

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N°Ref :.....

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 :

**Détermination de mode de liaison de la thymoquinone et ses
dérivées contre la xanthine oxydoréductase avec la
simulation informatique**

Présenté par :

-ABD ELALI Manal

-BELTOUM Assia

Devant le jury :

Présidente : HADEF Sawsen M.A.A Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Promotrice : BOUCHERIT Hanane M.C.B Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Examinatrice : MERZOUG Amina M.C.A Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Année Universitaire : 2021/2022



Remerciement


Tout d'abord merci beaucoup dieu de nous donner la patience et la force et le courage pour compléter ce travail

Il nous est agréable d'exprimer notre plus profonde gratitude et remerciement le plus sincère à notre encadreur Mme BOUCHERITE HANANE pour nous avoir encadré pendant cette année avec beaucoup d'enthousiasme. Nous allons adresser notre plus sincères remerciements pour la confiance qu'elle nous accordée, et pour avoir toujours fait preuve d'une grande disponibilité à notre égard.

Nous exprimons nos sincères gratitudes à Mme HADEF Sawssen, la président du Jury A Qui nous honore en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nous avons le plaisir d'exprimer notre profonde gratitude à Mme MERZOUGE Amina pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce 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.





Dédicace

Avant toute chose, le grand merci revient toujours à notre DIEU le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience et qui a éclairé mon chemin pour achever ce travail.

À ma chère mère

Merci pour l'amour qu'elle m'a toujours donné, leur encouragement et toute l'aide quelle m'a apporté durant mes études. Puisse Dieu leur accorde santé, bonheur et longue vie.

À mon cher père

Qu'Allah l'accueille en son vaste paradis.

À mes sœurs

Hamida, Hizia ,Rahima et Kanza Pour leurs amours et leurs encouragements.

À mon unique frère Abd Ellah

Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments difficiles de cette vie je n'oublier jamais ta faveur.

Aux anges de la famille : Alaa, Nassim, Israa et Ritadj

À mon fiancé : Abd Enacer

Au beau-frère : Mourad et Houssam

À mon Binôme : Manal

Je remercie vivement et chaleureusement Tout les amies et les personnes qui ont contribué de proche ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.



Assia

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.



A mes chers frères et sœurs et à tous mes proches. Pour leurs amours et leurs sacrifices sans limites

À mon binôme ASSIA

À Tous mes amies, et mes collègues de la promotion de master Biochimie

Appliquée.

À tous mes enseignants durant les années d'études.

*Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire *Elhamdoulillah**

Manal

Thème : Détermination de mode de liaison de la thymoquinone et ses dérivées contre la xanthine oxydoréductase avec la simulation informatique

Résumé

Notre travail, entre dans le cadre de la réalisation du mémoire de master, s'inscrit dans le courant de la recherche *in silico* des nouveaux inhibiteurs potentiels de la xanthine oxydoréductase (XOR) ; cible thérapeutique validée pour le traitement de la maladie de la goutte. Le logiciel de docking moléculaire Surflex-dock permet de simuler les interactions entre une cible enzymatique et différents ligands. Avec un pourcentage de 85% des valeurs de RMSD inférieures ou égales à 2 Å, on peut dire que Surflex-dock est assez performant et on peut l'utiliser en toute confiance pour étudier profondément le mécanisme d'inhibition de la XOR.

Dans cette étude, nous avons réalisé un docking basé sur la structure de la cible enzymatique avec le programme Surflex-dock d'une collection de 193 similaires de la thymoquinone issus de la PubChem ; afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme XOR plus affins et plus sélectifs que la TEI et la thymoquinone, inhibiteurs précédemment connu. Deux similaires : CID_129829816 et CID_132131050 avec des affinités égales à 6.96 et 6.82 M⁻¹ respectivement, sont considérés comme les meilleurs inhibiteurs potentiels de la XOR.

Enfin, l'application de la règle de *Lipinski* nous informe de manière positive sur les propriétés physicochimiques de ces deux inhibiteurs.

Mots clés : Xanthine oxydoréductase, la goutte, docking moléculaire, Surflex-dock, RMSD, règle de *Lipinski*.

Theme: Determination of thymoquinone binding mode and its derivatives against xanthine oxidoreductase with computer simulation

Summary

Our work is part of the master's thesis, is part of the current *in silico* search for new potential xanthine oxidoreductase inhibitors (XOR); therapeutic target validated for the treatment of gout disease. The software of molecular docking Surflex-dock makes it possible to simulate the interactions between enzymatic target and different ligands. With a percentage of 85% of RMSD values less than or equal to 2 Å, we can say that Surflex-dock is quite efficient and we can use it with confidence to study deeply the mechanism of XOR inhibition.

In this study, we performed a docking based on the structure of the enzymatic target with the Surflex-dock program from a collection of 193 thymoquinone similars from PubChem; to discover new potential inhibitors of the XOR enzyme more affine and more selective than TEI and thymoquinone, inhibitors previously known. Two similars: CID_129829816 and CID_132131050 with affinities equal to 6.96 and 6.82 M⁻¹ respectively, are considered the best potential XOR inhibitors.

Finally, the application of *Lipinski's* rule informs us positively about the physicochemical properties of these two inhibitors.

Keywords: Xanthine oxidoreductase, gout, molecular docking, Surflex-dock, RMSD, *Lipinski* rule.

الموضوع: تحديد نوع وضع الارتباط للثيموكين ومشتقاته ضد xanthine oxydoréductase باستعمال المحاكاة المعلوماتية

الملخص

إن هذه الدراسة التي أجريناها في إطار أطروحة الماستر تعتبر جزء من البحث الحالي في مجال *in silico* من أجل إيجاد مثبطات محتملة جديدة لإنزيم xanthine oxydoréductase لعلاج مرض النقرس.

يسمح برنامج الالتحام الجزيئي Surfex-dock بمحاكاة التفاعلات بين هدف إنزيمي وروابط مختلفة. مع نسبة 85% من قيم RMSD أقل أو يساوي 2 Å ، يمكن القول بأن برنامج Surfex-dock فعال للغاية ويمكن استخدامه بثقة لدراسة آلية تثبيط إنزيم XOR بعمق.

في هذه الدراسة أجرينا إلتحام جزيئي يعتمد على بنية الهدف الأنزيمي باستخدام برنامج Surfex-dock لمجموعة مكونة من 193 شبيهة للثيموكينون من PubChem ، من أجل اكتشاف مثبطات محتملة جديدة لإنزيم XOR والتي تكون أكثر دقة وانتقائية من الثيموكينون وTEI ، المثبطات المعروفة سابقا. متماثلان: CID_129829816 و CID_132131050 مع تقاربات تساوي 6.96 و 6.82⁻¹M على التوالي، يعتبران أفضل مثبطان محتملان لل XOR.

أخيرا، يساعد تطبيق قاعدة *Lipinski* بشكل إيجابي في معرفة الخصائص الفيزيائية والكيميائية لهذين المثبتين.

الكلمات المفتاحية: xanthine oxydoréductase ، النقرس، الالتحام الجزيئي Surfex-dock ، XOR ، قاعدة *Lipinski* .

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES GRAPHES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I : LA GOUTTE

I. La goutte.....	3
II. Epidémiologie	4
III. Les causes et les facteurs favorisants.....	4
IV. Les différentes phases de la goutte	6
IV.1. Hyperuricémie asymptomatique	6
IV.2. La phase de goutte aiguë.....	6
IV.3. La phase de goutte chronique.....	8
V. Quelles sont les symptômes de la maladie ?.....	9
VI. Comment diagnostique-t-on la goutte ?.....	9
VI.1. Les radiographies conventionnelles	10
VI.2. L'échographie	10
VI.3. La tomodensitométrie	11
VII. Traitement de la maladie	11
VII.1. Le repos	11
VII.2. Le régime	11
VII.3. Les médicaments	11
VII.3.1. Traitement de la crise aiguë	11
VII.3.2. Traitements hypouricémians.....	12
VIII. Comment éviter la goutte ?	13

CHAPITRE II : LA XANTHINE OXYDOREDUCTASE

I. Définition.....	14
II. Les formes de la XOR.....	15
III. Structure de la XOR.....	15

IV. Mécanisme d'action de la XOR.....	16
V. Implications physiopathologiques liées a la XOR.....	17
V.1. Implications physiologiques.....	17
V.2. Implications pathologiques.....	17
V.3. La XOR et l'acide urique	18
VI. Les inhibiteurs de l'enzyme XOR	19
VII. La thymoquinone.....	21
VII.1. Structure.....	21
VII.2. Propriétés physicochimiques	21
VII.3. Pathologie	21

CHAPITRE III : DOCKING MOLECULAIRE

I. Généralité	Erreur ! Signet non défini.
II. Définition de docking moléculaire.....	24
III. Principe de docking moléculaire.....	25
IV. Les outils du docking moléculaire.....	27
IV.1. Récepteur	27
IV.2. Ligand	27
IV.3. Programmes de docking moléculaire.....	27
IV.5. Le programme de docking Surflex-dock	29
V. Les types de docking moléculaires	30
V.1. Le docking rigide.....	30
V.2. Le docking flexible.....	31
V.3. Le docking semi-flexible.....	31
VI. Applications de docking moléculaire	31
VI.1. Optimisation des leads	31
VI.2. Identifications des coups.....	32
VI.3. Interaction médicament-ADN.....	32
VII. Avantages de docking moléculaire	32

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	33
I.1. Micro-ordinateur	33
I.2. Banques de données.....	33
I.2.1. La <i>protéine data bank</i> (PDB).....	33
I.2.2. La chimiothèque Pubchem.....	34

I.3. Programmes utilisés	34
I.3.1. Le logiciel Surflex-dock.....	35
I.3.2. Open Babel.....	35
I.3.3. <i>Discovery Studio Visualizer</i>	36
II. Méthodes	37
II.1. Réalisation du docking moléculaire par Surflex-dock	37
II.1.1. Génération de protomol	37
II.1.2. Docking d'un composé	38
II.1.3. Calcul du RMSD.....	39
III. Evaluation des programmes de docking	40
III.1. RMSD (<i>Root Mean Square Deviation</i>)	40
III.2. Analyse visuelle	41
IV. Docking de cible enzymatique XOR.....	41
IV.1. Choix d'une structure cristallographique de la XOR.....	41
IV.2. Préparation des inhibiteurs.....	41
IV.3. Etude des interactions des meilleurs inhibiteurs	42
V. Propriétés physico-chimiques	42
V.1. La règle de <i>Lipinski</i>	42
V.2. La Règle de <i>Veber</i>	43
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS	
I. Fiabilité de programme Surflex-dock.....	44
I.1. La précision du positionnement des composés (rmsd)	44
I.2. Analyse visuelle	48
II. Etude des interactions intervenant dans l'inhibition de la xanthine oxydoréductase par l'inhibiteur TEI	52
II.1. Notion du site actif	52
II.2. Site actif de la XOR.....	52
II.3. Analyse visuelle des interactions XOR-TEI.....	52
II.4. Analyse visuelle des interactions XOR-thymoquinone.....	55
III. Proposition de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase	59
III.1. Inhibition de la XOR par les similaires de l'inhibiteur thymoquinone	59
III.2. Sélection des meilleures similaires	61
III.3. Etude des interactions des deux similaires sélectionnés	62
III.3.1. Analyse visuelle 1N5X-CID_129829816.....	62

III.3.2. Analyse visuelle 1N5X-CID_132131050.....	64
IV. La règle de <i>Lipinski</i>	66
CONCLUSION	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	70

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
I.1	Schéma d'une crise de goutte au gros orteil.	3
I.2	Les différentes phases de la goutte.	6
I.3	Accès de goutte interphalangienne.	7
I.4	La crise de la goutte.	7
I.5	La phase de goutte chronique.	8
I.6	Radiographie de la main d'un patient atteint de goutte tophacée sévère et montrant l'érosion osseuse au niveau de la phalange proximale.	10
I.7	Echographie transversale de la styloïde ulnaire montrant un aspect en double contour (flèche).	10
II.1	Structure de la xanthine oxydoréductase (XOR).	14
II.2	Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase de rat.	16
II.3	XOR a catalysé l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au site Mo et du NADH au site FAD.	17
II.4	Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion.	18
II.5	Métabolisme de l'acide urique.	19
II.6	Les inhibiteurs de la XOR.	20
II.7	Structure chimique de la thymoquinone.	21
II.8	La fonction moléculaire des voies de la thymoquinone.	22
II.1	Docking moléculaire protéine-ligand .	25
II.2	Schéma du protocole général de docking.	26
III.3	Illustration de docking/scoring.	26
III.4	Comparaison des programmes de docking.	28

III.5	La méthode de construction incrémentale	30
IV.1	Site de la <i>Protéine Data Bank</i> (PDB)	33
IV.2	Page d'accueil de la base des données PubChem	34
IV.3	Programme Surflex-dock	35
IV.4	Capture d'écran de programme OpenBabel.	36
IV.5	Capture d'écran de logiciel <i>Discovery Studio Visualiser</i> .	37
IV.6	Exemple de génération de protocole : Protomol pour la streptavidine comparé à la pose native de la biotine (vert)	38
IV.7	Résultat de docking avec Surflex-dock.	39
IV.8	RMSD calculé par le logiciel Surflex-dock.	40
IV.9	Visualisation des interactions réalisées entre les meilleurs inhibiteurs et les résidus du site actif de la XOR obtenu par discovery studio visualize.	42
V.1	Superposition du ligand ZMR du complexe 3CKZ simulé par Surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).	49
V.2	Superposition du ligand B21 du complexe 2Q93 simulé par Surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).	50
V.3	Superposition du ligand 2PE du complexe 1BS4 simulé par Surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).	51
V.4	Analyse visuelle par <i>discovery studio visualize</i> des acides aminés du site actif de la XOR entourant l'inhibiteur TEI.	53
V.5	Interactions hydrophobiques formées par le composé TEI avec la XOR.	54
V.6	Représentation des interactions hydrogène formées par l'inhibiteur TEI avec la XOR.	55
V.7	Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur TQ avec la XOR.	56
V.8	Représentation des interactions hydrogène formées par le composé TQ avec le site actif de la XOR.	58

V.9	Représentation des interactions hydrogènes formées entre le composé CID_129829816 et le site actif de la XOR.	63
V.10	Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé CID_129829816 et le site actif de la XOR.	64
V.11	Représentation des interactions hydrogène formées entre le composé CID_132131050 et le site actif de la XOR	65
V.12	Représentation des interactions hydrophobiques formées entre l'inhibiteur CID_132131050 et le site actif de la XOR.	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
III.1	Principaux programmes d'amarrage moléculaire .	28
IV.1	Principales caractéristiques de complexe utilisé.	41
V.1	Liste de 154 complexes utilisés pour calculer le RMSD.	44
V.2	Valeurs de RMSD des trois complexes étudiés.	48
V.3	Liaisons hydrogène établies par le composé TEI avec le site actif de la XOR.	54
V.4	Les liaisons hydrogène établies par la TQ avec le site actif de la XOR.	57
V.5	Résultats de docking avec le logiciel Surflex-dock dans le site actif de la XOR.	59
V.6	Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats.	62
V.7	Les liaisons hydrogène établies par l'inhibiteur CID_129829816 avec le site actif de la XOR.	64
V.8	Les liaisons hydrogène établies par compose CID_132131050.	65
V.9	Critères de la règle de <i>Lipinski</i> pour les différents inhibiteurs choisis.	67

LISTE DES GRAPHES

Graphe	Titre	Page
V.1	Résultat en % obtenu par Surfex-dock à des différents intervalles de RMSD.	46
V.2	Résultats en % obtenus par Surfex à deux intervalles de RMSD (Å).	47

LISTE DES ABREVIATIONS

2D	bidimensionnelle
3D	tridimensionnel
ADME	absorption, distribution, métabolisme et élimination
ADN	acide désoxyribonucléique
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
ARN	acide ribonucléique
COX-2	cyclooxygénase 2
CUM	urate mono-sodium
KDa	kilodaltons
FAD	flavine adénine dinucléotides
HTS	high-throughput screening
IPP	pompe à proton
LogP	Coefficient de partage octanol/solvant
MO	molybdo-protéique
Mo-co	cofacteur molybdoptérine
NIH	National Institutes of Health
nOHHN	Donneurs de liaisons H
nON	Accepteur de liaisons H
nrotb	nombre de liaisons rotables
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM	Poids moléculaire
PSA	polar surface area
RMN	Resonance Magnetique Nucleare
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNS	Reactive nitrogene species
ROS	Reactive oxygen species
SBDD	<i>Structure-Based Drug Design</i>
TQ	thymoquinone
UMS	urate monosodique
XO	xanthine oxydase
XDH	xanthine déshydrogénase
XOR	xanthine oxydoreductase



INTRODUCTION

INTRODUCTION

La goutte est l'arthrite inflammatoire la plus fréquente chez l'homme après l'âge de quarante ans. Aussi bien son incidence que sa prévalence a plus que doublé durant les trente dernières années. Cette augmentation est certainement liée à l'accroissement de l'obésité et du syndrome métabolique, probablement suite à l'effet stimulant de l'insuline sur la réabsorption de l'acide urique dans le tubule proximal [1]. L'hyperuricémie est constatée comme le facteur de risque le plus sérieux dans la maladie de la goutte dont l'acide urique est le résultat final du métabolisme des purines [2]. Ces purines sont dégradées par une série de réactions biochimiques réalisée par une enzyme appelée xanthine oxydoréductase (XOR). Cette enzyme catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ou de la xanthine en acide urique [3]. Bien que plusieurs médicaments diminuent les taux d'acide urique, ils provoquent des effets indésirables graves. Par conséquent, plus d'efforts sont nécessaires pour trouver de nouveaux inhibiteurs de la XOR avec moins d'effets secondaires.

De nos jours, les études *in silico* correspondent à la modélisation de phénomènes biologiques, telle que l'interaction entre plusieurs molécules. Ces études utilisées pour faciliter la découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique, lorsque les méthodes chimiques classiques ont atteint leurs limites [4].

Le docking moléculaire ou amarrage est le nom donné aux simulations dans lesquelles différentes approches sont combinées pour prédire et étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur le plus souvent une protéine (cible enzymatique) et d'une petite molécule (ligand) [4].

Dans cette étude, la méthode de docking moléculaire a été utilisée pour étudier l'effet inhibiteur de la thymoquinone et ces dérivées sur l'activité de la XOR, dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs potentiels de cette enzyme. Cette recherche aidera à la recherche de nouveaux candidats médicaments pour cibler la maladie de la goutte.

Nous présenterons ce travail en cinq chapitres :

Dans le premier chapitre de ce travail, nous avons donné un aperçu général sur la maladie de la goutte. Le deuxième chapitre présente un descriptif détaillé de notre cible enzymatique, la xanthine oxydoréductase. Tout en citant les différents inhibiteurs déjà connus de la XOR. Le troisième chapitre est consacré à l'étude bibliographique de l'application du

docking moléculaire et les divers concepts théoriques sur lesquels se base. Le quatrième chapitre, intitulé « matériel et méthodes », décrit de façon approfondie les outils utilisés pour réaliser notre travail. Le dernier chapitre renferme les principaux résultats obtenus au cours de cette étude en comparaison avec les recherches précédentes. Nous terminons par une conclusion suivie par quelques perspectives.



CHAPITRE I :
LA GOUTTE

I. La goutte

La goutte est la manifestation clinique d'une maladie métabolique liée à la précipitation de cristaux d'urate mono-sodium (CUM). Lorsque les tissus sont saturés à l'excès, dans certaines conditions, l'urate précipite sous forme de cristaux dans les articulations (cartilage, synoviale et tissus de proximité) ainsi que dans le tissu sous-cutané [5].

La goutte est une maladie rhumatologique le plus fréquent à l'échelle mondiale. Elle touche une ou plusieurs articulations ; l'articulation de l'orteil est la plus atteinte, mais celle de la cheville, du poignet, du genou, du coude ou de la main peuvent être concernées. La maladie goutteuse est caractérisée par la survenue de poussées inflammatoires articulaires appelées « crise de goutte » [6]. Cette affection se caractérise par une inflammation intense des articulations qui engendre en général une très forte douleur. Le facteur principal de la crise de goutte est le taux élevé de l'acide urique dans le sang (au-dessus de 7,0 mg/ dl). Cette molécule provoque une réaction inflammatoire et une douleur intense [7].

La fréquence de la goutte a pratiquement doublé ces dernières années pour des raisons multiples : augmentation de l'espérance de vie, augmentation de l'obésité et de ses complications (maladies cardiovasculaires), augmentation des maladies rénales chroniques, alimentation non équilibrée, utilisation de nombreux médicaments [8].

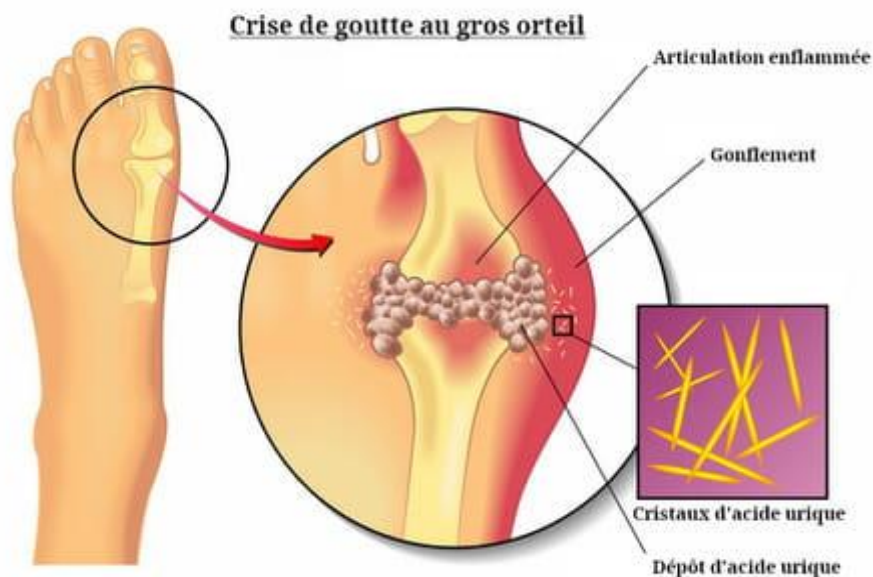


Figure I.1. Schéma d'une crise de goutte au gros orteil [9].

II. Epidémiologie

La goutte est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires de l'homme adulte et cette fréquence semble avoir encore augmenté dans les dernières décennies dans les pays occidentaux. Le vieillissement des populations, l'augmentation de l'utilisation des diurétiques en particulier comme traitement de l'hypertension artérielle, et surtout les changements alimentaires et « l'épidémie d'obésité » semblent les principaux facteurs expliquant cette augmentation [10].

Les hommes sont nettement plus touchés que les femmes par la goutte, puisque 80% du patient goutteux sont de sexe masculin. Chez l'homme, la maladie se déclare généralement après 40 ans et son incidence augmente avec l'âge. Les femmes sont protégées de la goutte jusqu'à la ménopause, grâce aux hormones féminines, et sont touchées plus tardivement par la maladie, après 65 ans [11].

III. Les causes et les facteurs favorisants

Les facteurs de risque de la goutte sont multiples. Ils peuvent être génétiques, liés à l'âge ou encore aux comportements alimentaires et/ou sédentaires, voire être en lien avec une autre maladie ou la prise de certains médicaments :

- **Prédisposition génétique et goutte** : les facteurs génétiques peuvent expliquer un certain nombre de gouttes primitives. 25 à 30% des patients atteints de la goutte ont un de leurs parents hyperuricémique et 40% ont un de leurs parents également goutteux [12, 13].
- **Hyperuricémie** : l'hyperuricémie est le principal facteur de risque de la goutte, mais il n'engendre pas nécessairement des crises chez les patients. L'hyperuricémie est un trouble sanguin défini par une trop grande concentration d'acide urique dans la circulation [14]. Chez la femme supérieur à 360 micromoles par litre (60 mg/l), et supérieur à 420 micromoles par litre (70 mg/l) chez l'homme. Les hyperuricémies découlent soit d'un excès de production, soit d'un défaut d'élimination rénale, soit de l'association ces deux phénomènes. Elles sont d'origine primaire (atteintes primaires du métabolisme des purines ou de l'élimination urinaire de l'acide urique) ou d'origine secondaire (suite l'alimentation, à l'administration de xénobiotiques ou suite à des pathologies ayant des conséquences sur le métabolisme de l'acide urique) [15].

- **Âge et sexe de la personne :** avant 65 ans, la goutte est 4 fois plus fréquente chez l'homme que chez la femme et 3 fois plus fréquente après 65 ans. Chez la femme, les œstrogènes ont un effet uricosurique protecteur mais avec l'âge et avec la ménopause la fréquence de la goutte augmente. La goutte apparaît donc plus tardivement chez la femme expliquant que les femmes goutteuses sont plus âgées que les hommes goutteux. Les valeurs d'uricémie sont bien plus faibles chez les enfants en comparaison aux adultes. Cependant, au cours de ces 20 dernières années, la fréquence de la goutte a doublé chez les femmes. En général, la goutte débute 10 ans plus tard chez la femme que chez l'homme et survient après la ménopause [13, 16].
- **L'alimentation et alcool :** l'alimentation est depuis longtemps reconnue comme un facteur de risque de goutte, considérant cette dernière comme « la maladie des rois », des bons vivants. Donc, une alimentation riche en viandes rouges, abats, charcuterie, et en certains poissons (sardine, anchois, hareng, saumon, carpe...) augmente significativement l'incidence de la maladie goutteuse [17]. De plus, parmi les boissons alcoolisées, la bière est celle qui entraîne la plus grande augmentation du risque. La consommation de sodas et d'aliments additionnés de fructose a aussi été liée à une augmentation de l'incidence de la goutte [18].
- **Maladies chroniques :** certaines maladies favorisent l'apparition de la goutte telle que : l'insuffisance rénale, le syndrome métabolique et l'obésité, l'hypertension artérielle, le diabète, l'hyperlipidémie. La goutte peut aussi être favorisée en cas de renouvellement accéléré des cellules comme par exemple, en cas de cancer du sang ou de psoriasis [13].
- **Médicaments :** un certain nombre de médicaments peuvent augmenter le risque d'hyperuricémie et de goutte. C'est notamment le cas des diurétiques thiazidiques (tel que l'hydrochlorothiazide) et des diurétiques de l'anse (comme le furosémide). La prise de diurétiques dans la prise en charge de l'hypertension artérielle augmente le risque de goutte incidente : le risque relatif de goutte incidente est de 2,39 chez la femme et de 3,41 chez l'homme et le risque relatif de crise de goutte est de 1,77 sous diurétique [19, 20]. De plus, l'acide acétylsalicylique (aspirine) à faible dose est à l'origine d'une rétention de l'acide urique et devient donc un facteur de risque de goutte alors que des fortes doses ont un effet uricosurique [21, 22].

IV. Les différentes phases de la goutte

On peut diviser les affections goutteuses en trois étapes (figure I.2) :

- 1^{ère} étape : hyperuricémie asymptotique ;
- 2^{ème} étape : goutte aiguë (crises de gouttes) ;
- 3^{ème} étape : goutte chronique.

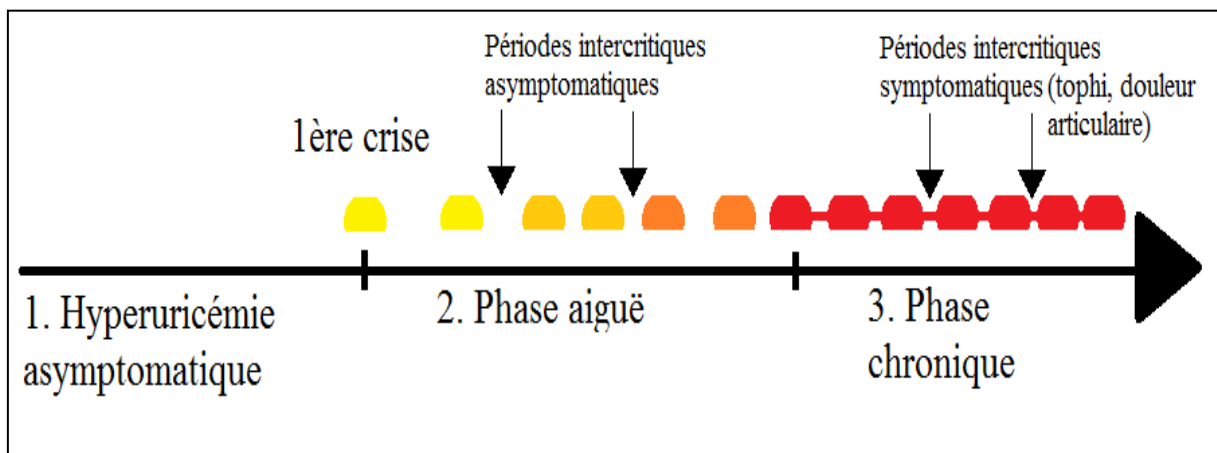


Figure I.2. Les différentes phases de la goutte [23].

IV.1. Hyperuricémie asymptotique

Premier stade de la goutte, l'hyperuricémie asymptotique est par définition sans manifestation clinique apparente. On peut la qualifier de maladie silencieuse car la formation des cristaux d'urate monosodique (UMS) et leur accumulation dans les tissus se font cependant durant cette phase mais de façon silencieuse. Il s'agit donc du stade précoce et d'une condition ubiquitaire à la maladie de la goutte [24, 25].

IV.2. La phase de goutte aiguë

L'accès aigu d'arthrite goutteuse, aussi appelée crise de goutte, résulte d'une réaction inflammatoire causée par les dépôts de cristaux d'UMS au niveau de l'articulation. Elle peut aussi toucher les tendons et les bourses séreuses péri articulaires. La crise cède sans séquelles en quelques jours même sans traitement. Entre les crises le patient est asymptotique, environ 50% des patients goutteux feront leur deuxième crise pendant la période de 6 mois à 2 ans suivant la première [23].



Figure I.3. Accès de goutte interphalangienne [24].

Une crise de goutte aiguë est caractérisée par l'apparition rapide (en 6 à 12 heures maximums) de douleurs intenses au niveau d'une articulation, souvent du membre inférieur (dans 85 à 90 % des cas) et d'une hypersensibilité au moindre contact. L'articulation présente alors les signes classiques de l'inflammation : tuméfaction intense et douloureuse, chaleur locale et érythème marqué pouvant être accompagné de fièvre. Les crises de gouttes peuvent être précédées de prodromes, comme des paresthésies ou une sensation générale de malaise ou d'irritabilité [26].

L'absence de traitement de la goutte aiguë entraîne une augmentation de la durée des crises, de leur fréquence et du nombre d'articulations touchées. Sur le long terme, elle risque d'évoluer vers la goutte chronique (dans les cinq ans pour 30 % des patients ayant fait des crises de goutte non traitées) [27].



Figure I.4. La crise de la goutte [28].

IV.3. La phase de goutte chronique

La goutte chronique ne se manifeste généralement qu'après une phase d'arthrites aiguës récidivantes. Elle se caractérise par une atteinte polyarticulaire avec minimes manifestations inflammatoires et peut aller jusqu'à des destructions articulaires [29].

Le patient entre en phase de goutte chronique lorsque les périodes inter critiques ne sont plus indolores. Les douleurs articulaires persistent entre les crises et celles-ci sont plus fréquentes. De plus, on observe des dépôts de cristaux au niveau de l'hypoderme, des muqueuses, des structures articulaires et para-articulaires ainsi qu'au niveau des tendons et des os. On appelle ces dépôts des tophi (au singulier, tophus) [23].

L'apparition de tophi est une des caractéristiques de cette goutte chronique, d'où le terme de goutte tophacée. Les tophi sont des dépôts sous-cutanés d'urate de sodium. On les retrouve fréquemment au niveau du pavillon de l'oreille, des coudes, des mains, du tendon d'Achille...etc. [30, 31].



Figure I.5. La phase de goutte chronique [29-31].

V. Quelles sont les symptômes de la maladie ?

La goutte commence généralement au niveau des membres inférieurs, le plus souvent à l'articulation de la base du gros orteil (podagre), suivie du genou et de la cheville. L'articulation touchée est fortement tuméfiée, rouge et extrêmement douloureuse. Une crise peut s'accompagner de fièvre. Les gaines tendineuses, bourses et tissus mous sont souvent aussi touchés. L'inflammation peut traverser la peau et peut simuler un érysipèle [31].

La crise de goutte ne dure généralement que quelques jours. Il reste ensuite une peau squameuse. Avec le temps, les intervalles entre les crises deviennent plus courts et le nombre d'articulations touchées augmente. Chez les personnes âgées et les femmes, la goutte est moins inflammatoire initialement et souvent oligo- à poly- articulaire. Les articulations des mains sont aussi plus souvent concernées [31].

La crise de goutte apparaît de façon très brutale et est très douloureuse. L'articulation touchée est gonflée et rouge. A la longue et sans traitement adapté, la persistance d'un taux d'acide urique trop élevé dans le sang entraîne la formation d'amas indolores, appelés tophus, au niveau des articulations et sous la peau.

La première crise de goutte n'atteint le plus souvent qu'une seule articulation du membre inférieur. Il arrive que plusieurs articulations soient touchées en même temps, on parle alors de polyarthrite goutteuse. D'autres articulations peuvent être concernées les mains, les poignets, les coudes, exceptionnellement la colonne vertébrale. Ces dépôts qu'ils soient visibles ou non, s'observent environ 10 à 20 ans après la première crise. Les problèmes rénaux, et en particulier les calculs, sont également fréquents chez les personnes souffrant de goutte non traitée [8].

VI. Comment diagnostique-t-on la goutte ?

Le diagnostic définitif de la goutte repose sur l'identification directe des cristaux d'UMS dans le liquide synovial et sur l'exclusion d'une arthrite septique. Il convient donc, si la situation le permet, de ponctionner l'articulation douloureuse. Le liquide synovial est inflammatoire avec une prédominance de polynucléaires neutrophiles. Les cristaux d'UMS, intracellulaires ou extracellulaires, sont visibles au microscope optique en lumière polarisée. Comme une crise de goutte aiguë et une arthrite septique peuvent coexister dans la même articulation [32].

VI.1. Les radiographies conventionnelles

Présentent peu d'intérêt, notamment au stade précoce où elles ne montrent que des signes peu spécifiques (gonflements et épanchements aspécifiques), les lésions osseuses n'apparaissant qu'après 5 à 10 ans d'évolution. À un stade avancé, elles permettent en revanche de constater des érosions goutteuses définies comme une rupture corticale avec marge sclérotique et bord saillant formant la classique image en « *hallebarde* » [33].



Figure I.6. Radiographie de la main d'un patient atteint de goutte tophacée sévère et montrant l'érosion osseuse au niveau de la phalange proximale [34].

VI.2. L'échographie

Permet en revanche de détecter précocement les lésions goutteuses. L'évolution échographique de la maladie est caractérisée par l'apparition successive de trois signes spécifiques : agrégats, double contour lié au dépôt de cristaux d'urate à la surface du cartilage puis tophi [33].

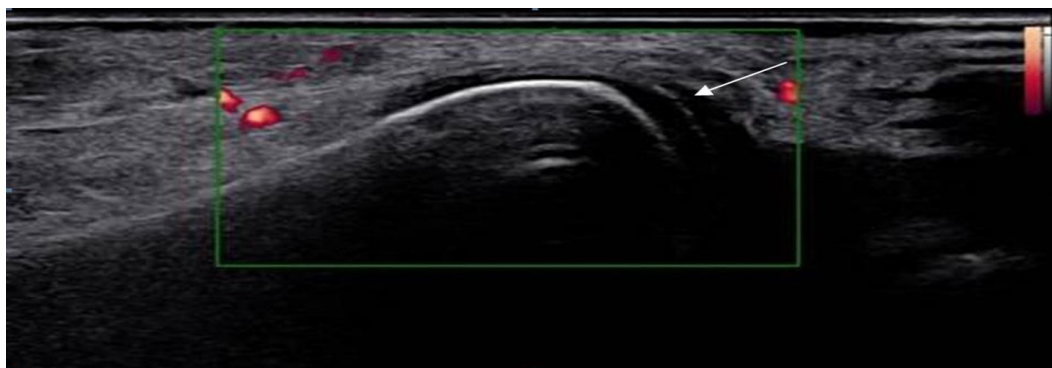


Figure I.7. Echographie transversale de la styloïde ulnaire montrant un aspect en double contour (flèche) [33].

VI.3. La tomodensitométrie

Peut être utile pour évaluer les dommages structuraux et mettre en évidence des opacités rondes et ovales avec une densité moyenne de 160 unités Hounsfield ; au stade de tophi, les dépôts calciques secondaires sont également visibles [33].

VII. Traitement de la maladie

C'est le traitement symptomatique qui doit être énergique et précoce. Il comprend le repos, le régime et les médicaments.

VII.1. Le repos

C'est un repos au lit, l'articulation malade étant protégée du poids des draps par un arceau et une vessie de glace pouvant être placée à son contact pour calmer la douleur (les baumes calmants ont généralement moins d'efficacité). Ce repos durera tant que les manifestations douloureuses ne seront pas calmées [2].

VII.2. Le régime

Il comporte une alimentation légère à base de légumes, de fruits, d'hydrates de carbone avec 2 litres d'eau minérale par jour, dont 1/2 litre d'eau de Vichy pour alcaliniser les urines, avec interdiction de l'alcool et également les tous premiers jours, interdiction des graisses et de la viande (les grandes règles du régime général de la goutte devant bien entendu être respectées durant la période) [2].

VII.3. Les médicaments

Les médicaments antigoutteux agissent soit en inhibant les réactions inflammatoires, soit en réduisant la concentration d'acide urique. Les médicaments hypouricémiants tels que l'allopurinol, un inhibiteur XOR, sont largement utilisés pour le traitement de la goutte [35].

VII.3.1. Traitement de la crise aigue

VII.3.1.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Etant donné les symptômes très douloureux, une dose d'emblée optimale mérite d'être initiée, plutôt qu'adopter des doses progressives. Plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont montré leur efficacité, mais seul le profil de sécurité doit conduire le

choix du traitement. Certains préféreront les inhibiteurs de la cyclooxygénase 2 (COX-2) aux Les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques, avec une attention particulière concernant le terrain cardiovasculaire et la fonction rénale. Chez les personnes à risque, la coprescription d'inhibiteurs de la pompe à proton (IPP) mérite d'être considérée [5].

VII.3.1.2. La colchicine

La colchicine, isolée en 1884, est extraite des graines de *Colchicum autumnalis*, le colchique d'automne. Cette plante est utilisée depuis des siècles pour traiter les accès de goutte. C'est le traitement spécifique de la goutte. Son effet se manifeste en 10 à 24 heures en moyenne sur les douleurs et elle aboutit à la disparition totale de la crise en 3 à 4 jours en général [2, 36, 37].

VII.3.2. Traitements Hypouricémiants

Il existe 3 catégories d'hypouricémiants : les inhibiteurs des synthèses puriniques (allopurinol, fébuxostat), les uricosuriques (probenécide, benzbromarone, fénofibrate, losartan) et enfin les uricasés. Seuls l'allopurinol et le fébuxostat ont reçu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la goutte [38].

VII.3.2.1. Allopurinol

Inhibiteur non spécifique de la xanthine oxydase a longtemps été l'hypouricémiant de référence [21]. C'est le traitement de fond de première intention. Il est débuté à distance de la crise de goutte et doit être pris à doses progressives. Les effets indésirables digestifs (nausées, vomissements, diarrhées) sont fréquents. Il peut provoquer une toxicité cutanée potentiellement grave qui impose l'arrêt du traitement et contre-indique formellement la reprise du médicament. La survenue d'une éruption cutanée d'évolution rapide, avec des lésions des muqueuses (bouche, yeux) ou de la fièvre nécessite l'arrêt immédiat du traitement et un avis médical rapide [39].

VII.3.2.2. Le fébuxostat

Le fébuxostat est commercialisé depuis mars 2010 en France. Le fébuxostat est un inhibiteur sélectif non purinique de la xanthine oxydase. Sa demi-vie est de 6 heures et son métabolisme est essentiellement hépatique [38].

Les effets indésirables les plus fréquents sont des nausées, des diarrhées, des maux de tête, des éruptions cutanées et des anomalies du bilan hépatique. De rares cas de réaction allergique grave, incluant des éruptions cutanées graves, ont été rapportés [39].

VIII. Comment éviter la goutte ?

- Limiter les apports d'aliments riches en substances puriques car elles sont dégradées pour produire l'acide urique ;
- Limiter les plats à base d'abats (foie, cervelle, rognons, ris de veau, tripes, langue, cœur, charcuteries) ;
- Limiter les poissons « bleus » (anchois, hareng, sardine, carpes, brochet ou truite, saumon, morue, cabillaud, œufs de poissons) ;
- Il faut bien s'hydrates (1.5 à 2 litre d'eau par jour) ;
- Apport en alcool réduit ;
- Perdre du poids de façon progressive.
- Arrêter les médicaments qui font augmenter le taux d'acide urique dans le sang.
- Remplacer les produits laitiers à faible teneur en matières grasses par d'autres aliments.



CHAPITRE II
LA XANTHINE
OXYDOREDUCTAE

I. Définition

La xanthine oxydoréductase (XOR, EC 1.1.3.22) est un molybdène flavoprotéine hydroxylase qui est largement distribuée dans la nature [40]. Appartient à une famille de molybdo-flavoenzymes très anciennes et très conservées. Cette famille comprend l'aldéhyde oxydase chez les plantes et les animaux et certaines enzymes procaryotes [41]. La xanthine oxydase (XO, EC 1.1.3.22) et la xanthine déshydrogénase (XDH, EC 1.1.1.204) sont des formes interconvertibles de la même enzyme ; xanthine oxydoréductase [42].

La XOR existe dans la plupart des tissus des mammifères sous forme déshydrogénase et est généralement reconnue comme une enzyme clé du catabolisme des purines [43, 44]. La XOR est très répandu chez les différentes espèces, elle a été identifiée dans les organismes procaryotes ainsi que dans les plantes et les animaux. Chez les êtres humains, la XOR est exprimée de manière ubiquitaire dans le foie et les intestins affichant donc la plus forte activité spécifique. Elle est exprimée aussi dans les poumons, les reins et le myocarde [45]. Cette enzyme se trouve également dans les fluides biologiques tels que le sang, le lait, le fluide nasal et la salive [46].

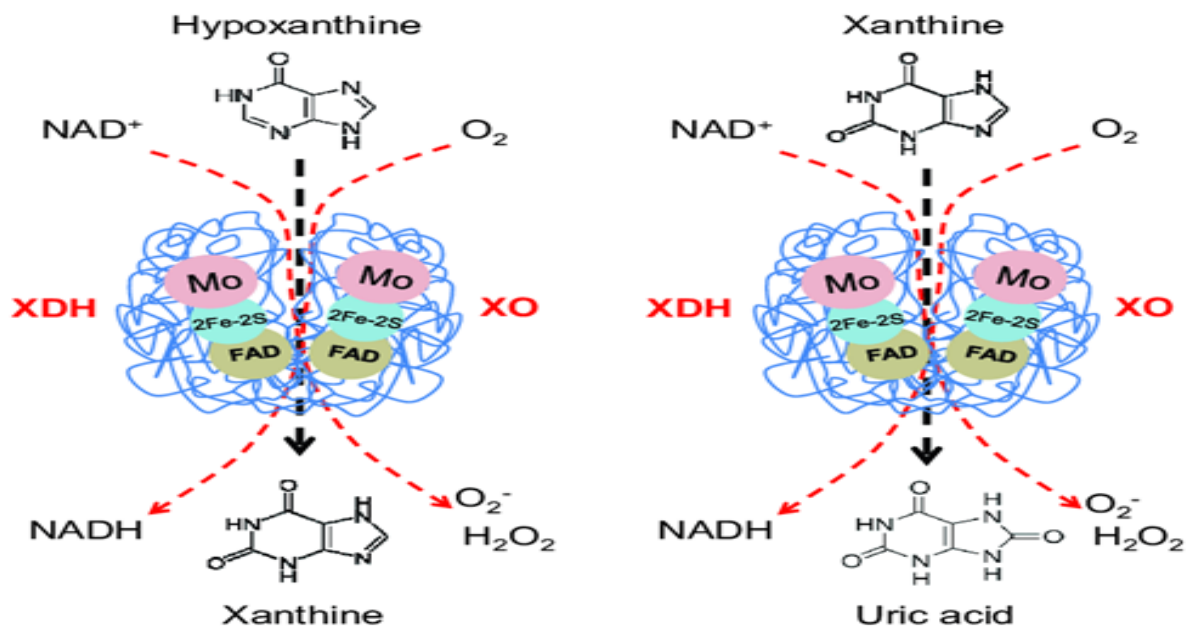
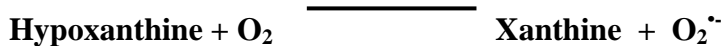


Figure II.1. Structure de la xanthine oxydoréductase (XOR) [47].

II. Les formes de la XOR

Il existe deux types de la XOR interconvertibles qui diffèrent par leur forme et par leur mode d'action [48]. Elles peuvent être soit de type xanthine oxydase (XO), dépendantes de l'O₂, soit de type xanthine déshydrogénase (XDH), dépendantes du NAD⁺. La XO est une enzyme cytosolique qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la réduction de O₂ en O₂⁻ selon la réaction :



La xanthine est ensuite oxydée par la XDH en acide urique selon la réaction :



III. Structure de la XOR

Les XOR sont des enzymes homodimères d'une masse moléculaire 300kDa (kilodaltons), constituée de deux sous unités identiques de 150kDa de chacune [49-51]. Chaque sous-unité contient une seule chaîne peptidique d'environ 1330 acides aminés, elle est partagée en 3 domaines [52] :

- Le domaine C-terminale de 85kDa (590-1332 acides aminés) est le molybdo-protéique (MO).
- Le domaine central de 40kDa (226-531 acides aminés), est une molécule de flavine adénine dinucléotides (FAD).
- Le domaine N-terminale de 20kDa (1-165 acides aminés) se constitue de deux sous domaines, avec deux centres (**Fe2/S2**) combinés jusqu'à quatre résidus de cystéine.

Le gène qui code pour la XOR humaine est composé de 36 exons et 35 introns. Ce gène est localisé dans la bande p22 du chromosome 2 [53-55]. La séquence de la XOR humaine est de 1333 acides aminés, elle est de 91% d'homologie avec celle de la XOR de la souris et du rat [55].

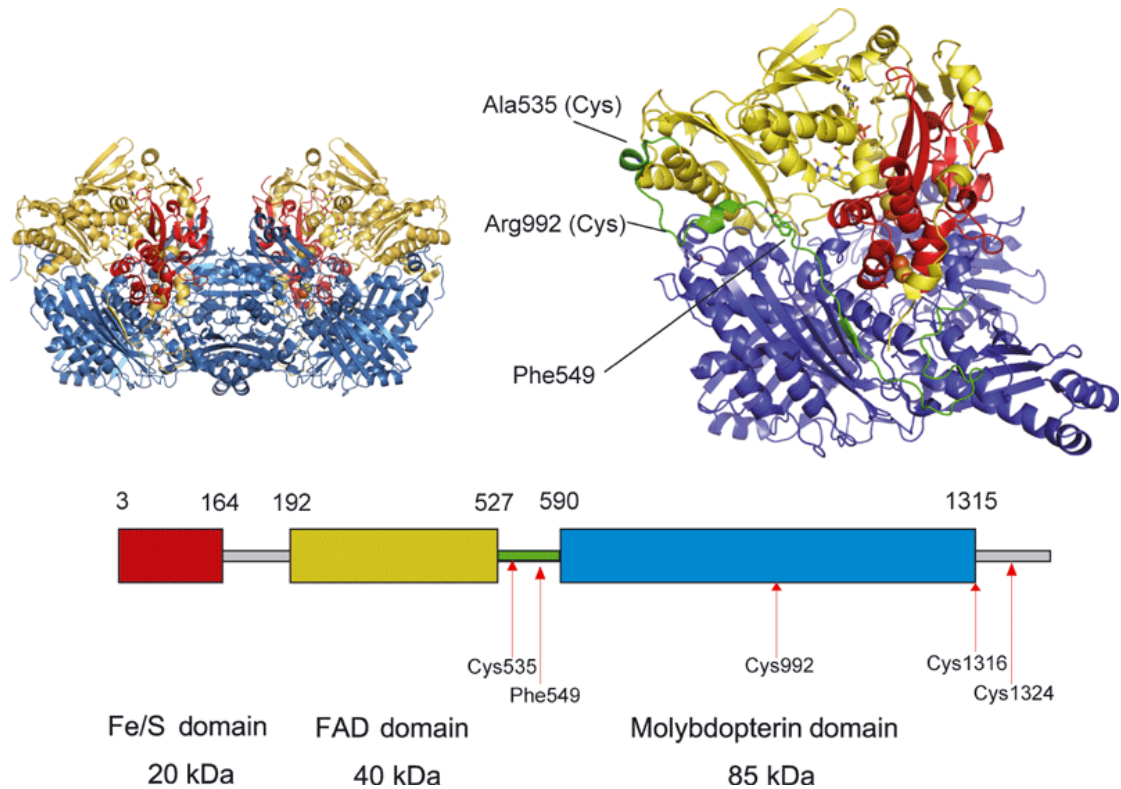


Figure II.2. Structure cristalline de la xanthine déshydrogénase de rat [56].

IV. Mécanisme d'action de la XOR

La XOR catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ou de la xanthine en acide urique dans la voie métabolique de dégradation des purines chez les animaux supérieurs. Chez l'homme, l'enzyme est la cible de médicaments thérapeutiques contre l'hyperuricémie ou la goutte [3].

La xanthine est oxydée en acide urique au centre de cofacteur molybdoptérine (Mo-co) de l'enzyme, et les électrons sont transférés par l'intermédiaire des 2 centres Fe/S vers le centre FAD où le NAD^+ est réduit en NADH pour la forme déshydrogénase (XDH), alors que pour la forme oxydase (XO) l'affinité pour le NAD^+ est diminuée, donc elle est renforcée pour l'oxygène entraînant ainsi le transfert d'électrons monovalents et divalents à l' O_2 pour générer le $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 , respectivement [57].

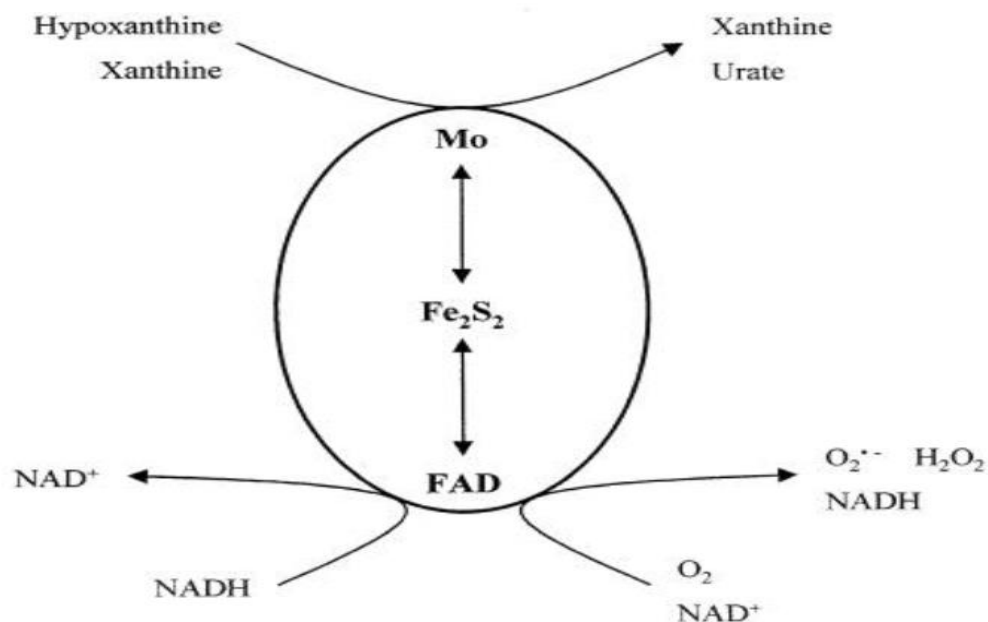


Figure II.3. XOR a catalysé l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au site Mo et du NADH au site FAD [58].

V. Implications physiopathologiques liées à la XOR

V.1. Implications physiologiques

La XOR joue un rôle principal dans le catabolisme des purines en acide urique, mais elle a aussi d'autres fonctions plus larges dans la physiologie de l'organisme tel que son rôle dans l'absorption du Fer au niveau de l'intestin et le foie [59, 60]. L'activité XOR est directement impliquée dans le métabolisme d'un certain nombre de médicaments antitumoraux et antimétaboliques utilisés contre les néoplasies, les maladies auto-immunes et les infections virales. La XOR peut également avoir une activité antimicrobienne, comme cela a été démontré dans le lait, le sang et le foie [41, 61, 62]. D'autre part, l'acide urique produit par la XOR a un rôle comme un antioxydant et un piègeur très puissant des radicaux libres [46, 63].

V.2. Implications pathologiques

La XOR a été impliquée dans les lésions d'ischémie-reperfusion, son implication dans les processus physiologiques normaux a été moins étudiée. Il est argumenté que les ROS (Reactive oxygen species) et RNS (Reactive nitrogen species) dérivés de la XOR jouent un rôle dans l'immunité innée, en particulier dans la réponse inflammatoire et dans la défense

antimicrobienne du tractus gastro-intestinal. De plus, cette enzyme est responsable des activités pro-inflammatoires et pro-thrombotiques des cellules endothéliales [58, 63-65]. Elle cause la goutte qui est une maladie inflammatoire due à des concentrations élevées de cristaux d'acide urique dans le sérum [66,67]. D'autre part, les produits oxydants de l'enzyme sont impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires et métaboliques, qui sont les principaux facteurs de risque de l'athérosclérose [63,67].

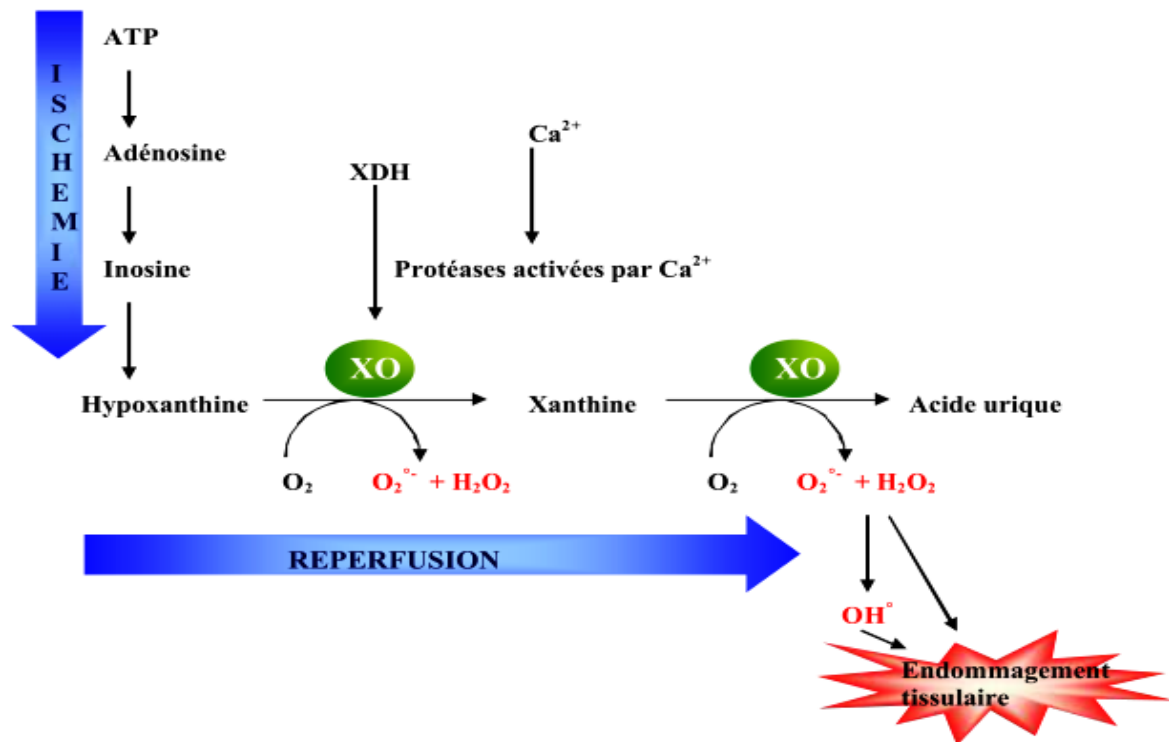


Figure II.4. Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion [68].

V.3. La XOR et l'acide urique

La XOR produit l'acide urique, l'augmentation de la concentration de ce produit provoque la goutte. C'est une maladie qui se traduit par une hyperuricémie, et aboutissant à des précipitations uratiques dans différents tissus, en particulier dans les articulations [69]. L'hyperuricémie est due à une insuffisance rénale, donc la quantité d'acide urique éliminé diminue et il s'accumule dans le sang. Les cristaux d'acide urique se déposent au niveau des articulations, ce qui provoque une destruction des os avec des douleurs à chaque mouvement [70].

➤ Acide urique

L'acide urique est le produit de la dégradation des bases puriques (hypoxanthine et guanosine sous l'action de la xanthine oxydase) [2]. L'acide urique est un sous-produit de la décomposition des acides nucléiques (acide ribonucléique, ARN et acide désoxyribonucléique, ADN) dans les cellules. Il est présent en très petites quantités dans le sang, car l'organisme détruit de façon continue des cellules pour en fabriquer de nouvelles de même, l'organisme transforme rapidement les substances présentes dans les aliments, appelées purines, en acide urique [70].

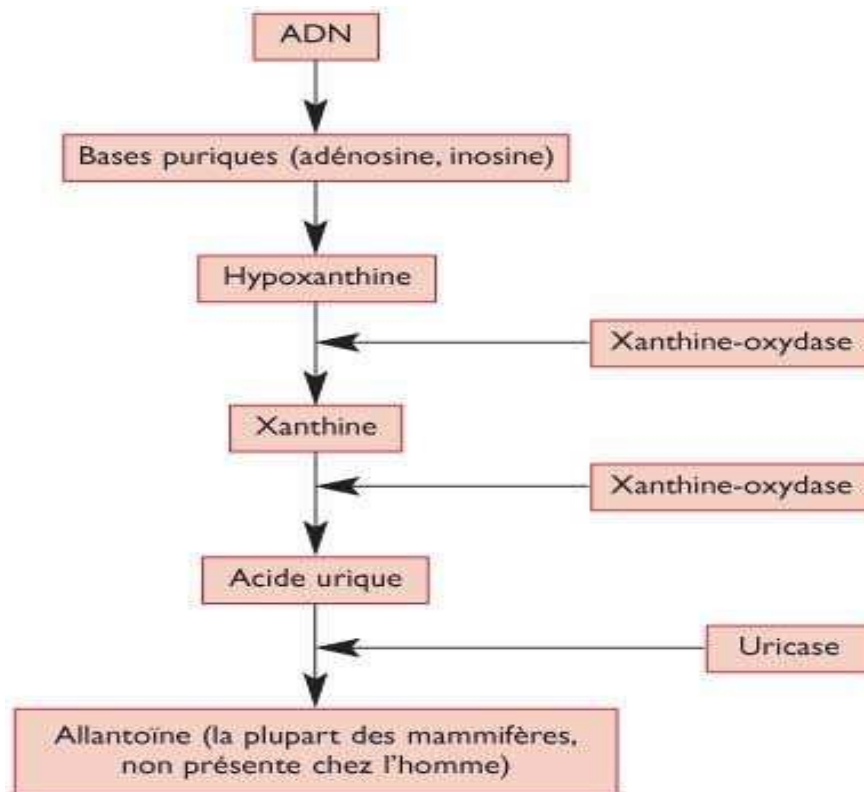


Figure II.5. Métabolisme de l'acide urique [71].

VI. Les inhibiteurs de l'enzyme XOR

L'inhibition de la XOR est de grand intérêt, principalement dans le traitement de la goutte, étant l'allopurinol, le fébuxostat et le topiroxostat, les plus inhibiteurs XO connus. Les inhibiteurs de la XOR sont soit des composés purines tels que l'allopurinol et l'oxypurinol, ou bien non purines tels que le fébuxostat. Allopurinol et Febuxostat comme médicaments contre la goutte ou l'hyperuricémie, peut inhiber efficacement la XOR. Une multitude flavonoïdes a été signalée comme des inhibiteurs naturels de la XOR [72].

➤ **Allopurinol**

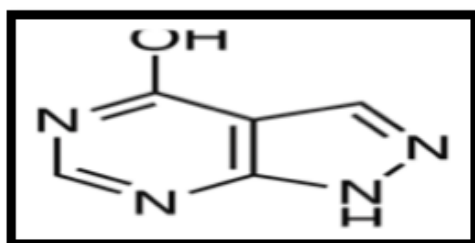
Depuis 1963 à ce jour, l'allopurinol est le traitement le plus efficace de la goutte. L'allopurinol est un uricofreinateur, il empêche la formation d'acide urique. Il inhibe la xanthine-oxydase, qui est une enzyme catalysant la biosynthèse de l'acide urique : il diminue l'uricémie et l'uraturie, est un analogue structural de l'hypoxanthine et est rapidement métabolisé en oxypurinol qui peut se lier à la XO et inhiber donc son activité [73].

➤ **Fébuxostat**

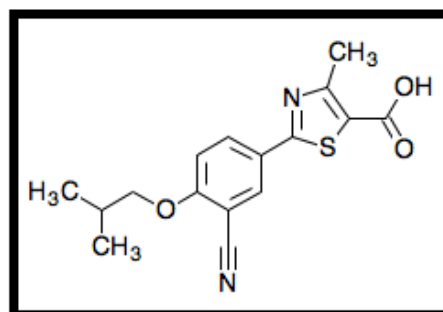
Un nouveau médicament fébuxostat (l'acide 2-[3-cyano-4-isobutoxyphenyl]-4-méthylthiazole-5-carboxylique) est un inhibiteur non purique spécifique de la XO, et significativement plus efficace que l'allopurinol [74-76].

➤ **Les flavonoïdes**

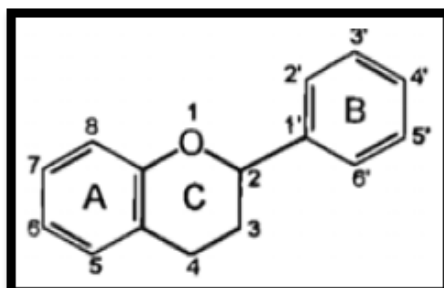
Les flavonoïdes ayant un effet inhibiteur sur la XO pourraient supprimer les lésions oxydatives causées par l'ischémie-reperfusion et pourraient être utilisés pour prévenir la goutte [77].



Allopurinol



Fébuxostat



Flavonoïdes

Figure II.6. Les inhibiteurs de la XOR [78-80].

VII. La thymoquinone

VII.1. Structure

La thymoquinone (TQ) ou 2-isopropyl-5-méthylbenzo-1,4-quinone [81], est le composant bioactif de l'huile volatile de la graine noire de *Nigella sativa*, Elle est présente dans la nigelle sous une forme cristalline triclinique [82]. La TQ est le constituant le plus abondant de l'huile volatile des graines de *Nigella sativa*. De plus, la plupart des propriétés de cette plante médicinale sont principalement attribuées à la TQ [83].

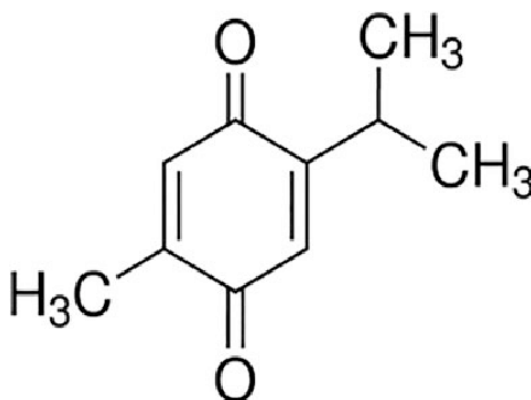


Figure II.7. Structure chimique de la thymoquinone [84].

VII.2. Propriétés physicochimiques

La thymoquinone est une poudre cristallisée de couleur jaune. Soluble dans les solvants organiques tels que l'éther, le chloroforme ou l'éthanol, mais partiellement soluble dans l'eau. Elle possède un point de fusion de 45-47°C, sa formule moléculaire est C₁₀H₁₂O₂, et son poids moléculaire de 164,2 g/mol [85].

VII.3. Pathologie

Un certain nombre d'actions pharmacologiques de la TQ ont été étudiées, notamment des effets anti-oxydants, anti-inflammatoires, immunomodulateurs, antihistaminiques, antimicrobiens et antitumoraux. Il a également des activités gastroprotectrices, hépatoprotectrices, néphroprotectrices et neuroprotectrices. De plus, des effets positifs de la TQ dans les troubles cardiovasculaires, le diabète, les troubles de la reproduction et les affections respiratoires, ainsi que dans le traitement des complications osseuses ainsi que la fibrose ont été démontrés. De plus, un grand nombre de données montrent que la TQ a des

effets indésirables très faibles et aucune toxicité grave [83]. La TQ permet d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses se rapprochant de l'apoptose. Elle s'est montrée comme étant efficace pour ralentir le processus de néovascularisation de la tumeur qui ainsi n'est plus alimentée correctement. De plus c'est également un analgésique et anticonvulsivant [86].

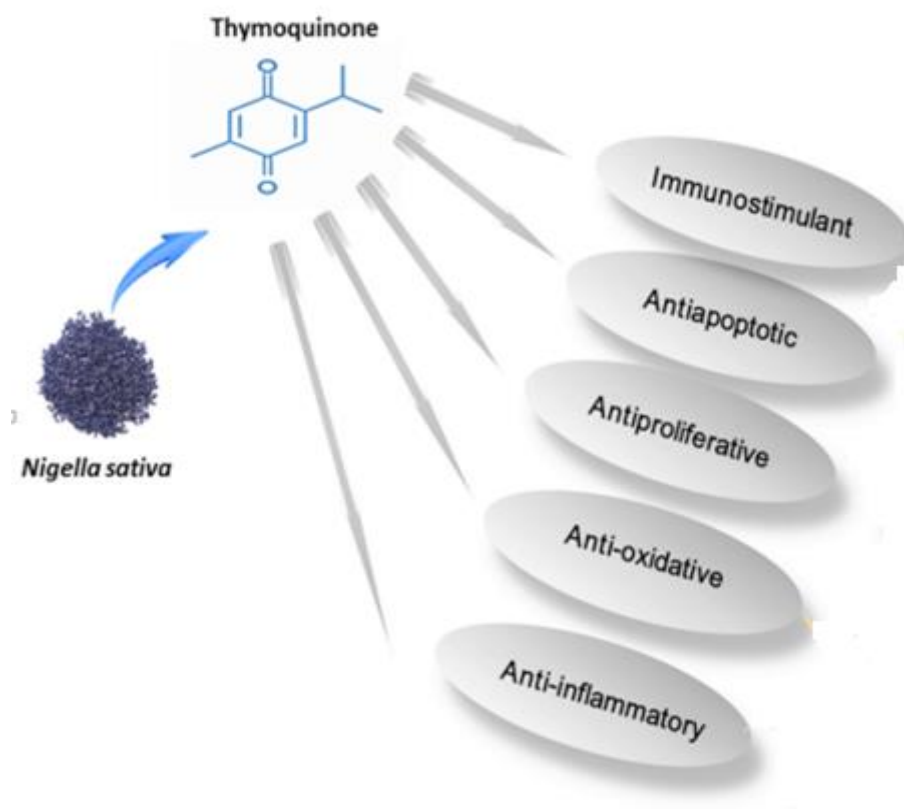
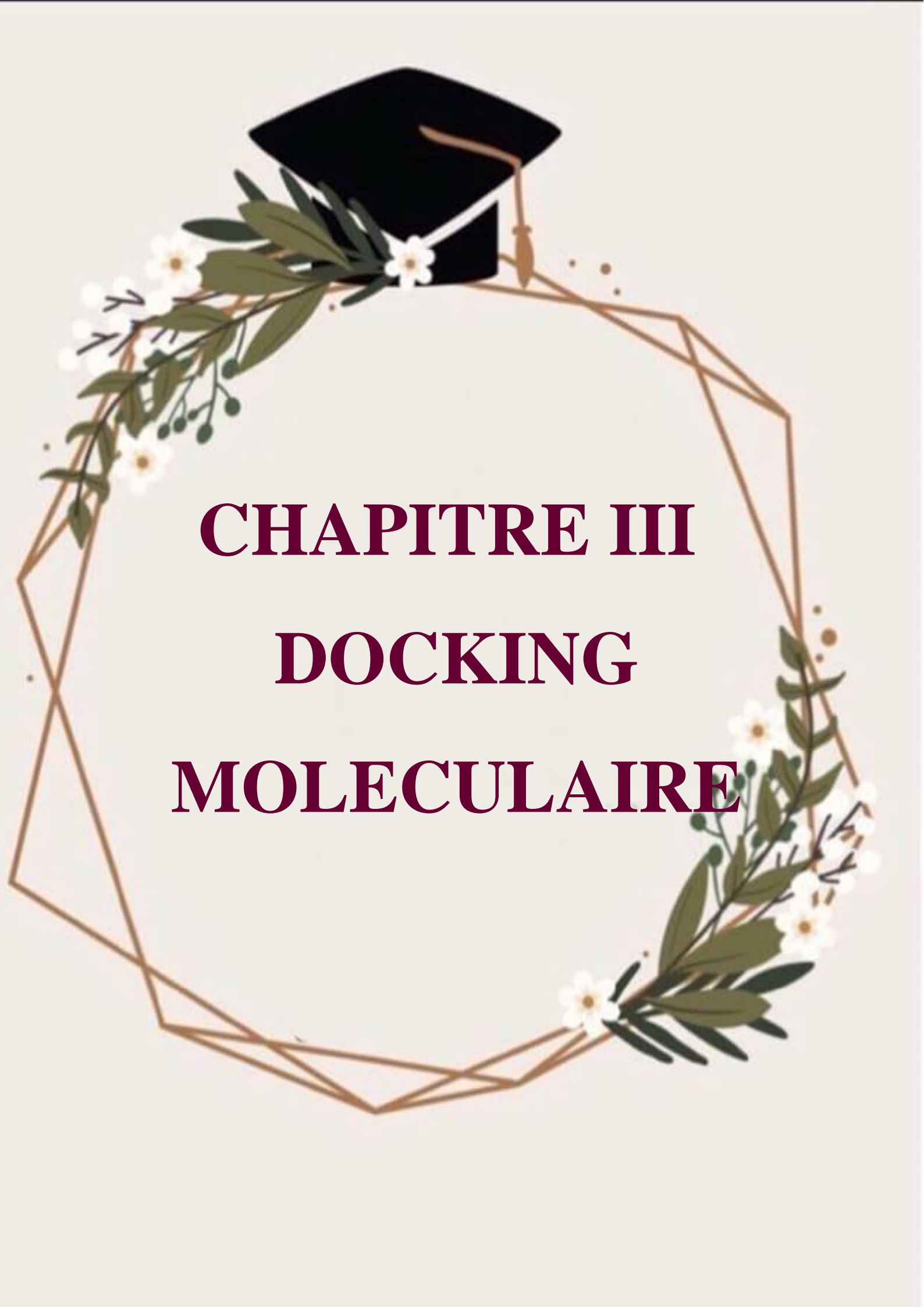


Figure II.8. La fonction moléculaire des voies de la thymoquinone [87].



CHAPITRE III
DOCKING
MOLECULAIRE

I. Généralité sur le docking moléculaire

Avec le développement des outils informatiques dans les 20 dernières années, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire s'est très vite introduit dans le domaine de la recherche en biologie [88].

Dans le passé, la méthode expérimentale établie pour la recherche des ligands interagissant avec une protéine donnée est le criblage à haut débit (HTS ou *high-throughput screening*). L'activité (ou plutôt l'affinité) d'un très grand nombre de composés est systématiquement testée. L'obtention de résultats positifs et leur confirmation conduisent à l'identification de touches (ou "*hits*") ou encore composés promoteurs. Il s'agit de composés interagissant significativement plus que la moyenne des autres composés testés sur la cible visée. Ces composés promoteurs sont par la suite optimisés en vue d'obtenir des candidats médicaments, ayant des caractéristiques proches de celles d'un médicament (*drug-like*) [89].

Cependant, les outils informatiques ont pris place pour traiter le flot de données produites et optimiser ses avancées. L'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo-saxon "docking") est l'une des méthodes *in silico* les plus récentes. La problématique du « docking », a été de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand par étude l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation de complexes moléculaires [90].

Les premiers programmes de docking ont été basés sur le concept de la clé-serrure, introduit par *Emile Fisher* en 1894. Selon lequel le ligand et la protéine sont considérés comme des corps rigides capables d'interagir lorsqu'ils présentent une complémentarité structurale parfaite. Ce concept est aujourd'hui obsolète. Une représentation plus ajustée d'un tel complexe est celui d'une main dans un gant (respectivement la molécule organique ou un ligand dans la protéine ou la cible enzymatique). Chacun peut changer sa forme, favoriser la complémentarité afin de réduire les interactions gênantes et augmenter le confort procuré par le contact entre les deux molécules [91].

II. Définition de docking moléculaire

Le docking moléculaire (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire) est une sorte de modélisation informatique, qui facilite la prédiction de l'orientation de liaison préférée d'une molécule (ligand) à une autre (récepteur), lorsque les deux interagissent entre eux pour former un complexe stable. Informations obtenu à partir de l'orientation préférée des molécules liées peut être utilisé pour prédire le profil énergétique (comme la liaison libre énergie), force et stabilité (comme l'affinité de liaison et la liaison constante) des complexes. Cela peut être fait en utilisant la fonction de notation de l'amarrage moléculaire.

De nos jours, l'amarrage moléculaire est souvent utilisé pour prévoir l'orientation de liaison de petites molécules (candidats-médicaments) à leur cible biomoléculaire (comme les protéines, glucide et acide nucléique) dans le but de déterminer leurs paramètres de liaison provisoires. Cela établit des données brutes pour la conception rationnelle de médicaments (développement de médicaments basé sur la structure) de de nouveaux agents avec une meilleure efficacité et plus de spécificité [92].

L'amarrage moléculaire est l'une des méthodes les plus fréquemment utilisées dans la SBDD (*Structure-Based Drug Design*) en raison de sa capacité à prédire, avec un degré de précision substantiel, la conformation des ligands de petites molécules dans le site de liaison de la cible approprié. Suite au développement des premiers algorithmes Dans les années 1980, le docking moléculaire est devenu un outil essentiel dans la découverte de médicaments [93].

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*. 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 [88].

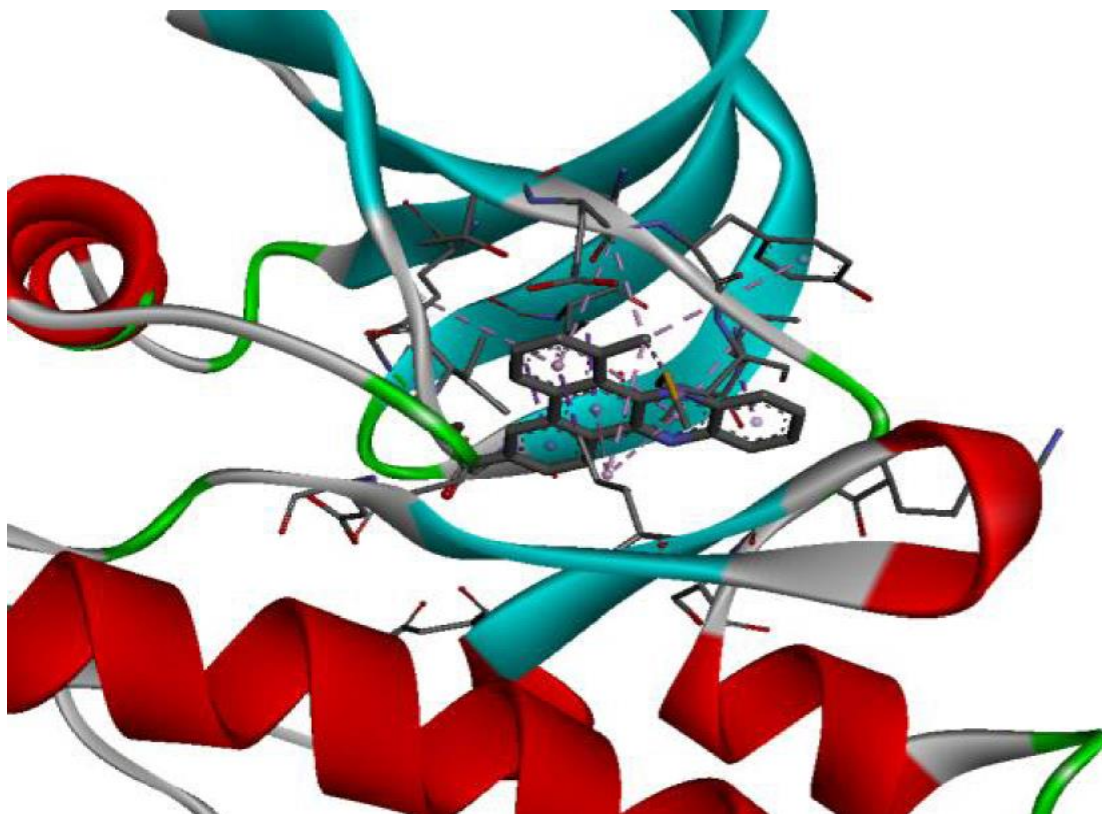


Figure III.1. Docking moléculaire protéine-ligand [94].

III. Principe de docking moléculaire

Le docking décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace tridimensionnel (3D). Deux aspects sont importants : la prédiction de l'affinité du complexe [ligand- protéine], et la prédiction de la position correcte du ligand dans le site actif de la protéine. La prédiction d'affinité est liée à différents ligands de la collection, certains conviennent mieux que d'autres. La prédiction de position est liée à la même molécule de ligand mais dans des orientations différentes [95, 96]. Un programme de docking doit être capable de générer les modes de liaison attendus pour des ligands dont la position adoptée au sein du site actif est connue dans un temps raisonnable [97]. Pour cela une simulation de docking s'accomplit en deux étapes complémentaires : le docking proprement dit et le scoring.

- **Le docking** : est une 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, entretenant 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 [98].

- **Le scoring** : est une 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 fonction de score. Celles-ci évaluent d'abord les différentes contributions énergétiques (et parfois entropiques) pour la stabilisation du complexes, permettant ainsi l'identification des modes d'interaction les plus probables. Ce score permet de retenir la meilleure conformation [98].

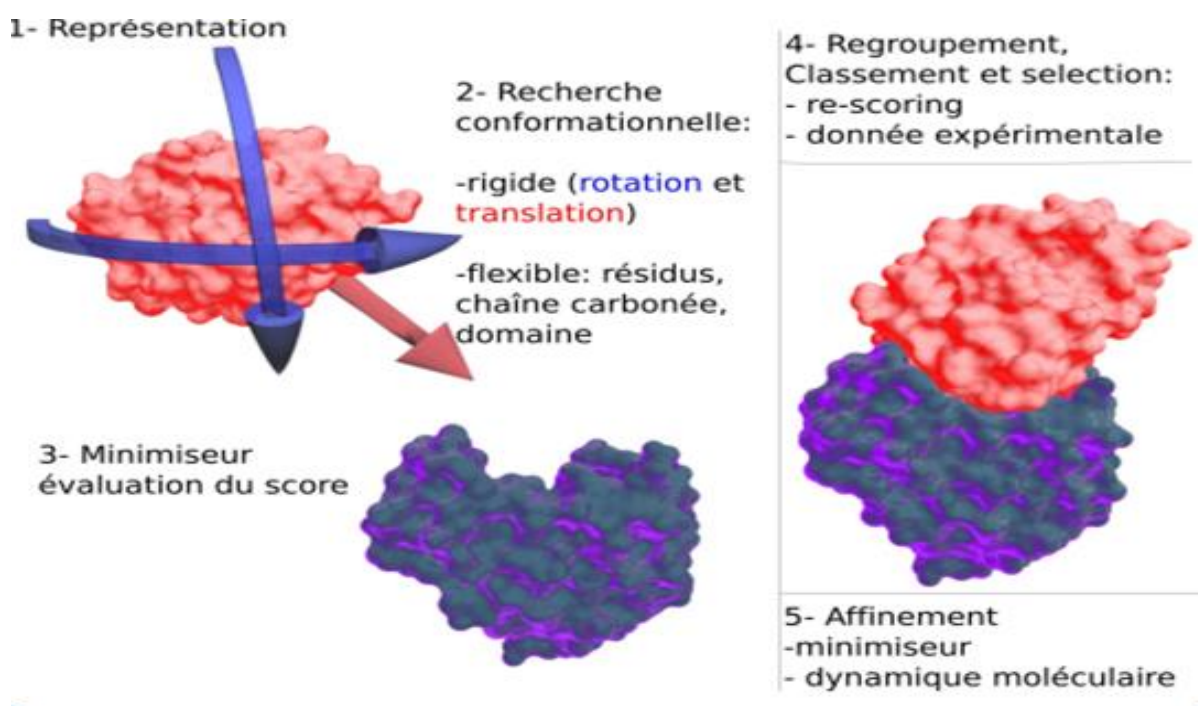


Figure III.2. Schéma du protocole général de docking [99].

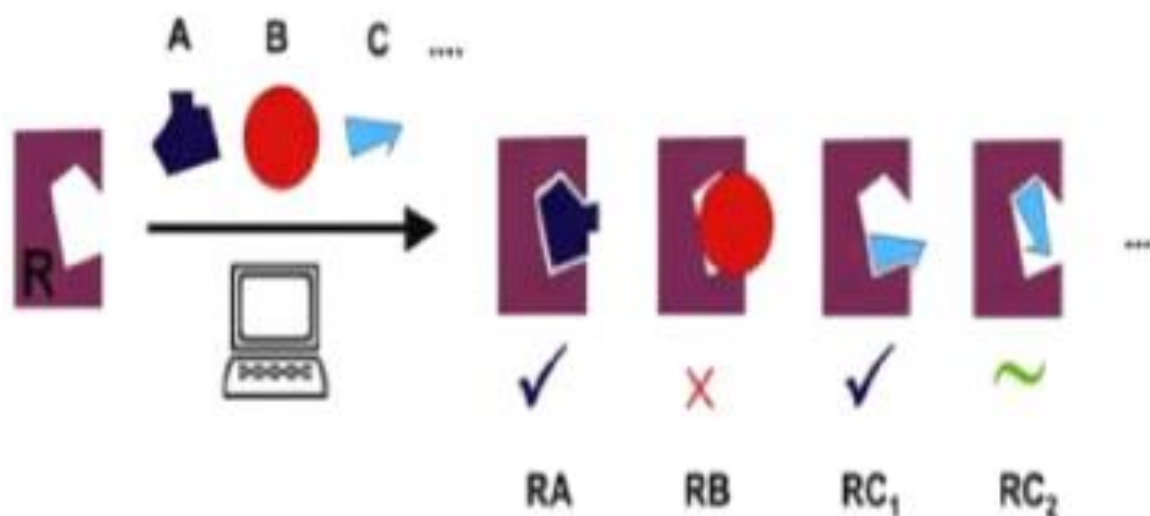


Figure III.3. Illustration de docking/scoring [100].

IV. Les outils du docking moléculaire

IV.1. Récepteur

En biologie, le récepteur est une protéine, généralement située à la surface des cellules, capable de fixer une molécule informative (médiators chimiques, neurotransmetteurs, hormones...) et de convertir ce message extracellulaire en signal intracellulaire, entraînant une réponse de la part de la cellule [101]. De ce fait, un récepteur est une protéine spécialisée capable de se lier spécifiquement et réversiblement à une autre molécule appelée ligand. Pour obtenir un récepteur, nous avons utilisé la structure 3D de la protéine disponible gratuitement dans la base de données PDB (*Protein Data Bank*).

IV.2. Ligand

Ligand est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal [102]. 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 [103].

IV.3. Programmes de docking moléculaire

Le docking moléculaire a pour objectif essentielle de prédire la conformation (position et orientation relative) 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 [102]. Au fil des années, on note l'apparition d'un nombre important de programmes de docking moléculaire avec une grande diversité des algorithmes de recherche et des fonctions de score. Plus de 30 logiciels de docking sont actuellement disponibles. Les trois les plus fréquemment cités présentent un pourcentage de 53 % des totales citations trouvées dans la littérature sont respectivement : AutoDock (27 %), GOLD (15 %) et FlexX (11 %) [104,105]. La figure III. 4 et le tableau III.1 ci-dessous présentent les principaux programmes d'amarrage moléculaire.

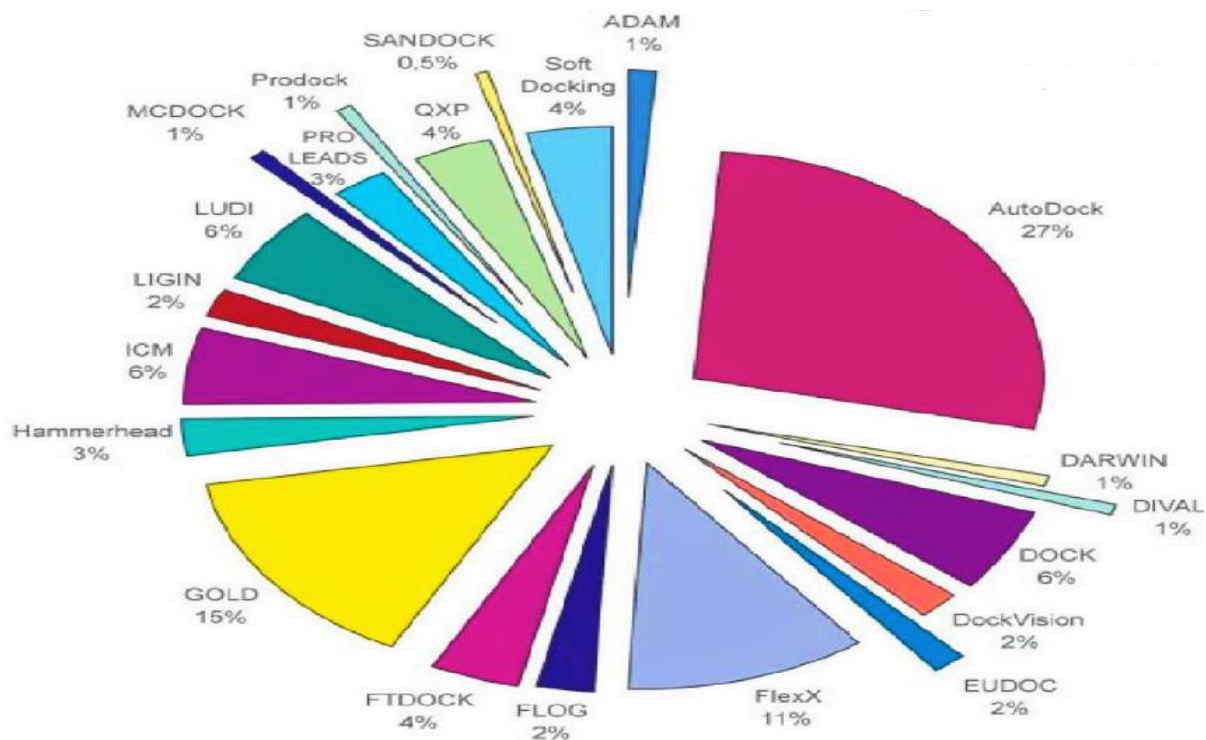


Figure III.4. Comparaison des programmes de docking [105].

Tableau III.1. Principaux programmes d'amarrage moléculaire [104].

Nom	Editeur	Site internet
AutoDock	Institut de recherche Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	Université de California-San Francisco	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrodinger	http://www.schrodinger.com/products/glide.html
Gold	Centre de données	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

IV.5. Le programme de docking Surfex-dock

Surflex-dock est un algorithme d'amarrage moléculaire flexible entièrement automatique qui combine la fonction de notation du système d'amarrage *Hammerhead* avec un moteur de recherche qui s'appuie sur une méthode de similarité moléculaire basée sur la surface comme moyen de générer rapidement des poses putatives appropriées pour les fragments moléculaires. Il se base sur la construction d'une pseudo-molécule (protomol) comme cible sur laquelle aligner le ligand par une construction incrémentale de ce dernier. Il s'agit de fragments de molécules placés dans le site actif de manière à occuper idéalement et de manière redondante celui-ci à partir de critères morphologiques. Il est important de préciser que cette pseudo-molécule peut être construite à partir du ligand dans le site actif, à condition de bénéficier d'une structure, ou bien à partir du récepteur sans aucun ligand [106,107]

- **Algorithme de docking (construction incrémentale) :** le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs ancres sont définies. Dans un premier lieu, un ou plusieurs fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site actif et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion (figure III.5). Cette méthode a été incorporée dans plusieurs programmes dont Dock, FlexX et Surfex-dock [108].

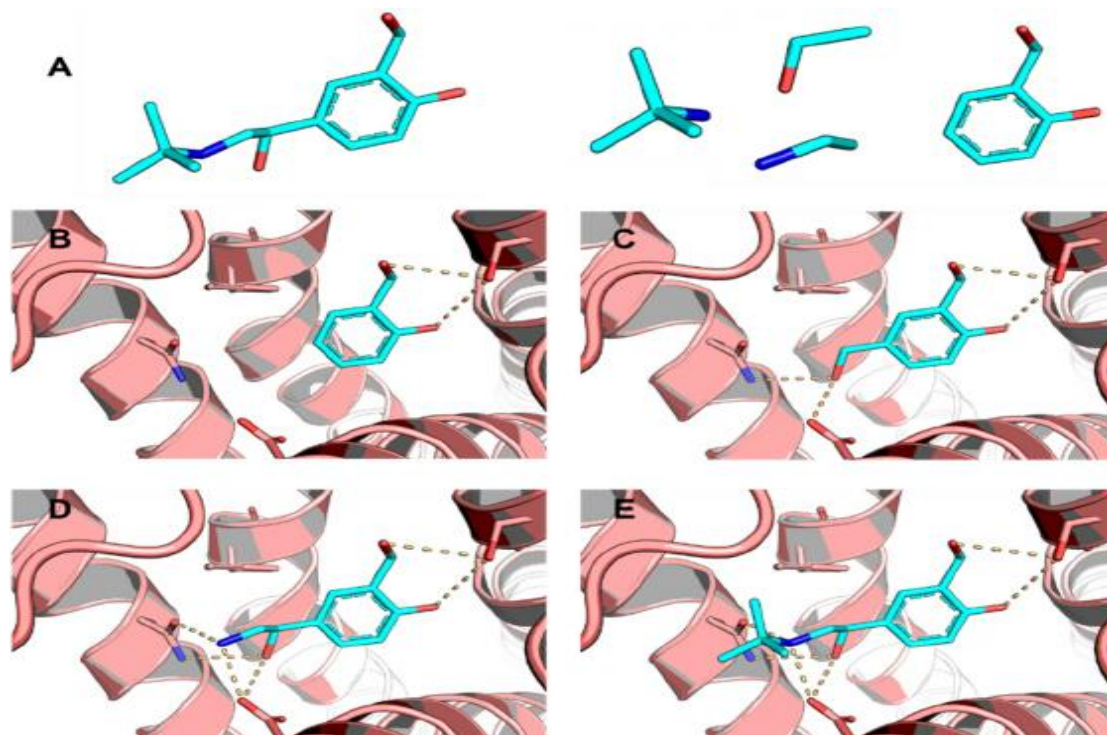


Figure III.5. La méthode de construction incrémentale [109]. (A) Le ligand est cassé en plusieurs fragments ; (B) Le fragment d'ancrage est ancré dans le site de liaison de la cible moléculaire ; (C) Le fragment suivant est amarré après le fragment d'ancrage ; (D et E) Les autres fragments sont ancrés séquentiellement pour construire le ligand entier dans sa conformation de liaison. Les résidus dans le site actif sont représentés en bâton. Les liaisons hydrogène sont indiquées par des lignes pointillées.

V. Les types de docking moléculaires

V.1. Le docking rigide

C'est le type de simulation le plus proche du modèle clé-serrure décrit préalablement. Les premières tentatives de docking étaient de ce genre. Ce type consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système protéine-ligand en considérant que chacune des deux molécules étant une entité rigide tout en conservant une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte.

Les algorithmes de docking rigide peuvent être très rapides, mais sont souvent peu utiles car la conformation bioactive du ligand est rarement connue a priori. Cependant, en combinaison avec un générateur de conformères, cette stratégie redevient intéressante car le

principal point négatif est théoriquement réglé. Cette synergie est employée par les logiciels de docking FRED et MS-DOCK [110 -113].

V.2. Le 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 se 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) [114].

V.3. Le docking semi-flexible

Les partenaires d'interaction sont partiellement déformables. En général, le récepteur est traité comme étant rigide et le ligand comme étant totalement flexible, se sont imposés, car elles permettent d'obtenir des résultats plus précis [115].

VI. Applications de docking moléculaire

L'amarrage moléculaire peut démontrer la faisabilité de toute réaction biochimique car il est effectué avant la partie expérimentale de toute enquête. Dans certains domaines, l'amarrage moléculaire a révolutionné les découvertes. En particulier, l'interaction entre les petites molécules (ligand) et la protéine cible (peut être une enzyme) peut prédire l'activation ou l'inhibition de l'enzyme. Ce type d'information peut fournir une matière première pour la conception rationnelle de médicaments. Certaines des principales applications de l'amarrage moléculaire sont décrites ci-dessous :

VI.1. Optimisation des leads

Le docking moléculaire permet de prédire une orientation optimisée du ligand sur sa cible. Il peut prédire différents modes de liaison du ligand dans le sillon de la molécule cible. Cela peut être utilisé pour développer des candidats-médicaments plus puissants, sélectifs et efficaces [116].

VI.2. Identifications des coups

L'amarrage en combinaison avec la fonction de notation peut être utilisé pour évaluer de grandes bases de données afin de découvrir un candidat-médicament puissant *in silico*, qui peut cibler la molécule d'intérêt [116].

VI.3. Interaction médicament-ADN

L'amarrage moléculaire joue un rôle de premier plan dans la prédiction initiale des propriétés de liaison du médicament à l'acide nucléique. Cette information établit la corrélation entre la structure moléculaire du médicament et sa cytotoxicité. Gardant cela à l'esprit, les chimistes médicaux s'efforcent constamment d'élucider le mécanisme anticancéreux sous-jacent des médicaments au niveau moléculaire en étudiant le mode d'interaction entre l'acide nucléique et les médicaments en présence de cuivre. Les chimistes médicaux font des observations *in silico* où leur principale découverte est de prédire si le composé/médicament interagit avec la protéine/l'ADN [116].

VII. Avantages de docking moléculaire

- Les techniques actuelles pour l'étude expérimentale des structures 3D des complexes (cristallographie, RMN, cryo-microscopie électronique, etc.) présentent de nombreuses limitations (taille, nature des protéines) et sont très coûteuses en temps et en prix. C'est pourquoi les techniques de docking ont été développées. Elles visent à prédire la structure 3D fonctionnelle d'un complexe protéique à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que les méthodes expérimentales *in vitro* [99].
- Le docking assisté par les techniques de RV (Réalité Virtuelle) multimodale présente une alternative pertinente pour améliorer l'activité du chercheur. Ces techniques permettent une interaction plus intuitive des structures protéiques 3D [99].
- L'amarrage moléculaire est une sorte de modélisation bioinformatique qui implique l'interaction de deux molécules ou plus pour donner l'adduit stable. En fonction des propriétés de liaison du ligand et de la cible, il prédit la structure tridimensionnelle de tout complexe. Le docking génère différents structures d'adduits possibles qui sont classées et regroupées à l'aide de la fonction de notation du logiciel. Les simulations d'amarrage prédisent un conformateur ancré optimisé sur la base de l'énergie totale du système [116].



CHAPITRE IV
MATERIEL ET
METHODES

I. Matériel

I.1. Micro-ordinateur

Dans la présente étude nous avons utilisé deux micro-ordinateurs, le premier ASUS ayant un processeur Intel (R) Atom, (TM) CPU N2600 et une mémoire vive de 1,00 Go, sous un système d'exploitation Windows 7 Professionnel. Le deuxième TOSHIBA ayant un processeur Intel(R) Core, (TM) i3-4005U CPU et une mémoire vive de 4.00Go, sous un système d'exploitation Windows 7 professionnel.

I.2. Banques de données

I.2.1. La *Protéine Data Bank* (PDB)

La banque de *Protein Data Bank* ou PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (3D) de macromolécules biologiques comme les protéines, essentiellement, et les acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Ces données expérimentales sont déposées dans la PDB par des biologistes et des biochimistes du monde entier et appartiennent au domaine public. Leur consultation est gratuite et peut se faire directement depuis le site web de la banque (<https://www.rcsb.org/>) [117]. 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 [118].



Figure IV.1. Site de la *Protéine Data Bank* (PDB) [119].

I.2.2. La chimiothèque PubChem

Est une base de données de chimie ouverte aux *National Institutes of Health* (NIH). "Ouvert" signifie que vous pouvez mettre vos données scientifiques dans la PubChem et que d'autres peuvent les utiliser [120]. Depuis son lancement en 2004, cette base de données est rapidement développée pour devenir une ressource d'information clé sur les produits chimiques qui sert les communautés scientifiques dans de nombreux domaines tels que la chimie informatique, la biologie chimique, la chimie médicinale et la découverte de médicaments [121]. Chaque composé de cette chimiothèque est stocké dans plusieurs formats de fichiers courants, notamment SMILES, mol2 et sdf. Parmi les informations disponibles dans la PubChem figurent : la référence de la molécule, la structure 2D et 3D et les propriétés physico-chimiques.



Figure IV.2. Page d'accueil de la base des données PubChem [122].

I.3. Programmes utilisés

Pour atteindre nos objectifs, nous avons besoin d'un programme de docking moléculaire, il s'agit de logiciel qui simule les interactions entre une protéine (cible enzymatique) et un ligand (substrat ou inhibiteur).

I.3.1. Le logiciel Surflex-dock

Surflex-dock (1.3, 2005) est un algorithme de docking rapide capable d'arrimer les ligands dans un environnement constitué d'acides aminés avec une bonne précision. Les paramètres standards de Surflex ont été utilisés par défaut dans cette étude [108].

Le docking est réalisé en 3 étapes [123] :

- Choix de la manière d'identifier le site actif et génération d'une pseudo-molécule (protomol) qui va servir de cible aux différents ligands ;
- Docking moléculaire d'un ou de plusieurs ligands ;
- La visualisation des résultats (Final-0).

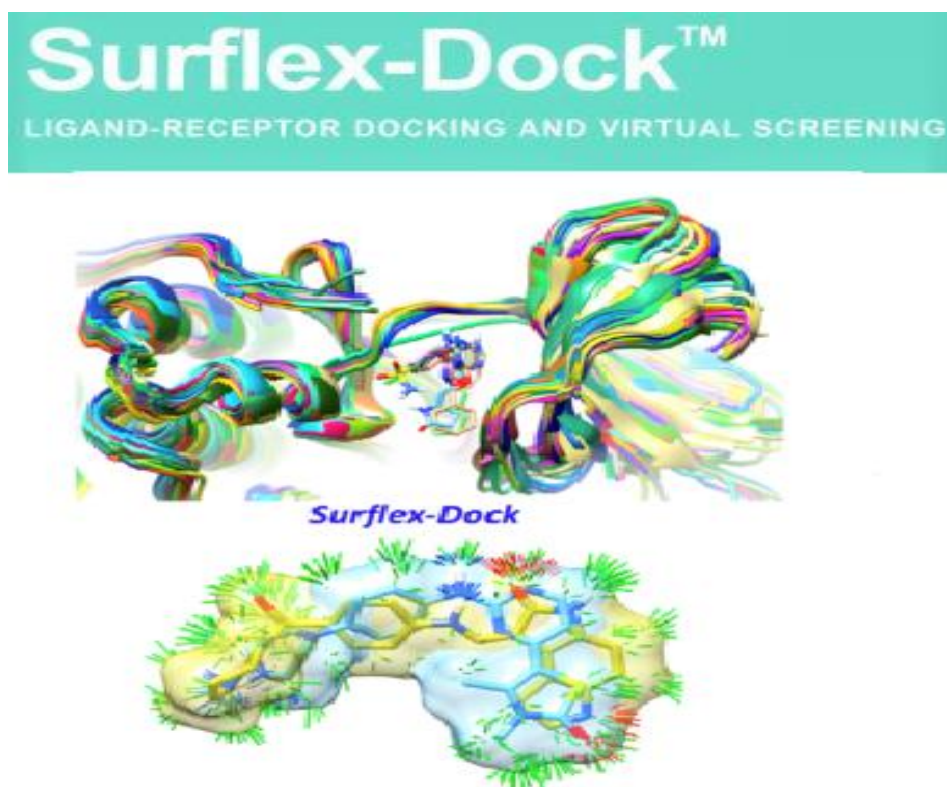


Figure IV.3. Programme Surflex-dock [124].

I.3.2. Open Babel

Open Babel (2.0.2, 1991) est une boîte à outils chimique conçue pour parler les nombreux langages des données chimiques. Il s'agit d'un projet collaboratif ouvert 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 [125]. Les formats de fichier que « *Open Babel* » prend en charge

comprennent : PDB, MOL, MOL2, SDF, XYZ, PC, SMI...etc. Ce dernier est obtenu à partir de cette adresse électronique <http://openbabel.org>.

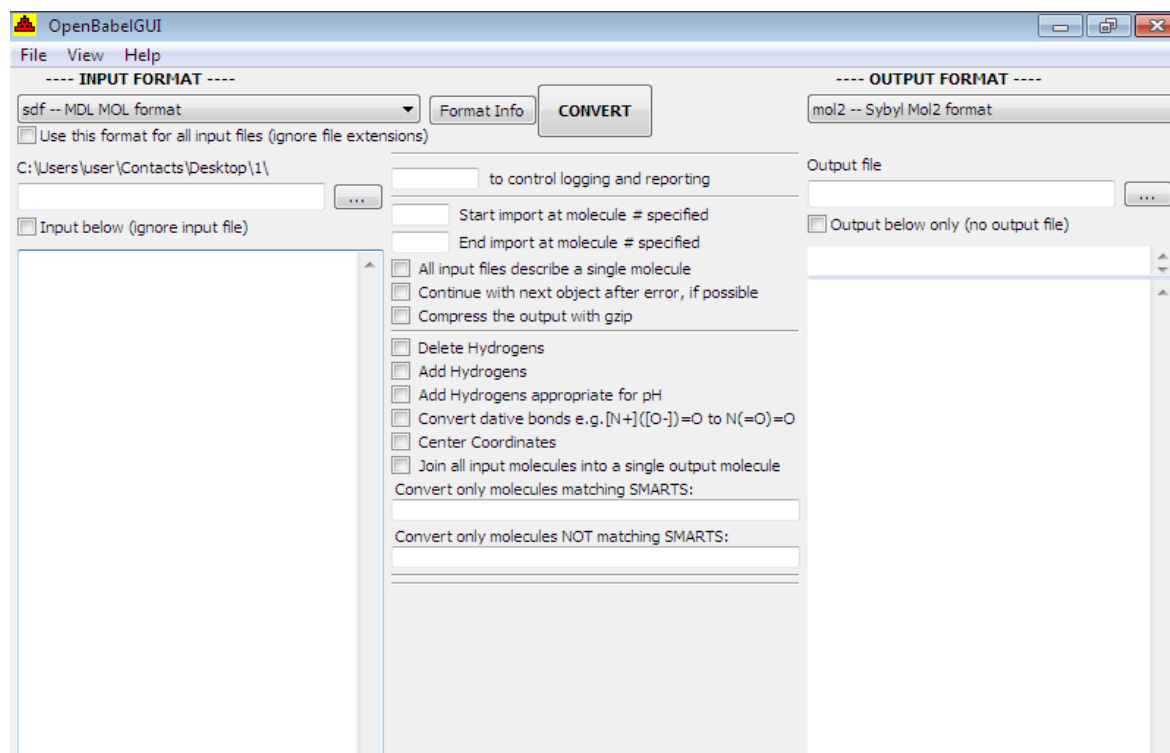


Figure IV.4. Capture d'écran de programme *OpenBabel*.

I.3.3. *Discovery Studio Visualizer*

Discovery Studio Visualizer est un visualiseur gratuit qui peut être utilisé pour ouvrir des données générées par d'autres logiciels, et permet un affichage 3D des complexes protéine-ligand. Il lit plusieurs formats de fichier dont le format .pdb et .mol2 sont les formats le plus courant pour visualiser la structure des protéines ou des petites molécules. *Discovery Studio Visualizer* propose plusieurs fonctions telles que : la présentation des liaisons chimiques (liaison hydrogène, interaction hydrophobe...etc.), la mesure de distances, l'annotation des acides aminés et ligand, créations de surfaces, choix de couleur (selon les atomes, les structures...), la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les différentes molécules. Donc est un logiciel complet d'analyse et de modélisation moléculaire structures, séquences et autres données pertinentes pour les chercheurs en sciences de la vie. Le produit comprend des fonctionnalités d'affichage et de modification des données ainsi que des outils permettant d'effectuer une analyse de base des données. Ce programme fonctionne sur Windows et Linux, son adresse électronique est <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>[126].

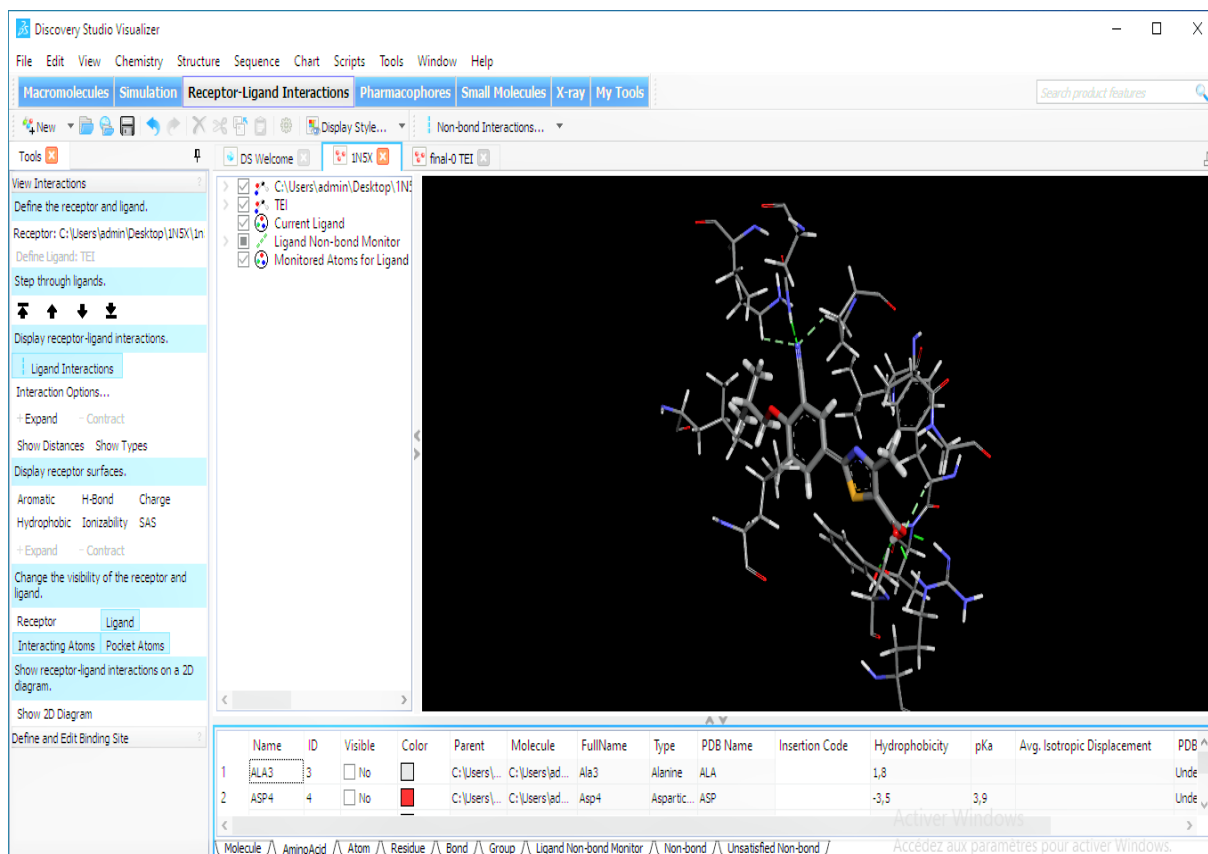


Figure IV.5. Capture d'écran de logiciel *Discovery Studio Visualiser*.

II. Méthodes

II.1. Réalisation du docking moléculaire par Surflex-dock

II.1.1. Génération de Protomol

Un protomol (fichier mol.2) qui sert de cible sur laquelle des ligands putatifs ou des fragments de ligand sont alignés (figure IV.6). Le protomol est constitué de fragments moléculaires CH₄ (hydrogènes non représentés), N-H et C=O. Le protomol a été généré uniquement sur la base de la structure des protéines. L'emplacement du protomol a été indiqué en marquant les résidus de la protéine à proximité du ligand natif [127].

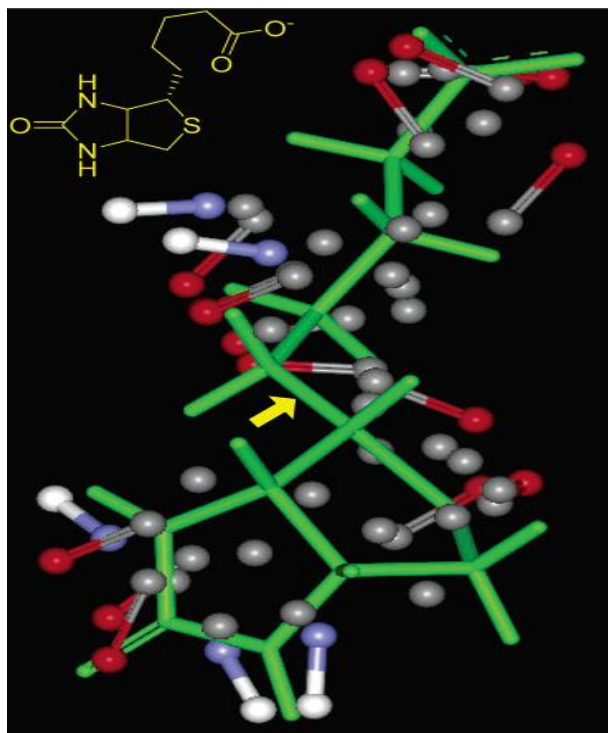


Figure IV.6. Exemple de génération de protocole : Protomol pour la streptavidine comparé à la pose native de la biotine (vert) [127].

Pour la création de protomol nous avons utilisé la commande :

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

II.1.2. Docking d'un composé

L'arrimage moléculaire exige un ligand, un protomol et une protéine. 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 (figure VI.7).

Pour le docking d'une seule molécule nous avons utilisé la commande :

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

```

.....
Times (total 3): search 0 align1 2 merge+chai
Nconfs (final 73): 3 24 2424 2074
[ret_conf -1.12] [ret_conf 1.72] [ret_conf -1
1] [ret_conf 0.70] [ret_conf -0.23] [ret_conf
.99] [ret_conf 4.59] [ret_conf -0.42] [ret_co
-1.54] [ret_conf 0.72] [ret_conf 1.66] [ret_c
nf 2.52] [ret_conf 2.15] [ret_conf -7.67] [re
_conf -1.41] [ret_conf 2.81] [ret_conf -13.00
[ret_conf -3.40] [ret_conf -2.87] [ret_conf 2
9] [ret_conf -0.20] [ret_conf -0.11] [ret_con
0.37] [ret_conf -2.77] [ret_conf -0.28] [ret_
f 3.37] [ret_conf 1.69] [ret_conf -4.54] [ret
f 1.93] [ret_conf 0.64] [ret_conf -0.04] [cra
1 1 1
final-1: 4.87 <crash -0.84 (self -0.03)>
final-2: 4.59 <crash -0.90 (self -0.02)>
final-3: 3.83 <crash -1.67 (self -0.05)>
final-4: 3.83 <crash -1.52 (self -0.02)>
final-5: 3.65 <crash -2.94 (self -0.02)>
final-6: 3.59 <crash -0.82 (self -0.04)>
final-7: 3.53 <crash -0.87 (self -0.05)>
final-8: 3.47 <crash -0.81 (self -0.02)>
final-9: 3.34 <crash -0.63 (self -0.02)>

```

Figure IV.7. Résultat de docking avec Surfex-dock.

Chaque fichier possède trois scores : le premier représente l'affinité ; le second correspond au degré de pénétration impropre du ligand dans la protéine appelé «crash score», plus ce score est proche de 0 plus l'interaction est favorable et le troisième ou «polar score» correspond au niveau de contribution des interactions polaires. Surfex-dock donne, par défaut, les dix meilleures affinités en M^{-1} [108].

II.1.3. Calcul du RMSD

La manière dont les ligands sont arrimés dans le site actif peut être décrite numériquement par le RMSD entre le ligand téléchargé à partir de la PDB (co-cristallisé) et la molécule dockée par le logiciel Surfex-dock (figure IV.8). En utilisant la commande ci-dessous pour calculer le RMSD :

```
Surfex-dock rms final-0.mol2 ligand.mol2
```

```

9] [ret_conf -0.20] [ret_conf -0.11] [ret_conf 1.32] [ret_conf 3.65]
0.37] [ret_conf -2.77] [ret_conf -0.28] [ret_conf 2.63] [ret_conf 0.
f 3.37] [ret_conf 1.69] [ret_conf -4.54] [ret_conf -1.65] [ret_conf
conf 1.93] [ret_conf 0.64] final-0: 6.04 <crash -0.93 <self -0.05>>
final-1: 4.87 <crash -0.84 <self -0.03>>
final-2: 4.59 <crash -0.90 <self -0.02>>
final-3: 3.83 <crash -1.67 <self -0.05>>
final-4: 3.83 <crash -1.52 <self -0.02>>
final-5: 3.65 <crash -2.94 <self -0.02>>
final-6: 3.59 <crash -0.82 <self -0.04>>
final-7: 3.53 <crash -0.87 <self -0.05>>
final-8: 3.47 <crash -0.81 <self -0.02>>
final-9: 3.34 <crash -0.63 <self -0.02>>

C:\Users\admin\Desktop\1N5X>surfex-dock rms final-0.mol2 TEI.mol2
Surflex License: C:\sfdocklicense
The Surflex software is the property of Biopharmics LLC.
Surflex licensed to SFDock0036 <Gerhard Vergoten, Univ. Lille> for
only.
Rotatable bonds: 44
Actual rmsd: 0.963
Heavy atom rmsd: 0.750
Similarity: 0.860

```

Figure IV.8. RMSD calculé par le logiciel Surfex-dock.

III. Evaluation des programmes de docking

Pour vérifier si le protocole de docking que nous avons utilisé est correct, nous avons jugé utile d'évaluer la performance du programme Surfex-dock par deux tests différents :

- RMSD (*Root Mean Square Deviation*).
- Analyse visuelle.

III.1. RMSD (*Root Mean Square Deviation*)

Ce test consiste à évaluer la capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Le mieux possible signifie que la valeur de déviation quadratique moyenne entre la pose du ligand calculée par le logiciel et la conformation dans le complexe expérimental est la plus petite possible [128]. Le ratio admis est une différence maximum de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate [129]. 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 cristallisés [108].

Un programme de docking moléculaire a été testé, Surfex-dock. Ce test a été réalisé sur 154 complexes protéine-ligand disponibles au niveau de la PDB et leur RMSD déterminés. La prédiction est acceptable si la valeur du RMSD ne dépasse pas 2 Å [129].

III.2. Analyse visuelle

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape essentielle pour juger la performance du programme Surflex-dock. 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.

IV. Docking de cible enzymatique XOR

IV.1. Choix d'une structure cristallographique de la 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. Les deux molécules du complexe ont été séparées dans des fichiers différents. Le programme Surflex-dock exige le format .mol2 pour appliquer le docking. Pour cette raison, nous avons utilisé le programme Open Babel pour la conversion de notre enzyme et les différents inhibiteurs étudiés au format .mol2 et aussi pour ajouter des atomes d'hydrogène à la structure de la protéine et du ligand. Les caractéristiques de cette enzyme sont regroupées dans le tableau IV.1 ci-dessous.

Tableau IV.1. Principales caractéristiques de complexe utilisé

Code	Résolution (Å)	Facteur R	Classification	Nombre de chaîne	Nombre des acides aminés par chaîne	Nombre d'atomes par chaîne
1N5X	2,80	0.244	EC : 1.1.1.204	2 (A, B)	1332	10024

IV.2. Préparation des inhibiteurs

A partir de la chimiothèque PubChem nous avons téléchargé 193 molécules similaires de la TEI. Ces molécules sont téléchargées sous le format .sdf et puis convertis au format .mol2 par le programme Open Babel.

IV.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.

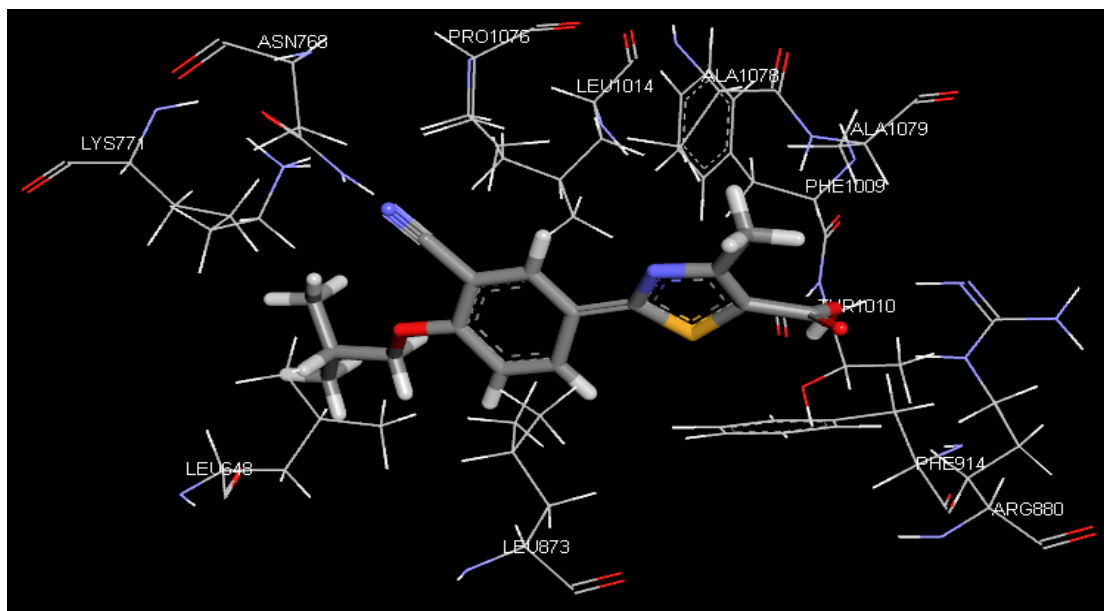


Figure IV.9. Visualisation des interactions réalisées entre le meilleur inhibiteur et les résidus du site actif de la XOR obtenu par *discovery studio visualizer*.

V. Propriétés physico-chimiques

V.1. La règle de *Lipinski*

La règle de cinq de *Lipinski* est une règle empirique qui décrit la pharmacobilité d'une molécule déterminée [130]. Cette règle décrit un ensemble de critères, permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D) [131]. L'efficacité de ces composés actifs administrés par voie orale sera influencée par les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME). Des caractéristiques communes influençant la perméabilité d'un composé à travers les barrières physiologiques ont été identifiées. En 1997, *Lipinski* et ses collègues ont développé quatre critères de règle de 5. Ces critères sont [132] :

- Le poids moléculaires du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (da).
- Le LogP doit être ≤ 5 ;
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 5 ;

- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être ≤ 10 ;

Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins deux des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité [131].

V.2. La règle de *Veber*

De plus, *Veber* a introduit deux critères supplémentaires à ce qui est aujourd'hui communément appelé "la règle des 5". D'après l'étude de 1100 composés candidats médicaments chez GlaxoSmithKline, la surface polaire (PSA, *polar surface area*) du composé doit être inférieure à 140 \AA^2 et le nombre de liaisons de rotation (*rotatable bonds* en anglais) doit être inférieur à 10 pour une bonne biodisponibilité par voie orale chez le rat [132].

La surface polaire est représentée par la somme des surfaces des atomes polaires de la molécule (calcul basé sur la topologie de la molécule ou tPSA) et permet de prédire l'absorption intestinale et le passage de la barrière hématoencéphalique. Ces critères peuvent être adaptés à la cible visée par la molécule. En effet, alors que l'absorption intestinale devient difficile pour un composé de surface polaire supérieure à 140 \AA^2 , 60 \AA^2 est le seuil maximal pour le passage de la barrière hématoencéphalique [133].



CHAPITRE V
RESULTATS ET
DISCUSSIONS

I. 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-dock utilisé. Pour cela, nous avons fait appel au test de RMSD et une analyse visuelle.

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

Le test de fiabilité du programme Surflex-dock par le RMSD a été réalisé sur 154 complexes protéine-ligand tirés de façon aléatoire de la PDB. Une prédiction d'un mode de liaison est considérée réussie si le RMSD est au-dessous d'une certaine valeur (généralement 2,0 Å) [134-136]. Les codes PDB des complexes et leurs inhibiteurs ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus avec Surflex-dock sont mentionnés dans le tableau V.1 ci-dessous.

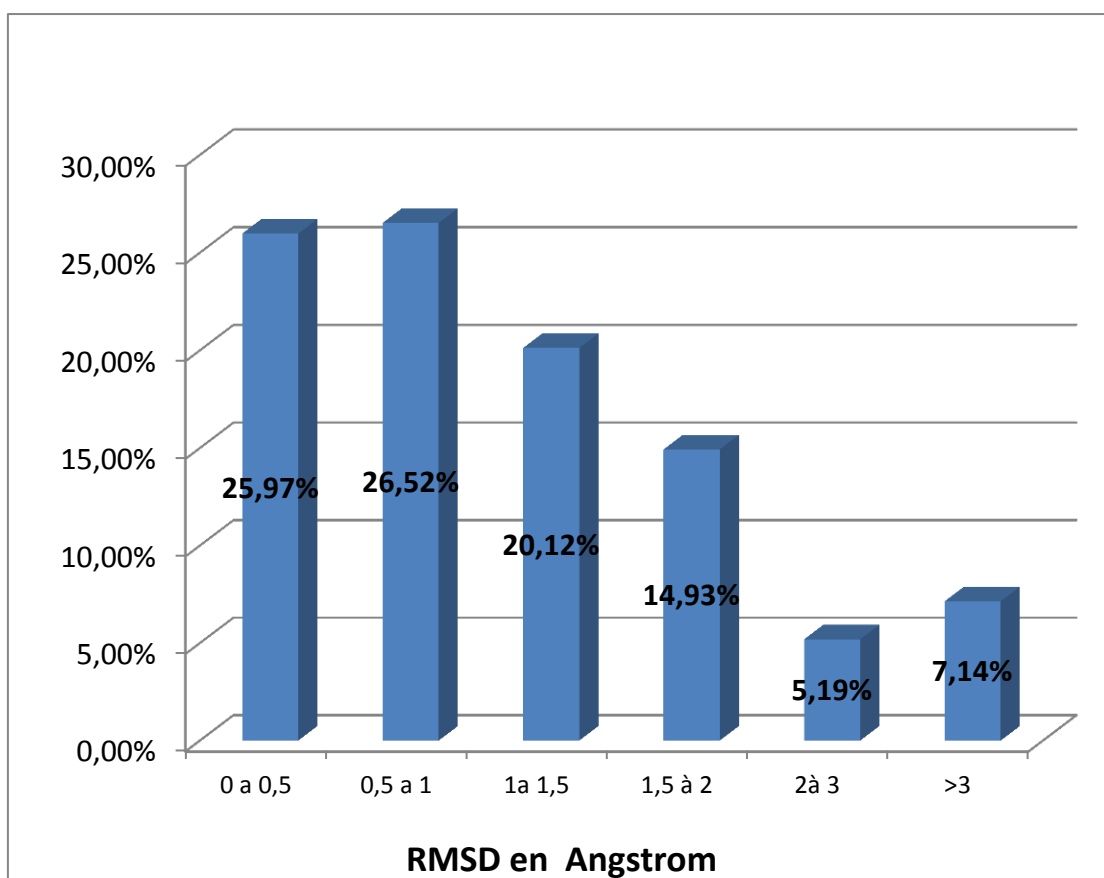
Tableau V.1. Liste de 154 complexes utilisés pour calculer le RMSD.

Code PDB	Ligand	RMSD (Å)	Code PDB	Ligand	RMSD (Å)
1A4G	ZMR	0,36	2HPT	BES	1,13
1BSJ	MLN	1,73	2HT7	G39	1,71
1EUS	DAN	0,59	2HTQ	ZMR	1,05
1C27	NLP	0,4	2HTV	NAG	0,39
1CP6	BUB	2,72	3MH3	BOG	1,25
1DTT	FTC	1,52	2OKL	BB2	1,54
1IX1	BB2	1,62	2OS3	BB2	0,60
1KQ0	MED	3,54	2P98	YE7	0,89
1KJ1	MAN	1,39	2PRQ	TRS	0,66
1FT7	PLU	2,49	2Q92	B23	0,07
1F8B	DAN	1,57	2Q93	B21	2,53
1G2A	BB2	0,45	2Q94	A04	0,05
1C1C	612	0,93	2Q95	A05	2,22
1A4Q	DPC	0,44	2Q96	A18	3,03
1AQN	IPA	1,00	2QWB	SIA	1,59
1B9S	FDI	4,71	2QT9	524	1,39
1B9T	RAI	0,80	2QWD	4AM	0,89
1B9V	RA2	1,38	2QWE	ZMR	0,48
1BS4	2PE	8,81	2QWG	G28	0,74
1BSK	MLN	0,40	2QWK	G39	0,70
1BSZ	2PE	1,13	2RF2	MRX	0,50
1C6X	3IN	2,11	2RIP	34Q	0,59
1C21	MET	0,30	2RGU	356	1,71
1C23	MPH	4,47	2RKI	TT1	1,41
1C27	NLP	4,38	2SIM	DAN	1,44

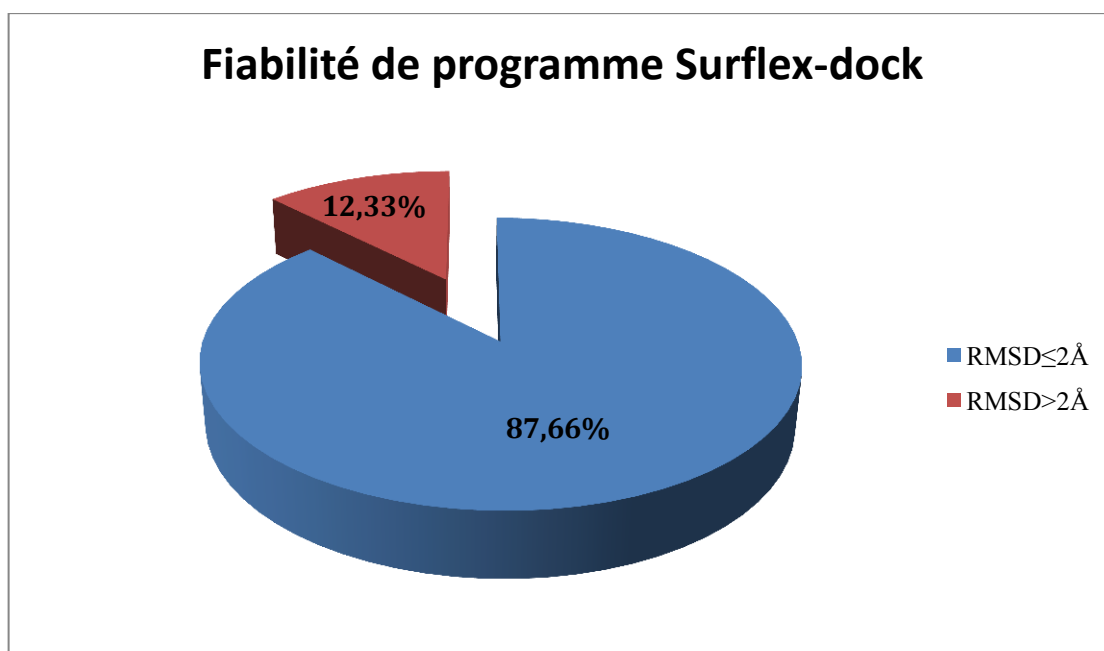
1E8V	DAN	4,64	2SLI	SKD	0,78
1EET	BFU	0,35	2VG6	NNB	0,16
1EP4	S11	0,59	2VG7	NNI	0,98
1EUU	GAL	3,95	2VVZ	DAN	1,34
1LAM	MRD	3,22	2VW1	DAN	0,55
1C22	MF3	0,80	2WAJ	SNB	1,75
1QXW	M1C	0,88	2WIH	P48	0,94
1WKM	MET	0,23	2WON	ZZE	0,48
1XNZ	FCD	0,08	2ZD1	T27	1,10
1YVM	TMG	0,05	2ZOQ	5ID	1,02
2BB7	QMS	3,01	2ZE2	T27	1,92
2EVC	FC3	0,08	2AH1	TRQ	0,86
2EVM	FC2	0,06	3B7E	ZMR	1,40
2EVO	CTO	1,94	3B7R	BIR	1,63
2GG2	U12	3,97	3B7U	KEL	1,24
2GG3	U13	3,77	3C6U	M22	0,75
1FKO	EFZ	0,61	3C43	315	1,34
3FFI	3OB	1,37	3CMD	MLI	0,13
2BHD	FLC	0,91	3CKZ	ZMR	0,34
2GGO	U11	1,64	3O4L	MES	0,37
4PVB	2WW	2,20	3D27	W29	0,72
1HNI	AAA	1,17	3DM2	GWE	0,36
1HNV	TBO	0,95	3DLG	GWE	0,72
1ICJ	2PE	1,22	3PTB	BEN	1,18
1ING	ST5	1,19	3TAU	MSE	0,82
1IVD	ST1	1,78	3PKA	Y02	1,73
1FK9	EFZ	0,34	3ONC	LDT	7,12
3ADU	MYI	2,71	3OBJ	BMU	0,99
2AI7	SB7	1,64	3PGH	FLP	1,51
2AIE	SB9	1,00	3O1L	GOL	0,75
2B3L	GOL	1,92	3NNU	EDB	0,46
2bb7	QMS	0,89	2P9A	YE6	0,29
2CCV	A2G	0,89	3RR3	FLR	1,22
2BE2	R22	0,99	3MBL	LSG	0,38
2BAN	357	1,24	3M2W	L8I	0,11
2BER	SLB	1,54	3NEW	3NE	0,47
2BUB	FPB	1,08	3LO3	4OH	0,91
2CGZ	A2G	1,13	3LQY	GOL	0,61
2DQM	BES	1,23	1XRY	BES	1,24
2EK9	BES	1,44	1XOE	ABX	0,97
2EVM	FC2	2,84	2NQ6	HM4	1,98
2BHC	FLC	0,98	1R58	AO5	0,47
2EW5	Y12	1,17	1S17	GNR	1,35
2EW6	Y13	2,11	1S1W	UC1	0,75
2GG5	U19	0,26	1TKF	DTR	1,62
2GG7	U14	0,16	1TKT	H12	1,97

2GG8	U15	1,66	1TXR	BES	1,08
2FJP	S14	0,34	1VCJ	IBA	0,45
2GBI	XIH	0,92	1AF4	DIO	0,48
2GG9	U16	1,27	2QWF	G20	0,65
2GGB	U17	1,27	1G9H	TRS	0,41
2GU6	NLP	0,51	1UD2	GOL	0,76

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



Graphe V.1. Résultat en % obtenu par Surflex-dock à des différents intervalles de RMSD.



Graphe V.2. Résultats en % obtenus par Surfex à deux intervalles de RMSD (Å).

D'après le tableau V.1, la meilleure prédiction du positionnement du ligand de complexe cristallographique et celles de ligand amarré par Surfex-dock est représentée par un RMSD égale à 0,05 Å. Par contre le mauvais RMSD est représenté par une valeur de 8,81 Å. De plus, la majorité des meilleurs résultats se situent dans l'intervalle] 0-0.5] Å avec un pourcentage de 25,97% et l'intervalle] 0,5-1] Å avec un pourcentage de 26,52 %.

Nous remarquons d'après les résultats de graphe V.2 que le logiciel Surfex-dock reproduit bien les données expérimentales. En effet, 87,66% des valeurs du RMSD sont inférieures ou égale à 2 Å et seulement 12,33% des résultats sont supérieurs à 2 Å.

Notre résultat confirme ceux obtenus par Boucherit et *al*, (2014), où la fiabilité de programme Surfex-dock et un autre logiciel (GOLD) a été étudié (comparative entre la performance de deux logiciels). GOLD reproduit bien les données expérimentales, et à un degré moindre Surfex-dock. 79.16 % des valeurs de RMSD sont inférieures ou égale à 2 Å pour le premier et 66 % pour le deuxième [136]. Ce résultat est comparable aussi avec les travaux de Hioual et *al* (2014), elle est testée deux programmes : Flex X et GOLD et obtenues 64,05% des valeurs de RMSD inférieurs à 2Å pour GOLD et 55,56% pour Flex X [137].

I.2. Analyse visuelle

En plus de test RMSD, il est nécessaire de faire une analyse visuelle de ces résultats. C'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 [140].

La comparaison de la conformation expérimentale qu'on retrouve dans la PDB des trois complexes (colorées en vert) : le 3CKZ (le meilleur), et le 2GG3 (l'intermédiaire), 1BS4 (le mauvais) avec les conformations calculées par le programme Surflex-dock (colorées en rouge), est présentée dans le tableau V.2 et les figures V.1, 2 et 3 suivants.

Tableau V.2. Valeurs de RMSD des trois complexes étudiés.

Code du complexe	Code du ligand	RMSD (Å)
3CKZ	ZMR	0,34
2Q93	B21	2,53
1BS4	2PE	8,81

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

- ❖ Dans le cas de ligand ZMR, avec un RMSD de 0,34 Å ; la superposition est parfaite. Elle présente une conformation spatiale très proche voir même superposable à celle déterminée expérimentalement.
- ❖ Dans le cas de ligand B21, avec un RMSD de 2,53 Å ; la superposition est moindre que dans le premier cas.
- ❖ Dans le cas de ligand 2PE, avec un RMSD de 8,81 Å ; la superposition des deux inhibiteurs est mauvaise c'est-à-dire le ligand docké est éloigné de ligand déterminé expérimentalement.

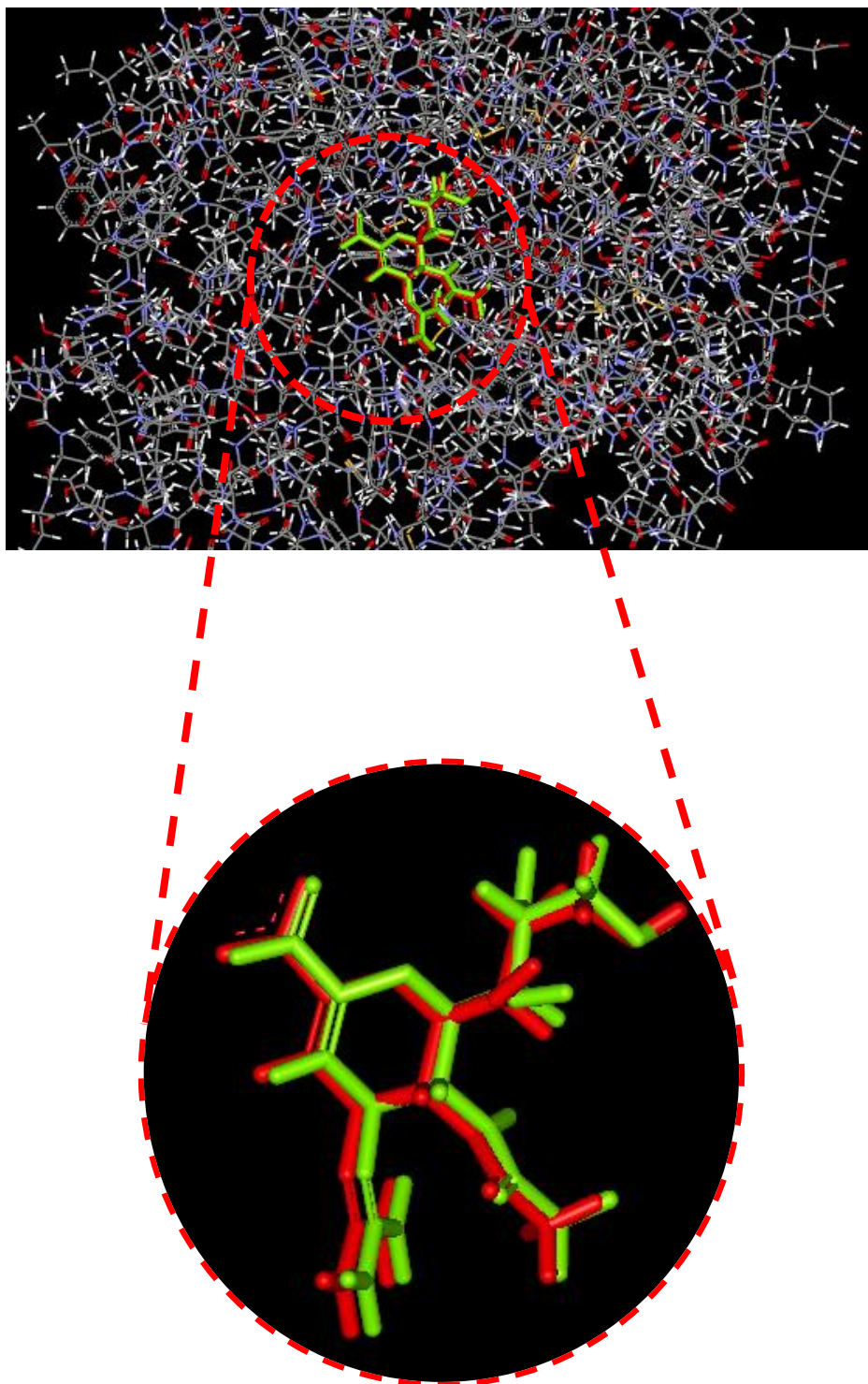


Figure V.1. Superposition du ligand ZMR du complexe 3CKZ simulé par Surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).

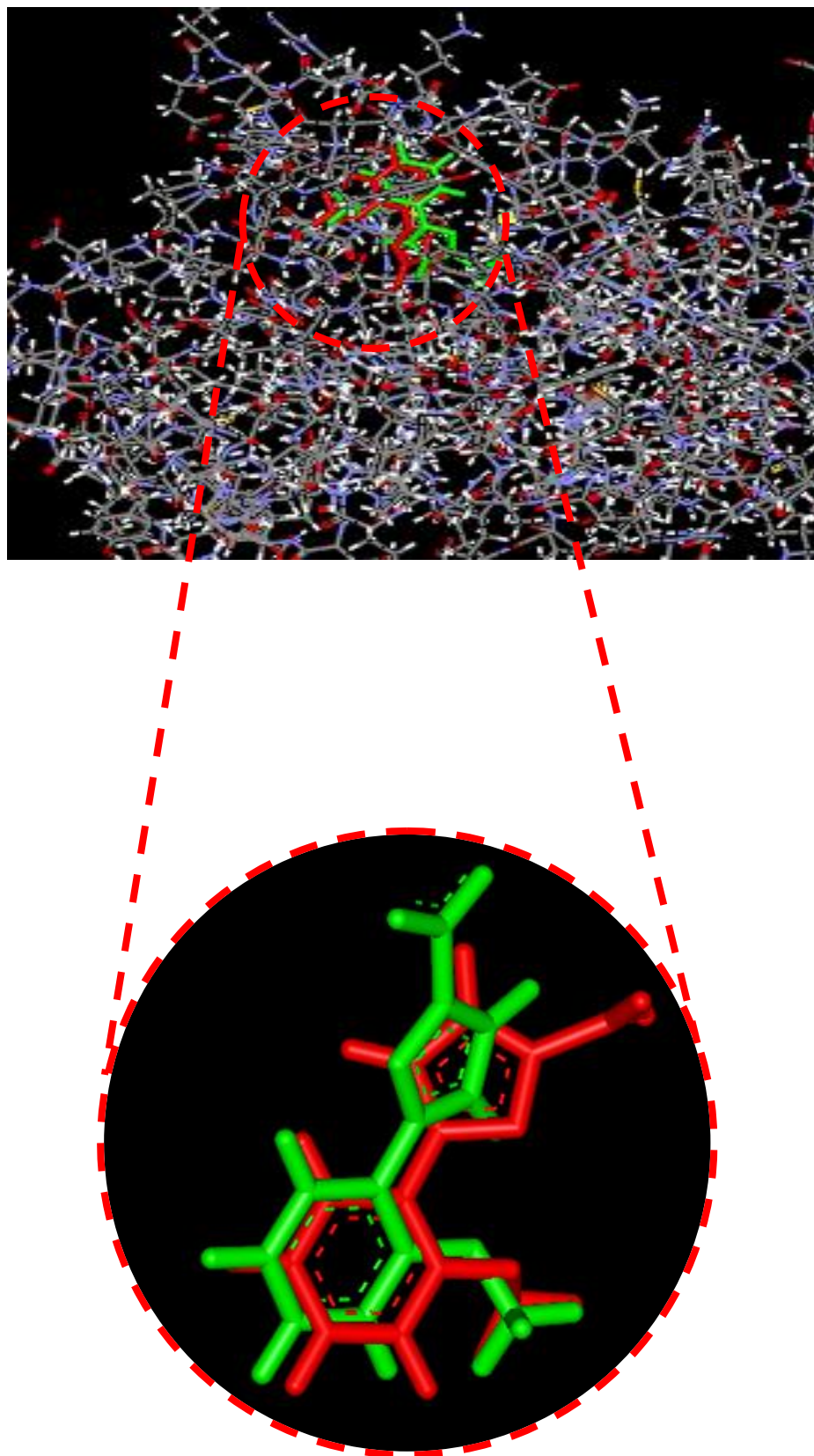


Figure V.2. Superposition du ligand B21 du complexe 2Q93 simulé par Surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).

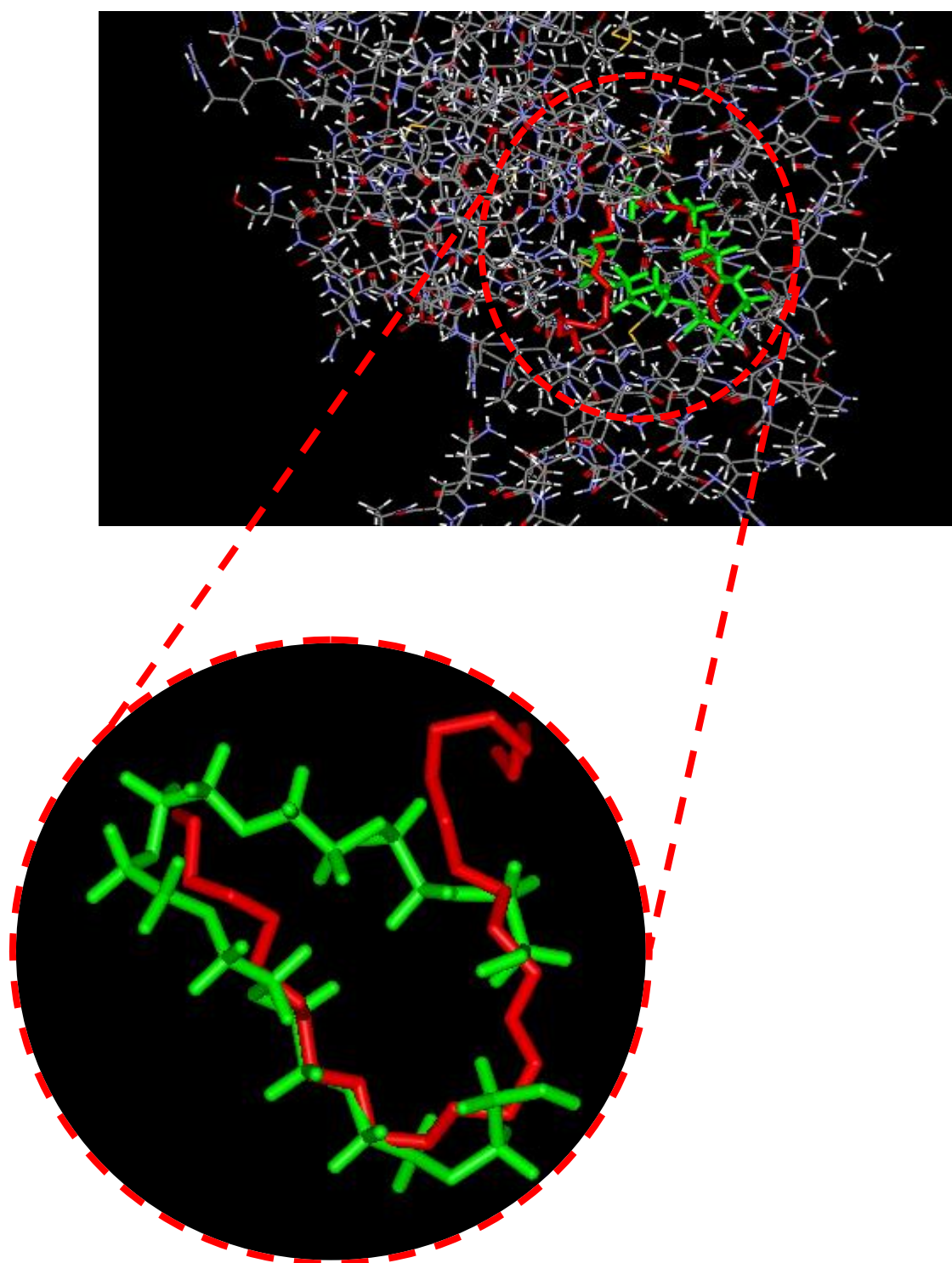


Figure V.3. Superposition du ligand 2PE du complexe 1BS4 simulé par Surfex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).

D'après les différents tests utilisés dans cette étude pour évaluer la qualité de programme Surflex-dock, nous permet de conclure que surflex-dock est un logiciel hautement performant. Il peut donc être utilisé en toute confiance pour réaliser le docking moléculaire et étudier 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

La réaction spécifique qu'une enzyme contrôle dépend d'une zone de sa structure tertiaire. Cette zone est appelée le site actif et les activités avec d'autres molécules se produisent en elle. Le site actif apparaît alors sous la forme d'une petite cavité de la protéine enzyme. Cette cavité est définie par des replis de la chaîne polypeptidique de l'enzyme qui rapprochent des acides aminés souvent éloignés le long de la séquence d'acides aminés. Ce repli présente sur la face interne de la cavité (souvent à dominante hydrophobe) des radicaux latéraux d'acides aminés (OH, NH ou NH₂, protons échangeables) dans une disposition caractéristique. Les atomes ou radicaux du substrat interagissent avec les atomes et radicaux du site actif par le biais de liaisons faibles en énergie, liaisons hydrogène, de Van der Waals, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes, etc., dont l'ensemble va définir une constante d'association [141, 142].

II.2. 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. Selon le logiciel *Discovery studio visualizer* les acides aminés du site actif sont :

Leu 1014, Phe 1076, Ala1078, Ala1079, Leu 648, Asn 768, Lys 771, Leu 873, Arg 880, Phe 914, Phe 1009, Thr 1010.

II.3. Analyse visuelle des interactions XOR-TEI

Notre démarche consiste d'abord d'étudier le mécanisme d'inhibition mis en place par l'inhibiteur 2-(3-cyno-4-isobutoxy-phenyl)-4-methyl-5-thiazole-carboxylic acid ou TEI tiré de la PDB contre notre cible enzymatique XOR extraite du complexe 1N5X. Cet inhibiteur donne une affinité égale à 6.04 M^{-1} calculé par le logiciel Surflex-dock. L'analyse visuelle des

interactions entre cet inhibiteur et l'enzyme XOR est représentée dans la figure V.4 ci-dessous.

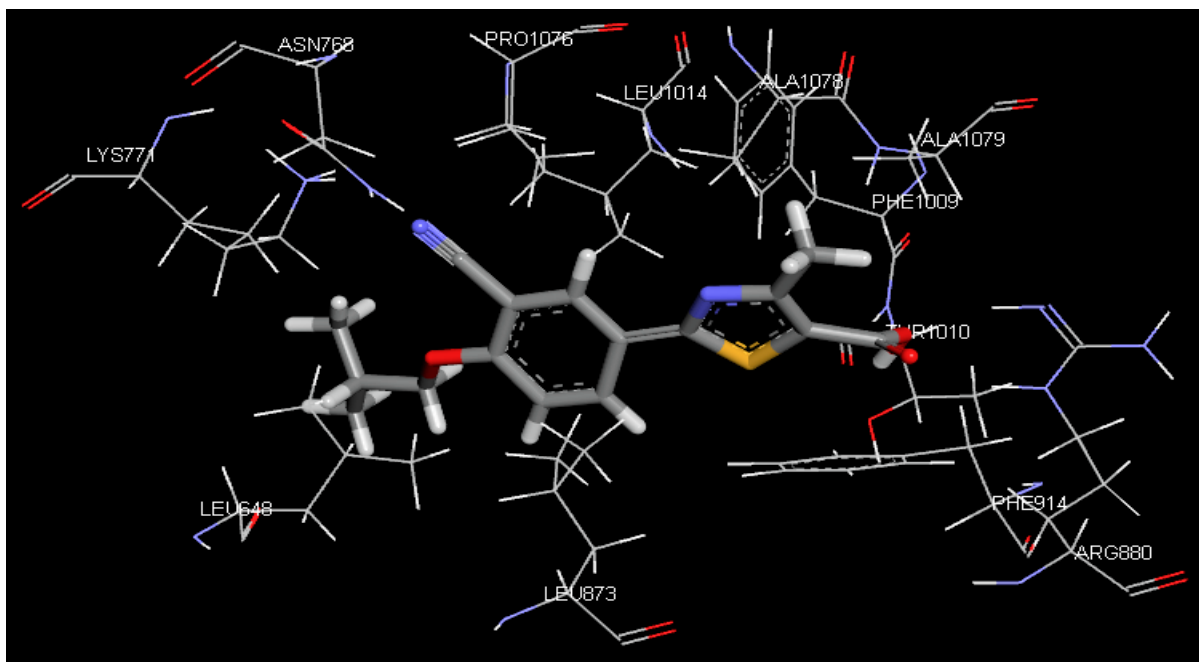


Figure V.4. Analyse visuelle par *discovery studio visualizer* des acides aminés du site actif de la XOR entourant l'inhibiteur TEI.

Cette Affinité est traduite par la présence de différentes liaisons entre l'enzyme et l'inhibiteur, le logiciel *Discovery studio visualizer* utilisé dans ce travail nous a permis de visualiser seulement les interactions hydrophobiques ainsi que les liaisons hydrogènes.

Plusieurs interactions hydrophobiques stabilisent l'inhibiteur TEI. Elles sont réalisées avec les résidus de Leu648, Leu1014, Ala1079, Leu873, Phe919, Ala 1078, Phe1009. La figure V.5 suivant montre le site actif de la XOR complexée avec l'inhibiteur TEI.

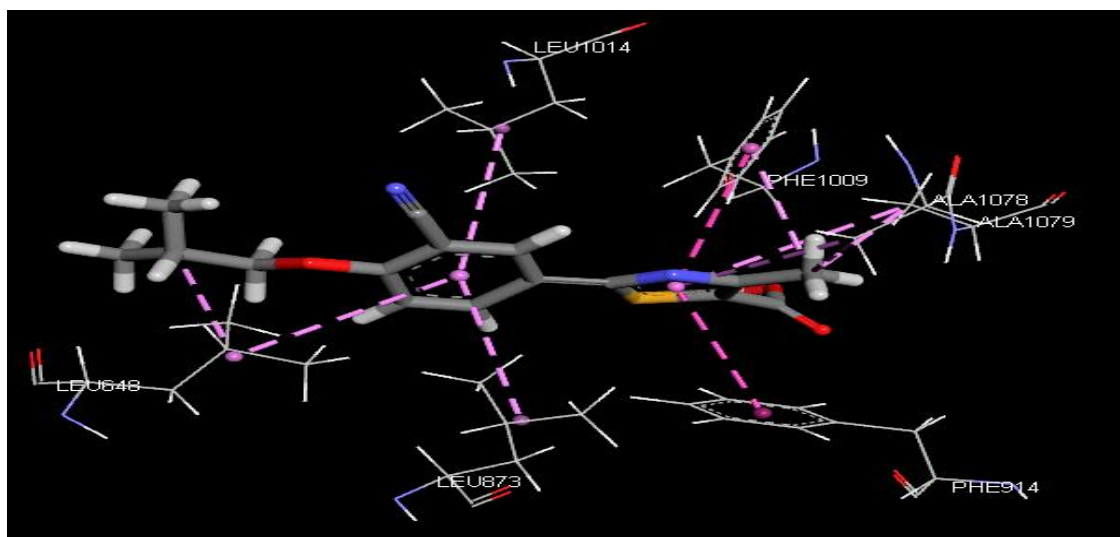


Figure V.5. Interactions hydrophobiques formées par le composé TEI avec la XOR.

De plus, l'analyse visuelle montre que l'inhibiteur TEI est stabilisé par la formation des huit ponts hydrogène (représentés en tirets discontinus vert) avec les résidus : Thr 1010, Phe1009, Arg880, Arg880, Pro1076, Asn786, Lys771 et Lys771. Dans le tableau V.3 ci-dessous nous avons résumé ces différentes liaisons.

Tableau V.3. Liaisons hydrogène établies par le composé TEI avec le site actif de la XOR.

Liaison	Atomes du ligand	Atomes et résidus du site actif	Distance (Å)
H			
1	O	H16-OG1Thr1010	2.406
2	O	H-CA Phe1009	2.548
3	O	H-NH2 Arg880	1.991
4	O	H-NE Arg880	1.902
5	N	H-CD Pro1076	2.341
6	N	H-ND2 Asn768	2.048
7	N	H-NZ Lys771	2.136
8	N	H-CE Lys771	2,766

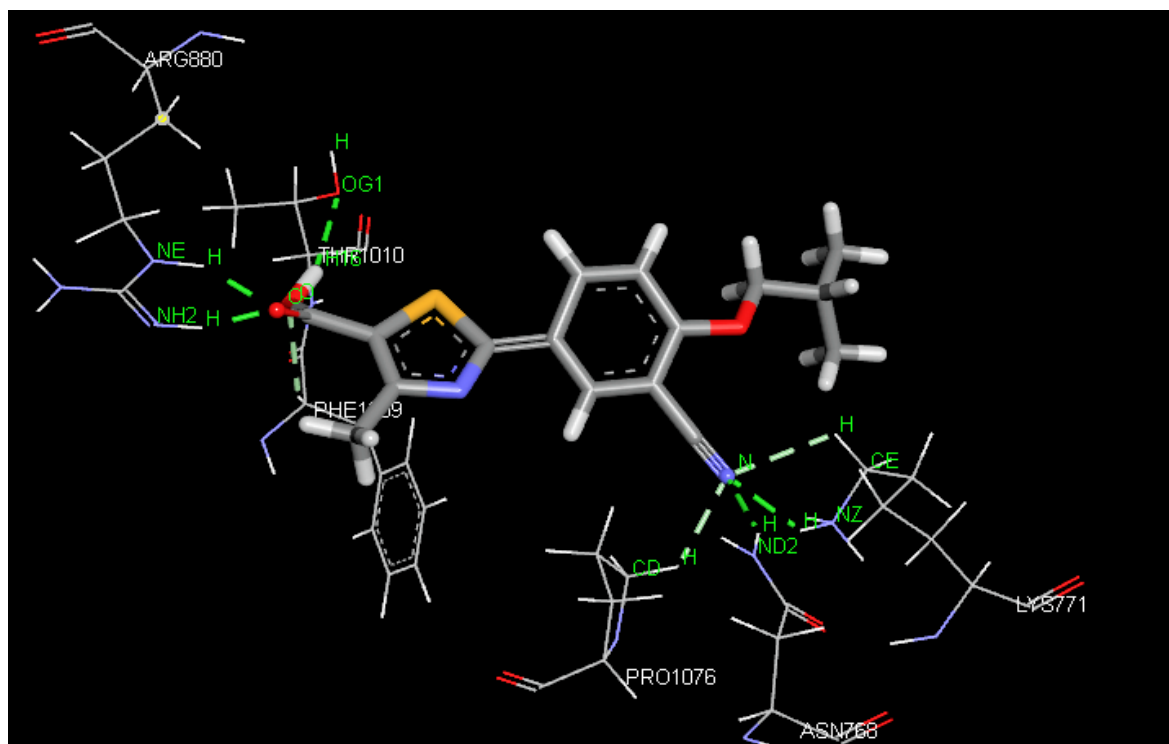


Figure V.6. Représentation des interactions hydrogène formées par l'inhibiteur TEI avec la XOR.

II.4. Analyse visuelle des interactions XOR-Thymoquinone

Nigella sativa est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des graines de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux, et notamment comme antidiabétique, antihypertenseur et anti-inflammatoire.

La thymoquinone (TQ) est abondamment présent dans les graines de *Nigella sativa* L. Un grand nombre d'études ont révélé que la thymoquinone est le principal constituant actif de l'huile de *Nigella sativa*, ce constituant étant responsable de la majorité des propriétés pharmacologiques. Les activités organoprotectrices bénéfiques de la thymoquinone dans des modèles animaux expérimentaux de différentes maladies humaines sont attribuées aux puissantes propriétés antioxydants et anti-inflammatoires [140, 143].

L'inhibiteur TQ est stabilisé au sein de site actif de la XOR par plusieurs interactions hydrophobiques. Elles sont réalisées avec les résidus : Phe914, Leu873, Val1011, Leu1014, Phe1009, Ala1079. La figure V.7 suivante représente ces interactions.

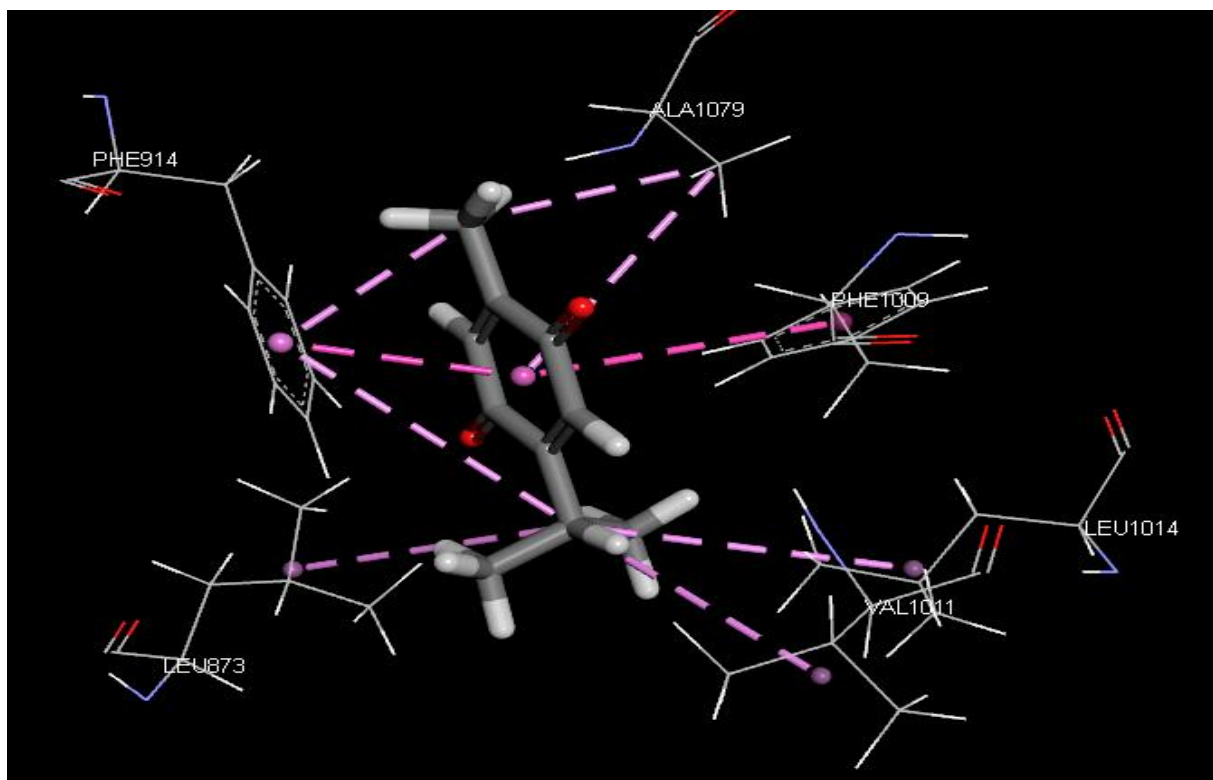


Figure V.7. Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur TQ avec la XOR.

De plus, cette molécule établit quatre liaisons hydrogènes (représentés en tirets discontinus vert) avec les résidus de Phe1009, Thr1010, Arg880, Arg880. Le complexe enzyme-inhibiteur donne une affinité égale à $3,81 \text{ M}^{-1}$.

Les travaux de Rezaeinasab M et *al*, (2019) mettent en évidence les résidus responsables de la reconnaissance du substrat par le site actif de la XOR. De plus, ils indiquent que la thymoquinone bloque les centres catalytiques de la xanthine oxydase, ce qui conduit à une diminution du signal électrochimique du centre Mo dans la XO. Des études d'amarrage moléculaire ont également montré que la TQ réduit l'oxydation de la xanthine en acide urique [144]. Les longueurs et les orientations spatiales des différentes liaisons hydrogène obtenues sont résumées sur le tableau V.4 ci-dessous.

Tableau V.4. Les liaisons hydrogène établies par la TQ avec le site actif de la XOR.

Liaison	Atome du ligand	Atomes et résidus du site actif	Distance(Å)
H			
1	O	H-CA Phe1009	2.488
2	O	H-N Thr1010	2.036
3	O	H-NE Arg880	2.721
4	O	H-NH2 Arg880	2.073

L'analyse visuelle des interactions entre cet inhibiteur et l'enzyme XOR est représentée dans la figure V.8 suivante.

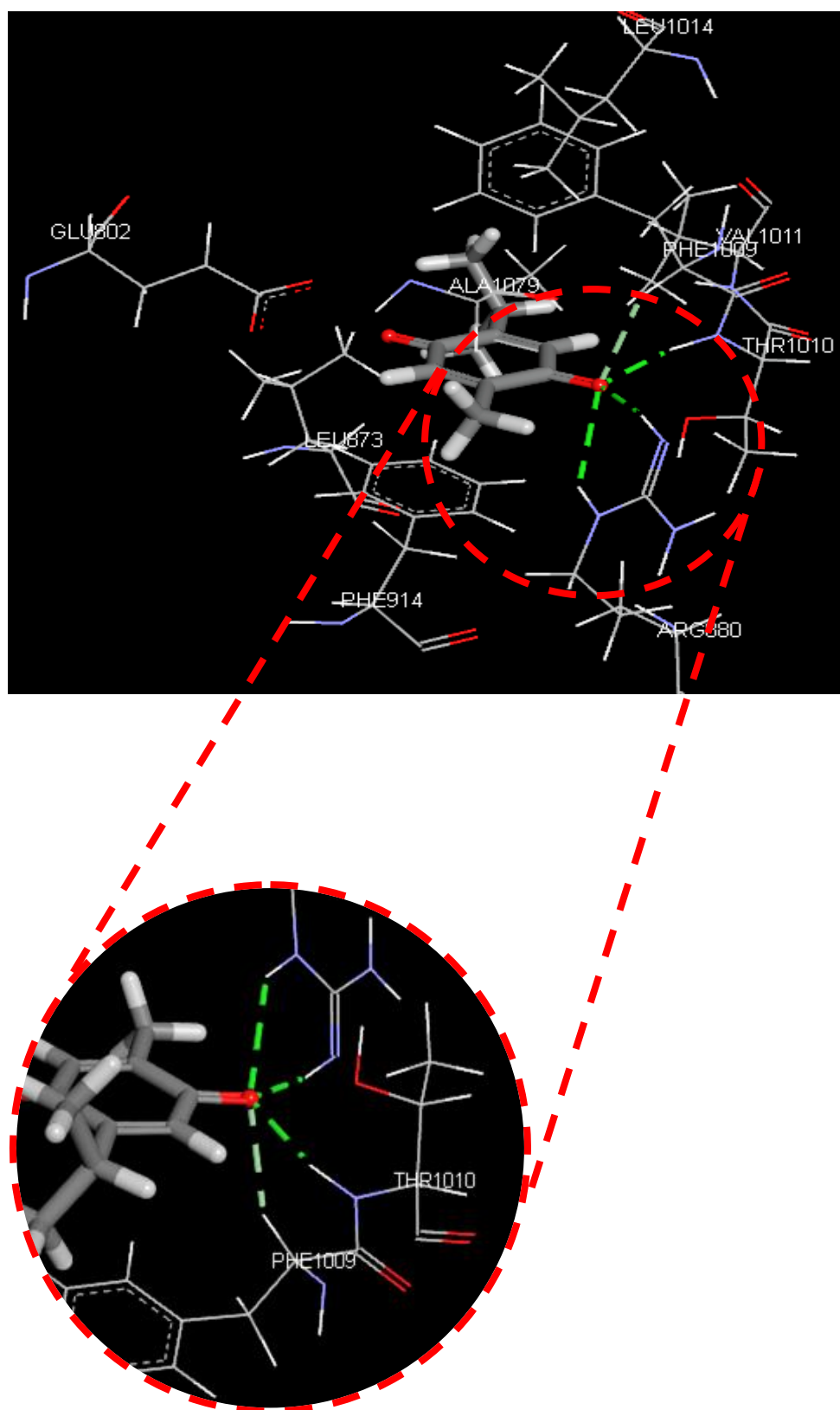


Figure V.8. Représentation des interactions hydrogène formées par le composé TQ avec le site actif de la XOR.

III. Proposition de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase

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

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 193 similaires du composé thymoquinone avec 89% de similarité. Ces composés chimiques sont téléchargés à partir de la banque de donnée PubChem. Nous avons jugé intéressant de tester ces inhibiteurs, de comparer leurs scores de docking (Affinité) par rapport aux inhibiteurs étudiés précédemment (TEI et TQ) et de proposer le meilleur inhibiteur de notre cible enzymatique XOR. Les résultats de docking sont présentés dans le tableau V.5 suivant.

Tableau V.5. Résultats de docking avec le logiciel Surflex-dock dans le site actif de la XOR

N	Code de l'inhibiteur	Affinité M-1	N	Code de l'inhibiteur	Affinité M ¹
1	CID_10281	3.79	98	CID_101382936	6.61
2	CID_68241	3.33	99	CID_101382934	5.68
3	CID_70291	6.17	100	CID_101345011	2.09
4	CID_276202	5.99	101	CID_101273055	3.14
5	CID_297370	3.43	102	CID_101253853	3.78
6	CID_299978	6.74	103	CID_101253852	2.72
7	CID_642540	2.86	104	CID_101232705	4.37
8	CID_825316	3.67	105	CID_101232698	3.40
9	CID_11844847	1.98	106	CID_101133550	5.16
10	CID_12502788	3.68	107	CID_101025954	4.19
11	CID_45082897	4.83	108	CID_100968742	3.81
12	CID_54395514	4.79	109	CID_85982727	2.35
13	CID_142809047	3.85	110	CID_85780134	2.47
14	CID_143527977	1.83	111	CID_85374867	4.84
15	CID_144823918	3.28	112	CID_85296548	5.55
16	CID_145192646	3.08	113	CID_73722967	3.82
17	CID_151233652	4.37	114	CID_71438815	4.82
18	CID_152766581	3.71	115	CID_57381248	3.01
19	CID_154296298	3.95	116	CID_45082907	4.02
20	CID_154325601	3.88	117	CID_45082902	4.83
21	CID_154505668	4.50	118	CID_22748296	4.61
22	CID_129177339	3.00	119	CID_15706998	5.61
23	CID_264271	2.41	120	CID_15311331	2.86
24	CID_529866	5.19	121	CID_14065610	3.51
25	CID_642518	0.67	122	CID_12405345	3.82
26	CID_6480938	6.74	123	CID_12251711	4.40
27	CID_10582989	5.64	124	CID_11105578	3.08
28	CID_12588093	6.37	125	CID_10855689	3.26

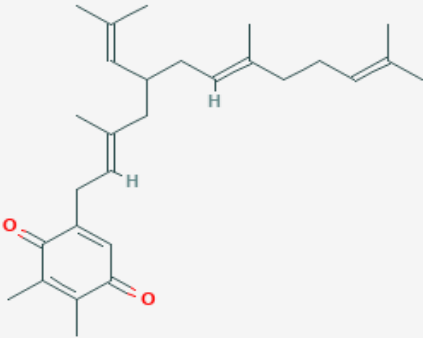
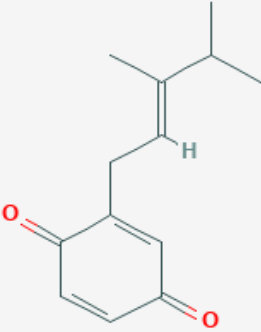
29	CID_14145186	3.34	126	CID_10511421	2.99
30	CID_14511622	3.54	127	CID_10419266	4.73
31	CID_15664192	2.28	128	CID_599944	2.99
32	CID_19877373	2.42	129	CID_10441901	3.64
33	CID_20073421	4.05	130	CID_12032977	4.61
34	CID_21404393	5.88	131	CID_12424069	3.66
35	CID_22959741	5.99	132	CID_12873329	4.43
36	CID_71397229	4.49	133	CID_13303002	3.51
37	CID_85401005	5.81	134	CID_14356254	5.26
38	CID_85748914	3.86	135	CID_15266132	4.81
39	CID_86132218	3.37	136	CID_19877271	2.08
40	CID_101935235	6.25	137	CID_19877326	2.22
41	CID_123338555	3.41	138	CID_20163301	3.25
42	CID_130026865	3.02	139	CID_20344590	4.01
43	CID_10871609	5.28	140	CID_20501816	5.60
44	CID_11035274	6.39	141	CID_20871715	3.78
45	CID_27906	3.78	142	CID_21541893	5.45
46	CID_77864	4.68	143	CID_21719814	3.62
47	CID_3018503	3.42	144	CID_46854618	2.92
48	CID_6365734	3.67	145	CID_53404847	3.84
49	CID_11228886	3.32	146	CID_53897605	4.46
50	CID_14289169	4.71	147	CID_54030998	3.67
51	CID_101289687	3.60	148	CID_146888739	4.01
52	CID_78494	4.44	149	CID_54299200	2.76
53	CID_90362391	3.81	150	CID_54385261	3.96
54	CID_90473621	4.62	151	CID_55252821	3.46
55	CID_907661691	4.43	152	CID_57254574	3.47
56	CID_90794358	3.08	153	CID_57267633	3.20
57	CID_91111504	4.64	154	CID_57734344	2.98
58	CID_91361202	4.79	155	CID_57796765	2.74
59	CID_101687391	5.49	156	CID_57831505	2.82
60	CID_117671629	2.40	157	CID_58193267	1.73
61	CID_118647990	3.08	158	CID_58528818	3.78
62	CID_123753674	3.24	159	CID_59165268	3.99
63	CID_123983147	3.80	160	CID_59811714	2.78
64	CID_129251963	4.75	161	CID_59843876	3.57
65	CID_129684636	2.44	162	CID_59861712	5.30
66	CID_129743286	1.75	163	CID_68393006	3.37
67	CID_129804548	5.31	164	CID_69498948	3.92
68	CID_129829816	6.96	165	CID_69652101	2.83
69	CID_129830407	5.96	166	CID_70548858	3.78
70	CID_132131050	6.82	167	CID_71174543	3.36
71	CID_134385693	3.86	168	CID_71410994	4.44
72	CID_135227826	5.66	169	CID_73829046	3.78
73	CID_135332033	6.23	170	CID_85138427	3.76
74	CID_138981560	2.22	171	CID_86095728	2.76
75	CID_138983622	4.80	172	CID_86162965	4.78

76	CID_138984811	3.34	173	CID_88590774	2.64
77	CID_139818414	2.95	174	CID_88791273	4.40
78	CID_140936131	4.04	175	CID_88854289	2.44
79	CID_142732268	4.17	176	CID_88854295	4.21
80	CID_133682203	3.11	177	CID_88967567	3.17
81	CID_133681581	3.52	178	CID_88990852	3.81
82	CID_133678115	4.21	179	CID_88991028	3.71
83	CID_133626604	2.48	180	CID_89173961	3.09
84	CID_131858224	4.77	181	CID_90361331	2.55
85	CID_131247480	4.33	182	CID_144970560	3.38
86	CID_131236728	3.65	183	CID_133681555	3.35
87	CID_130036974	4.21	184	CID_133626807	3.63
88	CID_130031149	2.75	185	CID_133626107	2.22
89	CID_130030150	2.44	186	CID_133620300	2.24
90	CID_129708208	4.24	187	CID_131247041	3.43
91	CID_122663873	3.16	188	CID_54243705	5.62
92	CID_121223978	4.61	189	CID_77864	4.68
93	CID_103847216	2.91	190	CID_11228886	3.32
94	CID_103458680	3.51	191	CID_78494	4.44
95	CID_102256021	4.50	192	CID_10281	3.79
96	CID_102037304	3.63	193	CID_11297973	4.02
97	CID_101411968	5.09			

III.2. Sélection des meilleures similaires

Le docking avec Surflex-dock, nous a permis de calculer l’Affinité de 193 similaires du composé thymoquinone provenant de la chimiothèque PubChem. À la lumière des résultats obtenus dans le tableau V.5, les deux similaires N°68 (CID_129829816) et N°70 (CID_132131050) donnent la meilleure affinité ($6.96M^{-1}$ et $6.82 M^{-1}$ respectivement), supérieur à celle de l’inhibiteur thymoquinone ($3.81 M^{-1}$) et l’inhibiteur TEI ($6.04 M^{-1}$). Les inhibiteurs choisis sont représentés dans le tableau V.6 ci-dessous.

Tableau V.6. Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats

Code de l'inhibiteur	Structure (2D)	Nom chimique	Affinité (M ⁻¹)
CID_129829816		2,3-Dimethyl-5-geranylgeranyl-1,4-benzoquinone	6.96
CID_132131050		2-[(E)-3,4-dimethylpent-2-enyl]cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione	6.82

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 utilisés le programme *Discovery studio visualizer* pour visualiser et analyser le nombre et le type de liaisons former entre le complexe enzyme-inhibiteur.

III.3.1. Analyse visuelle 1N5X-CID_129829816

L'analyse visuelle montre que l'inhibiteur 2,3-Dimethyl-5-geranylgeranyl-1,4-benzoquinone dont le code ID est CID_129829816 donne la meilleure Affinité (6.96 M⁻¹) est bien placé dans le site actif de l'enzyme XOR. Ce composé est stabilisé par la formation de quatre ponts hydrogène avec les résidus de Phe1009, The1010, Arg880, Arg880. Dans la figure V.9 et le tableau V. 7 ci-dessous nous avons résumé ces différents ponts.

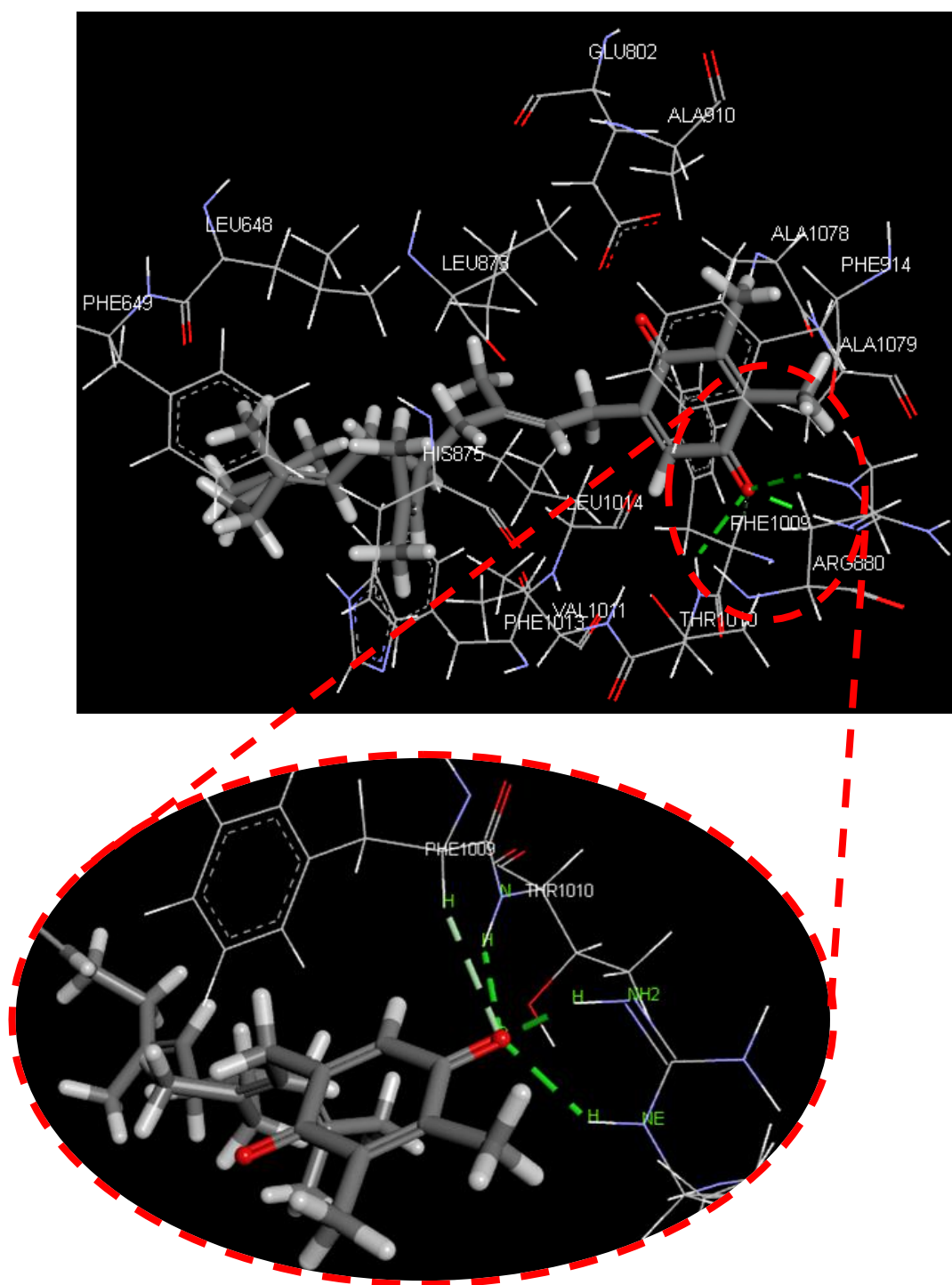


Figure V.9. Représentation des interactions hydrogènes formées entre le composé CID_129829816 et le site actif de la XOR.

Tableau V.7. Les liaisons hydrogène établies par l'inhibiteur CID_129829816 avec le site actif de la XOR.

Liaison H	Atomes du ligand	Atomes et résidus du site actif	Distance(Å)
1	O	H-CA Phe1009	2,74
2	O	H-N Thr1010	2,40
3	O	H-NE Arg880	2,30
4	O	H-NH2 Arg880	1,80

De plus, l'inhibiteur CID_129829816 forme avec le site actif de la XOR plusieurs interactions hydrophobiques avec les acides aminés suivants : Phe1013, Phe649, Leu648, Leu873, Ala910, His875, Phe914, Ala1079, Ala178, Phe1009, Leu1014, Val1011. Ces interactions sont représentées dans la figure V.10 ci-dessous.

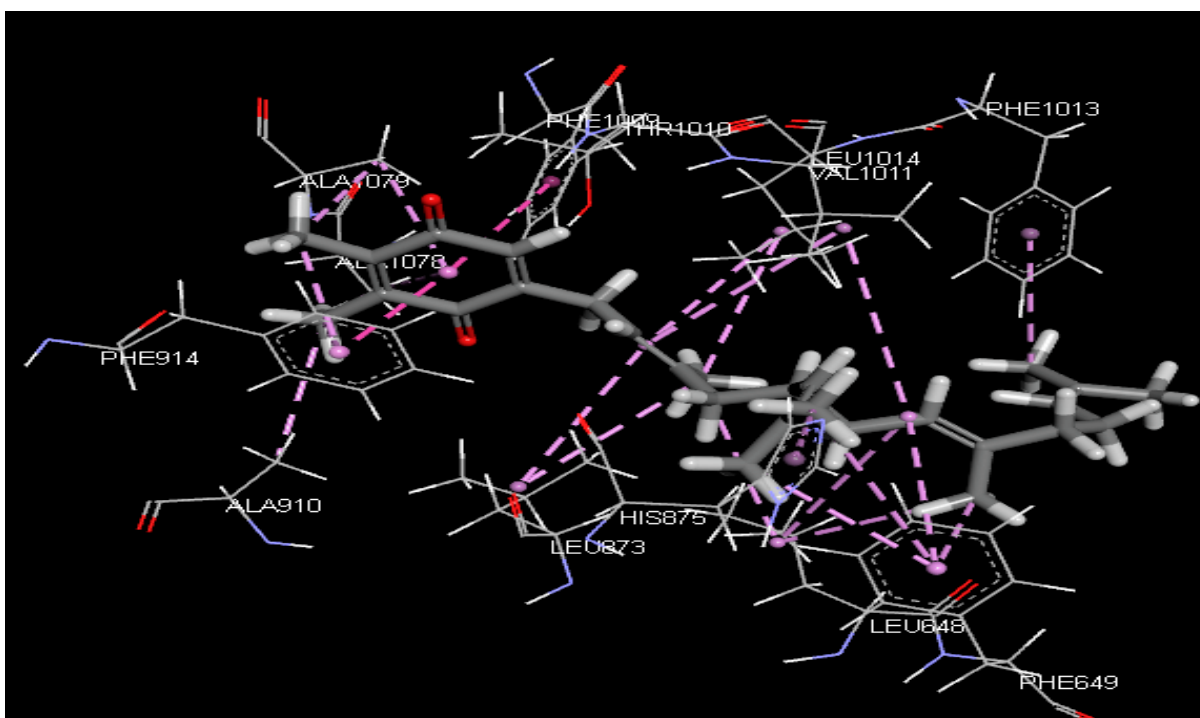


Figure V.10. Représentation des interactions hydrophobiques formées entre le composé CID_129829816 et le site actif de la XOR.

III.3.2. Analyse visuelle 1N5X-CID_132131050

À la lumière des résultats obtenus dans le tableau V.6, l'inhibiteur 2-[(E)-3,4-dimethylpent-2-enyl] cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione dont le code ID est CID_129829816,

donne une affinité 6.82 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 : Phe1009, Thr1010, Arg880 et Arg880. Dans la figure V.11 et le tableau V.8 ci-dessous nous avons résumé ces différentes interactions.

Tableau V.8. Les liaisons hydrogène établies par composé CID_132131050

Liaison H	Atomes du ligand	Atomes et résidus du site actif	Distance(Å)
1	O	H-NE Arg880	2,67
2	O	H-NH2 Arg880	1,97
3	O	H-N Thr1010	1,96
4	O	H-CA Phe1009	2,51

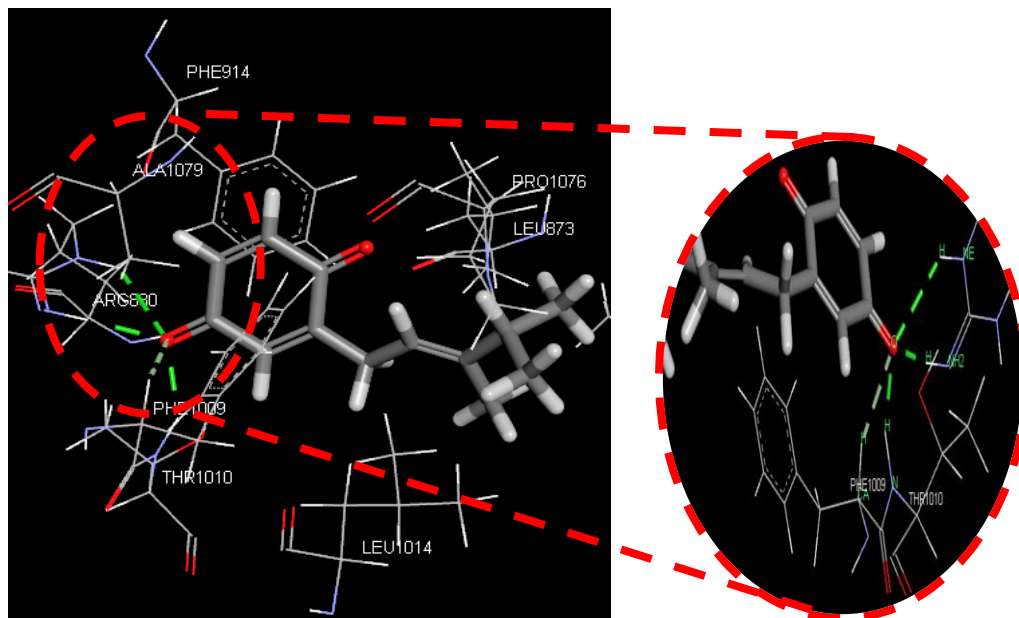


Figure V.11. Représentation des interactions hydrogène formées entre le composé CID_132131050 et le site actif de la XOR

Plusieurs interactions hydrophobiques stabilisent l'inhibiteur CID_132131050 dans le site actif de la XOR. Elles sont réalisées avec les acides aminés suivants : Leu1014, Leu648,

Leu873, Phe914, Ala1079, Phe1009, Pro1076. Ces interactions sont représentées dans la figure V.12 ci-dessous.

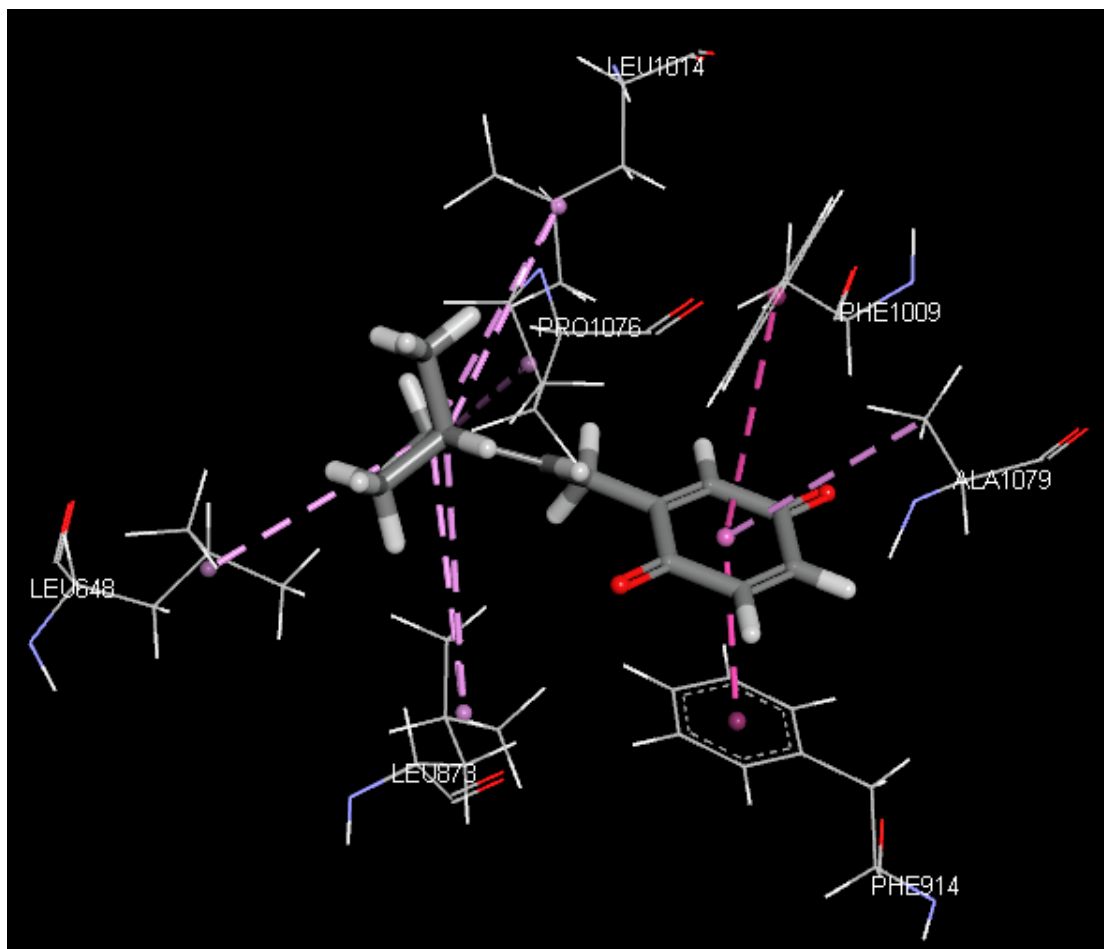


Figure V.12. Représentation des interactions hydrophobiques formées entre l'inhibiteur CID_132131050 et le site actif de la XOR.

IV. La règle de *Lipinski*

Avant de terminer ce travail, il était indispensable de compléter notre recherche par l'application de la règle de 5 formulée par Christopher *Lipinski* [145]. Cette règle décrit un ensemble de critères, permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Le tableau V.9 suivant présente les résultats de la règle de *Lipinski* appliquée aux inhibiteurs choisis.

Tableau V.9. Critères de la règle de *Lipinski* pour les différents inhibiteurs choisis.

ligand \ critères	PM	nOHHN	nON	LogP	nrotb
Thymoquinone	164.20	0	2	2	1
CID_129829816	408.60	0	2	8.2	10
CID_132191050	204.26	0	2	2.7	3

PM : Poids moléculaire.

LogP : Coefficient de partage octanon/Eau.

nON : Accepteur de liaisons H.

nOHHN : Donneurs de liaisons H.

nrotb : nombre de liaisons rotables.

Ce tableau montre que parmi les cinq conditions de *Lipinski*, une seule n'est pas respectée. Il s'agit de coefficient de partage actonon/Eau (LogP) pour l'inhibiteur CID-129829816 dont leur valeur est égale à 8,2 alors que le maximum est fixé à 5. Cependant, les inhibiteurs testés sont capables de présenter une activité biologique très importante conformément aux résultats de *Lipinski et al*, 1997 [146], qui montre que toute molécule validant au moins trois conditions de la règle de *Lipinski* est considérée comme candidat potentiel et ne pose des problèmes d'absorption par voie orale.



CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif principal de ce mémoire est de découvrir *in silico* par le biais du docking moléculaire de nouveaux composés agissant comme inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase (XOR), cible enzymatique intéressante jouant un rôle important dans le traitement de la maladie de la goutte. Afin d'atteindre cet objectif nous sommes passés par plusieurs étapes.

Dans un premier temps, nous avons évalué la performance du programme d'amarrage moléculaire Surflex-dock utilisé dans ce travail. Pour cela nous avons fait appel au test RMSD qui sert à évaluer la déviation de la géométrie du ligand docké par Surflex-dock par rapport à la conformation de ligand de référence. Sur les 154 complexes pris de la PDB, 87,66% ont présentés un RMSD inférieur ou égale à 2 Å, affirmant ainsi bon fonctionnement du programme Surflex-dock. De plus, 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. Ces résultats montrent que le programme Surflex-dock est suffisamment performant et on peut l'utiliser en toute confiance pour simuler les interactions entre les différents inhibiteurs et la cible enzymatique XOR.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous intéressons à déterminer le mode d'interaction, lors de la fixation de TEI et la Thymoquinone à l'enzyme durant la formation du complexe XOR-inhibiteur, avec une meilleure complémentarité par le calcul de l'affinité du complexe formé. Ce dernier nous a servi dans une troisième partie, comme structure de départ pour mettre en évidence un nouvel inhibiteur plus affin envers notre cible enzymatique. Pour cela, nous avons téléchargé 193 similaires de la Thymoquinone à partir de la chimiothèque PubChem, afin d'évaluer leur affinité envers la XOR. Deux similaires : CID_129829816 et CID_132131050 avec des affinités égales à 6.96 et 6.82 M⁻¹ respectivement, sont considérés comme les meilleurs inhibiteurs de la XOR.

Enfin la règle de *Lipinski* nous a permis de vérifier que les deux similaires obtenu par docking moléculaire se présentent comme, des nouveaux inhibiteurs potentiels de la XOR car ses propriétés physico-chimiques indiquent qu'ils ne présentent aucun problème en cas d'absorption par voie orale.

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*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Carey B. I et Dudler J. 2006. Rhumatologie La goutte. *Revue Médicale Suisse*. **2**: 160-162.
- [2] Chermat R. LA GOUTTE. UFAS Faculté de Médecine 5ème année. Module de Rhumatologie. 2019-2020.
- [3] Nishino T., Okamoto K., Eger B T., Pai E F et Nishino T. 2008. Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS Journal*. **275**:3278- 3289.
- [4] Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R et Bajorath J. 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews/ drug discovery*. **3** :935-945.
- [5] Bentin J., Fernandez-Lopez M. J., Dragan E., Eloundou P et Peretz A. 2014. La goutte, revisitée. *Service de Rhumatologie, C.H.U. Brugmann*. **35** : 207-214.
- [6] Krifi M. N. 2018. Naissance et essor de l’immunologie : Une science en devenir. ISTE Group. 135 p.
- [7] Nguyen V et Gruffat X. 2015. La goutte, la maladie des rois. Un ebook proposé par Creapharma.ch.
- [8] Anonyme : Qu’est-ce que la goutte ? [En ligne]. <http://www.crisedegoutte.fr/fr/comprendre-la-goutte/qu-est-ce-que-la-goutte.html>. Consulté le [29/03/2022].
- [9] Anonyme: Goutte : que faire en cas de crise ? [En ligne]. <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2443181-goutte-maladie-symptome-crise-que-faire/>. Consulté le [20/04/2022].
- [10] Richette P. 2010. GOUTTE : ACTUALITÉ 2010. Réflexions Rhumatologiques, N°132. 3-46. Service de Rhumatologie, Hôpital Lariboisière, Fédération de Rhumatologie, Centre Viggo Petersen, Paris.
- [11] Anonyme : Goutte. [En ligne]. <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/rhumatologie/goutte/?amp>. Consulté le [19/03/2022].

- [12] Bardin T et Richette P. 2011. Épidémiologie et génétique de la goutte. *La Presse Médicale*. **40**:830-835.
- [13] Anonyme: la goutte. [En ligne]. <https://ressourcessante.salutbonjour.ca/condition/getcondition/goutte>. Consulté le [1/04/2022].
- [14] Anonyme : Goutte. [En ligne]. <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/rhumatologie/goutte/?amp>. Consulté le [19/03/2022].
- [15] Saderine S. l'acide urique : une molécule physiologique peuvent être pathologique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Limoges. France. 2013. 83p.
- [16] Valeix N et Guillot X. 2013. La goutte, une complication des hyperuricémies. *Actualités Pharmaceutiques*. **52**(524): 18-20.
- [17] Choi H. K., Liu S et Curhan G. 2005. Intake of purine- rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis & Rheumatism*. **52** (1): 283-290.
- [18] Kuo C. F., Grainge M. J., Zhang W et Doherty M. 2015. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology*. **11** (11): 649-62.
- [19] Singh J. A., Reddy S. G et Kundukulam J. 2011. Risk Factors for Gout and Prevention: A Systematic Review of the Literature. *Current Opinion in Rheumatology*. **23** (2):192-202.
- [20] Choi H. K., Atkinson K., Karlson E. W et Curhan G. 2005. Obesity, Weight Change, Hypertension, Diuretic Use, and Risk of Gout in Men: The Health Professionals Follow-up Study. *Archives of Internal Medicine*. **165** (7) :742-8.
- [21] Chalès G et Guggenbuhl P. 2005. Hyperuricémies, une équation extra-articulaire à trois composantes : rénale, cardiovasculaire et métabolique. *La Lettre du Rhumatologue*. **134**:18-23.
- [22] Singh J. A., Reddy S. G et Kundukulam J. 2011. Risk Factors for Gout and Prevention: A Systematic Review of the Literature. *Current Opinion in Rheumatology*. **23** (2) :192-202.
- [23] Demirtas H .V. La goutte : Nouveautés en 2020 et particularités en Polynésie Française. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bordeaux. France. 2021.115p.

- [24] Punzi L et Oliviero F. 2007. Diagnostic pratique des arthropathies microcristallines. *Revue du Rhumatisme*. **74** (2) :138-46.
- [25] Pascart T et Flipo R. M. 2011. La goutte : présentations cliniques et diagnostic. *Revue du Rhumatisme*. **78** : S116-21.
- [26] Maquin E. La goutte, une maladie en recrudescence : enquête à l'officine. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de lorraine. France. 2018.102p.
- [27] Leclercq P et Malaise M. G. 2004. La goutte. *Revue Médicale Liège*. **59** (5) : 274-80.
- [28] Anonyme : Définition et cause de la goutte. [En ligne]. <https://www.lesmauxdedos.com/wp-content/uploads/2020/07/goutte-infos.jpg>. Consulté le [14/04/2022].
- [29] Forster A et Krebs A. 2013. La goutte – ennuyeuse, mais traitable. *Forum Médical Suisse*. **13** (15) : 285-289
- [30] Anonyme: Manifestations cliniques de la goutte. [En ligne]. <https://www.revmed.ch/RMS/2007/RMS-103/32142>. Consulté le [1/04/2022].
- [31] Punzi L et Oliviero F. 2007. Diagnostic pratique des arthropathies microcristallines. *Revue du Rhumatisme*. **74** (2) : 138-46.
- [32] Leclercq P et Malaise M. G. 2004. LA GOUTTE. *Revue Medicale de Liege*. **59** : 274-280.
- [33] Dhanda S., Jagmohan P., Quek S. T et Tian Q. S. 2011. A re-looks at an old disease: a multimodality review on gout. *Clinical Radiology*. **66** (10):984-992.
- [34] Eggebeen A. T. 2007. Gout: An Update. *American Academy of Family Physicians*. **76** (6): 801-8.
- [35] Changyi C. H., Jian-Ming L et Qizhi Y. 2016. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Medical Science Monitor*. **22**: 2501-2512.
- [36] Nuki G et Simkin P. A. 2006. A concise history of gout and hyperuricemia and their treatment. *Arthritis Research and Therapy*. **1**: S1

- [37] Anonyme: Intoxications sévères par la colchicine d'après les données issues des Centres antipoison et de toxicovigilance français janvier 2000 – juin 2011. [En ligne]. http://www.centres_antipoison.net/cctv/CCTV_Colchicine_rapport_VF_octobre_2014.pdf. Consulter le [29 /03/ 2022].
- [38] Richette P. 2012. Les traitements pharmacologiques de la goutte. *La Lettre du Rhumatologue*. **384** : 16-21.
- [39] Anonyme : Le diagnostic et le traitement de la goutte. [En ligne]. https://www.vidal.fr/maladies/metabolisme_diabete/goutte/traitement.html. Consulté le [14/04/2022].
- [40] Xu P., LaVallee P et Hoidal J. R. 2000. Repressed Expression of the Human Xanthine Oxidoreductase. *Gene. The journal of biological chemistry*. **275**(8): 5918-5926.
- [41] Battelli M. G., Polito L., Bortolotti M et Bolognesi A. 2016. Xanthine Oxidoreductase in Drug Metabolism: Beyond a Role as a Detoxifying Enzyme. *Current Medicinal Chemistry*.**23**(35): 4027-4036.
- [42] Battelli M. G., Abbondanza A et Stirpe F. 1992. Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes: conversion from D to O form and leakage from cells. *Chemico biological Interactions*. **83**(1): 73-84.
- [43] Harrison R. 2004. Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Drug metabolism reviews*. **36**(2): 363–375.
- [44] Berry C. E et Hare J. M. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications: Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease. *The Journal of Physiology*. **555** (3): 589-606.
- [45] Cantu-Medellin N et Kelley E. E. 2013. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*. **1**(1): 353-358.
- [46] Vorbach C., Harrison R et Capecchi M. R. 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *TRENDS in Immunology*. **24**(9): 512-517.

- [47] Anonyme: structure of xanthine oxydoréductase (XOR). [En ligne]. <https://www.researchgate.net/publication/305392784/figure/fig5/AS:668587916275715@1536415189181/Structure-of-xanthine-oxidoreductase-XOR-XOR-is-a-large-homodimer-enzyme-each-subunit.png>. Consulté le [10/04/2022].
- [48] Anonyme : Xanthine oxydase – [Biologie de la peau] [en ligne]. <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?mot139>. Consulté le [13/04/2022].
- [49] Krenitsky T. A., Spector T et Hall W. W. 1986. Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. *Archives of Biochemistry and biophysics*. **247**(1): 108-119.
- [50] Hille R et Nishino T. 1995. Flavoprotein structure and mechanism Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *The FASEB journal*. **9**(11): 995-1003.
- [51] Nishino T. 1994. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *The Journal of Biochemistry*. **116**(1): 1-6.
- [52] Anonyme : Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine oxydoreductase des extraits de Cachrys libanotis. [En ligne]. <https://www.memoireonline.com/02/13/6981/Effet-scavenger-des-radicaux-oxygenes-et-inhibiteur-de-la-xanthine-oxydoreductase-des-extraits-de.html>. Consulté le [13/04/2022].
- [53] Xu P., Huecksteadt T et Hoidal J. R. 1996. Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics*. **34**(2): 173-180.
- [54] Ichida K., Amaya Y., Noda K., Minoshima S., Hosoya T., Sakai O., Shimizu N et Nishino T. 1993. Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene*. **133**(2): 279-284.
- [55] Xu P., Huecksteadt T. Harrison R et Hoidal J. R. 1994. Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase. *Biochemecal and Biophysical Research Communications*. **199**(2): 998-1004.
- [56] Asai R., Nishino T., Matsumura T., Okamoto K., Igarashi K et Pai E. F. 2007. Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase. *The journal of Biochemistry* .**141**(4): 525–534.

- [57] Cantu-Medellin N et Kelley E. E. 2013. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide*. **34**(1): 19-26.
- [58] Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*. **33**(6): 774-797.
- [59] Bray R. C. 1975. 6 Molybdenum Iron - Sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. *The enzyme*. **12**: 299 – 419.
- [60] Topham R. W., Walker M. C et Calish M. P. 1982. Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochemecal and Biophysical Research Communications*. **109**(4): 1240-1246.
- [61] Ozturk G., Shah I. M., Mills D. A., German J. B et Moura Bell J. M. L. N. 2020. The antimicrobial activity of bovine milk xanthine oxidase. *International Dairy Journal*, **102**:104581.
- [62] Borges F., Fernandes E et Roleira F. 2002. Progress towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*. **9**(2): 195-217.
- [63] Battelli M. G., Bolognesi A et Polito L. 2014. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et BiophysicaActa*. **1842**(9): 1502-1517.
- [64] Kelley E. E. 2015. A new paradigm for XOR-catalyzed reactive species generation in the endothelium. *Pharmacological Reports*. **67**:669–674.
- [65] Masuda T., Nojima S., Miura Y., Honda S et Masuda A. 2015. An oxidative coupling product of luteolin with cysteine ester and its enhanced inhibitory activity for xanthine oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **25**(16): 3117-3119.
- [66] Masuda T., Shingai Y., Takahashi C., Inai M., Miura Y., Honda S et Masuda A. 2014. Identification of a potent xanthine oxidase inhibitor from oxidation of caffeic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. **69**: 300-307.
- [67] Battelli M. G., Polito L et Bolognesi A. 2014. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis*. **237**(2): 562-567.

- [68] Granger D. N., Rutili G et McCord J. M. 1981. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. **81**(1): 22-29.
- [69] Nuki G. 2006. Events provoking acute gouty arthritis. *Metabolic and Genetic Arthropathies*. **34**: 417 - 423.
- [70] Enomoto A., Kimura H., Chairoungdua A., Shigeta Y., Jutabha P., Ho Cha S., Hosoyamada M., Takeda M., Sekine T., Igarashi T., Matsuo H., Kikuchi Y., Oda T., Ichida K., Hosoya T., Shimokata K., Niwa T., Kanai Y et Endou H. 2002. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature*. **417**: 447 - 452.
- [71] Pessina P.A. 2017. Prise en charge de la goutte en 2017.
- [72] Qingyong L., Chuanchao S., Min W., Mao Z., Ming L., Ting Z., Erdong Y., Zhi W., Maojin Yet Jiaoyan R. 2019. Tryptophan residue enhances in vitro walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities. *Journal of functional foods*. **53**: 276-285.
- [73] Pillinger M. H., Rosenthal P et Abeles A. M. 2007. Hyperuricemia and gout. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. **65**(3): 215-221.
- [74] Puddu P., Puddu G. M., Cravero E., Vizioli L et Muscari A. 2012. The relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Cardiology*. **59**(3): 235-242.
- [75] Malik U. Z., Hundley N. J., Romero G., Radi R., Freeman B. A., Tarpey M. M., Kelley E. E. 2011. Febuxostat Inhibition of Endothelial-Bound XO: Implications for Targeting Vascular ROS Production. *Free Radical Biology and Medicine*. **51**(1): 179–184.
- [76] Faruque L. I., Ehteshami-Afshar A., Wiebe N., Tjosvold L., Homik J et Tonelli M. 2013. A systematic review and meta-analysis on the safety and efficacy of febuxostat versus allopurinol in chronic gout. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. **43**(3): 367-375.
- [77] Nagao A., Seki M et Kobayashi H. 1999. Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **63**(10): 1787-1790.

- [78] Anonyme: Allopurinol. [En ligne] <https://www.tcichemicals.com/CA/fr/p/A0907>. Consulté le [16/05/2022].
- [79] Anonyme: Figure Chemical structure of febuxostat. [En ligne]. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-febuxostat-Uloric-R-package-insert-Takeda-Pharmaceuticals_fig1_51240086. Consulté le [08/05/2022].
- [80] Anonyme : Structure chimique de base des flavonoïdes. [En ligne]. https://www.researchgate.net/figure/Structure-chimique-de-base-des-flavonoides-Structure-chimique-de-base-des-flavonoides_fig3_313309648. Consulté le [08/05/2022].
- [81] Anonyme : Thymoquinone. [En ligne]. <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Thymoquinone> . Consulté le [31/05/2022].
- [82] Anonyme : La thymoquinone, le meilleur de la nigelle. [En ligne]. <https://apotecaria.com/blogs/actualite-des-produits-naturels/la-thymoquinone-le-meilleur-de-la-nigelle>. Consulté le [31/05/2022].
- [83] Darakhshan S., Pour A. B., Colager A. H et Sisakhtnezhad S. 2015. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*. **96**:138-158.
- [84] Anonyme: Structure of thymoquinone. [En ligne]. https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-thymoquinone_fig1_340864737. Consulté le [17/05/2022].
- [85] Khan M. 1999. Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Inflammopharmacology*. **7**:15-35.
- [86] Anonyme : NIGELLA SATIVA. [En ligne]. <https://exsence.com/immunité-defense/18-nigella-sativa.html>. Consulté le [01/06/2022].
- [87] Al-Gabri N. A., Saghir S. A., AlHashedi S. A., El-Far A. H., Khafaga A. F., Swelum A. A., Al-wajeeh A. S., Mousa S. A., Abd El-Hack M. E., Naiel M. A., Khaled A et El-Tarabily K. A. 2021. Therapeutic Potential of Thymoquinone and Its Nanoformulations in Pulmonary Injury: A Comprehensive Review. *International Journal of Nanomedicine*. **16**: 5117–5131.
- [88] Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Hioual K. S et Mokrani E. 2013. L'amarrage moléculaire : une nouvelle approche pour lutter contre le développement de

la tuberculose. *Revue de microbiologie industrielle, sanitaire, et environnementale*. **7**(2):133-149.

[89] Mokrani El H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Mémoire de magister en biochimie appliquée. Université Frères Mentouri Constantine 1. Algérie. 2012.122p.

[90] Chang M. W., Ayeni C., Breuer S et Torbett B. E. 2010. Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS ONE*. **5**(8): 11955.

[91] Yuriev E., Agostino M et Ramsland P.A. 2011. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *Journal of Molecular Recognition*. **24** (2): 149-164.

[92] Agarwal S et Mehrotra R. 2016. An overview of Molecular Docking. *JSM Chemistry*. **4**(2): 1024.

[93] Ferreira L. G., dos Santos R. N., Oliva G et Andricopulo A. D. 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. **20**:13385-13421.

[94] Guédouar H., Zaki H., Bouachrine M et Aloui F. 2020 .Molecular docking investigation of cytotoxic phenanthrene derivatives. *Comptes Rendus Chimie*. **23**:329-342.

[95] Schulz-Gasch T., Stahl M. 2004. Scoring Functions for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective. *Drug Discovery Today: Technologies*. **1**(3): 231-239.

[96] Wang R., Lu Y., Fang X et Wang S. 2004. An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDBbind Refined Set of 800 Protein-ligand Complexes. *The Journal for Chemical Information and Computer scientists*. **44**(6): 2114-2125.

[97] Boucherit H. Recherche in silico de nouveaux composés bioactifs et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase. Thèse de doctorat en biochimie appliquée. Université Frères Mentouri Constantine 1. Algérie. 2020. 116p.

[98] De Oliveira E. B. Simulation moléculaire appliquée à l'acétylation de flavonoïdes catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la régiosélectivité de la bioconversion. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. France. 2009. 207p.

- [99] Férey N., Bouyer G., Martin C., Drif A., Bourdot P., Ammi M., Nelson J., J-M. Burkhart J. M et Autin L. 2008. Docking de protéines en Réalité Virtuelle : une approche hybride et multimodale. *2eme soumission à RSTI*. 1-32.
- [100] Anonyme : Développement d'un portail web pour le criblage virtuel sur la grille de calcul. [En ligne]. https://www.memoireonline.com/04/15/9022/m_Developpement-d-un-portail-web-pour-le-criblage-virtuel-sur-la-grille-de-calcul8.html#toc14. Consulté le [08/06/2022].
- [101] Anonyme : Récepteur : qu'est-ce que c'est ? [En ligne]. <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-recepteur-243/>. Consulté le [07/06/2022].
- [102] Shibata D., Slusarenko A., Casey R., Hildebrand D et Bell E. 1994. Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter*. **12**: 41.
- [103] Monge A. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat en Chimie Informatique. Université d'Orléans. France. 2006. 160p.
- [104] Merzoug A., Chikhi A., Bensegueni A., Boucherit H et Okay S. 2018. Virtual Screening Approach of Bacterial Peptide Deformylase Inhibitors Results in New Antibiotics. *Molecular Informatics*. **36** : 1-14.
- [105] Sousa S. F., Fernandes P. A et Ramos M. J. 2006. Protein ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*. **65** (1): 15–26.
- [106] Jain A. N. 2003. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *Journal of medicinal chemistry*. **46**(4): 499–511.
- [107] Welch W., Ruppert J et Jain A.N. 1996. Hammerhead: Fast, Fully Automated Docking of Flexible Ligands to Protein Binding Sites. *Chemistry & Biology*. **3**: 449-462.
- [108] Boucherit H. Etude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis* par diverses molécules. Mémoire de magister en Biochimie. Université Frères Mentouri Constantine 1. Algérie. 2012. 110p.

- [109] Anonyme: The Incremental Construction Method. [En ligne]. https://www.researchgate.net/figure/The-incremental-construction-method-A-The-ligand-stick-representation-carbon-in_fig3_281102169. Consulté le [13/06/2022].
- [110] Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R et Ferrin T. E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*. **161**(2): 269 - 288.
- [111] McGann M., Almond H. R., Nicholls A., Grant J. A et Brown F. K. 2003. Gaussian docking functions. *Biopolymers*. **68** (1):76-90.
- [112] McGann, M. 2011. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **51**(3): 578-596.
- [113] Sauton N., Lagorce D., Villoutreix B. O et Miteva M. A. 2008. MS-DOCK: accurate multiple conformation generator and rigid docking protocol for multi-step virtual ligand screening. *BMC Bioinformatics*. **9** :184.
- [114] Bitencourt F. G et De Azevedo W. F. 2019. Docking with SwissDock. *Docking Screens for Drug Discovery*. **30**: 189-202.
- [115] Bessadok A. La multiplicité de transport de la P-glycoprotéine : Etudes de modélisation comparative et de docking au sein de la famille des protéines ABC. Thèse de doctorat. Université pierre et marie curie. France. 2011. 188p.
- [116] Dar A. M et Mir S. 2017. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*. **8** (2): 1-3.
- [117] Anonyme: Protein Data Bank - Définition et Explications. [En ligne]. <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Protein-Data-Bank.html> . Consulté le [29/04/2022].
- [118] Anonyme : Protein Data Bank. [En ligne]. <http://www.pdb.org>. Consulté le [25/05/2022]
- [119] Anonyme : PDB. [En ligne]. <https://www.rcsb.org/structure/1N5X>. Consulté le [29/04/2022].

[120] Anonyme: About PubChem. [En ligne]. <https://pubchemdocs.ncbi.nlm.nih.gov/about> . Consulté le [29/04/2022].

[121] Kim S., Thiessen P. L., Bolton E. E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker B. A., Wang J., Yu B., Zhang J et Bryant S. H. 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*. **44** (1): 1202-1213.

[122] Anonyme: PubChem. [En ligne]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulté le [29/04/2022].

[123] Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions peptide deformylase –substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université Frères Mentouri, Constantine 1. Algérie. 2007. 126p.

[124] Anonyme: BioPharmics LLC. Computational Tools for Drug Discovery. [En ligne]. <https://www.biopharmics.com/>. Consulté le [01/06/2022].

[125] Anonyme: Open Babel: The Open Source Chemistry Toolbox. [En ligne]. http://openbabel.org/wiki/Main_Page. Consulté le [09/05/2022].

[126] Anonyme: Introduction to the Discovery Studio Visualizer. [En ligne]. http://www.adrianomartinelli.it/Fondamenti/Tutorial_0.pdf. Consulté le [01/06/2022].

[127] Jain A. N. 2003. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *Journal of Medicinal Chemistry*. **46**: 499-511.

[128] Merzoug A., Chikhi A., Bensegueni A., Boucherit H, Hioual K. S., Mokrani El H et Teniou S. 2012. Conception in silico de nouveaux antipneumocoques par l'inhibition de la peptide déformylase. *Les technologies de laboratoire*. **27**: 33-40.

[129] Merzoug A. Étude in silico de l'inhibition de la peptide déformylase. Thèse de magistère en Biochimie. Université Frères Mentouri Constantine 1. Algérie. 2012. 91p.

[130] Anonym: Lipinski's rule of five. [En ligne]. <https://dev.drugbank.com/guides/terms/lipinski-s-rule-of-five>. Consulté le [18/05/2022].

[131] Boucherit H, Chikhi A, Bensegueni A, Merzoug A, Hioual K .S et Mokrani E. 2013. L'amarrage moleculaire : une nouvelle approche pour lutter contre le developpement de la

tuberculose. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*. **7** (2) :133-149.

[132] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W et Feeney P. J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **46**: 3-26.

[132] Veber D. F ., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K. W et Kopple K. D. 2002. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. **45**: 2615-2623.

[133] Cecchelli R., Berezowski V., Lundquist S., Culot M., Renftel M., Dehouck M. P et Fenart L. 2007. Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery*. **6**(8): 650-661.

[134] Vieth M., Hirst J. D., Kolinski A et Brooks C. L. 1998. Assessing energy functions for flexible docking. *Journal of Computational Chemistry*. **19**: 1612-1634.

[135] Chikhi A et Bensegueni A. 2008. Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Free- war. *Journal of Computer Science and Systems Biology*. **1**: 081-086.

[136] Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Hioual K et 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

[137] Hioual K. S ., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Boucherit H., Mokrani El H., Teniou S et Merabti B. 2014. Successful challenge: A key step in infectious diseases treatment using computer-aided drug design. *International Journal of Biological Sciences and Applications*. **1**(1) : 11-14.

[138] Merzoug A. Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase. Thèse de doctorat en biochimie appliquée. Université Frères Mentouri , Constantine 1. Algérie. 2018. 100p.

- [140] Boudiaf K., Houcher Z., Sobhi W et Benboubetra M. 2010. Evaluation of Antioxidant and Anti-Xanthine Oxidoreductase Activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts. *Journal of Applied Biological Sciences*. **4** (1): 7-16.
- [141] Anonyme : Site actif : définition, explications. [En ligne]. <https://www.aquaportail.com/definition-12380-site-actif.html>. Consulté le [10/05/2022].
- [142] Gachelin G. ENZYMES - Site actif. [En ligne]. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/enzymes-site-actif/>. Consulté le [25/05/2022].
- [143] Sameer N., Goyal S. N., Prajapati C. P., Gore P. R., Patil C. R., Mahajan U. B., Sharma C., Talla S. P et Ojha S. K. 2017. Therapeutic potential and Pharmaceutical Development of Thymoquinone: A Multitargeted Molecule of Natural Origin. *Frontiers in pharmacology*. **8**: 1-19.
- [144] Rezaeinasab M., Benvidi A., Gharaghani S., Abbasi S et Zera H. R. 2019. Deciphering the inhibition effect of thymoquinone on xanthine oxidase activity using differential pulse voltammetry in combination with theoretical studies. *Enzyme and Microbial Technology*. **121**: 29-36.
- [145] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W et Feeney P. J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **46**: 3-26.
- [146] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W et Feeney P. J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **23**: 3-25.

Thème : Détermination de mode de liaison de la thymoquinone et ses dérivées contre la xanthine oxydoréductase avec la simulation informatique

Résumé

Notre travail, entre dans le cadre du mémoire de master, s'inscrit dans le courant de la recherche in silico des nouveaux inhibiteurs potentiels de la xanthine oxydoréductase (XOR) ; cible thérapeutique validée pour le traitement de la maladie de la goutte. Le logiciel de docking moléculaire Surflex-dock permet de simuler les interactions entre une cible enzymatique et différents ligands. Avec un pourcentage de 85% des valeurs de RMSD inférieures ou égales à 2 Å, on peut dire que Surflex-dock est assez performant et on peut l'utiliser en toute confiance pour étudier profondément le mécanisme d'inhibition de la XOR.

Dans cette étude, nous avons réalisé un docking basé sur la structure de la cible enzymatique avec le programme Surflex-dock d'une collection de 193 similaires de la thymoquinone issus de la PubChem ; afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme XOR plus affins et plus sélectifs que la TEI et la thymoquinone, inhibiteurs précédemment connu. Deux similaires : CID_129829816 et CID_132131050 avec des affinités égales à 6.96 et 6.82 M⁻¹ respectivement, sont considérés comme les meilleurs inhibiteurs potentiels de la XOR.

Enfin, l'application de la règle de *Lipinski* nous informe de manière positive sur les propriétés physicochimiques de ces deux inhibiteurs.

Mots clés : Xanthine oxydoréductase, la goutte, docking moléculaire, Surflex-dock, RMSD, règle de *lipinski*.

Devant le jury :

Présidente : HADEF Sawsen

M.A.A Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Promotrice : BOUCHERIT Hanane

M.C.B Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Examinatrice: MERZOUG Amina

M.C.A Centre.Univ.A.Boussouf - Mila