

N°Réf :.....

## Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

# Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

## Prédiction *in silico* de la structure 3D et étude d'amarrage moléculaire de la xanthine oxydoréductase

Présenté par :

- LAMRI ZEGAR Safa
- CHADI Houyame

Devant le jury composé de :

Président : KELLAB Rabah	M.A.A	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila
Promotrice : BOUCHERIT Hanane	M.C.B	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila
Examinatrice : MERZOUG Amina	M.C.B	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Année Universitaire : 2020/2021

# **Remerciement**

*A Dieu nous nous inclinons et de Dieu nous nous inspirons, Seigneur merci d'avoir veillé sur cet humble travail que seules vos bénédictions en étaient la cause.*

*Nous tenons à notifier que notre plus grande gratitude va à notre encadreur :*

**Dr. BOUCHERIT Hanane**

*A Notre mentor le long de cette expérience, merci à vous Madame pour votre partage du savoir-faire et de l'expertise que vous avez apportés à notre travail et surtout pour la confiance accordée, ce qui nous a permis de mener à bien ce travail.*

*Nous exprimons toute notre reconnaissance à Monsieur le président du Jury:*

**M. KELLAB Rabah**

*A Qui nous honore en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements vont à:*

**Mme MERZOUG Amina**

*Pour l'intérêt qu'il a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.*

*Enfin, nous remercions nos familles, nos amis et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités*

# *Dédicace*

*A ma chère mère : **Leila***

*Tu m'inspires la force par un simple sourire, entre tes mains mes malheurs partent accompagnant un soupir, et en ta présence le bon Dieu ne cesse me bénir.*

*A mon cher père : **Sadek***

*Comme un phare tu illumines et corriges mon cap ; qu'importent mes tombées, tu m'attrapes. A toi l'ami, le frère, le maître ; t'honorer est ma raison d'être.*

*A ma tendre sœur adorée ; **Imane** et à ma cousine préférée : **Achouaket** mes petits cousins d'amour : **Ishak ; Younes ; Mohamed ; Oussama Et Abderrahmane***

*A Mes très chères frères de cœur : **Akram Et Mounir***

*Avec qui je partage la joie et la peine, vos mots d'encouragement se comptent par centaines, grâce à vous en moi j'y crois et à présent sereine.*

*A ma grand-mère **Zahiya** ; A ma grand-mère : **Sakina** que le dieu me les protège.*

*A tous mes êtres chers, membres de la famille **LAMRI ZEGAR** et **kedadra***

*une longue liste d'amies, à celles d'enfance : **Nour ; Mouad ; Hasna ; Mariya** ; et à celles d'extrême importance : **Meriem** .A tous ceux qui m'ont aimée, aidée et guidée*

*A mon Binôme : **Ch. Houyame***

*Je ne changerai pour rien au monde notre collaboration, merci pour ta sagesse, ton soutien, ta confiance ; j'ai trouvé en toi le pilier sur lequel je m'appuyais ; l'épaule sur lequel je pleurais. Ma confidente je te remercie pour ta sincérité, ton respect et ton amour.*

*Ma gratitude à vous tous*

**Safa**

# *Dédicace*

*A ma chère mère : **Akila***

*Tu m'inspires la force par un simple sourire, entre tes mains mes malheurs partent  
accompagnant un soupir, et en ta présence le bon Dieu ne cesse me bénir.*

*A mon cher père : **Hamou***

*Comme un phare tu illumines et corriges mon cap ; qu'important mes tombées, tu  
m'attrapes. A toi l'ami, le frère, le maître ; t'honorer est ma raison d'être.*

*A mes tendres sœurs adorées ; **Ibtissam et Anfal** et à ma cousine préférée : **Soufia** et mes  
petits cousins d'amour : **Amir ; Batoul***

*A Mes très chères frères de cœur : **Oussama et Yasser***

*Avec qui je partage la joie et la peine, vos mots d'encouragement se comptent par  
centaines, grâce à vous en moi j'y crois et à présent sereine.*

*A ma grand-mère **Atra** que le dieu me les protège.*

*A tous mes êtres chers, membres de la famille **CHADI et BAHOUH***

*Une longue liste d'amies, à celles d'enfance : **Nour ; chahrazad** ; et à celles d'extrême  
importance : **Meriem**. A tous ceux qui m'ont aimée, aidée et guidée*

*A mon Binôme : **LAMRI ZEGAR Safa***

*Je ne changerai pour rien au monde notre collaboration, merci pour ta sagesse, ton  
soutien, ta confiance ; j'ai trouvé en toi le pilier sur lequel je m'appuyais ; l'épaule sur  
lequel je pleurais. Ma confidente je te remercie pour ta sincérité, ton respect et ton  
amour.*

*Ma gratitude à vous tous*

**Houyame**

## **Thème : Prédiction *in silico* de la structure 3D et étude d'amarrage moléculaire de la xanthine oxydoréductase**

### **Résumé**

La xanthine oxydoréductase représente une cible thérapeutique très importante, en tant qu'elle implique dans l'inhibition du stress oxydatif et les problèmes de santé qui en découlent. Pour contourner les limites du criblage expérimental, une nouvelle approche alternative basée principalement sur des techniques informatiques a été envisagée ; c'est le docking moléculaire.

L'objectif principal de notre étude était de tester la performance du programme de docking Surflex-dock par trois critères. Dans un premier temps, le test de RMSD, ou critère de déviation de la structure obtenue par docking par rapport à la structure donnée par diffraction aux rayons X. Les résultats du RMSD obtenus montrent que 84% des valeurs sont inférieures ou égales à 2 Å. Dans un deuxième temps, l'analyse par régression linéaire nous a permis de rechercher la corrélation entre l'énergie d'interaction obtenue par Surflex-dock et l'activité biologique ( $IC_{50}$ ), cette analyse donne un coefficient de corrélation "  $r = 0.65$  ". Enfin, ces tests ont été suivis par une analyse visuelle de la superposition des ligands de référence et ceux obtenus par docking moléculaire. Nos résultats montrent que le logiciel Surflex-dock fonctionne correctement. Il peut donc être utilisé pour découvrir de nouveaux inhibiteurs de la XOR.

Dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la XOR, nous avons réalisés un docking moléculaire par le logiciel Surflex-dock d'une collection de 482 similaires du composé TEI avec 90% de similarité. Deux similaires: CID\_144411068 et CID\_123307845 avec des affinités égales à 9.89 et 9.28  $M^{-1}$  respectivement, sont considérées comme les meilleurs inhibiteurs théoriquement potentiels de la XOR plus affines et plus sélectifs que la TEI.

Enfin, la prédiction de la similaire médicamenteuse nous renseigne de manière positive sur les propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité de ces nouvelles molécules proposées.

**Mots clés :** Xanthine Oxydoréductase, Stress Oxydatif, Docking Moléculaire, Surflex-dock, RMSD, ADME -Tox.

## **Theme: *In silico* prediction of the 3D structure and molecular docking study of xanthine oxidoreductase**

### **Summary**

Xanthine oxidoreductase is a very important therapeutic target, as it involves in the inhibition of oxidative stress and the resulting health problems. To circumvent the limits of experimental screening, a new alternative approach based mainly on computer techniques has been considered; this is molecular docking.

The main objective of our study was to test the performance of the Surflex-dock docking program by three criteria. First, the RMSD test, or criterion of deviation of the structure obtained by docking compared to the structure given by X-ray diffraction. The results of the RMSD obtained show that 84% of the values are less than or equal to 2 Å. In a second step, the linear regression analysis allowed us to look for the correlation between the interaction energy obtained by Surflex-dock and biological activity (IC<sub>50</sub>), this analysis gives a correlation coefficient "  $r = 0.65$ . Finally, these tests were followed by a visual analysis of the superposition of the reference ligands and those obtained by molecular docking. Our results show that the Surflex-dock software works correctly. It can therefore be used to discover new XOR inhibitors.

In order to discover new, more powerful XOR inhibitors, we made molecular docking using Surflex-dock software from a collection of 482 similar to the TEI compounds with 90% similarity. Two similar: CID\_144411068 and CID\_123307845 with affinities equal to 9.89 and 9.28 M<sup>-1</sup> respectively, are considered to be the best theoretically potential XOR inhibitors more refined and selective than TEI.

Finally, the prediction of the similar drug positively informs us about the physicochemical, pharmacokinetic and toxicity properties of these proposed new molecules.

**Keywords:** Xanthine Oxidoreductase, Oxidative Stress, Molecular Docking, Surflex-dock, RMSD, ADME -Tox.

## الموضوع: التنبؤ الافتراضي للهيكـل ثلاثي الأبعاد ودراسة الالتحام الجزيئي

### Xanthine oxidoreductase -L

#### الملخص

يمثل **Xanthine oxidoreductase** هدفاً علاجياً مهماً للغاية، حيث يشار إلى كيفية تثبيط الإجهاد التأكسدي والمشاكل الصحية الناتجة عنه. للتحايل على قيود الفحص التجريبي، تمت مناقشة نهج بديل جديد يعتمد بشكل أساسي على تقنيات الكمبيوتر؛ إنه الالتحام الجزيئي.

كان الهدف الرئيسي من دراستنا هو اختبار أداء برنامج Surflex-dockin عن طريق ثلاثة معايير.

أولاً، اختبار RMSD، أو معيار انحراف الهيكل الذي تم الحصول عليه عن طريق الالتحام فيما يتعلق بالهيكل المعطى من حيود (انحراف) الأشعة السينية. تظهر نتائج RMSD التي تم الحصول عليها أن 84 % من القيم أقل من أو تساوي 2 Å.

ثانياً، سمح لنا تحليل الانحدار الخطي بإيجاد الارتباط بين طاقة التفاعل التي تم الحصول عليها بواسطة Surflex-dock والنشاط البيولوجي (IC50)، وهذا التحليل يعطي معامل ارتباط "r = 0.65".

ثالثاً، أعقبت هذه الاختبارات بتحليل مرئي لتراكب الروابط المرجعية وتلك التي تم الحصول عليها عن طريق الالتحام الجزيئي. تظهر نتائجنا أن برنامج Srflex-dock يعمل بشكل صحيح. لذلك يمكن استخدامه لاكتشاف مثبطات جديدة لـ XOR.

في محاولة لاكتشاف مثبطات XOR الجديدة والأكثر فاعلية، أجرينا الالتحام الجزيئي بواسطة برنامج Surflex-dock - Surflex مجموعة من 482 مجموعة متشابهة من مركب TEI مع تشابه بنسبة 90%.

الثنائية المتشابهة: CID\_144411068 و CID\_123307845 مع تقاربات تساوي 9.89 و 9.28 M-1 على التوالي، يعتبر ان أفضل مثبطات محتملة نظرياً لـ XOR أكثر انتقائية وأكثر تقارب من TEI.

أخيراً، يوفر لنا التنبؤ بالعقار المشابه معلومات إيجابية عن الخصائص الفيزيائية والكيميائية والحركية الدوائية والسمية لهذه الجزيئات المقترحة الجديدة.

**الكلمات المفتاحية:** Xanthine Oxydoreductase، الإجهاد التأكسدي، الالتحام الجزيئي، Surflex-dock، RMSD، ADME-Tox.

## **Table des matières**

Résumé

Summary

المخلص

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des Graphes

Liste des abréviations

**Introduction** ..... 1

### **CHAPITRE I: Le stress oxydatif**

I. Historique ..... 5

II. Définition de stress oxydative..... 5

III. Les radicaux libres..... 6

III.1. Définition ..... 6

III.2. Production de radicaux libres dans le corps humain..... 6

III.3. Sources de radicaux libres ..... 6

III.3.1. Sources exogène ..... 6

III.3.2. Source endogène ..... 7

IV. Les espaces réactives..... 8

V. Dommages oxydatifs des macromolécules..... 8

V.1. L'acide désoxyribonucléique ..... 9

V.2. Les protéines : ..... 9

V.3. Les lipides et les lipoprotéines ..... 9

VI. Les systèmes de défenses antioxydants..... 10



VI.1. Système de défenses antioxydants enzymatique .....	10
VI.2. Système de défenses antioxydants non-enzymatiques .....	11
VII. Stress oxydant et pathologies humaines.....	11

**CHAPITRE II: La xanthine oxydoréductase**

I. Définition .....	16
II. Distribution et localisation.....	16
II.1. Dans le sein .....	17
II.2. Dans l'intestin .....	18
II.3. Dans les reins .....	18
II.4. Dans le foie.....	18
III. Gène de la XOR.....	18
IV. Structure et voie de transfert d'électrons dans la XOR.....	19
V. La conversion de la XDH à XO.....	20
VI. Mécanisme d'action de la xanthine oxydoréductase.....	21
VII. Pathologies liées à la XOR.....	22
VII.1. L'inflammation.....	22
VII.2. L'ischémie / réperfusion.....	22
VII.3. Le stress oxydatif.....	23
VIII. Les inhibiteurs de la XOR .....	23
Référence .....	27

**CHAPITRE III: Docking moléculaire**

I. Introduction .....	31
II. Définition de docking .....	31
III. Principe de docking moléculaire .....	32
IV. Les outils du docking moléculaire.....	33
IV.1. Récepteur .....	33
IV.2. Ligand.....	34

IV.3. . Programmes de docking .....	34
V. Les interactions intermoléculaires .....	35
V.1. Les interactions hydrogène .....	35
V.2. Les interactions de Van der Waals.....	36
V.3. Les interactions hydrophobes.....	36
VI. Types de docking moléculaire.....	37
VI.1. Docking rigide .....	37
VI.2. Docking flexible .....	37
VI.3. Docking semi-flexible .....	38
VII. Etapes typiques du Docking moléculaire.....	38
VII.1. Détermination des structures .....	39
VII.2. Préparation des structures.....	39
VII.3. Docking moléculaire .....	39
VII.4. Prédiction et évaluation .....	39
VIII. Avantages et les limites de l'amarrage moléculaire .....	40
VIII.1. Avantage de docking.....	40
VIII.2. Limites d'amarrage moléculaire .....	40

#### **CHAPITRE IV: Matériel et méthodes**

I. Matériel .....	46
I.1. Micro-ordinateur.....	46
I.2. Banques de données.....	46
I.2.1. La Protéine Data Bank (PDB).....	46
I.2.2. PubChem.....	46
I.3. Programmes .....	47
I.3.1. Le logiciel Surflex-dock .....	47
I.3.2. Open Babel.....	48
I.3.3. ViewerLite .....	48

I.4. Les Serveurs .....	48
I.4.1. SwissADME .....	48
I.4.2. PreADMET .....	49
II. Méthodes.....	49
II.1. Réalisation du docking moléculaire .....	49
II.2. Evaluation de programme Surflex-dock .....	50
II.2.1. Le RMSD.....	50
II.2.2. Analyse visuelle.....	51
II.2.3. Coefficient de corrélation r .....	51
III. Docking de cible enzymatique XOR .....	51
III.1. Préparation de l'enzyme XOR .....	51
III.2. Préparation des inhibiteurs.....	52
III.3. Etude des interactions des meilleurs inhibiteurs .....	52
IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse .....	52
IV.1. Propriété physicochimique .....	53
IV.2. Propriétés pharmacocinétiques .....	53
IV.3. La toxicité .....	55

## **CHAPITRE V: Résultats et discussions**

I. Tests de fiabilité de programme Surflex-dock .....	60
I.1. La précision du positionnement des composés (RMSD).....	60
I.2. Analyse visuelle par MSViewer .....	64
II. Etude des interactions intervenant dans l'inhibition de la xanthine oxydoréductase par l'inhibiteur TEI.....	69
II.1. Notion du site actif .....	69
II.2. Les acides aminés de site actif de la XOR .....	69
II.3. Analyse visuelle des interactions XOR-TEI par le programme ViewerLite42.....	69
III. Proposition de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase.....	73

III.1. Inhibition de la XOR par les similaires de l'inhibiteur TEI.....	73
III.2. Sélection des meilleures similaires .....	80
III.3. Etude des interactions des deux similaires sélectionnés .....	81
III.3.1. Analyse visuelle CID_144411068-XOR.....	81
III.3.2. Analyse visuelle CID_123307845- XOR.....	83
IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse .....	85
IV.1. Prédiction des propriétés physicochimiques.....	85
IV.2. Prédiction de propriétés pharmacocinétiques .....	86
IV.3. Prédiction de la toxicité .....	87
<b>Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>90</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>93</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1</b> : Pathologies liées au stress oxydatif .....	12
<b>Tableau II.1</b> : Les inhibiteurs de la XOR .....	24
<b>Tableau III.1</b> : Principaux programmes de docking moléculaire. ....	35
<b>Tableau V.1</b> : Liste de 150 complexes utilisés pour calculer le RMSD .....	60
<b>Tableau V.2</b> : Valeurs de RMSD des trois complexes choisis .....	65
<b>Tableau V.3</b> : Les liaisons hydrogène établies par le TEI avec le site actif de la XOR. ....	72
<b>Tableau V.4</b> : Résultats de docking avec le logiciel Surflex-dock dans le site actif de la XOR	73
<b>Tableau V.5</b> : Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats. .....	81
<b>Tableau V.6</b> : Les liaisons hydrogène établies par compose CID_144411068 avec le site actif de la XOR.....	82
<b>Tableau V.7</b> : Les liaisons hydrogène établies par le composé CID_123307845avec le site actif de la XOR.....	84
<b>Tableau V.8</b> : Critères de la règle de <i>Lipinski</i> pour les différents inhibiteurs choisis à partir de serveur swissADME.....	86
<b>Tableau V.9</b> : Propriétés pharmacocinétiques des composés choisis obtenues à partir de serveur SwissADME.....	86
<b>Tableau V.10</b> : Profil de toxicité des inhibiteurs étudiés obtenus à partir de serveur preADMET .....	87

## Liste des figures

<b>Figure I.1</b> : Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes .....	5
<b>Figure I.2</b> : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres.....	7
<b>Figure I.3</b> : Principales espèces réactives de l'oxygène .....	8
<b>Figure I.4</b> : Molécules intervenant dans les protections cellulaires .....	10
<b>Figure I.5</b> : Spectre de différentes pathologies touchant divers organes dans lesquelles le stress oxydant est impliqué .....	12
<b>Figure II.1</b> : Réactions d'oxydoréduction catalysée par les deux formes de la XOR .....	16
<b>Figure II.2</b> : Tissus humains exprimant un niveau élevé de la xanthine oxydoréductase et fonction locale des activités et produits XOR.....	17
<b>Figure II.3</b> : Localisation de gène de la XOR.....	19
<b>Figure II.4</b> : Structure cristalline de la xanthine oxydoréductase. ....	19
<b>Figure II.5</b> : Voie de transfert d'électrons dans la XOR .....	20
<b>Figure II.6</b> : Conception et construction de la XO et la XDH .....	21
<b>Figure II.7</b> : Représentation du mécanisme réactionnel de la XOR .....	22
<b>Figure II.8</b> : Rôle du XO dans le stress oxydatif cellulaire .....	23
<b>Figure III.1</b> : Procédures générales pour l'amarrage moléculaire.....	32
<b>Figure III.2</b> : La représentation schématique du docking de deux molécules.....	32
<b>Figure III.3</b> : Principe général de docking moléculaire.....	33
<b>Figure III.4</b> : La liaison hydrogène.....	36
<b>Figure III.5</b> : Illustration des principaux types d'interaction entre dipôles.....	36
<b>Figure III.6</b> : Patch hydrophobe.....	37
<b>Figure III.7</b> : La liaison ionique.....	37
<b>Figure III.8</b> : Étapes typiques d'un docking.....	38
<b>Figure IV.1</b> : Site de la Protéine Data Bank (PDB) .....	46
<b>Figure IV.2</b> : Site de la PubChem .....	47
<b>Figure IV.3</b> : Site de serveur SwissADME.....	48

<b>Figure IV.4 :</b> Site de serveur PreADMET .....	49
<b>Figure IV.5 :</b> Les différentes valeurs de r .....	51
<b>Figure IV.6 :</b> Visualisation des interactions réalisées entre les meilleurs inhibiteurs et les résidus du site actif de la XOR obtenu par ViewerLite. ....	52
<b>Figure IV.7 :</b> Les voies de transport à travers la BHE .....	54
<b>Figure IV.8 :</b> Le rôle des cytochromes P450 .....	55
<b>Figure V.1 :</b> Superposition du ligand EFZ du complexe 1FK9 simulé par Surflex-dock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en orange).....	65
<b>Figure V.2 :</b> Superposition du ligand 1UN du complexe 2R5Q simulé par Surflex-dock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en orange).....	66
<b>Figure V.3 :</b> Superposition du ligand FDI du complexe 1B9S simulé par Surflex-dock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en orange). ....	67
<b>Figure V.4 :</b> Représentation de la cavité du site actif de la XOR complexée avec le TEI.....	70
<b>Figure V.5 :</b> Analyse visuelle par ViewerLite 42 du mode d'interaction du ligand TEI avec le site actif de la XOR. ....	71
<b>Figure V.6 :</b> Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé TEI avec la XOR.....	72
<b>Figure V.7 :</b> Analyse visuelle par ViewerLite42 du mode d'interaction de similaire CID_144411068 avec le site actif de la XOR .....	82
<b>Figure V.8 :</b> Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé CID_144411068 et le site actif de la XOR .....	83
<b>Figure V.9 :</b> Analyse visuelle par ViewerLite42 du mode d'interaction de similaire CID_123307845avec le site actif de la XOR .....	84
<b>Figure V.10 :</b> Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé CID_123307845 et le site actif de la XOR .....	85

## Liste des graphes

<b>Graphe V.1</b> : Résultats en % obtenus par Surfex-dock à plusieurs intervalles de RMSD (Å)...	63
<b>Graphe V.2</b> : Résultats en pourcentage du test RMSD à deux intervalles. ....	64
<b>Graphe V.3</b> : Corrélation entre l'activité biologique (LogIC <sub>50</sub> ) des inhibiteurs et leurs Affinités données par Surfex-dock.....	68



## Liste des abréviations

**2D** : Deux dimensions

**3D**: Trois dimensions

**Å** : Angström

**ADME/Tox** : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excretion, Toxicité

**ADN** : Acide desoxyribonucléique

**ADP** : Adenosine diphosphate

**AO** : Agent oxydants

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ATP** : Adenosine triphosphate

**BHE** : Barrière-hémato-encéphalique

**C5a** : Complément anaphylatoxines

**CID** : Code identifiant

**CYP** : Cytochrome Protéine

**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène

**FAD** : Flavine adénine dinucléotide

**GI** : Gastro-intestinale

**GPx** : Glutathion peroxydase

**hERG** : Human Ether-a-go-go Related Gene

**IC50** : Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition

**IL** : Interleukine

**KDa** : Kilo Dalton

**LH** : Liaison hydrogène

**Log P** : Le Coefficient De Partition Octanol /Eau

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PDB**: Protein Data Bank

**RCSB:** Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

**RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire

**RMSD:** Root Mean Square Deviation

**RONs:** Reactive Oxygen Azote Species

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**SIB :** Institut Suisse De Bioinformatique

**SOD :** Superoxyde Dismutase

**TNF- $\alpha$  :** Facteur De Nécrose Tumorale

**UA:** Acide Urique

**UV :** Ultra-violet

**VDW :** Van Der Walls

**XDH :** Xanthine Déshydrogénase

**XO :** Xanthine Oxydase

**XOR :** Xanthine Oxydoréductase

# *Introduction*



## INTRODUCTION

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient [1]. La recherche en biologie ne peut, actuellement, se passer des outils informatiques pour traiter le flot de données produites et optimiser ses avancées [2]. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo-saxon "docking") qui est une des méthodologies les plus utilisées à l'heure actuelle, c'est à dire le positionnement automatique d'une molécule de faible poids moléculaire au sein du site de liaison. La procédure générale de ces outils est divisible en cinq étapes : la représentation de la protéine, celle du ligand, l'échantillonnage conformationnel de la protéine et du ligand, et enfin l'attribution d'un score à chaque pose à travers une fonction de score. La sélection des molécules est finalement réalisée en choisissant celles possédant les meilleurs scores [3].

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire le déséquilibre entre la production cellulaire de radicaux libres, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des espèces réactives oxygénées et azotées (RONS) et des défenses antioxydants de l'organisme [4]. Le stress oxydant est un facteur d'inflammation et de mutagenèse, mais il est aussi considéré comme une des principales causes de cancer et jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer, comme dans plusieurs pathologies plus courantes telles que les maladies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes [5]. Parmi leurs cibles thérapeutiques, la xanthine oxydoréductase (XOR) qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et xanthine en acide urique, qui est responsable des dommages oxydatifs des tissus, durent la réoxydation de la xanthine oxydase il y a formation d'un radical superoxyde et d'un hydrogène peroxyde [6]. C'est pour cette raison l'inhibition de cette enzyme est une cible attractive très utilisée dans le traitement et la prévention de plusieurs maladies [7].

Dans cette étude Nous nous intéressons au traitement par inhibition enzymatique de la XOR. Il s'agit dans ce travail de simuler l'inhibition *in silico* en utilisant le programme de docking moléculaire Surflex-dock afin de détecter le meilleur inhibiteur de cette enzyme et par la même de proposer de nouveaux candidats médicament contre le stress oxydatif.

Le but de cette étude est :

- De tester, dans un premier temps, la fiabilité de programme de docking Surflex-dock par le RMSD et le coefficient de corrélation linéaire.

- Dans un deuxième temps, d'étudier l'inhibition de la xanthine oxydoréductase par la méthode de docking moléculaire. Nous nous intéressons à déterminer le mode d'interaction, lors de la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme durant la formation du complexe XOR-inhibiteur, avec une meilleure complémentarité par le calcul de l'affinité du complexe formé. Le composé qui aura la plus grande affinité est celui qui présentera la meilleure activité et par la suite une meilleure inhibition.

- Finalement, d'étudier les propriétés ADME-Tox des meilleurs inhibiteurs proposés.

Ces résultats aideront probablement au développement d'un outil thérapeutique efficace pour lutter contre le développement de stress oxydatif.

## Référence

- [1] Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19** : 1639-1662 .
- [2] Levinthal C., Wodak S. J., Kahn P., Dadvanian A. K. 1975. Hemoglobin interaction in sickle cell fibers. I. Theoretical approaches to the molecular contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72** : 1330-34.
- [3] Taylor R. D., Jewsbury P. J., Essex J. W. 2002. Une examen de la méthode d'amarrages des petites molécules de protéines *J. Comput. Aided Mol.* **16** : 151-66.
- [4] Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* **91** : 31-38.
- [5] Gutteridge J. M. 1993. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* **19** : 141-158.
- [6] Anthoni J. 2007. Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomère de flavonoïde. Thèse de doctorat en procédés biotechnologique et alimentation. Institut Nationale Polytechnique de lorraine. France. 223p.
- [7] Hamlaoui I. 2014. Etude théorique des réactions enzymatiques : cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par des nouvelles chalcones. Thèse de doctorat en sciènes. Université Constantine 1. Algérie. 85p.

*CHAPITRE I:*  
*Le stress oxydatif*

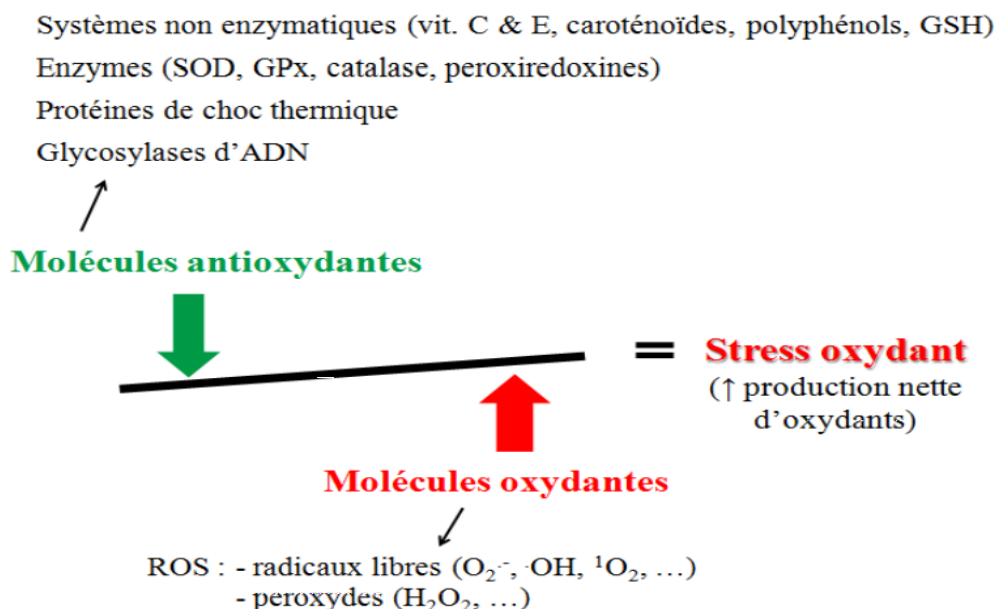


## I. Historique

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartmann avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants [1].

## II. Définition de stress oxydative

Le stress oxydant est un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires (ou réactives) de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydants [2]. Il se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels [3].



**Figure I.1 :** Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes [4].



### **III. Les radicaux libres**

#### **III.1. Définition**

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. La réactivité de ces radicaux ne doit cependant pas être exagérée; la demi-vie de ces composés instables est extrêmement courte (10<sup>-9</sup> à 10<sup>-6</sup> s) et tous n'ont pas la même réactivité et le même potentiel lésionnel [5].

#### **III.2. Production de radicaux libres dans le corps humain**

Les radicaux libres sont dérivés soit de processus métaboliques essentiels normaux dans le corps humain, soit de sources externes telles que l'exposition aux rayons X, à l'ozone, au tabagisme, aux polluants atmosphériques et aux produits chimiques industriels. La formation de radicaux libres se produit en continu dans les cellules à la suite de réactions enzymatiques et non enzymatiques. Les réactions enzymatiques, qui servent de source de radicaux libres, comprennent celles impliquées dans la chaîne respiratoire, dans la phagocytose, dans la synthèse des prostaglandines et dans le système du cytochrome P-450. Ces radicaux peuvent également se former dans des réactions non enzymatiques de l'oxygène avec des composés organiques ainsi que celles initiées par des réactions ionisantes [6].

#### **III.3. Sources de radicaux libres**

##### **III.3.1. Sources exogène**

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes.). Les rayonnements UV induisent la synthèse de O<sub>2</sub>•-, OH•, 1O<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> l'intermédiaire d'agents photo sensibilisant [7]. L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels..), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libre [8].

### III.3.2. Source endogène

La production des ERO dans les cellules des mammifères découle de plusieurs sources essentiellement d'origine enzymatique :

- **La Mitochondries** est la source de production majeure d'O<sub>2</sub><sup>°</sup> dans la cellule [9].
- **L'inflammation** est une source de radicaux oxygénés produits directement par le complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires activées [5].
- **La phagocytose** des bactéries et parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène [10].
- **Xanthine oxydase** : Dans certaines conditions physiopathologiques, cette oxydoréductase peut être soumise à un début de digestion protéasique ou d'altération oxydative, et peut produire le radical anion superoxyde et/ou du peroxyde d'hydrogène lors de l'oxydation de l'hypo xanthine et de la xanthine [11]. La xanthine déshydrogénase est alors qualifiée de xanthine oxydase. Cette génération d'espèces oxydantes par la xanthine oxydase a été montrée dans plusieurs modèles expérimentaux comme jouant un rôle crucial dans la genèse du stress oxydatif et la sévérité des lésions observées [9].

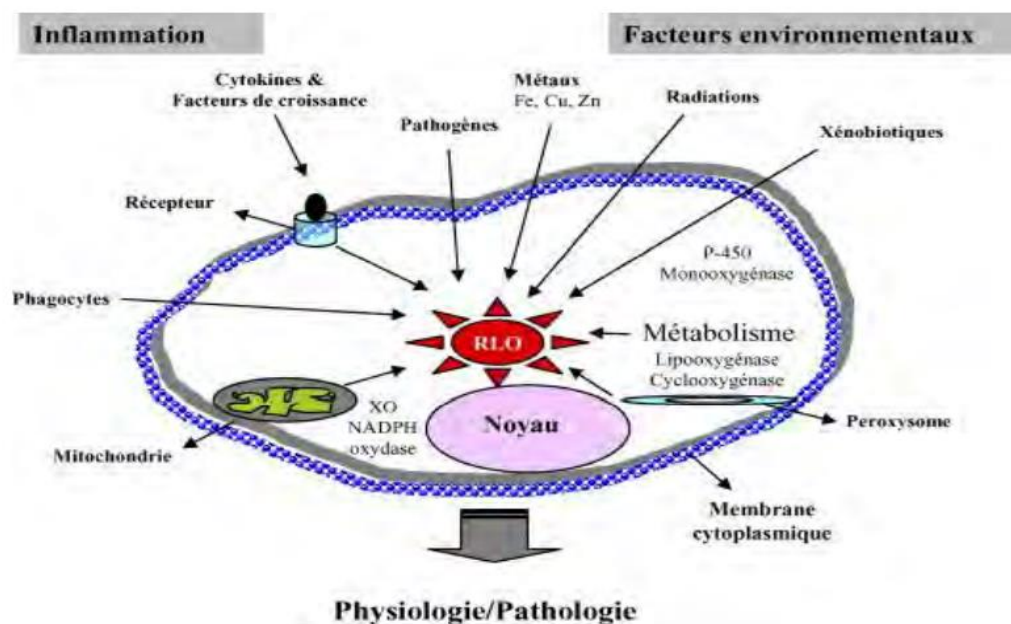


Figure I.2 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres [12].

#### IV. Les espaces réactives

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP en ATP. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des EOA. Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription [1].

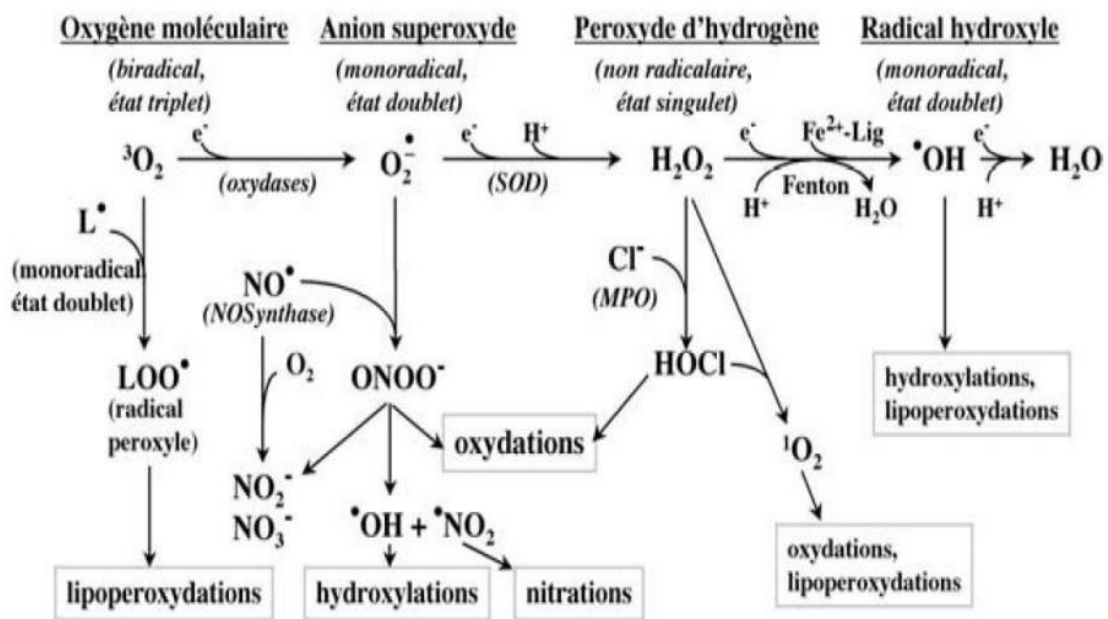


Figure I.3 : Principales espèces réactives de l'oxygène [13].

#### V. Dommages oxydatifs des macromolécules

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides [10].

### **V.1. L'acide désoxyribonucléique**

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec •OH pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, leur Conséquences [1, 3] :

- Altération de la fonction mitochondriale ;
- Formation d'espèces mutagènes ;
- Activation des systèmes de réparation.

### **V.2. Les protéines**

Les dommages oxydatifs protéiques ciblent potentiellement les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) et aromatiques (trypsine, histidine) à cause de leur sensibilité à ces attaques due à l'abondance de groupements sulfhydryles (SH) dans leurs structures. Conséquences des dommages oxydatifs des protéines produisent des changements structuraux majeurs par réticulation et fragmentation des structures protidiques à l'origine des modifications des propriétés des protéines responsables de nombreuses altérations des fonctions cellulaires suite à [3] :

- Des inhibitions enzymatiques ;
- Perte de spécificité ligand-récepteur ;
- Dénaturation des épitopes antigéniques ;
- Perturbations métaboliques ;
- Échappement à la dégradation et accumulation tissulaire.

### **V.3. Les lipides et les lipoprotéines**

La cible majeure de l'attaque radicalaire est les acides gras polyinsaturés, comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique, présents notamment dans les membranes plasmiques. Leur oxydation par les ERO provoque [2, 3] :

- Une atteinte de l'intégrité des structures membranaires ;
- Dysfonctionnements cellulaires ;
- Modification de la structure des lipoprotéines ;
- Amplification des dommages cellulaires.

## VI. Les systèmes de défenses antioxydants

Dans le cas d'une production physiologique de radicaux libres, l'organisme dispose de différents systèmes efficaces de protection qui lui permettent de lutter contre ces espèces radicalaires [5]. Les antioxydants sont définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce dernier [3]. Les défenses cellulaires contre les espèces oxydantes peuvent être enzymatiquement assistées ou non.

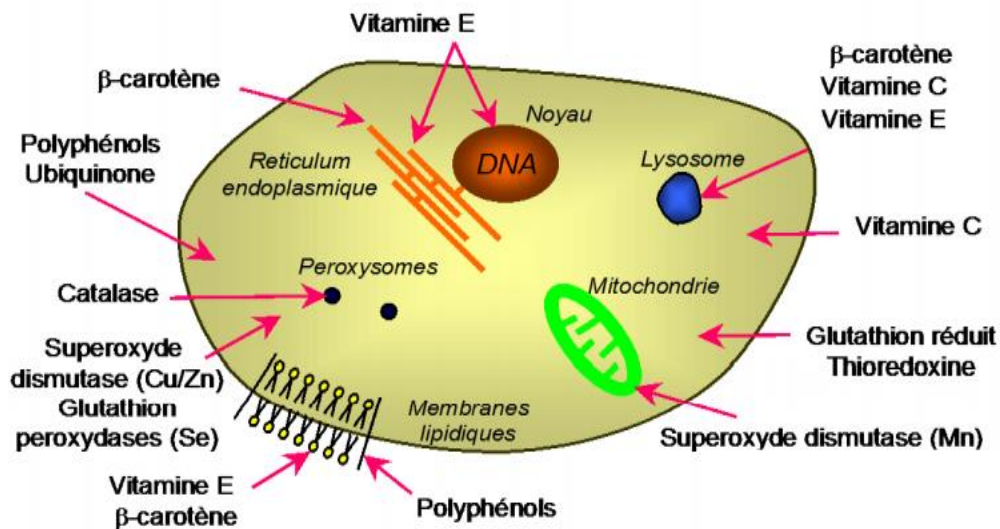


Figure I.4 : Molécules intervenant dans les protections cellulaires [14].

### VI.1. Système de défenses antioxydants enzymatique

- **Les superoxydes dismutases (SOD)** : Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde  $O_2^{\bullet-}$  par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène [1].



- **La catalase** : Le rôle de la catalase est d'accélérer la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène biomoléculaire [14]. Selon la réaction :



- **Glutathion peroxydase (GPx)** : est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydro peroxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydro peroxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur selon la réaction suivante [14] :



## VI.2. Système de défenses antioxydants non-enzymatiques

- **Les vitamines** : captent l'électron libre d'un radical libre qui devient une molécule ou un ion stable. La vitamine devient un radical détruit ou régénéré Vit C antioxydant puissant, inhibe peroxydation lipidique, régénère vitamine E. Vit E antioxydant puissant, inhibe la peroxydation lipidique. Vit A [15].
- **Les composés phénoliques** : leur capacité antioxydant réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique [14].
- **Les caroténoïdes** : l'activité antioxydant de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O<sub>2</sub>•-, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet [14].
- **Les oligoéléments antioxydants** : sont des micronutriments qui sont fortement impliqués dans l'homéostasie énergétique. Ce sont des cofacteurs indispensables pour des réactions métaboliques d'enzymes antioxydants comme la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Il s'agit principalement du cuivre, du manganèse, du sélénium et du zinc [13].

## VII. Stress oxydant et pathologies humaines

De nombreuses pathologies, impliquant le stress oxydant dans leur développement, ont été recensées. Le tableau I.1 et la figure I.6 suivant donne une aide sur ces différentes maladies.

Tableau I.1 : Pathologies liées au stress oxydatif [1, 7].

Maladies où le stress oxydatif est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydatif est le facteur déclencheur	Maladies entraînant un stress oxydatif secondaire
<p>Cancers</p> <p>Auto-immunité</p> <p>Cataracte</p>	<p>Maladie d'Alzheimer</p> <p>Stérilité Masculine.</p> <p>Rhumatismes</p> <p>Athéromes</p> <p>Asthmes</p>	<p>Diabète</p> <p>Insuffisance Rénale</p> <p>Maladie de Parkinson.</p>

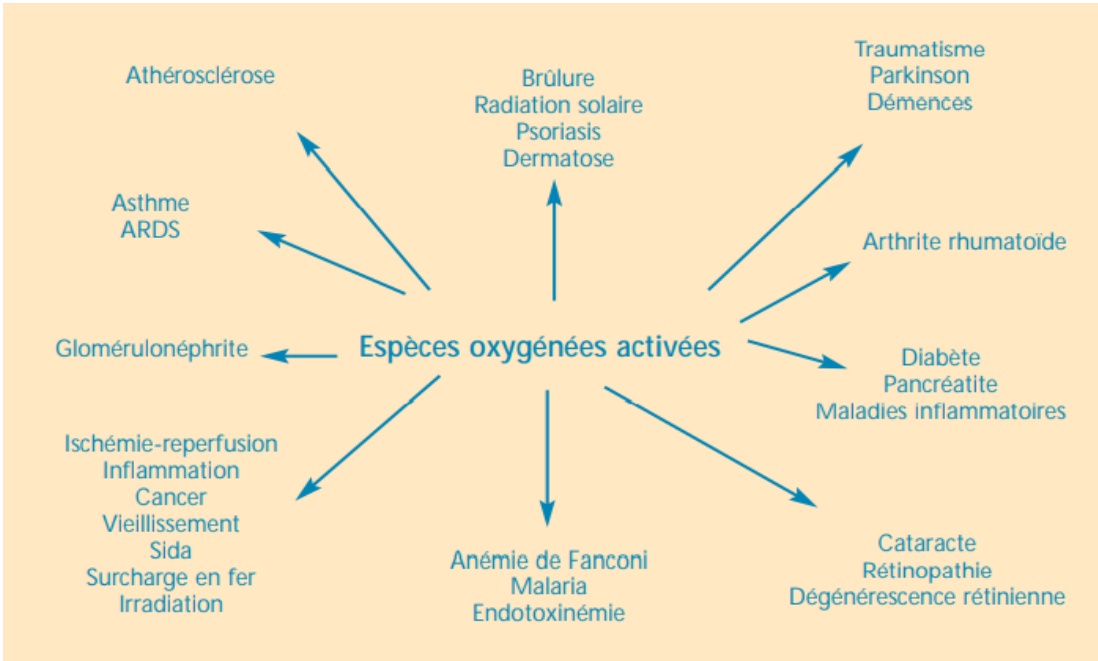


Figure I.5 : Spectre de différentes pathologies touchant divers organes dans lesquelles le stress oxydant est impliqué [16].

## Référence

- [1] Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J. P. 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege*. **10** : 628-638.
- [2] Migdal C., Serres M. 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*. **27** : 405-412.
- [3] BENSAXHRIA A .2018 . Le Stress Oxydatif. *Revue de toxicologie général* **9** :70-86.
- [4] Lavoie M. E. 2012. Inflammation, stress oxydant, profil métabolique : influence des apports alimentaires et de la dépense énergétique. Thèse de doctorat en nutrition. Université de Montréal. Canada. 326p.
- [5] HININGER I., BIGARD X. 2007.Exercice stress oxydatif et apports nutritionnels spécifiques. *Revue de nutrition du sportif*. **7** :126-155.
- [6] Lobo V., Patil A., Phatak A. Chandra N. 2010 .free radicals, antioxydants and fonctionel foods: Impact on humen health. *Revue de pharmacognosie*. **4**: 118-126.
- [7] Zerargui F. 2015. Activité antioxydant des extraits de racines *Tamus communis* L. Et caractérisation des substances bioactives. Thèse de doctorat en biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1 .Algérie. 126p.
- [8] Mena S., Ortega A., Estrela J. M. .2009. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. Mutation. *Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **2** : 36-44.
- [9] Guerin J.C., Leophonte P., Lebas F.X., Liard F., Terrioux Ph., Boulanger P. 2005. Le stress oxydatif en pathologie bronchopulmonaire : apport de la N-acétyl-cystéine (NAC).*Rev. Pneumol. Clin*. **1**:16-21.
- [10] Favier A. 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. **8** : 108-115.
- [11] Vamecq J., Vallée L., Storme L., Gelé P., Bordet R. 2004. Les acteurs immédiats du stress oxydatif Key players in oxidative stress. *La Lettre du Pharmacologue*. **1** :16-23.



[12] AFONSO V., CHAMPY R., MITROVIC D., COLLIN P., LOMRI A. 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*. **74** : 636-643.

[13] Guillouty A.2016 .Plantes médicinales et antioxydants .Thèse de docteur en pharmacie .université Toulouse iii Paul Sabatier. France. 95p.

[14] Rezaire A.2012 .Activité antioxydant, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat en Phytochimie .Université des Antilles et de la Guyane. Guyane. 193p.

[15] Collard J. 2010. Les systèmes de défense antioxydants. [https://www.synlab.be/images/cwattachments/14\\_ba2cc87677f84d40bdaa6b27b9d9db05.pdf](https://www.synlab.be/images/cwattachments/14_ba2cc87677f84d40bdaa6b27b9d9db05.pdf). Consulté le: [02 /06/2021].

[16] Pincemail J., Heusele C., Bonté F., Limet R., Defraigne J.O. 2001. Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones – Nutrition*. **4** : 158-164.

# *CHAPITRE II:*

*La xanthine*

*oxydoréductase*



## I. Définition

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une molybdoflavoprotéine cytosolique complexe ubiquitaire a été isolée pour la première fois à partir de lait du bovins par Schardinger en 1902 [1, 2].

Chez les mammifères, l'enzyme a deux formes interchangeable [2, 3 et 4] : la xanthine oxydase (XO, EC 1.17.3.2) et la xanthine déshydrogénase (XDH, EC 1.17.1.4), qui génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS). En fait, la fonction la plus importante est liée au catabolisme des purines [5] ; Les deux formes catalysent la conversion de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique (UA) [6].

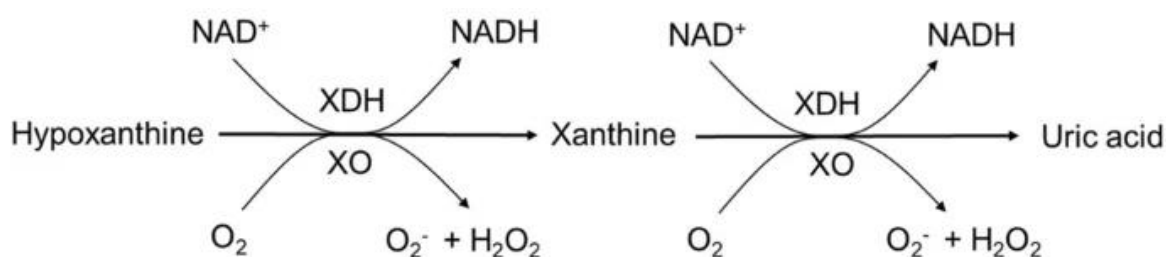
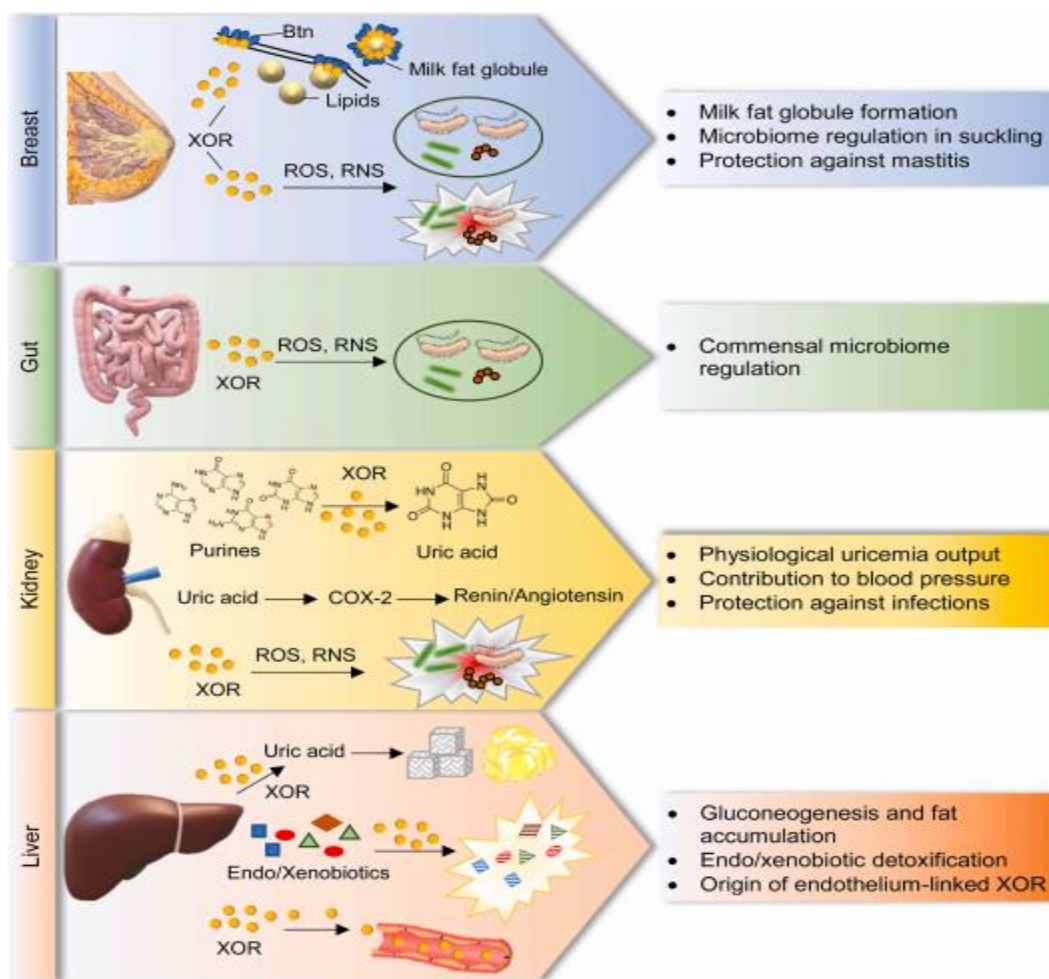


Figure II.1 : Réactions d'oxydoréduction catalysée par les deux formes de la XOR [6].

## II. Distribution et localisation

L'enzyme xanthine oxydoréductase a une large distribution dans les organismes vivants et est hautement conservée chez les espèces procaryotes, végétales et animales [7]. Chez les mammifères, l'activité de cette enzyme est largement distribuée, avec des niveaux les plus élevés étant trouvés dans le foie et l'intestin [8]. Il est également situé dans l'épithélium et la muqueuse des glandes mammaires, la muqueuse du cœur, des poumons et les reins [9].

Chez l'homme, la XOR est principalement présent dans : les cellules endothéliales capillaires, tissu pulmonaire, glande mammaire, foie et muqueuses et il a une faible activité dans muscle squelettique, cœur et cerveau [10]. En particulier, un large éventail de niveaux d'activité a été signalé dans les fluides biologiques, tels que le sang et le lait [11].



**Figure II.2 :** Tissus humains exprimant un niveau élevé de la xanthine oxydoréductase et fonction locale des activités et produits XOR [12].

### II.1. Dans le sein

La sécrétion des globules gras du lait pendant la lactation est médiée par le regroupement de la protéine transmembranaire, la butyrophiline 1A1 (Btn). La XOR contribue à la sécrétion de lipides apocrines en induisant une réorganisation de la membrane apicale, permettant ainsi le clustering Btn et l'amarrage membranaire des gouttelettes de matière grasse laitière [12]. Au lait, la XOR produit du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'oxyde nitrique (NO) que la lactoperoxydase utilise pour former de l'hypothiocyanite et du dioxyde d'azote, qui neutralisent la croissance de bactéries opportunistes, protégeant ainsi le sein de la mammite. De plus, cette action bactéricide dans le lait laisse indemne la flore commensale de la cavité buccale néonatale, estomac et intestin, régulant ainsi le microbiome intestinal. Pour toutes ces raisons, la XOR est indispensable à la croissance régulière du nouveau-né [13].

## **II.2. Dans l'intestin**

Le renouvellement fréquent des entérocytes assure une présence abondante de la XOR dans la lumière intestinale où les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont dérivées de la XOR et les espèces azotées réactives (RNS) exercent une activité protectrice contre les infections opportunistes, tout en épargnant le microbiome commensal [12].

## **II.3. Dans les reins**

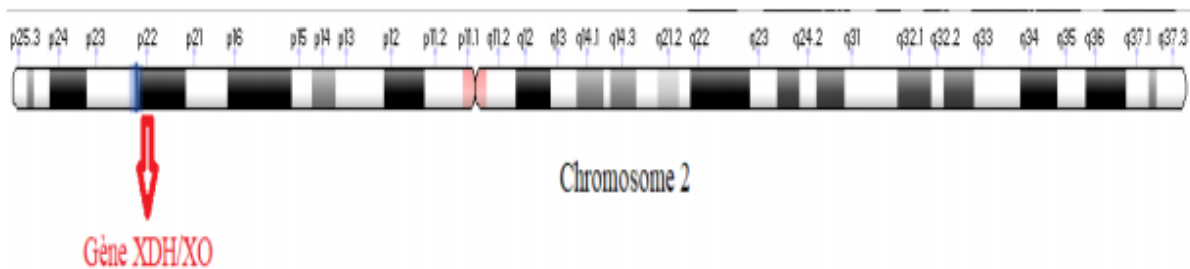
La plupart des purines le catabolisme se produit; dans ce district, la XOR est responsable de l'uricosurie, et par conséquent des niveaux d'uricémie, qui à son tour contribuent à soutenir la pression artérielle en régule à la hausse l'expression de la cyclooxygénase-2 et par conséquent la voie rénine/angiotensine. Les produits oxydants de la XOR peuvent également contribuer à maintenir stériles les voies urinaires [12].

## **II.4. Dans le foie**

La XOR exerce toutes ses activités et, en plus des purines, métabolise de nombreux substrats endogènes et exogènes, dont les médicaments. L'acide urique produit par la XOR influence le métabolisme hépatique du glucose et des lipides et augmente la néoglucogenèse et l'accumulation de graisse [14]. De plus, le sérum XOR provient principalement du renouvellement physiologique des cellules hépatiques, qui induit la libération d'enzymes hépatiques à partir de cellules mortes.

## **III. Gène de la XOR**

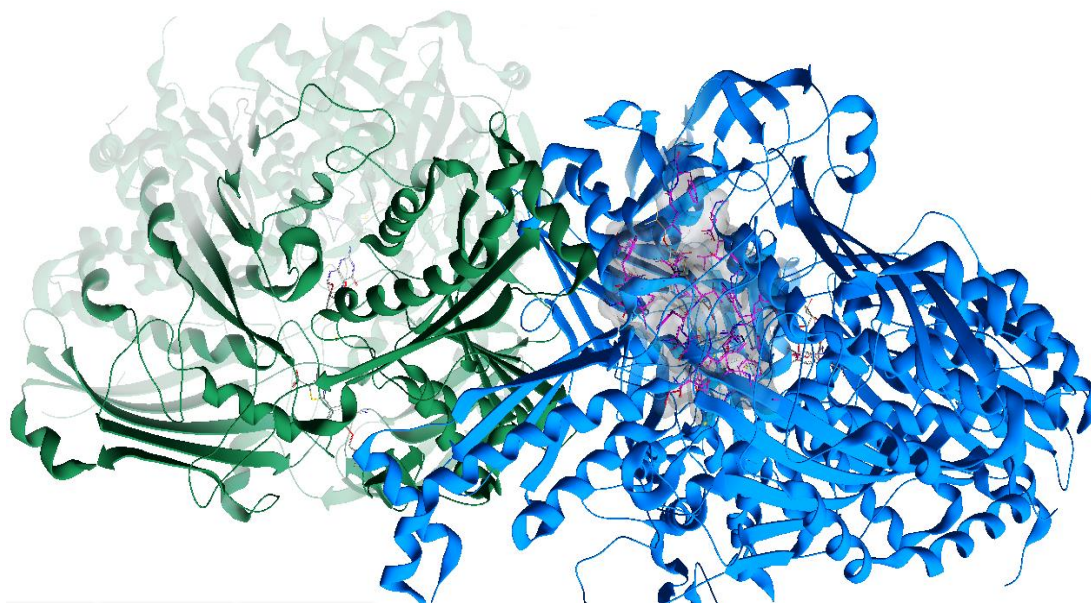
Le gène qui code pour la XOR humaine est localisé dans la bande p22 du chromosome 2 ; il est formé de 36 exons et 35 introns. Sa séquence, illustrée par la figure II.3, est de 1333 acides aminés ; elle est quasi homologue à celle de la XOR de la souris et du rat [15]. L'augmentation de l'expression du gène de la XOR en fin de grossesse est maximale après la naissance ; les niveaux de la transcription augmentent jusqu'aux sept premiers jours de la période de lactation [16].



**Figure II.3 :** Localisation de gène de la XOR [17].

#### IV. Structure et voie de transfert d'électrons dans la XOR

La structure moléculaire de la protéine XOR est homodimérique [3] ; a deux sous-unités identiques [12]; de masse moléculaire d'environ 300 kDa [2] ; chaque monomère a trois domaines (figure II. 5) [3].



**Figure II.4 :** Structure cristalline de la xanthine oxydoréductase.

Chaque sous unité est organisée en trois domaines (Figure II.5) chacun est associé à un cofacteur spécifique : le domaine N-terminal de 20 kDa, contient deux centres (Fe<sup>2+</sup> / S<sub>2</sub>), le domaine central (FAD) de 40 kDa et le domaine C-terminal de 85 kDa contient un centre molybdoptérine (Mo) [18-21].

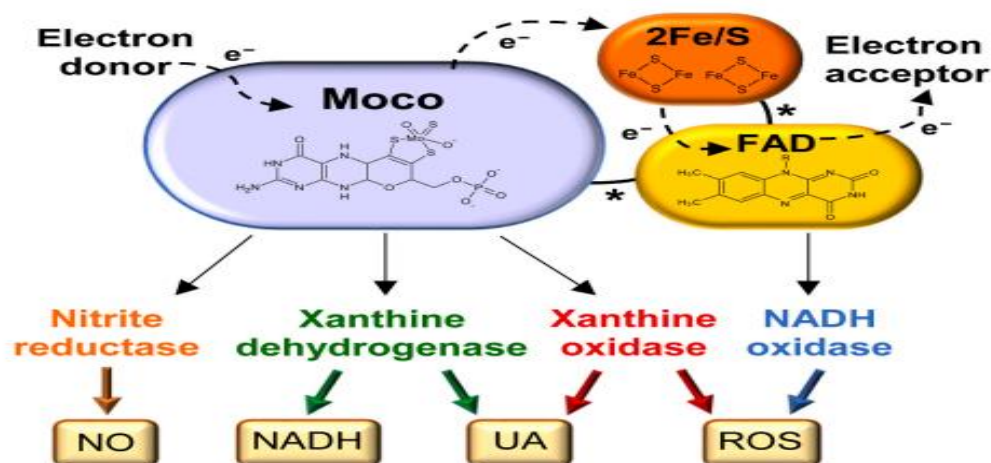


Figure II.6 : Voie de transfert d'électrons dans la XOR [12].

Chacune composée de trois domaines reliés par des régions charnières non structurées (indiquées par des astérisques) :

- Le N-terminal de 20 kDa domaine (orange) a deux fer-soufre non identiques clusters (2Fe/S) ;
- Le domaine intermédiaire de 40 kDa ;(jaune) a une flavine adénine dinucléotide (FAD) cofacteur ;
- Le domaine C-terminal de 85 kDa (lilas) a un cofacteur de molybdoptérite contenant un molybdène atome (Moco).

Le flux d'électrons ( $e^-$ ) se déplace de la Moco site, où l'oxydation se produit, à travers les deux centres redox fer-soufre vers le site FAD, où l'accepteur d'électrons est réduit. Les produits de XOR les activités sont : l'acide urique (UA) et la nicotine amide adénine dinucléotide (NADH) réduite à partir de la xanthine déshydrogénase (XDH), UA, ion superoxyde et peroxyde d'hydrogène (ROS) de la xanthine oxydase (XO), monoxyde d'azote (NO) à partir de nitrate et de nitrite réductase et ROS de la NADH oxydase [12].

## V. La conversion de la XDH à XO

La XDH est converti en XO dans des conditions de maladie ou pendant les processus de purification. Cette reconversion est réalisée soit de manière réversible par oxydation de groupements sulfhydryle (SH) soit irréversible par protéolyse [22]. La première conversion de la XDH est réversible, elle est dû à l'oxydation des groupements thiols de la Cys 535 et la Cys 992, par exposition aux agents sulfhydryls [13]. La deuxième est due au traitement de la XDH avec des protéases, telles que la trypsine, la chymotrypsine ou pancréatine, de sorte qu'elle se convertit de manière irréversible en XO. Ces enzymes provoquent une modification dans le groupe

d'acides aminés (Phe 549, Arg 335, Trp 336, Arg 427) et ainsi l'interaction entre les acides aminés Phe 549 et Trp 336 est perturbée, ce qui modifie la structure du site actif du FAD et devient inaccessible au  $\text{NAD}^+$  [23].

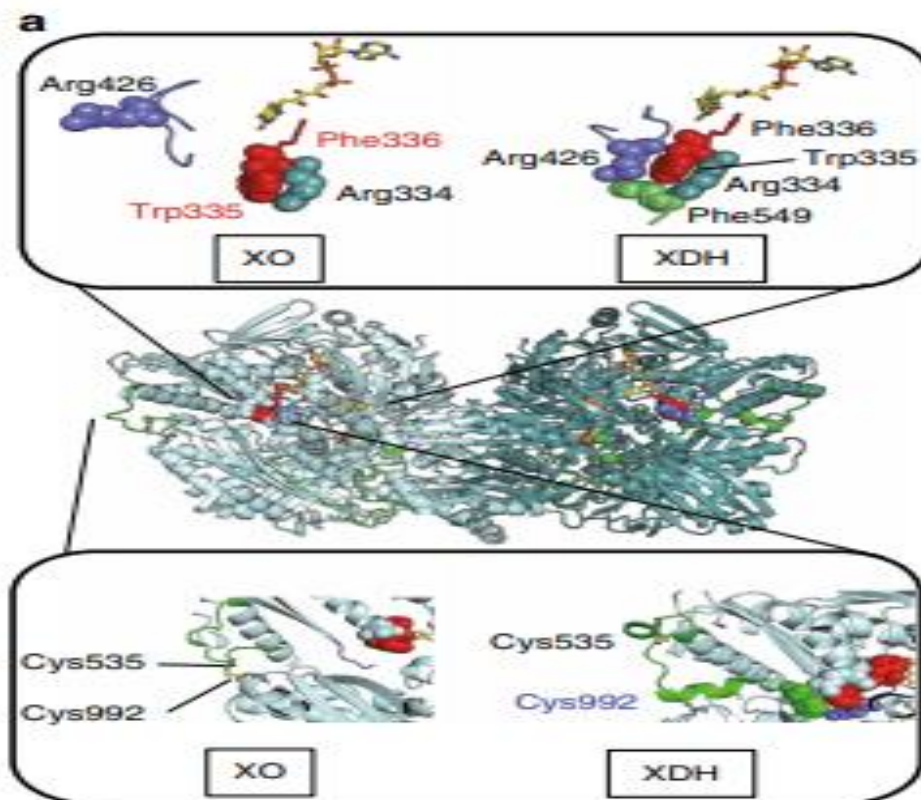


Figure II.7 : Conception et construction de la XO et la XDH [24].

## VI. Mécanisme d'action de la xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase catalyse deux étapes d'hydroxylation dans la voie métabolique de dégradation des purines, c'est-à-dire hypoxanthine en xanthine et xanthine en acide urique [25].

Le mécanisme d'action s'effectue en deux étapes représentées sur la figure II.7 :

- La première étape est une demi-réaction de réduction qui a lieu au niveau du centre Mo. Elle est caractérisée par la réduction de Mo (VI) en Mo(IV) et l'oxydation de la xanthine en acide urique. Pour continuer sa fonction catalytique, le molybdène perd les deux électrons. Ces derniers sont transférés au centre FAD par l'intermédiaire des clusters  $\text{Fe}_2/\text{S}_2$  ; sachant que les centres  $\text{Fe}_2/\text{S}_2$  peuvent être considérés comme des pompes d'électrons.
- La seconde est la demi-réaction d'oxydation qui a lieu au centre du FAD. Dans cette étape, si la réaction est catalysée par la XDH,  $\text{FADH}_2$  transporte les deux électrons dans



NAD + Donner NADH [25]. S'ils sont excités par la XO, les électrons à l'oxygène moléculaire O<sub>2</sub> pour produire le radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) de manière monovalente, ou de manière divalente, il donne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [15].

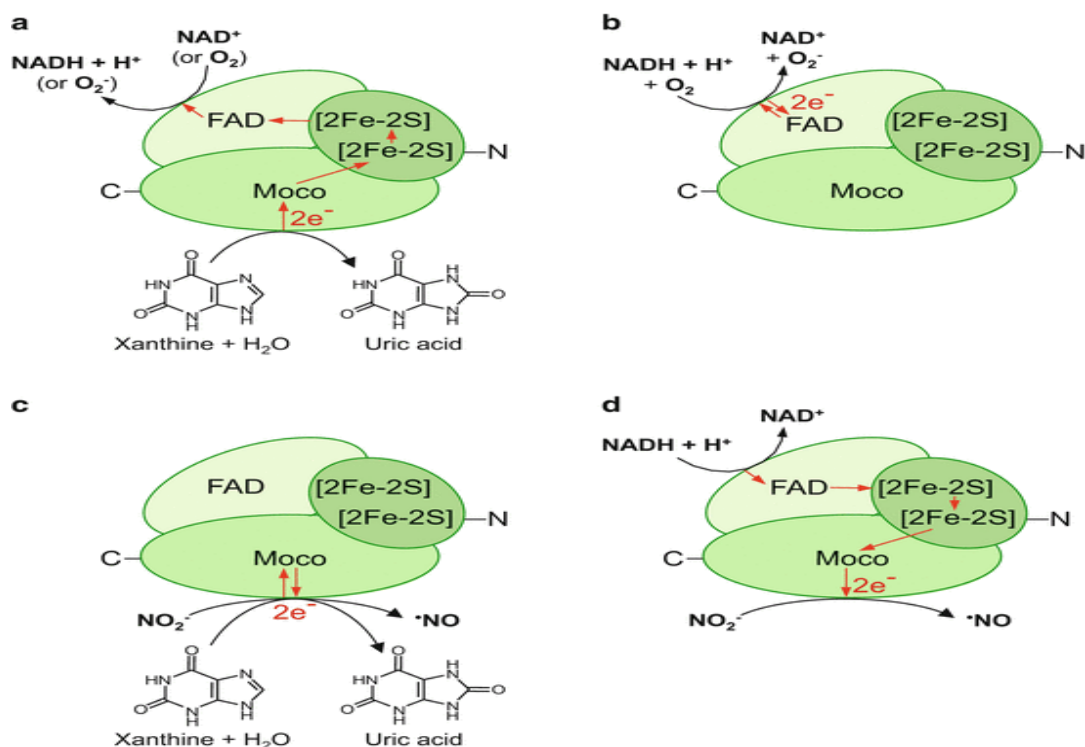


Figure II.8 : Représentation du mécanisme réactionnel de la XOR [26].

## VII. Pathologies liées à la XOR

### VII.1. L'inflammation

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents interférons (TNF- $\alpha$  et C5a), qui provoquent la conversion de la XDH en XO. Alors, la production de ROS est élevée, ce qui active le NF- $\kappa$ B régulateur de la production des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 et IL-6). Les espèces réactives de l'oxygène produites par la XOR peuvent également réagir avec les composés de la membrane cellulaire, tel que l'acide arachidonique, pour produire des neutrophiles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire [27].

### VII.2. L'ischémie / réperfusion

Les ROS produites par la XOR provoquent des lésions ischémiques [28]. En raison du catabolisme de l'ATP pendant l'hypoxie, ce qui entraîne une augmentation de la concentration d'hypoxanthine dans la réperfusion, la XO oxyde l'hypoxanthine accumulée en xanthine et la xanthine en acide urique, réduisant l'O<sub>2</sub> simultanément en O<sub>2</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'interaction entre ces deux molécules produit un radical Oh, provoquant des lésions tissulaires [27].

### VII.3. Le stress oxydatif

Le système enzymatique XO joue également un rôle majeur dans le stress oxydatif cellulaire. Pendant la phase d'ischémie, il y a le phénomène d'accumulation de purine (Hypoxanthine et Xanthine) en augmentant le catabolisme de l'adénosine triphosphate (ATP). Pendant la période de pompage, l'apport massif d'oxygène accélère les réactions enzymatiques de la XO. Les métabolites sont généralement convertis en acide urique participé à la synthèse de radicaux libres comme le superoxyde. Cela activera les autres radicaux libres et polynucléaires neutrophiles (PNN) va sécréter des PNN protéases. Les protéases et les radicaux libres sont responsables de la lyse cellulaire [29].

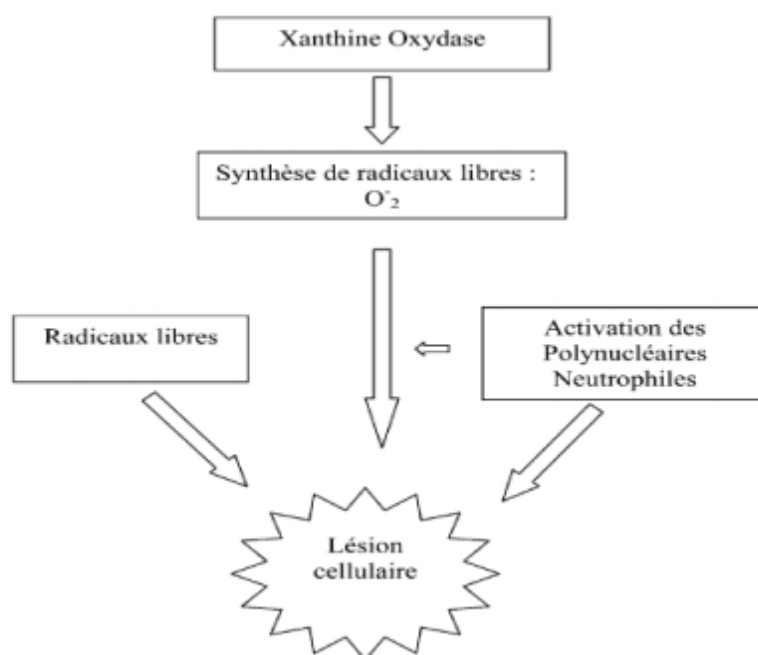
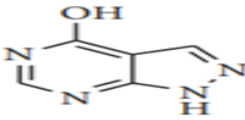
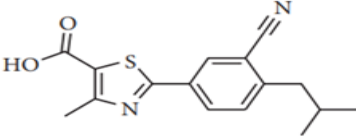
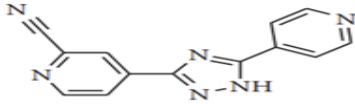
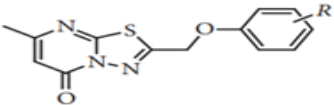
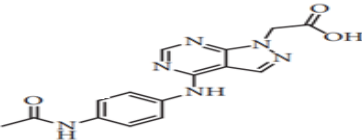
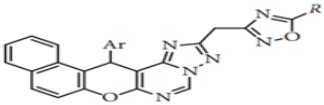
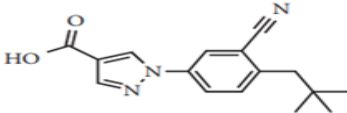
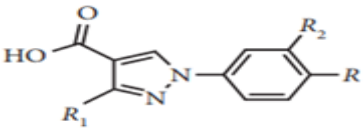
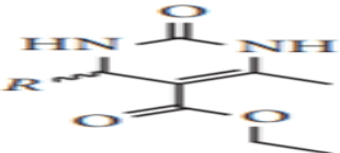


Figure II.9 : Rôle du XO dans le stress oxydatif cellulaire [29].

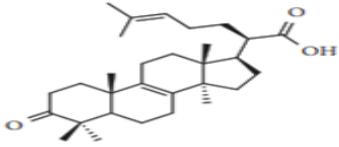
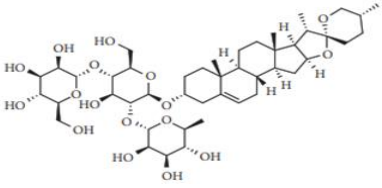
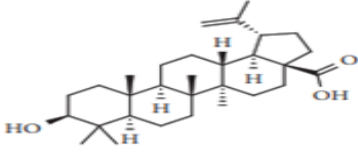
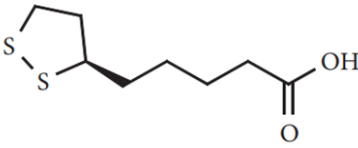
### VIII. Les inhibiteurs de la XOR

A ce jour, de nombreux composés ont été proposés pour agir en tant qu'inhibiteurs de la XOR et démontrer une valeur thérapeutique possible. Les structures de ces inhibiteurs sont représentées dans le tableau II.1 ci-dessous.

Tableau II.1 : Les inhibiteurs de la XOR

N	Nom	Structure de l'inhibiteur	Réf	
<b>Inhibiteurs de la XO utilisés en clinique</b>				
1	Allopurinol		[30]	
2	Febuxostat			
3	Topiroxostat			
<b>Dérivés synthétiques</b>				
4	<b>Analogues de noyau de purine</b>	5H-thiadiazolopyrimidin-5-ones,		[30]
5		Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine		
6		Pyranotriazolopyrimidines		
7	<b>au fébuxostat</b>	Y-700		
8		1-phenyl-pyrazole-4-carboxylic acid derivatives,		
9	<b>Dérivés de la dihydropyrimidinone</b>	Dihydropyrimidones		

10		3-substituted-2,1-benzisoxazoles		
11		5-benzylidene barbiturates,		
12		5phenylhydrazinyl-ethylidene barbiturates,		
13	Autres dérivés organiques synthétiques.	3H-quinazolin-4-one derivatives,		
<b>Composés naturels et semi-synthétiques et mimétiques de Structures naturelles</b>				
14	Composés phénoliques et analogues	3,4-dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNB)		[30]
15		2,5-dihydroxyacetophenone		
16		Hydroxytyrosol		

17	Terpènes et Dioscine	3-oxo-5 $\alpha$ -lanosta-8,24-dien-21-oic acid		
18		Dioscin		
19		Betulinic acid		
20	Autres composés naturels et semi-synthétiques	l'acide $\alpha$ -lipoïque		

## Référence

- [1] Agarwal A., Banerjee A., Banerjee U. C. 2011. Xanthine oxidoreductase: a journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Crit Rev Biotechnol.* **31**(3): 264-80.
- [2] Nishino T., Okamoto K., Eger B. T., Pai E. F., Nishino T. 2008. Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *The FEBS Journal.* **275** (13): 3278-89.
- [3] Battelli M. G., Bortolotti M., Polito L., Bolognesi A. 2019. Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. *Redox Biol.* **21**:101070.
- [4] Martin H. M., Kevin P., M. Eugene B., Susane D. and Roger H. 2004. Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Free Radic Biol Med.* **37** (8): 1214-1223
- [5] Biagi P., Abate L. 2005. Heart failure, oxidative stress and allopurinol Scopenso cardiaco e stress ossidativo: ruolo dell'allopurinolo. *Monaldi Arch Chest Dis.* **64**: 33-37.
- [6] Ozturk G., German G. B., M. L. N. de Moura Bell J. 2019. Effects of industrial heat treatments on the kinetics of inactivation of antimicrobial bovine milk xanthine oxidase. *npj Science of Food.* **13**: 1-7.
- [7] Battelli M. G., Polito L., Bortolotti M, Bolognesi A. 2016. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* ID 3527579 : 1-8.
- [8]. Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabo C. 2006. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors : Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev .* **58** (1): 87-114.
- [9] Hancock J. T., Ovejero-Boglione M. C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R. and Harrison R. 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3308-3310
- [10] Al-Khalidi U. A. and Chaglassian T. H. 1965. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem Journal.* **1** : 318-320.

- [11] Battelli M. G., Bolognesi A., Polito L. 2016. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1842** (9): 1502-1517.
- [12] Bortolotti M., Polito L., Battelli M. G., Bolognesi A. 2021. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biology*. **41** : 101882.
- [13] Al-Shehri S.S; Duley J.A; Bansal N. 2020. Xanthine oxidase-lactoperoxidase system and innate immunity: biochemical actions and physiological roles. *Redox Biol.* **34**: 101524.
- [14] Lima W.G ; Martins-Santos M.E., Chaves V.E.2015. Uric acid as a modulator of glucose and lipid metabolism. *Biochimie*. **116**: 17-23.
- [15] Hamlaoui I. 2014. Etude théorique des réactions enzymatiques : Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones. Thèse de doctorat en Chimie Théorique. Université de Constantine1. Algérie. 113p.
- 16** Kurosaki M., Zanotta S., Li C. M., Garattini E. and Terao M. 1996. Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation: regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin. *Biochem. J.* **319** : 801-810
- [17] NCBI. 31 janvier 2019. NCBI. Genome Data Viewer: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=gene&acc=7498>. Consulté le : [02/04/2021].
- [18] Baghiani A., Harrison R. and Benboubetra M. 2003. Purification and partial characterization of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry*. **111**: 407-414.
- [19] Berry C.E. and Hare J.M. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* **555** : 589-606.
- [20] Harrison R. 2000. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*. **33**: 774-797.
- [21] Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabó C. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.* **58**: 87-114.

- [22] Day R. O., Bishoy K., Diluk R.W.K., Kenneth M.W. and Graham G. G. 2016. Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Clinical Science*: 2167- 2180.
- [23] Kuwabara Y., Nishino T., Okamoto K., Matsumura T., Eger B.T., Pai E.F. and Nishino T. 2003. Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 8170-8175.
- [24] Kusano T., Ehirchiou D., Matsumura T, Chobaz V, Nasi S., Castelblanco M., So A., Lavanchy C., Acha-Orbea H., Nishino T., Okamoto K., Busso N. 2019. Targeted knock-in mice expressing the oxidase- fixed form of xanthine oxidoreductase favor tumor growth. *Nature Communications*. **10**:4904.
- [25] Ichida k ., Amaya Y., Okamoto K., Nishino T. 2012. Mutations Associated with Functional Disorder of Xanthine Oxidoreductase and Hereditary Xanthinuria in Humans. *Int. J. Mol. Sci*. **13** : 15475-15495.
- [26] Urarte E., Esteban R., Moran J. F. Florian Bittner. Established and Proposed Roles of Xanthine Oxidoreductase in Oxidative and Reductive Pathways in Plants. *In book: Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*. 2015. DOI:10.1007/978-3-319-10079-1\_2.
- [27] Pritsos C. A. 2000. Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chemico-Biological Interactions*. **129**: 195-208.
- [28] Van Hoorn D. E. C., Nijveldt R., J., Van Leeuwen P., A., M., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D., B., A., Van Norren K., 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*. **451**: 111- 118.
- [29] Mercier E. and Perrotin D. 2003. L'hépatite ischémique. *Réanimation*. 449-454.
- [30] Pauff J. M. 2008. Structure-function studies of xanthine oxidoreductase. Thèse de doctorat en philosophie. Université d'État de l'Ohio. USA. 180p.



*CHAPITRE III:*  
*Docking moléculaire*



## I. Introduction

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Les détails de ces interactions, au niveau moléculaire, sont donc d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire [1]. La voie informatique offre une bonne alternative aux limitations expérimentales. Pour cette raison, la recherche informatique est actuellement très active *in silico*, et sa croissance montre son importance et son caractère incontournable. Les méthodes informatiques actuellement utilisées ont deux objectifs : l'un est d'étudier la structure tridimensionnelle et les changements de conformation des molécules, et l'autre est de simuler le mécanisme d'amarrage ou docking moléculaire [2].

L'étude du docking est une étape clé dans la compréhension de la réponse biologique et de la conception de médicaments. Les tentatives d'amarrage ont longtemps été basées sur le concept de serrures à clé, ne considérant que les corps rigides peuvent interagir lorsqu'ils présentent une parfaite compatibilité géométrique. Cependant, à partir de ces premières étapes [3], une idée a progressivement émergé : les molécules ne sont pas figées, mais des changements de conformation peuvent survenir au cours de l'interaction. Par conséquent, le programme a évolué dans le sens d'introduire au moins une partie de la flexibilité des systèmes impliqués [2].

## II. Définition de docking

L'amarrage moléculaire est une méthode empirique qui permet de prédire l'affinité entre deux molécules. Il est généralement utilisé pour prédire l'affinité du ligand pour la protéine, y compris la position et la direction les plus favorables de l'interaction entre le ligand et la protéine ciblent (figure III.1 et III.2). Cet outil est actuellement très demandé pour trouver de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Il permet de réaliser des criblages très rapides et peu coûteux pour identifier des molécules pouvant avoir une forte activité sur la cible enzymatique, ou au contraire, pour identifier la cible de molécules ayant une activité biologique intéressante. En revanche, lorsque la structure tridimensionnelle de la protéine cible est définie, l'amarrage peut mettre en évidence les régions et les résidus à explorer pour optimiser l'affinité du ligand pour la cible. Il est également utilisé pour optimiser la sélectivité d'une molécule entre deux ou plusieurs protéines [4].

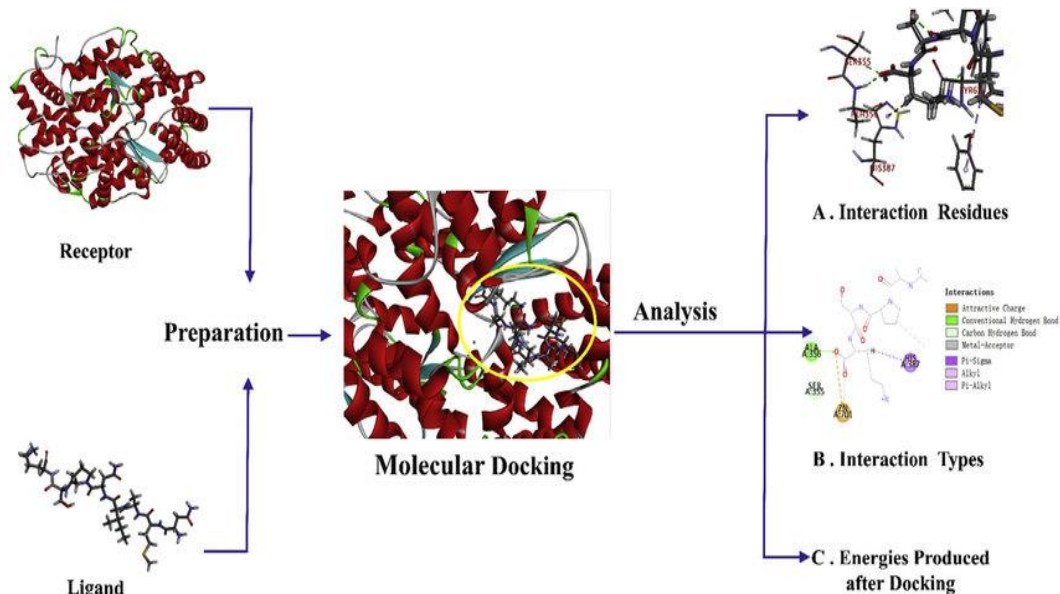


Figure III.1 : Procédures générales pour l'amarrage moléculaire [5].

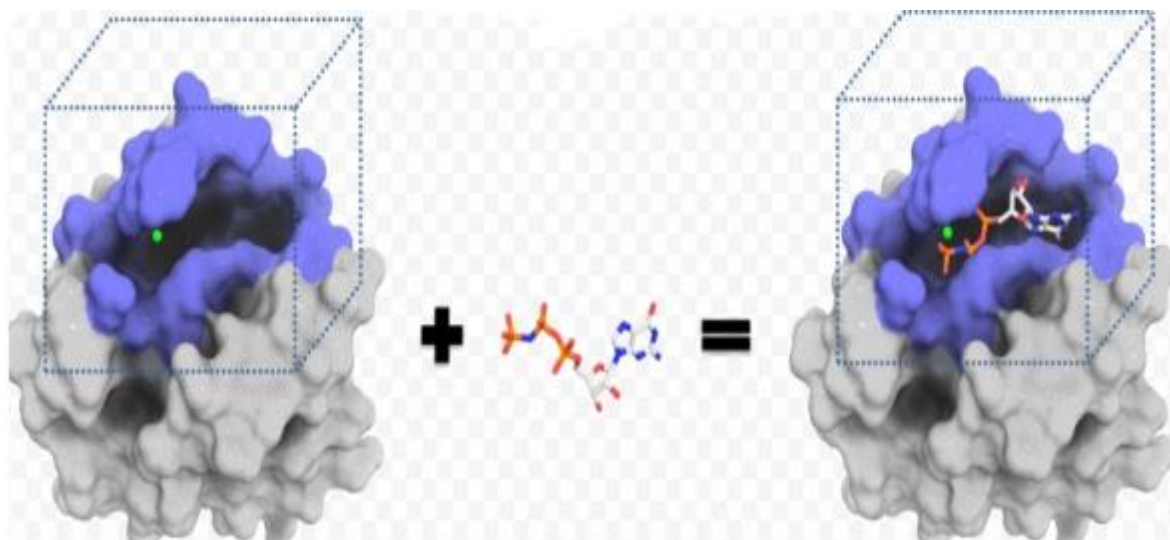


Figure III.2 : La représentation schématique du docking de deux molécules [6].

### III. Principe de docking moléculaire

L'amarrage décrit le processus consistant à placer une molécule (ligand) sur un site d'activité de la protéine cible dans l'espace tridimensionnel (3D). Deux aspects sont importants : prédiction de l'affinité du complexe protéine-ligand et prédiction de la bonne position du ligand pénètre dans le site actif de la protéine [7, 8].

Le processus de docking moléculaire implique deux étapes fondamentales qui sont le Docking et le Scoring [9]:

- **La première (le docking)** : est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations

(poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interaction les plus favorables. Bien que pouvant être faite « manuellement », cette étape est le plus souvent exécutée de manière automatisée à l'aide d'algorithmes de docking, ce qui améliore la vitesse et la précision des simulations.

- **La deuxième (le scoring)** : est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine dans chacun des complexes sélectionnés lors de l'étape précédente. Cette tâche est accomplie par des outils informatiques nommées fonctions de score. Celles-ci évaluent d'abord les différentes contributions énergétiques (et parfois entropiques) pour la stabilisation du complexe protéine-ligand, et ordonnent ensuite ces complexes, permettant ainsi l'identification des modes d'interaction les plus probables.

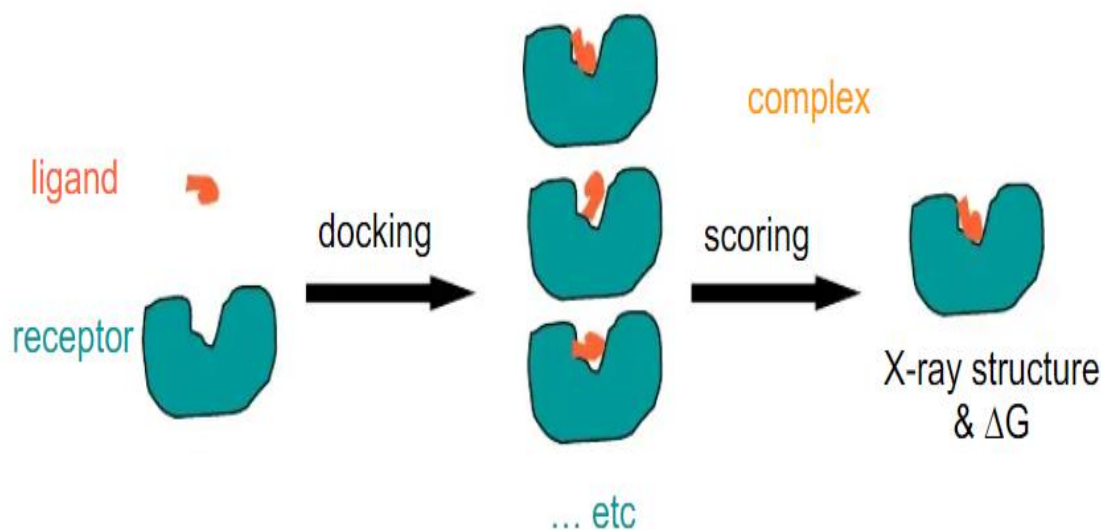


Figure III.3 : Principe général de docking moléculaire [10].

## IV. Les outils du docking moléculaire

### IV.1. Récepteur

Dans le cas d'une molécule le récepteur est une protéine spéciale qui peut se lier spécifiquement et de manière réversible à une autre molécule appelée ligand. Pour obtenir le récepteur, nous avons utilisé la structure 3D de la protéine disponible gratuitement dans la base de données PDB [11]. Différentes conformations tridimensionnelles peuvent être téléchargées sous l'extension .pdb, qui peut être lue par le logiciel d'accueil et contient diverses informations sur la protéine. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolu la structure, la méthode expérimentale, etc. Il contient également des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z, qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. Si la cible n'a pas été stockée

dans la bibliothèque et que la bibliothèque contient des protéines avec des séquences similaires, une modélisation d'homologie sera effectuée pour construire la structure 3D de la cible souhaitée [12].

#### **IV.2. Ligand**

En biologie, un ligand (du latin ligandum, liant) est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule cible, une protéine ou un acide nucléique, et remplit généralement des rôles fonctionnels : stabilité structurelle, catalyse, régulation de l'activité enzymatique et transmission du signal. Le terme est largement utilisé dans la recherche sur les protéines et fait référence aux molécules qui interagissent avec les protéines de manière non covalente et spécifique et jouent un rôle dans leurs fonctions.

La liaison du ligand à la protéine réceptrice modifie généralement la conformation de cette dernière, qui est sa structure tridimensionnelle. L'énergie associée à l'interaction intermoléculaire entre la protéine et son ligand favorise ce changement conformationnel, appelé ajustement induit. Par conséquent, cette modification structurelle peut réguler son état fonctionnel et son activité [13].

En Docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules [14].

#### **IV.3. . Programmes de docking**

Le docking moléculaire a pour objectif essentielle de prédire la conformation la plus favorable du ligand au sein de son récepteur. Initié au début des années 1980, ce domaine s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs [15].

Les logiciels de docking 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 [16]. De nombreux programmes de docking sont disponibles [17, 18] tel que Surflex, GOLD, FRED... sont devenus des outils utilisés régulièrement par la modélisation moléculaire (voir le tableau III.1).

Tableau III.1 : Principaux programmes de docking moléculaire [15].

Nom Editeur	Site Internet
AutoDock Scripps	<a href="http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/">http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/</a>
FlexX BioSolveIT	<a href="http://www.biosolveit.de/FlexX/">http://www.biosolveit.de/FlexX/</a>
Fred OpenEyes	<a href="http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html">http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html</a>
Dock UCSF	<a href="http://dock.compbio.ucsf.edu/">http://dock.compbio.ucsf.edu/</a>
Glide Schrödinger	<a href="http://www.schrodinger.com/Products/glide.html">http://www.schrodinger.com/Products/glide.html</a>
Gold CCDC	<a href="http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/">http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/</a>
ICM Molsoft	<a href="http://www.molsoft.com/products.html">http://www.molsoft.com/products.html</a>
LigandFit Accelrys	<a href="http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html">http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html</a>
Surflex Biopharmics	<a href="http://www.biopharmics.com/products.html">http://www.biopharmics.com/products.html</a>

## V. Les interactions intermoléculaires

Pour attacher un ligand à une protéine le problème est de prédire la conformation et l'orientation du ligand relative au site actif de la protéine cible. Le docking est la base de la reconnaissance moléculaire et du type de l'interaction. À chaque protéine cible de structure connue le docking se révèle être la clé dans le design de nouveaux médicaments [19, 20, 21]. Donc, les liaisons chimiques faibles sont essentielles pour expliquer les propriétés des molécules biologiques. Du fait de leur faible énergie (généralement comprise entre 4 et 30 kJ/mol), elles peuvent se rompre et se rétablir très facilement à la température physiologique, permettant ainsi des interactions temporaires entre molécules [22].

### V.1. Les interactions hydrogène

Les liaisons hydrogène (LH) sont des interactions d'origine électrostatique entre un atome électronégatif dit "accepteur" (charge partielle  $\delta^-$ ) et un atome d'hydrogène polaire (charge partielle  $\delta^+$ ) qui est lié de manière covalente à un atome électronégatif dit "donneur" (charge partielle  $\delta^-$ ) [23].

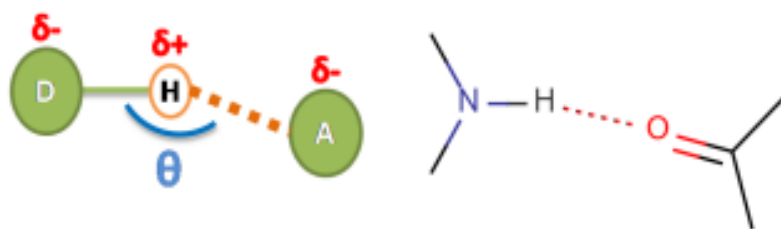


Figure III.4 : La liaison hydrogène [23].

## V.2. Les interactions de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals (VdW), également connues sous le nom d'interactions de London ou de forces de dispersion, impliquent des dipôles instantanés. Les interactions de VdW sont de faible intensité, mais elles sont néanmoins très importantes en pratique à cause de leur très grand nombre. Bien que cela puisse paraître assez simpliste, ce sont les interactions de VdW qui sont essentiellement responsables de la complémentarité stérique lors d'un phénomène de liaison [23].

### A) Interaction de Keesom entre dipôles permanents



### B) Interaction de Debye entre dipôle induit – dipôle permanent



### C) Interaction de London entre dipôles instantanés



### Légende



Figure III.5 : Illustration des principaux types d'interaction entre dipôles [23].

## V.3. Les interactions hydrophobes

Les molécules non polaires et peu polarisables ont tendance à se regrouper, ce qui crée une force de liaison hydrophobe. Il s'agit d'interactions entre molécules ou groupements qui ont très peu d'affinité pour le solvant dans lequel elles sont dissoutes (eau). Les groupements vont se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'eau. Les groupements

vont donc s'attirer mutuellement par des forces de type dispersion (London). Plusieurs acides aminés hydrophobes se trouvent en contact à l'interface par complémentarité hydrophobe. Ces derniers entraînent une interaction stabilisante pour beaucoup de complexes [15].

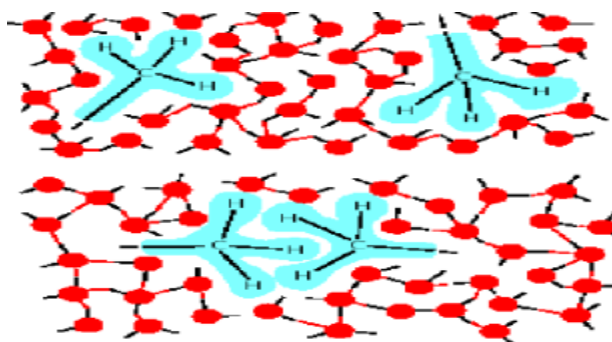


Figure III.6 : Patch hydrophobe [15].

#### V.4. Interaction ionique

Les liaisons ioniques ou ponts salins concernent les fortes interactions électrostatiques attractives entre charges de signe opposé ; les liaisons ioniques stabilisent fortement les structures tridimensionnelles des protéines [23].

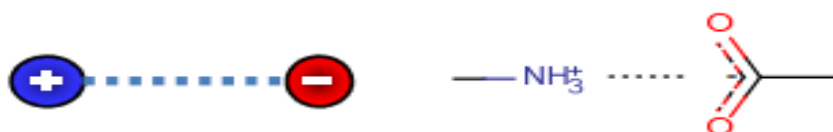


Figure III.7 : La liaison ionique [23].

## VI. Types de docking moléculaire

### VI.1. Docking rigide

Dans le cas des méthodes de docking rigide, la recherche de la pose optimale se limite au positionnement. Cette opération consiste en la recherche exhaustive dans l'espace discrétisé des 6 degrés de liberté. Certains programmes, s'ils n'appartiennent pas à la famille des techniques de docking rigide, utilisent plusieurs étapes successives d'optimisation dont les premières peuvent s'apparenter à du docking rigide [24].

### VI.2. Docking flexible

Lorsque les méthodes de docking prennent en compte la flexibilité du ligand, deux étapes sont effectuées successivement pendant toute la durée du docking. La première étape correspond à une exploration de l'espace conformationnel de manière à retrouver, parmi les conformations proposées, la conformation bioactive. Pendant la deuxième étape une fonction de score évalue ces conformations. Il existe plusieurs types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du



ligand : les méthodes systématiques (fragmentation/reconstruction), les méthodes aléatoires, et les méthodes de simulation (dynamique moléculaire) [18].

### VI.3. Docking semi-flexible

Lorsque l'espace conformationnel des ligands est exploré, le nombre de degrés de liberté de l'espace de recherche peut être conséquent dans le cas de molécules très flexibles. Dans un tel contexte, l'emploi de méthodes de recherche exhaustives apparaît souvent inapproprié car nécessitant des simplifications importantes au niveau de l'échantillonnage. D'autres algorithmes, dits de fragmentation, sont employés pour construire de façon incrémentielle le ligand au sein du site actif de la protéine. L'espace des conformations du ligand est alors restreint au voisinage d'un ensemble initial d'états simplifiés. Cette stratégie de recherche par construction, qui se présente sous diverses variantes, est notamment adoptée par les programmes DOCK, FLEXX, et Hammerhead [25].

## VII. Etapes typiques du Docking moléculaire

Le processus de docking moléculaire consiste à faire interagir un ligand avec le récepteur (généralement de nature protéique). La technique de docking comprend quatre étapes principales (voir figure III.8):

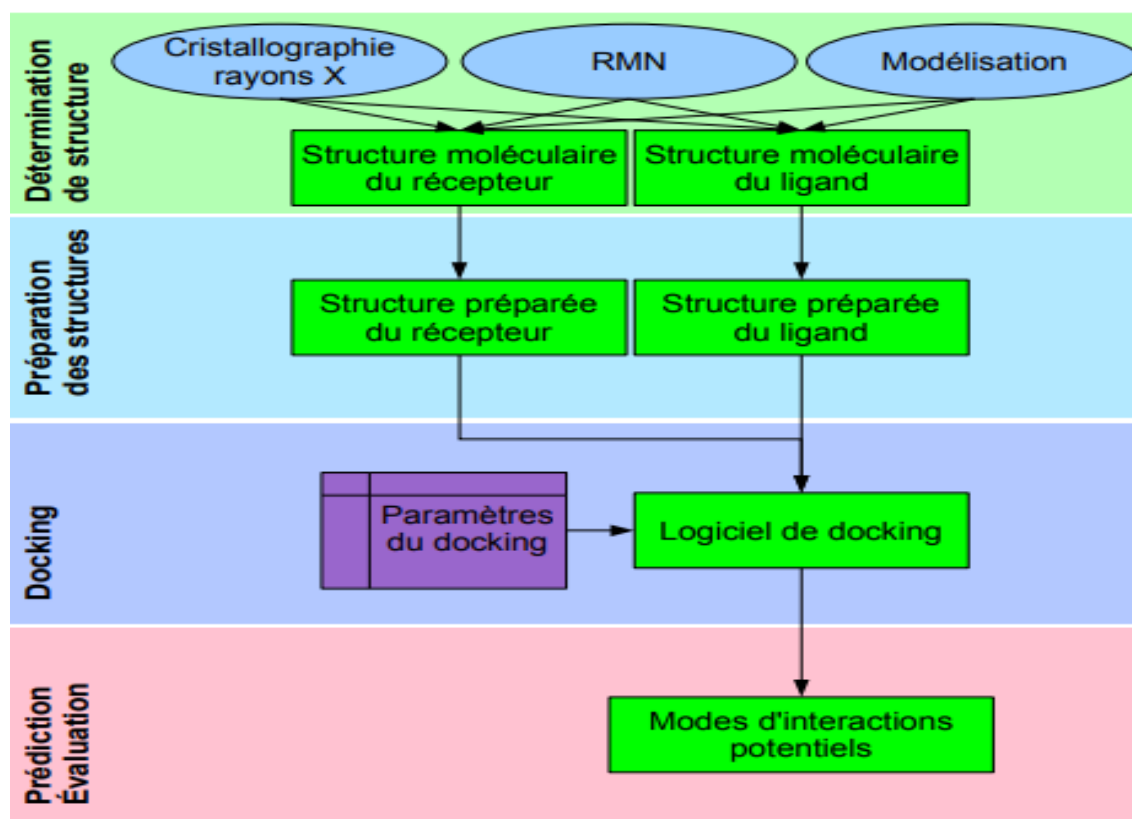


Figure III.8 : Étapes typiques d'un docking [16].

### **VII.1. Détermination des structures**

Cette étape préliminaire du docking moléculaire est réalisée pour détecter les structures moléculaires mises en jeu (le récepteur et le ligand). Ces structures sont obtenues en faisant appel à trois méthodes d'analyse (la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X). La majorité des structures protéiques sont disponibles via la PDB [15].

### **VII.2. Préparation des structures**

La préparation du récepteur en vue du docking ne peut être réalisée qu'une fois les structures mises en jeu sont identifiées. Après le téléchargement de la cible, nous utilisons un logiciel de visualisation pour voir avec quels ligands l'enzyme est cocrystallisé (eau, ligands, ion,...) [26].

### **VII.3. Docking moléculaire**

Dans le domaine de la modélisation moléculaire, le docking est une méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable. Les paramètres du calcul de docking sont :

- L'état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précise) ;
- Détermination des acides aminés de site actif ;
- Enfin lancer le processus de Docking.

A la fin de chaque cycle d'exploration, le logiciel de docking va enregistrer la meilleure interaction avec le ligand [26].

### **VII.4. Prédiction et évaluation**

Une fois les paramètres du docking moléculaire sont établis, le programme passe à l'étape de prédiction et d'évaluation. Celle-ci permet la mise au point des modes d'interactions potentiels. Cette étape est réalisée comme suit [26, 27, 28]:

- Algorithme de docking en principe, un algorithme de docking doit être capable de générer les modes de liaison attendus pour des ligands. Pour cela, il est nécessaire que l'algorithme d'une recherche conformationnelle puisse explorer l'espace conformationnel possible, de façon efficace et exhaustive.
- Les méthodes de "scoring" sont utilisées pour estimer mathématiquement l'affinité de liaison entre un récepteur et chacune des poses générées pendant le docking.

L'association entre protéines et ligands est gouvernée par plusieurs paramètres thermodynamiques (interactions hydrophobes, liaisons hydrogène, interactions de Van Der Waals...).

## **VIII. Avantages et les limites de l'amarrage moléculaire**

### **VIII.1. Avantage de docking**

- L'application de l'amarrage dans un système de distribution de médicaments ciblé (targeted drug-delivery system) est un avantage énorme. On peut étudier la taille, la forme, la distribution de charge, la polarité, les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes du ligand (médicament) et du récepteur (site cible).
- Le docking moléculaire aide à l'identification des sites cibles du ligand dans le récepteur.
- Le docking aide également à comprendre les structures de différentes enzymes et de leur mécanisme d'action
- La fonction de «scoring» dans le docking permet de sélectionner le meilleur ajustement, positionnement d'une molécule ou le meilleur composé parmi un éventail d'options.
- Tout ne peut pas être prouvé expérimentalement, car les méthodes expérimentales traditionnelles de découverte de médicaments prennent beaucoup de temps. L'amarrage moléculaire aide à accélérer le processus de conception de médicaments assisté par ordinateur et fournit également toutes les conformations possibles sur la base de la structure du récepteur et du ligand
- L'amarrage présente un avantage considérable pour l'étude des interactions entre protéines.
- Il existe des millions de composés, de ligands, de médicaments et de récepteurs dont la structure 3D a été cristallisée. Le criblage virtuel de ces composés peut être effectué par docking [29].

### **VIII.2. Limites d'amarrage moléculaire**

- Lors du docking des protéines et des petites molécules, il peut y avoir des problèmes dans la structure du récepteur (la protéine). Une valeur de résolution inférieure à 1,2 Å est requise pour un docking fiable de petites molécules ; tandis que la plupart des structures cristallographiques ont une résolution comprise entre 1,5 et 2,5Å. L'utilisation accrue des modèles d'homologie en docking moléculaire doit être examinée avec soin, car leur résolution est encore plus médiocre. La plupart des applications acceptent et donnent de

bons résultats pour les structures avec une résolution inférieures à 2,2 Å. Il faut tout de même prendre soin de choisir une structure.

- Presque toutes les fonctions de notation utilisées lors du docking, ne prennent pas en compte le rôle joué par les inhibiteurs ou les ions liés par des liaisons covalentes.
- La méthodologie et les recherches sur le docking protéine-protéine doivent être considérablement améliorées car le succès dans ce domaine est grandement entravé par de nombreux faux positifs et faux négatifs [29].

## Référence

- [1] Grosdidier A. 2007. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Grenoble. France. 90p.
- [2] Brut M. 2009. Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques. Thèse de doctorat en Nanophysique. Université de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 146 p.
- [3] Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161**: 269-288.
- [4] Traore M. 2016. Synthèse et études de modélisation moléculaire dans l'optimisation de la sélectivité de nouveaux agents antiparasitaires inspirés de produits naturels. Thèse de doctorat en Génétique. Université Grenoble Alpes. France. 188p.
- [5] Tu M ; Cheng S ; Lu W ; Du M.2018. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **105** : 7-17.
- [6] ALLAM L. 2020. Conception et évaluation des molécules anticancéreuses par approches in silico Inhibiteurs des Kinases AKT1 et LMTK3. Thèse de doctorat en Biologie Médicale, Pathologie Humaine et Expérimentale et Environnement. Faculté de Médecine et de Pharmacie Rabat. Maroc. 201p.
- [7] Schulz-Gasch T ; Stahl M. 2004. Scoring Functions for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective. *Drug Discovery Today: Technologies.* **1**: 231-239.
- [8] Wang R., Lu Y., Fang X., Wang S. 2004. An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDBbind Refined Set of 800 Protein-ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **44**: 2114-2125.
- [9] Helperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. 2002. Principles of dockings: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics.* **47** : 409-443.
- [10] Chen Q. 2004. EMBO-Course: Methods for protein simulation and drug design. China.

- [11] Martin L. 2006. Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif : une application sur la protéine kinase FAK. Thèse de doctorat en Bioinformatique. Université Montpellier 2. France. 149p.
- [12] Mokrani E. H. 2012. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister en Technologie des explorations biochimiques. Université Mentouri Constantine I. Algérie. 75p.
- [13] Leach A. R. 2001. Molecular modelling: Principles and application. Pearson Education Canada. 582. 10-6 p.
- [14] Monge A. 2006. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat en Chimie Informatique et Théorique. Université d'Orléans. France. 154p.
- [15] Bouchagra S. 2018. Modélisation des interactions protéine-petites molécules: étude de la relation structure – fonction dans le cas des lipases. Thèse de doctorat en chimie organique et bioorganique. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie. 145 p.
- [16] Carlson H. A. 2002. Protein flexibility is an important component of structure-based drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 1571-1578.
- [17] Corbeil C. R., N. Moitessier. 2009. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 3. Impact of input ligand conformation, protein flexibility, and water molecules on the accuracy of docking programs. *Journal of chemical information and modeling.* **49** (4): 997-1009.
- [18] Bitencourt F. G., De Azevedo W. F. 2019. Docking with SwissDock. *Docking Screens for Drug Discovery.* **30**: 189-202.
- [19] Golbraikh A., Tropsha A. 2002. Beware of q<sup>2</sup>!. *Journal of Molecular Graphics and Modelling J. Mol. Graph. Model.* **20**: 269-276.
- [20] Martin T.M., Harten P., Young D.M., Muratov E.N., Golbraikh A., Zhu H., Tropsha A. 2012. Does Rational Selection of Training and Test Sets Improve the Outcome of QSAR Modeling. *J. Chem. Inf. Model.* **52**: 2570-2578.

[21] Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161**: 269-288.

[22] Gauchard P. A. Les interactions de faible énergie. [En ligne].

[http://www.umvf.biomedicale.univ-paris5.fr/.../gauchard\\_pierre\\_alexis\\_P05.pdf](http://www.umvf.biomedicale.univ-paris5.fr/.../gauchard_pierre_alexis_P05.pdf). Consulté le: [14/09/2021].

[23] Hoffer L. 2013. Développement et validation du logiciel S4MPLE : application au docking moléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du fragment-based drug design. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg. France. 165p.

[24] Beautrait A. 2008. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine fat de la kinase d'adhérence focale FAK. Thèse doctorat en Chimie Informatique et Théorique. Université Henri Poincaré. France. 226 p.

[25] Dar A.M., Mir S. 2017. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bioanal Tech.* **8**: 356.

[26] Morris, G. M., Lim-Wilby M. 2008. Molecular docking. *Molecular modeling of proteins.* **443**: 365-382.

[27] Feher M. 2006. Consensus scoring for protein–ligand interactions. *Drug discovery today.* **11**(9-10): 421-428.

[28] Heberlé G., De Azevedo W. F. 2011. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Current medicinal chemistry.* **18**(9): 1339-1352.

[29] Arrouchi H. 2019. Repositionnement de la Kinase PIM-1 et du récepteur de la vitamine D comme cibles thérapeutiques pour le Développement de médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat en biologie moléculaire. Université Mohammed. Rabat. Maroc. 176p.

*CHAPITRE IV:*  
*Matériel et méthodes*





## I. Matériel

### I.1. Micro-ordinateur

Dans la présente étude nous avons utilisé deux micro-ordinateurs, le premier LENOVO ayant un processeur Intel (R) Core,(TM) i3CPU et une mémoire vive de 4,00 Go, sous un système d'exploitation Windows 10 Professionnel. Le deuxième CONDOR ayant un processeur Intel(R) Core,(TM) i3CPU et une mémoire vive de 4.00Go, sous un système d'exploitation Windows 10 professionnel.

### I.2. Banques de données

#### I.2.1. La Protéine Data Bank (PDB)

La PDB est le référentiel mondial des structures macromoléculaires déterminées expérimentalement principalement par cristallographie aux rayons X, RMN ou microscopie électronique [1]. Cette ressource est alimentée par les informations d'archives de la banque de données sur les protéines sur les formes 3D des protéines, des acides nucléiques et des assemblages complexes qui aident les étudiants et les chercheurs à comprendre tous les aspects de la biomédecine et de l'agriculture, de la synthèse des protéines à la santé et aux maladies. A la date du 18 février 2021, la PDB contient 174826 entrées, toutes référencées par un code de quatre caractères un chiffre suivi de 3 caractères alphanumériques [2].

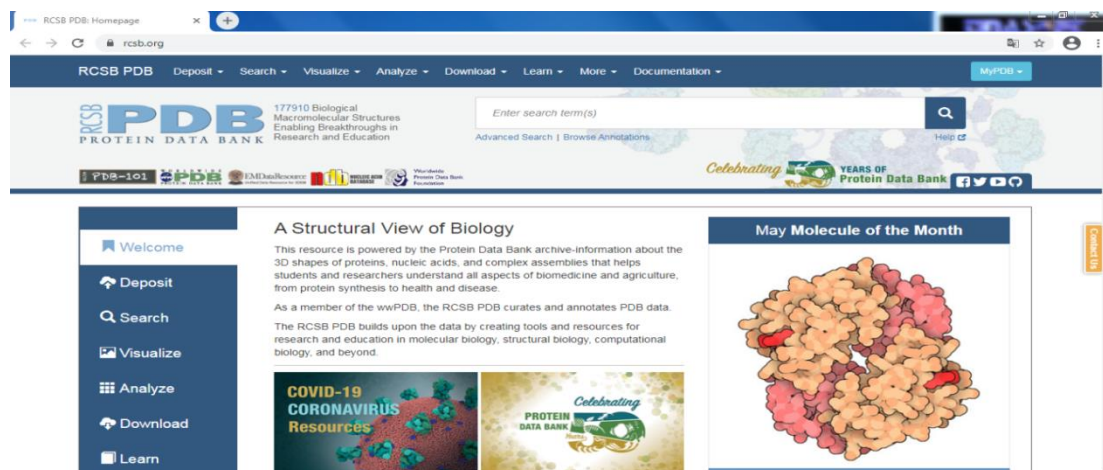


Figure IV.1 : Site de la Protéine Data Bank (PDB) [2].

#### I.2.2. PubChem

C'est une banque de données de molécules chimiques gérée par le Centre National de l'Information Biotechnologie (NCBI), branche de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis sous l'autorité de la National Institutes of Health (NCI). La chimiothèque PubChem répertorie plus de 94 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 [3].

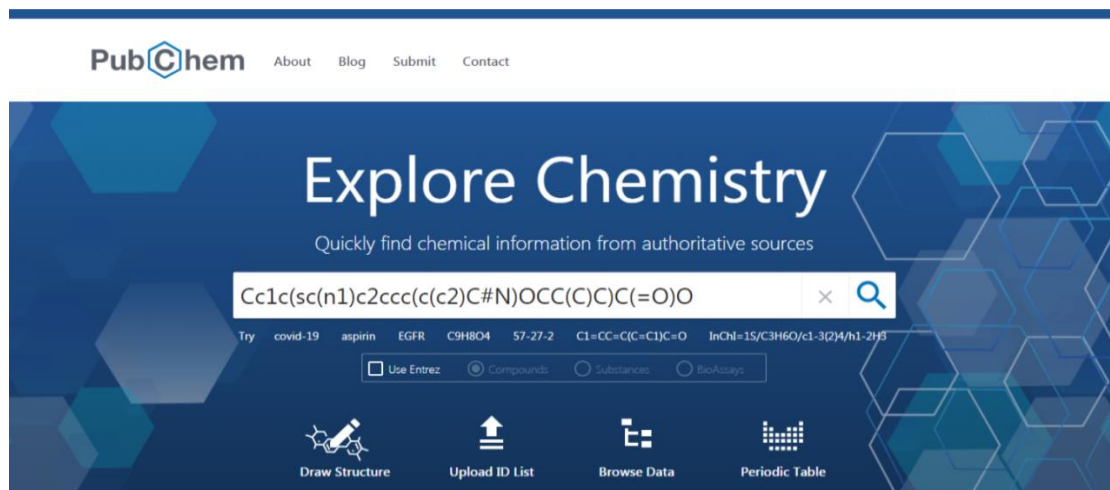


Figure IV.2 : Site de la PubChem [3].

### I.3. Programmes

#### I.3.1. Le logiciel Surfex-dock

Surflex-**dock** est un algorithme d'amarrage moléculaire flexible entièrement automatique qui combine la notation fonction du système d'amarrage Hammerhead avec un moteur de recherche qui repose sur une méthode basée sur la similitude moléculaire comme moyen de générer rapidement des poses putatives appropriées pour fragments moléculaires. Les cinq modules de la plateforme Surfex (Tools, Similarity, Docking, xGen et Affinity) sont entièrement intégrés. L'ensemble fournit un flux de travail complet de modélisation prédictive [4].

- Conversion moléculaire 2D en 3D, avec interprétation précise de la chiralité et fonctions de dénombrement ;
- Élaboration de conformité comprenant des macrocycles complexes, prenant également en charge l'utilisation de contraintes RMN ;
- Préparation et alignement de la structure des protéines ;
- Amarrage pour la prédiction de pose ou le dépistage virtuel ;
- Modélisation en espace réel des ligands en tant qu'ensembles conformationnels dans les cartes de densité de rayons X.

Le logiciel est disponible pour les plates-formes Windows, Linux et Mac, avec un déploiement facile sur les postes de travail et les ordinateurs portables sur site [5].

### I.3.2. Open Babel

Open Babel est une boîte à outils chimique conçue pour parler de nombreuses langues de données chimiques. Il s'agit d'un projet ouvert et collaboratif permettant à quiconque de rechercher, convertir, analyser ou stocker des données issues de la modélisation moléculaire, de la chimie, des matériaux à l'état solide, de la biochimie ou de domaines connexes [6].

### I.3.3. ViewerLite

ViewerLite 4.2 est un outil gratuit de visualisation, qui permet un affichage 3D d'une structure de molécule biologique. Il permet d'ouvrir plus de 150 types de fichiers sur PC sous un système d'exploitation Windows [7]. Le programme Surflex-dock est dépourvu de la visualisation c'est pour cette raison nous avons utilisé le programme ViewerLite afin de visualiser les différentes interactions formées entre le ligand et le site actif de notre enzyme.

## I.4. Les Serveurs

### I.4.1. SwissADME

SwissADME est un serveur en ligne géré par l'Institut suisse de bioinformatique (SIB), qui fournit des services et des ressources en bioinformatique aux scientifiques. Il fournit notamment une plate-forme pour évaluer la règle de cinq de Lipinski sur la biodisponibilité orale des médicaments (propriétés physicochimiques), les propriétés pharmacocinétiques et la ressemblance d'un composé à un médicament [8].

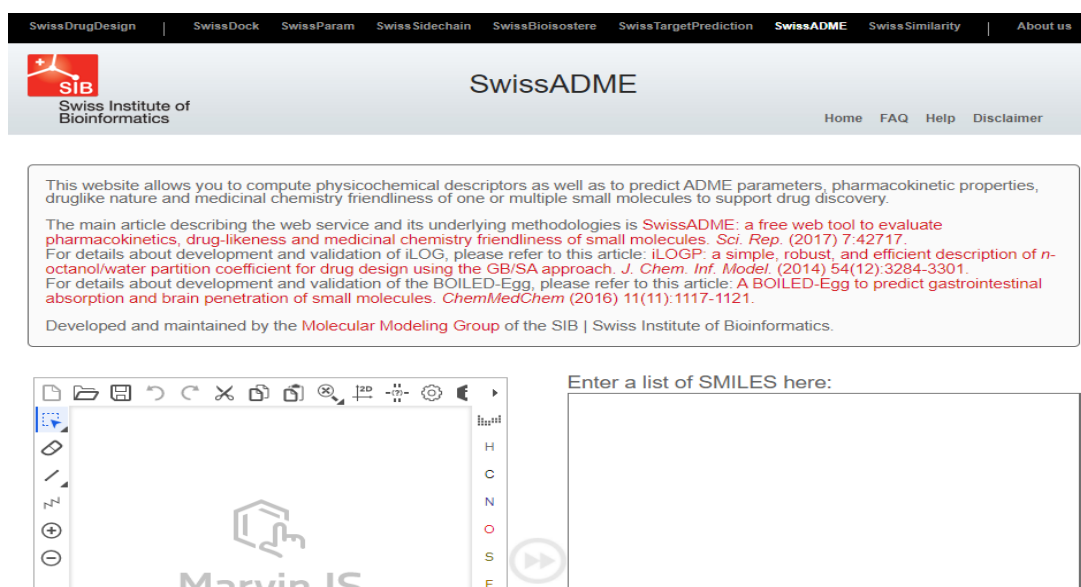


Figure IV.3 : Site de serveur SwissADME [8].

## I.4.2. PreADMET

PreADMET est une application Web permettant de prédire les données ADME-Tox et de créer une bibliothèque de type médicament à l'aide de la méthode in silico. PreADMET permet un accès à plusieurs modèles pour prédire [9] :

- Les propriétés physicochimiques (Druglikeness) ;
- Quelques comportements pharmacocinétiques ;
- La toxicité des composés.

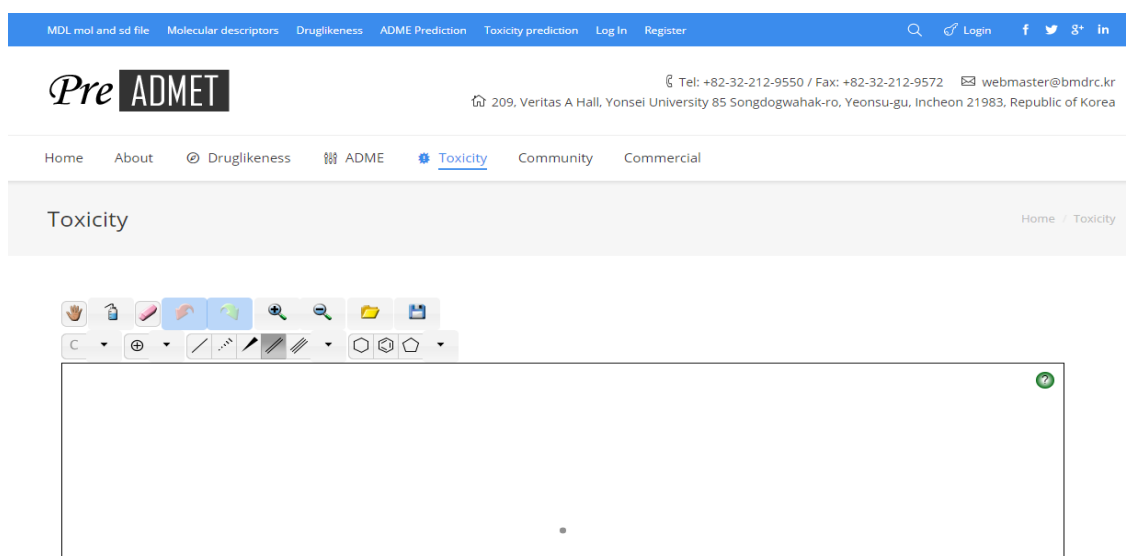


Figure IV.4 : Site de serveur PreADMET [9].

## II. Méthodes

### II.1. Réalisation du docking moléculaire

Le Docking a été réalisé en utilisant le programme Surfex-dock. Dans cette fenêtre nous avons appliqués les trois commandes de docking moléculaire :

- **Création du protomol :**

Identification du site actif par la construction d'une pseudo-molécule appelée "protomol". Cette étape est réalisée grâce à la commande suivante :

**Surflex-dock proto ligand.mol2 protéine.mol2 pl**

- **Docking d'un composé :**

Le docking d'un ligand débute par une fragmentation préalable du ligand. L'assemblage des fragments obtenus permet de rechercher les meilleures conformations du ligand dans le site

actif de l'enzyme. Le résultat de docking (Affinité) est donné sous la forme des 10 meilleurs « conformées » au format .mol2. La réalisation de cette étape nécessite la commande suivante :

**Surflex-dock dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 protéine.mol2**

- **Calcul du RMSD :**

Une fois la reconstruction du complexe protéine-ligand est réalisée par Docking moléculaire, Surflex-dock calcule le RMSD en comparant la géométrie du meilleur conformère (final-0) au ligand d'origine issu directement de la PDB. Le RMSD est calculé en utilisant la commande suivante :

**Surflex-dock rms final-0.mol2 ligand.mol2**

## **II.2. Evaluation de programme Surflex-dock**

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son cible enzymatique. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de trois critères.

### **II.2.1. Le RMSD**

La mesure la plus fréquemment utilisée pour la comparaison des structures en biologie structurale est, sans doute, la racine de position de l'atome écart quadratique moyen (RMSD) obtenu après roto-transla- ajustement par les moindres carrés .Ses applications sont diverse et inclure la surveillance des changements structurels dans les simulations de repliement et dynamique des protéines, évaluation de la qualité de schémas de prédiction de structure, comparant les diversité des structures modèles issues des expériences , évaluant les propriétés des approches de modélisation à différents niveaux de résolution et la définition de haute- formes de résolution des polymères. De plus, la structure diversité d'un ensemble de structures biomoléculaires obtenues par des simulations informatiques est fréquemment analysé par calcul d'une distribution tous contre tous des valeurs RMSD [23].

Le RMSD est la détermination de la position du ligand calculé par le logiciel de docking par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB (déterminer expérimentalement). La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms. La norme actuelle pour évaluer les performances d'un programme de docking est de faire un test à partir de plusieurs centaines de complexes protéine-ligand [10].

## II.2.2. Analyse visuelle

La visualisation des résultats de docking moléculaire faisant suite au test RMSD est également une étape importante pour juger de la performance du programme de docking utilisé. Elle permet de visualiser les résultats décrits par les valeurs numériques de RMSD, et d'assurer que les modèles des ligands simulés par ce programme sont correctement placés dans le site actif de l'enzyme.

## II.2.3. Coefficient de corrélation r

Le coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson permet d'étudier l'intensité et le sens de la corrélation qui existe entre deux variables. La valeur du coefficient de corrélation est située entre -1 et 1. Plus le coefficient de corrélation est proche des valeurs extrêmes -1 et 1, plus la corrélation linéaire entre les variables est forte [13].

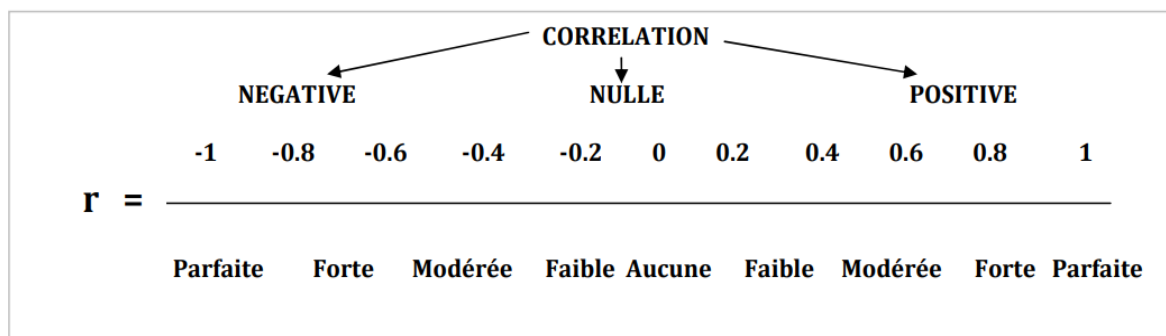


Figure IV.5 : Les différentes valeurs de r [21].

Pour étudier la corrélation entre le score obtenu par le docking moléculaire (Affinité) et l'activité biologique ( $IC_{50}$ ) nous avons utilisé des complexes enzyme-inhibiteur provenant de la PDB. Au total, 52 ont été testées. La disponibilité des valeurs de leur  $IC_{50}$  est parmi les critères de choix de ces molécules. Les structures des inhibiteurs testés, leurs  $IC_{50}$  ainsi que les affinités simulées par le programme Surflex-dock sont représentées dans l'annexe 2.

## III. Docking de cible enzymatique XOR

### III.1. Préparation de l'enzyme XOR

Dans notre étude nous avons utilisé le complexe 1N5X disponible dans la PDB contenant la xanthine oxydoréductase et l'inhibiteur TEI. Le complexe a été téléchargé au format .pdb après l'introduction de son code. Les deux molécules du complexe ont été séparées dans des fichiers différents. Le programme Surflex-dock exige le format. mol2. Pour cette raison, nous avons utilisés le programme Open Babel 2.3.0 pour la conversion du format .pdb de notre

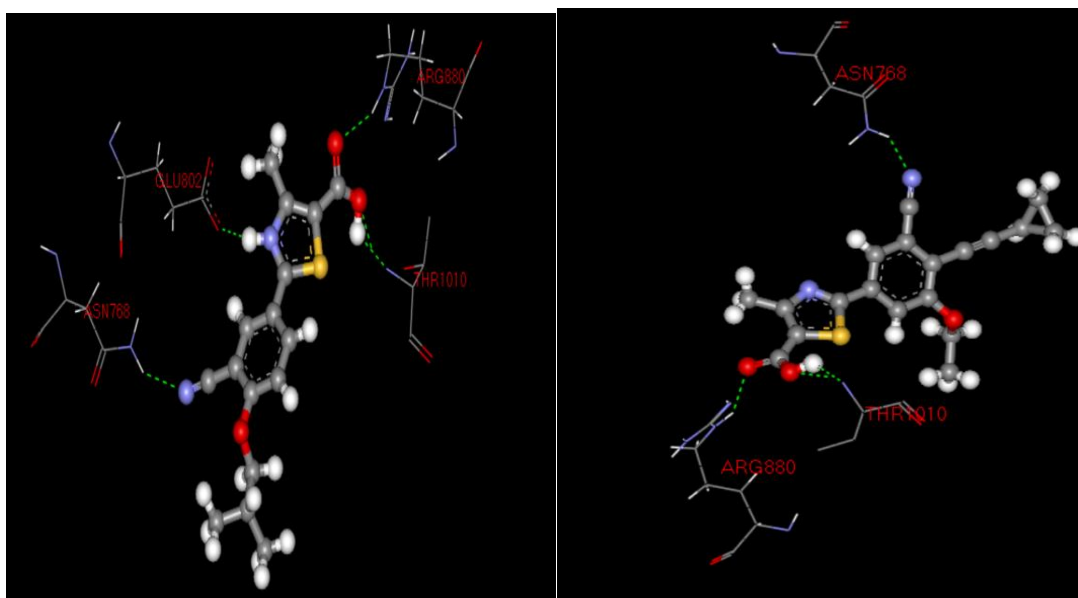
complexe en format .mol2 et aussi pour ajouter des atomes d'hydrogène à la structure de la protéine et du ligand.

### III.2. Préparation des inhibiteurs

A partir de la chimiothèque PubChem nous avons téléchargé 382 molécules similaires de la TEI. Ces molécules sont téléchargées sous le format .sdf et puis convertis au format .mol2 par le programme Open Babel.

### III.3. Etude des interactions des meilleurs inhibiteurs

C'est une étape très importante qui permet d'observer et de dénombrer les différentes interactions réalisées entre l'inhibiteur testé et les résidus du site actif de notre cible enzymatique.



**Figure IV.6 :** Visualisation des interactions réalisées entre les meilleurs inhibiteurs et les résidus du site actif de la XOR obtenu par ViewerLite.

## IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse

Pour augmenter le succès de la découverte et le développement de candidats médicaments, il est nécessaire de considérer l'activité pharmacologique des composés et l'optimisation de leurs propriétés ADMETox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité). Le Réseau des plateformes ADME repose une palette de prestations permettant d'identifier et de développer des candidats précliniques. Les tests peuvent être classés en trois catégories : caractérisation physicochimique, paramètres pharmacocinétiques et prédiction de la toxicité [8].

### IV.1. Propriété physicochimique

La règle de cinq de Lipinski est en relation directe avec les propriétés biologiques d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion éventuelle des molécules étudiées, repose sur propriétés physico-chimiques à savoir :

- Un poids moléculaire (PM) maximum de 500g/mol ;
- Un maximum de 5 liaisons H-donneurs (DH) (OH ou NH) ;
- Un maximum de 10 liaisons H-accepteurs (AH) (O ou N) ;
- Nombre de liaisons retables  $\leq 15$  ;
- Un coefficient de partition octanol / eau "logP" ou une lipophile  $\leq 5$ .

Cette règle permet de déterminer si un composé chimique avec une activité biologique possédant les propriétés admises généralement pour être un médicament susceptible d'être administré par voie orale [16].

### IV.2. Propriétés pharmacocinétiques

La pharmacocinétique est le terme utilisé pour décrire le mouvement d'un médicament dans, à travers et hors du corps. La cinétique d'un médicament peut être divisée en quatre phases : absorption, distribution, métabolisme, excrétion. Les propriétés de l'ADME affectent directement l'activité d'un médicament, il est donc important d'« optimiser » les propriétés du candidat médicament pour s'assurer qu'il est aussi efficace que possible [8].

- **BBB perméabilité**

La barrière hémato-encéphalique est une structure retrouvée au niveau des capillaires cérébraux. Elle représente un véritable obstacle pour les actifs qui doivent se rendre au cerveau pour y exercer un effet pharmacologique. Durant les étapes du développement du médicament, des modèles cellulaires *in vitro* sont utilisés pour l'évaluation de la perméabilité au cerveau des nouveaux médicaments [20].



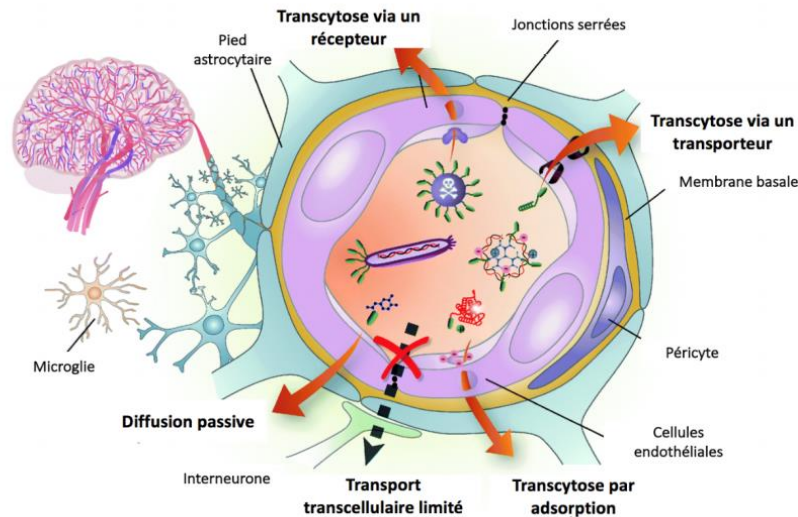


Figure IV.7 : Les voies de transport à travers la BHE [20].

- **GL absorption**

L'absorption est le processus par lequel le médicament passe de son site d'administration à la circulation générale. L'absorption gastro-intestinale (GI) est un modèle pour prédire *in silico* l'absorption des candidats-médicaments [21].

- **Inhibition CPY**

Les cytochromes P450 (CYP) sont des hémoprotéines qui participent au métabolisme oxydatif de nombreux médicaments. En fonction de la structure de la protéine fixée à l'hème, différentes familles et sous-familles ont été identifiées chez l'homme. Les principales formes sont CYP 1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 2E1 et 3A4, L'activité des CYP peut être modifiée sous l'action de médicaments inducteurs ou inhibiteurs, dont beaucoup font partie de la classe des médicaments anti-infectieux. Leur connaissance doit permettre d'éviter les interactions médicamenteuses. La connaissance des CYP impliqués dans le métabolisme d'un nouveau médicament est indispensable pour prévoir les interactions médicamenteuses qui risquent de survenir, et qu'il conviendra d'étudier avec des essais cliniques adaptés [17].

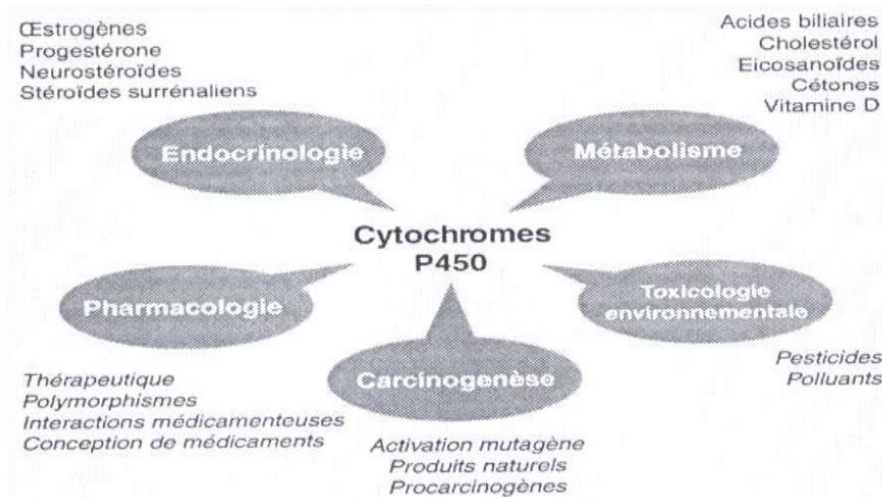


Figure IV.8 : Le rôle des cytochromes P450 [22].

### IV.3. La toxicité

La toxicité se définit comme l'ensemble des effets néfastes qui peuvent être des lésions morphologiques et fonctionnelles dans un organisme vivant, provoquées par une substance introduite à dose unique relativement élevée ou à des petites doses longtemps répétées. L'étude de la toxicité d'une substance est l'ensemble des essais pharmacologiques, qui déterminent le degré ou le caractère nocif de cette dernière afin de réglementer son utilisation. L'action d'une substance toxique est évaluée en fonction de plusieurs paramètres entre autres son mode d'administration [18].

- **Génotoxicité et Le test d'Ames**

C'est le test de génotoxicité le plus répandu. On y utilise des souches de bactéries (*Salmonella typhimurium*) qui ont perdu par mutation la faculté de synthétiser un acide aminé, l'histidine ; on cultive ces bactéries sur des milieux sans histidine, en présence de substance à tester (native ou traitée avec des enzymes hépatiques). Si la substance n'est pas mutagène, le développement des bactéries n'a pas lieu ; dans le cas contraire, la substance provoque une mutation "réverse", qui redonne aux bactéries la faculté de synthétiser l'histidine et donc de se développer. Le résultat est connu 4 jours après le début du test [14].

- **La carcinogénicité**

La carcinogénicité est une toxicité qui cause le cancer dans le corps. En règle générale, les tests de cancérogénicité nécessitent une longue période de temps (généralement 2 ans); actuellement, seules les méthodes de test in vivo sont établies. Habituellement, le test utilise des souris ou des rats, en les exposants à un composé. Et la variable à observer est l'existence d'un cancer, les tests de cancérogénicité in vivo menés sur des souris et des rats pendant 2 ans [21].

- **La toxicité de HERG**

L'HERG est une protéine jouant le rôle de canal ionique. Le blocage des canaux potassiques chez le gène humain lié à hERG est devenu une préoccupation croissante pour les organismes de réglementation et les industries pharmaceutiques qui investissent des efforts considérables dans l'évaluation de la toxicité cardiaque des médicaments. Les outils *in silico* permettant de filtrer les inhibiteurs potentiels du canal hERG aux premiers stades du processus de découverte de médicaments [19].

- **La toxicité aigue**

Les études de toxicité aigue de pesticides visent à obtenir de l'information sur les effets néfastes sur la santé humaine qui peuvent survenir dans les deux semaines suivant l'exposition à de fortes doses du produit. Pour ce, on observe les effets néfastes qui peuvent se produire chez des animaux de laboratoire 30 minutes après l'administration d'une dose unique, de façon périodique dans les 24 heures qui suivent et quotidiennement jusqu'à 14 jours [12], exemple : Les daphnies (teste daphnies) sont utilisées comme espèce modèle pour mesurer la toxicité aquatique des substances chimiques en laboratoire. En effet, ces crustacés d'eau douce constituent un niveau trophique intermédiaire, les consommateurs primaires : elles se nourrissent des producteurs comme les algues et sont mangées par d'autres espèces, les consommateurs secondaires, par exemple les poissons [16].

## Référence

- [1] Touw W. G., Baakman C., Black J., Beek A. H., Krieger E., Joosten R. P., Vriend G. 2015. une série de banque de donnée liées à la PDB pour les besoins quotidiens . *Nucleic Acids Research* .**43** :364-368.
- [2] Protein Data Bank. <http://www.pdb.org>. Consulté le [28 /05/2021].
- [3] PubChem. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulté le : [28 /05/2021].
- [4] Jain A. N. 2003. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *J. Med. Chem.* **46**(4):499-511.
- [5] BioPharmics. LLC | [info@biopharmics.com](mailto:info@biopharmics.com) | @biopharmics. Consulté le : [28 /05/2021].
- [6] Open Babel. <http://openbabel.org/>. Consulté le : [28 /05/2021].
- [7] ViewerLite. <https://windowsfileviewer.com/>. Consulté le : [28 /05/2021].
- [8] SwissADME. (<http://www.swissadme.ch>). Consulté le : [02 /06/2021].
- [9] preADMET. (<https://preadmet.bmdrc.kr/>). Consulté le : [02 /06/2021].
- [10] Teniou S. 2012. Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Mémoire de magistère en Biochimie. Université Mentouri Constantine I. Algérie. 100p.
- [11] Arrault A. 2007 Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat en Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. Université d'Orleans. France. 176 p.
- [12] Laurefn M. C. 2007. Études biologiques et toxicologiques de pesticides utilisés en pomiculture québécoise sur le prédateur acarien *Anystis Baccarum* (l.) Et analyse critique des dispositifs d'évaluation canadienne et américaine de la toxicité des pesticides. Mémoire de la maîtrise en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montréal .Canada. 138p.
- [13] Fox W. 1999. Statistiques Sociales. 3ème édition. France .374p .

- [14] Libes Y. 2014. La toxicité chimique et son évaluation. [https://www4.ac-nancy-metz.fr/ia54/circos/ienstmax/sites/ienstmax/IMG/pdf/La\\_toxicite\\_et\\_son\\_evaluation.pdf](https://www4.ac-nancy-metz.fr/ia54/circos/ienstmax/sites/ienstmax/IMG/pdf/La_toxicite_et_son_evaluation.pdf) Consulté le : [02/06/2021].
- [15] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P. J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* **46** :3-26.
- [16] Franklin B. 2017. Une meilleure caractérisation des mécanismes d'action toxique à partir de la structure moléculaire. Thèse de doctorat en Chimie, Physique et Matériaux. Université de Haute Alsace - Mulhouse. France. 210p.
- [17] Taburet A. M., Furlan V. 2000. Le système des cytochromes P450 : définition, rôle et implication dans la pharmacocinétique des anti-infectieux. *La Lettre de l'Infectiologue.***1** :12-17.
- [18] Etame L. G., Yinyang J., Okalla Ebongue C., Makondo B.V., Ngaba G.P., Mpondo E., Dibong S. D. 2017. Étude de la toxicité aigue et subaigüe de l'extrait au vin des graines de *Carica papaya* Linn. *Journal of Applied Biosciences.* **120**: 12077-12085.
- [19] De la Nuez A., Rodríguez R. 2008. Current methodology for the assessment of ADMETox properties on drug candidate molecules. *Biotecnología Aplicada.* **25** :97-110.
- [20] Puscas I. 2019. Développement d'un modèle in vitro de la barrière hémato-encéphalique. Mémoire du grade de Maîtrise en Sciences Pharmaceutiques. Université de Montréal. Canada .103p.
- [21] Boucherit H. 2020. Recherche in silico de nouveaux composés bioactifs et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase. Thèse de doctorat sciences en Biochimie. Constantine: Université Mentouri Constantine. Algérie. 116p.
- [22] Gueguen Y., Mouzat K., Ferrari L. 2006. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann. Biol. Clin.* **64**: 535-548.
- [23] Kelly L., Damm., Heather A. 2006. Carlson Gaussian-Weighted RMSD Superposition of Proteins: A Structural Comparison for Flexible Proteins and Predicted Protein Structures. *Biophysical Journal.* **90** :4558-4573.

*CHAPITRE V:*  
*Résultats et discussions*



Le travail réalisé ici est divisé en deux parties. La première partie traite la performance du programme de docking moléculaire utilisé (Surflex-dock). La deuxième partie expose l'étude des interactions intervenant dans l'inhibition de la XOR par divers inhibiteurs provenant de la base de données Pub hem et la découverte des nouveaux composés pouvant inhiber plus fortement notre cible enzymatique.

## I. Tests de fiabilité de programme Surflex-dock

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la xanthine oxydoréductase par diverses molécules, nous avons tenté d'évaluer la fiabilité du programme Surflex utilisé. Pour cela, nous avons fait appel au test de RMSD et l'analyse visuelle.

- La performance de ce programme est jugée au moyen de trois critères :
  - La précision du positionnement des composés (RMSD) ;
  - La superposition des géométries du ligand ;
  - Coefficient de corrélation linéaire (r).

### I.1. La précision du positionnement des composés (RMSD)

La manière dont les ligands sont arrimés dans le site actif peut être généralement décrite numériquement par le RMSD entre ligand calculée par le logiciel Surflex-dock par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB [1]. La prédiction est acceptable si sa valeur est inférieure ou égale à pas 2 angströms (Vieth et *al.* 1998 ; Chikhi et Bensegueni, 2008). [2] et [3].

Dans notre cas, le test RMSD pour le programme Surflex-dock a été réalisé sur 150 complexes protéine-ligand tirés de façon aléatoire de la PDB (tableau V.1).

**Tableau V.1** : Liste de 150 complexes utilisés pour calculer le RMSD

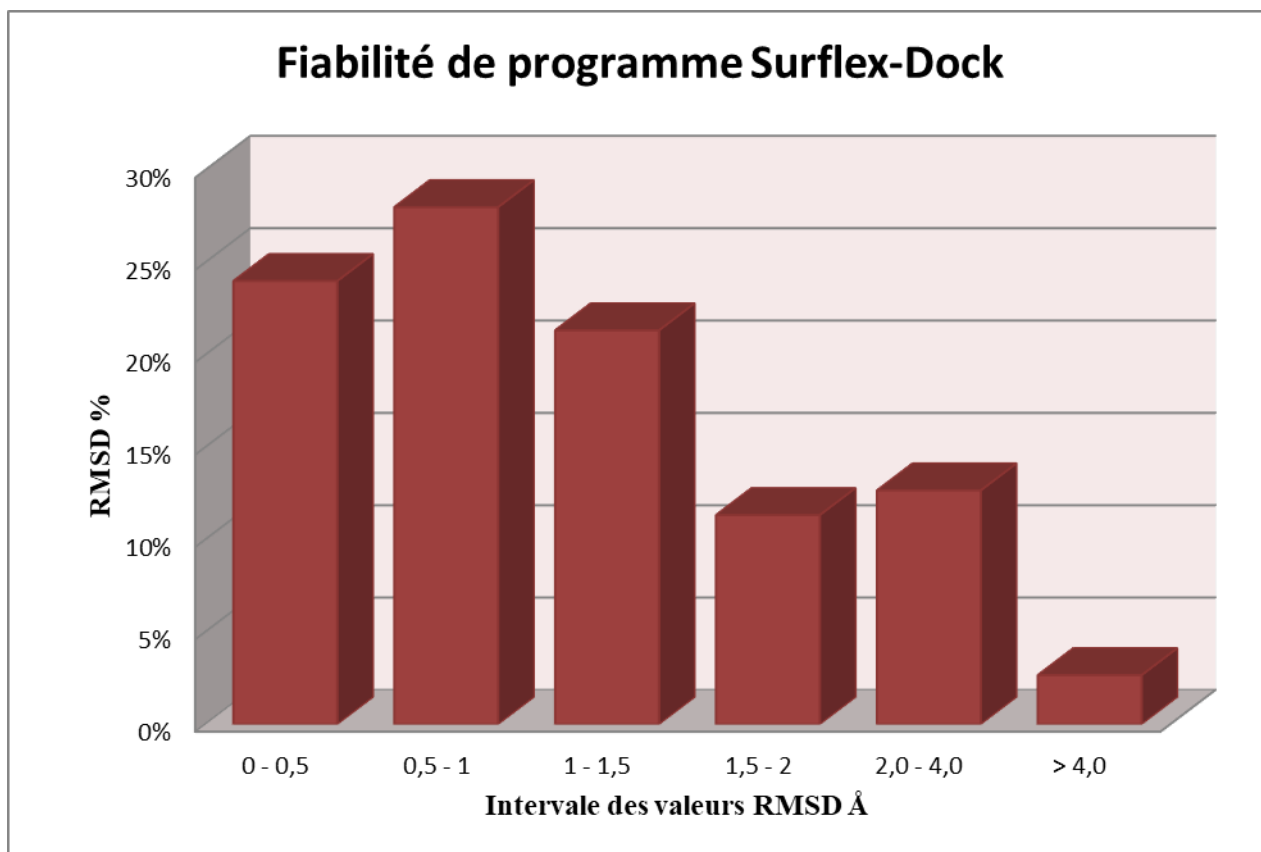
N	Code PDB	Code de ligand	RMSD (Å)	N	Code PDB	Code de ligand	RMSD (Å)
1.	1B9T	RAI	0,808	1.	2QWB	SIA	4.771
2.	1BQN	HBV	1.432	3.	2QWC	DAN	0.417
4.	1C1C	612	0.930	5.	2QWD	4AM	0.987
6.	1C23	MPH	0.601	7.	2QWE	NAG	1.092
8.	1C27	NLP	0.705	9.	2QWF	G20	0.652
10.	1CP6	BUB	2.727	11.	2QWG	G28	0.775
12.	1DTT	FTC	1.523	13.	2QWH	G39	1.343
14.	1FK9	EFZ	0.363	15.	2QWI	G20	1.185

16.	1E8V	DAN	1.153	17.	2QWJ	G28	0.772
18.	1EET	BFU	0.359	19.	2QWK	G39	0.705
20.	1EP4	S11	0.848	21.	2QYK	NPV	0.064
22.	1EUS	DAN	0.593	23.	2QYL	NPV	1.678
24.	1EUU	GAL	0.943	25.	2R3T	G4G	0.351
26.	1F8B	DAN	1.070	27.	2R3W	G3G	0.487
28.	1FKO	EFZ	0.284	29.	2R5P	MK1	0.749
30.	1FT7	PLU	2.499	31.	2R5Q	1UN	2.213
32.	1G2A	BB2	0.456	33.	8CPA	AGF	3.864
34.	1HNI	AAA	1.590	35.	2R6N	CKE	1.522
36.	1HNV	TBO	0.980	37.	2R8Q	IBM	1.487
38.	1N5N	GOL	2.457	39.	2R9W	23C	0.753
40.	1NN2	NAG	0.974	41.	2R9X	WH6	0.641
42.	1G27	BB1	2.039	43.	2R59	PH0	1.130
44.	1B9V	RA2	1.389	45.	2SIM	DAN	1.448
46.	3M2W	L8I	1.255	47.	3L4T	BJ1	0.457
48.	3MH3	BOG	3.133	49.	3L4V	KTL	1.789
50.	3MBL	LSG	1.428	51.	3L4W	NAG	1.265
52.	3NEW	3NE	0.479	53.	3L4X	NR3	1.923
54.	3NNU	EDB	0.464	55.	3L4Y	NR4	1.457
56.	3O1L	GOL	1.960	57.	4CPA	GLY	0.055
58.	3OBJ	BMU	0.994	59.	4DID	GDP	0.983
60.	3ONC	LDT	0.341	61.	6CPA	ZAF	1.334
62.	3PTB	BEN	0.062	63.	7CPA	FVF	0.646
64.	3RR3	FLR	1.502	65.	1ERQ	BJH	1.153
66.	3SLI	SKD	0.378	67.	2OTZ	1MR	0.051
68.	3TAV	MLT	0.825	69.	2OW0	6MR	0.898
70.	1B9S	FDI	4.715	71.	2OW9	SP6	1.257
72.	3IU9	T07	2.249	73.	2OXN	OAN	1.214
74.	3K6L	2BB	1.246	75.	5AM4	MVJ	0.053
76.	3KED	DAB	0.120	77.	5AM2	KUF	0.176
78.	3KWF	B1Q_	0.437	79.	5AM1	I5T	0.151
80.	3L03	4OH	0.913	81.	2BPZ	3IN	2.138
82.	3L8X	N4D	1.145	83.	1wj1	S99	0.774
84.	3LAK	KR1	0.459	85.	2WJ2	OL1	1.346
86.	1AQN	IPA	1.005	87.	5ALU	HD2	0.885
88.	3LN1	CEL	1.108	89.	5ALT	9XZ	1.166



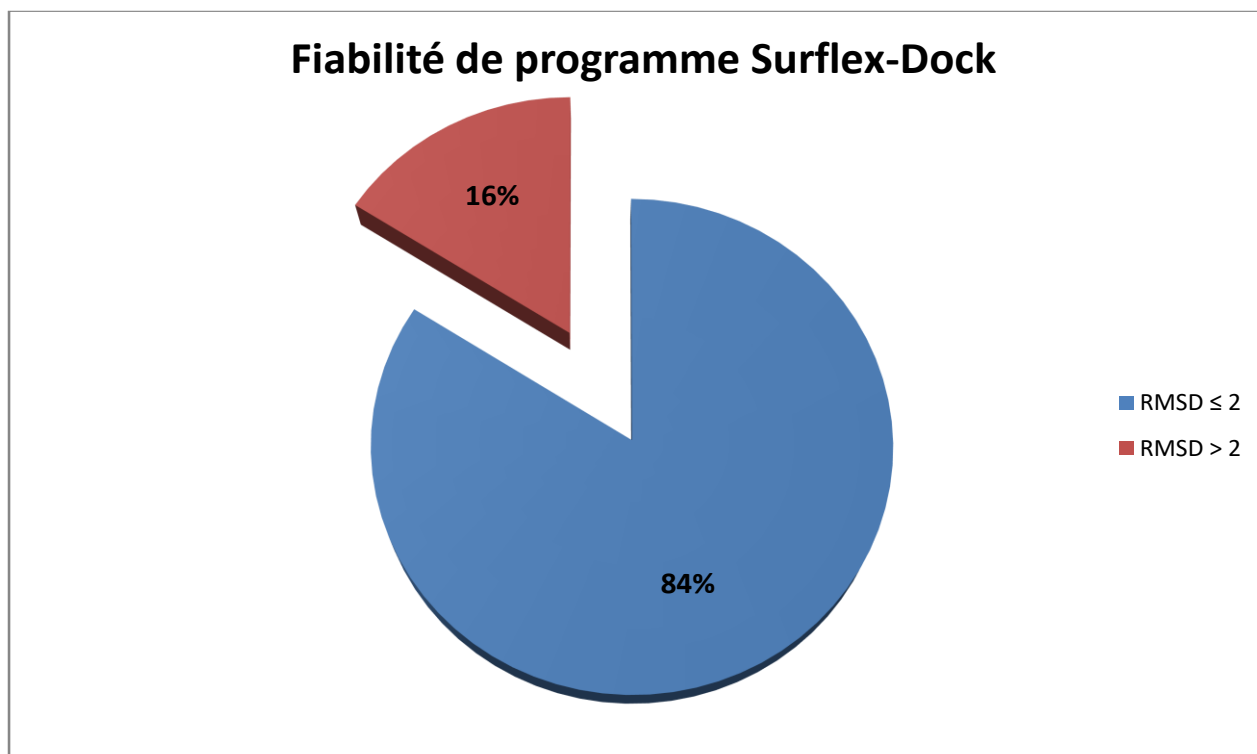
<b>90.</b>	3LQL	LDT	0.913	<b>91.</b>	5ALW	JQN	4.545
<b>92.</b>	3IU7	FCD	0.170	<b>93.</b>	5ALH	4UA	1.244
<b>94.</b>	3IU8	T03	0.223	<b>95.</b>	5AM0	LWS	0.550
<b>96.</b>	3HRB	I39	0.790	<b>97.</b>	5ALN	5ZM	0.073
<b>98.</b>	3HV6	R39	0.709	<b>99.</b>	5AI0	JF6	0.109
<b>100.</b>	3FMM	XI2	0.449	<b>101.</b>	4I73	MBY	0.625
<b>102.</b>	3G5K	BB2	0.827	<b>103.</b>	2WAP	PIX	1.642
<b>104.</b>	3GC7	B45	0.631	<b>105.</b>	2RF	23N	0.348
<b>106.</b>	3GC8	B45	0.731	<b>107.</b>	5ALD	FCW	1.310
<b>108.</b>	3GCP	SB2	1.232	<b>109.</b>	2PJ2	864	0.333
<b>110.</b>	3GCQ	1BU	1.118	<b>111.</b>	3D50	OEV	2.681
<b>112.</b>	4V0I	J82	3.687	<b>113.</b>	2PJB	983	1.686
<b>114.</b>	1AI4	DHY	1.888	<b>115.</b>	2OYL	IDC	0.762
<b>116.</b>	1AI5	MNP	1.504	<b>117.</b>	2OZ2	D1R	1.453
<b>118.</b>	1AI6	4HP	2.040	<b>119.</b>	2P9A	YE6	0.295
<b>120.</b>	2QTB	474	0.813	<b>121.</b>	2P98	YE7	0.891
<b>122.</b>	1AI7	IPH	0.048	<b>123.</b>	2P99	YE6	0.058
<b>124.</b>	1AJP	OMD	2.604	<b>125.</b>	2P8O	BVA	4.482
<b>126.</b>	1CPS	CPM	1.304	<b>127.</b>	2P83	MR0	1.897
<b>128.</b>	1GZF	NAD	3.466	<b>129.</b>	3D7H	YC2	0.777
<b>130.</b>	1JKD	NO3	0.046	<b>131.</b>	2OVV	PFH	1.403
<b>132.</b>	1K5Q	PAC	2.221	<b>133.</b>	3D7G	MUD	0.436
<b>134.</b>	1K5S	GRO	0.094	<b>135.</b>	3D7F	YBY	1.949
<b>136.</b>	1KEC	GRO	1.227	<b>137.</b>	3CWE	825	3.173
<b>138.</b>	2BPZ	3IN	2.138	<b>139.</b>	3D6P	U2S	1.656
<b>140.</b>	2CTC	HFA	0.311	<b>141.</b>	3D7D	FBD	2.050
<b>142.</b>	2QTT	FMC	0.726	<b>143.</b>	3CTR	MGP	1.805
<b>144.</b>	2QU2	251	0.951	<b>146.</b>	3CKR	009	0.912
<b>147.</b>	2QU3	462	0.956	<b>148.</b>	3D45	7MG	1.689
<b>149.</b>	2QVU	FDP	0.885	<b>150.</b>	3D4Z	GIM	3.663

Dans les graphes suivants, les résultats sont donnés en pourcent (%), à plusieurs intervalles de RMSD représentés par différentes couleurs :



**Graphe V.1 :** Résultats en % obtenus par Surfex-dock à plusieurs intervalles de RMSD (Å)

Le RMSD minimum dans l'ensemble est de 0.046 Å alors que le maximum est de 4.771 Å. La majorité des résultats positifs se situe dans l'intervalle 0-0.5 Å avec un pourcentage de 25% et l'intervalle 0,5 – 1 Å avec un pourcentage de 28%.



**Grphe V.2 :** Résultats en pourcentage du test RMSD à deux intervalles.

Le graphe 01 montre que 84% des valeurs de RMSD sont inférieures ou égale à 2 Å et que seulement 16 % des résultats sont supérieurs à 2 Å. Conformément aux travaux de Vieth *et al.*, (1998), Chikhi et Bensegueni, (2008) et Gabb *al.*, (1997) [2, 3 et 5]. Ce résultat est comparable aussi à celui rapporté par Teniou, (2012), Boucherit *et al.*, (2014). Et ce qui montre que tout programme de docking est réussi lorsque le RMSD est inférieure à 2 Å [4, 6]. Ceci est également cohérent avec les résultats obtenus par Zaheer-ul-Haq *et al.* (2010). Où six programmes de docking ont été utilisés : FRED, GOLD, MOE, AutoDock, FlexX et Surflex, pour une étude comparative. Le calcul du RMSD montre que les meilleurs résultats ont été obtenus par Surflex et GOLD [7].

## I.2. Analyse visuelle par MSViewer

L'analyse visuelle est aussi une étape utile pour juger la performance du logiciel Surflex-dock. Elle permet de visualiser les résultats décrits par la valeur numérique RMSD [1]. La comparaison de la conformation expérimentale des trois complexes (colorées en orange) : le 1FK9 (le meilleur), le 2R5Q (l'intermédiaire) et le 1B9S (le mauvais) avec les conformations optimales calculées par le logiciel Surflex-dock (colorées en vert), est montrée dans le tableau et les figures suivantes.

Tableau V.2 : Valeurs de RMSD des trois complexes choisis

NUM	Code PDB	Code de ligand	RMSD Å
1	1FK9	EFZ	0.363
2	2R5Q	1UN	2.213
3	1B9S	FDI	4.715

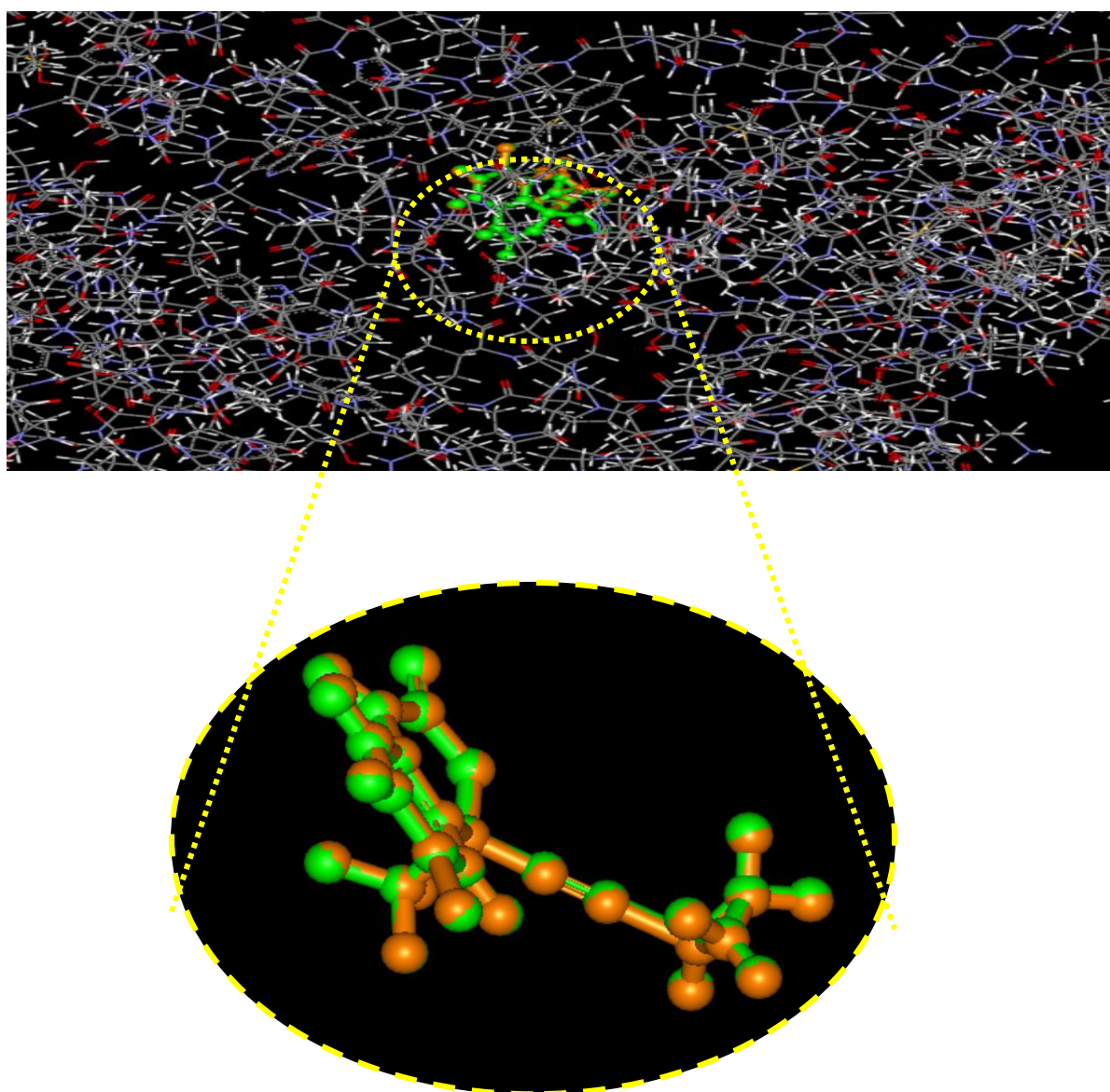
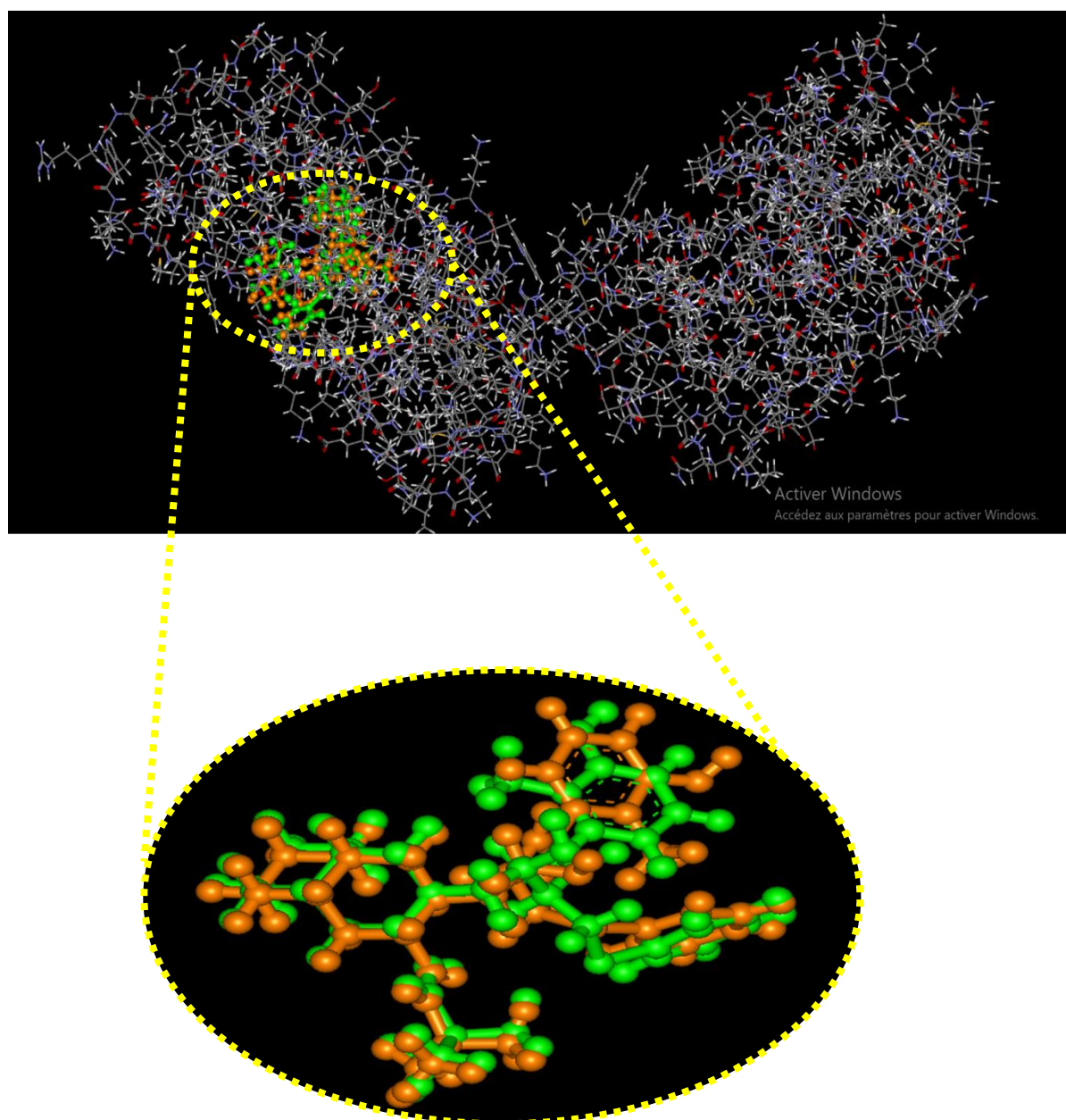
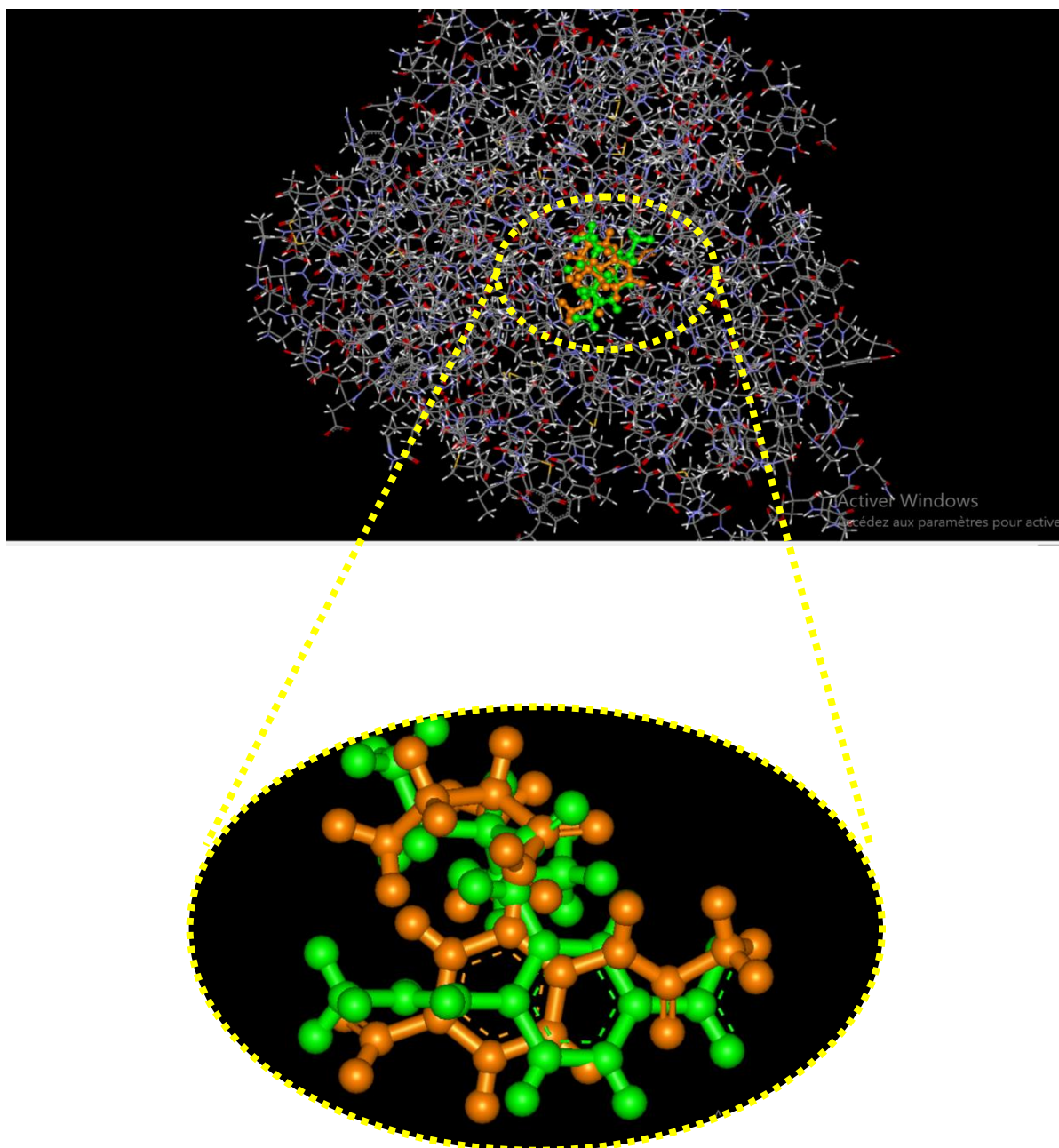


Figure V.1 : Superposition du ligand EFZ du complexe 1FK9 simulé par Surflex-dock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en orange).



**Figure V.2** : Superposition du ligand 1UN du complexe 2R5Q simulé par Surfex-dock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en orange).



**Figure V.3 :** Superposition du ligand FDI du complexe 1B9S simulé par Surflex-dock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en orange).

D'après les résultats de docking moléculaire, on obtient :

- Dans le cas de ligand EFZ, avec un RMSD de 0.363 Å ; la superposition de la conformation est parfaite. Elle présente une conformation spatiale très proche voir même superposable à celle déterminée expérimentalement.
- Dans le cas de ligand 1UN, avec un RMSD de 2.213 Å ; la superposition de la conformation est moindre que dans le premier cas.

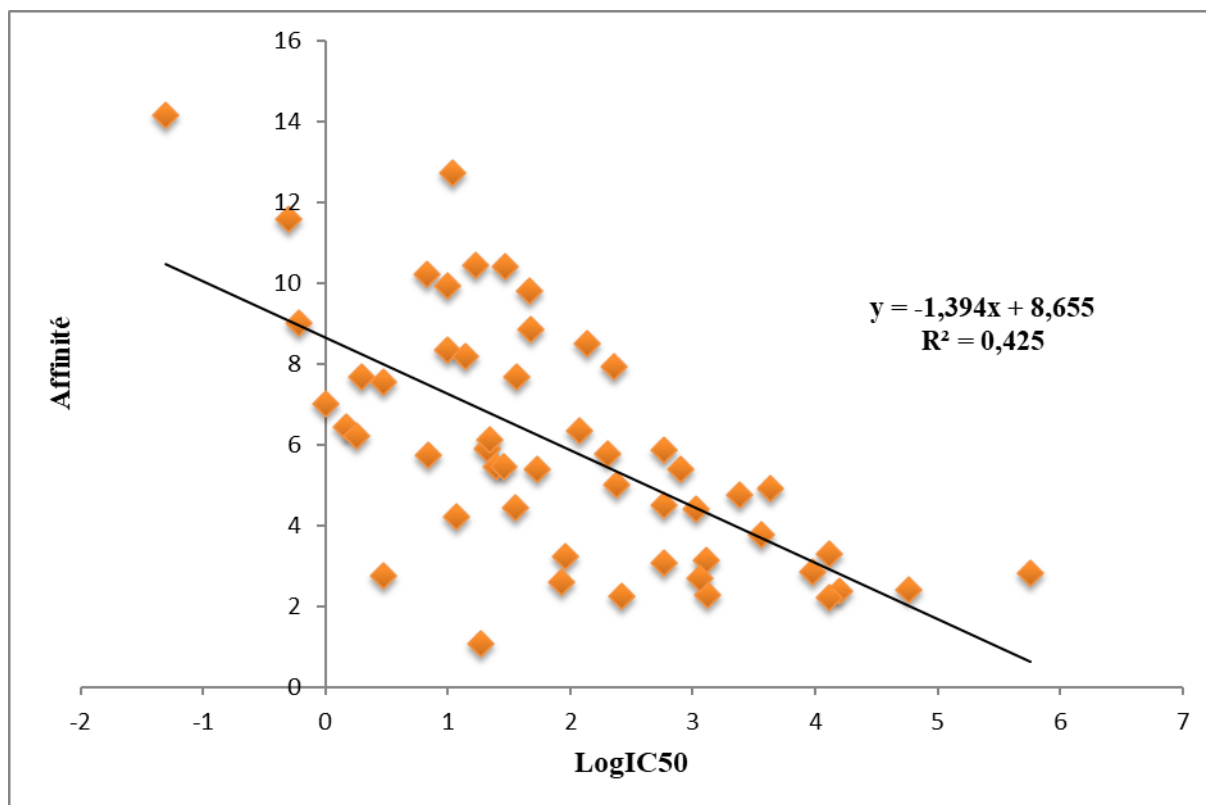
- Dans le cas de ligand FDI, avec un RMSD de 4.715 Å ; la superposition de la conformation est mauvaise c'est-à-dire le ligand arrimé et éloigné de ligand qu'on retrouve dans la PDB.

### I.3. Coefficient de corrélation linéaire (r)

Afin de tester une nouvelle fois la performance du programme surflex nous avons jugé utile de calculer le coefficient de corrélation linéaire (r), en traçant la droite de régression linéaire entre l'affinité (final-0) et l'activité biologique (LogIC<sub>50</sub>).

Dans cette étude, différents complexes protéine-inhibiteur proviennent de la PDB ont été examinés. Au total, 52 complexes ont été testés par Surfex-dock. Le score de docking (final-0) des inhibiteurs étudiés ainsi que leur IC<sub>50</sub> sont représentés dans l'annexe 1.

L'analyse par régression linéaire a permis d'obtenir la courbe de corrélation suivante.



**Graph V.3 :** Corrélation entre l'activité biologique (LogIC<sub>50</sub>) des inhibiteurs et leurs Affinités données par Surfex-dock.

Le graphe V.3 montre que le programme Surfex-dock établit une relation linéaire positive avec  $r = 0,65$  entre le score de docking (final-0) et l'activité biologique représentée ici par logIC<sub>50</sub>. Il y a donc corrélation significative entre les deux paramètres analysés. Ceci est

également cohérent avec les résultats obtenus par Boucherit (2012), Kamel et al, (2010), Bensegueni et Chikhi, (2010) [8, 9 et 10].

## **Conclusion**

Les différents tests utilisés dans ce travail pour évaluer la qualité du programme Surflex-dock, nous permet de conclure que ce logiciel est hautement performant. Il peut donc être utilisé, sans grands risque d'erreurs, pour étudier profondément le mécanisme d'inhibition de la XOR par ces inhibiteurs.

## **II. Etude des interactions intervenant dans l'inhibition de la xanthine oxydoréductase par l'inhibiteur TEI**

### **II.1. Notion du site actif**

Les enzymes sont en général des protéines globulaires possèdent une région particulière reconnue par le ligand spécifique de la protéine s'appelle le site actif. Le site actif est constitué d'un petit nombre d'acides aminés constitués éloignés dans la structure primaire mais proches dans la structure 3D. On distingue au sein du site actif :

- Les acides aminés qui constituent le site de fixation (ces acides aminés n'ont pas de fonction chimique impliquées dans la réaction) reconnaît la structure du substrat et détermine l'affinité et la spécificité de la réaction qui établissent des liaisons non covalentes avec le substrat pour le stabiliser.
- Les acides aminés qui constituent le site catalytique permet la transformation du substrat en produit et détermine la vitesse de la réaction.

### **II.2. Les acides aminés de site actif de la XOR**

La détermination des acides aminés de site actif de notre cible intervenant dans le processus de reconnaissance du ligand est cruciale pour pouvoir réaliser un docking moléculaire. Le site actif de notre cible enzymatique est constitué des acides aminés suivants :

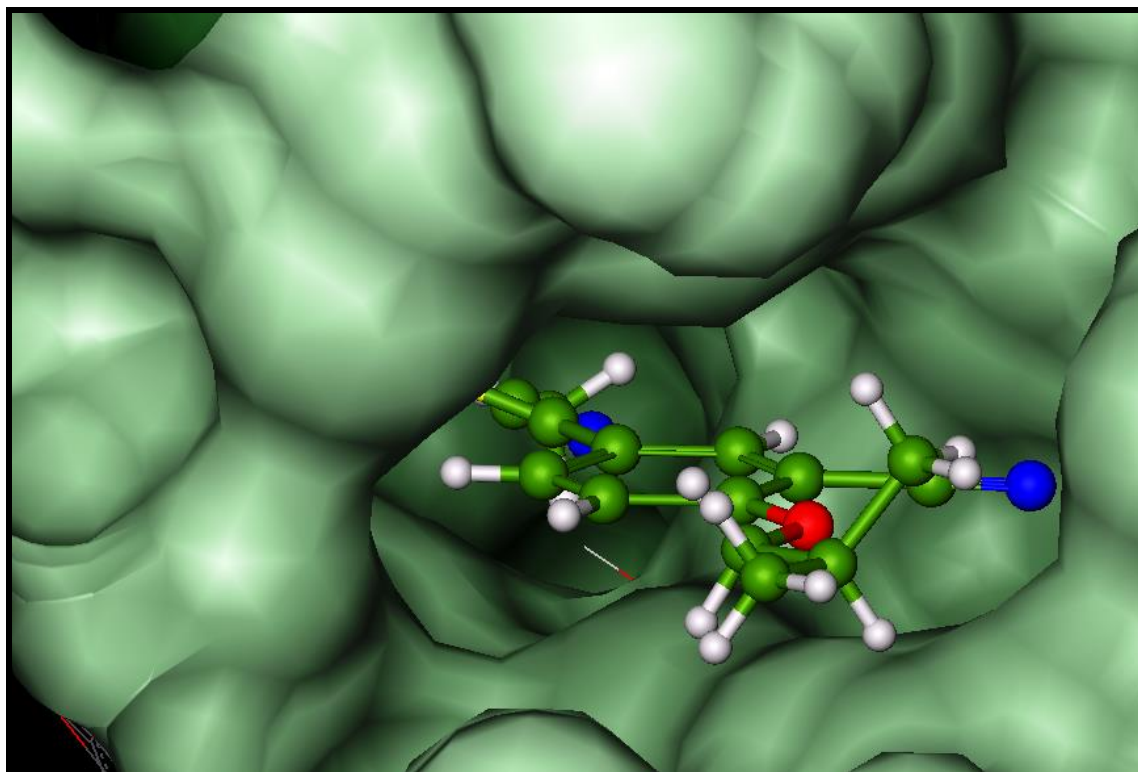
Leu 648, Phe 649, Asn 768, Lys771, Glu 802, Thr 803, Asp872, Leu 873, Ser 876, Ile877, Arg880, Ala 910, Gly 913, Phe 1005, Gly 1006, Ser 1008, Phe 1009, Thr 1010, Val 10011, Phe113, Leu1014, Ser 1075, Pro 1076, Ala1078, Ala 1079, Ser1080, Phe1150 et Glu 1261.

### **II.3. Analyse visuelle des interactions XOR-TEI par le programme ViewerLite42**

Notre démarche consiste d'abord d'étudier l'interaction de l'enzyme XOR avec le ligand de référence TEI. Le résultat est illustré dans la figure V.4.



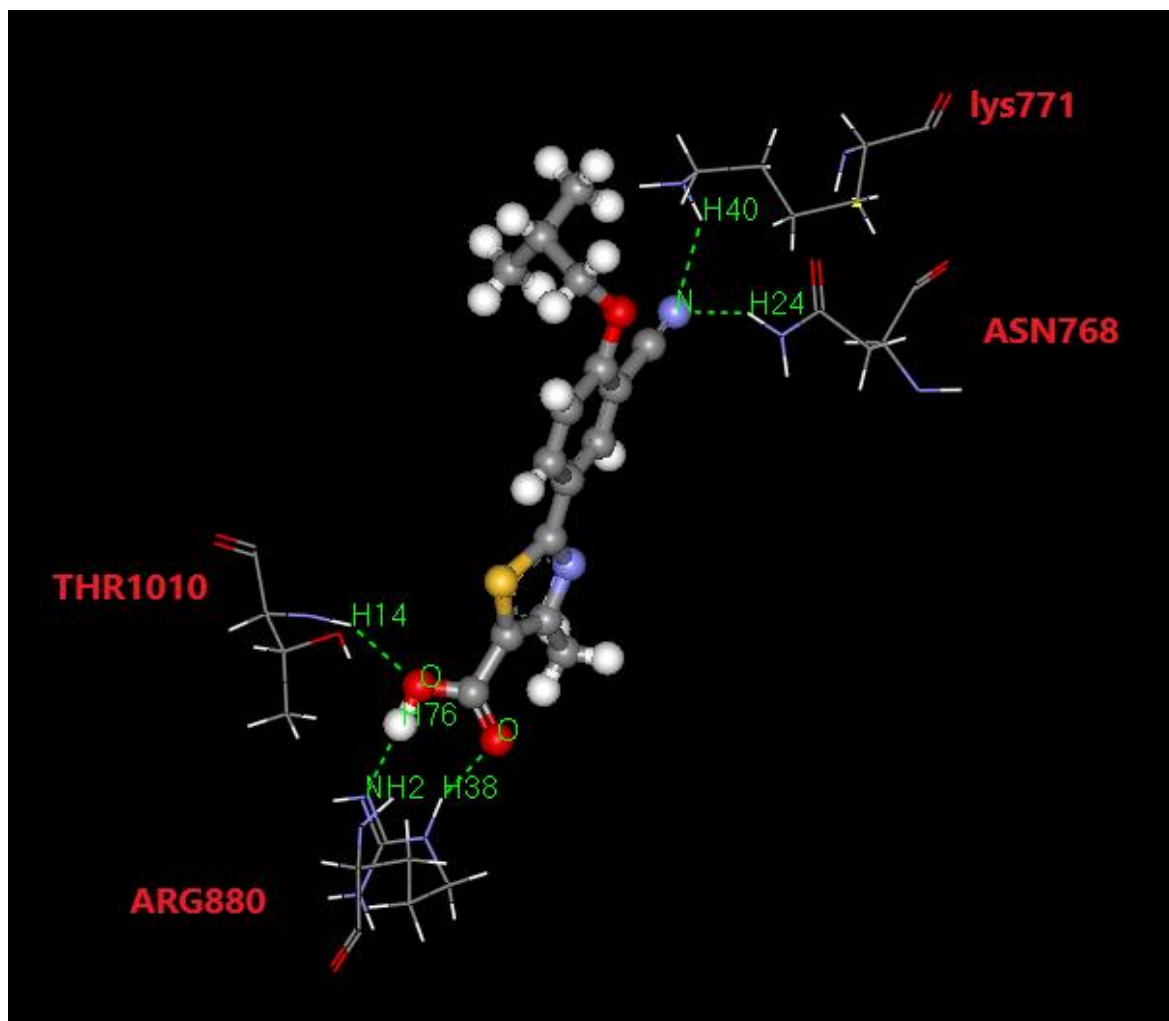
La figure suivante représente la cavité du site actif de la xanthine oxydoréductase complexée avec le TEI.



**Figure V.4 :** Représentation de la cavité du site actif de la XOR complexée avec le TEI

Les interactions prédites par le docking moléculaire sont, en général, électrostatiques. Parmi les liaisons électrostatiques, les liaisons Hydrogènes [10]. Sont très répandues et importantes en raison de leur force qui bascule entre celle de la liaison covalente et celle des forces de Van Der Waals.

La visualisation des résultats du docking par Surflex-dock montre que le l'inhibiteur TEI forme avec le site actif de la XOR cinq liaisons hydrogène avec quelques acides aminés de site actif représentés dans la figure V.5 ci-dessous.



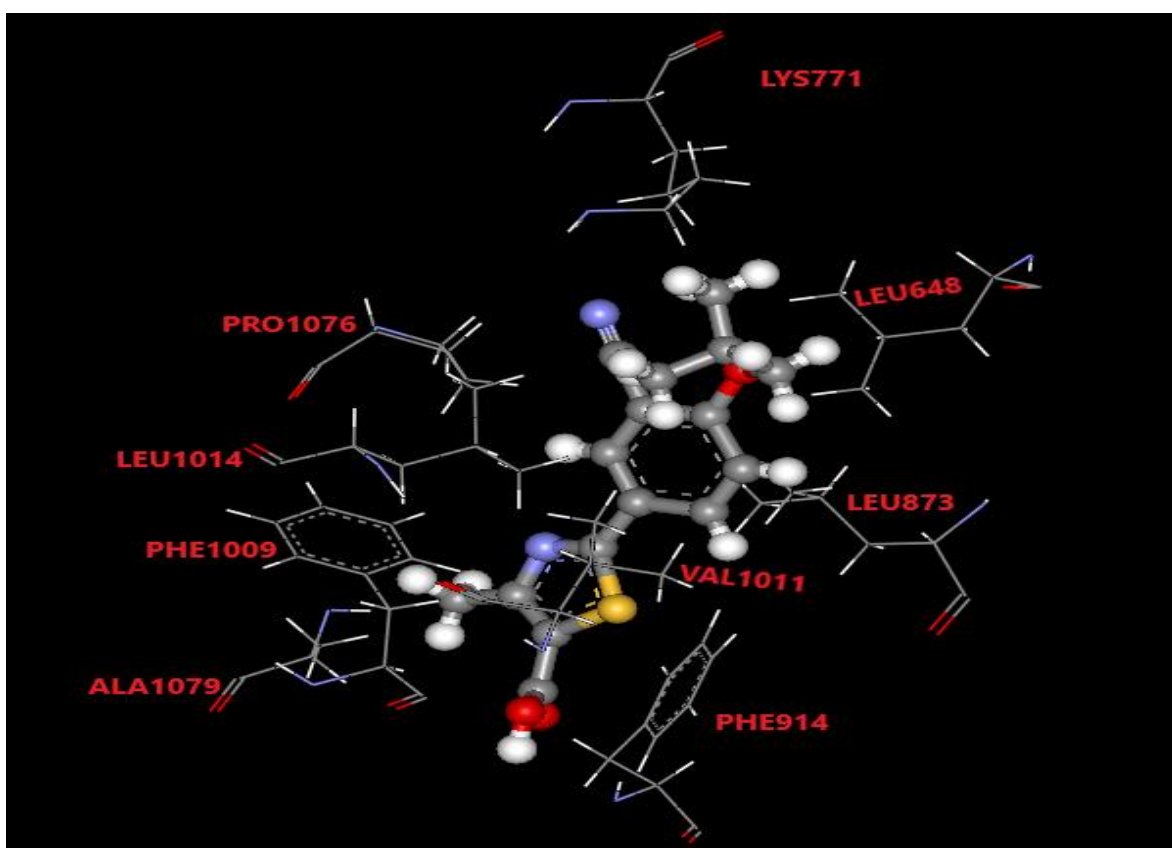
**Figure V.5 :** Analyse visuelle par ViewerLite 42 du mode d'interaction du ligand TEI avec le site actif de la XOR.

L'analyse visuelle montre que l'inhibiteur TEI est stabilisé par la formation des ponts hydrogène (représentés en tirets discontinus vert) avec les résidus de ASN768, Lys771, ARG880 et THR1010. De plus, le complexe enzyme-inhibiteur donne une affinité égale à  $7.66 \text{ M}^{-1}$ . Dans le tableau V.3 ci-dessous nous avons résumé ces différentes liaisons.

**Tableau V.3** : Les liaisons hydrogène établies par le TEI avec le site actif de la XOR.

Liaisons H	Mode de liaison de l'inhibiteur avec les résidus du site actif
1	N de l'inhibiteur ----- H (N°=24) ----- de l'AA : ASN768
2	N de l'inhibiteur ----- H (N°=40) de l'AA : LYS771
3	O de l'inhibiteur ----- H (N°=14) de l'AA : THR1010
4	H (N°=76) de l'inhibiteur ----- NH <sub>2</sub> de l'AA : ARG880
5	O de l'inhibiteur ----- H (N°=38) de l'AA : ARG880

De plus, plusieurs interactions hydrophobiques stabilisent l'inhibiteur TEI. Elles sont réalisées avec les résidus de LYS771, LEU648, LEU873, VAL1011, PHE914, ALA1079, PHE1009, LEU1014 et PRO1076. La figure V.6 visualise ces interactions :



**Figure V.6** : Représentation des interactions hydrophobiques formées par le composé TEI avec la XOR

### III. Proposition de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase

#### III.1. Inhibition de la XOR par les similaires de l'inhibiteur TEI

Dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la XOR, nous avons réalisés un docking moléculaire par le logiciel Surflex-dock d'une collection de 482 similaires du composé TEI avec 90% de similarité. Ces composés chimiques sont téléchargés à partir de la banque de donnée PubChem. Les résultats de docking par Surflex-dock sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau V.4 :** Résultats de docking avec le logiciel Surflex-dock dans le site actif de la XOR

N	Code de l'inhibiteur	Affinité (M <sup>-1</sup> )	N	Code de l'inhibiteur	Affinité (M <sup>-1</sup> )
1	CID_134018	6,47	2	CID_22687935	7,79
3	CID_2798545	5,03	4	CID_39158559	6,24
5	CID_9818975	4,73	6	CID_73052723	3,98
7	CID_9884549	6,72	8	CID_39158582	7,33
9	CID_11956739	4,63	10	CID_43056491	4,81
11	CID_11956740	5,80	12	CID_46825938	5,05
13	CID_12307245	2,86	14	CID_53354188	6,81
15	CID_19965105	7,27	16	CID_73052722	5,58
17	CID_19965145	7,12	18	CID_53354189	7,04
19	CID_19965169	2,79	20	CID_53354190	7,05
21	CID_23062189	1,37	22	CID_73052721	4,29
23	CID_46849409	6,47	24	CID_62131534	6,95
25	CID_46897585	1,61	26	CID_73051142	5,54
27	CID_49849690	6,17	28	CID_73050993	4,63
29	CID_67479596	5,87	30	CID_73050992	5,64
31	CID_69189133	3,26	32	CID_73050991	6,04
33	CID_92136281	6,76	34	CID_73050990	6,21
35	CID_92136333	5,31	36	CID_71544042	5,23
37	CID_95492613	6,03	38	CID_73050988	3,57
39	CID_102154657	4,65	40	CID_71544098	5,99
41	CID_117793809	3,93	42	CID_71544100	4,38
43	CID_123304594	6,44	44	CID_20984533	4,44
45	CID_123534046	5,45	46	CID_20988180	5,28

<b>47</b>	CID_123578835	5,42	<b>48</b>	CID_20987832	5,15
<b>49</b>	CID_123592322	3,50	<b>50</b>	CID_20987734	5,12
<b>51</b>	CID_123701130	3,30	<b>52</b>	CID_20987593	7,22
<b>53</b>	CID_123704905	6,25	<b>54</b>	CID_20987453	3,56
<b>55</b>	CID_123820018	2 ,76	<b>56</b>	CID_20987350	7,82
<b>57</b>	CID_123820090	8,96	<b>58</b>	CID_20987199	5,42
<b>59</b>	CID_123866861	6,16	<b>60</b>	CID_20987153	3 ,42
<b>61</b>	CID_123904306	7,98	<b>62</b>	CID_20987100	5,66
<b>63</b>	CID_123964358	5,33	<b>64</b>	CID_20986764	7,73
<b>65</b>	CID_123997573	8,38	<b>66</b>	CID_20986614	4,27
<b>67</b>	CID_124009973	6,14	<b>68</b>	CID_20985985	4,25
<b>69</b>	CID_131871719	4,98	<b>70</b>	CID_20984716	4,70
<b>71</b>	CID_131874197	5,67	<b>72</b>	CID_20984619	6,16
<b>73</b>	CID_131874756	4,98	<b>74</b>	CID_153818114	-0.23
<b>75</b>	CID_132062247	7,08	<b>76</b>	CID_152431070	0.26
<b>77</b>	CID_132062251	4,45	<b>78</b>	CID_152049810	1.22
<b>79</b>	CID_132062256	5,75	<b>80</b>	CID_150064665	3.06
<b>81</b>	CID_134548169	3,48	<b>82</b>	CID_149781335	-0.65
<b>83</b>	CID_135482091	5,65	<b>84</b>	CID_146014067	2.33
<b>85</b>	CID_135627703	6,13	<b>86</b>	CID_144982194	2.70
<b>87</b>	CID_136098592	4,47	<b>88</b>	CID_144982132	0.53
<b>89</b>	CID_136414588	6,02	<b>90</b>	CID_144677002	3.14
<b>91</b>	CID_136475442	6,38	<b>92</b>	CID_144753786	1.43
<b>93</b>	CID_136622686	4 ,16	<b>94</b>	CID_144676986	2.97
<b>95</b>	CID_136642659	3,01	<b>96</b>	CID_144676984	3.31
<b>97</b>	CID_137145920	3,57	<b>98</b>	CID_144328337	1.32
<b>99</b>	CID_137306156	4,05	<b>100</b>	CID_138756054	1.65
<b>101</b>	CID_139312255	6,49	<b>102</b>	CID_137781970	2.12
<b>103</b>	CID_139312262	7,54	<b>104</b>	CID_137766422	1.29
<b>105</b>	CID_139567527	4,85	<b>106</b>	CID_93764298	1.07
<b>107</b>	CID_139767480	3,63	<b>108</b>	CID_137765330	2.08
<b>109</b>	CID_139882205	6,55	<b>110</b>	CID_137756053	1.61
<b>111</b>	CID_140250205	6,47	<b>112</b>	CID_137720874	1.03
<b>113</b>	CID_140302148	4,67	<b>114</b>	CID_137694998	1.17

<b>115</b>	CID_140302302	5,82	<b>116</b>	CID_137694997	2.15
<b>117</b>	CID_141182650	2,27	<b>118</b>	CID_137694996	1.48
<b>119</b>	CID_141182651	6,19	<b>120</b>	CID_137694995	2.06
<b>121</b>	CID_141182652	2,34	<b>122</b>	CID_137694994	1.88
<b>123</b>	CID_141182653	0,91	<b>124</b>	CID_137694993	2.12
<b>125</b>	CID_141228114	1 ,44	<b>126</b>	CID_137694992	1.67
<b>127</b>	CID_141228115	2,27	<b>128</b>	CID_93747647	1.57
<b>129</b>	CID_141299316	8,61	<b>130</b>	CID_137694991	0.68
<b>131</b>	CID_141299317	6,43	<b>132</b>	CID_137694990	1.76
<b>133</b>	CID_141313501	7,80	<b>134</b>	CID_137694989	1.81
<b>135</b>	CID_141358346	6,13	<b>136</b>	CID_137620873	0.15
<b>137</b>	CID_141363332	6,35	<b>138</b>	CID_137580324	0.12
<b>139</b>	CID_141363333	4,24	<b>140</b>	CID_89706781	1.48
<b>141</b>	CID_141363341	3,76	<b>142</b>	CID_116276444	1.91
<b>143</b>	CID_141363343	4,71	<b>144</b>	CID_115327896	3.08
<b>145</b>	CID_141425563	3,24	<b>146</b>	CID_114360896	1.91
<b>147</b>	CID_141463648	3,38	<b>148</b>	CID_114360895	1.99
<b>149</b>	CID_141754783	4,12	<b>150</b>	CID_114360851	2.90
<b>151</b>	CID_142764732	2,44	<b>152</b>	CID_114360735	1.91
<b>153</b>	CID_144045668	2,46	<b>154</b>	CID_114360733	1.44
<b>155</b>	CID_144236682	3,94	<b>156</b>	CID_114360706	1.35
<b>157</b>	CID_144236686	5,73	<b>158</b>	CID_114360672	1.69
<b>159</b>	CID_144277727	5,78	<b>160</b>	CID_114360670	2.30
<b>161</b>	CID_144328336	8,35	<b>162</b>	CID_114360636	1.53
<b>163</b>	CID_144328338	5,60	<b>164</b>	CID_114360599	1.65
<b>165</b>	CID_144390710	2,74	<b>166</b>	CID_114360570	1.21
<b>167</b>	CID_144411062	8,25	<b>168</b>	CID_114360509	1.50
<b>169</b>	CID_144411070	8,11	<b>170</b>	CID_114360227	-0.31
<b>171</b>	CID_144676984	7,24	<b>172</b>	CID_114359895	1.69
<b>173</b>	CID_144676993	7,32	<b>174</b>	CID_114359521	1.39
<b>175</b>	CID_144680051	3,68	<b>176</b>	CID_114359446	0.53
<b>177</b>	CID_144680060	4,10	<b>178</b>	CID_114359324	1.06
<b>179</b>	CID_144753782	4,92	<b>180</b>	CID_113288053	2.79
<b>181</b>	CID_144753786	5,64	<b>182</b>	CID_104840846	1.50

<b>183</b>	CID_145010272	4,92	<b>184</b>	CID_104838211	2.17
<b>185</b>	CID_145493759	4,18	<b>186</b>	CID_101481451	1.62
<b>187</b>	<b>CID_145592888</b>	<b>9,88</b>	<b>188</b>	CID_101481450	1.19
<b>189</b>	CID_147904709	7,31	<b>190</b>	CID_101481449	2.37
<b>191</b>	CID_147980002	5,08	<b>192</b>	CID_98030366	1.68
<b>193</b>	CID_148363303	5 ,72	<b>194</b>	CID_98028672	2.41
<b>195</b>	CID_148575948	5,65	<b>196</b>	CID_98028669	2.96
<b>197</b>	CID_149027982	4,39	<b>198</b>	CID_95481160	1.60
<b>199</b>	CID_149090534	5,24	<b>200</b>	CID_98019180	1.02
<b>201</b>	CID_149211478	2,04	<b>202</b>	CID_95481148	1.73
<b>203</b>	CID_149309725	5,42	<b>204</b>	CID_95481146	1.31
<b>205</b>	CID_149687117	5,31	<b>206</b>	CID_95481144	1.81
<b>207</b>	CID_149781334	6,01	<b>208</b>	CID_95481140	1.63
<b>209</b>	CID_150064664	4,92	<b>210</b>	CID_95481138	1.59
<b>211</b>	CID_150323929	8,17	<b>212</b>	CID_95481121	1.72
<b>213</b>	CID_150430234	4,17	<b>214</b>	CID_93781299	1.72
<b>215</b>	CID_150727031	3 ,47	<b>216</b>	CID_93781291	0.33
<b>217</b>	CID_150867510	-0,96	<b>218</b>	CID_93764306	1.46
<b>219</b>	CID_150927807	7,97	<b>220</b>	CID_93764299	1.82
<b>221</b>	CID_151212386	9,09	<b>222</b>	CID_90479163	0.32
<b>223</b>	CID_151268314	5,80	<b>224</b>	CID_83971323	2.19
<b>225</b>	CID_152049809	4 ,28	<b>226</b>	CID_82133464	2.32
<b>227</b>	CID_152431069	3,24	<b>228</b>	CID_82133454	1.71
<b>229</b>	CID_152753455	3,94	<b>230</b>	CID_82091190	1.53
<b>231</b>	CID_152842400	5,09	<b>232</b>	CID_78916473	2.50
<b>233</b>	CID_153022815	5,13	<b>234</b>	CID_78426935	0.49
<b>235</b>	CID_153045818	4,32	<b>236</b>	CID_78426934	0.47
<b>237</b>	CID_153176792	3,93	<b>238</b>	CID_73053331	1.15
<b>239</b>	CID_153338667	8,43	<b>240</b>	CID_73053330	0.69
<b>241</b>	CID_153818113	3,05	<b>242</b>	CID_73053184	1.67
<b>243</b>	CID_153818115	3,85	<b>244</b>	CID_73053183	2.27
<b>245</b>	CID_153866891	6,01	<b>246</b>	CID_73053040	2.88
<b>247</b>	CID_153908678	7,86	<b>248</b>	CID_73053039	2.37
<b>249</b>	CID_153996998	3,47	<b>250</b>	CID_73053038	1.16

<b>251</b>	CID_154487557	2,72	<b>252</b>	CID_73053037	2.34
<b>253</b>	CID_154487558	6,67	<b>254</b>	CID_73053036	0.46
<b>255</b>	CID_2742269	5,40	<b>256</b>	CID_73053035	1.08
<b>257</b>	CID_4980399	6,15	<b>258</b>	CID_73052887	2.86
<b>259</b>	CID_4980400	6,55	<b>260</b>	CID_73052886	1.85
<b>261</b>	CID_4980405	5 ,76	<b>262</b>	CID_73052885	2.08
<b>263</b>	CID_4980412	6,22	<b>264</b>	CID_73052884	1.26
<b>265</b>	CID_4980417	6,05	<b>266</b>	CID_73052883	2.51
<b>267</b>	CID_10711624	4,20	<b>268</b>	CID_73052882	2.19
<b>269</b>	CID_19965075	5,83	<b>270</b>	CID_73052724	1.12
<b>271</b>	CID_19965076	-3,81	<b>272</b>	CID_73050994	1.47
<b>273</b>	CID_19965086	6,28	<b>274</b>	CID_73052723	1.49
<b>275</b>	CID_19965098	6,93	<b>276</b>	CID_73052722	2.97
<b>277</b>	CID_19965106	5,39	<b>278</b>	CID_73052721	0.53
<b>279</b>	CID_19965114	3,37	<b>280</b>	CID_73051142	1.19
<b>281</b>	CID_19965130	5,58	<b>282</b>	CID_73051141	0.80
<b>283</b>	CID_19965149	8,58	<b>284</b>	CID_73050993	1.82
<b>285</b>	CID_19965157	3,42	<b>286</b>	CID_73050992	0.70
<b>287</b>	CID_19965164	5,60	<b>288</b>	CID_73050991	1.23
<b>289</b>	CID_19965165	8,20	<b>290</b>	CID_73050990	1.81
<b>291</b>	CID_19965176	6,33	<b>292</b>	CID_73050988	0.94
<b>293</b>	CID_20984419	6,37	<b>294</b>	CID_71544100	1.13
<b>295</b>	CID_23062189	1 ,37	<b>296</b>	CID_71544098	1.62
<b>297</b>	CID_25271892	6,73	<b>298</b>	CID_71544042	1.95
<b>299</b>	CID_46897677	4,50	<b>300</b>	CID_62131534	2.64
<b>301</b>	CID_46849410	8,70	<b>302</b>	CID_134018	1.59
<b>303</b>	CID_54588800	8,22	<b>304</b>	CID_53354190	2.49
<b>305</b>	CID_57410646	4,95	<b>306</b>	CID_53354189	2.49
<b>307</b>	CID_59432767	6,73	<b>308</b>	CID_53354188	2.49
<b>309</b>	CID_66647773	5,99	<b>310</b>	CID_46825938	1.83
<b>311</b>	CID_66666496	6,97	<b>312</b>	CID_43056491	2.46
<b>313</b>	CID_66690963	6,82	<b>314</b>	CID_43056491	4.81
<b>315</b>	CID_66691921	3,93	<b>316</b>	CID_39158582	8.05
<b>317</b>	CID_66692000	8,10	<b>318</b>	CID_39158559	6.24



319	CID_66692420	3,82	320	CID_22687935	7.97
321	CID_66692555	5,10	322	CID_22687830	5.50
323	CID_66692562	3,08	324	CID_22687789	5.52
325	CID_66693513	7,75	326	CID_22687381	3.22
327	CID_66696075	4 ,97	328	CID_22687227	4.18
329	CID_66995060	7,11	330	CID_22687226	5.06
331	CID_67157218	6,43	332	CID_22686166	6.29
333	CID_67232055	5,66	334	CID_22686144	7.40
335	CID_67374078	4,30	336	CID_22685820	5.22
337	CID_67712877	4,86	338	CID_22685627	6.94
339	CID_67814365	3,12	340	CID_22685403	7.29
341	CID_67993855	6,07	342	CID_22685400	3.63
343	CID_68387359	5,31	344	CID_22685299	7.23
345	CID_69051520	5,15	346	CID_22684979	3.90
347	CID_69326699	6,77	348	CID_22684925	3.98
349	CID_70998729	6,23	350	CID_22684855	5.54
351	CID_71113144	5,36	352	CID_22684712	5.72
353	CID_123463028	6,91	354	CID_22684660	5.82
355	CID_123436047	5,20	356	CID_22684634	5.22
357	CID_123378144	5,68	358	CID_22684616	6.81
359	CID_123372831	7,98	360	CID_22684521	5.89
361	CID_123329969	7,91	362	CID_22682614	8.00
363	<b>CID_123307845</b>	<b>9,28</b>	364	CID_22682515	6.24
365	CID_123304594	6,44	366	CID_22682398	6.37
367	CID_123298046	3,13	368	CID_22682265	4.75
369	CID_123263109	4,38	370	CID_22682201	7.12
371	CID_123170771	8,05	372	CID_22681993	6.76
373	CID_123138243	3,33	374	CID_22681913	5.58
375	CID_122642386	4,94	376	CID_22681900	4.91
377	CID_117793809	3,93	378	CID_22681759	4.73
379	CID_90338050	3,28	380	CID_22681697	7.16
381	CID_90338019	5,61	382	CID_22681659	5.92
383	CID_90338018	5,15	384	CID_22681163	6.05
385	CID_89706781	2,43	386	CID_22680948	4.60

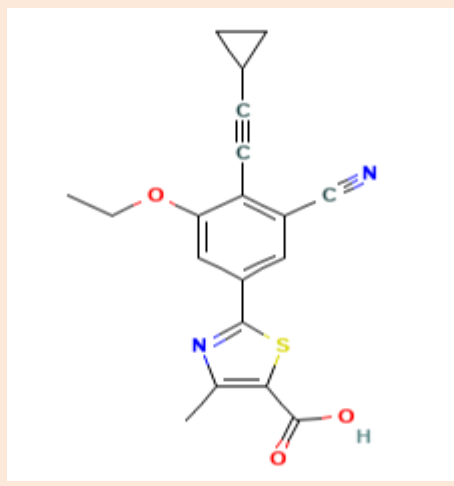
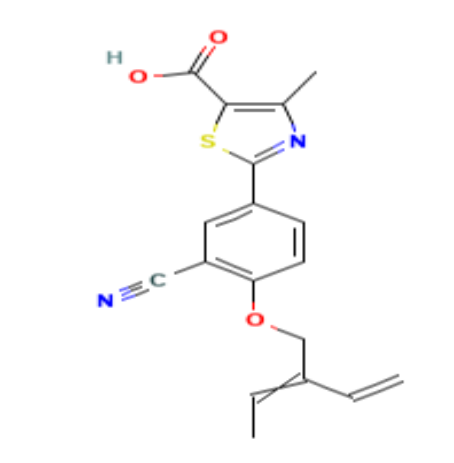
<b>387</b>	CID_89705678	4,01	<b>388</b>	CID_22680373	4.79
<b>389</b>	CID_89612955	7,34	<b>390</b>	CID_22679902	6.54
<b>391</b>	CID_89512783	4,60	<b>392</b>	CID_20994421	6.69
<b>393</b>	CID_88882647	3,78	<b>394</b>	CID_20993800	5.88
<b>395</b>	CID_88562090	5,42	<b>396</b>	CID_20993608	3.60
<b>397</b>	CID_87415806	6,11	<b>398</b>	CID_20993451	6.60
<b>399</b>	CID_87415715	3,30	<b>400</b>	CID_20993412	6.40
<b>401</b>	CID_87244148	4,98	<b>402</b>	CID_20993306	5.46
<b>403</b>	CID_78426936	8,83	<b>404</b>	CID_20993255	5.57
<b>405</b>	CID_78426932	5 ,87	<b>406</b>	CID_20993211	7.02
<b>407</b>	CID_78426931	6,35	<b>408</b>	CID_20993162	5.72
<b>409</b>	CID_78426793	4,44	<b>410</b>	CID_20992737	4.89
<b>411</b>	CID_78426656	4,41	<b>412</b>	CID_20991808	6.29
<b>413</b>	CID_78426655	8,82	<b>414</b>	CID_20991207	4.78
<b>415</b>	CID_78426653	3,84	<b>416</b>	CID_20991017	4.44
<b>417</b>	CID_78426651	6,57	<b>418</b>	CID_20990800	6.81
<b>419</b>	CID_77107743	5,79	<b>420</b>	CID_20990746	5.75
<b>421</b>	CID_77107341	3,74	<b>422</b>	CID_20990642	4.96
<b>423</b>	CID_76955756	6,53	<b>424</b>	CID_20990608	5.80
<b>425</b>	CID_76155156	8,47	<b>426</b>	CID_20990595	8.14
<b>427</b>	CID_73052725	4,53	<b>428</b>	CID_20990559	5.08
<b>429</b>	CID_134018	6 ,47	<b>430</b>	CID_20990375	5.20
<b>431</b>	CID_9884549	6,72	<b>432</b>	CID_20990114	5.00
<b>433</b>	CID_22682265	4,75	<b>434</b>	CID_20989944	3.63
<b>435</b>	CID_22682398	6,37	<b>436</b>	CID_20988223	6.68
<b>437</b>	CID_22682515	6,24	<b>438</b>	CID_20984349	3.58
<b>439</b>	CID_22682614	8 ,00	<b>440</b>	CID_20984314	3.25
<b>441</b>	CID_22684397	6,37	<b>442</b>	CID_20984300	7.89
<b>443</b>	CID_22684521	5,89	<b>444</b>	CID_20984276	7.54
<b>445</b>	CID_22684616	6,81	<b>446</b>	CID_20984131	5.70
<b>447</b>	CID_22684660	5,82	<b>448</b>	CID_20984083	6.48
<b>449</b>	CID_22684712	5,72	<b>450</b>	CID_9923663	8.00
<b>451</b>	CID_22684855	5,54	<b>452</b>	CID_9901546	5.75
<b>453</b>	CID_22684925	3,98	<b>454</b>	CID_9858172	4.83

<b>455</b>	CID_22684979	3,90	<b>456</b>	CID_8824911	5.07
<b>457</b>	CID_22685299	7,23	<b>458</b>	CID_8824888	5.21
<b>459</b>	CID_22685400	3,63	<b>460</b>	CID_8824887	6.13
<b>461</b>	CID_22685403	7,29	<b>462</b>	CID_8824726	6.33
<b>463</b>	CID_22685627	6,94	<b>464</b>	CID_8197990	5.49
<b>465</b>	CID_22685820	5,22	<b>466</b>	CID_7745320	7.38
<b>467</b>	CID_22686144	7,40	<b>468</b>	CID_7745213	7.75
<b>469</b>	CID_22686166	6,29	<b>470</b>	CID_7745208	5.98
<b>471</b>	CID_22687226	5,06	<b>472</b>	CID_7006584	5.09
<b>473</b>	CID_22687227	4,18	<b>474</b>	CID_4980624	5.67
<b>475</b>	CID_22687381	3,22	<b>476</b>	CID_4980620	5.75
<b>477</b>	CID_22687789	5,52	<b>478</b>	CID_4980609	7.89
<b>479</b>	CID_22687830	5,50	<b>480</b>	CID_4980501	5.37
<b>481</b>	CID_4980498	5.26	<b>482</b>	CID_101481450	1.19

### III.2. Sélection des meilleures similaires

Le docking avec Surflex-dock, nous a permis calculer l’Affinité de 482 similaires du composé TEI provenant de la banque PubChem. D’après les résultats de tableau V.4, les deux similaires N°187 (CID\_144411068) et N°363 (CID\_123307845) présentent une forte affinité (9.89 et 9.28 M<sup>-1</sup> respectivement), supérieur à celle de l’inhibiteur TEI (7.66 M<sup>-1</sup>). Les inhibiteurs choisis sont représentés dans le tableau V.5 suivant.

Tableau V.5 : Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats.

Code de PubChem	Structure (2D)	Nom chimique	Affinité ( $M^{-1}$ )
CID_144411068		2-[3-Cyano-4-(2-cyclopropylethynyl)-5-ethoxyphenyl]-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid	9,89
CID_123307845		2-[3-Cyano-4-(2-ethenylbut-2-enoxy)phenyl]-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid	9.28

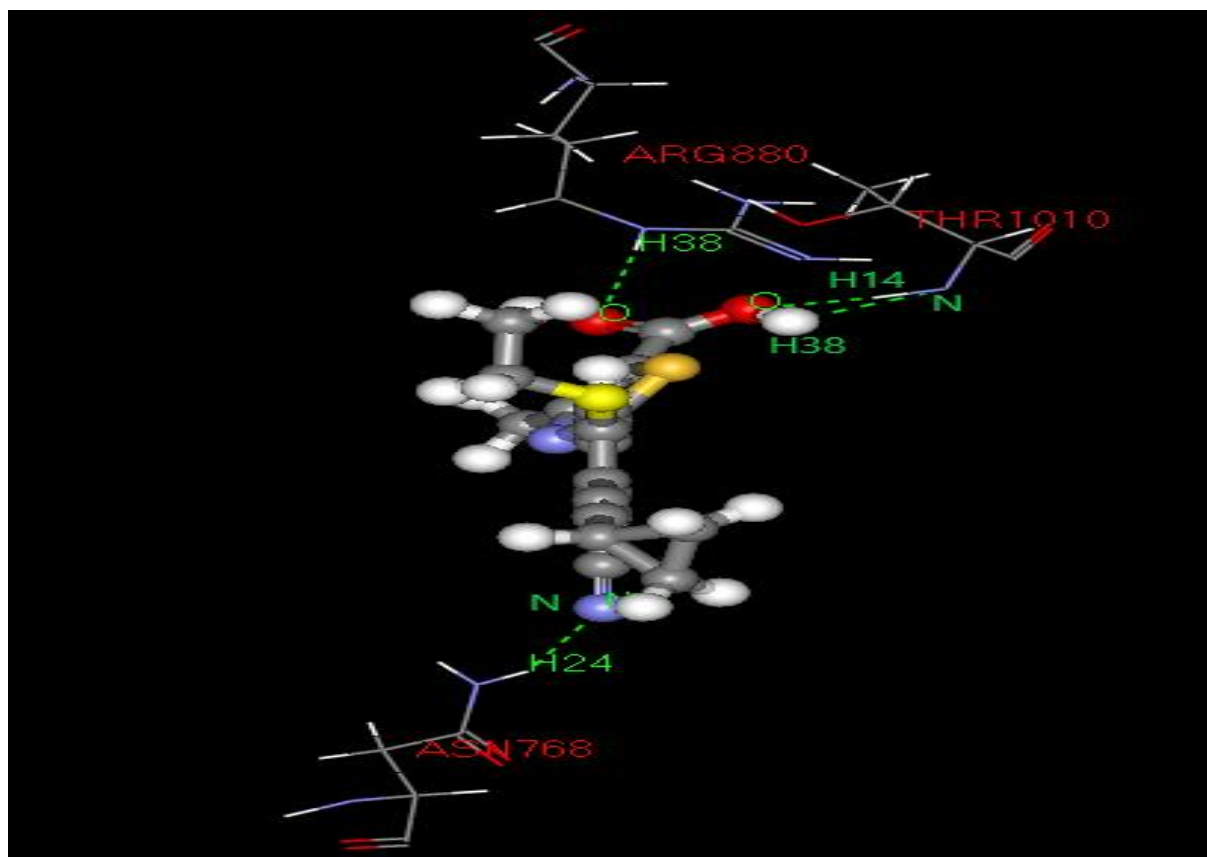
### III.3. Etude des interactions des deux similaires sélectionnés

Le docking de ces composés dans le site actif de notre cible XOR donne plusieurs informations intéressantes concernant les liaisons formées entre ces derniers. Nous avons utilisé le programme ViewerLite42 pour visualiser et analyser le nombre et le type de liaisons former entre le complexe enzyme-inhibiteur.

#### III.3.1. Analyse visuelle CID\_144411068-XOR

À la lumière des résultats obtenus dans le tableau V.5, l'inhibiteur 2-[3-Cyano-4-(2-cyclopropylethynyl)-5-ethoxyphenyl]-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid dont le code ID est CID\_144411068, donne la meilleure Affinité ( $9.89 M^{-1}$ ), ainsi qu'une bonne pénétration au

niveau du site actif. L'analyse visuelle montre que ce composé est stabilisé par la formation de quatre ponts hydrogène avec les résidus de ASN768, ARG880 et THR1010. Dans la figure V. 7 et le tableau V. 6 ci-dessous nous avons résumé ces différents ponts.



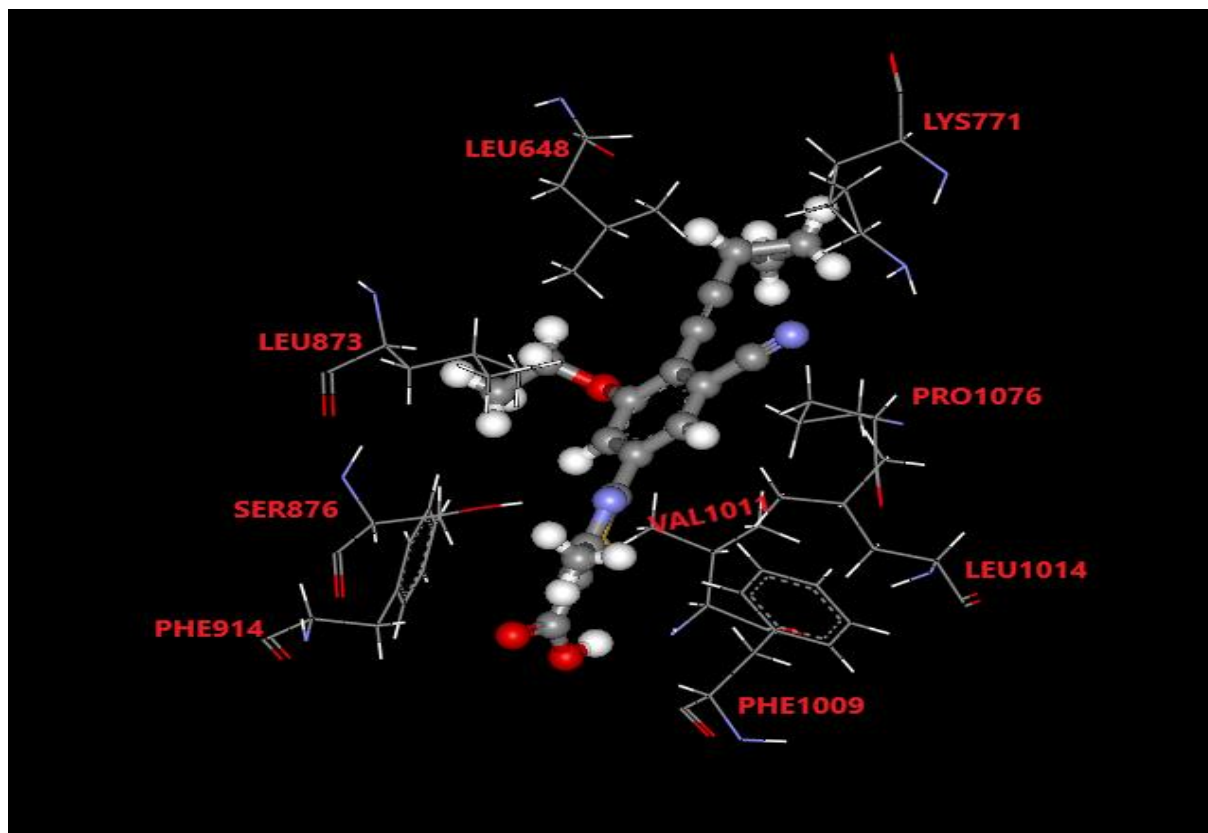
**Figure V.7 :** Analyse visuelle par ViewerLite42 du mode d'interaction de similaire CID\_144411068 avec le site actif de la XOR

**Tableau V.6 :** Les liaisons hydrogène établies par compose CID\_144411068 avec le site actif de la XOR.

Liaison H	Mode de liaison de l'inhibiteur avec les résidus du site actif
1	N de l'inhibiteur ----- H (N°=24) de l'AA : ASN768
2	O de l'inhibiteur ----- H (N°=38) de l'AA : ARG880
3	O de l'inhibiteur ----- H (N°=14) de l'AA : THR1010
4	H (N°=24) de l'inhibiteur ----- N de l'AA : THR1010

De plus, l'inhibiteur CID\_144411068 forme avec le site actif de la XOR plusieurs interactions hydrophobiques avec les résidus de LYS771, PRO1076, VAL1011, LEU1014

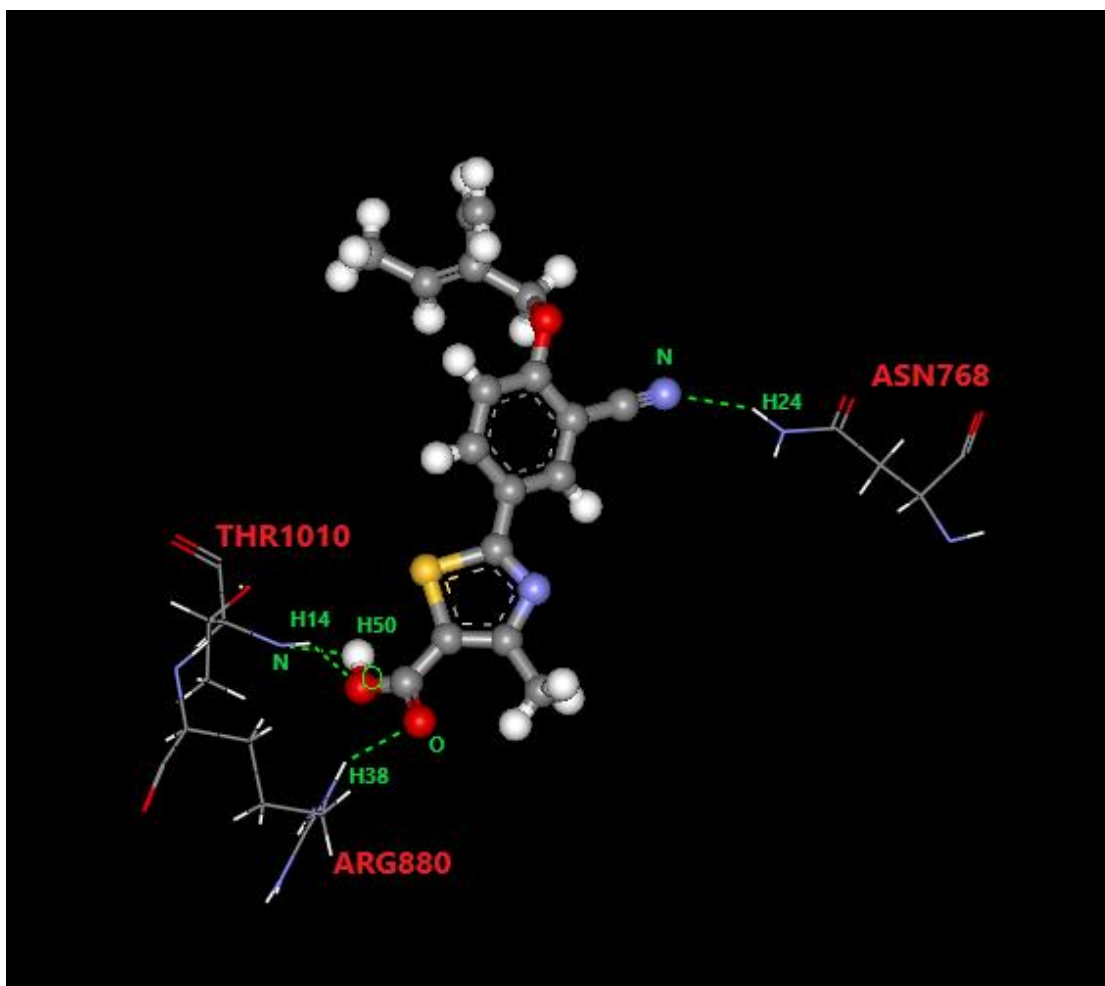
PHE1009, PHE914, SER876, LEU873 et LEU648. Ces interactions sont représentées dans la figure V.8 ci-dessous.



**Figure V.8 :** Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé CID\_144411068 et le site actif de la XOR

### III.3.2. Analyse visuelle CID\_123307845- XOR

L'analyse visuelle montre que l'inhibiteur l'inhibiteur2-[3-Cyano-4-(2-ethenylbut-2-enoxy) phenyl]-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid dont le code ID est CID\_123307845 est bien placé dans le site actif de l'enzyme XOR (Affinité égale à  $9.28 \text{ M}^{-1}$ ). Le complexe est stabilisé par la formation de quatre liaisons hydrogène. Dans la figure V. 9 et le tableau V. 7 ci-dessous nous avons résumé ces différentes interactions.



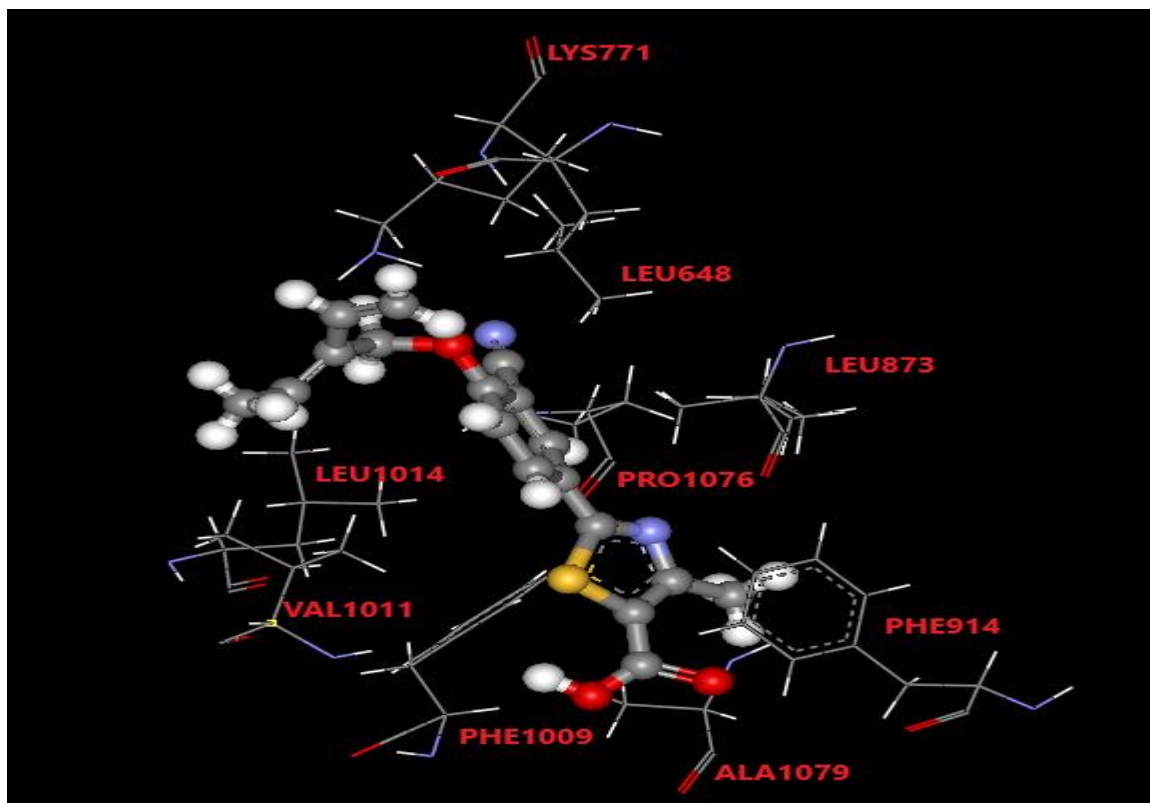
**Figure V.9 :** Analyse visuelle par ViewerLite42 du mode d'interaction de similaire CID\_123307845 avec le site actif de la XOR

**Tableau V.7 :** Les liaisons hydrogène établies par le composé CID\_123307845 avec le site actif de la XOR.

Liaison H	Mode de liaison de l'inhibiteur avec les résidus du site actif
1	N de l'inhibiteur ----- H (N°=24) de l'AA : ASN768
2	O de l'inhibiteur ----- H (N°=38) de l'AA : ARG880
3	O de l'inhibiteur ----- H (N°=14) de l'AA : THR1010
4	H (N°=50) de l'inhibiteur ----- N de l'AA : THR1010

Concernant les liaisons hydrophobiques l'inhibiteur CID\_123307845 forme avec le site actif de la XOR plusieurs interactions avec les résidus de LYS771, LEU648, LEU873,

PRO1076, PHE914, AL1079, PHE1009 VAL1011et LEU1014. Ces interactions sont représentées dans la figure V.10 ci-dessous.



**Figure V.10 :** Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé CID\_123307845 et le site actif de la XOR

#### IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse

Après l'étude des différentes interactions établies entre la XOR et les similaires de l'inhibiteur TEI, il est nécessaire d'évaluer les critères permettant leur validation comme candidat médicament, en utilisant le serveur SwissADME et preADMET pour déterminée les paramètres physicochimiques, les paramètres pharmacocinétiques et de vérifie aussi la toxicité des composé proposés.

##### IV.1. Prédiction des propriétés physicochimiques

Cette démarche est basée essentiellement sur les cinq règles de Lipinski. Ces critères sont admis comme conditions générales pour une bonne biodisponibilité.

Les résultats du tableau V.8 ont montrés que les meilleurs composés prédits par l'amarrage moléculaire répondent à la règle de cinq de Lipinski, on a pu observer que les propriétés de deux composés proposés étaient conformes aux critères de cette règle, en se référant à leurs faibles



pois moléculaires et à leur caractère lipophile. Ils avaient de bonnes propriétés ce qui indique que ces inhibiteurs peuvent être administrés par voie orale sans poser de problèmes.

**Tableau V.8 :** Critères de la règle de *Lipinski* pour les différents inhibiteurs choisis à partir de serveur swissADME

Critère	PM (g/mol)	Log P	nON	nOHHN	nrotn	PSA (Å <sup>2</sup> )
<b>CID_144411068</b>	351,41	3,15	5	1	4	111,45
<b>CID_123307845</b>	340.40	2 ,76	5	1	6	111 ,45

**PM :** Poids moléculaire.

**LogP :** Coefficient de partage octanom/Eau.

**nON :** Accepteur de liaisons H.

**nOHHN :** Donneurs de liaisons H.

**nrotb :** nombre de liaisons rotatives.

**PSA :** Surface polaire accessible.

#### IV.2. Prédiction de propriétés pharmacocinétiques

Pour compléter notre recherche, il est utile de faire une analyse des propriétés pharmacocinétiques afin d'assurer notre sélection.

**Tableau V.9 :** Propriétés pharmacocinétiques des composés choisis obtenues à partir de serveur SwissADME

Critère	CID_144411068	CID_123307845
<b>GL absorption</b>	Haute	Haute
<b>BBB perméabilité</b>	non	Non
<b>CYP1A2 inhibition</b>	oui	oui
<b>CYP2C19 inhibition</b>	oui	oui
<b>CYP2C9 inhibition</b>	oui	oui
<b>CYP2D6 Inhibition</b>	non	non
<b>CYP3A4 Inhibition</b>	oui	oui

Selon le tableau V. 9, nous avons observé que l'absorption gastro-intestinale des deux inhibiteurs choisis est élevée. De plus, la barrière hémato-encéphalique est imperméable à tous les composés. En ce qui concerne l'inhibition de CYP, nous avons constatés que les deux composés étudiés sont des inhibiteurs pour toutes les isoenzymes de cytochrome P450 à l'exception de l'isoenzyme CYP2D6.

### IV.3. Prédiction de la toxicité

Dans le but de vérifier la toxicité des composés en utilisant le serveur preADMET dont le but de déterminer plusieurs paramètres, représentés dans le tableau V.10.

**Tableau V.10** : Profil de toxicité des inhibiteurs étudiés obtenus à partir de serveur preADMET

Paramètre	CID_144411068	CID_123307845
<b>Algae-at</b>	0,0135262	0,015511
<b>Daphania -at</b>	0,0204048	0,0106364
<b>Medaka-at</b>	0,000920122	0,000274006
<b>Minnow-at</b>	0,000778041	0,000356766
<b>Cr-Mousse</b>	Négative	Négative
<b>Cr-Rat</b>	Négative	Négative
<b>Test-Ames</b>	Mutagène	Mutagène
<b>Inhibition -hERG</b>	Risque Faible	Risque médium

La prédiction de la toxicité montre que les deux inhibiteurs de la XOR présentent des propriétés cancérogènes négatives concernant le test sur les souris et sur les rats. De plus, nous avons noté que les deux composés étudiés présentent un effet mutagène, pouvant donc induire des modifications génétiques. Concernant le test d'inhibition du gène hERG, nous avons constatés des bons résultats pour les deux composés étudiés (faible et moyen).

### Conclusion

Les deux inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase étudiés répondent favorablement aux critères de la règle de Lipinski, pharmacocinétiques et toxicologiques. Ces informations sont très utiles lors de leur optimisation et développement pour devenir des nouveaux candidats médicaments.

## Référence

- [1] Boucherit H. 2020. Recherche *in silico* de nouveaux composés bioactifs et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase. Thèse de doctorat en biochimie. Université frères mentouri - Constantine I. Algérie. 210p.
- [2] Vieth M., Hirst J. D., Kolinski A et Brooks C. =L.1998. Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* **19**: 1612-1622.
- [3] Chikhi A., Bensegueni A. 2008. Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Free- war. *J. Comp. Sci. Syst Biol.***1** : 081-086.
- [4] Teniou S. 2012. Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Mémoire de magistère en Biochimie. Université Mentouri Constantine I. Algérie. 110p.
- [5] Gabb J., Jackson R.M., Sternberg M. J. E. 1997. Modelling protein dock- ing using shape complementarity, electrostatics and biochemical in- formation. *J. Mol. Biol.* **272**: 106-120.
- [6] Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Hioual K., Mokrani E. H. 2014. Theoretical study of the interactions involved in the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase by several molecules. *Computational Biology and Bioinformatics.* **2**: 63-73
- [7] Zaheer-ul-Haq., Halim S. A., Uddin R., Madura J. D. 2010. Benchmarking docking and scoring protocol for the identification of potential acetyl cholinesterase inhibitors. *J Mol Graph Model.* **28** : 870-882.
- [8] Boucherit H. 2012. Etude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase de *mycobacterium tuberculosis* par diverses molécules. Mémoire de magister en biochimie. Université Mentouri Constantin I. Algérie. 110p.
- [9] Kamel M. M., Ali H. I., Anwar M. M., Mohameda N. A., Soliman A. M. 2010. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **45**: 572-580.
- [10] Chikhi A., Bensegueni A. 2010. In Silico Study of the Selective Inhibition of Bacterial Peptide Deformylases by Several Drugs. *Journal of Proteomics and Bioinformatics.* **3** : 61-65.

[11] Laulhé C. 2019. L3 Physique et Applications – Structure de la matière. – Chapitre II – Les différents types de liaisons et leur influence sur les structures. [En ligne] [http : //hebergement.upsud.fr/l3papp/wp-content/uploads/2017/01/Chapitre-II.pdf](http://hebergement.upsud.fr/l3papp/wp-content/uploads/2017/01/Chapitre-II.pdf). Consulté le [15/08/2021].

# *Conclusion et Perspectives*



## **Conclusion et Perspectives**

L'objectif principal de notre travail est de découvrir *in silico* par le biais du docking moléculaire de nouvelles structures agissant comme inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase, cible enzymatique récente jouant un rôle dans l'inhibition de stress oxydatif.

Afin d'affirmer que Surflex-dock est un programme adapté à notre étude, nous avons essayé de tester la capacité de ce programme selon trois critères : le test de RMSD qui sert à évaluer la déviation de la géométrie du ligand simulé par Surflex-dock par rapport à la conformation de référence qu'on retrouve dans la PDB. Sur les 150 complexes pris arbitrairement de la PDB, 84% ont présentés un RMSD inférieur ou égale à 2 Å. L'analyse visuelle confirme ces résultats puisqu'on observe une bonne superposition de conformation, celle du ligand calculé par Surflex-dock pour des valeurs de RMSD inférieures à 2 Å. La superposition devient mauvaise pour des valeurs de RMSD supérieures à 2 Å. Le dernier test utilisé est celui du coefficient de corrélation entre l'activité biologique ( $IC_{50}$ ) des molécules étudiées et le score de docking moléculaire (Affinité pour Surflex-dock). Les résultats de la régression linéaire donnent une valeur positive égale à 0,65. Ces tests nous a permis de conclure que Surflex-dock est un programme de docking très fiable qu'on peut utiliser en toute confiance pour modéliser les interactions entre les inhibiteurs testés et la cible enzymatique XOR.

Dans la recherche de nouveaux inhibiteurs théoriques plus efficaces que notre ligand de référence TEI, et à partir de la chimiothèque « PubChem » nous avons téléchargé 482 composés chimiques avec un taux de similarité de 90% à notre ligand de référence, afin d'évaluer leur affinité envers la XOR. Deux similaires : CID\_144411068 et CID\_123307845 avec des affinités égales à 9.89 et 9.28  $M^{-1}$  respectivement, sont considérer comme les meilleurs inhibiteurs théoriquement potentiels de la XOR plus affins et plus sélectifs que la TEI qui est une affinité égale à 7.66  $M^{-1}$ .

Enfin, l'application de la méthode de filtrage ADME-Tox nous informe de manière positive sur les propriétés physicochimiques, pharmacocinétique et toxicologique des inhibiteurs proposés.

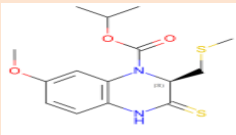
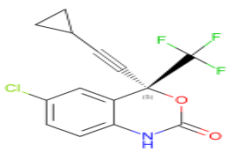
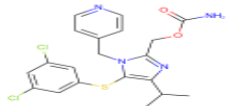
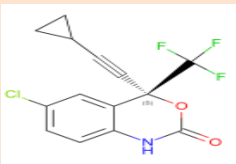
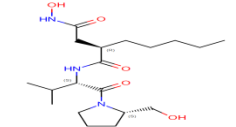
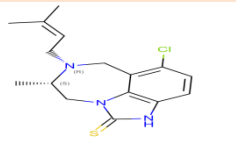
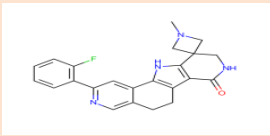
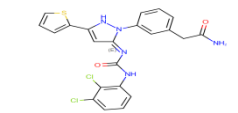
Pour conclure, au vu des résultats obtenus dans cette recherche, qui consiste en l'élucidation de l'inhibition *in silico* de la XOR par docking moléculaire, nous proposons les composés CID\_144411068 et CID\_123307845 comme nouveaux inhibiteurs potentiels de notre enzyme.

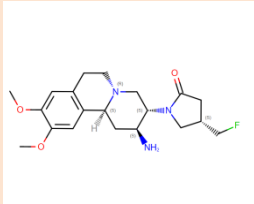
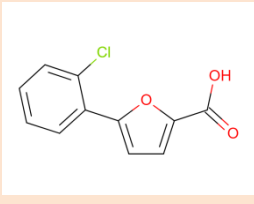
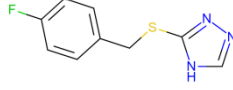
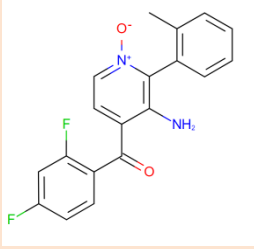
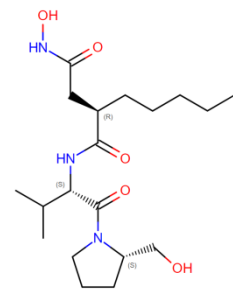
En termes de perspectives d'avenir, ce travail pourra être complété et prolongé par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* afin de valider nos résultats théoriques et vérifier l'efficacité de l'approche *in silico*.

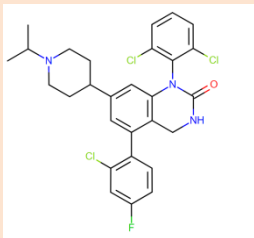
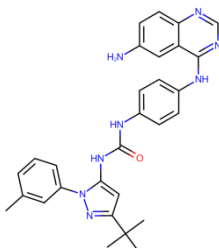
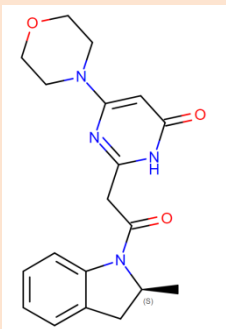
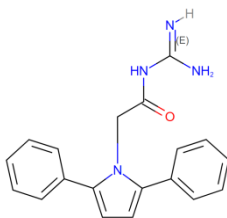
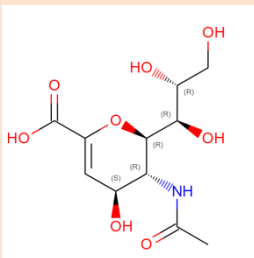
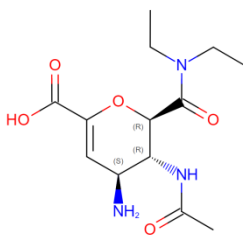
# *Annexes*

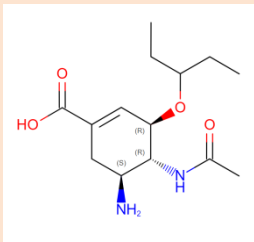
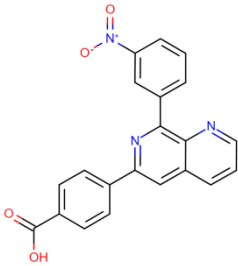
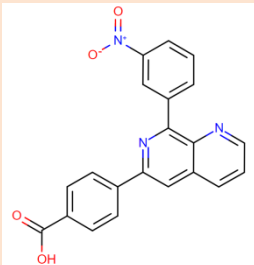
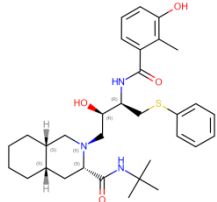
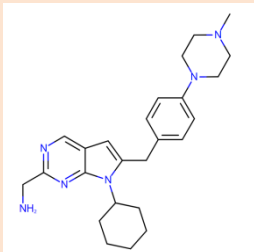
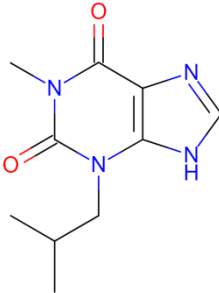


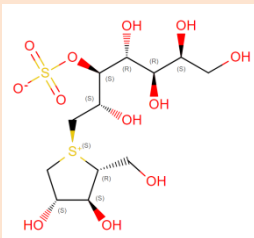
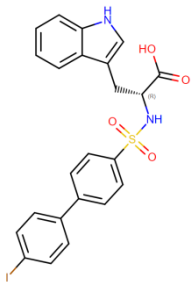
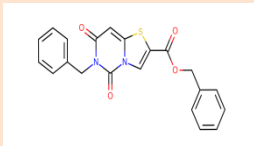
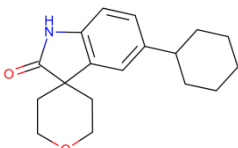
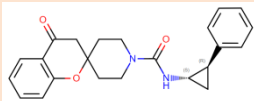
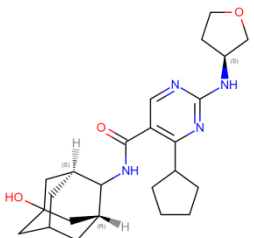
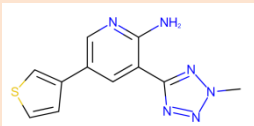
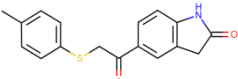
**Annexe 1 :** Corrélation entre les scores donnés par Surflex-dock de 52 complexes et leurs activités biologiques (IC<sub>50</sub>).

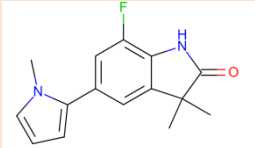
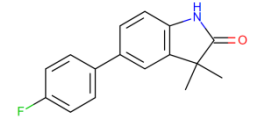
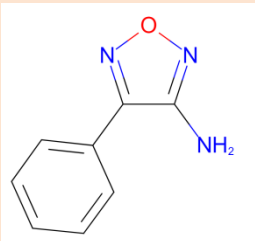
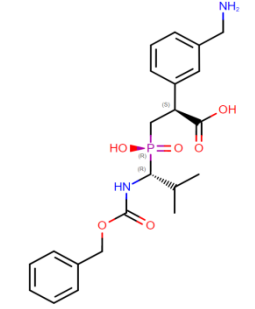
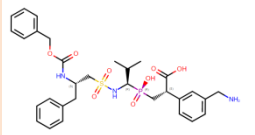
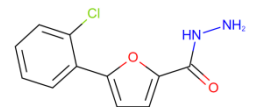
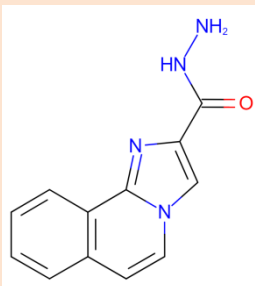
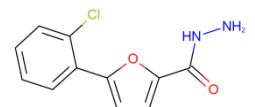
NUM	CODE DE PDB	Code ligand	structure	IC <sub>50</sub> (nm)	Affinité (Final-0)	Log(IC <sub>50</sub> )
1.	1BQN	HBV		600	5,86	2,778
2.	1FK9	EFZ		54	5,38	1,732
3.	1EET	BFU		10	8,36	1
4.	1EP4	S11		47	9,81	1,672
5.	1FKO	EFZ		25	5,45	1,397
6.	1G2A	BB2		140	8,52	2,146
7.	1HNV	TBO		4300	4,93	3,633
8.	1G27	BB1		7	5,75	0,845
9.	3M2W	L8I		3	7,56	0,477
10.	3NNU	EDB		48	8,86	1,681

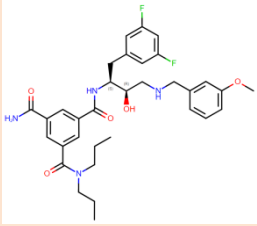
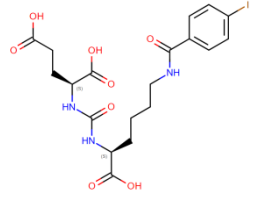
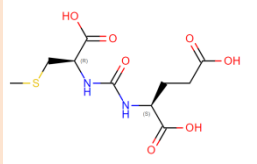
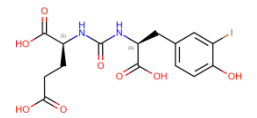
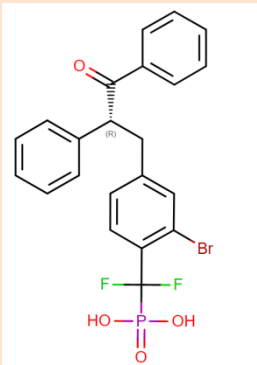
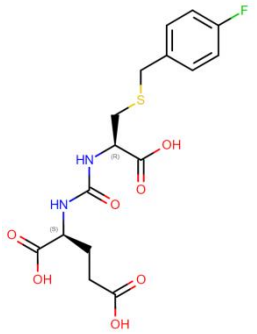
11.	3SLI	SKD		1300	3,14	3,113
12.	3IU9	T07		240	5	2,380
13.	3KWF	B1Q		6,80	10,21	0,832
14.	3L8X	N4D		10	9,93	1
15.	3IU7	FCD		16000	2, 36	4,204
16.	3IU8	T03		580	3,06	2,764
17.	3HRB	I39		21	5,90	1,322
18.	3G5K	BB2		1,5	6,43	0,176

19.	3GC8	B45		0,60	9	-0,221
20.	3GCQ	1BU		800	5.4	2,903
21.	4V0I	J82		36	4,43	1,556
22.	2QU2	251		3700	3,76	3,568
23.	2QWC	DAN		13000	2.21	4,113
24.	2QWJ	G28		230	7,94	2,361

25.	2QWK	G39		2	7,68	0,301
26.	2QYK	NPV		29	5,47	1,462
27.	2QYL	NPV		49	3,22	1,690
28.	2R5Q	1UN		1,8	6.22	0,255
29.	2R6N	CKE		1	7	0
30.	2R8Q	IBM		58000 0	2,83	5,763

31.	3L4V	KTL		37	7,69	1,568
32.	2OW0	6MR		201	5,78	2,303
33.	2OW9	SP6		30	10,40	1,477
34.	5AM4	MVJ		113	0,48	2,053
35.	5AM1	I5T		3	2,76	0,477
36.	5ALU	HD2		22	6,13	1,342
37.	5ALT	9XZ		13100	3,29	4,117
38.	5ALW	JQN		7050	7,14	3.83,848

39.	5AM0	LWS		1320	2,29	3,120
40.	5ALN	5ZM		267	2,24	2,426
41.	5AI0	JF6		20640 0	4,14	5,314
42.	2PJ2	864		12	4,20	1,079
43.	2PJB	983		19	1,08	1,278
44.	2P9A	YE6		58000	2,42	4,763
45.	2P98	YE7		2440	4,75	3,387
46.	2P99	YE6		1160	2,69	3,064

47.	2P83	MR0		11	12,73	1,041
48.	3D7H	YC2		0,05	14,15	-1,301
49.	3D7G	MUD		17	10,44	1,230
50.	3D7F	YBY		0,5	11,58	-0,301
51.	3CWE	825		120	6,33	2,079
52.	3D7D	FBD		14	8,20	1,146

Thème :

**Prédiction *in silico* de la structure 3D et étude d'amarrage moléculaire de la xanthine oxydoréductase.**

**Résumé**

La xanthine oxydoréductase représente une cible thérapeutique très importante, en tant qu'elle implique dans l'inhibition du stress oxydatif et les problèmes de santé qui en découlent. Pour contourner les limites du criblage expérimental, une nouvelle approche alternative basée principalement sur des techniques informatiques a été envisagée ; c'est le docking moléculaire.

L'objectif principal de notre étude était de tester la performance du programme de docking Surflex-dock par trois critères. Dans un premier temps, le test de RMSD, ou critère de déviation de la structure obtenue par docking par rapport à la structure donnée par diffraction aux rayons X. Les résultats du RMSD obtenus montrent que 84% des valeurs sont inférieures ou égales à 2 Å. Dans un deuxième temps, l'analyse par régression linéaire nous a permis de rechercher la corrélation entre l'énergie d'interaction obtenue par Surflex-dock et l'activité biologique ( $IC_{50}$ ), cette analyse donne un coefficient de corrélation " $r = 0.65$ ". Enfin, ces tests ont été suivis par une analyse visuelle de la superposition des ligands de référence et ceux obtenus par docking moléculaire. Nos résultats montrent que le logiciel Surflex-dock fonctionne correctement. Il peut donc être utilisé pour découvrir de nouveaux inhibiteurs de la XOR.

Dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la XOR, nous avons réalisé un docking moléculaire par le logiciel Surflex-dock d'une collection de 482 similaires du composé TEI avec 90% de similarité. Deux similaires: CID\_144411068 et CID\_123307845 avec des affinités égales à 9.89 et 9.28  $M^{-1}$  respectivement, sont considérées comme les meilleurs inhibiteurs théoriquement potentiels de la XOR plus affines et plus sélectifs que la TEI.

Enfin, la prédiction de la similaire médicamenteuse nous renseigne de manière positive sur les propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité de ces nouvelles molécules proposées.

**Mots clés:** Xanthine Oxydoréductase, Stress Oxydatif, Docking Moléculaire, Surflex-dock, RMSD, ADME-Tox.

**Devant le jury :**

<b>Président : KELLAB Rabah</b>	M.A.A	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila
<b>Promotrice : BOUCHERIT Hanane</b>	M.C.B	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila
<b>Examinatrice : MERZOUG Amina</b>	M.C.B	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila