hydrodistillats obtenus sont mesurés (en ml par Kg de matériel végétal) et séchés par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toutes trace d'eau. Après les avoir récupérées, les huiles essentielles sont conservées, dans des tubes en verre opaques et bien scellé, au réfrigérateur à une température voisine de 4°C et à l'abri de la lumière (protection contre la chaleur, l'évaporation et la lumière).



Figure 20 : Graines des cinq épices utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.

II. 2.a.1 Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M) et la masse de la matière végétale utilisée (MS). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par l'Équation 3 suivante :

$$\text{Rendement HE} = \left(\frac{M}{M_S} \right) \times 100 \dots \dots \dots (3)$$

II. 2.a.2 Caractérisation des huiles extraites

➤ Caractéristiques organoleptiques

L'analyse sensorielle est une source d'information essentielle. L'analyse a été effectuée en observant et en inhalant directement l'huile essentielle. L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle. La couleur d'huile essentielle est un paramètre très important pour certaines applications, en la déterminant directement par les yeux.

➤ Détermination de la densité relative

L'AFNOR recommande l'utilisation d'un pycnomètre d'une capacité de 5ml, mais à défaut, celui-ci a été remplacé par un aliquote d'une capacité de 1,5ml. A l'aide d'une balance électronique, on pèse l'aliquote propre et sèche et on fait la tare. Ensuite on prend des volumes égaux d'huile essentielle et on les pèse afin d'obtenir leurs poids exacts.

Le calcul de la densité des HE s'est fait à partir de l'**Équation 4** suivante :

$$\text{Densité} = \frac{M}{V} \dots \dots \dots (4)$$

Où :

M : Le poids exact en (g) de l'HE pesée.

V : Le volume en (ml) d'HE utilisé.

II. 2.a.3 Analyse chromatographique

Les huiles essentielles des différents échantillons sont analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF), puis par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

➤ Les conditions opératoires de la CPG

La séparation des composés de l'huile essentielle a été effectuée au Laboratoire LABSF (Laboratoire des Sciences Fondamentales) de l'université de Laghouat, selon une procédure interne qui est la suivante :

Chromatographe de type Skyray Instruments GC5400, équipé d'une colonne capillaire DB-5 (30 m × 0,32 mm), avec une épaisseur de film 0,1 µm et d'un détecteur d'ionisation de flamme (FID). La programmation de la température du four était la suivante : de 50°C à raison de 20°C/min jusqu'à 280°C. 280°C en mode isotherme pendant 10 min. Les températures d'entrée et du détecteur sont de 280°C. L'Hydrogène a été utilisé comme un gaz vecteur à un débit constant de 1 ml/min. Les injections sont de 2 µl d'huile essentielle dans du Chlorure de méthylène (50 mg d'HE dans 1 ml de CH₂Cl₂).

Les indices de rétention linéaire sont calculés par comparaison entre le temps de rétention (TR) du composé étudié et ceux d'une série de n-alcanes (C₈-C₂₀) standards selon l'**Équation 5** suivante ^[168] :

$$I_R = 100 \times \frac{(t_R)_i - (t_R)_n}{(t_R)_{n+1} - (t_R)_n} + 100 n \dots \dots \dots (5)$$

Où :

I_R : Indice de rétention du soluté considéré ;

$(t_R)_i$: Temps de rétention du soluté considéré ;

$(t_R)_n$: Temps de rétention de l'alcane contenant « n » atomes de carbone et dont le pic précède celui du soluté ;

$(t_R)_{n+1}$: Temps de rétention de l'alcane contenant « n+1 » atomes de carbone et dont le pic sort après celui du soluté ;

n et n+1 : nombre de carbones des hydrocarbures paraffiniques (n-alcane) ;

L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse expérimentaux de leurs ions-fragments caractéristiques à ceux cités dans la littérature^[169] et/ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley 7, Nist 2002).

➤ Les conditions opératoires de la GC/SM

L'analyse GC-MS a été réalisée au Laboratoire LISA (Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques) de l'université d'Aix Marseille en France, selon une procédure interne qui est la suivante :

Chromatographe de type Perkin Elmer Clarus680 couplé au spectromètre de masse Clarus SQ 8 0 t. La silice fondue Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm DI, 0,25 μ m df, RESTEK, USA) est directement couplée au spectromètre de masse. Le gaz porteur était de l'hélium (1 ml / min). Le programme de température du four était le suivant : initialement maintenu à 70° C pendant 4 min ; varie de 70 à 180° C à raison de 4° C / min ; puis maintenu pendant 10 minutes à 180° C. La température de l'orifice d'injection était de 250 ° C et la température du détecteur était de 280 ° C. L'ionisation des composants de l'échantillon a été réalisée en mode EI (70 eV). La plage de balayage du spectromètre de masse était de 30 à 300 amu. Les constituants individuels ont été identifiés en comparant les spectres de masse avec les spectres stockés dans la base de données de spectres de masse NIST / EPA / NIH. Version 2.0 g, build le 19 mai 2011.

II. 2. B Molécules pures et médicaments

➤ Synthèse des complexes de lanthanide (III)

Les lanthanides sont les 15 éléments de la première période du bloc f, allant du lanthane (Z = 57) au lutécium (Z = 71). Représentés dans le tableau périodique ci-après (**Figure 21**). La perte d'un électron 4f et des deux électrons 6s conduit à l'ion lanthanide trivalent qui est le degré d'oxydation le plus stable pour toute la série ^[170]. C'est à ces ions lanthanides (notés Ln (III) ou Ln^{3+}) complexés au bis-coumarines que nous nous intéressons.

(Adapté de Nonat, 2007)^[170]

Les complexes Lanthanides (Ln) ont été synthétisés par réaction de sels inorganiques de cérium (Ce) (III), lanthane (La) (III) et de néodyme (Nd) (III) avec les ligands (L) respectifs : bis (4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl) – pyridin-2-yl-méthane (H_2L_2), bis (4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl) –pyridin-3-yl-méthane (H_2L_3), bis (4-hydroxy-2-oxo2H-chromen-3-yl) –pyridin-4-yle –méthane (H_2L_4) et bis (4- hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl) – (1H-pyrazol-3-yl) –méthane (H_2L_5).

$$[Ln(OH)(H_2O)_{n-1}]^{2+} + L^{2-} \rightarrow Ln(L^{2-})(OH)(H_2O) + n^{-2}(H_2O), \dots \dots (8)$$
$$\text{H}_2\text{L5} = \text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6.$$

53

➤ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les médicaments ont été broyés, pesés à l'aide d'une balance de précision 0,0002 g et conserver sous forme de poudre jusqu'à leur utilisation.

II. 2. C Effet du solvant sur l'activité enzymatique

Le DMSO est fréquemment utilisé comme solvant pour les molécules hydrophobes afin d'étudier leur effet sur les différentes enzymes, mais son utilisation en des concentrations non défini et indéterminé, peut gêner à l'activité enzymatique.^[175]

C'est dans ce contexte, que nous avons évalué l'influence possible du DMSO sur l'inhibition de notre enzyme (XO). L'extrait enzymatique a été ajouté à une série de volumes croissants de DMSO, ces volumes sont exprimés en pourcentage de solvant dans l'extrait enzymatique 12,5% 25% 50% et 100% de DMSO.

(Le même test est réalisé avec le tampon phosphate à PH 7,4 comme solvant).

II. 3 La Xanthine oxydase (XO)

II. 3. A Préparation de l'extrait brut de la XO

La XO a été isolée à partir du lait bovin et humain (XOB et XOH) selon le protocole d'extraction de Nakamura et Yamazaki, (1982)^[176] modifié par (Baghiani et *al.*, 2003)^[138] comportant quelques modifications. Le lait a été centrifugé à 4500 rpm pendant 35 minutes. La crème flottante a été dissoute dans un volume double de phosphate de potassium (K_2HPO_4 0,2 M) contenant 1 mM d'EDTA. Le mélange a été soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugés à 4500 rpm pendant 40 minutes. Le surnageant récupéré, représente l'extrait enzymatique brut de XO qui a été répartie en aliquotes à raison de 1,5 ml et conservée par la suite à -30°C jusqu'à son utilisation. (Toutes ces étapes sont effectuées à une température de +4°C).

La démarche expérimentale est résumée dans le diagramme représenté dans la **Figure 22**

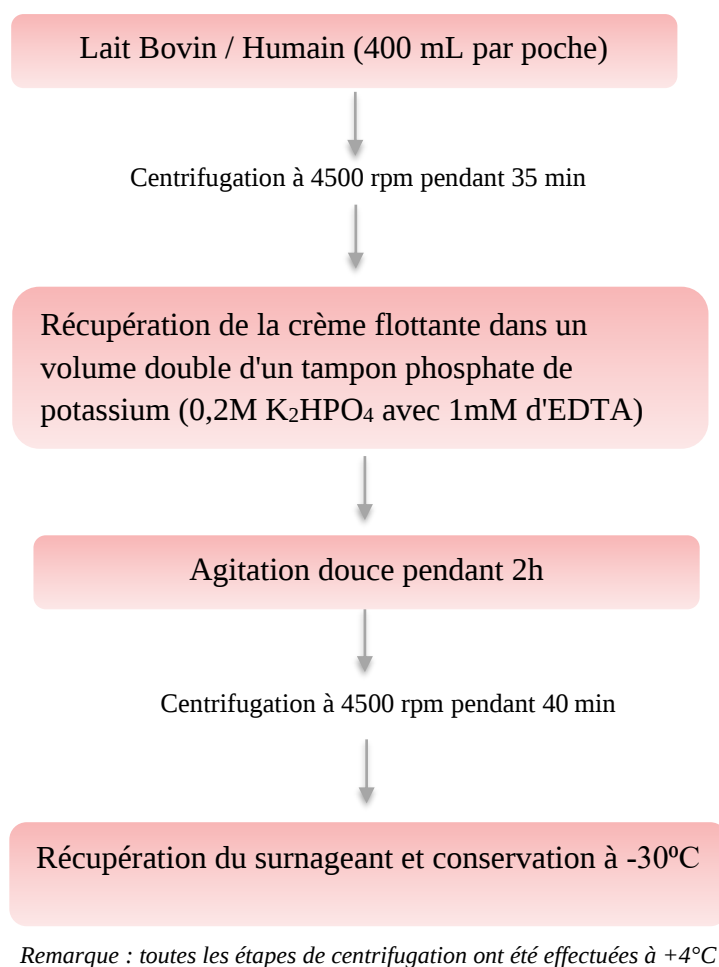


Figure 22 : Diagramme qui représente la démarche expérimentale de l'extraction de la XO.

II. 4 Test d'effet des molécules/extraits sur la XO

II. 4. A Principe de la méthode de détection à double enzyme (DED)

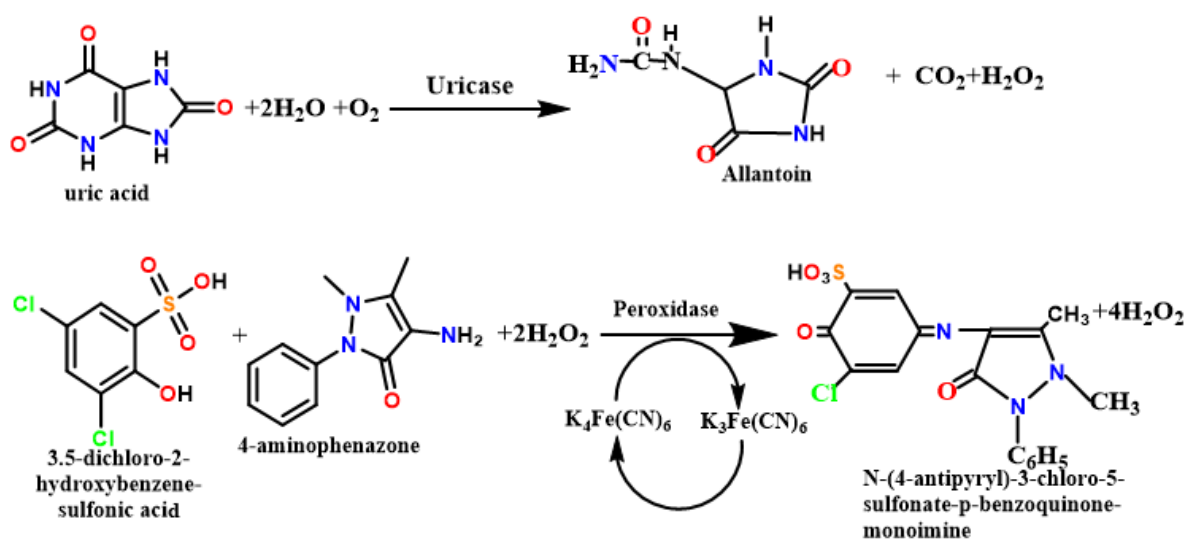
L'effet inhibiteur de nos molécules pures et extraits a été testé par la méthode de détection à double enzyme (DED) ^[16] en utilisant un lecteur à microplaque de 96 puits. Cette méthode de détection est connue dans l'analyse biomédicale, mais elle est utilisée pour la première fois pour suivre l'activité inhibitrice de cette enzyme. Puisque l'acide urique (notre produit cible) n'a pas de couleur à la fin de réaction, la méthode DED propose un moyen efficace de retracer le produit fabriqué par l'enzyme, par l'utilisation d'un réactif spécifique pour détecter l'acide urique.

➤ Réactif du dosage de l'acide urique

Nous avons utilisé le réactif du dosage de l'acide urique de la marque (BIOLABO et Spinreact) (Annexe 6). L'acide urique est oxydé par l'uricase pour produire de l'allantoïne, du

dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonate (DCHBSA) et 4-aminophenazone (4-AF)) pour former une N-(4-antipyril)-3-chloro-5-sulfonate-p-benzoquinone-monoimine, complexe de couleur violette. L'absorbance est mesurée à 490 nm.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans l'échantillon testé [177]. Le schéma réactionnel est présenté dans la (Figure 23).



(Fossati et al., 1980).

Figure 23 : Schéma réactionnel de la catalyse de l'acide urique par les deux enzymes.

➤ Préparation du réactif

Le réactif du dosage se présente en trois flacons : **R1** : Solution tampon ; **R2** : Enzymes ; **R3** : Étalon primaire aqueux d'Acide urique). Ainsi pour préparer le réactif de travail RT nous avons mélangé l'intégralité du volume du flacon R1 et du flacon R2). Avant l'emploi, nous agitons doucement le flacon pour homogénéiser la solution (éviter la formation de mousse).

II. 4. B Préparation des molécules et extraits à tester

Nos inhibiteurs (HE, AINS et molécules pures) ont été préparés juste avant les essais dans le tampon dans une série de concentrations diluées de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ à $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ pour chaque inhibiteur.

Certains inhibiteurs ont nécessité l'ajout d'un pourcentage bien déterminé de DMSO pour assurer leur dilution totale.

II. 4. C Inhibition de la réaction catalysée par la XO

L'effet inhibiteur de nos molécules et extraits sur l'activité de la XO a été étudié spectrophotométriquement en suivant indirectement (Par la méthode de double enzyme) la production de l'acide urique à 492 nm.

Un volume de 20 μ l d'extrait enzymatique dilué dans le tampon phosphate a été ajouté à 40 μ l d'inhibiteur (en présence de concentrations croissantes). Les solutions mères des différents inhibiteurs ont été préparées dans le tampon phosphate (d'autres dans le DMSO (25%)). Ce mélange (enzyme/inhibiteur) est pré-incubé pendant 15 min à 37°C. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout d'un volume de 40 μ l de substrat (xanthine à 0,1g/l) dissout dans un tampon phosphate, le mélange est incubé à 37°C pendant 30min, le réactif de dosage de l'acide urique est ensuite ajouté avec un volume de 160 μ l, et incubé de nouveau à 37 °C pendant 10 min. L'allopurinol (l'inhibiteur spécifique de la XO) a été utilisé comme control positif. Le blanc du test d'inhibition est dépourvu du substrat. Le control de la réaction est dépourvu de l'inhibiteur. Le blanc de la plaque est dépourvu du substrat et de l'inhibiteur.

Toutes les expériences ont été répétées plusieurs fois (10 fois).

La démarche expérimentale est résumée dans le diagramme représenté dans la **Figure 24**

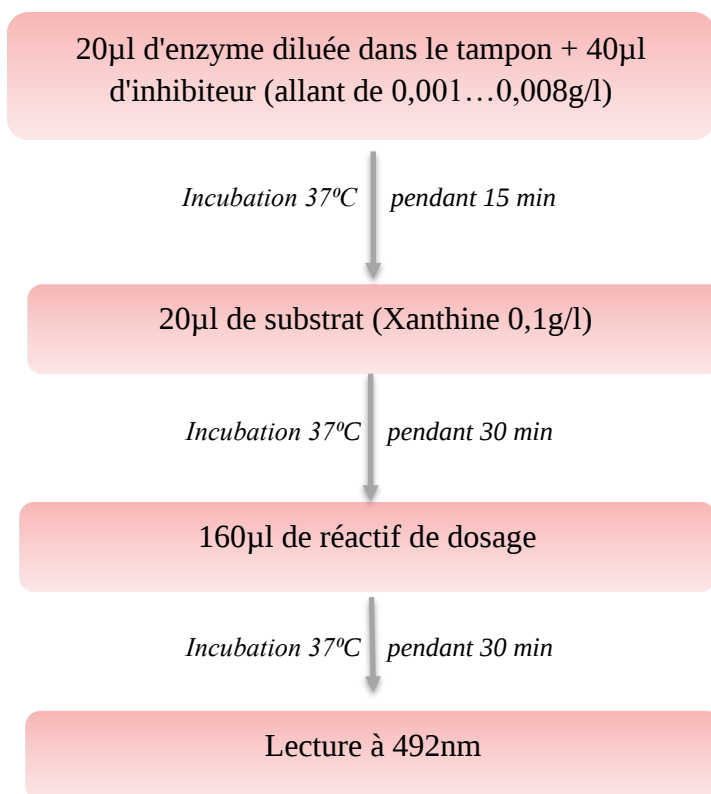
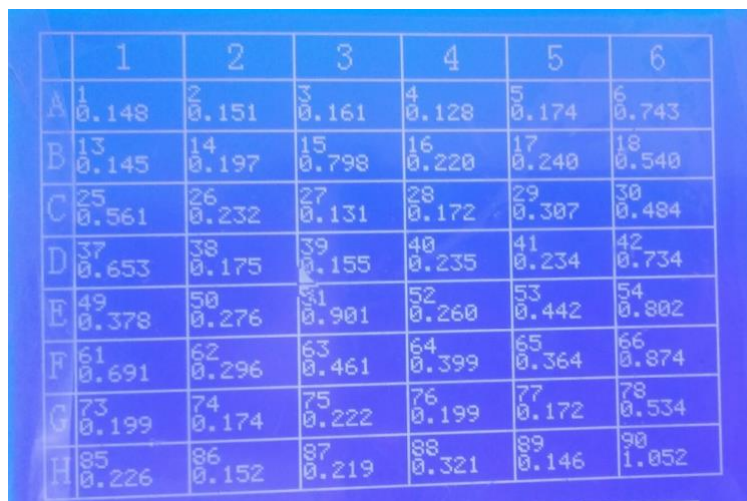


Figure 24 : Diagramme qui représente la démarche expérimentale de l'inhibition de la XO.

II. 5 Recueil traitement et analyse des données

- Le recueil des données est fait dans des tableaux (**Figure 25**) qui classent tous les paramètres contrôlés de chaque série et regroupent les résultats finaux.



	1	2	3	4	5	6
A	1 0.148	2 0.151	3 0.161	4 0.128	5 0.174	6 0.743
B	13 0.145	14 0.197	15 0.798	16 0.220	17 0.240	18 0.540
C	25 0.561	26 0.232	27 0.131	28 0.172	29 0.307	30 0.484
D	37 0.653	38 0.175	39 0.155	40 0.235	41 0.234	42 0.734
E	49 0.378	50 0.276	51 0.901	52 0.260	53 0.442	54 0.802
F	61 0.691	62 0.296	63 0.461	64 0.399	65 0.364	66 0.874
G	73 0.199	74 0.174	75 0.222	76 0.199	77 0.172	78 0.534
H	85 0.226	86 0.152	87 0.219	88 0.321	89 0.146	90 1.052

Figure 25 : Tableau affichant les résultats d'absorbance d'une microplaque étudiée.

- Le traitement des données a été fait à l'aide du logiciel EXCEL 2013/2019, et les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir des représentations graphiques **I % = f (c)**, les taux d'inhibitions I % sont calculés selon l'**Équation 9** suivante :

$$I\% = \left(\frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \right) \times 100 \dots\dots\dots (9)$$

Tel que :

I % : le taux d'inhibition.

A_{contrôle} : Activité de l'enzyme en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A_{extrait} : Activité de l'enzyme en présence de l'inhibiteur

- Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées 10 fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données a été effectuée par ANOVA.

IN SILICO

I. MATERIEL

I. 1 Moyen informatique

Dans notre étude, nous avons utilisé une station puissante (Carte graphique NVIDIA Quadro Experience, plateforme : Windows7). Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7 (64bits).

I. 2 Logiciels

Nous avons utilisé les logiciels suivants dans cette étude de modélisation : Discovery Studio Visualizer v4.0, Autodock tools (ADT), Autodock Vina (ADV), GOLD, Chemoffice v 16.0.

I. 3 Les banques des données

Nous avons consulté deux bases de données pour la réalisation de cette étude : la PDB et la PubChem.

➤ La banque de données protéiques (PDB)

C'est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines, essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN (**Figure 26**).

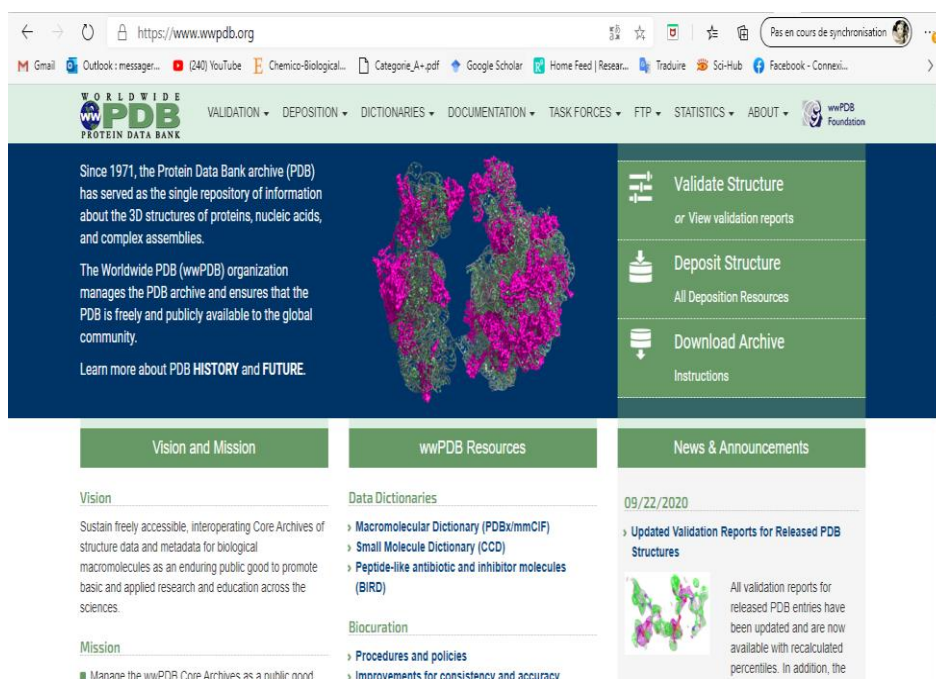


Figure 26 : Interface de la banque de donnée protéique PDB.

➤ Pubchem

PubChem est une banque de données américaine de molécules chimiques, elle répertorie plusieurs millions de composés en mettant en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres : chimique, biochimique, pharmacologique, production, toxicologie, environnemental...etc. Cette chimiothèque contient les structures chimiques de petites molécules ainsi que l'information sur leurs activités biologiques (**Figure 27**).

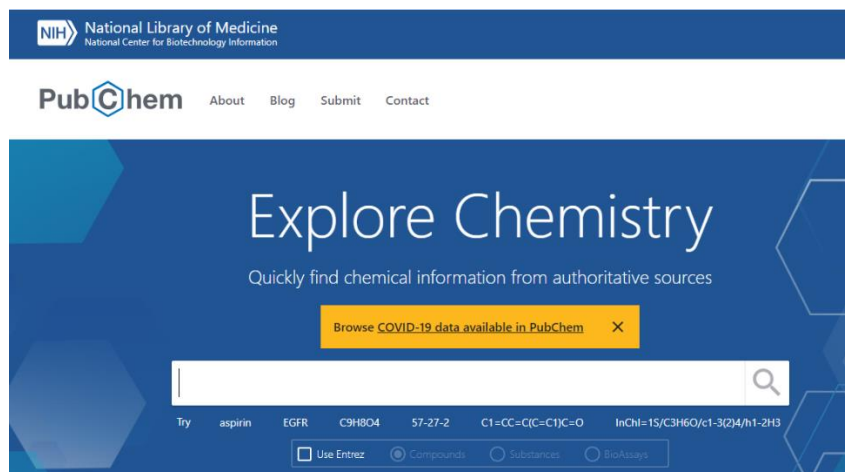


Figure 27 : Interface de PubChem.

II. METHODES

II. 1 Préparation des molécules

La préparation des ligands et des récepteurs est nécessaire avant le Docking. Les hydrogènes manquant et liaisons rotatables sont des données importantes et doivent être ajoutées aux fichiers pdb des molécules, dont le format dépend du logiciel de Docking utilisé.

Pour *Autodock vina*, la suite AutoDock met à disposition le logiciel AutoDock Tools (ADT) [160] et pour le GOLD, le logiciel Hermes, pour la visualisation.

II. 1. A Préparation et choix du récepteur

Pour l'amarrage moléculaire, il faut télécharger des fichiers sous format PDB contenant la conformation tridimensionnelle de l'enzyme via la banque de donnée PDB (*Protein Data Bank*). Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

Dans notre cas, cette banque nous propose 23 conformations 3D de la XO bovine et 02 conformations 3D de la XO humaine avec différentes résolutions et différents ligands (**Tableau 9**).

Notre objectif est d'étudier l'inhibition de la XO Humaine et Bovine par les méthodes de modélisation moléculaire, dont nous intéressons à déterminer le mode d'interaction du complexe (XO- inhibiteur) pour la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme, avec une meilleure complémentarité et en calculant l'énergie d'interaction du complexe formé.

Le complexe qui aura l'énergie d'interaction la plus faible et/ou le PLPchem score le plus élevé et celui qui présentera la meilleure activité inhibitrice. Ces résultats aideront probablement au développement d'un outil thérapeutique efficace pour lutter contre la goutte. Pour cela, nous avons regroupé toutes les informations disponibles des deux XO à partir de la PDB dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Informations structurales de la XO Bovine et Humaine disponibles dans la PDB.

Caractéristique d'enzyme	Code PDB	Ligands	Résolution	Références
<i>Xanthine Oxydase Bovine</i>				
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine complexée avec l'hypoxanthine	3NRZ	FES ×4 FAD ×2 HPA ×2	1,8 Å	Cao <i>et al.</i> ,2010 ^[178]
Structure cristalline de la xanthine oxydase du lait bovin	1FIQ	FES ×2 FAD MTE-MOS SAL GOL	2,5 Å	Enroth <i>et al.</i> ,2000 ^[179]
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine complexée avec l'arsénite	3NVV	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS-AST AST-MTE-MOS	1,82 Å	Cao <i>et al.</i> ,2011 ^[180]
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine complexée avec la guanine	3NVW	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 GUN ×2	1,6 Å	Cao <i>et al.</i> ,2014 ^[181]
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine complexée avec la quercétine	3NVY	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 QUE ×2	2 Å	Cao <i>et al.</i> ,2014 ^[181]
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine complexée avec la 6-mercaptopurine	3NS1	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 PM6 ×2	2,6 Å	Cao <i>et al.</i> ,2010 ^[182]
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine complexée avec l'indole-3-aldéhyde	3NVZ	FES ×4 FAD ×2 MTE-MOS ×2 I3A ×2	1,6 Å	Cao <i>et al.</i> ,2014 ^[183]
Structure cristalline de la xanthine oxydase bovine réduite complexée avec l'arsénite	3SR6	FES ×4 FAD ×2 MTE-RMO ×2	2,1 Å	Cao <i>et al.</i> ,2011 ^[180]

Xanthine oxydase bovine, forme clivée par protéase	3AX7	FES ×4 – FAD ×2 XAX ×2 – SAL ×2 BCT ×2 – GOL ×5	2,34 Å	Ishikita <i>et al.</i> ,2012 ^[184]
Xanthine oxydase bovine, forme clivée par protéase	3AX9	FES ×4-FAD ×2 XAX ×2 – BCT ×2 GOL ×5 SAL ×2	2,3 Å	Ishikita <i>et al.</i> ,2012 ^[185]
Structure cristalline de la désulfo-xanthine oxydase avec la xanthine	3EUB	FES ×8 MTE-MOM ×4 FAD ×4 – XAN ×4	2,6 Å	Pauff <i>et al.</i> , 2009 ^[186]
Structure cristalline de la xanthine oxydase en complexe avec la lumazine	3ETR	FES ×4 – FAD ×2 MTE-MOS ×2 LUZ ×2	2,2 Å	Pauff <i>et al.</i> , 2009 ^[187]
Structure de la xanthine oxydase avec la 2-hydroxy-6-méthylpurine	3B9J	FES ×4 - FAD ×2 MTE-MOS - 290 MTE-MOS-290	3,2 Å	Pauff <i>et al.</i> , 2009 ^[188]
Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase du lait bovin	1FO4	FES ×4 MTE-MOS ×2 SAL ×2 - FAD ×2 GOL ×4	2,1 Å	Enroth <i>et al.</i> ,2000 ^[183]
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	1,9 Å	Ishikita <i>et al.</i> ,2012 ^[184]
Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase du lait bovin	3UNC	FES ×4 MTE-MOS ×2 FAD ×2 _ SAL ×2 GOL ×24 _ CO3 ×2	1,65 Å	Ishikita <i>et al.</i> ,2012 ^[185]
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	2,2 Å	Ishikita <i>et al.</i> ,2012 ^[185]
Xanthine déshydrogénase Y-700 du lait bovin	1VDV	FES×4_MTE-MOS ×2_FAD ×2_YSH ×2_GOL ×21- ACY	1,98 Å	Fukunari <i>et al.</i> ,2004 ^[189]
Structure cristalline de la Xanthine Déshydrogénase du lait bovin lié de manière covalente à l'oxipurinol	3BDJ	FES ×4 MTE-MOW ×2 FAD ×2 141 ×2 GOL×7- CO3 ×2	2 Å	Okamoto <i>et al.</i> ,2008 ^[190]
Xanthine déshydrogénase de lait bovin avec un inhibiteur lié au TEI-6720	1N5X	FES ×4 MTE-MOS ×2 FAD ×2 TEI ×2	2,8 Å	Okamoto <i>et al.</i> ,2003 ^[191]
Structure cristalline de la forme liée de la xanthine déshydrogénase bovine au FYX-051	1V97	FES ×4 MTE-MOS ×2 FAD ×2- FYX ×2 ACY ×2- GOL ×8	1,94 Å	Okamoto <i>et al.</i> , 2004 ^[192]
Complexe de xanthine déshydrogénase bovine et de trihydroxy FYX-051	3AM9	FES ×4- FAD ×2 BCT ×2 MTE-MOS-FYO×2 GOL ×2	2,17 Å	Matsumoto <i>et al.</i> ,2011 ^[193]

Forme liée à l'urate de xanthine- oxydoréductase bovine	3AMZ	FES ×4- FAD ×2 NAI ×2- BCT ×2 GOL ×3 MTE-MOS-URC×2	2,1 Å	Okamoto <i>et al.</i> ,2010 ^[194]
<i>Xanthine Oxydase Humaine</i>				
Structure cristalline de la xanthine oxydoréductase du lait humain	2CKJ	FES, FAD, GOL, ACY, PO4	3,59 Å	Pearson <i>et al.</i> ,2006 ^[195]
Structure cristalline de la xanthine oxydoréductase de lait humain muté sur Glu803 et Arg881	2E1Q	BCT, FES, FAD, MTE, MOM, SAL, CA	2,6 Å	Yamaguchi <i>et al.</i> ,2007 ^[196]

Nous avons décidé de travailler avec les structures XO avec les codes PDB : 3NRZ pour la XO bovine et 2CKJ pour la XO humaine.

L'enzyme 2CKJ est déjà présente sous forme libre et le complexe 3NRZ a été séparé de son ligand (hypoxanthine) afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre.

Les deux récepteurs sont ensuite préparés par *AutoDock Tools* (dans le cas d'*autodock vina*) qui permet d'attribuer des charges de type « KOLLMAN », ajout des Hydrogènes dits polaires (présents dans le fichier d'entrée des protéines pour GOLD), suppression des hétéroatomes, et des molécules d'eau sauf les molécules nécessaires dans le site actif (pour GOLD, Un clic sur l'option « *Delete Remaining Waters* » permet leur élimination). Les molécules d'eau dans les cavités des protéines peuvent parfois être un élément fondamental. Elles sont capables d'assurer le relais entre le récepteur et le ligand et ainsi créer des réseaux de liaisons hydrogènes.

Vers la fin, nous intégrons dans ce fichier les paramètres de solvation des atomes avant de l'enregistrer dans le format :

- *pdbqt* requis par le programme AutoDock Vina.
- *mol2* requis par le programme GOLD.

II. 1. B Préparation des ligands

Nous avons eu recours à la chimiothèque PUBCHEM ^[197], afin d'obtenir les molécules à étudier par Docking sur XO. Les molécules ainsi obtenues sont enregistrées en format SDF. La phase finale de préparation du ligand est réalisée par le programme Autodock tools. Ce dernier a pour rôle de contrôler les mouvements du ligand, en définissant les atomes aromatiques, les liaisons flexibles et les angles de torsion. La molécule finale est enregistrée en format *pdbqt* avant son utilisation par AutoDock Vina. Pour le programme GOLD. Le fichier protéine peut

avoir un ou plusieurs ligands occupant le site de liaison qui doit être enlevé avant de pouvoir effectuer un docking. En cliquant sur « Delete Ligands » de la liste des options proposées, puis sur le bouton « Extract ». Le ligand extrait est enlevé du fichier de la protéine et automatiquement rechargé dans « Hermes » de sorte qu'il puisse être employé pour définir le site de liaison.

Les ligands utilisés sont :

- ✓ Les composés majoritaires de chaque huile essentielle obtenue à partir de l'analyse CPG-SM : Linalol, Estragole, D-Limonène, Carvone, 2-méthyl-3-phenylpropanal et l'Anéthol.
- ✓ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Indométacine, Celecoxib, Diclofénac de sodium, Naproxène de sodium et l'Ibuprofène).
- ✓ Ainsi qu'un certain nombre de complexes organométalliques synthétisés chimiquement pour la première fois par Kostova et ses collaborateurs ; La2, La4, La5, Ce2, Ce3, Ce5, Nd2, Nd3, Nd4, Nd5. [12-14, 171-173]

Le **Tableau 9** résume les différentes informations structurales de ces ligands.

Tableau 9 : Informations structurales des ligands.

Ligands	Poids moléculaire (g/mol)	Nom IUPAC	Formule brute
Indométacine	357,790	2-[1-(4-chlorobenzoyl) -5-methoxy-2-methylindol-3-yl] acetic acid	C ₁₉ H ₁₆ ClNO
Celecoxib	381,373	4-[5- (4-methylphenyl) -3-(trifluoromethyl) pyrazol-1-yl]benzene sulfonamide	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S
Diclofénac de sodium	318,129	sodium, 2- [2- (2,6-dichloroanilino) phenyl] acetate	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂
Naproxène de sodium	252,245	sodium; (2S) -2- (6-methoxy-naphthalen-2-yl) propanoate	C ₁₄ H ₁₃ NaO ₃
Ibuprofen	206,285	2-[4-(2-methylpropyl) phenyl] propanoic acid	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Anéthol	148,205	1-Methoxy-4-[(1E)-prop-1-en-1-yl]benzene	C ₁₀ H ₁₂ O
Carvone	150,22	2-Methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-2-en-1-one	C ₁₀ H ₁₄ O

D-limonene	136,23	(4 <i>R</i>)-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	C ₁₀ H ₁₆
Linalol	154,253	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
2-methyl-3-phenyl Propanal	148,202	Propanal,2-Méthyl-3-phényl	C ₁₀ H ₁₂ O
Estragole	148,2	1-allyl-4-méthoxybenzène	C ₁₀ H ₁₂ O

II. 2 Docking moléculaire

Le Docking a été réalisé en utilisant les programmes Autodock vina (ADV) et GOLD.

- **ADV** : Les paramètres « receptor » et « ligand » correspondent aux noms des fichiers au format « .Pdbqt » de la protéine et de la petite molécule à docker, respectivement (propre aux logiciels AutoDock). Pour augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, ADV effectue une recherche dans une zone délimitée par une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine étudiée et permettant la libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées « center_x », « center_y » et « center_z », et sa taille en fonction des paramètres « size_x », « size_y » et « size_z ».

L'espacement ou la maille de la grille est fixé 1 Å (**Figure 28**). La boîte ou « Grid box » est alors centrée sur le ligand, et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés. Les paramètres de la grille sont évidemment différents pour chacune des deux structures d'enzyme et sont définis manuellement grâce à l'outil AutoDock Tools.

Le Docking est ensuite lancé via la commande : vina --config config.txt.

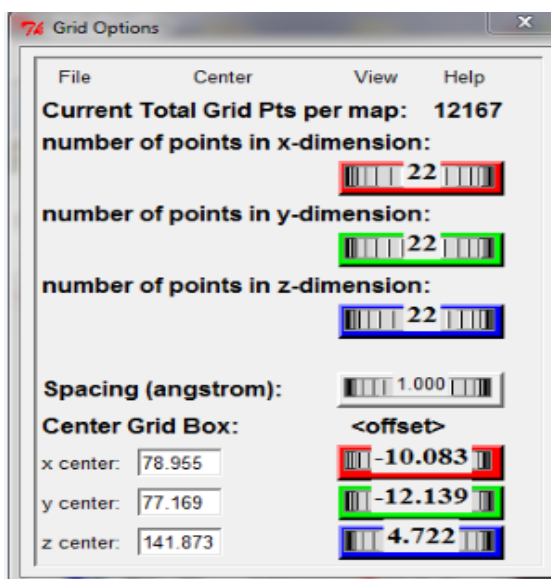


Figure 28 : Les différents paramètres de la grille (Grid box).

- **GOLD** : La fonction PLPChem score est la fonction de score par default de GOLD [198], et celle qui a été utilisée dans cette thèse. Avant de terminer la mise en place de notre docking, cliquer sur l'option Advanced, sélectionner Output Options. Cette page est séparée en trois vues tabulées : « *File Format Options* », « *Information in File* » et « *Selecting Solutions* », permettent de contrôler les informations des fichiers de sortie. Enfin, le choix de l'option *Run GOLD* dans le menu permet de lancer les calculs. Une fois le docking terminé, le message « *Finished Docking Ligand* » apparaîtra dans la fenêtre *Run GOLD*. Les résultats de docking sont présentés sous forme des 05 meilleures solutions pouvant être observés dans la fenêtre *Run GOLD* :

- Les fichiers contenant des informations sur la protéine et le ligand initialisé ;

(gold_protein. Mol2 et gold_ligand. Mol2).

- Les fichiers contenant le ligand docker (gold_soln_ligand_m1_n. mol2) ;

Les fichiers contenant le score de Fitness, les tentatives d'amarrage sont énumérées selon le score de Fitness. Donc, la meilleure solution est placée en premier ;

- Les fichiers log des protéines et de ligand (gold_protein.log et gold_ligand_m1.log) ;
- Les fichiers contenant les messages d'erreur (gold.err).

Au cours du Docking, le site actif de l'enzyme est considéré comme rigide. Dans la partie résultats et discussion, nous étudions les différents ligands dont les structures sont représentées

en **Annexe 5**. Nous montrons également les différentes positions adaptées au sein du site actif avec les interactions les plus significatives.

PARTIE 2

Résultats et Discussion

Résultats IN VITRO

I. Huiles Essentielles

➤ Rendement en huiles essentielles

L'estimation du rendement massique en huile essentielle obtenu par hydrodistillation révèle des valeurs comprises entre 0,1-1,2 % pendant 180 min (**Tableau 10**).

Les valeurs obtenues de densité de nos huiles essentielles sont représentées dans le (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Rendements et valeurs de densité des huiles essentielles extraites pendant 180 min.

	Densité	Rendement (%)
<i>Carum carvi</i> L.	0,923	0,98
<i>Pimpinella anisum</i> L.	0,99	0,39
<i>Coriandrum sativum</i> L.	0,772	0,1
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	0,992	0,37
<i>Cuminum cyminum</i> L.	0,869	1,2

➤ Caractéristiques organoleptiques

Cette caractérisation de chaque HE a porté sur 3 volets : L'aspect ; La couleur, L'odeur, les résultats de cette évaluation sensorielle réalisée sur nos cinq HEs sont présentés dans le **Tableau 11**.

L'HE de carvi, cumin, fenouil et coriandre sont liquides à température voisine de 4°C à l'exception de l'HE d'anis qui est à l'état solide. Toutes les HEs présentent la même couleur jaune pâle.

Tableau 11 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites.

HE	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Pimpinella anisum</i>	Solide à 4°C		Semblable à celle de l'anis
<i>Carum carvi</i>	Liquide mobile	Jaune pâle	Semblable à celle du carvi
<i>Coriandrum sativum</i>			Semblable à celle du coriandre
<i>Cuminum cyminum</i>			Semblable à celle du cumin
<i>Foeniculum vulgare</i>			Semblable à celle du fenouil

➤ Identification des constituants des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles étudiées a été déterminée à l'aide de deux techniques d'analyses : la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF), et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/SM. L'analyse quantitative a atteint les taux de 94,94%, 26,21%, 54,89%, 82,42% et 82,24% avec un total de 30, 25, 20, 18 et 25 composés identifiés respectivement pour les Hes d'anis, cumin, carvi, coriandre et fenouil. Les résultats de la CG/SM sont présentés dans les **Tableaux (12-16)** selon l'ordre de prédominance.

Tableau 12 : Composition chimique de l'huile essentielle d'anis.

Temps de rétention	Composé
7,355	α -Pinène
7,856	1,5,5-triméthyl-6-méthylène-cyclohexène
8,801	β -Pinène
9,156	2,6-octadien-1-ol, 2,7-diméthyl-
9,671	Cyclohexène, 1-méthyl-5-(1-méthylethényl) (R)
10,462	Benzène, 1-éthyl-2,4-diméthyl-
10,622	Cyclohexène, 1-méthyl-5-(1-méthylethényl) (R)
12,703	1,6-octadien-3-ol, 3,7-diméthyl-
13,328	1,6-octadien-3-ol, 3,7-diméthyl-
16,759	Estragole
17,184	Estragole
21,406	Anéthol
22,286	Cyclohexène, 4-éthényl-4-méthyl-3-(1-méthylethényl) -1-(1-méthylethényl) -, (3R-trans) -
23,807	2-propanone, 1-(4-méthoxyphényl) -
26,023	1-H-benzocycloheptène, 2,4a,5,6,7,8,9,9a-octahydro-3,5,5-triméthyl-9-méthylène-, (4aS-cis) -
26,628	4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-énylidène) -2-méthylènebicyclo (4.1.0)heptane
27,013	Longifolène-V4)
27,263	1,3-cyclohexadiène, 5-(1,5-diméthyl-4-hexényl) -2-méthyl, IS (Rs)
29,684	Cyclohexène-1-acrylique acid, 2,6,6-triméthyl-3-oxo-, méthyl ester
30,279	Isoaromadendrene époxyde
31,52	- (-) spathuléol
32,135	7-épi-cis-sesquibabinène hydrate
33,506	Retinal

Tableau 13 : Composition chimique et teneur des différents constituants de l'huile essentielle de cumin.

Temps de rétention	Composé	Surface	Teneur %
18,69	Propanal, 2-méthyl-3-phényl	889608512	50,26
10,502	Benzène, 1-méthyl-3-(1-méthylethényl)	460181760	26
21,561	Cyclohexanebutanal, 2-méthyl-3-oxo-, cis-	124283960	7
16,934	1,3-cyclohexadiène-1-méthanol, 4-(1-méthylethényl)	98980304	5,6
8,876	β -Pinène	93359424	5,27
18,16	Phénol, 3(1-méthylethényl)-	56692320	3,2

15,194	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	46616592	2,63
--------	---	----------	------

Tableau 14 : Composition chimique et teneur des différents constituants de l'huile essentielle de carvi.

Temps de rétention	Composé	Surface	Teneur %
18,935	Carvone	1600324992	51,83
10,707	D-limonène	1455014784	47,12
14,758	Limonene oxide, cis-	23866332	0,77
14,243	Trans-p-mentha-2,8-dienol	8151198,5	0,26

Tableau 15 : Composition chimique et teneur des différents constituants de l'huile essentielle de coriandre.

Temps de rétention	Composé	Surface	Teneur %
13,503	B-linalool	5094492672	73,03
16,879	a-terpineol	464275584	6,65
16,004	Endo-borneol	231248352	3,31
15,214	(-)-camphor	211471136	3,03
19,13	Geraniol	171828832	2,46
23,532	Geranyl acetate	156963936	2,25
20,471	Thymol	138776752	1,98
17,064	Estragole	97599264	1,39
20,26	Anethole	88364784	1,26
16,369	Terpinen-4-ol	64656976	0,92
17,234	Decanal	61245724	0,87
19,315	2-decenal, (Z)-	42890312	0,61
18,85	Carvone	40301976	0,57
11,777	Y-terpinene	39437372	0,56
26,253	2-dodecenal	33108028	0,47
18,675	Propanal, 2-methyl-3-phenyl-	16845762	0,24
12,407	Cis-linalool oxide	14351695	0,2
22,601	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, acetate	7604699,5	0,1

Tableau 16 : Composition chimique et teneur des différents constituants chimique de l'huile essentielle de fenouil.

Temps de rétention	Composé	Surface	Teneur %
17,224	Estragole	4283771648	77,12
16,914	a-terpineol	394783936	7,10
20,281	Anethole	192832368	3,47
20,486	Thymol	173414256	3,12
16,024	Endo-borneol	159996304	2,88
18,865	(-)-carvone	93496920	1,68
10,697	D-limonene	89965168	1,61
13,053	Bicyclo 2.2.1heptan-2-one, 1,3,3-trimethyl	72865224	1,31
29,674	3-methoxycinnamaldehyde	36951968	0,66

13,328	1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	18232080	0,32
20,831	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	12114243	0,21
15,234	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-. (1S)-	10283799	0,185
22,601	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl) acetate	10159122	0,182
18,7	Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)-	5673800,5	0,1

II. Caractérisation des complexes de lanthanide (III)

La synthèse des complexes de lanthanide (III) étudiés et leurs formules, nous ont déjà été rapportées par Kostova et ces collaborateurs [12, 14, 172, 173, 199-203]. La composition des complexes a été étudiée par spectroscopie de masse. Le type de liaison des complexes de lanthanide (III) ont été étudiés par des techniques spectroscopiques.

Les résultats obtenus ont montré que les sites réactifs les plus probables pour l'attaque électrophile (liaison métallique) dans le type de ligand sont les atomes d'oxygène carbonyliques et hydroxyliques.

Les données spectrales ont confirmé que les atomes d'oxygène carbonyle et hydroxylique sont inclus dans la liaison avec l'ion métallique dans les complexes étudiés. Les deux autres sites de liaison de l'ion métallique sont occupés par un ion OH^- et une molécule d'eau [199-202].

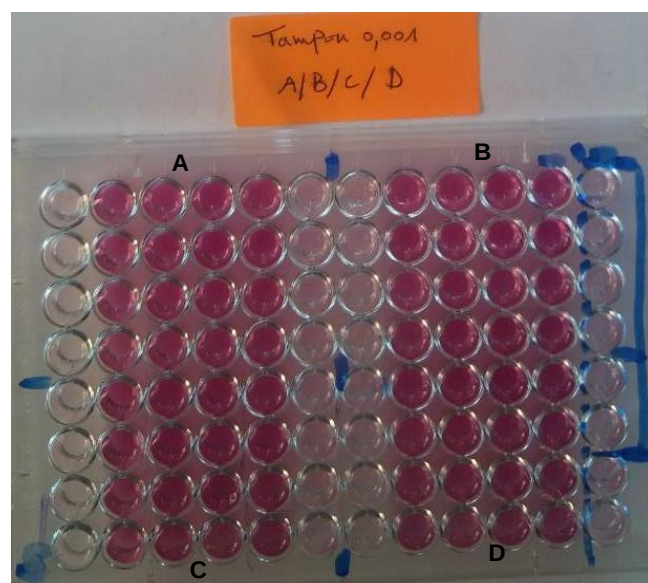
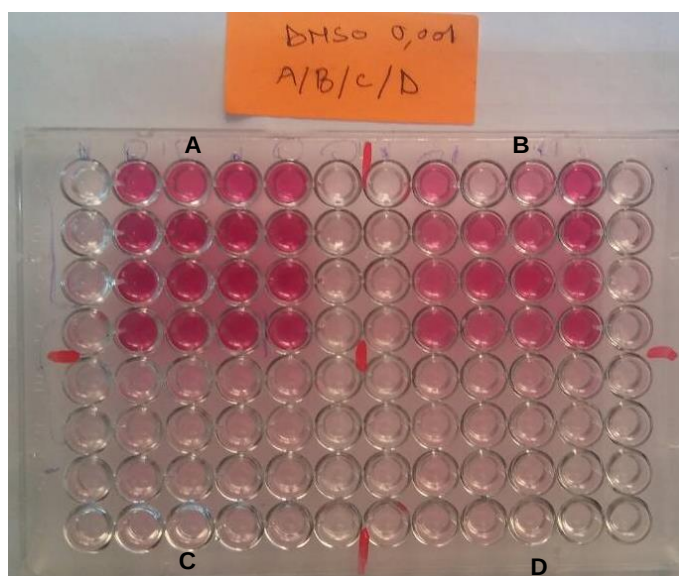
III. Effet du solvant sur l'activité enzymatique

Les résultats montrent que l'activité résiduelle est conservée en présence du tampon, contrairement au DMSO, où nous observons un décroît de l'activité enzymatique à partir de 25% (Tableau 17 et Figure 29).

Tableau 17 : Effet de la teneur en solvants organiques sur l'activité enzymatique de la XO.

Solvant	Pourcentages		Activité
DMSO	A	12,5	+
	B	25	+
	C	50	-
	D	100	-
Tampon	A	12,5	+
	B	25	
	C	50	
	D	100	

(+) présence d'activité, (-) Absence ou diminution d'activité.

**Figure 29 :** Effet des différentes teneurs du DMSO et du Tampon sur la XO.

IV. Extraction de l'enzyme xanthine oxydase

➤ Rendement

Le rendement moyen de l'extrait enzymatique obtenu à partir du lait humain était d'environ deux fois supérieures à celui de l'extrait enzymatique du lait bovin (**Tableau 18**).

Tableau 18 : Rendements des extraits enzymatiques obtenus des deux sources de lait (bovin et humain) à partir d'un volume de 1000 ml.

Source	Rendement (%)
Lait Bovin	6,4
	8,25
	3,3
	5,1
	5,4
Lait Humain	10,3
	10,2
	22,9
	7,19

V. Inhibition de la réaction catalysée par la Xanthine oxydase

Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I % en fonction des concentrations des extraits et molécules pures, exprimées en µg/ml pour une seule concentration de substrat (0,1g/l), nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀) de chaque échantillon (les courbes des meilleures inhibitions sont présentés dans l'Annexe 4 et les valeurs d'IC₅₀ sont représentés dans le **Tableau 19**.

Tableau 19 : Valeurs d'IC₅₀ des inhibiteurs étudiés et des deux médicaments commerciaux.

		IC ₅₀ (µg/ml)	
		XOH	XOB
HE	<i>Carum carvi</i> L.	3,43± 0,56	5,33 ± 0,13
	<i>Pimpinella anisum</i> L.	2,37 ± 0,23	1,74 ± 0,21
	<i>Coriandrum sativum</i> L.	3,76 ± 0,18	10,59 ± 1,59
	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	3,89 ± 0,11	5,53 ± 0,82
	<i>Cuminum cyminum</i> L.	3,67 ± 0,17	6,26 ± 0,92
	Diclofénac de sodium	1,45 ± 0,19	6,21 ± 0,17
	Naproxène de sodium	2,04 ± 0,13	2,96 ± 0,27

AINS	Indométacine	$0,31 \pm 0,13$	$0,83 \pm 0,11$
	Ibuprofène	$2,75 \pm 0,23$	$9,46 \pm 0,13$
	Celecoxib	$1,27 \pm 0,11$	$3,48 \pm 0,13$
COMPLEXES	La(L2) (OH)·H ₂ O	/	$11,66 \pm 0,86$
	La(L4) (OH)·2H ₂ O	/	$13,65 \pm 2,16$
	La(L5) (OH).2H ₂ O	/	$9,97 \pm 1,29$
	Ce(L2) (OH). H ₂ O	/	$8,54 \pm 2,20$
	Ce(L3) (OH). H ₂ O	/	$9,07 \pm 0,81$
	Ce(L5) (OH)·H ₂ O	/	$13,69 \pm 1,51$
	Nd(L2) (OH).2H ₂ O	/	$14,49 \pm 1,94$
	Nd(L3) (OH).2H ₂ O	/	$7,85 \pm 1,28$
	Nd(L4) (OH).2H ₂ O	/	$12,96 \pm 1,06$
	Nd(L5) (OH).2H ₂ O	/	$13,38 \pm 1,71$
Febuxostat ^a		$0,064 \pm 0,017$	
Allopurinol ^a		$2,72 \pm 0,64$	

^a Utilisés comme témoins

Selon l'analyse ANOVA, les résultats obtenus indiquent que tous les groupes testés ont un F_{stat} plus grand que le F_{crit} et tous ont une valeur P inférieure à 0,05.

Résultats IN SILICO

I. Docking moléculaire

Les résultats retournés par ADV se présentent sous la forme d'un fichier. *Pdbqt* contenant la liste de toutes les conformations du ligand générées (aussi appelées « poses ») dans la zone de recherche, également un fichier texte contenant les scores de chacune de ces conformations, la meilleure énergie d'affinité et la moins bonne de chaque pose (en kcal/mol) et alors fourni dans ce fichier texte. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 20**.

Les résultats retournés par GOLD se présentent sous la forme d'un fichier. *Pdb* contenant les solutions des conformations du ligand générées (poses) dans la zone de recherche, ainsi qu'un fichier texte contenant les scores de chacune de ces conformations, la meilleure valeur du « PLPchem score » est la bonne pour chaque pose est alors fourni dans ce fichier texte. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 20**.

Tableau 20 : Les différentes interactions obtenues après le Docking moléculaire pour les deux sources de xanthine oxydase.

Ligand	Energie (Kcal/mol)/ PLP chem score	Taux de répétition (%)	Acides aminés en interaction	Type d'interactions	Interaction Hydrogènes (Å)
Xanthine oxydase Bovine (XOB)					
Indométacine	-5,8	52	Leu648, Val1011, Leu1014, Phe1013, Asn768, Lys771, Asp872, Ser876	π -alkyl; π - sigma; π - π -T- Shaped; Alkyl- alkyl	2,87
Celecoxib	-7,2	78	Lys771, Leu648, Val1011, Leu1014, Leu873, Pro1076	π -cation; π -alkyl π -sigma; Alkyl- alkyl Fluorine	/
Diclofénac sodique	-5,6	92	Pro1076, Leu1014, Leu648, Phe1013, Val1011, Leu873	π -alkyl; π - sigma; Alkyl- alkyl	/
Naproxène sodique	-7,9	68	Arg912, Ser1080, Thr1083, Ser1082, Glu1261, Val1081	π -alkyl Amide- π - stacked	2,26
Ibuprofène	-7,2	86	Ala1078, Arg912, Ser1082, Thr1083	Alkyl-alkyl	3,05
Anéthol	-7,0	66	Thr1010, Val1011, Leu1014, Ala1079, Phe1009, Phe914, Ala1078, Ala910	π -sigma, π - π stacked, alkyl- alkyl, π -alkyl, π - π t-shaped	3,23
Carvone	-7,0	66	Ala1079, Leu1014, Val 1011, Phe1009, Phe914, Leu873	alkyl-alkyl, π - alkyl, van der waals	3,32

D-limonène	-6,8	90	Val1011, Leu1014, Leu873, Phe914, Ala1079, Phe1009, Ala1078	alkyl-alkyl, π -alkyl	/
Estragol	-6,7	44	Leu1014, Val1011, Leu873, Phe914, Ala1079, Phe1009, Ala1078, Glu802	π - π stacked, π - π t-shaped, alkyl-alkyl, π -alkyl, π -sigma	/
Linalol	-5,9	52	Leu1042, Met1038, Thr1083, Ser1082	alkyl-alkyl	2,61 3,12
2-methyl-3-Phenylpropanal	-3,3	46	Thr1010, Arg880, Phe1009, Phe914, Ala1079, Ala1078	π -sigma, alkyl-alkyl, π -alkyl	3,32 3,39
Lanthanum (III)	32,28	80	Leu648, Ser876, Glu879, Val1011, Leu1014	π -alkyl, π -sigma, alkyl	2,21 2,94 2,63
Cérium (III)	33,27	60	Leu648, Ser876, Val1011, Phe1013, Leu1014	π -sulfure, π -alkyl, π -sigma, π - π t-shaped	2,05 2,50
Neodymium (III)	33,46	70	Leu648, Lys771, Phe1013, Leu1014	π -alkyl, π -sigma	2,43 2,21 2,83

Xanthine oxydase Humaine (XOH)

Indométacine	-7,0	98	Arg913, Phe915, Ala1080, Ala1079, Ser1083, Gln1041, Met1039, Phe799	π -alkyl ; alkyl-alkyl.	3,02
Celecoxib	-7,2	52	Arg913, Phe799, Ser1081, Gly1261, Met1039, Val1260, Ser1083	conventional fluorine, π - π -t-shaped, π -sigma, π -alkyl, alkyl-alkyl, π -sulfur,	3,00
Diclofénac sodique	-7,6	100	Met1039, Phe799, Arg913, Gln1195, Glu1262, Gly1261, Cys150.	Π -alkyl; amide- π -stacked, π - π -stacked, π -sulfur; alkyl-alkyl	2,51 2,24
Naproxène sodique	-8,1	100	Phe915, Phe912, Gly800, Gly914, Glu1262, Arg913, Ser1080, Ser1082, Met1039	π -sulfur ; π -alkyl	2,00
Ibuprofène	-7,0	54	Arg913, Met1039, Gly1040, Gln1195	π -cation, π -alkyl, alkyl-alkyl,	3,06 2,13
Anéthol	-5,7	88	Cys150, Phe799, Met1039, Arg913	π -alkyl, π - π stacked, π -cation, π -sulfur, alkyl-alkyl	/
Carvone	-6,0	100	Cys150, Gly1261, Phe799, Arg913, Met1039	π -sigma, alkyl-alkyl, π -alkyl	3,53
D-limonène	-5,8	100	Cys150, Phe799, Met1039, Arg913	π -alkyl, alkyl-alkyl, π -sigma	/
Estragol	-5,6	52	Phe799, Arg913, Met1039, Ala911, Phe915	π -sulfur, alkyl-alkyl, π -alkyl	/
Linalol	-5,7	66	Phe799, Arg913, Glu768, Ala1080, Ala1079, Ala911, Phe915	alkyl-alkyl, π -alkyl	2,96

2-methyl-3-Phenylpropanal	-2,7	88	Phe799, Met1039	alkyl-alkyl, π -sigma	/
Lanthanum (III)	46,41	100	Gln1195, Gln1202, Phe799, Cys150, Ala1079, Met1039, Gly800, Ala1080, Ala911, Arg913, Phe915	π -alkyl, π -sigma, amide- π -stacked, π -sulfur	1,83 2,33 2,34
Cérium (III)	28,25	90	Cys113, Met1039, Val1260, Gly1261, Ala1259, Cys150, Phe799, Gln1041, Gln1195, Cys113, Gly798, Met1039	π -alkyl, π -sulfur	2,19 2,87
Neodymium (III)	53,87	100	Cys150, Phe799, Met1039, Ala1259, Ala1079, Ala1080, Ser1081, Ser1083, Val1260, Gly1040, Ile1191	π -alkyl ; amide- π -stacked, π - π – T shaped, π -sulfur ; alkyl-alkyl	2,03 2,83

Discussion IN VITRO

I. Huiles Essentielles

➤ Rendement en huiles essentielles

Les résultats du rendement de l'extraction d'huile essentielle des plantes utilisées dans notre étude rapporté dans la littérature montrent de manière générale que le rendement obtenu est en accord avec les rendements mentionnés dans la littérature (à l'exception de quelques huiles), cette variation de rendement peut être due à plusieurs facteurs, notamment les conditions d'extraction, la période de récolte et les variations dans la culture exemple : Type de sol, climat, etc...

Nous rappelons que l'huile essentielle des graines sèches de nos différentes plantes a été extraite par hydrodistillation. Le **Tableau 21** résume les rendements en huiles essentielles issues de notre étude et de la littérature.

L'extraction par hydrodistillation des HE de cumin, fenouil, carvi, coriandre et anis révèle une valeur de rendement de l'ordre de 1,2%, 0,37%, 0,98%, 0,1%, 0,39% pour chaque espèce respectivement.

Le rendement en HE du cumin (1,2%) semble nettement plus important que celui mentionné par Abhri^[204] (0,63%) et Yezza et Djediai^[205] (1,02%), mais inférieur à celui trouvé par Abdellaoui *et al.*^[206] (5,27%).

D'autres résultats rapportés par Singh *et al.*^[207] et par Gulfraz *et al.*^[208] sur l'HE du fenouil montre un rendement supérieur de 1,2% et de 3,8% respectivement, contre 0,37% pour notre huile.

Pour l'HE de carvi, les auteurs ont obtenu un rendement de 0,75% et 0,47%, respectivement, tous les deux inférieurs au notre où nous avons observé un rendement de 0,98%.

Quant à l'HE de coriandre nous avons observé des rendements proches des auteurs, avec 0,1% pour notre HE, et 0,2 et 0,5 % pour ceux de la littérature. ^{[209] [210]}

Pour l'HE d'anis, Ozel *et al.*^[211] et Ghouati *et al.*^[212] estiment un rendement allant de 1 à 4 %. Dans notre cas, nous avons observé un rendement de 0,39%.

Ces différences de rendement en huile essentielle sont tout à fait normales puisqu'elles peuvent être attribuées à plusieurs facteurs en même temps, tel que les facteurs climatiques et environnementaux, l'organe de plante, la situation géographique, l'âge et la période de la

cueillette ^[213-215]. De plus, et d'après Lagunez Rivera^[216] l'hydrolat peut toujours contenir des gouttelettes que nous n'avons pas pu récupérer ce qui pourrait fausser le rendement.

Tableau 21 : Rendements des huiles essentielles issues de notre étude et de la littérature.

HE	Rendement HD %	Références
Cumin	1,2	Notre étude
	1,02	[205]
	0,63	[204]
	5,27	[206]
Fenouil	0,37	Notre étude
	1,2	[207]
	3,8	[208]
Carvi	0,98	Notre étude
	0,75	[217]
	0,47	[218]
Coriandre	0,1	Notre étude
	0,2	[209]
	0,5	[210]
Anis	0,39	Notre étude
	1-4	[211]
	3	[212]

HD : Hydrodistillation

➤ Densité

Nous avons également rassemblé les valeurs de densité des HE d'anis, carvi, coriandre, fenouil et cumin retrouvées dans la littérature dans le **Tableau 22** afin de les comparer avec ceux de nos résultats

Tableau 22 : Valeurs de densité des huiles essentielles issues de notre étude et de la littérature.

	Densité	Références
<i>Carum carvi</i> L.	0,923	Notre étude
	0,916	[219]
<i>Pimpinella anisum</i> L.	0,99	Notre étude
	0,99	[220]

<i>Coriandrum sativum</i> L.	0,772	Notre étude
	0,607	[221]
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	0,992	Notre étude
	0,923	[221]
<i>Cuminum cyminum</i> L.	0,869	Notre étude
	0,915	[219]

En étudiant la littérature, nous avons été amenés à dire que ; les valeurs de densité sont plus ou moins du même ordre de grandeur que ceux retrouvés dans la littérature.

➤ Caractéristiques organoleptiques

Des notes olfactives proches des arômes originels des espèces fraîches utilisées sont enregistrées pour les cinq huiles essentielles. Nous notons que nos huiles essentielles ayant des caractéristiques organoleptiques du même ordre et des propriétés en accord et comparables avec ceux donnés par la littérature et par la direction de normalisation (nouvelle direction aromatique) (**Tableau 23**).

Tableau 23 : Caractéristiques organoleptiques de notre étude et de littérature.

HE	Aspect	Couleur	Odeur	Références
<i>Pimpinella anisum</i>	Solide à 4°C	Jaune pâle	Semblable à celle de l'anis	Notre étude
		Incolore à jaune pâle	Epicé, sucré	[222]
<i>Carum carvi</i>	Liquide	Jaune pâle	Semblable à celle du carvi	Notre étude
		Jaune	Aromatique épicé	[218]
		Jaune clair	Forte odeur anisée	[217]
<i>Coriandrum sativum</i>	Liquide	Jaune pâle	Semblable à celle du coriandre	Notre étude
		Jaune	Caractéristique de la coriandre	[221]
		Jaune clair	Caractéristique et semblable à celle de la coriandre	[210]
<i>Foeniculum vulgare</i>	Liquide	Jaune pâle	Semblable à celle du fenouil	Notre étude
		Incolore à jaune pâle	Caractéristique herbacée	[223]
		Limpide	Anisée	[221]
		Jaune pâle	Semblable à celle du cumin	Notre étude

<i>Cuminum cyminum</i>	Liquide	Jaune à jaune doré	Epicé très forte	[224]
		Jaune foncé	Peu agréable	[204]

➤ Composition chimique

➤ L'Huile essentielle de coriandre

Les résultats de la CG/SM de l'HE étudiée ont révélé que la quasi-totalité des constituants de l'huile essentielle des graines de *C.sativum* faisaient partie de la classe chimique des terpènes et des composés terpéniques représentés majoritairement par l'alcool monoterpénique, linalol avec 73,03% suivi de d'autres constituants minoritaires tels que ; α -terpineol, Endo-borneol et le L-camphor qui est un monoterpénone. (Figure 30).

Ces résultats ont été comparés à la composition chimique décrite dans la littérature (Tableau 24)^[209, 225]. Notre HE est en accord avec celles de la littérature, à quelques exceptions près. En effet, certains composés présents dans notre HE étaient absents de celle de Sourmagh *et al.*^[209], à l'image du thymol, l'estragol et l'Anéthol, d'autres étaient quant à eux, absents dans notre échantillon, α -pinène en est l'exemple. Ceci peut être expliqués par les facteurs climatiques, édaphiques et culturaux, mais d'une manière générale, les résultats de la composition chimique trouvés pour l'échantillon étudié sont semblables et correspondent à ceux rapportés dans la littérature.

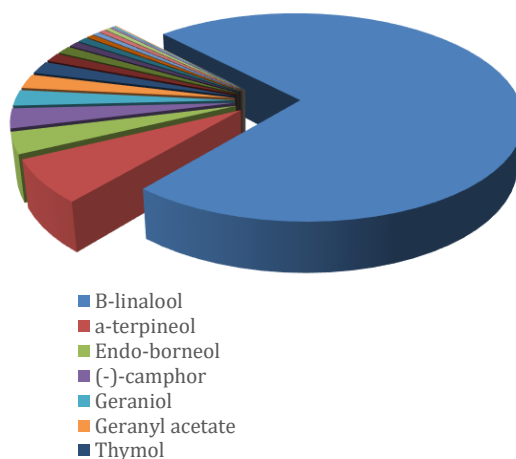


Figure 30 : Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de coriandre.

➤ L'HE de carvi

Les résultats de la CG/SM de l'huile essentielle des graines de *C.carvi* ont révélé deux principaux composés, la Carvone avec 51,83% suivi du limonène avec 47,12%. D'autres

constituants mineurs ont été notés tels que (Limonene oxide, cis- et Trans-p-mentha-2,8-dienol) (**Figure 31**).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Laribi *et al.*^[218] et Ben-khalifa *et al.*^[226] qui ont noté que la Carvone et le limonène représentaient la principale proportion d'environ 90% et 96% respectivement (**Tableau 24**).

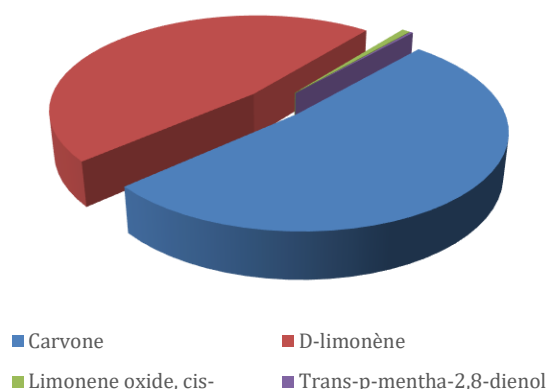


Figure 31 : Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de carvi.

➤ L'HE de cumin

Pour l'HE des graines de *C. cyminum*, les résultats ont montré que cette huile contenait le 2-methyl-3-phenylpropanal, comme composé majoritaire avec 50,26% (**Figure 32**). Les autres composés étaient présents à de faibles teneurs. Notre composé majoritaire est en accord avec celui trouvé dans l'HE des graines de cumin de Ben-khalifa *et al.*^[226]. Cependant les résultats de Jirovetz *et al.*^[227] n'ont pas été similaires avec les nôtres, en effet leur HE présentait le Cuminaldéhyde comme composé majoritaire. Ceci peut être expliqué par les facteurs climatiques et environnementaux, ainsi qu' à la situation géographique, puisque nos graines et ceux de Ben-khalifa^[226] sont d'origine du nord d'Afrique quant à ceux de Jirovetz^[227] sont de Bulgarie.

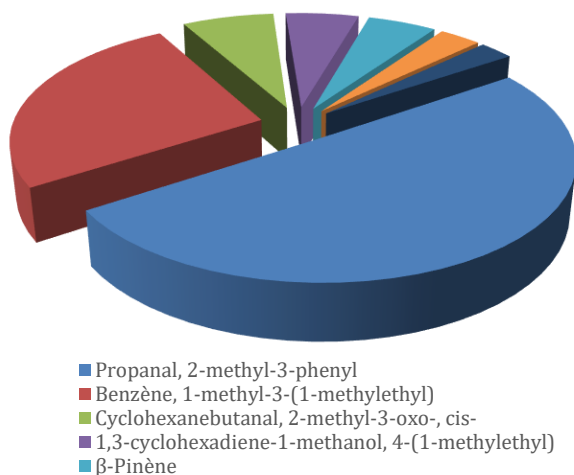


Figure 32 : Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de cumin.

➤ L'HE de fenouil

Une étude a été réalisée par Barazani *et al.*^[228] sur l'HE des graines de fenouil de différentes populations. Ils ont trouvé trois chémotypes : HE de certaines populations contient principalement de l'estragole (comme le cas de notre HE), d'autres le trans-Anéthol ou bien un mélange des deux composés ($\approx 50\%$ et 30%).

Zoubiri *et al.*^[229] ont trouvé que l'HE des graines de fenouil cultivées à Sétif (Est d'Algérie) contenait principalement le trans-Anéthol (72,86%) contre (3,41%) d'estragole. Contrairement à notre HE qui est constituée de (77,12%) d'estragole contre (3,47%) d'Anéthol (**Figure 33**).

Anastasopoulou *et al.*^[230] et Yaacoub et Tlidjane^[231] ont aussi trouvé l'Estragole comme étant le principal composé de l'HE de graines de fenouil.

Cependant, basé sur des données disponibles. « The European Committee for Herbal Medicinal Products (HMPC) » a conclu que de fortes concentrations d'Estragole sont des carcinogènes génotoxiques. En raison du rapport, « The Committee of experts on flavouring substances » a recommandé une dose d'Estragole limite de 0,05mg/kg.^[230]

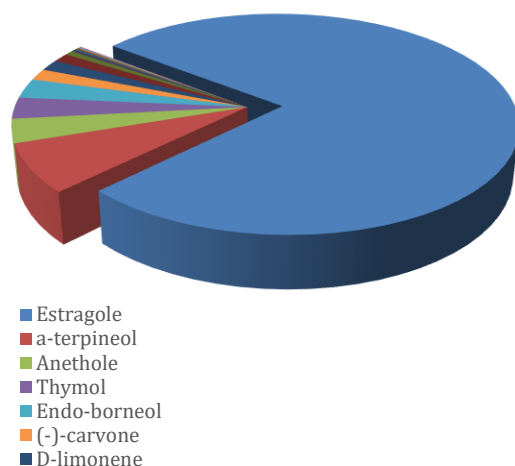


Figure 33 : Diagramme à secteurs représentant la composition chimique majoritaire de l'HE de fenouil.

➤ L'HE d'anis

Le principal constituant de notre HE des graines de *P.anisum* s'est avéré être l'Anéthol, résultat en accord avec celui de Ullah *et al.*^[232] et Singh *et al.*^[233]. L'Anéthol est considéré comme le constituant le plus important en raison de ses activités spasmolytiques et expectorantes, stimulant les sécrétions respiratoires, alors qu'il s'agit d'un agent œstrogénique et anesthésique local^[234].

Tableau 24 : Composés majoritaires de nos HEs comparé à la littérature.

HE	Composés majoritaires	Références
Anis	Anéthol	Notre étude
	Trans-Anéthol	[232]
	Trans-Anéthol	[233]
Carvi	Carvone et d-limonène	Notre étude
	Carvone et limonène	[218]
	Carvone et d-limonène	[226]
Coriandre	B-Linalol	Notre étude
	Linalol	[209]
	Linalol	[225]
Fenouil	Estragole	Notre étude
	Estragole	[230]
	Estragole	[231]
Cumin	Propanal, 2-methyl-3phenyl	Notre étude
	Propanal, 2-methyl-3phenyl	[226]
	Cuminaldehyde	[227]

Xanthine oxydase

➤ Rendement

Nous avons remarqué que le rendement moyen de l'extrait enzymatique obtenu à partir du lait humain était environ deux fois supérieur à celui de l'extrait enzymatique obtenu du lait bovin, mais, en parallèle, une activité enzymatique plus faible.

En effet, cette faible activité était déjà évaluée dans plusieurs expériences^[110, 112, 113], qui ont indiqué que moins de 2% de l'enzyme humaine était présente sous forme active contre 40% de forme active pour l'enzyme bovine. Cela résulte de la présence de formes inactives démolybdo et désulfo (déjà mentionner dans la revue bibliographique : partie Xanthine oxydase, p30). Selon Abadeh *et al.*^[112] la cause de ces formes inactives est intrinsèque et non une conséquence de la procédure d'isolement.

II. Inhibition de la Xanthine oxydase

Des expériences sur l'inhibition de la XO ont été menées depuis longtemps par différents groupes de chercheurs utilisant deux méthodes, la méthode spectrophotométrique mesurant la quantité d'acide urique libérée à 292 nm^[235] et la méthode HPLC mesurant le même produit^[236].

La première méthode est moins sensible lorsque nous utilisons des inhibiteurs à cycles aromatiques car ils absorbent à la même longueur d'onde et interfèrent alors avec les résultats.

La deuxième méthode est efficace et précise, mais prend beaucoup de temps.

Dans cette thèse, nous utilisons pour la première fois une nouvelle approche pour mesurer l'acide urique. D'une façon générale, cette approche est basée sur la transformation de l'acide urique libéré en un produit coloré détecté par la méthode spectrophotométrique.

➤ Huiles essentielles

Les résultats obtenus représentent une activité intéressante des huiles essentielles utilisées sur les deux sources de XO. Il a été observé que les changements variaient d'une à trois fois plus grand que le maximum entre les valeurs d'inhibition pour la XOH et la XOB. Les HE dans la XOH ont montré les IC₅₀ les plus faibles.

Nous supposons que ces HE pourraient avoir plus d'affinité pour l'enzyme humaine qu'à l'enzyme bovine, ceci pourra s'expliquer par la nature et l'origine de la source et son effet sur la structure génétique. Bien que ce changement de structure génétique n'ait pas eu d'incidence très significative sur l'inhibition entre les deux sources.

Nous n'avons pas pu discuter nos résultats avec d'autres recherches dans la littérature par manque d'études similaires à la nôtre, seule la plus proche a été réalisée par un groupe de chercheurs taïwanais lors d'une tentative d'inhibition de la XO par l'huile essentielle de feuilles de *C. osmophloeum* qui a présenté une activité d'inhibition avec un IC_{50} de 16,3 $\mu\text{g/ml}$ ^[237]. Une autre étude réalisée par Bahadori *et al.*^[238] en utilisant l'HE des parties aériennes de *S.spinosa* a présenté une activité d' IC_{50} de 38,7 $\mu\text{g/ml}$.^[238]

Ces valeurs sont nettement supérieures aux nôtres, en effet, toutes nos HE ont présenté une activité inhibitrice avec des IC_{50} inférieurs à 11 $\mu\text{g/ml}$.

Par contre, Mosbah *et al.*^[239] ont testé l'effet inhibiteur de l'HE de *Rhaponticum acaule* et ont trouvé une activité inhibitrice intéressante d'une valeur d' IC_{50} 2,20 $\mu\text{g/ml}$.

➤ Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les résultats obtenus montrent que tous les médicaments AINS testés présentaient des niveaux variables d'activité contre la XOH et XOB. L'inhibition est assez extraordinaire à de très faibles concentrations. En particulier l'indométacine, ayant une valeur d' IC_{50} de 0,96 $\mu\text{g/ml}$ pour la XOB et 0,29 $\mu\text{g/ml}$ pour la XOH, toutes les deux inférieures à celle de l'allopurinol (2,72 $\pm$ 0,64 $\mu\text{g/ml}$). Cela pourrait faire de lui un puissant candidat en tant qu'inhibiteur de la XO. Et puisque son activité inhibitrice est supérieure à celle de l'allopurinol, nous pouvons postuler que ses effets secondaires possibles seraient moindres par rapport aux effets connus de l'allopurinol en raison de son efficacité à une concentration relativement faible.

Nous aurons voulu discuter nos résultats avec d'autres études de la littérature mais en raison des données non disponibles pour l'inhibition de la XO par les AINS cela nous a été difficile. Alors, nous nous sommes contentés de les discuter avec des études réalisées avec d'autres composés purs. Le premier a montré que l'acide ursolique a un IC_{50} de 10,3 $\mu\text{g/ml}$ ^[240] et la S-allyl cystéine avec une IC_{50} de 33 $\mu\text{g/ml}$ rapportée par Johnson *et al.*^[241]. Une autre étude a été réalisée par un groupe de chercheurs brésiliens. Les résultats montrent des valeurs d' IC_{50} de 88,33 $\mu\text{g/ml}$, 79,865 $\mu\text{g/ml}$, 119,765 $\mu\text{g/ml}$ et 155,55 $\mu\text{g/ml}$ pour le décanoate de naringine, l'octanoate de naringine, le décanoate de naringine et l'héspéridine, respectivement ^[242].

➤ Les complexes de lanthanides (III)

De nombreuses études ont suscité beaucoup d'intérêt aux métaux de terres rares et ont rapporté la présence d'activité biologique des complexes de ces métaux (tel que les ions lanthanides) avec des dérivés de la coumarine^[243, 244]. La recherche montre que les activités biologiques des ligands sont augmentées par la complexité de la formation des métaux.^[245]

La relation entre l'inhibition enzymatique et d'autres effets thérapeutiques n'est pas toujours significative, mais afin de révéler les effets biologiques potentiels d'une nouvelle molécule, les activités biologiques telles que les activités antitumorales sont fréquemment publiées avec des résultats d'interaction entre les molécules d'essai et les enzymes.^[246, 247]

C'est dans cette optique que l'effet inhibiteur des complexes organométalliques sur l'activité de la XO du lait bovin a été évalué. Rappelons que ces complexes ont déjà fait l'objet d'études par Kostova *et al.*^[12-14], dans lesquelles ils ont rapporté qu'ils avaient une activité antitumorale importante contre deux lignés cellulaires humaines (cas de la leucémie), ainsi qu'une action anticoagulante intéressante. Les complexes testés dans notre étude ont également montré dans les mêmes études de Kostova *et al.*, qu'ils auraient un faible potentiel cytotoxique.

Nos résultats d'inhibition ont montré que tous les complexes organométalliques inhibent de manière modérée l'activité de la XOB, avec des valeurs d'IC₅₀ allant de 7,85 µg/ml jusqu'à 14,49 µg/ml (**Tableau 19**) avec les trois meilleurs inhibiteurs potentiels ; Nd3, Ce2 et La5. Cependant, nous n'avons pas pu trouver d'études similaires sur l'inhibition de la XO avec ces complexes. Ce qui confirme l'originalité de notre travail et aucune étude préalable dans ce contexte n'a été réalisé.

Toutefois, nous citons ici quelques-unes basées sur l'inhibition de la XO avec d'autres complexes métalliques, comme dans l'étude d'Özerkan et coll.^[247] où ils ont rapporté la synthèse et l'évaluation de nouveaux complexes de palladium (II) avec des thiosemicarbazones tétradentées. Deux composés ont montré une inhibition intéressante de la XO avec des IC₅₀ de 0,4 et 0,7 µg/ml, meilleures valeurs que l'allopurinol témoin.

Autres complexes résultant de la combinaison d'acide férulique, un inhibiteur connu de XO, et de 3-aminopyrazole, une molécule aux effets anti-inflammatoires, et de cuivre/ zinc ont été préparés par Li *et al.*^[246] Ces deux composés ont présenté des effets inhibiteurs de XO, avec de meilleurs résultats observés pour le complexe de cuivre. De plus, des études chez des souris

modèles d'hyperuricémie ont révélé que les taux élevés d'acide urique dans le sang pouvaient être diminués par les deux complexes (10 mg / kg, injectés par voie intrapéritonéale) et que leur effet est similaire à celui observé avec le febuxostat.

Discussion IN SILICO

Dans cette section nous discutons le mode d'interaction des différents inhibiteurs avec le site actif des deux sources d'enzymes de xanthine oxydase.

I. Huiles essentielles (composés majoritaires)

➤ **L'Anéthol**, ou le (E)-1-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl) benzène (**Figure 34**).

Selon les résultats du docking moléculaire avec la xanthine oxydase bovine (XOB), l'Anéthol est lié sur la partie extérieure du site actif (**Figure 34**), à un taux de répétition égale à 66% et une valeur d'énergie significative (**Tableau 20**).

En revanche, dans le cas de la xanthine oxydase humaine (XOH), sa liaison avec le site actif est meilleure avec un taux de répétition plus important à 88% (**Tableau 20**), mais avec une valeur d'énergie faible.

Nous pourrions alors dire que l'Anéthol est plus stable dans le cas de la XOB mais avec un minimum d'affinité, et moins stable dans le cas de la XOH mais avec une grande affinité. Ces résultats sont notamment influencés par trois facteurs essentiels ;

- Le mode d'orientation préféré de l'Anéthol,
- Le poids moléculaire,
- La composition en acides aminés dans les deux sites actifs.

En effet, dans le cas de la XOB, le tunnel du site actif est composé de plusieurs acides aminés hydrophobes tel que : Ala910, Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1078, et Ala1079, six (06) de ces acides aminés composent le site catalytique dans l'enzyme bovine, et un total de dix (10) interactions hydrophobes sont formés avec ces derniers. L'Ala910, Ala1079, Leu1014, et Val1011 ont formé une seule interaction hydrophobe, tandis que Phe914, Ala1078, et Phe1009 ont formé au minimum deux (02) interactions hydrophobes avec la fonction ester et le noyau benzène de l'Anéthol, Thr1010, quant à lui, est le seule acide aminé hydrophile dans ce groupe avec deux (02) importantes interactions hydrophiles avec la fonction ester. Cette dernière est la plus réactive avec six (06) différentes interactions. D'un autre côté, la masse moléculaire de l'Anéthol est légèrement faible avec 148,08 g/mol, ce facteur est très important lors du docking moléculaire, car plus la molécule est petite plus la possibilité des poses augmente avec respect au groupement fonctionnel. En effet, la meilleure pose de l'Anéthol était attirée par la triade catalytique Ala910, Ala1078, et Ala1079, d'un côté vue sa localisation au début du site catalytique, et l'électronégativité élaborée par le noyau benzène de l'autre côté, finalement l'Anéthol est inséré horizontalement dans le site actif ce qui explique sa meilleure valeur

d'énergie par rapport à son taux de répétition obtenu, cela prouve sa stabilité au sein de site actif de XOB.

Dans le cas de XOH, la composition du site catalytique est différente d'un point de vue polarité, puisqu'il est composé essentiellement par des acides aminés hydrophiles tel que : Glu1262, Arg881, Gln768, et Arg913. Ce dernier intervient dans le site catalytique et forme deux (02) interactions de type hydrophobe et électrostatique, en outre le noyau benzène a formé trois (03) autres interactions hydrophobes avec Met1039, Phe799, et Cys150, ce dernier a formé deux (02) importantes interactions de type sulfure et carbone-hydrogène avec la fonction ester et le noyau benzène, en totale, une seule interaction hydrogène est obtenu. Contrairement à la XOB, les interactions enregistrées étaient avec des acides aminés polaires et apolaires, ce qui explique l'affinité de l'Anéthol vers le site actif polaire et apolaire. Cela ne peut pas garantir sa stabilité, en raison de l'absence de certains acides aminés apolaires qui favorisent plus d'interactions et donc plus de stabilité.

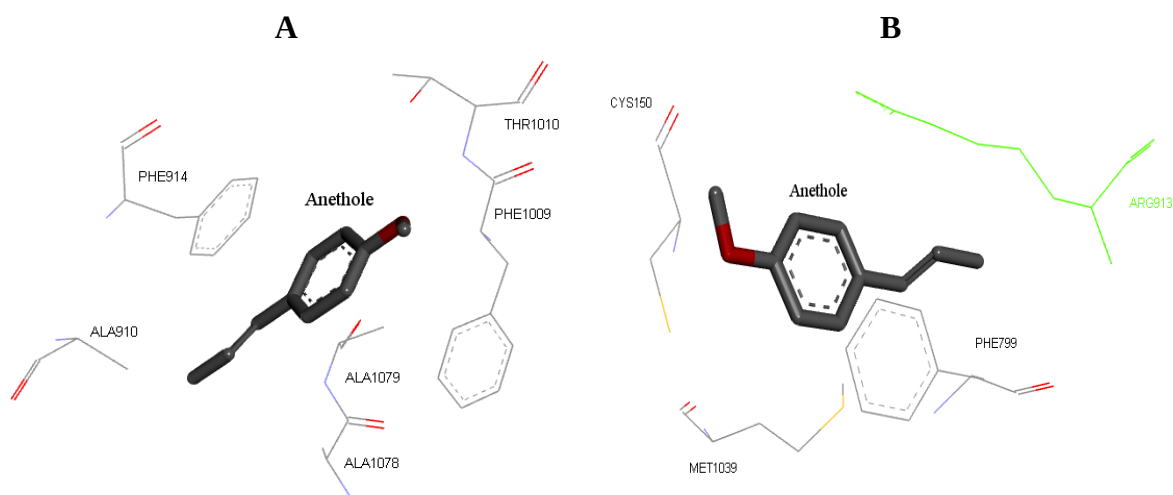


Figure 34 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de l'Anéthol avec la XOB (A) et XOH (B).

➤ **La Carvone** ou 2-méthyl-5-(prop-1-en-2-yl) cyclohex-2-en-1-one (**Figure 35**).

Selon le docking moléculaire avec la XOB. La Carvone est liée au début du site catalytique (**Figure 35**) avec un taux de répétition égale à 66 % (**Tableau 20**) et avec une valeur d'énergie significative (**Tableau 20**).

D'autre part, dans le cas de la XOH, le ligand a enregistré le meilleur taux de répétition de 100 % (**Tableau 20**), mais avec une valeur d'énergie relativement faible.

La Carvone semble être similaire à l'Anéthol en terme de stabilité et affinité. En effet, les deux inhibiteurs sont plus stables dans le cas de XOB, mais avec un minimum d'affinité, par contre, moins stable dans le cas la XOH, et avec une grande affinité.

La Carvone est également influencée par les trois facteurs déjà décrit dans la section de l'Anéthol tel que ; le mode d'orientation préféré, le poids moléculaire, et la composition en acides aminés des deux sites actifs.

Dans le cas de la XOB, le tunnel du site actif qui représente la rentrée vers le site catalytique est de nature hydrophobe due à sa composition en acides aminés hydrophobes tel que ; Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, et Ala1079, ce dernier avec Ala914, Ala1078, et Phe1009 composent le site catalytique dans la XOB. L'acide aminé Phe1009 étant le plus réactif avec trois (03) interactions hydrophobes par son cycle aromatique en raison de sa localisation face au cycle de Carvone, suivi par le Phe914 avec deux (02) interactions hydrophobes établis entre son cycle aromatique et le cycle de Carvone, quant à la Leu1014 et Ala1079, ont aussi enregistré deux (02) interactions pour chacune avec une importante interaction hydrogène entre la fonction cétone et l'Ala1079. La Val1011 a enregistré une seule interaction hydrophobe, en totale dix (10) interactions hydrophobes sont obtenues.

Ces acides aminés avec le Phe1009, sont responsables en grande partie du taux de répétition obtenu, car la structure du Carvone est simple en terme de groupement fonctionnel et de faible masse (~150 g/mol) dans ce cas l'effet d'encombrement stérique est négligeable, la polarité de Carvone joue pareillement un rôle important, car il est apolaire, finalement la Carvone est gravité vers la partie apolaire de site actif, supportée par plusieurs interactions hydrophobes et hydrogènes ce qui assure son affinité qui est prouvée par sa valeur d'énergie.

Cependant, dans le cas de la XOH, la composition et la polarité du site catalytique sont différentes, le tunnel du site actif est peu apolaire et est composé essentiellement de méthionine, cystéine, et phénylalanine tandis que le site catalytique est composé de l'Arg881, Gln768, Arg913, et Glu1262 ces deux derniers participent dans deux (02) interactions de type hydrophobes et carbone-hydrogène, de plus, le cyclohexane du Carvone a formé encore trois (03) interactions hydrophobes comme dans le cas de l'Anéthol avec Met1039, Cys150, et Phe799 ce dernier a enregistré trois (03) interactions importantes.

Ces données prouvent la grande similarité entre la Carvone et l'Anéthol, tout deux partageant presque les mêmes propriétés physico-chimiques, finalement, y'avais moins d'interactions enregistrées avec les acides aminés polaires et apolaires, contrairement à la XOB, ceci explique le taux de répétition enregistré (**Tableau 20**) qui traduit sa grande affinité, mais avec une

stabilité influencée par l'absence de milieu apolaire vue sa nature hydrophobe comme le cas de la XOB.

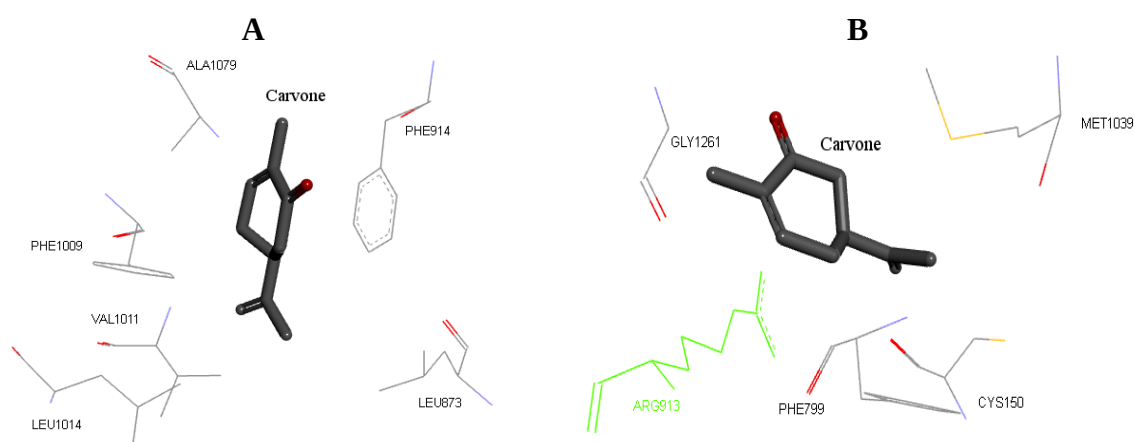


Figure 35 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de la Carvone avec la XOB (A) et XOH (B).

➤ **Le D-limonène** ou 1-méthyl-4-(prop-1-en-2-yl) cyclohex-1-ene (**Figure 36**).

Selon le docking moléculaire dans le cas de la XOB, le D-limonène est trouvé lié au milieu du site catalytique (**Figure 36**) avec un taux de répétition égale à 90 % et une valeur d'énergie convenable (**Tableau 20**). En revanche, dans le cas de la XOH toutes les poses possibles du docking ont été trouvées dans le site actif (**Tableau 20**), pourtant, sa valeur d'énergie est parmi les plus faible dans cette étude, pour cette raison l'affinité et la stabilité peuvent être meilleures dans XOB. Dans ce cas, le D-limonène est trouvé en face des acides aminés catalytiques hydrophobes, tous ces atomes ont réagi avec au moins une interaction hydrophobe, Phe1009 et Phe914 ont enregistré six (06) interactions chacun avec leurs fonctions alkyles. Ala1079 et Leu1014 ont participé dans quatre (04) interactions avec les différentes fonctions alkyle. Ala1078, Val1011 et Leu873 ont participé dans une seule interaction. Toutes les interactions obtenues étaient hydrophobes. Vu sa faible polarité, le D-limonène est attiré par la région hydrophobe du site actif qui est couvert par quatre (04) acides aminés catalytiques, par conséquent treize (13) interactions apolaires sont obtenues. Donc la meilleure orientation du D-limonène est influencée essentiellement par la polarité, nous notons que le site actif de XOB est composé d'une partie polaire et apolaire ce qui explique la valeur du taux de répétition obtenu. Eventuellement, sa stabilité est logique, car la structure du D-limonène est pauvre en groupements fonctionnels comme les fonctions hydroxyle et carboxyle, donc une association avec d'autres terpénoïdes qui se trouvent naturellement avec le D-limonène comme la Carvone

est possible. Nous pensons que cette association peut en effet améliorer son affinité, et même sa stabilité.

Dans le cas de la XOH, le D-limonène est situé en face de l'Arg913 avec deux (02) interactions hydrophobes dans le site catalytique, entouré par trois (03) autres acides aminés tel que Cys150, Met1039, et Phe799, qui semblent indispensables. Ces derniers sont obtenus dans le cas de plusieurs molécules telles que l'Anéthol, la Carvone et le limonène avec Arg913, qui intervient toujours en tant que le seul acide aminé catalytique, le Phe799 est le plus réactif avec deux (02) interactions, la Cys150 et Met1039 ont enregistré une seule interaction chacun, la masse du limonène est très faible par rapport aux autres molécules (~136 g/mol), même avec les acides aminés qu'ils entourent, cette propriété reste le facteur majeur qui favorise son insertion au sein du site actif de la XOH avec 100 % de chance, contrairement à la XOB car la cavité de site actif est plus adéquate et favorable aux molécules de faible taille et de différents degrés de polarité mais l'inconvénient principal est d'un côté ; l'instabilité due au manque d'acides aminés (seulement 04 acides aminés), et de l'autre côté ; l'absence de groupements fonctionnels comme les fonctions hydroxyle et carboxyle, ces données éclaircissent la valeur d'énergie obtenue par le D-limonène.

Donc, une possible association avec d'autres terpénoïdes comme la Carvone reste toujours pratique dans la cavité de la XOH vue la faible masse des deux ligands, cette association peut augmenter la stabilité du D-limonène.

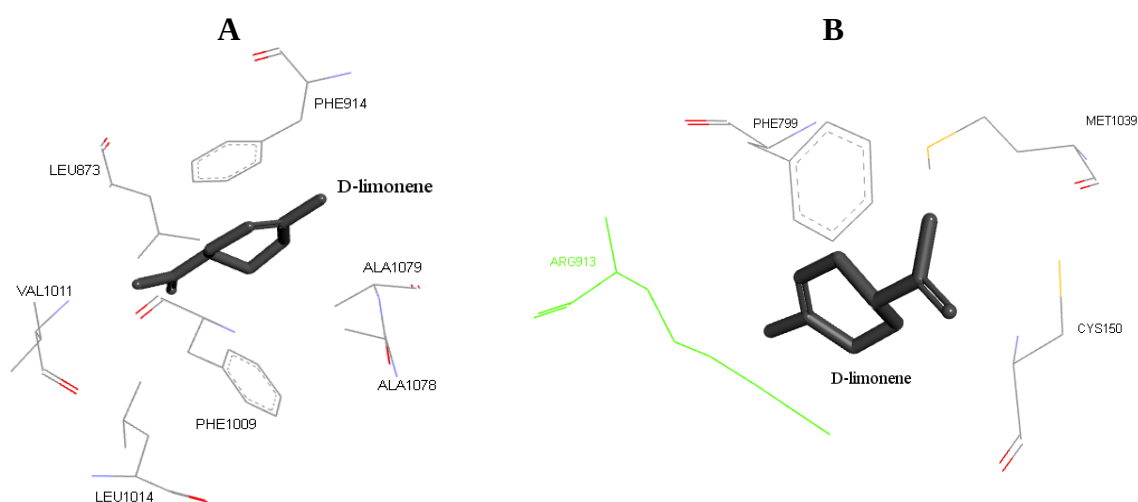


Figure 36 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du D-limonène avec la XOB (A) et XOH (B).

- **L'Estragol** ou 1-allyl-4-methoxybenzene de formule $C_{10}H_{12}O$, est l'isomère structural de l'Anéthol et le Cuminal (**Figure 37**).

Selon le docking moléculaire avec la XOB. L'Estragol est lié dans le site actif (**Figure 37**) avec un taux de répétition égale à 44 %, malgré sa valeur d'énergie significative (**Tableau 20**), le résultat enregistré est classé comme étant le plus faible dans cette étude, en outre, dans le cas de la XOH, la liaison de l'Estragol n'est pas la meilleure avec un taux de répétition de 52 %, et une valeur d'énergie faible (**Tableau 20**), donc l'Estragol est purement défavorable dans les deux cas du docking. Ces résultats sont obligatoirement influencés par le mode d'orientation préférée, le poids moléculaire, et la polarité dans les deux sites actifs, en plus de la rotation de la double liaison C_9-C_{11} . Malgré la propriété d'isomérisation structurale entre l'Estragol et l'Anéthol, les résultats obtenus expliquent l'inverse en vis-à-vis de l'affinité et la stabilité de ces derniers, la seule différence entre ces deux inhibiteurs, reste le mouvement de la double liaison simple C_3-C_9 en C_9-C_{11} .

Dans le cas de la XOB, l'Estragol est lié principalement avec Phe914, Phe1009, Val1011, Leu1014, Ala1078, et Ala1079. Ces derniers représentent d'un côté le tunnel hydrophobe et de l'autre côté, le site catalytique, l'inconvénient majeur, est que le tunnel du site actif est connu pour son hydrophobicité, pour cette raison que l'Estragol est trouvé bloquer au début du site catalytique face au Leu873 et Glu802. Ce dernier a noté une importante interaction rigide type carbone-hydrogène, on suggère que cette dernière est responsable de sa stabilité, traduit par sa valeur d'énergie la plus faible (**Tableau 20**), cette interaction est établie avec la fonction ester de l'Estragol. Deux (02) autres interactions sont faites avec ce dernier avec Ala1078 et Phe914, en plus, le cycle benzénique a enregistré quatre (04) interactions avec Ala1078, Ala1079, Phe914, et Phe1009. Le groupement butène quant à lui ; a enregistré trois (03) interactions avec Leu873, Leu1014, et Val1011, notant que ces interactions enregistrées sont hydrophobes, nous suggérons alors que ce groupement est responsable de l'affinité de l'Estragol au sein du site actif, en raison de la rotation de sa liaison C_9-C_{11} de 120° qui a entouré la molécule vers Glu802 créant ainsi une interaction rigide qui forcément conduit à bloqué l'Estragol face aux acides aminés hydrophobes, c'est pour cela que la plupart des poses ont été trouvées loin du site catalytique et face à la partie hydrophile hors site actif.

Dans le cas de la XOH, l'Estragol est influencé par les mêmes paramètres que la XOB. En plus de la rotation de la molécule entière de 180° vers le milieu polaire par son pôle hydrophile, qui est logique vu la composition en acides aminés polaires et apolaires favorisés par la cavité et le site catalytique, l'Estragol est lié avec des acides aminés hydrophiles qui sont le Met1039 et

Arg913 et hydrophobes qui sont le Phe799, Phe915 et Ala911. L'Arg913 avec Phe799 sont responsables de former quatre (04) interactions. Par conséquent cinq (05) interactions hydrophobes et une interaction sulfure ont été formé avec les différents groupements fonctionnels tel que la fonction ester et la fonction anisole. Le couple Ala911 et Phe915 ont réagi avec la double liaison C₉-C₁₁ et ont influencé l'orientation de l'Estragol au sein du site catalytique vers la partie apolaire car la distance en Å mesuré entre l'Met1039 et la fonction anisole sont élevées, en les comparant avec le même cas de l'Anéthol dans XOH, car ce sont des isomères structuraux et le Met1039 intervient dans les deux cas, finalement, après le docking seulement la moitié des poses avec cette conformation est trouvé au sein du site actif, et le reste des poses avec des conformations et des rotations différentes qui sont trouvées hors du site actif dans des régions plus ou moins apolaire, ce qui explique les résultats trouvés et prouve que l'Estragol ne représente pas l'exemple du ligand idéal pour la xanthine oxydase.

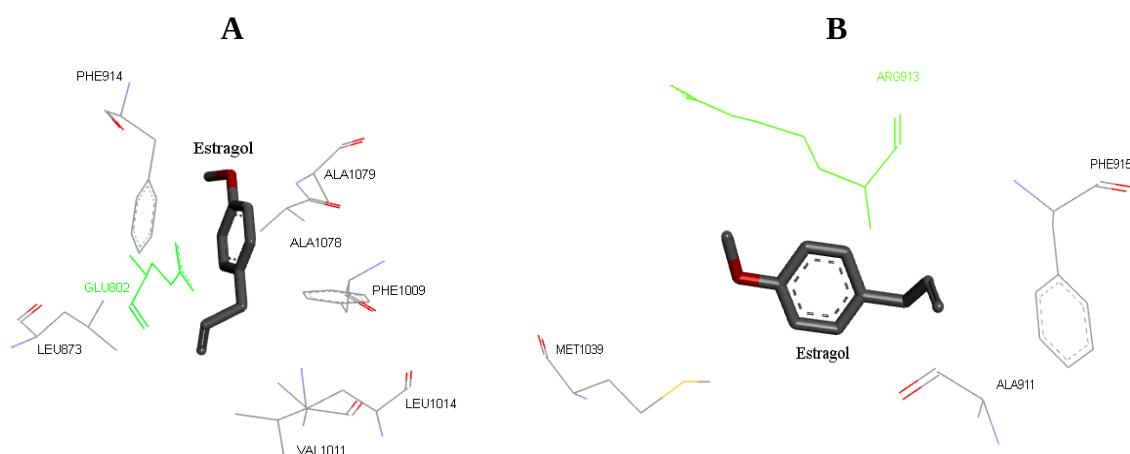


Figure 37 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de l'estragol avec la XOB (A) et XOH (B).

➤ le **Linalol** ou 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol (**Figure 38**).

Selon le docking moléculaire dans le cas de la XOB. Le Linalol est trouvé intégrer par sa queue hydrophobe à un taux de répétition égale à 52 % avec une valeur d'énergie faible (**Tableau 20**). Par contre, dans le cas de la XOH, le Linalol est trouvé intégrer par sa tête hydrophile à un taux de répétition égale à 66 % avec une valeur d'énergie faible (**Tableau 20**), nous pouvons dire que le Linalol est classé parmi les inhibiteurs défavorables dans les deux cas du docking. Sa structure est acyclique linéaire et insaturée issue des alcools terpéniques qui peuvent donner une grande flexibilité à sa chaîne alkyle tandis que sa tête hydroxyle peut attirer plusieurs acides aminés et donc s'impliquer dans différentes interactions, ces données fournies ne montrent pas une grande affinité ou stabilité au sein du site actif de XOB ou XOH, vue la structure du Linalol

qui est dépourvu d'un cycle aromatique et malgré la présence de l'atome d'oxygène qui favorise d'un côté, la formation d'un nuage électronique important et de l'autre côté, la flexibilité du groupement alkyle dans le cas de la XOB. La moitié des poses de Linalol ont été trouvées hors du site actif dans des régions aléatoires dans l'espace, quant à l'autre moitié, elle est intégrée au sein du site catalytique, mais en face de Ser1082 et forme alors une interaction hydrogène comme étant le plus proche acide aminé, le groupement alkyle était le contrôleur du mouvement du Linalol qui s'installe finalement face au Met1038 avec deux (02) interactions hydrophobes. Cette conformation exige à la partie hydrophile de faire une rotation de 90° vers le Ser1082 et Thr1083, nous suggérons que cette rotation est responsable de sa stabilité dans XOB car la Glu1261 peut créer une interaction rigide avec son groupement hydroxyle si la rotation était de 180°, ces informations montrent l'avantage des inhibiteurs à systèmes cycliques par rapport au non cyclique dans l'inhibition de la xanthine oxydase, pareillement, les autres interactions obtenues ont été avec Leu1042 et Thr1083. Par conséquent, trois (03) interactions hydrophobes et une interaction hydrogène ont été formées.

Dans le cas de la XOH, les modifications sur la structure du Linalol sont similaires, presque le tiers des poses ont été trouvées hors du site actif dans des régions aléatoires dans l'espace, et le reste des poses est intégré au sein du site catalytique en face de Gln768 qui forme la seule interaction hydrogène. Le groupement hydroxyle était le contrôleur du mouvement de Linalol contrairement à la XOB, en outre le groupement alkyle s'installe et se stabilise par Phe799 et Arg913, ce dernier a enregistré trois (03) interactions hydrophobes. La conformation du Linalol trouvée est la même qu'avec la XOB, dans ce cas la partie hydrophile a fait la même rotation de 90° mais vers la fonction cétone de Gln768 afin de trouver un atome électro-négatif, en outre, il a fait appel à d'autres acides aminés inattendus dans le site actif comme le Ala911, Ala1079, Ala1080, et Phe915 qui ont formé cinq (05) interactions hydrophobes. Nous suggérons que cette rotation est responsable de la diminution de la stabilité (-5,7 kcal/mol) du Linalol dans la XOH. Ces informations prouvent que le Linalol seul, peut être déstabilisé en raison du mouvement de ces extrémités très flexibles au sein de la xanthine oxydase. Cependant, une possible association avec d'autres inhibiteurs cycliques peut soulever ce problème.

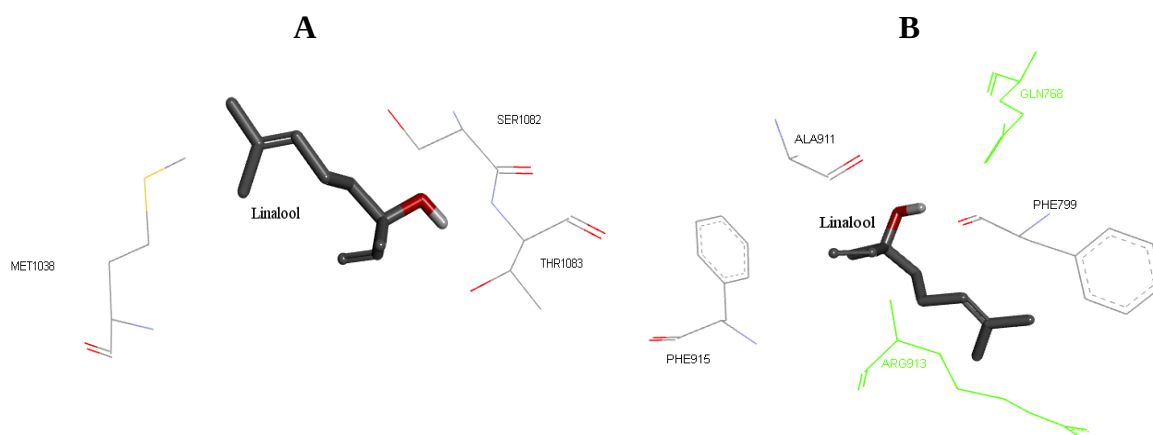


Figure 38 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Linalol avec la XOB (A) et XOH (B).

➤ **2-Methyl-3-phenylpropanal (Figure 39)** selon le docking moléculaire dans la XOB. Le 2-methyl-3-phenylpropanal est trouvé intégré entièrement au centre de site catalytique à un taux de répétition très faible à 46 % avec une valeur d'énergie assez faible (**Tableau 20**), par contre dans la XOH le 2-methyl-3-phenylpropanal est trouvé intégré au centre de site catalytique avec un taux de répétition fort à 88 %, mais avec une valeur d'énergie très faible (**Tableau 20**), alors le 2-methyl-3-phenylpropanal est classé parmi les inhibiteurs défavorables dans les deux cas de docking, sa structure est simple de très faible taille comme le cas de Linalol, la chaîne alkyle et la fonction cétone dans les deux extrémités peuvent favoriser une grande flexibilité, plusieurs types d'interactions vont se former, ces données fournies indiquent l'inverse dans le cas de XOB malgré les nombres d'interactions enregistrés, afin d'expliquer ces résultats nous avons concentré sur sa structure, car c'est le facteur principal, la plupart des poses ont été trouvées hors site actif dans des régions aléatoires dans l'espace, et le reste est intégré au sein du site catalytique face au groupement amine de Thr1010 et Arg913 et forme 2 interactions hydrogène, le groupement alkyle s'installe face au Phe914, Phe1009, Ala1078, et Ala1079 et forme 4 interactions hydrophobes, malgré la présence de l'atome de l'oxygène qui favorise un nuage électronique vers Thr1010 et Arg913 et la flexibilité élaborée par le groupement alkyle qui est liée avec tous les acides aminés catalytiques, une faible affinité et stabilité au sein du site actif est obtenue, la structure de 2-methyl-3-phenylpropanal est caractérisée par le pouvoir de se lier dans des milieux polaires et apolaires et de s'intégrer dans des sites actifs petits, ont suggéré que le 2-methyl-3-phenylpropanal peut se lier dans un autre site similaire dans la chaîne C de XOB cette liaison peut être due à sa flexibilité, finalement le 2-methyl-3-phenylpropanal peut être le mauvais modèle pour la XOB. Ces informations montrent l'inconvénient des

inhibiteurs à systèmes cycliques de faible taille dans l'inhibition de la xanthine oxydase. Dans le cas de XOH, la plupart des poses ont été trouvées dans la cavité catalytique, le groupement alkyle s'installer et se stabiliser face au Phe799 et Met1039, la minorité des poses ont trouvé hors cavité contrairement à la XOB, en outre, la fonction cétone est dévier vers l'Arg913 afin de former une interaction hydrogène, mais la chaîne alkyle est bloqué par le Phe799 et Met1039 ces deux derniers ont recordé 2 interactions hydrophobes chacun d'eux comme étant le nombre total d'interactions ce qui explique la faible stabilité obtenue (-2,7 kcal/mol). Ces informations prouvent que le 2-methyl-3-phenylpropanal seul se déstabiliser fortement dans la xanthine oxydase humaine, une possible association avec d'autres inhibiteurs cycliques comme le Cuminal peut améliorer sa stabilité.

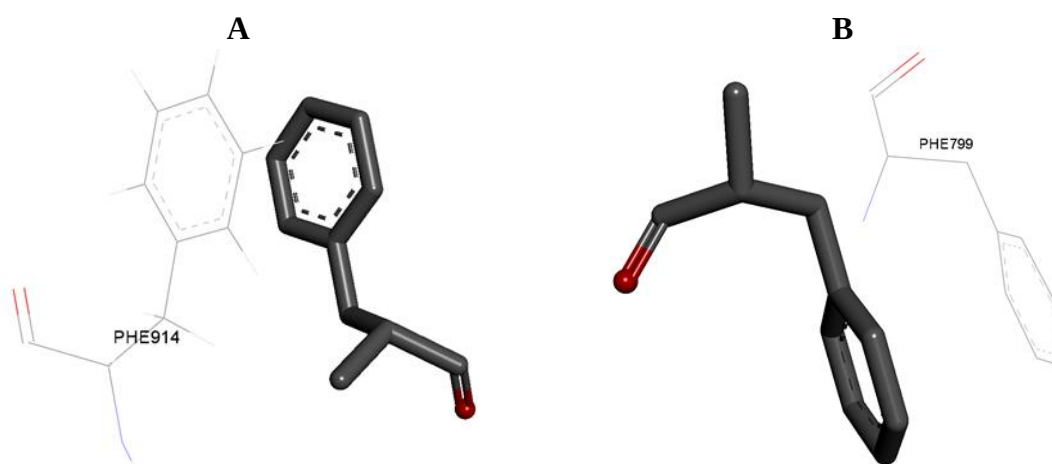


Figure 39 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du 2-methyl-3-phenylpropanal avec la XOB (A) et XOH (B).

➤ Résumé des composés majoritaires des huiles essentielles

En résumé le docking moléculaire des composés majoritaires des huiles essentielles qui sont ; l'Anéthol, la Carvone, le D-limonène, l'Estragol, le Linalol, et le 2-methyl-3-phenylpropanal présentent un effet modéré pour les deux sources de xanthine oxydase, ces derniers présentent des poids moléculaires faibles avec des fonctions biochimiques limitées par rapport aux autres inhibiteurs testés.

Dans le cas de la XOB, les inhibiteurs sont trouvés au sein du site actif et leurs modes d'action sont caractérisés par la fixation profonde dans le site catalytique en raison de leurs faible taille, et forment alors des interactions hydrophobes et hydrogènes. Le facteur commun entre ces derniers repose sur la polarité du site actif de la XOB, leur taux de répétition est toujours inférieur à 100 % à cause de la nature moyennement apolaire du site actif de la XOB.

Egalement, la minorité des atomes électronégatifs qui portent ces inhibiteurs les obligent à se lier dans des régions apolaires, ce qui explique leur faible taux de répétition. En revanche, Ils présentent une meilleure stabilité.

Il faut savoir que les acides aminés Val1011, Leu1014, Phe1009, et Phe914 sont notés indispensables dans toutes les interactions hydrophobes obtenues.

Dans le cas de la XOH, les inhibiteurs sont trouvés aussi au sein du site actif et leurs modes d'action sont caractérisés de la même façon que la XOB ; en se fixant profondément dans le site catalytique et formant ainsi des interactions hydrophobes et hydrogènes grâce à la polarité du site actif de la XOH. Leurs taux de répétition sont meilleurs par rapport à ceux enregistrés pour la XOB, et les acides aminés Cys150, Phe799, Met1039, et Arg913 sont notés indispensables dans toutes les interactions hydrophobes obtenues.

II. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

○ **L'Indométacine** ou l'acide 1-(4-chlorobenzoyl)-5-méthoxy-2-méthyl-1-H-indole-3-acétique (**Figure 40**) est trouvé lié dans la partie extérieure du site actif, selon les résultats du docking moléculaire. Son taux de répétition est de 52% dans la (XOB), tandis qu'il est à 98% dans la XOH (**Tableau 20**), ces résultats sont proportionnels avec les valeurs d'énergie en kcal/mol associées des deux enzymes. Plus le taux de répétition est important plus la valeur d'énergie la plus faible est importante mais avec des affinités différentes, par exemple, l'affinité de l'indométacine est grande dans XOH, cette grande différence entre ces deux résultats est expliquée après avoir analysé la structure des deux enzymes.

Pour la XOB, le site actif est composé d'une longue chaîne d'acides aminés apolaires situés dans la partie extérieure, ces acides aminés sont ; Ala910, Phe914, et Phe1009 et couvrent l'entrée du site actif, quant aux autres acides aminés (Glu802, Arg880, et Glu 1261), ils sont de type polaires et interviennent dans la partie intérieure en couvrant complètement le tunnel du site actif.

L'indométacine a formé quatorze (14) interactions dans le site actif du XOB, la partie majeure est trouvée liée avec son groupement indole à côté du site actif avec des acides aminés apolaires qui sont ; Leu648, Val1011, Leu1014, et Phe1013. Ces derniers ont formé dix (10) interactions de type hydrophobe, tandis que Asn768, Lys771, Asp872, et Ser876 ont formé quatre (04) liaisons hydrogènes avec les deux fonctions cétone et hydroxyle, la fonction chlorobenzène n'a réagi avec aucune liaison à cause de sa position pointée vers la partie extérieure éloignée de l'enzyme. Le groupement indole de l'indométacine est responsable de son orientation préférée dans le site actif de XOB qui est altéré par les acides aminés Leu648 et Leu 1014, qui influent

sur son taux de répétition et donc sur sa valeur d'énergie indiquant alors sa faible stabilité, mais il peut inhiber la XOB en bloquant son site de liaison.

De l'autre côté, le site actif de la XOH est composé d'une courte chaîne d'acides aminés polaires (Glu1262, Arg 913, Gln768, et Arg881) qui sont situés dans la partie intérieure du site actif. La cavité du site actif de la XOH est petite comparée à celle de la XOB, dans ce cas l'indométacine a formé onze (11) interactions hydrophobes et hydrogènes au niveau du site actif de la XOH et contrairement à la XOB, les interactions formées sont d'ordre équivalent entre les acides aminés polaires et apolaires (Arg913, Gln1041, Ser1083, Phe799, Phe915, Ala1080, Ala1079) avec le groupement chlorobenzène.

Tandis que le groupement indole a formé deux (02) interactions hydrophobes avec Met1039 par son cycle benzénique et hydrogène avec Ser1083 par son groupement hydroxyle, en outre les deux fonctions cétone et hydroxyle qui représentent le groupement carboxyle de l'indométacine n'ont réagi avec aucune interaction, et l'orientation préférée par l'indométacine dans le cas du site actif de la XOH est plus stable, cela est due principalement aux acides aminés Phe915, Ala1080, et Ala1079 qui sont responsables de la plupart des interactions et du taux de répétition enregistré (**Tableau 20**) et donc de la valeur d'énergie. Pour conclure, nous pourrions dire que l'indométacine pourrait être un excellent inhibiteur pour la XOH.

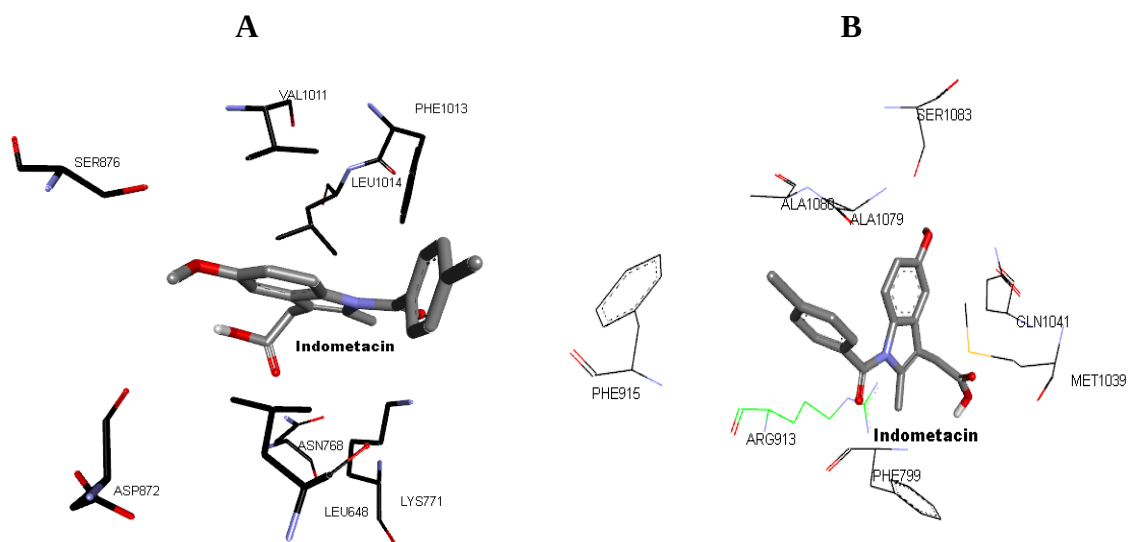


Figure 40 : Les acides aminés impliqués dans les interactions de l'indométacine avec XOB (A) et XOH (B).

○ **Celecoxib** ; est le 4 [5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluorméthyl)-1 H-pyrazol-1 Yl] benzolsulfonamid (**Figure 41**). Selon le docking moléculaire avec la XOB, le celecoxib est trouvé lier dans la partie extérieure du site actif (**Figure 41**) à un taux de répétition de 78% et avec une valeur d'énergie intéressante (**Tableau 20**). Alors qu'avec la XOH sa liaison avec le

site actif est diminuée avec un taux de répétition plus faible (**Tableau 20**), ces résultats sont expliqués par le mode d'orientation préférée par le celecoxib dans les deux cas du docking moléculaire.

Dans le premier cas (XOB) ; la totalité de l'inhibiteur a été trouvée amarrer en prenant la forme d'une lettre Y. La fonction 3-(trifluoromethyls)-1 H-pyrazole est la partie « leader » et dominante grâce à son grand nuage électronique qu'elle présente, cette dernière a enregistré huit (08) interactions de type hydrophobes avec les acides aminés apolaires Leu648, Leu873, Leu1014, et Val1011. Egalement, nous avons aussi noté une importante interaction halogène entre la fonction cétone de Glu802 (l'un des acides aminés catalytiques de la XOB) et l'atome fluore du celecoxib. Cette interaction reflète la grande stabilité du celecoxib avec la XOB et explique aussi la valeur d'énergie obtenue (**Tableau 20**). Quant aux restes des interactions trouvées, elles sont enregistrées avec Pro1076 et Lys771 avec la fonction 4-(4-methylbenzyl) benzène-sulfamide qui représente la partie non réactive en terme d'interaction et affinité. Le même résultat est trouvé pour la XOH ; où le celecoxib a été introduit avec la forme Y mais inséré plus profondément. Sa fonction 3-(trifluoromethyls)-1 H-pyrazole a enregistré qu'une seule interaction hydrophobe de type alkyle avec Val1260. Les autres interactions sont de type hydrogène-hydrogène, carbone-hydrogène, et oxygène-halogène, et la fonction 4-(4-methylbenzyl) benzène-sulfamide a enregistré cinq (05) différentes interactions de type sulfure avec Met1039 et trois (03) interactions hydrophobes avec Phe799 et une importante interaction avec l'acide aminé catalytique Arg913 contrairement à la XOB. Cette dernière fonction est plus réactive dans le cas de XOH et prouve que le celecoxib a été docker profondément, elle explique aussi la valeur d'énergie stable enregistrée de la XOH (**Tableau 20**), par contre, son taux de répétition obtenu est l'un des plus faibles pourcentages trouvés, cela peut être expliqué par l'absence de l'acide aminée leucine dans la cavité du XOH, en effet, c'est un acide aminé indispensable pour fixer celecoxib au sein du site actif et assurer son affinité grâce à la fonction 3-(trifluoromethyls)-1 H-pyrazole. Pour conclure, nous dirons que le celecoxib est stable mais avec une affinité moins importante sa chance à se lier dans le site actif est de 50%.

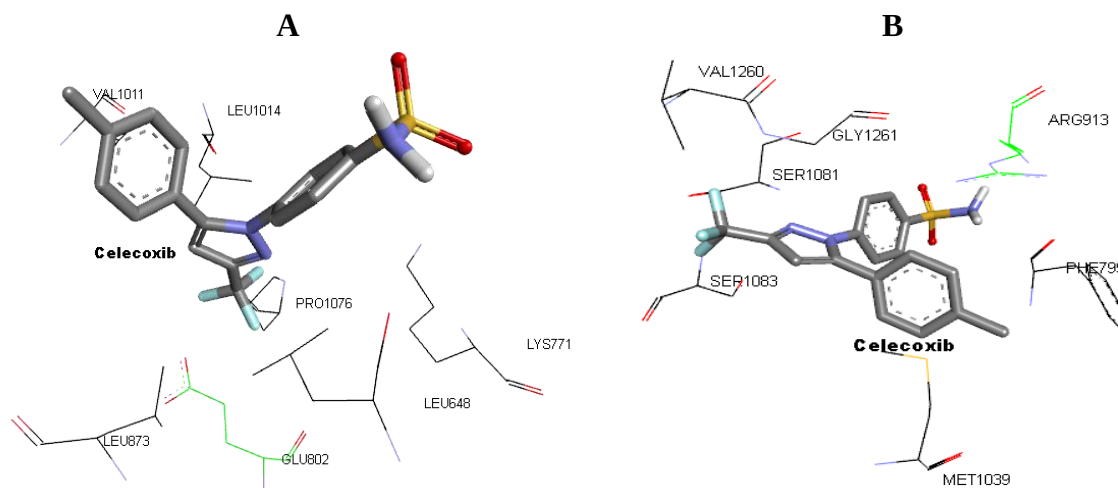


Figure 41 : Les acides aminés impliqués dans des interactions du Celecoxib avec la XOB (A) et XOH (B).

○ **Diclofénac sodique** ou le sodium 2,6-dichlorophenyl amino phényle acétate (**Figure 42**). Selon le docking moléculaire dans la XOB, le diclofénac sodique est trouvé lié avec un taux de répétition intéressant égale à 92% (**Tableau 20**). La majorité de sa structure s'est retrouvée au sein du site actif tandis que sa fonction carboxylique est retrouvée dans le milieu extérieur, avec une valeur d'énergie relativement élevée (**Tableau 20**) par rapport aux autres inhibiteurs testée.

Tandis que pour la XOH, le diclofénac sodique s'est trouvé entièrement entouré dans la cavité par les acides aminés catalytiques formant ainsi plusieurs et différentes interactions, présentant alors un taux de répétition optimale de 100% (**Figure 42**), avec une valeur d'énergie satisfaisante. Ces résultats sont influencés essentiellement par le patrimoine génétique des deux enzymes. En effet, dans les deux cas du docking moléculaire, le diclofénac est introduit au sein du site actif par la même façon et avec une conformation relativement similaire en terme de rotation et degré de liaison en faveur de la fonction 1,3-dichlorobenzene qui est plus réactif dans la XOB. Pareillement, la nature du site actif des deux enzymes est différente en terme de polarité. Cette dernière propriété est plus importante dans le cas de la XOH. La complexité et le poids moléculaire du diclofénac n'ont pas influencé sur ces résultats car le nombre d'atomes qu'il compose est inférieure à 400 atomes, paramètre qui respecte la loi de Lipinski.

Dans le cas de XOB, la structure de l'inhibiteur est lié avec Leu648, Leu873, Leu1014, Pro1076, et Val1011 en formant dix (10) interactions hydrophobes avec le 1,3-dichlorobenzene, par contre, une seule interaction s'est trouvée avec le sodium 2-(2-(méthylamino) phényle) acétate avec Leu648, ceci prouve que le diclofénac est bloqué à l'entrée du site actif, dans le cas de XOB et pour les inhibiteurs à système cyclique liés à des atomes halogènes, la présence

de ces acides aminés hydrophobes, diminue la possibilité a inhibé l'enzyme, dans ce cas, la seule façon efficace pour l'inhibition de l'activité de la XOB est par le blocage du site actif, ceci explique la valeur d'énergie enregistrée.

Pour la XOH, la structure de l'inhibiteur se trouve lié avec le Phe799, Met1039, Glu1262, et Arg913 en formant cinq (05) interactions hydrophobes avec le 1,3-dichlorobenzène. Contrairement à la XOB, plusieurs interactions de type sulfure, et hydrogène ont été observées avec le sodium 2-(2-(méthylamino) phényle) acétate avec Cys150, Gly1261, et Gln1195, en plus deux acides aminés catalytiques (l'Arg913 et Glu1262) qui ont participé dans ces interactions. Ceci justifierait l'introduction totale du diclofénac sodique au sein du site actif, augmentant et assurant ainsi son affinité. Finalement, pour les inhibiteurs à système cyclique liés à des atomes halogènes, la présence de ces acides aminés hydrophiles dans le cas de XOH augmenterait la possibilité d'inhiber l'enzyme XOH irréversiblement.

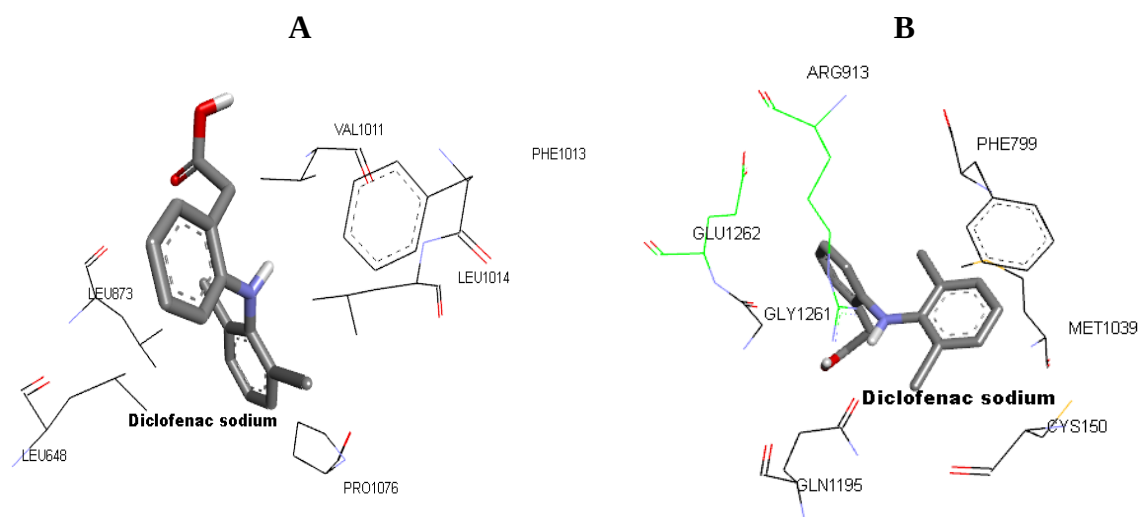


Figure 42 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Diclofénac sodique avec la XOB (A) et XOH (B).

○ **Naproxène sodique ;** ou sodium (S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoate (**Figure 43**). Selon les résultats du docking moléculaire pour la XOB, le naproxène sodique est trouvé lier à un taux de répétition plus au moins acceptable par rapport aux autres inhibiteurs (**Tableau 20**), par contre, sa valeur d'énergie est classée deuxième avec une valeur de -7,9 kcal /mol, de l'autre côté (XOH), le naproxène sodique, est trouvé lier à un taux de répétition de 100%, en plus sa valeur d'énergie est classée première parmi tous les inhibiteurs testés, la simplicité structurale du naproxène de point de vue poids moléculaire (~252 g /mol) et le nombre d'atome lui facilite l'entrée au sein du site actif quel que soit sa polarité, de même dans le cas des cavités plus au moins apolaires, vue la nature de sa structure polaire et petite, qui

facilitent la liaison aux acides aminés polaires, ces derniers se trouvent en réalité localisés profondément et en minorité dans le cas de la XOB, contrairement à la XOH où ils apparaissent. Dans le cas de la XOB, le naproxène est lié par interaction rigide de type carbone-hydrogène avec le Glu1261 (l'un des acides aminés catalytiques) et le plus important dans l'activité inhibitrice, sachant que le Glu1261 intervient naturellement dans la réaction de transformation de la xanthine en acide urique et est responsable de l'attaque nucléophile en 4 étapes par sa fonction cétone. La structure du naproxène partage quelques similarités avec le substrat xanthine surtout au niveau de sa fonction ester qui est portée sur le groupement anisole (**Figure 43**), une autre interaction de type hydrophobe a été observée avec Ser1080 et Arg912 avec les groupements sodium (S)-2-phenylpropanoate et anisole respectivement, une interaction hydrogène est notée également avec Ser1082. Par conséquent, quatre (04) interactions sont partagées entre les deux fonctions du naproxène.

Finalement, la faible présence d'acides aminés polaires dans le site actif de la XOB a influencé sur son taux de répétition. Dans le cas de XOH, le naproxène est également lié par une interaction rigide de type carbone-hydrogène avec Gly800, et trois (03) autres interactions de type hydrogène sont notées avec Phe912, Phe915 et Glu1262, ce dernier est l'un des acides aminés catalytiques responsables de l'activité inhibitrice. L'acide aminé Glu1262 intervient naturellement (tout comme le Glu1261) dans la réaction de catalyse décrite auparavant. Deux (02) interactions hydrophobes avec l'Arg913 sont notées, en plus deux (02) autres importantes interactions (sulfure avec Met1039) sont obtenues. En conséquence huit (08) interactions obtenues, chose qui prouve la grande stabilité du naproxène et explique ainsi sa valeur d'énergie.

La fonction hydroxyle de l'anisole n'a enregistré aucune interaction, en revanche, la fonction carboxyle portée sur le groupement sodium (S)-2-phenylpropanoate était plus réactive (comparée au premier cas) avec quatre (04) interactions hydrogènes. Finalement, la structure et la conformation du naproxène peuvent être l'un des inhibiteurs efficaces les plus préférés, pouvant jouer le rôle d'analogue de substrat assuré par différentes interactions hydrogène, hydrophobe et sulfure.

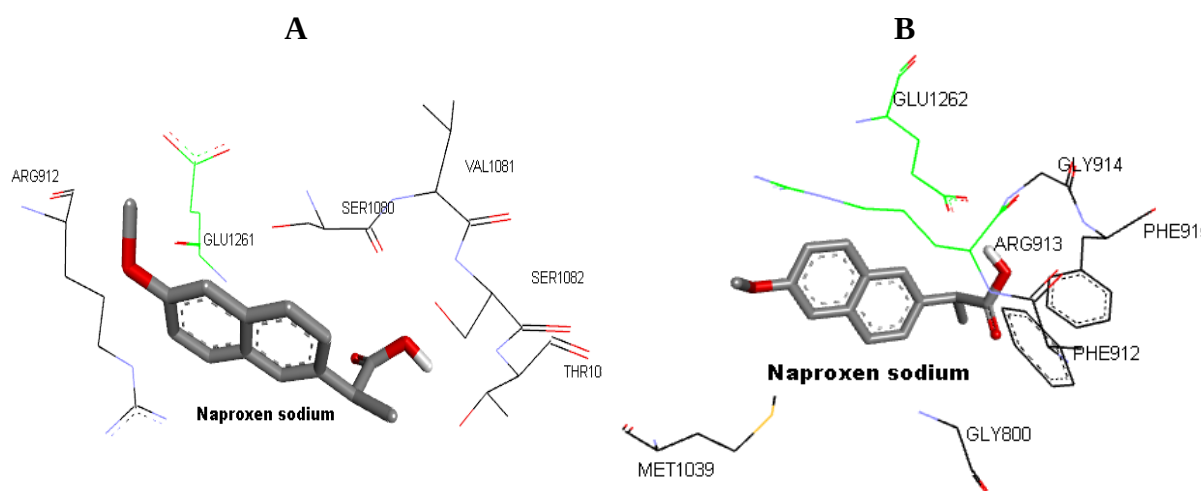


Figure 43 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Naproxène sodique avec la XOB (A) et XOH (B).

○ **L'Ibuprofène** ou 2-(4-isobutylphenyl) acide propanoïque (**Figure 44**).

Selon le docking moléculaire de la XOB, l'ibuprofène est trouvé lié au centre du site actif (**Figure 44**) avec un taux de répétition logique (**Tableau 20**) et une valeur d'énergie intéressante égale à -7,2 kcal/mol. Par contre dans le cas de la XOH, sa liaison avec le site actif se trouve diminuée avec un taux de répétition moins important (**Tableau 20**), et une valeur d'énergie relativement similaire avec -7,0 kcal/mol.

Ces résultats sont expliqués par le mode d'orientation préféré de l'ibuprofène dans les deux cas de docking moléculaire. Tout d'abord, l'ibuprofène présente une structure simple avec une masse moléculaire de 206 g/mol qui est légèrement plus petite qu'aux autres inhibiteurs étudiés. Dans ce travail, et même avec la xanthine (ligand natif de la XO), la fonction carboxylique avec le cycle benzénique partage un nuage électronique important avec les acides aminés du site actif, et contrôle aussi son orientation préférée, dans le cas où l'inhibiteur est de petite taille, l'effet stérique vis-à-vis du site actif est moins important, les fonctions biochimiques de l'inhibiteur, la polarité et la disposition des acides aminés catalytiques influent sur son efficacité.

Dans le premier cas (XOB), l'ibuprofène a enregistré deux (02) interactions de type hydrogène et carbone-hydrogène avec le groupement amine, et hydroxyle avec Ser1082, respectivement. D'autres interactions de type hydrophobe ont été trouvées avec Arg912 et Ala1078, ce dernier est l'un des acides aminés catalytiques, en outre, l'Ibuprofène est localisé proche des autres acides aminés catalytiques mais avec de grandes distances (>5 Å) due à sa petite taille par rapport au site actif. Par conséquent, quatre (04) interactions ont été enregistrées.

Finalement, ces résultats indiquent la stabilité de l'ibuprofène dans la XOB, cette stabilité est assurée par les interactions rigides, justifiant ainsi sa valeur d'énergie, et son taux de répétition. Dans le cas de XOH, l'ibuprofène a enregistré pareillement deux (02) interactions de type hydrogène mais avec différents acides aminés (Gly1040 et Gln1195), ces derniers se trouvent situés loin des acides aminés catalytiques. Par ailleurs, trois (03) interactions hydrophobes ont été observées avec Met1039 et Arg913, ce dernier est le plus réactif avec trois (03) interactions : deux hydrophobes avec la fonction isobutane et une importante interaction électrostatique de type π -cation avec le noyau benzène.

L'Arg913 joue un rôle important dans la stabilité de l'ibuprofène, cette dernière explique la valeur d'énergie obtenue. En effet, l'Arg913 est l'un des quatre acides aminés catalytiques (Glu1262, Arg881, et Gln768). Notons également que le taux de répétition obtenu est faible comparé à sa stabilité, ceci est dû à sa localisation proche de l'Arg913 et au début du site catalytique, en plus la fonction carboxyle qui présente l'élément le plus réactif pour l'ibuprofène a été attiré par le Gly1040 et Gln1195 qui se localisent au début du site actif bloquant ainsi l'entrée pour l'ibuprofène, nous pouvons dire alors que la plupart des poses obtenues sont hors du site actif.

Finalement, le taux de répétition obtenu est logique et la structure de l'ibuprofène peut être plus efficace dans le cas de la XOB que la XOH.

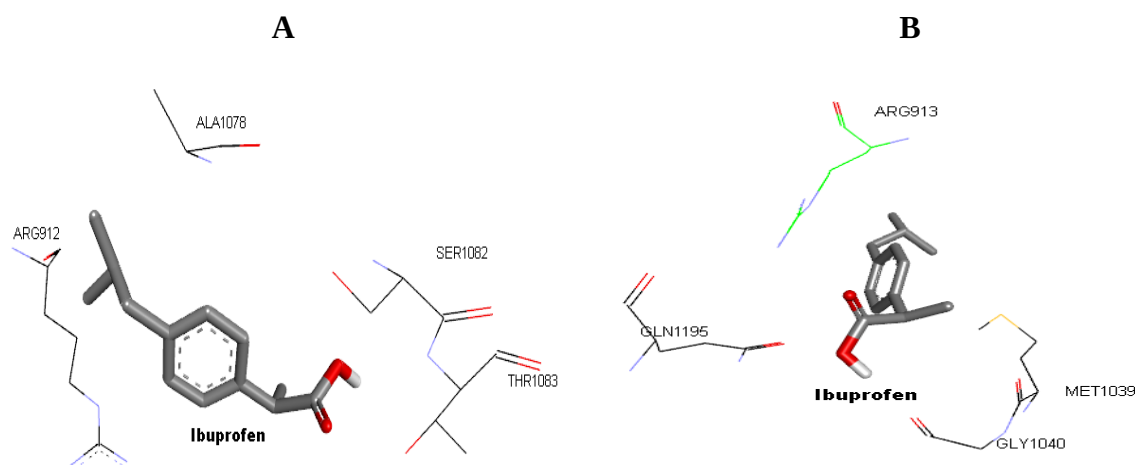


Figure 44 : Les acides aminés impliqués dans des interactions de l'Ibuprofène avec la XOB (A) et XOH (B).

➤ Résumé des anti-inflammatoires

En résumé le docking moléculaire des anti-inflammatoires : Indométacine, Celecoxib, et l'Ibuprofène présente un effet faible, contrairement au Diclofénac sodique et au Naproxène sodique qui présentent un effet fort pour les deux sources de xanthine oxydase. Dans le cas de

la XOB, les inhibiteurs se trouvent dans différentes régions du site actif, leurs modes d'action sont caractérisés par la fixation dans le tunnel du site actif tandis que leurs atomes électronégatifs se trouvent pointés vers les acides aminés catalytiques et forment alors des interactions hydrophobes et hydrogènes. En outre, les acides aminés Leu648, Val1011, et Leu1014 sont notés indispensables dans la plupart des interactions hydrophobes obtenues. Dans le cas de la XOH, les inhibiteurs se trouvent également dans différentes régions du site actif, leurs modes d'actions sont similaires à ceux de la XOB mais par fixation au sein de site actif et leurs atomes électronégatifs se trouvent pointés vers les acides aminés catalytiques et forment des interactions hydrophobes et hydrogènes. En outre, les acides aminés Phe799, et Arg913 sont notés indispensables dans la plupart des interactions hydrophobes obtenues.

III. Les complexes de lanthanides (III)

Les lanthanides (Ln) sont des éléments de terre rares avec des applications industrielles et médicales. En conséquence, les systèmes biologiques vivants tels que les plantes, animaux, et humains sont en contact avec eux. Les applications médicales des lanthanides ont repris et intensifié les recherches sur leur chimie et biocompatibilité.

○ **Lanthanum (III)** ou complexe de bis(4-hydroxy-2-oxo-2 H-chromen-3-yl)-(1 H-pyrazol-3-yl)-methane (La(L5)(OH).2H₂O) (**Figure 45**), dérivé de coumarines.

Selon les résultats du docking moléculaire avec la XOB, le Lanthanum (III) (La5) est lié dans la partie extérieure du site actif loin du site catalytique, son taux de répétition est égal à 80 % mais nous notons un taux plus important pour la XOH de 100 %, ces résultats sont proportionnelles avec les valeurs du PLPchem score des deux enzymes (**Tableau 20**).

La valeur du PLPchem score définit l'affinité : plus la valeur du PLPchem score est importante plus l'affinité est meilleure. Le (La5) a formé trois (03) interactions importantes de type hydrogène avec le Leu648, Ser876, et Glu879, ce dernier a formé une interaction rigide de type carbone-hydrogène avec son groupement hydroxyle et le noyau chromane, de plus la Leu648 a formé deux (02) autres interactions hydrophobes avec le noyau chromane, et une interaction hydrogène avec le cycle du Lanthanum (La), la Val1011 a formé trois (03) interactions hydrophobes et la Leu1014 a enregistré une interaction hydrophobe avec le même noyau.

Le premier noyau chromane de La5 est le plus réactif avec neuf (09) interactions comparé au deuxième noyau chromane qui n'enregistre aucune interaction, de l'autre côté, le métal Lanthanum a fait une seule interaction. Le La5 est introduit au sein du site actif avec son premier

noyau chromane, quant au deuxième noyau chromane, il est trouvé face au milieu extérieur ce qui explique son inactivité, la seule différence entre ces deux noyaux est la liaison entre la fonction cétone du premier noyau et la fonction hydroxyle du deuxième noyau. Le La5 est une grande molécule multicyclique complexée avec le Lanthanum qui lie cinq (05) atomes d'oxygène d'un côté et deux noyaux chromanes avec un cycle pyrazole de l'autre côté, cette propriété lui permet de s'engager dans plusieurs interactions hydrophobes et hydrogènes qui sont essentielles dans l'amélioration de son affinité et de sa stabilité d'un côté, et d'un autre côté d'assurer un effet stérique dans le site actif grâce à son poids moléculaire significatif (~593 g/mol). La présence de métaux Lanthanum pourrait conduire à une inhibition importante, ce résultat est prouvé après avoir confirmé l'absence d'interactions défavorables de type « BUMPS » (bosses), par conséquent la plupart des poses sont rencontrées au sein du site actif, prouvant ainsi sa grande affinité vers la XOB qui est assurée par le Lanthanum et est confirmée par le PLPchem score. La fonction cétone du noyau chromane est responsable en grande partie de ces interactions, car son orientation vers Ser876 a forcé le noyau chromane à dévier d'un angle d'environ 30°, par conséquent, cinq (05) interactions hydrophobes ont été formées.

Selon les résultats du docking moléculaire dans la XOH, le La5 est trouvé plus stable dans cet environnement et est lié dans la partie extérieure du site actif avec un taux de répétition de 100 % (**Tableau 20**). Malgré la non implication des acides aminés catalytiques de la XOH, son PLPchem score est amélioré, ce qui prouve sa grande affinité. Ces données prouvent que le La5 a bloqué le site actif, donnant alors une prédiction initiale de son mécanisme d'action, toutes ces fonctions biochimiques sont impliquées dans au moins une interaction. Par contre, le deuxième noyau chromane qui porte la fonction cétone est plus réactif par rapport au premier noyau chromane qui porte la fonction hydroxyle comme dans le cas de la XOB.

Le Met1039 a formé deux (02) interactions (hydrophobe et sulfure) avec le cycle de pyrazole et la fonction hydroxyle du premier noyau chromane, ce dernier est trouvé lié avec Gln1195 par une interaction hydrogène et avec Cys150 par une interaction hydrophobe, alors que, plusieurs interactions hydrophobes ont été formées avec le deuxième noyau chromane avec : Ala1079 et Gly800 qui ont formé deux (02) interactions chacun, et Ala1080, Ala911 et Phe915 avec une interaction chacun. Dans cette structure, le métal Lanthanum (La), est le plus important. En effet, il a formé deux (02) importantes interactions hydrogènes avec Phe799 et Gln1202 par les différents atomes d'oxygène qu'il porte. En tout, quinze (15) différentes interactions ont été formées avec le Lanthanum (III) chose qui prouve sa grande stabilité étant un complexe organométallique dans la XOH. Ces différents atomes électro-négatifs et ces hétérocycles ont

permi de bloquer le site actif de la XO_H, ces derniers sont essentiels afin d'améliorer son affinité malgré le grand poids moléculaire (~593 g/mol). La conformation obtenue est la plus répétée avec 100 % de chance et absence d'interactions défavorables de type BUMPS (bosses), nous suggérons que le Lanthanum est responsable en grande partie de ces interactions vue son rôle majeur dans la fixation des différents groupements fonctionnels.

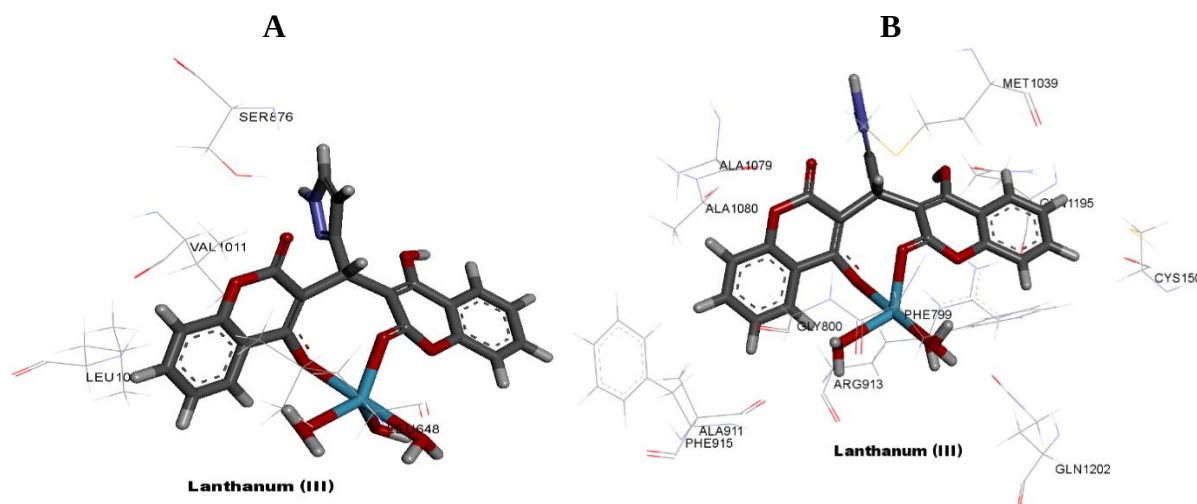


Figure 45 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Lanthanum (III) avec la XO_B (A) et XO_H (B).

○ **Cérium (III)** ou complexe de bis (4-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-pyridin-2-yl-methane (Ce(L2)(OH).H₂O) dérivé de coumarines fait partie des lanthanides. Selon les résultats du docking moléculaire (**Figure 46**), le Cérium (Ce2) est lié dans la partie extérieure du site actif de la XO_B loin du site catalytique, son taux de répétition est moins important avec un pourcentage de 60 %, et avec un PLPchem score de 33,27. Tandis que son taux de répétition est plus important dans la XO_H avec 90 % (**Tableau 20**), mais avec une valeur de PLPchem score légèrement plus faible à 28,25.

Dans le cas de la XO_B, le Ce2 forme une interaction importante de type hydrogène avec le groupement hydroxyle de Ser876 et l'atome d'oxygène porté sur l'hétérocycle de cérium (Ce), ainsi, la Leu648 a formé deux (02) interactions hydrophobes avec le noyau chromane qui porte le groupement hydroxyle, ce dernier est responsable dans toutes les interactions hydrophobes et est noté comme la fonction la plus réactive, en raison de l'introduction du Ce2 par son cycle chromane. Les acides aminés Val1011 et Phe1013 ont formé chacun deux (02) interactions hydrophobes avec le même noyau, l'autre noyau chromane qui porte le groupement cétone et le noyau pyrazole n'a pas participé dans ces interactions, de l'autre côté, le cycle de cérium a fait une seule interaction. Le Ce2 est une grande molécule multicyclique complexée avec le Ce, similaire a d'autres complexes lanthanides, le métal Cérium lie quatre (04) atomes d'oxygène

d'un côté et deux noyaux chromanes avec un cycle pyrazole de l'autre côté, ces fonctions biochimiques favorisent la formation de plusieurs interactions hydrophobes et hydrogènes qui sont indispensables pour assurer son affinité et sa stabilité, le Ce2 est trouvé au sein du site actif avec deux conformations qui se différencient par la rotation du cycle pyrazole, 60 % sont stables et agissent en bloquant l'entrée du site actif grâce au poids moléculaire significatif de Ce2 (~588 g/mol) qui peut conduire à un effet d'encombrement stérique stabilisé par l'atome de cérium. Ces conformations sont absentes de toute interaction défavorable de type BUMPS (bosses), le reste des conformations inhabituelles sont trouvées instables avec formation des BUMPS, dans ce cas, il est difficile pour les atomes électrophiles d'avoir des interactions avec les doublets non liants de ces derniers en raison de l'effet stérique. Finalement, la fonction hydroxyle du noyau chromane est responsable de ces interactions en raison de son orientation vers Ser876 qui a forcé le noyau chromane à se dévier légèrement, en conséquence, sept (07) interactions hydrophobes ont été formées. Selon les résultats du docking moléculaire dans la XOH, le Ce2 est trouvé stable et est lié également dans la partie extérieure du site actif avec un taux de répétition de 90 %, (**Tableau 20**), son PLPchem score est diminué, mais n'a pas influé sur son affinité, car la plupart de ces poses ont été obtenues dans le site actif, dans cette situation le Ce2 est lié en bloquant le site actif dans sa partie extérieure vu son volumineux poids moléculaire comme dans le cas de XOB. Toutes ces fonctions biochimiques ont été impliquées dans au moins une interaction, ceci explique la différence de taux de répétition trouvée entre les deux enzymes, et indique le mécanisme d'action vis-à-vis de la XOH, les deux cycles chromanes réagissent en stabilisant la structure par Ala1084, Ala1259, Val1260, et Gly1261 avec la fonction hydroxyle, et par Gly798, Phe799, Cys113, Cys150, et Met1039 avec la fonction cétone. Quant à Met1039, il est trouvé lié avec le cycle pyrazole qui avec le cycle de Ce assurent l'inhibition en couvrant la totalité de la cavité en prenant la forme d'une clé. Deux (02) importantes interactions hydrogène sont notées avec Phe799 et les deux fonctions hydroxyle portées sur les deux hétérocycles du cérium et le doublet non-liant sur le cycle chromane. Le cycle de cérium a joué un rôle important par les différents atomes d'oxygène qu'il porte, et qui favorisent une électronégativité importante dans le milieu, la conformation obtenue est la plus répétée à 90 % de chance avec absence de toute interaction défavorable de type BUMPS.

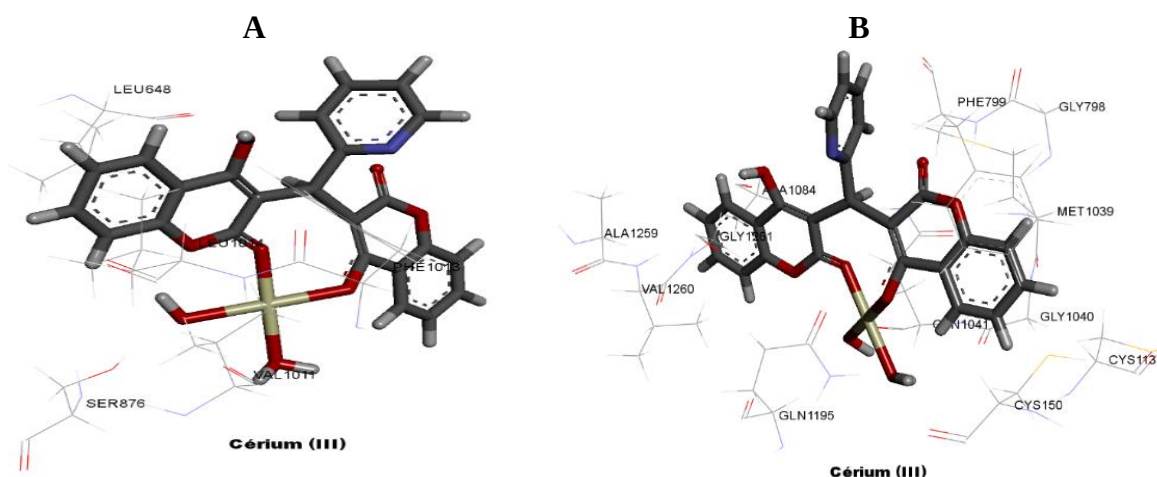


Figure 46 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Cérium (III) avec la XOB (A) et XOH (B).

○ **Neodymium (III)** ou complexe bis(4-hydroxy-2-oxo-2 H-chromen-3-yl)-pyridin-3-yl-methane ($\text{Nd}(\text{L3})(\text{OH}).2\text{H}_2\text{O}$) dérivés de coumarines fait partie des lanthanides.

Selon les résultats du docking moléculaire (**Figure 47**), le Neodymium ($\text{Nd}3$) est trouvé lié au niveau de la partie extérieure du site actif de la XOB et est proche du site catalytique, son taux de répétition est trouvé logique avec un pourcentage de 70 %, et avec la meilleure valeur enregistrée de PLPchem score (33,46). Du côté de la XOH, son taux de répétition a été plus important avec un pourcentage de 100 % (**Tableau 20**), et une valeur de PLPchem score plus significative de 53,87. Le $\text{Nd}3$ forme trois (03) interactions importantes (type hydrogène et carbone-hydrogène) avec ses fonctions hydroxyles portées sur le cycle de neodymium (Nd) et avec le groupement amine de Lys771, ces interactions peuvent jouer un rôle important dans sa stabilité, en outre, la Leu648 a formé deux (02) interactions hydrophobes avec le noyau chromane qui porte le groupement hydroxyle, ce dernier est responsable de toutes les interactions hydrophobes et est noté comme la fonction la plus réactive comme dans le cas du cérium III, étant donné que le $\text{Nd}3$ est introduit par son cycle chromane de la même façon que le cérium III Le Phe1013 et Leu1014 ont chacun formé une seule interaction hydrophobe avec le même noyau, par contre le noyau chromane qui porte le groupement cétone et le noyau pyrazole n'ont participé dans aucunes de ces interactions, d'un autre côté, le cycle du Neodymium a fait deux (02) interactions. Le $\text{Nd}3$ est considéré comme étant le plus volumineux parmi tous les complexes lanthanides testés, il se compose d'un système multicyclique complexé avec le Nd , le Nd lie cinq (05) atomes d'oxygène d'un côté et deux noyaux chromanes avec un cycle pyrazole de l'autre coté. Selon l'échelle de Pauling, le Nd est

plus électronegatif que La et Ce, ce qui lui procure l'avantage de former plusieurs interactions indispensables pour assurer son affinité et sa stabilité, le Nd3 est stable au sein du site actif et absent de toute interaction défavorable avec une seule conformation à 100 %, le Nd3 agit comme les autres lanthanides testés, c'est-à-dire, en bloquant l'entrée du site actif grâce son poids moléculaire significatif (~608 g/mol) qui conduit forcément à un effet d'encombrement stérique, stabilisé par l'atome de Neodymium.

Finalement, le Nd3 a enregistré le meilleur modèle d'inhibiteur de la famille des lanthanides. Dans le cas de la XOH, le Nd3 est lié dans la partie extérieure du site actif avec un taux de répétition optimale de 100 %, (**Tableau 20**), et son PLPchem score a noté la meilleure valeur. Toutes ces poses ont été obtenues dans le site actif, démontrant ainsi sa grande affinité. Le Nd3 est lié en bloquant le site actif dans sa partie extérieure comme tous les lanthanides. Toutes ces fonctions chimiques telles que les deux hétérocycles du cérium et pyrazole, et les deux cycles de chromane ont participé dans au moins une interaction, ce qui explique les résultats obtenus, le mécanisme d'action de Nd3 vis-à-vis de la XOH repose essentiellement sur l'orientation en forme clé qui va s'intégrer initialement par le cycle de Neodymium qui va se stabiliser par des interactions hydrogènes avec Gly1040 (2,03 Å) and Ile1191 (2,83 Å), ensuite, les deux cycles chromanes vont s'installer au niveau des deux extrémités extérieures du site actif et formant ainsi des interactions hydrophobes, le cycle chromane qui porte la fonction cétone va réagir avec Cys150 (π -sulfur), Phe799 (π - π -T shaped) et Met1039 (π -alkyl), tandis que l'autre cycle chromane va réagir avec Val1260, Ala1259, Ser1081, et Ser1083 (π - π - T shaped, amide- π -Stacked, respectivement), et le cycle pyrazole va se lier avec Ala1079 et Ala1080 (amide- π -Stacked), ce mécanisme d'inhibition adopté par le Nd3 favorise une inhibition pouvant être irréversible, vu que l'ion neodymium était très proche du Gly400 ce qui favorise la formation de liaison métallique.

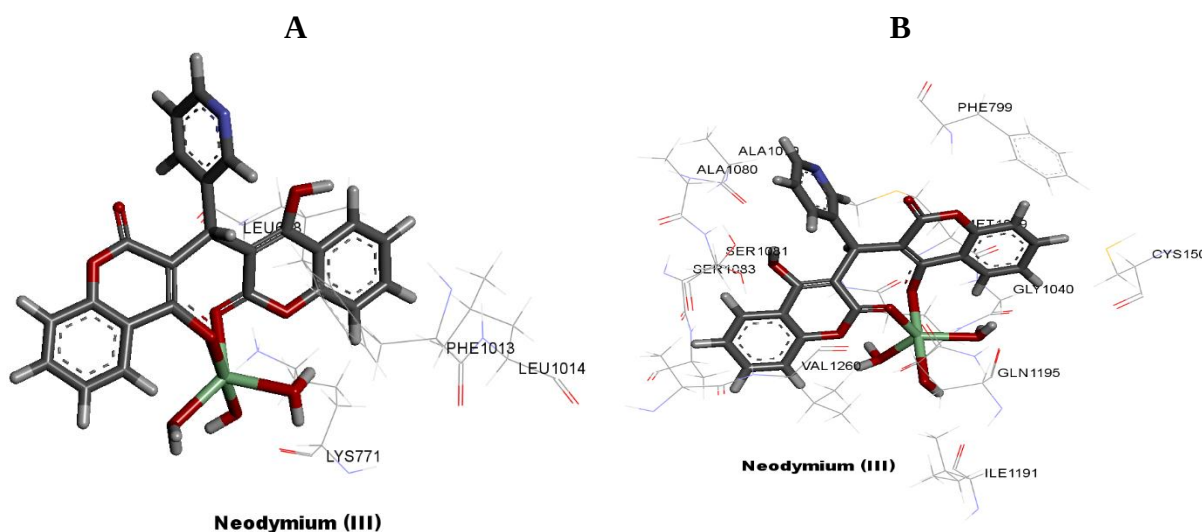


Figure 47 : Les acides aminés impliqués dans les interactions du Neodymium (III) avec la XOB (A) et XOH (B).

➤ Résumé des complexes organométalliques

Le docking moléculaire des complexes organométalliques: Lanthanum (III), Cérium (III), et Neodymium (III) a prouvé leurs efficacités pour les deux sources de xanthine oxydase évaluées, leurs poids moléculaire étaient importants et leurs fonctions biochimiques sont différentes.

Dans le cas de la XOB, les inhibiteurs sont trouvés au début du site actif, partageant le même mode d'action pour bloquer le site actif, ils interviennent à chaque fois par l'un des deux cycles chromane qui est utilisé pour bloquer le site actif avec les ions métalliques La, Ce, et Nd, ces ions participent et jouent un rôle dans la stabilisation de la structure en formant des liaisons de type conventionnelle hydrogène et carbone-hydrogène, par contre, le cycle pyrazole ne participe pas dans les interactions avec XOB et reste à chaque fois pointé vers l'extérieure, leur taux de répétition est toujours moins de 100 % à cause de la nature moyennement apolaire du site actif de XOB, de plus, les atomes électronégatifs que portent ces inhibiteurs obligent ces derniers à se lier dans des régions plus polaires. Les acides aminés Leu648 et Leu1014 sont responsables de toutes interactions hydrophobes obtenues. En outre, leur stabilité qui est traduite par leur PLPchem score est enregistrée la même.

Dans le cas de la XOH, les inhibiteurs sont trouvés au début du site actif, ils partagent le même mode d'action en bloquant le site actif comme dans le cas de la XOB, mais en intervenant par tous leurs groupements fonctionnels. Les ions métalliques La, Ce, et Nd jouent un rôle crucial dans la stabilisation de la structure en formant des interactions de type conventionnels hydrogène et carbone-hydrogène, leur taux de répétition tend vers le maximum (100 %). La nature polaire du site actif de XOH joue un rôle significatif en attirant ces inhibiteurs en raison

des atomes électronégatifs qu'ils portent, donc ce dernier est obligé de se lier proche du site actif. Les acides aminés Cys150, Ala1079, et Met1039 sont responsables de toutes les interactions hydrophobes et sulfure obtenues. En outre, leur stabilité qui est proportionnelle à leur PLPchem score est élevée à chaque fois que l'électronégativité de l'ion métallique lié est importante.

Conclusion

La goutte est une maladie dont la prévalence et l'incidence sont en augmentation, faisant de cette pathologie microcristalline un problème de santé publique. L'obtention d'un objectif d'uricémie (taux d'acide urique dans le sang) inférieur à 60 mg/L (360 mol/L) permet en effet de réduire le nombre de crises et de dissoudre les tophi. Cela est possible, notamment par l'inhibition de la xanthine oxydase. L'enzyme responsable de la formation d'acide urique.

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse s'est focalisé sur l'inhibition de cette enzyme qui a été extraite à partir du lait de deux différentes sources, bovine et humaine.

Nous avons été amenés à conduire aussi bien des expérimentations *in vitro* que des calculs de Docking semi-flexible *in silico*. Ce travail couvre ainsi les deux étapes de la recherche pharmaceutique.

In vitro, l'effet inhibiteur de nos HEs, AINS et CO sur les deux sources de la XO, a été testé par la méthode de détection à double enzyme (DED), qui a été rapportée pour la première fois. Les résultats ont montré des activités inhibitrices importantes et le calcul des concentrations d'inhibition IC_{50} a montré que les AINS, en particulier l'indométacine et l'HE d'anis, ont présenté le meilleur pouvoir inhibiteur. Meilleur que l'allopurinol.

In silico, nous avons choisi deux programmes de Docking moléculaire : *Autodock vina*, et *GOLD*. Ces programmes ont été développés pour aider à la mise au point de molécules à activité thérapeutique. Il s'agit de calculs entre des composés de petit poids moléculaire (inhibiteurs) et des récepteurs protéiques de types enzymatiques. Dans ce contexte, nous avons utilisé ces programmes pour étudier les interactions intervenant dans l'inhibition de la XO par nos divers inhibiteurs, nous avons supposé que le principal composé de chaque HE pourrait être responsable de l'activité inhibitrice de la XO.

Les résultats étaient les suivants ; Les CO ont été classés les meilleurs pour les deux XO (bovine et humaine) en termes d'affinité, avec les valeurs de taux de répétition les plus élevées. Les médicaments AINS, quant à eux, ont été trouvés plus stables dans la XO_H avec les meilleures valeurs d'énergie enregistrées. De l'autre côté, les composés majoritaires des HEs étaient plus stables dans la XO_B avec des valeurs de taux de répétition modérées.

Ce travail peut bien sûr être soumis à plusieurs critiques. Si nous pouvons estimer qu'il représente un certain avancement dans la compréhension du mécanisme d'inhibition de la XO,

tout en contribuant à l'amélioration des approches utiles à une telle étude, il est aussi clair que de nombreuses possibilités restent ouvertes. Par ailleurs, je souhaite que le lecteur de cette thèse, s'il n'en était pas déjà convaincu, aura pu percevoir la complexité mais aussi la richesse et le potentiel actuel des méthodes dérivées de la modélisation moléculaire ainsi que la méthode DED.

Le caractère pluridisciplinaire du projet dans lequel s'inscrit cette thèse, au carrefour de la chimie, de la biologie et de l'informatique, m'a ouvert de nombreuses perspectives d'avenir. Parmi ces perspectives, nous pouvons citer :

- Pour la première thématique (*in vitro*), la suite de ce projet sera de tester d'autres inhibiteurs.
- Pour la deuxième thématique (*in silico*), il sera intéressant de faire des dynamiques de simulation moléculaire post-docking. En effet, Dans le milieu biologique, les protéines sont très flexibles et existent sous plusieurs conformations en équilibre entre elles. Contrairement à la majorité des docking où la protéine est fixe, la dynamique moléculaire permet de tenir compte de cette grande flexibilité de la protéine. Elle peut donc être utilisée pour valider ou affiner une position de docking (complexe ligand/protéine).

*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques

- [1]. Rubino, M. La goutte en 2014: la pathologie et ses traitements, rôle du pharmacien d'officine. 2014.
- [2]. CHAFIK, A.; EL HASSANI, S., Enquête sur la prise en charge de la goutte par le médecin généraliste. 2011.
- [3]. LARIBI, A.; RABAH, K. Etude in-silico de l'inhibition de la Xanthine oxydase. Université de Bouira, 2017.
- [4]. Kuo, C.-F.; Grainge, M. J.; Zhang, W.; Doherty, M. J. N. r. r., Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. 2015, 11 (11), 649.
- [5]. Sylla, C., L'Approche steps wise de la goutte dans le service de Rhumatologie au CHU du Point G à Bamako. 2011.
- [6]. Adjadj, M.; Baghiani, A., Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la Xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva* (L.) Schreber. 2009.
- [7]. ASKALI, B. la goutte et le rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge. 2016.
- [8]. Hérve, E. Le colchique de la goutte. Thèse. Université de Nantes, 2016.
- [9]. Richette, P.; Bardin, T. J. L. L. d. R. N. o., Epidemiologie de la goutte. 2012, 151-161.
- [10]. Malaise, M. J. R. M. d. L., Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. 1996, 51 (1), 123-125.
- [11]. Pillon, F., Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités Pharmaceutiques* 2014, 53 (534), 43-46.
- [12]. Kostova, I.; Manolov, I.; Momekov, G.; Tzanova, T.; Konstantinov, S.; Karaivanova, M., Cytotoxic activity of new cerium (III) complexes of bis-coumarins. *European journal of medicinal chemistry* 2005, 40 (12), 1246-54.
- [13]. Kostova, I.; Momekov, G.; Zaharieva, M.; Karaivanova, M., Cytotoxic activity of new lanthanum (III) complexes of bis-coumarins. *European journal of medicinal chemistry* 2005, 40 (6), 542-51.
- [14]. Kostova, I.; Manolov, I.; Momekov, G., Cytotoxic activity of new neodymium (III) complexes of bis-coumarins. *European journal of medicinal chemistry* 2004, 39 (9), 765-75.
- [15]. Assami, K. Extraction assistée par ultrasons des huiles essentielles et arômes du *Carum carvi* L. d'Algérie. Université des Sciences et de la Technologie d'Alger, Houari Boumediène, 2014.
- [16]. Bou-Salah, L.; Benarous, K.; Linani, A.; Bombarda, I.; Yousfi, M. J. I. C.; Products, In vitro and in silico inhibition studies of five essential oils on both enzymes human and bovine xanthine oxidase. *Industrial Crops and Products* 2020, 143, 111949.
- [17]. Nuki, G.; Simkin, P. A. J. A. r.; therapy, A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. 2006, 8 (S1), S1.
- [18]. Sadernel, S. J. U. d. l. F. d. p., L'acide urique: une molécule physiologique pouvant être pathologique. 2013.
- [19]. Gillray, J. The Gout. https://www.britishmuseum.org/collection/object/P_1851-0901-980.
- [20]. Newcombe, D. S., *Gout: Basic science and clinical practice*. Springer Science & Business Media: 2012.
- [21]. Hippocrate, Nouvelle traduction des Commentaires sur les aphorismes d'Hippocrate et commentaires spécialement applicables à la médecine dite clinique avec la description de la peste d'Athènes (traduction par F.-C.-F. de Mercy). Paris: Béchot Jeune. 1829.
- [22]. Schlienger, J.-L. J. M. d. m. M., L'histoire des tourments de la podagre (goutte). 2014, 8 (2), 230-234.
- [23]. Mehssani, J., La goutte : repères historiques. *REV MAR RHUM* 2019, 48: 4-6.
- [24]. Copeman, W. S. C., *A short history of the gout and the rheumatic diseases*. University of California Press: 1964.
- [25]. Mazières, B., Une petite histoire de la goutte :De la description aux traitements. *Rhumatos* 2017, 14 (125).
- [26]. Newcombe, D. S.; Robinson, D. R., *Gout: Basic Science and Clinical Practice*. Springer London: 2012, <https://books.google.fr/books?id=AO8JEPBknm0C>.
- [27]. MacKenzie, C. R. J. C. T. O. i. R., Gout and hyperuricemia: an historical perspective. 2015, 1 (2), 119-130.
- [28]. Kelley, W. N.; Rosenbloom, F. M.; Henderson, J. F.; Seegmiller, J. E. J. P. o. t. N. A. o. S. o. t. U. S. o. A., A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. 1967, 57 (6), 1735.
- [29]. Dr. Melissa Robitaille, P. P. Pourquoi la goutte est-elle caricaturée ? <https://institutpodiatrique.ca/fr/sante-des-pieds/blog/pourquoi-la-goutte-est-elle-caricaturee>.
- [30]. Trifirò, G.; Morabito, P.; Cavagna, L.; Ferrajolo, C.; Pecchioli, S.; Simonetti, M.; Bianchini, E.; Medea, G.; Cricelli, C.; Caputi, A. P. J. A. o. t. r. d., Epidemiology of gout and hyperuricaemia in Italy during the years 2005–2009: a nationwide population-based study. 2013, 72 (5), 694-700.

- [31]. Korng Ea, H., De l'hyperuricémie à la goutte : physiopathologie. *Revue du Rhumatisme* **2011**, 78, S103-S108.
- [32]. Kuo, C.-F.; Grainge, M. J.; Zhang, W.; Doherty, M., Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology* **2015**, 11 (11), 649-662.
- [33]. Chalès, G., De l'hyperuricémie à la goutte : épidémiologie de la goutte. *Revue du Rhumatisme* **2011**, 78, S109-S115.
- [34]. Pascal, R., Goutte : actualité 2010. *Réflexions Rhumatologiques* **2010**, 132 (toma 14).
- [35]. Klemp, P.; Stansfield, S. A.; Castle, B.; Robertson, M. C., Gout is on the increase in New Zealand. **1997**, 56 (1), 22-26.
- [36]. Lennane, G. A.; Rose, B. S.; Isdale, I. C., Gout in the Maori. *Annals of the rheumatic diseases* **1960**, 19 (2), 120-125.
- [37]. Nan, H.; Qiao, Q.; Dong, Y.; Gao, W.; Tang, B.; Qian, R.; Tuomilehto, J., The prevalence of hyperuricemia in a population of the coastal city of Qingdao, China. **2006**, 33 (7), 1346-1350.
- [38]. MIAO, Z.; LI, C.; CHEN, Y.; ZHAO, S.; WANG, Y.; WANG, Z.; CHEN, X.; XU, F.; WANG, F.; SUN, R.; HU, J.; SONG, W.; YAN, S.; WANG, C.-Y., Dietary and Lifestyle Changes Associated with High Prevalence of Hyperuricemia and Gout in the Shandong Coastal Cities of Eastern China. **2008**, 35 (9), 1859-1864.
- [39]. Wallace, K. L.; Riedel, A. A.; Joseph-Ridge, N.; Wortmann, R., Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population. **2004**, 31 (8), 1582-1587.
- [40]. Roddy, E.; Zhang, W.; Doherty, M., The changing epidemiology of gout. *Nature Clinical Practice Rheumatology* **2007**, 3 (8), 443-449.
- [41]. Lawrence, R. C.; Hochberg, M. C.; Kelsey, J. L.; McDuffie, F. C.; Medsger, T. A.; Felts, W. R.; Shulman, L. E., Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *The Journal of rheumatology* **1989**, 16 (4), 427-441.
- [42]. Lawrence, R. C.; Helmick, C. G.; Arnett, F. C.; Deyo, R. A.; Felson, D. T.; Giannini, E. H.; Heyse, S. P.; Hirsch, R.; Hochberg, M. C.; Hunder, G. G.; Liang, M. H.; Pillemer, S. R.; Steen, V. D.; Wolfe, F., Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. **1998**, 41 (5), 778-799.
- [43]. Currie, W. J., Prevalence and incidence of the diagnosis of gout in Great Britain. **1979**, 38 (2), 101-106.
- [44]. Annemans, L.; Spaepen, E.; Gaskin, M.; Bonnemaire, M.; Malier, V.; Gilbert, T.; Nuki, G., Gout in the UK and Germany: prevalence, comorbidities and management in general practice 2000–2005. **2008**, 67 (7), 960-966.
- [45]. Stevens, C.; Millar, T.; Clinch, J.; Kanczler, J.; Bodamyali, T.; Blake, D. J. T. L., Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. **2000**, 356 (9232), 829-830.
- [46]. Harris, C. M.; Massey, V. J. J. o. B. C., The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen reaction kinetics and measurement of superoxide radical. **1997**, 272 (13), 8370-8379.
- [47]. Mikuls, T. R.; Farrar, J. T.; Bilker, W. B.; Fernandes, S.; Schumacher, H. R.; Saag, K. G., Gout epidemiology: results from the UK General Practice Research Database, 1990–1999. **2005**, 64 (2), 267-272.
- [48]. Kuo, C.-F.; Grainge, M. J.; Mallen, C.; Zhang, W.; Doherty, M., Rising burden of gout in the UK but continuing suboptimal management: a nationwide population study. **2015**, 74 (4), 661-667.
- [49]. Chou, C. T.; Lai, J. S., The epidemiology of hyperuricaemia and gout in Taiwan aborigines. *Rheumatology* **1998**, 37 (3), 258-262.
- [50]. Kuo, C.-F.; Grainge, M. J.; Mallen, C.; Zhang, W.; Doherty, M., Comorbidities in patients with gout prior to and following diagnosis: case-control study. **2016**, 75 (1), 210-217.
- [51]. Lin, C. M.; Chen, C. S.; Chen, C. T.; Liang, Y. C.; Lin, J. K., Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, 294 (1), 167-72.
- [52]. Arromdee, E.; Michet, C. J.; Crowson, C. S.; O'Fallon, W. M.; Gabriel, S. E., Epidemiology of gout: is the incidence rising? **2002**, 29 (11), 2403-2406.
- [53]. Elliot, A. J.; Cross, K. W.; Fleming, D. M., Seasonality and trends in the incidence and prevalence of gout in England and Wales 1994–2007. **2009**, 68 (11), 1728-1733.
- [54]. Hall, A. P.; Barry, P. E.; Dawber, T. R.; McNamara, P. M., Epidemiology of gout and hyperuricemia: A long-term population study. *The American Journal of Medicine* **1967**, 42 (1), 27-37.
- [55]. Campion, E. W.; Glynn, R. J.; Delabry, L. O., Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the normative aging study. *The American Journal of Medicine* **1987**, 82 (3), 421-426.
- [56]. Falasca, G. F., Metabolic diseases: gout. *Clinics in Dermatology* **2006**, 24 (6), 498-508.

- [57]. Pal, N., The Gout. In *Recent Advances in Gout*, IntechOpen: 2019.
- [58]. Dalbeth, N.; So, A. J. A. o. t. r. d., Hyperuricaemia and gout: state of the art and future perspectives. **2010**, 69 (10), 1738-1743.
- [59]. Choi, H.; K., A.; K., K., E. W.; Curhan, G., Obesity, weight change, hypertension, diuretic use, and risk of gout in men: the health professionals follow-up study. *Archives of internal medicine* **2005**, 165 (7), 742-748.
- [60]. Merriman, T. R.; Dalbeth, N. J. J. B. S., The genetic basis of hyperuricaemia and gout. **2011**, 78 (1), 35-40.
- [61]. Chales, G.; Richette, P. J. R. d. R. m., Obésité, hyperuricémie et goutte. **2016**, 83 (1), 44-49.
- [62]. Choi, H. K.; Ford, E. S.; Li, C.; Curhan, G., Prevalence of the metabolic syndrome in patients with gout: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Care & Research* **2007**, 57 (1), 109-115.
- [63]. Richette, P.; Clerson, P.; Périsin, L.; Flipo, R.-M.; Bardin, T., Revisiting comorbidities in gout: a cluster analysis. **2015**, 74 (1), 142-147.
- [64]. Grundy, S. M.; Cleeman, J. I.; Daniels, S. R.; Donato, K. A.; Eckel, R. H.; Franklin, B. A.; Gordon, D. J.; Krauss, R. M.; Savage, P. J.; Smith, S. C.; Spertus, J. A.; Costa, F., Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. **2005**, 112 (17), 2735-2752.
- [65]. Guize, L.; Pannier, B.; Thomas, F.; Bean, K.; Jégo, B.; Benetos, A., Recent advances in metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Archives of Cardiovascular Diseases* **2008**, 101 (9), 577-583.
- [66]. Bardin, T.; Richette, P., Épidémiologie et génétique de la goutte. *La Presse Médicale* **2011**, 40 (9, Part 1), 830-835.
- [67]. Hak, A. E.; Choi, H. K., Menopause, postmenopausal hormone use and serum uric acid levels in US women – The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Research & Therapy* **2008**, 10 (5), R116.
- [68]. Lioté, F.; Lancrenon, S.; Lanz, S.; Guggenbuhl, P.; Lambert, C.; Saraux, A.; Chiarelli, P.; Delva, C.; Aubert, J.-P.; Ea, H.-K., GOSPEL: Prospective survey of gout in France. Part I: Design and patient characteristics (n=1003). *Joint Bone Spine* **2012**, 79 (5), 464-470.
- [69]. Winnard, D.; Wright, C.; Taylor, W. J.; Jackson, G.; Te Karu, L.; Gow, P. J.; Arroll, B.; Thornley, S.; Gribben, B.; Dalbeth, N., National prevalence of gout derived from administrative health data in Aotearoa New Zealand. *Rheumatology* **2012**, 51 (5), 901-909.
- [70]. Dehghan, A.; Köttgen, A.; Yang, Q.; Hwang, S.-J.; Kao, W. L.; Rivadeneira, F.; Boerwinkle, E.; Levy, D.; Hofman, A.; Astor, B. C. J. T. L., Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. **2008**, 372 (9654), 1953-1961.
- [71]. Caulfield, M. J.; Munroe, P. B.; O'Neill, D.; Witkowska, K.; Charchar, F. J.; Doblado, M.; Evans, S.; Eyheramendy, S.; Onipinla, A.; Howard, P. J. P. M., SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. **2008**, 5 (10), e197.
- [72]. Yan, D.; Zhang, Y., Personalized Medicine of Urate-Lowering Therapy for Gout. In *Recent Advances in Gout*, IntechOpen: 2019.
- [73]. Reginato, A. M.; Mount, D. B.; Yang, I.; Choi, H. K. J. N. r. R., The genetics of hyperuricaemia and gout. **2012**, 8 (10), 610.
- [74]. Punzi, L.; Oliviero, F., Diagnostic pratique des arthropathies microcristallines. *Revue du rhumatisme (Ed. française)* **2007**, 74 (2), 138-146.
- [75]. Pascart, T.; Flipo, R.-M., La goutte: présentations cliniques et diagnostic. *Revue du Rhumatisme* **2011**, 78, S116-S121.
- [76]. Revaz, S.; Dudler, J., Manifestations cliniques de la goutte: Rhumatologie. *Revue médicale suisse* **2007**, 3 (103), 728-730.
- [77]. Scuiller, A.; Pascart, T.; Bernard, A.; Oehler, E., La maladie goutteuse. *La Revue de Médecine Interne* **2020**, 41 (6), 396-403.
- [78]. Minesh Khatri, M. What Gout Looks Like: The Fingers. <https://www.webmd.com/arthritis/ss/slideshow-gout> (accessed 07/07/2020).
- [79]. Dudler, S. R. J. J. R. M. S., Manifestations cliniques de la goutte. **2007**, 3, 32142.
- [80]. Schardinger, F. J. Z. f. U. d. N.-u. G., sowie der Gebrauchsgegenstände, Über das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. **1902**, 5 (22), 1113-1121.

- [81]. Morgan, E.; Stewart, C.; Hopkins, F. G. J. P. o. t. R. S. o. L. S. B., Containing Papers of a Biological Character, On the anaerobic and aerobic oxidation of xanthin and hypoxanthin by tissues and by milk. **1922**, 94 (657), 109-131.
- [82]. Booth, V. H. J. B. J., The specificity of xanthine oxidase. **1938**, 32 (3), 494-502.
- [83]. Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Nishino, T.; Pai, E. F. J. P. o. t. N. A. o. S., Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. **2000**, 97 (20), 10723-10728.
- [84]. Rashidinejad, A.; Birch, J., Xanthine Oxidase in Dairy Foods. **2019**.
- [85]. Harrison, R. J. I. D. J., Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. **2006**, 16 (6), 546-554.
- [86]. Hille, R.; Nishino, T. J. T. F. J., Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. **1995**, 9 (11), 995-1003.
- [87]. SAIDI Massinissa; Atmane, Z., Activité anti-hyperuricémique et anti-xanthine oxydoréductase in vivo de l'extrait brut éthanolique de feuilles de Clematis flammula.
- [88]. KESKAS, N. Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine oxydoreductase des extraits de Cachrys libanotis. L. Université Ferhat Abbas, 2011.
- [89]. Pritsos, C. A. J. C.-b. i., Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. **2000**, 129 (1-2), 195-208.
- [90]. Krenitsky, T. A.; Tuttle, J. V.; Cattau Jr, E. L.; Wang, P. J. C. B.; Biochemistry, P. P. B. C., A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. **1974**, 49 (4), 687-703.
- [91]. Parks, D. J. A. P. S., Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. **1986**, 548, 87-99.
- [92]. Linder, N.; Rapola, J.; Raivio, K. O. J. L. i.; methods, a. j. o. t.; pathology, Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. **1999**, 79 (8), 967-974.
- [93]. Meneshian, A.; Bulkley, G. B. J. M., The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. **2002**, 9 (3), 161-175.
- [94]. Harrison, R. J. F. R. B.; Medicine, Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? **2002**, 33 (6), 774-797.
- [95]. Jarasch, E.-D.; Grund, C.; Bruder, G.; Heid, H. W.; Keenan, T. W.; Franke, W. W. J. C., Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. **1981**, 25 (1), 67-82.
- [96]. Rouquette, M.; Page, S.; Bryant, R.; Benboubetra, M.; Stevens, C. R.; Blake, D. R.; Whish, W. D.; Harrison, R.; Tosh, D. J. F. L., Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. **1998**, 426 (3), 397-401.
- [97]. Singh, H. J. C. o. i. c.; science, i., The milk fat globule membrane—A biophysical system for food applications. **2006**, 11 (2-3), 154-163.
- [98]. Spitsberg, V. J. J. o. d. s., Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. **2005**, 88 (7), 2289-2294.
- [99]. Danthine, S.; Blecker, C.; Paquot, M.; Innocente, N.; Deroanne, C. J. L. L., Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique. **2000**, 80 (2), 209-222.
- [100]. Vallée, C., La Membrane des globules gras du lait: Propriétés et applications en santé «Milk Fat Globule Membrane (MFGM): Properties and health applications». **2015**.
- [101]. Hamlaoui, I., Etude théorique des réactions enzymatiques. **2014**.
- [102]. Berry, C. E.; Hare, J. M. J. T. J. o. p., Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **2004**, 555 (3), 589-606.
- [103]. Minoshima, S.; Wang, Y.; Ichida, K.; Nishino, T.; Shimizu, N. J. C.; Research, G., Mapping of the gene for human xanthine dehydrogenase (oxidase)(XDH) to band p23 of chromosome 2. **1995**, 68 (1-2), 52-53.
- [104]. Rytönen, E.; Halila, R.; Laan, M.; Saksela, M.; Kallioniemi, O.-P.; Palotie, A.; Raivio, K. J. C.; Research, G., The human gene for xanthine dehydrogenase (XDH) is localized on chromosome band 2p22. **1995**, 68 (1-2), 61-63.
- [105]. Benabdelhak, M. Inhibition de l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase par les extraits et les fractions chromatographiques d'extraits de Fraxinus angustifolia et Pistacia lent. Université de Béjaia, 2015.
- [106]. TRABSA, H. PROPRIETES ANTIOXYDANTES ET ACTIVITE INHIBITRICE DE LA XANTHINE OXYDASE DES EXTRAITS DE LA PLANTE MEDICINALE PEGANUM HARMALA L. université mohamed khider-biskra, 2011.

- [107]. McManaman, J.; Palmer, C.; Wright, R.; Neville, M. J. T. J. o. p., Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion. **2002**, 545 (2), 567-579.
- [108]. Godber, B. L.; Schwarz, G.; Mendel, R. R.; Lowe, D. J.; Bray, R. C.; Eienthal, R.; Harrison, R. J. B. J., Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. **2005**, 388 (2), 501-508.
- [109]. Messili Katia; Naouel, O., Activités anti-hyperuricémique et antixanthine oxydoréductase in vivo de l'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. **2013**.
- [110]. Harrison, R. J. D. m. r., Physiological roles of xanthine oxidoreductase. **2004**, 36 (2), 363-375.
- [111]. Atmani, D.; Benboubetra, M.; Harrison, R. J. J. o. d. r., Goats' milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. **2004**, 71 (1), 7-13.
- [112]. Abadeh, S.; Killackey, J.; Benboubetra, M.; Harrison, R. J. B. e. B. A.-G. S., Purification and partial characterization of xanthine oxidase from human milk. **1992**, 1117 (1), 25-32.
- [113]. Harrison, R., Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. Portland Press Ltd.: 1997.
- [114]. GODBER, B.; SANDERS, S.; HARRISON, R.; EISENTHAL, R.; BRAY, R. C., $\geq 95\%$ of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin. Portland Press Ltd.: 1997.
- [115]. Zerargui, F. Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. 2018.
- [116]. Taibi, G.; Paganini, A.; Gueli, M. C.; Ampola, F.; Nicotra, C. M. J. J. o. e. i., Xanthine oxidase catalyzes the synthesis of retinoic acid. **2001**, 16 (3), 275-285.
- [117]. McCord, J. M.; Fridovich, I. J. J. o. B. C., The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **1968**, 243 (21), 5753-5760.
- [118]. Blake, D.; Stevens, C.; Sahinoglu, T.; Ellis, G.; Gaffney, K.; Edmonds, S.; Benboubetra, M.; Harrison, R.; Jawed, S.; Kanczler, J., Xanthine oxidase: four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. Portland Press Ltd.: 1997.
- [119]. Kökçüoğlu, E.; Belce, A.; Özyurt, E.; Tepeler, Z. J. C. I., Xanthine oxidase levels in human brain tumors. **1990**, 50 (3), 179-181.
- [120]. Griendling, K. K.; Sorescu, D.; Ushio-Fukai, M. J. C. r., NAD (P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **2000**, 86 (5), 494-501.
- [121]. Granger, D. N.; McCord, J. M.; Parks, D. A.; Hollwarth, M. E. J. G., Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. **1986**, 90 (1), 80-84.
- [122]. Martí, R.; Varela, E.; Pascual, C.; Segura, R. M. J. C. c. a., Determination of xanthine oxidoreductase forms: influence of reaction conditions. **2001**, 303 (1-2), 117-125.
- [123]. Friedl, H. P.; Till, G. O.; Ryan, U. S.; Ward, P. A. J. T. F. J., Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. **1989**, 3 (13), 2512-2518.
- [124]. Burdon, R. H.; Gill, V. J. F. r. r. c., Cellularly generated active oxygen species and HeLa cell proliferation. **1993**, 19 (3), 203-213.
- [125]. Schreck, R.; Baeuerle, P. A. J. T. i. c. b., A role for oxygen radicals as second messengers. **1991**, 1 (2-3), 39-42.
- [126]. Perez, H. D.; Weksler, B. B.; Goldstein, I. M. J. I., Generation of a chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide-generating system. **1980**, 4 (3), 313-328.
- [127]. Battelli, M. G.; Polito, L.; Bortolotti, M.; Bolognesi, A. J. C. M., Xanthine oxidoreductase in cancer: more than a differentiation marker. **2016**, 5 (3), 546-557.
- [128]. Kalcio, M. T.; Lu, M.; Kizilay, A.; Yilmaz, H. R.; Efkani, U.; Güleç, M.; Özturan, O.; Akyol, Ö. J. K. B. B. I. D., Adenosine deaminase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and malondialdehyde levels in the serum of patients with head and neck carcinoma. **2004**, 12, 16-22.
- [129]. Fini, M. A.; Orchard-Webb, D.; Kosmider, B.; Amon, J. D.; Kelland, R.; Shibao, G.; Wright, R. M. J. J. o. c. b., Migratory activity of human breast cancer cells is modulated by differential expression of xanthine oxidoreductase. **2008**, 105 (4), 1008-1026.
- [130]. Hille, R.; Massey, V. J. P.; therapeutics, Tight binding inhibitors of xanthine oxidase. **1981**, 14 (2), 249-263.
- [131]. Wortmann, R. L. J. C. o. i. r., Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. **2005**, 17 (3), 319-324.

- [132]. Pacher, P.; Nivorozhkin, A.; Szabo, C., Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological reviews* **2006**, *58* (1), 87-114.
- [133]. Stewart, R. C.; Hille, R.; Massey, V. J. J. o. B. C., Characterization of arsenite-complexed xanthine oxidase at room temperature. Spectral properties and pH-dependent redox behavior of the molybdenum-arsenite center. **1984**, *259* (23), 14426-14436.
- [134]. Blanc, B. J. L. l., Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. **1982**, *62* (617-620), 350-395.
- [135]. Garat, A. Pharmacogenetique des médicaments thiopuriques Implication des enzymes TPMT et IMPDH2 et de la RhoGTPase RAC1. 2009.
- [136]. Hart, L.; McGartoll, M. A.; Chapman, H. R.; Bray, R. J. B. J., The composition of milk xanthine oxidase. **1970**, *116* (5), 851-864.
- [137]. Bray, R. C.; Barber, M. J.; Lowe, D. J. J. B. J., Electron-paramagnetic-resonance spectroscopy of complexes of xanthine oxidase with xanthine and uric acid. **1978**, *171* (3), 653-658.
- [138]. Baghiani, A.; Harrison, R.; Benboubetra, M., Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of physiology and biochemistry* **2003**, *111* (5), 407-14.
- [139]. Beautrait, A. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine FAT de la kinase d'adhérence focale FAK. 2008.
- [140]. Teniou, S.; Bensegueni, A., Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. **2011**.
- [141]. Asses, Y. Conception par modélisation et criblage in silico d'inhibiteurs du récepteur c-Met. Nancy 1, 2011.
- [142]. Boucherit, H., Etude theorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la methionine aminopeptidase de mycobacterium tuberculosis par diverses molecules. **2012**.
- [143]. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. J. J. o. m. b., A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **1982**, *161* (2), 269-288.
- [144]. Koshland Jr, D. E. J. A. C. I. E. i. E., The key-lock theory and the induced fit theory. **1995**, *33* (23-24), 2375-2378.
- [145]. Rieux, C. Etude des ADN glycosylases de la superfamille structurale Fpg/Nei par modélisation moléculaire, de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans les stratégies anti-cancer. 2017.
- [146]. Aurélien, G. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER, 2007.
- [147]. Pagadala, N. S.; Syed, K.; Tuszynski, J. J. B. r., Software for molecular docking: a review. **2017**, *9* (2), 91-102.
- [148]. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. J. J. o. c. c., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **1998**, *19* (14), 1639-1662.
- [149]. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. J. J. o. m. b., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **1997**, *267* (3), 727-748.
- [150]. Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. J. P. S., Function,; Bioinformatics, Protein-ligand docking: current status and future challenges. **2006**, *65* (1), 15-26.
- [151]. TIFOURAK, D., Etude par Docking Moléculaire de l'inhibition des CYP3A4 par le jus de pamplemousse. **2019**.
- [152]. Böhm, H.-J. J. J. o. c.-a. m. d., The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. **1992**, *6* (1), 61-78.
- [153]. Kramer, B.; Rarey, M.; Lengauer, T. J. P. S., Function,; Bioinformatics, Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. **1999**, *37* (2), 228-241.
- [154]. Hart, T. N.; Read, R. J. J. P. S., Function,; Bioinformatics, A multiple-start Monte Carlo docking method. **1992**, *13* (3), 206-222.
- [155]. Abagyan, R.; Totrov, M. J. J. o. m. b., Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. **1994**, *235* (3), 983-1002.
- [156]. Cho, A. E.; Wendel, J. A.; Vaidehi, N.; Kekenés-Huskey, P. M.; Floriano, W. B.; Maiti, P. K.; Goddard III, W. A. J. J. o. c. c., The MPSim-Dock hierarchical docking algorithm: Application to the eight trypsin inhibitor cocrystals. **2005**, *26* (1), 48-71.
- [157]. Madaoui, H. Prédiction structurale et ingénierie des assemblages macromoléculaires par bioinformatique. 2007.

Références Bibliographiques

- [158]. Hercend, C. Contribution de la modélisation moléculaire à l'étude de pathologies humaines: Application au transporteur ATP7B et au récepteur 5HT2B. 2012.
- [159]. Jain, A. N. J. C. P.; Science, P., Scoring functions for protein-ligand docking. **2006**, 7 (5), 407-420.
- [160]. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. J. o. c. c., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **2009**, 30 (16), 2785-2791.
- [161]. Trott, O.; Olson, A. J. J. o. c. c., AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **2010**, 31 (2), 455-461.
- [162]. Brauer, C. Les médiateurs et voies de signalisation intracellulaires impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale: nouvelles stratégies thérapeutiques en cancérologie. UHP-Université Henri Poincaré, 2007.
- [163]. Reddy, A. S.; Pati, S. P.; Kumar, P. P.; Pradeep, H.; Sastry, G. N. J. C. P.; Science, P., Virtual screening in drug discovery-a computational perspective. **2007**, 8 (4), 329-351.
- [164]. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D., Improved protein-ligand docking using GOLD. **2003**, 52 (4), 609-623.
- [165]. Amina, M.; obtenir le diplôme de MAGISTERE, P.; BIOCHIMIE, E., Étude in silico de l'inhibition de la peptide déformylase. **2017**.
- [166]. Vieth, M.; Hirst, J. D.; Kolinski, A.; Brooks III, C. L. J. J. o. C. C., Assessing energy functions for flexible docking. **1998**, 19 (14), 1612-1622.
- [167]. Gabb, H. A.; Jackson, R. M.; Sternberg, M. J. J. o. m. b., Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. **1997**, 272 (1), 106-120.
- [168]. Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography*; 1963.
- [169]. Adams, R. P., *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured publishing corporation Carol Stream, IL: 2007; Vol. 456.
- [170]. Nonat, A. Complexes de lanthanides (III) pour le développement de nouvelles sondes magnétiques et luminescentes. 2007.
- [171]. Kostova, I., Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* **2005**, 5 (1), 29-46.
- [172]. Kostova, I.; Momekov, G., New cerium(III) complexes of coumarins - synthesis, characterization and cytotoxicity evaluation. *European journal of medicinal chemistry* **2008**, 43 (1), 178-88.
- [173]. Kostova, I.; Trendafilova, N.; Momekov, G., Theoretical, spectral characterization and antineoplastic activity of new lanthanide complexes. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* **2008**, 22 (2), 100-11.
- [174]. Benarous, K.; Bou-Salah, L.; Linani, A.; Yousfi, M.; Kostova, I.; Saso, L. J. J. o. B. S.; Dynamics, Lanthanide (III) complexes of bis-coumarins as strong inhibitors of bovine xanthine oxidase-molecular docking and SAR studies. **2020**, 1-7.
- [175]. Misuri, L.; Cappiello, M.; Balestri, F.; Moschini, R.; Barracco, V.; Mura, U.; Del-Corso, A. J. J. o. e. i.; chemistry, m., The use of dimethylsulfoxide as a solvent in enzyme inhibition studies: the case of aldose reductase. **2017**, 32 (1), 1152-1158.
- [176]. Nakamura, M.; Yamazaki, I., Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *Journal of biochemistry* **1982**, 92 (4), 1279-86.
- [177]. Fossati, P.; Prencipe, L.; Berti, G., Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical chemistry* **1980**, 26 (2), 227-31.
- [178]. Cao, H.; Pauff, J. M.; Hille, R., Substrate orientation and catalytic specificity in the action of xanthine oxidase: the sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid. *The Journal of biological chemistry* **2010**, 285 (36), 28044-53.
- [179]. Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Nishino, T.; Pai, E. F., Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (20), 10723-10728.
- [180]. Cao, H.; Hall, J.; Hille, R. J. J. o. t. A. C. S., X-ray crystal structure of arsenite-inhibited xanthine oxidase: μ -sulfido, μ -oxo double bridge between molybdenum and arsenic in the active site. **2011**, 133 (32), 12414-12417.

- [181]. Cao, H.; Pauff, J. M.; Hille, R. J. J. o. n. p., X-ray crystal structure of a xanthine oxidase complex with the flavonoid inhibitor quercetin. **2014**, 77 (7), 1693-1699.
- [182]. Cao, H.; Pauff, J. M.; Hille, R. J. J. o. B. C., Substrate orientation and catalytic specificity in the action of xanthine oxidase the sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid. **2010**, 285 (36), 28044-28053.
- [183]. Cao, H.; Hall, J.; Hille, R., Substrate Orientation and Specificity in Xanthine Oxidase: Crystal Structures of the Enzyme in Complex with Indole-3-acetaldehyde and Guanine. *Biochemistry* **2014**, 53 (3), 533-541.
- [184]. Ishikita, H.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Pai, E. F., Protein Conformational Gating of Enzymatic Activity in Xanthine Oxidoreductase. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (2), 999-1009.
- [185]. Ishikita, H.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Pai, E. F. J. J. o. t. A. C. S., Protein conformational gating of enzymatic activity in xanthine oxidoreductase. **2012**, 134 (2), 999-1009.
- [186]. Pauff, J. M.; Cao, H.; Hille, R. J. J. o. B. C., Substrate orientation and catalysis at the molybdenum site in xanthine oxidase crystal structures in complex with xanthine and lumazine. **2009**, 284 (13), 8760-8767.
- [187]. Pauff, J. M.; Cao, H.; Hille, R., Substrate Orientation and Catalysis at the Molybdenum Site in Xanthine Oxidase: CRYSTAL STRUCTURES IN COMPLEX WITH XANTHINE AND LUMAZINE. *The Journal of biological chemistry* **2009**, 284 (13), 8760-7.
- [188]. Pauff, J. M.; Zhang, J.; Bell, C. E.; Hille, R. J. J. o. B. C., Substrate orientation in xanthine oxidase: crystal structure of enzyme in reaction with 2-hydroxy-6-methylpurine. **2008**, 283 (8), 4818-4824.
- [189]. Fukunari, A.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Eger, B. T.; Pai, E. F.; Kamezawa, M.; Yamada, I.; Kato, N., Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid]: A Potent Xanthine Oxidoreductase Inhibitor with Hepatic Excretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, 311 (2), 519.
- [190]. Okamoto, K.; Eger, B. T.; Nishino, T.; Pai, E. F.; Nishino, T., Mechanism of Inhibition of Xanthine Oxidoreductase by Allopurinol: Crystal Structure of Reduced Bovine Milk Xanthine Oxidoreductase Bound with Oxipurinol. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2008**, 27 (6-7), 888-893.
- [191]. Okamoto, K.; Eger, B. T.; Nishino, T.; Kondo, S.; Pai, E. F.; Nishino, T., An Extremely Potent Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase: CRYSTAL STRUCTURE OF THE ENZYME-INHIBITOR COMPLEX AND MECHANISM OF INHIBITION *. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (3), 1848-1855.
- [192]. Okamoto, K.; Matsumoto, K.; Hille, R.; Eger, B. T.; Pai, E. F.; Nishino, T., The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (21), 7931.
- [193]. Matsumoto, K.; Okamoto, K.; Ashizawa, N.; Nishino, T., FYX-051: A Novel and Potent Hybrid-Type Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2011**, 336 (1), 95.
- [194]. Okamoto, K.; Kawaguchi, Y.; Eger, B. T.; Pai, E. F.; Nishino, T., Crystal Structures of Urate Bound Form of Xanthine Oxidoreductase: Substrate Orientation and Structure of the Key Reaction Intermediate. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (48), 17080-17083.
- [195]. Pearson, A.; Godber, B.; Eisenthal, R.; Taylor, G.; Harrison, R. J. A. S. E., Human milk xanthine dehydrogenase is incompletely converted to the oxidase form in the absence of proteolysis. **2006**.
- [196]. Yamaguchi, Y.; Matsumura, T.; Ichida, K.; Okamoto, K.; Nishino, T., Human Xanthine Oxidase Changes its Substrate Specificity to Aldehyde Oxidase Type upon Mutation of Amino Acid Residues in the Active Site: Roles of Active Site Residues in Binding and Activation of Purine Substrate. *The Journal of Biochemistry* **2007**, 141 (4), 513-524.
- [197]. Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A.; Yu, B. J. N. a. r., PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **2019**, 47 (D1), D1102-D1109.
- [198]. Traore, M. D. M. Synthèse et études de modélisation moléculaire dans l'optimisation de la sélectivité de nouveaux agents antiparasitaires inspirés de produits naturels. Université Grenoble Alpes, 2016.
- [199]. Kostova, I.; Trendafilova, N.; Mihaylov, T., Theoretical and spectroscopic studies of pyridyl substituted bis-coumarins and their new neodymium (III) complexes. *Chemical Physics* **2005**, 314, 73-84.

- [200]. Kostova, I.; Trendafilova, N.; Momekov, G., Theoretical and spectroscopic evidence for coordination ability of 3,3'-benzylidenedi-4-hydroxycoumarin. New neodymium(III) complex and its cytotoxic effect. *Journal of inorganic biochemistry* **2005**, 99, 477-87.
- [201]. Trendafilova, N.; Kostova, I.; Rastogi, V. K.; Georgieva, I.; Bauer, G.; Kiefer, W., Characteristic Raman and IR bands of 3,3'-benzylidenebis(4-hydroxycoumarin) and its La(III), Ce(III) and Nd(III) complexes. *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, 37 (8), 808-815.
- [202]. Kostova, I.; Trendafilova, N.; Georgieva, I., Spectroscopic and Theoretical Studies of a New Cerium (III) Complex with 3,3'-(ortho-Pyridinomethylene)di-[4-hydroxycoumarin]. *Spectroscopy Letters* **2007**, 40 (1), 65-81.
- [203]. Kostova, I.; Nikolova, I., Stability of Neodymium(III) Complexes of 4-Hydroxycoumarins with Anticoagulant Activity. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* **2006**, 1, 30-35.
- [204]. Abahri, S. Caractéristiques physico chimiques de trois huiles essentielles extraites par hydro distillation de trois plantes aromatiques (cumin, cannelle de Chine et la coriandre). Université Mouloud Mammeri, 2018.
- [205]. Yezza, S.; Djedjai, R. analyse physico-chimique et activités biologiques des huiles essentielles de quelques épices. . Université Kasdi Merbah Ouargla., 2016.
- [206]. Abdellaoui, M.; Kasrati, A.; Allaoui, A.; El Rhaffari, L. J. E. J. o. S. R., Caractérisations Agronomiques et Activités anti Oxydantes des Huiles essentielles des Populations Locales du Cumin (Cuminum Cyminum) Conduit sous des Conditions de Production Biologique dans la Réserve de Biosphère des Oasis du Maroc. **2016**, 137, 11-25.
- [207]. Singh, G.; Maurya, S.; De Lampasona, M.; Catalan, C. J. F. c., Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of Foeniculum vulgare volatile oil and its acetone extract. **2006**, 17 (9), 745-752.
- [208]. Gulfraz, M.; Mehmood, S.; Minhas, N.; Jabeen, N.; Kausar, R.; Jabeen, K.; Arshad, G. J. A. J. o. B., Composition and antimicrobial properties of essential oil of Foeniculum vulgare. **2008**, 7 (24).
- [209]. Sourmaghi, M. H. S.; Kiaee, G.; Golfakhrabadi, F.; Jamalifar, H.; Khanavi, M. J. J. o. F. S.; Technology, Comparison of essential oil composition and antimicrobial activity of Coriandrum sativum L. extracted by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. **2015**, 52 (4), 2452-2457.
- [210]. KACHETEL, L.; SAHMI, A., ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE DES FRUITS DE Coriandrum sativum L. **2017**.
- [211]. Ozel, A., ANISE (PIMPINELLA ANISUM): CHANGES IN YIELDS AND COMPONENT COMPOSITION ON HARVESTING AT DIFFERENT STAGES OF PLANT MATURITY. *Experimental Agriculture* **2009**, 45, 117-126.
- [212]. Ghouati, Y., COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE FRUITS D'ANIS VERT MAROCAIN (*). **2012**, 151, 1-4.
- [213]. Marzouki, H.; Elaissi, A.; Khaldi, A.; Bouzid, S.; Falconieri, D.; Marongiu, B.; Piras, A.; Porcedda, S. J. T. O. N. P. J., Seasonal and geographical variation of Laurus nobilis L. essential oil from Tunisia. **2009**, 2 (1).
- [214]. Aprotosoiaie, A. C.; Spac, A.; Hancianu, M.; Miron, A.; Tanasescu, V. F.; Dorneanu, V.; Stanescu, U. J. F., The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (Foeniculum vulgare Mill.). **2010**, 58 (1), 46-53.
- [215]. Olle, M.; Bender, I.; Koppe, R. J. A. R., The content of oils in umbelliferous crops and its formation. **2010**, 8 (3), 687-696.
- [216]. Lagunez Rivera, L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. 2006.
- [217]. Nacira, B.; Fadhila, R., Contribution à l'étude de l'activité biocide des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la famille des Apiaceae (Foeniculum vulgare et Carum carvi) vis-à-vis du puceron farineux de pêcher (Hyalopterus amygdali) inféodé aux arbres fruitiers. **2018**.
- [218]. Laribi, B.; Bettaieb, I.; Kouki, K.; Sahli, A.; Mougou, A.; Marzouk, B. J. I. C.; Products, Water deficit effects on caraway (Carum carvi L.) growth, essential oil and fatty acid composition. **2009**, 30 (3), 372-379.
- [219]. Faucon, M., *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale de*. 2019, <https://www.livres-medicaux.com/traite-d-aromatherapie-scientifique-et-medicale-les-huiles-essentielles.html> 960.
- [220]. Karaali, A.; Başoğlu, N. J. Z. f. L.-U. u. F., Essential oils of Turkish anise seeds and their use in the aromatization of raki. **1995**, 200 (6), 440-442.

Références Bibliographiques

- [221]. Ouis, N. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger, 2015.
- [222]. anisum, P. Aniseed Essential Oil, Pimpinella anisum Steam Distilled <https://www.newdirectionsaromatics.ca/products/essential-oils/aniseed-essential-oil.html>
- [223]. Oil, F. O. E. Fennel Organic Essential Oil, Steam Distilled. <https://www.newdirectionsaromatics.com/products/essential-oils/fennel-organic-essential-oil.html>.
- [224]. Oil, C. E. Cumin Essential Oil, Steam Distilled. <https://www.newdirectionsaromatics.com/products/essential-oils/cumin-essential-oil.html>.
- [225]. Ghazanfari, N.; Mortazavi, S. A.; Yazdi, F. T.; Mohammadi, M. J. H., Microwave-assisted hydrodistillation extraction of essential oil from coriander seeds and evaluation of their composition, antioxidant and antimicrobial activity. **2020**, 6 (9), e04893.
- [226]. Ben-Khalifa, N.; Chaieb, I.; Laarif, A.; Haouala, R. J. J. N. S., Insecticidal activity of six Apiaceae essential oils against *Spodoptera littoralis* Biosduval (Lepidoptera: Noctuidae). **2018**, 55, 3603-3609.
- [227]. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoyanova, A. S.; Georgiev, E. V.; Damianova, S. T. J. I. j. o. f. s.; technology, Composition, quality control and antimicrobial activity of the essential oil of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds from Bulgaria that had been stored for up to 36 years. **2005**, 40 (3), 305-310.
- [228]. Barazani, O.; Cohen, Y.; Fait, A.; Diminshtein, S.; Dudai, N.; Ravid, U.; Putievsky, E.; Friedman, J. J. B. S.; Ecology, Chemotypic differentiation in indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. **2002**, 30 (8), 721-731.
- [229]. Zoubiri, S.; Baaliouamer, A.; Seba, N.; Chamouni, N., Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil.
- [230]. Anastasopoulou, E.; Graikou, K.; Ganos, C.; Calapai, G.; Chinou, I. J. F.; Toxicology, C., Pimpinella anisum seeds essential oil from Lesbos island: Effect of hydrodistillation time, comparison of its aromatic profile with other samples of the Greek market. Safe use. **2020**, 135, 110875.
- [231]. Yaacoub, R.; Tlidjane, I., Caractérisation physico-chimiques et analyses biologiques de l'huile essentielle des grains de *Cuminum cyminum* L. et de *Foeniculum vulgare* Mill. extraite par hydrodistillation et CO₂ supercritique: Etude comparative. **2018**.
- [232]. Ullah, H.; Mahmood, A.; Honermeier, B. J. P. J. o. B., Essential oil and composition of anise (*Pimpinella anisum* L.) with varying seed rates and row spacing. **2014**, 46 (5), 1859-1864.
- [233]. Singh, G.; Kapoor, I.; Singh, P.; De Heluani, C.; Catalan, C. J. I. J. o. E. O. T., Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and oleoresins from anise seeds (*Pimpinella anisum* L.). **2008**, 2 (3), 122-130.
- [234]. Orav, A.; Raal, A.; Arak, E. J. N. p. r., Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. fruits from various European countries. **2008**, 22 (3), 227-232.
- [235]. Kong, L.; Cai, Y.; Huang, W.; Cheng, C. H.; Tan, R. J. J. o. e., Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. **2000**, 73 (1-2), 199-207.
- [236]. Mohamed Isa, S. S. P.; Ablat, A.; Mohamad, J. J. M., The antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of *Plumeria rubra* flowers. **2018**, 23 (2), 400.
- [237]. Wang, S. Y.; Yang, C. W.; Liao, J. W.; Zhen, W. W.; Chu, F. H.; Chang, S. T., Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2008**, 15 (11), 940-945.
- [238]. Bahadori, M. B.; Valizadeh, H.; Asghari, B.; Dinparast, L.; Farimani, M. M.; Bahadori, S. J. J. o. F. F., Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. **2015**, 18, 727-736.
- [239]. Mosbah, H.; Chahdoura, H.; Kammoun, J.; Hlila, M. B.; Louati, H.; Hammami, S.; Flamini, G.; Achour, L.; Selmi, B. J. B. c.; medicine, a., *Rhaponticum acaule* (L) DC essential oil: chemical composition, in vitro antioxidant and enzyme inhibition properties. **2018**, 18 (1), 1-12.
- [240]. Abu-Gharbieh, E.; Shehab, N. G.; Almasri, I. M.; Bustanji, Y., 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* **2018**, 13 (8), e0202572.
- [241]. Johnson, P.; Loganathan, C.; Iruthayaraj, A.; Poomani, K.; Thayumanavan, P., S-allyl cysteine as potent anti-gout drug: Insight into the xanthine oxidase inhibition and anti-inflammatory activity. *Biochimie* **2018**, 154, 1-9.

- [242]. de Araujo, M.; Franco, Y. E. M.; Alberto, T. G.; Messias, M. C. F.; Leme, C. W.; Sawaya, A.; Carvalho, P. O., Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by acylated derivatives of flavonoids synthesised enzymatically. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2017**, 32 (1), 978-985.
- [243]. Haiduc, I.; Silvestru, C., Metal compounds in cancer chemotherapy. *Coordination Chemistry Reviews* **1990**, 99, 253-296.
- [244]. Keppler, B.; Berger, M.; Klenner, T.; Heim, M., Metal complexes as antitumour agents. In *Advances in Drug Research*, Elsevier: 1990; Vol. 19, pp 243-310.
- [245]. Saryan, L. A.; Ankel, E.; Krishnamurti, C.; Petering, D. H.; Elford, H. J. J. o. M. C., Comparative cytotoxic and biochemical effects of ligands and metal complexes of. alpha.-N-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. **1979**, 22 (10), 1218-1221.
- [246]. Li, L.-Z.; Zhou, G.-X.; Li, J.; Jiang, W.; Liu, B.-L.; Zhou, W. J. J. o. T. E. i. M.; Biology, Compounds containing trace element copper or zinc exhibit as potent hyperuricemia inhibitors via xanthine oxidase inactivation. **2018**, 49, 72-78.
- [247]. Özerkan, D.; Ertik, O.; Kaya, B.; Kuruca, S. E.; Yanardag, R.; Ülküseven, B. J. I. n. d., Novel palladium (II) complexes with tetradentate thiosemicarbazones. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and xanthine oxidase inhibition. **2019**, 37 (6), 1187-1197.

Annexes

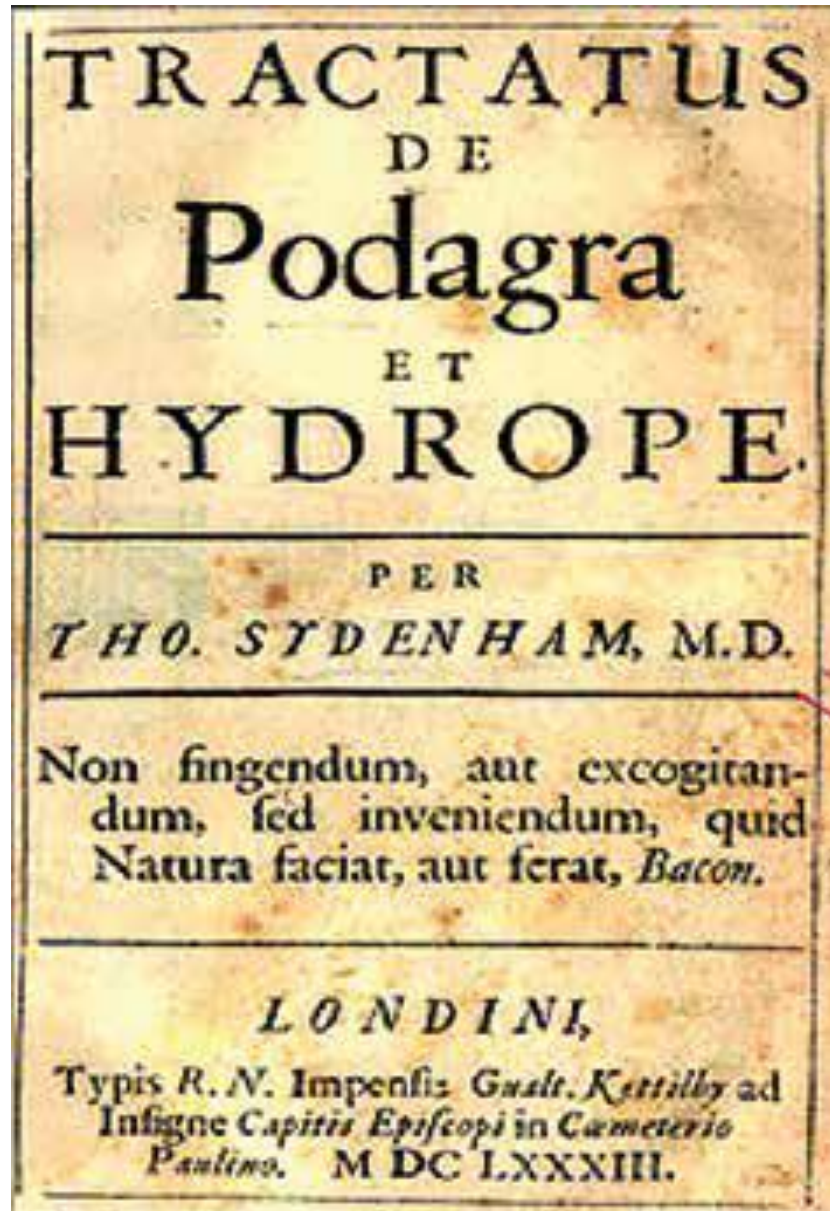
Annexe 1

مقالة في النقرس لأبي بكر الرازي، تحقيق يوسف زيدان الإسكندرية 2003، ص 14-15

- الباب الأول : ما النقرس؟ وما الفرق بينه وبين وجع المفاصل؟
- الباب الثاني : عن ماذا يتوَلَّد النقرس؟
- الباب الثالث : لماذا صار بعض أهل النقرس يتخلصون سريعا من النقرس ويعودون إلى حال الصحة؟ وبعضهم يعرض لهم من النقرس أن يقعدوا، ولا يمكنهم أن يمشوا في جميع أيامهم؟
- الباب الرابع : كم أصناف النقرس؟
- الباب الخامس : لماذا صار لا ينقرس النساء، إلا إذا انقطع حيضهن؟
- الباب السادس : ما العلة التي من أجلها لا ينقرس الخصيان؟
- الباب السابع : ما العلة التي لها ، لا ينقرس الصبيان قبل وقت الحلم؟
- الباب الثامن : ما دليل النقرس الذي يحدث عن الدم؟
- الباب التاسع : ما دليل النقرس الذي يحدث عن الدم البلغمي؟
- الباب العاشر: كم الأشياء التي يُحتاج إلى إحكامها في علاج النقرس؟
- الباب الحادي عشر: كيف ينبغي أن يُدبر المنقرس بالحمية؟
- الباب الثاني عشر: كيف ينبغي أن يُدبر المنقرس بالمطعم والمشرب؟
- الباب الثالث عشر: كيف ينبغي أن يجري الأمر في علاج النقرس بالإسهال؟
- الباب الرابع عشر: كيف ينبغي أن يجري الأمر في علاج المنقرس، بإخراج الدَّم؟
- الباب الخامس عشر: كيف ينبغي أن يكون الأمر في علاج المنقرس، بالقيء؟
- الباب السادس عشر: كيف ينبغي أن يُدبر المنقرس، بصَبِّ الماء على القدمين؟
- الباب السابع عشر: كيف ينبغي أن يُدبر المنقرس، بالأطلية والضمادات؟
- الباب الثامن عشر: كيف ينبغي أن يدبر المنقرس، بالحَمَام؟
- الباب التاسع عشر: كيف ينبغي أن يعالج المنقرس، إذا ابتدأ بما يقاومه ويسكِّنه حتى لا يقوى ولا يستحكم؟
- الباب العشرون: كيف ينبغي أن يُتحرَّز من معاودة النقرس؟

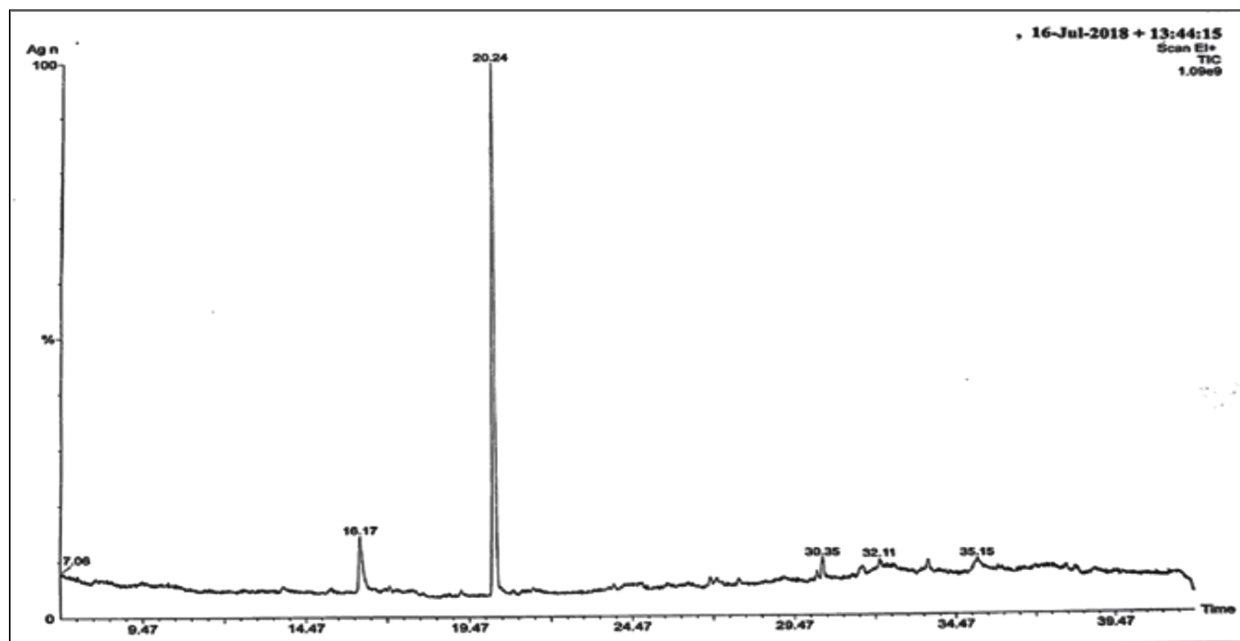
Annexe 2

Traité de la goutte et l'hydropisie de Sydenham

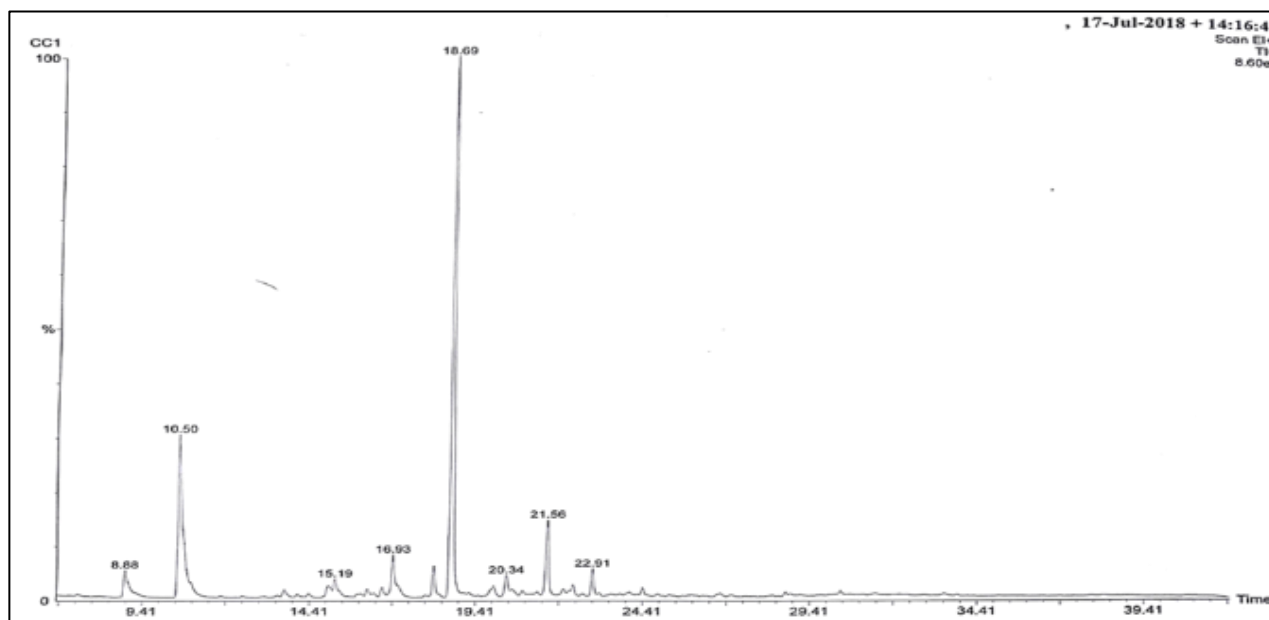


Annexe 3

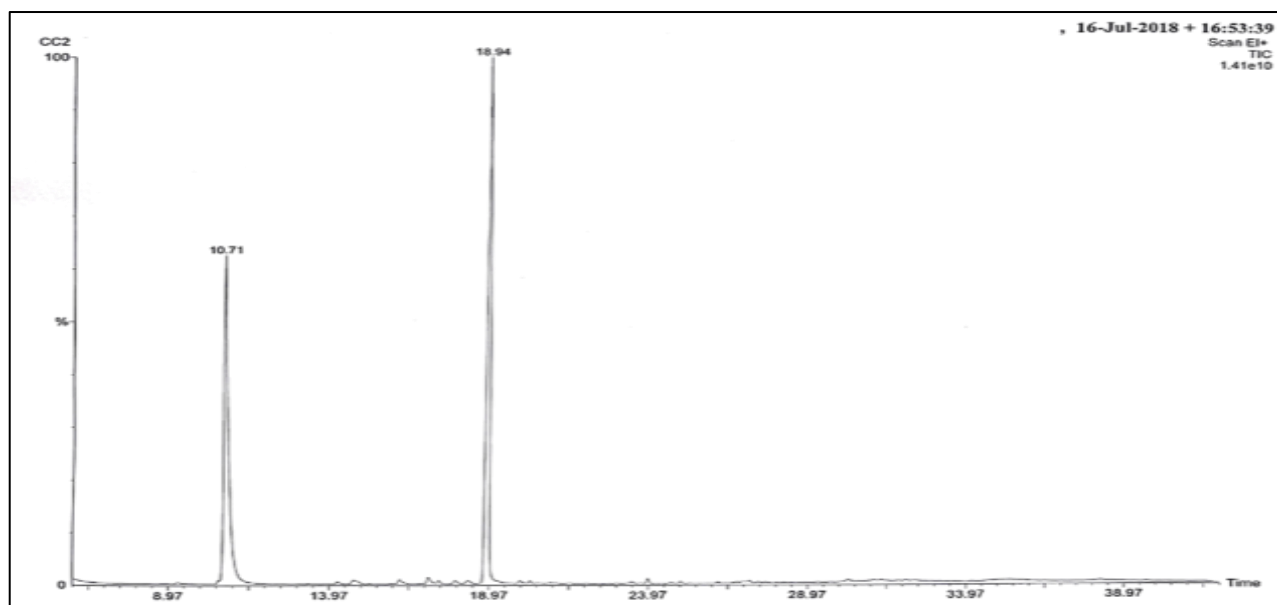
Profils de chromatographie en phase gazeuse (CG) des cinq HEs : (AG) huile essentielle d'anis ; (CC1) huile essentielle de cumin ; (CC2) huile essentielle de carvi ; (CS) huile essentielle de coriandre et (FV2) huile essentielle de fenouil.



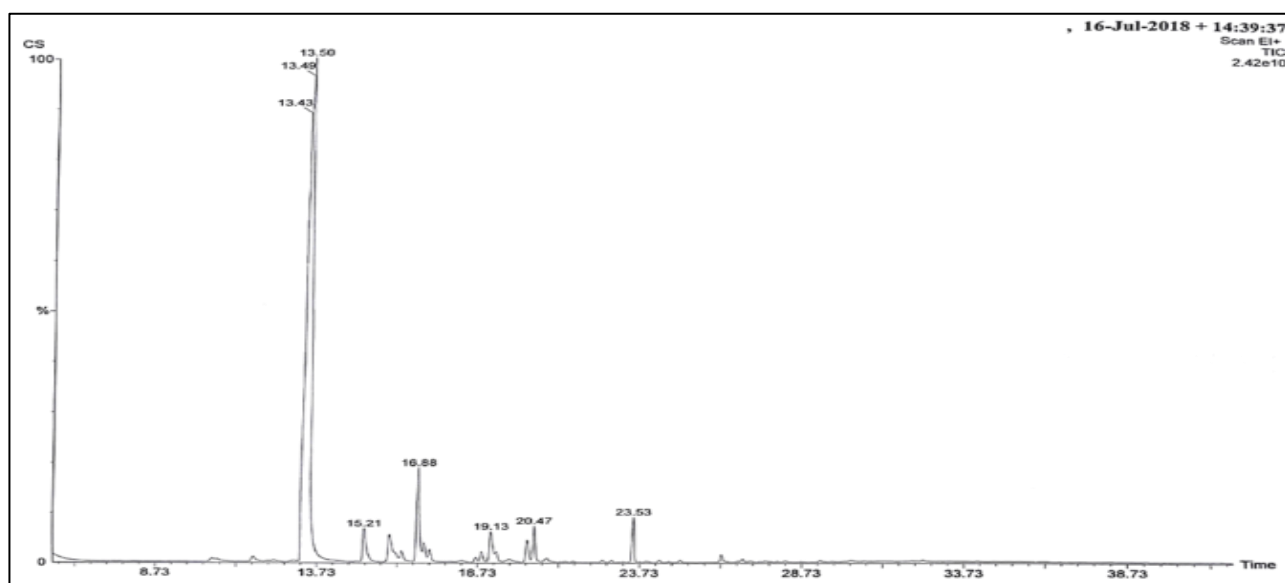
AG



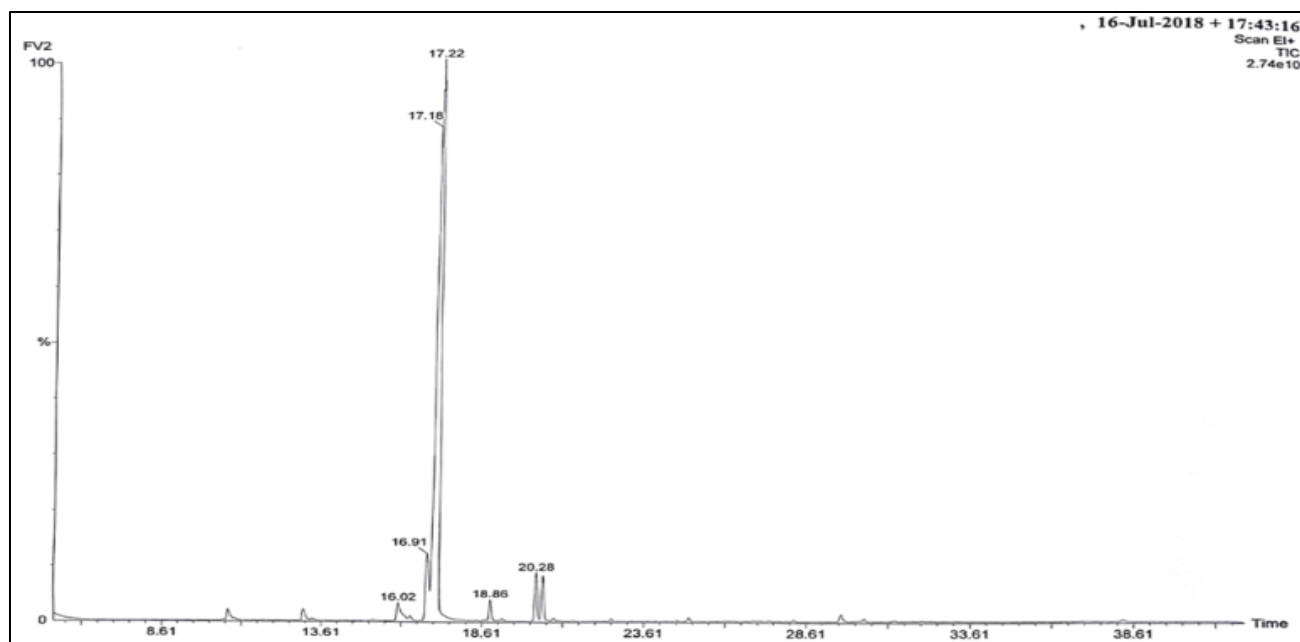
CC1



CC2



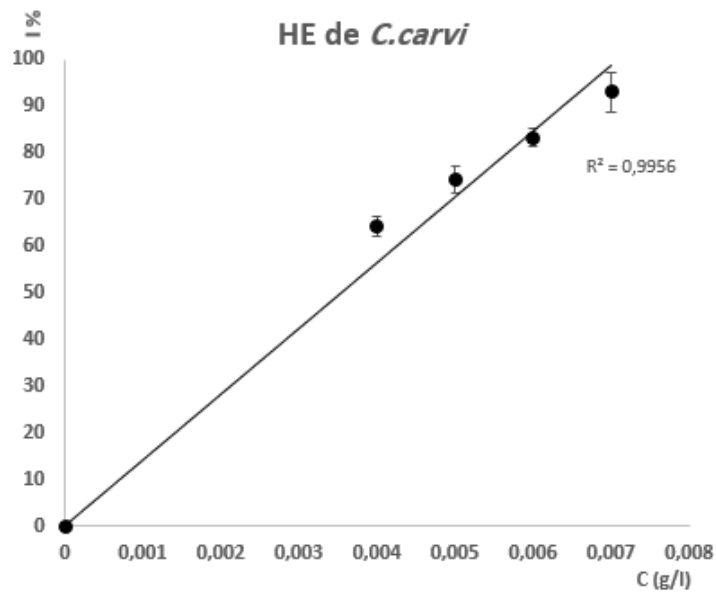
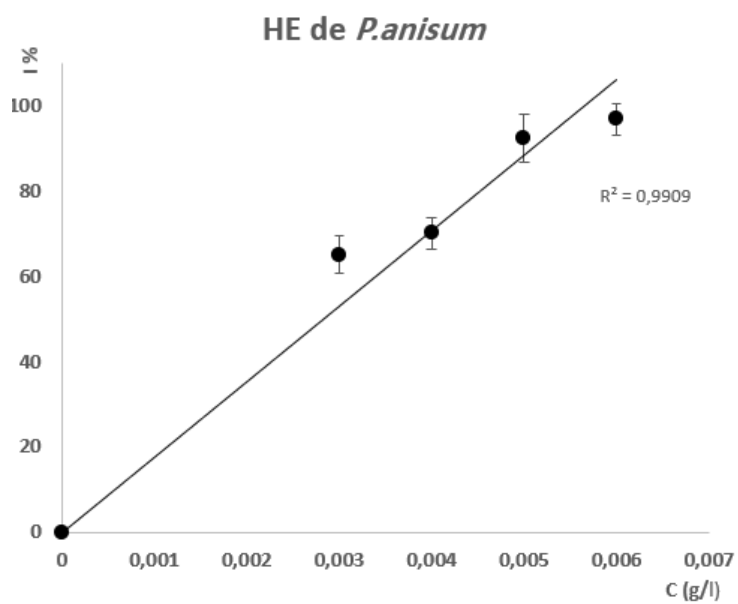
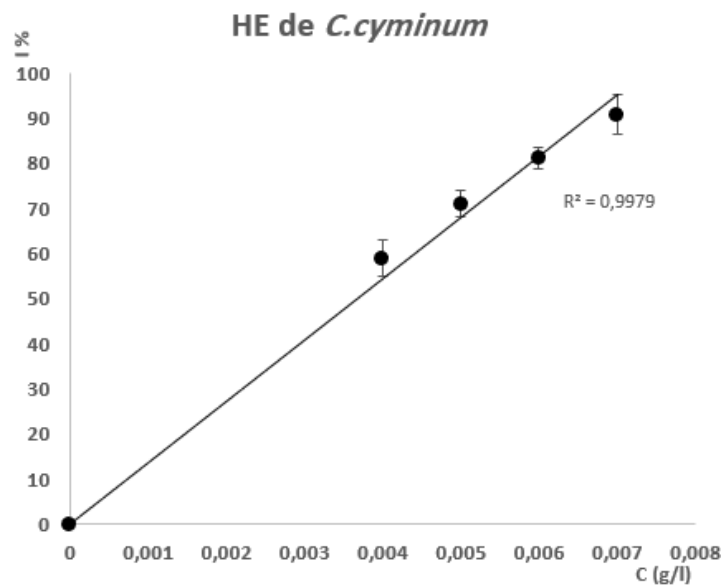
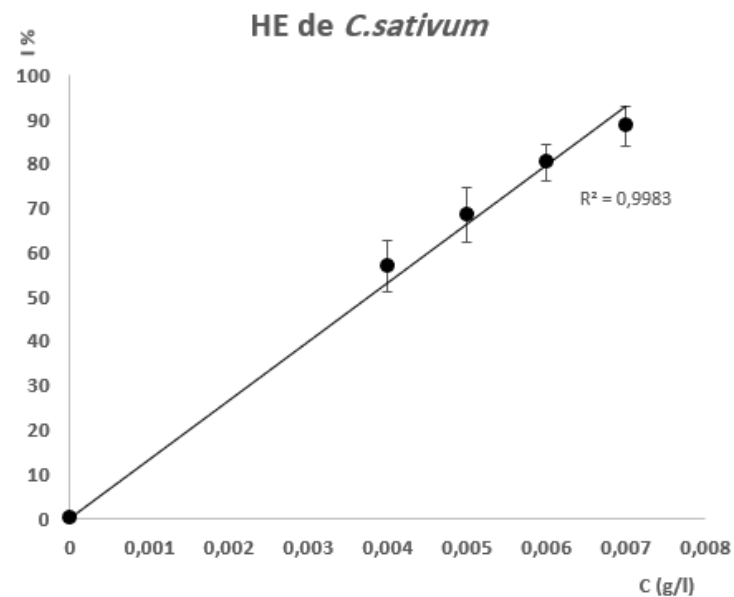
CS

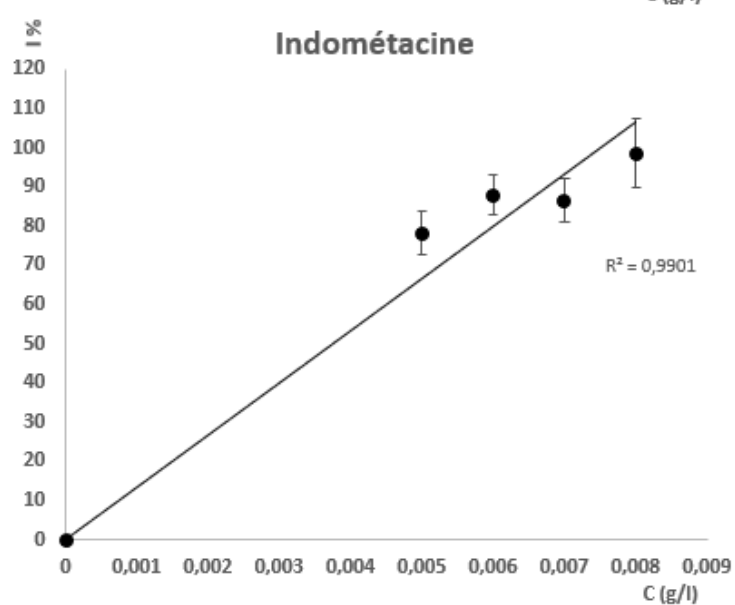
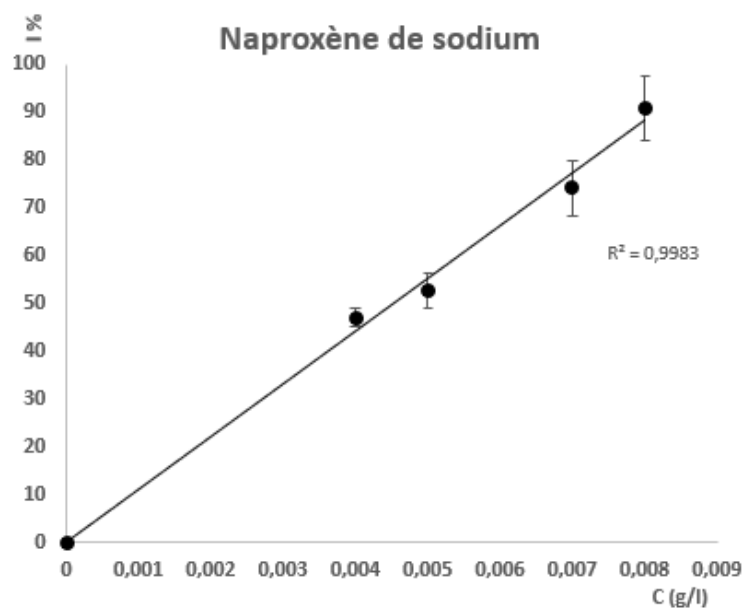
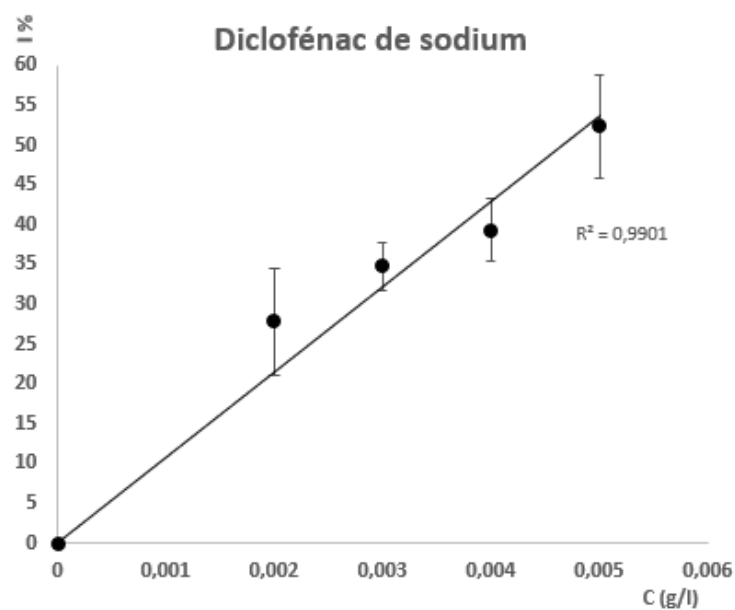
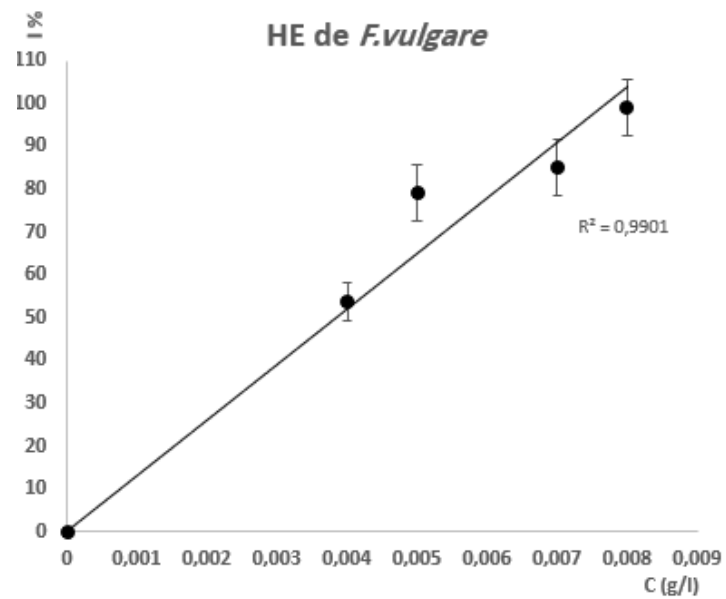


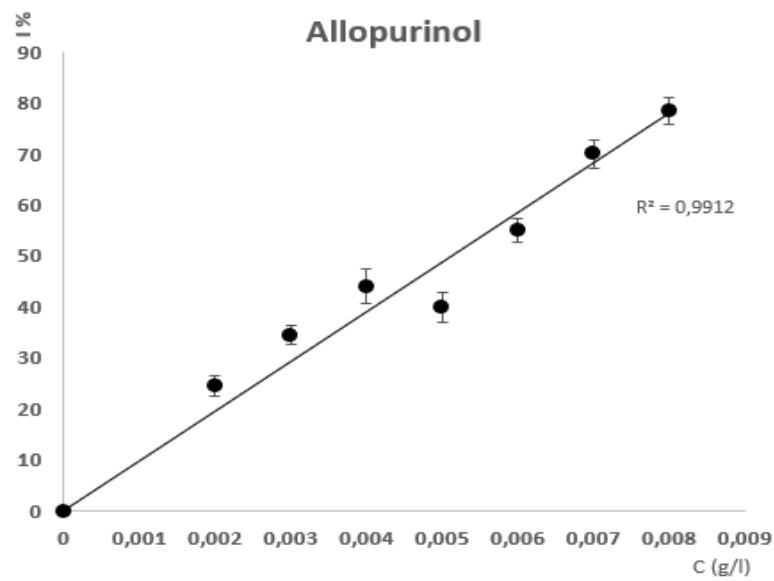
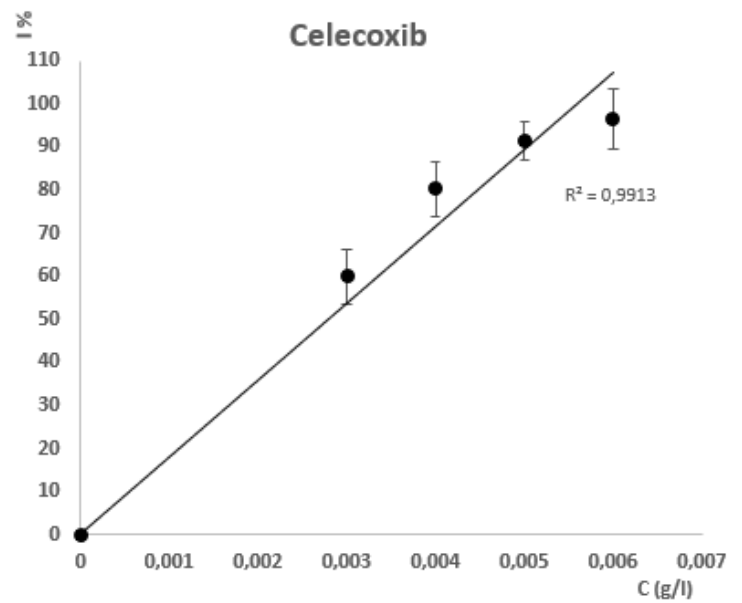
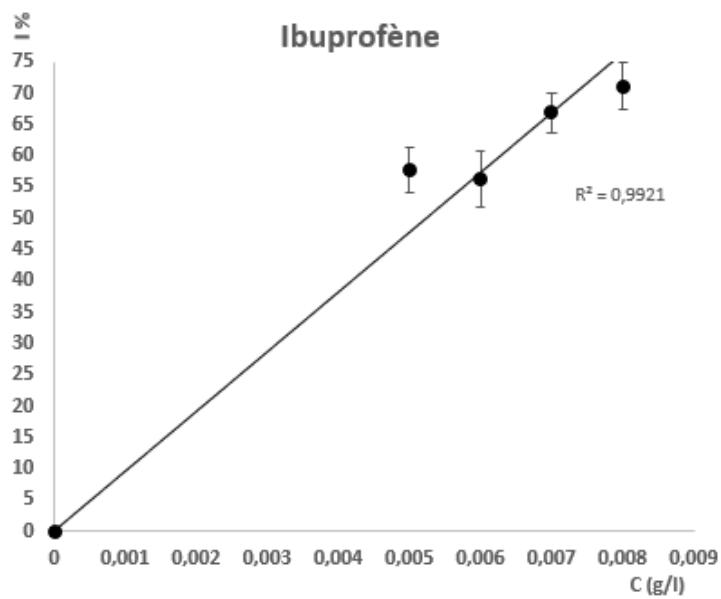
FV2

Annexe 4

Les représentations graphiques de l'inhibition enzymatique de la XOH $I\% = f(C)$ des huiles essentielles et des molécules testées.

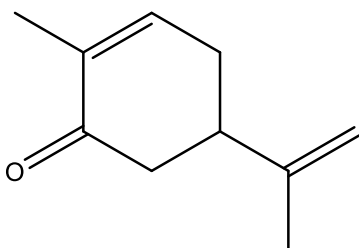
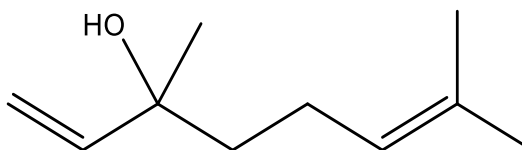
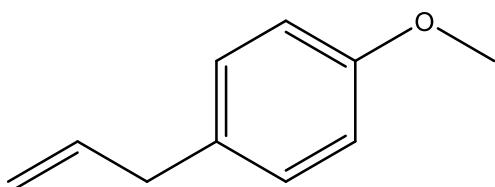
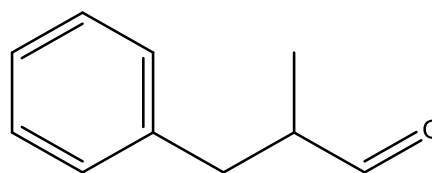
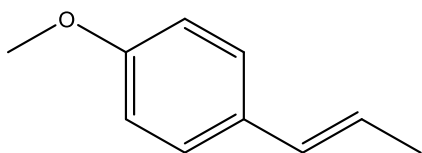
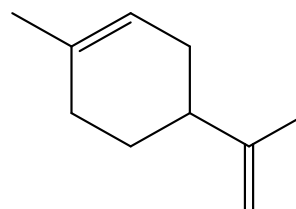
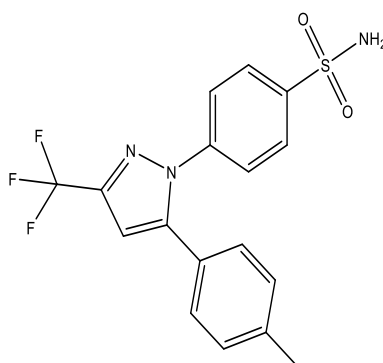


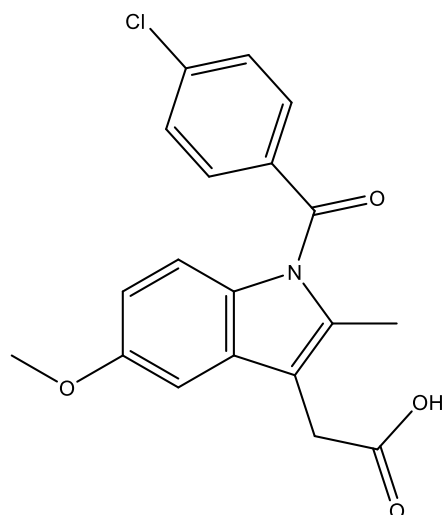
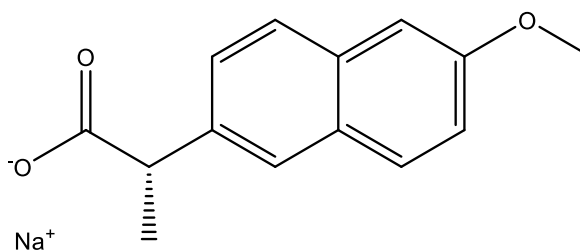
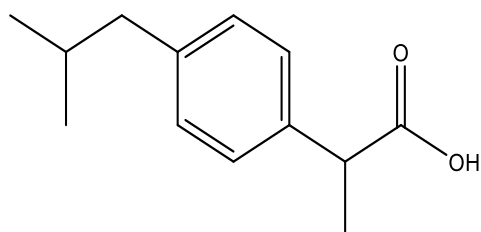
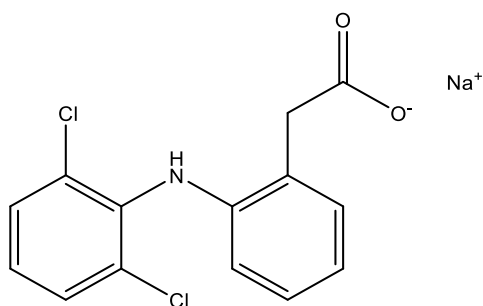


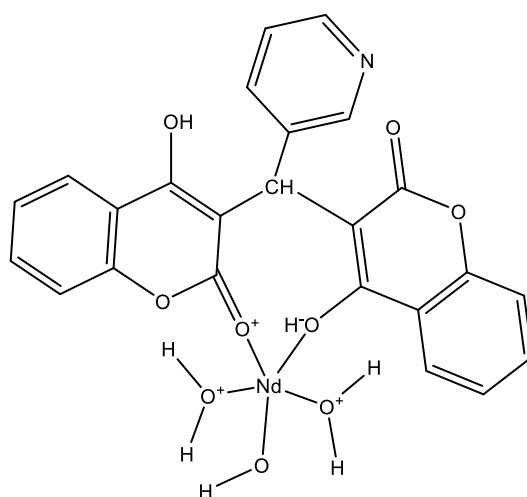
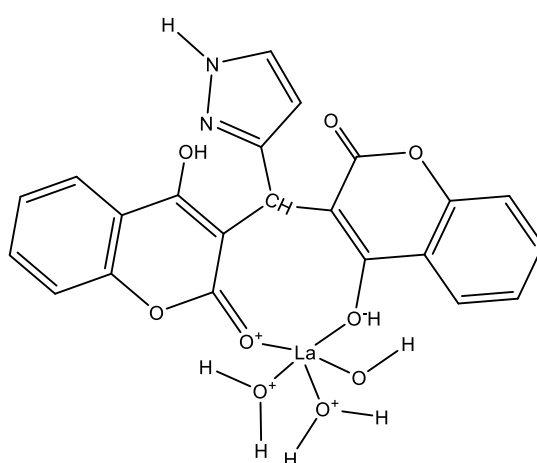
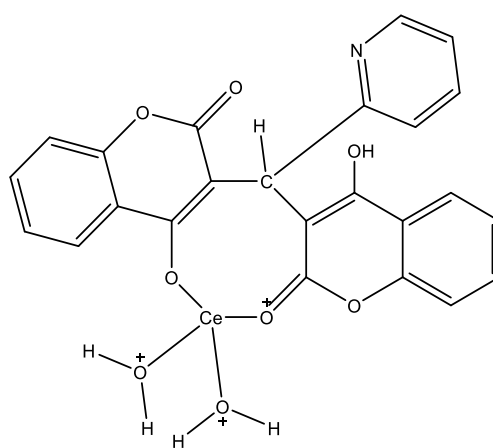


Annexe 5

Structures chimiques des molécules utilisées dans le Docking.

**Carvone****Linalol****Estragole****2-methyl-3-phenylpropanal****Anéthol****D-limonène****Celecoxib**

**Indométacine****Naproxène sodique****Ibuprofène****Diclofénac sodique**

**Neodymium (III)****Lanthanum (III)****Cérium (III)**

Annexe 6

Notice des réactifs de travail



URIC ACID

Acide Urrique

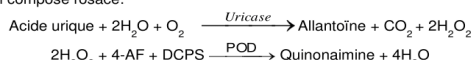
Uricase - POD. Enzymatique colorimétrique

Détermination quantitative d'acide urique IVD

Conserver à 2-8°C

PRINCIPE DE LA METHODE

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène ($2H_2O_2$) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4-aminophénazone (4-AF) et du 2-4 Diclorophénol sulphonate (DCPS) forme un composé rosacé:



L'intensité de quinonimine rouge formée est proportionnelle à la concentration d'acide urique présente dans l'échantillon testé².

SIGNIFICATION CLINIQUE

L'acide urique et ses sels sont le produit final du métabolisme des purines. En cas d'insuffisance rénale progressive, il existe une rétention de sang dans l'urée, de créatinine et d'acide urique.

Des niveaux élevés d'acide urique indiquent une pathologie rénale et sont souvent accompagnés de fuites urinaires^{1,5,6}.

Le diagnostic clinique doit être réalisé en tenant compte de toutes les données cliniques et des données de laboratoire.

REACTIFS

R 1	Phosphates pH 7,4	50 mmol/L
Tampon	2-4 Diclorophénol sulphonate (DCPS)	4 mmol/L
R 2	Uricase	60 U/L
Enzymes	Peroxydase (POD)	660 U/L
	Ascorbate oxydase	200 U/L
	4 - Aminophénazone (4-AF)	1 mmol/L
ACIDE URIQUE CAL	Patron primaire de détection d'acide urique	6 mg/dL

PREPARATION

Réactif de travail (RT): Dissoudre (→) le contenu d'une capsule d'enzymes de R 2 dans un peu de tampon R 1. Fermer et mélanger doucement jusqu'à dissoudre le contenu. Stabilité: 1 mois au réfrigérateur (2-8°C) ou 10 jours à température ambiante.

CONSERVATION ET STABILITE

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon, et s'ils sont maintenus hermétiquement fermés à 2-8°C, à l'abri de la lumière et des sources de contamination. Ne pas utiliser les réactifs en dehors de la date indiquée.

Indices de détérioration des réactifs:

- Présence de particules et turbidité.
- Absorption (A) du blanc à 520 nm $\geq 0,16$.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

- Spectrophotomètre ou analyseur pour les lectures à 520 nm.
- Cuvettes de 1,0 cm d'éclairage.
- Equipement classique de laboratoire.

ECHANTILLONS

- Sérum ou plasma¹: Stabilité 3-5 jours à 2-8°C et 6 mois à -20°C.
- Urine (24 h)¹: Stabilité 3 jours à température ambiante à pH > 8. Diluer l'échantillon dans 1/50 d'eau distillé. Mélanger. Multiplier le résultat obtenu par 50 (facteur de dilution); si l'échantillon est trouble, faites-le réchauffer à 60°C pendant 10 min pour dissoudre les précipités d'urate et d'acide urique. Ne pas placer au réfrigérateur.

PROCÉDURE

- Conditions de test:
Longueur d'ondes:520 nm (490-550)
Cuvette:1 cm d'éclairage
Température:37°C/15-25°C
- Régler le spectrophotomètre sur zéro en fonction de l'eau distillée
- Pipetter dans une cuvette:

	Blanc	Modèle	Echantillon
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Modèle (Remarque 2) (μL)	--	25	--
Echantillon (μL)	--	--	25

- Mélanger et incubé pendant 5 minutes à 37°C ou 10 minutes à 15-25°C.
- Lire l'absorption (a) du patron et l'échantillon, en comparaison avec le blanc du réactif. La couleur reste stable pendant au moins 30 minutes.

CALCULS

Sérum ou plasma

$$(A) \text{Echantillon} \times 6 (\text{Conc. Modèle}) = \text{mg/dL d'acide urique dans l'échantillon}$$

(A) Modèle

Urine 24 h

$$(A) \text{Echantillon} \times 6 \times \text{vol. (dL) urine /24h} = \text{mg/24 h d'acide urique}$$

(A) Modèle

Facteur de conversion: mg/dL x 59,5= μmol/L.

CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'analyser conjointement les échantillons de sérum dont les valeurs ont été contrôlées:

SPINTROL H Normal et pathologique (Réf. 1002120 et 1002210).

Si les valeurs se trouvent en dehors des valeurs tolérées, analyser l'instrument, les réactifs et le calibre.

Chaque laboratoire doit disposer de son propre contrôle de qualité et déterminer les mesures correctives à mettre en place dans le cas où les vérifications ne correspondraient pas aux attentes.

VALEURS DE REFERENCE⁵

Sérum ou plasma:

Femmes 2,5 - 6,8 mg/dL $\approx$ 149 - 405 μmol/L
Hommes 3,6 - 7,7 mg/dL $\approx$ 214 - 458 μmol/L

Urine:

250 - 750 mg/24 h $\approx$ 1,49 - 4,5 mmol/24 h

Ces valeurs sont données à titre d'information. Il est conseillé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs de référence.

CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

Gamme de mesures: Depuis la limite de détection de 0,03 mg/dL jusqu'à la limite de linéarité de 25 mg/dL.

Si la concentration de l'échantillon est supérieure à la limite de linéarité, diluer 1/2 avec du ClNa 9 g/L et multiplier le résultat final par 2.

Précision:

	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
Moyenne (mg/L)	4,74	11,4	4,72	11,2
SD	0,03	0,06	0,07	0,15
CV (%)	0,63	0,56	1,58	1,36

Sensibilité analytique: 1 mg/dL = 0,0347 A.

Exactitude: Les réactifs SPINREACT (y) ne montrent pas de différences systématiques significatives lorsqu'on les compare à d'autres réactifs commerciaux (x).

Les résultats obtenus avec 50 échantillons ont été les suivants:

Coefficient de corrélation (r): 0,99.

Equation de la Courbe de régression: $y=1,005x + 0,0005$

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier suivant l'analyseur employé.

INTERFERENCES

Aucune interférence n'a été constatée avec la bilirubine jusqu'à 170 μmol/L, avec l'hémoglobine jusqu'à 130 mg/dL, ni avec l'acide ascorbique jusqu'à 570 μmol/L². Différentes drogues ont été décrites ainsi que d'autres substances qui interfèrent dans la détermination de l'acide urique^{3,4}.

REMARQUES

- URIC ACID CAL: Etant donné la nature du produit, il est conseillé de le manipuler avec une grande précaution. En effet, il peut être contaminé avec facilité.
- Le calibrage au moyen du patron de détection peut donner lieu à des erreurs systématiques lors de méthodes automatiques. Dans de tels cas, il est conseillé d'utiliser des calibrages sériques.
- Utiliser des embouts de pipettes jetables propres pour diffuser le produit.
- SPINREACT dispose de consignes détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Schultz A. Uric acid. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1261-1266 and 418.
- Fossati P et al. Clin Chem 1980;26:227-231.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTATION

Ref: 1001010	Cont.	R1: 10 x 20 mL, R2:10 → 20 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001011		R1: 10 x 50 mL, R2:10 → 50 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001012		R1: 4 x 125 mL, R2:4 → 125mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001013		R1: 4 x 250 mL, R2:4 → 250mL, CAL: 1 x 5 mL





BIOLABO
www.biolabo.fr

FABRICANT :
BIOLABO SAS,
Les Hautes Rives
02160, Maizy, France

ACIDE URIQUE Méthode Uricase

Réactif pour le dosage quantitatif de l'acide urique dans le plasma et le sérum humains, ou les urines.

REF 80351	R1 6 x 30 mL	R2 6 x 30 mL	R3 1 x 5 mL
REF 80001	R1 2 x 100 mL	R2 2 x 100 mL	R3 1 x 5 mL
REF 87601	R1 6 x 200 mL	R2 6 x 200 mL	R3 1 x 10 mL

SUPPORT TECHNIQUE ET COMMANDES

Tel : (33) 03 23 25 15 50
Fax : (33) 03 23 256 256



CODE CNQ: M2

IVD USAGE IN VITRO

INTERET CLINIQUE (1) (2)

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

PRINCIPE (1) (3)

L'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (dichloro-hydroxybenzène sulfonate et amino-antipyrine) pour former une quinonéimine, complexe de couleur rouge. L'absorbance mesurée à 520 nm (490-530), est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans le spécimen.

REACTIFS

flacon R1	ENZYMES
Hexacyanoferrate (II) de potassium	42 µmol/L
Peroxydase	≥ 450 U/L
Amino-antipyrine	0,150 mmol/L
Uricase	≥ 120 U/L

flacon R2	TAMPON
Dichlorohydroxybenzène sulfonate	2 mmol/L
Tris pH 8,0 à 25°C	50 mmol/L
Conservateur	

flacon R3	ETALON
Acide Urique 100 mg/L (595 µmol/L)	

PRECAUTIONS

Les réactifs BIOLABO sont destinés à du personnel qualifié, pour un usage in vitro.

- Vérifier l'intégrité des réactifs avant leur utilisation.
 - Utiliser des équipements de protection (blouse, gants, lunettes).
 - Ne pas pipeter avec la bouche.
 - En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
 - Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1%) qui peut réagir avec les métaux tel que le cuivre ou le plomb des canalisations. Rincer abondamment.
 - La fiche de données de sécurité peut être obtenue sur simple demande.
 - Elimination des déchets : respecter la législation en vigueur.
- Par mesure de sécurité, traiter tout spécimen comme potentiellement infectieux. Respecter la législation en vigueur.

PREPARATION DES REACTIFS

Flacon R1 : Utiliser un objet non coupant pour enlever la capsule aluminium.

Verser sans délai le contenu du flacon R1 (Enzymes) dans le flacon R2 (Tampon). Agiter doucement jusqu'à complète dissolution avant d'utiliser le réactif (environ 2 minutes).

STABILITE ET CONSERVATION

Stocker à 2-8°C dans le flacon d'origine bien rebouché et à l'abri de la lumière.

- Etalon (flacon R3) : Transvaser la quantité nécessaire, bien reboucher et stocker à 2-8°C.
- Le réactif R1 (avant ouverture) et les réactifs R2 et R3, sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret s'ils sont utilisés et conservés dans les conditions préconisées.
- Après reconstitution, le réactif de travail est stable au moins 1 mois en l'absence de contamination.
- Ne pas utiliser le réactif de travail s'il est trouble ou si l'absorbance à 520 nm > 0,100.
- Ne pas utiliser le réactif de travail après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN (4)

Sérum non hémolysé, plasma prélevé sur héparine ou EDTA.

Urines diluées (1+9) dans l'eau distillée avant dosage.

L'acide urique est stable dans le spécimen :

- 3 jours à température ambiante.
- une semaine à 2-8°C.
- jusqu'à 6 mois congelé à -20°C.

Ajouter NaOH pour maintenir les urines alcalines et prévenir la précipitation de l'acide urique.

INTERFERENCES (3) (5)

Un taux élevé de bilirubine et/ou d'acide ascorbique interfère négativement avec le dosage. Les résultats peuvent être surévalués en cas de lipémie élevée ou d'hémolyse du spécimen.

Patient traité à la vitamine C : l'interférence due à l'acide ascorbique peut être réduite en laissant le spécimen 2 heures à température ambiante avant d'effectuer le dosage.

Young D.S. a publié une liste des substances interférant avec le dosage.

REACTIFS ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES

1. Equipement de base du laboratoire d'analyses médicales.
2. Sérums de contrôle normaux et pathologiques.

CALIBRATION

- Etalon du coffret (flacon R3) ou BIOLABO Multicalibrator [REF] 95015 (valeur obtenue en titrant un échantillon représentatif du lot avec les réactifs BIOLABO contre un matériau de référence traçable sur SRM913a).
- Ou tout calibrant raccordé sur une méthode ou un matériau de référence.

La fréquence de calibration dépend des performances de l'analyseur et des conditions de conservation du réactif.

Il est recommandé de calibrer à nouveau dans les cas suivants :

1. Changement du lot de réactif.
2. Après opérations de maintenance sur l'analyseur.
3. Les valeurs de contrôle obtenues sortent des limites de confiance, même après utilisation d'un deuxième flacon de sérum de contrôle fraîchement reconstitué.

CONTRÔLE DE QUALITE**CODE CNQ: M2**

- BIOLABO EXATROL-N Taux I [REF] 95010.
- BIOLABO EXATROL-P Taux II [REF] 95011.
- Tout autre sérum de contrôle titré pour cette méthode.
- Programme externe de contrôle de la qualité.

Il est recommandé de contrôler dans les cas suivants :

- Au moins un contrôle par série.
 - Au moins un contrôle par 24 heures.
 - Changement de flacon de réactif.
 - Après opérations de maintenance sur l'analyseur.
- Lorsqu'une valeur de contrôle se trouve en dehors des limites de confiance indiquées, appliquer les actions suivantes :
1. Répéter le test en utilisant le même contrôle.
 2. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, préparer un sérum de contrôle fraîchement reconstitué et répéter le test.
 3. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, utiliser un autre calibrant ou un calibrant fraîchement reconstitué et répéter le test.
 4. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre flacon de réactif et répéter le test.
 5. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, contacter le service technique BIOLABO ou le revendeur local.

INTERVALLES DE REFERENCE (4)

Sérum ou plasma	ACIDE URIQUE	
	mg/L	[μmol/L]
Enfant(*)	20-55	[119-327]
Homme	35-72	[208-428]
Femme(**)	26-60	[155-357]

Urines	250-750 mg/24h	[1,48-4,43 mmol/24 h]
--------	----------------	-----------------------

(*) Taux plus élevé chez l'enfant nouveau né.

(**) Taux plus faible durant la grossesse.

Il est recommandé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs de référence pour la population concernée.

PERFORMANCES

Intra-série N = 20	Taux normal	Taux élevé	Inter-série N = 20	Taux normal	Taux élevé
Moyenne mg/L	53,2	89,7	Moyenne mg/L	52,6	90,2
S.D. mg/L	0,49	0,49	S.D. mg/L	1,2	1,2
C.V. %	0,9	0,55	C.V. %	2,2	1,3

Limite de détection : environ 3 mg/L

Sensibilité pour 100 mg/L : 0,370 Abs. à 520 nm.

Comparaison avec réactif du commerce:

$$y = 0,9953 x - 0,2539 \quad r = 0,9923$$

LIMITE DE LINEARITE

La réaction est linéaire jusqu'à 200 mg/L (1190 μmol/L).

Au delà, diluer le spécimen avec une solution NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte de la dilution dans le calcul du résultat. La limite de linéarité dépend du rapport de dilution spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés :	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif de travail	1 mL	1 mL	1 mL
Spécimen (Rq 1)			25 μL
Etalon		25 μL	
Eau déminéralisée	25 μL		

Mélanger. Laisser reposer 5 minutes à 25°C.
Lire les absorbances à 520 nm (490-530) contre le blanc réactif.
La coloration est stable 30 minutes.

Remarque :

1. Sérum, plasma, ou urines diluées (1 + 9) dans l'eau déminéralisée.
2. Des procédures spécifiques sont disponibles pour les analyseurs automatiques. Contacter le service technique BIOLABO.
3. Le volume spécimen peut être réduit à 20 μL (linéarité accrue, légère baisse de sensibilité).

CALCUL

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

Sérum et plasma :

$$\text{Résultat} = \frac{\text{Abs (Dosage)}}{\text{Abs (Etalon)}} \times \text{concentration de l'Etalon}$$

Urines diluées (1 + 9) :

Multiplier le résultat ci dessus par 10 (facteur de dilution)

REFERENCES

- (1) TIETZ N.W. Text book of clinical chemistry, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 1245-1250.
- (2) BERNARD S. Biochimie clinique-Instruments et techniques de laboratoire-Diagnostic médicaux chirurgicaux. 2^{ed} éd. 1989 p153-156 Ed. MALOINE PARIS.
- (3) FOSSATI, P., PRENCIPE L., and BERTI G., Use of 3,5-dichloro-2-Hydroxybenzene sulfonic acid / 4 Amino phenazone chromogenic system in direct enzymatic assays of uric acid in serum and urine. Clin. Chem. : 26(227-231) 1980
- (4) Clinical Guide to Laboratory Test, 4th Ed., N.W. TIETZ (2006) p. 1098-1099.
- (5) YOUNG D.S., Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests, 4th Ed. (1995) p. 3-609 à 3-622
- (6) SRM: Standard Reference Material®

Fabricant Date de péremption Usage "In vitro" Température de conservation Référence Produit Consulter la notice Numéro de lot Conserver à l'abri de la lumière Suffisant pour diluer avec

Made in France

Dernière version : www.biolabo.fr

Version : 25/07/2011