

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine1
Faculté des Sciences Exactes
Département de Chimie

N° d'ordre :

N° de série :

THÈSE

en vue de l'obtention du

Doctorat en Sciences

délivré par

L'Université Constantine 1

Option : Chimie Théorique

Présentée par

IKRAM HAMLAOUI

THÈME

**Etude théorique des réactions enzymatiques :
Cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de
nouvelles chalcones**

Soutenue le 20 / 05 /2014 devant le jury

H. MEHDIOUI	Professeur	Université Constantine3	Président
M.BENCHARIF	Professeur	E.N.S.C	Rapporteur
C. HOUÉE-LEVIN	Professeur	Université d'Orsay - Paris-Sud	Examineur
L. BENCHARIF	Professeur	Université Constantine 1	Examineur
R. BENCHERAJET	M.C.	Université Constantine 1	Examineur
T. BENLECHEB	M.C.	Université de Khenchela	Examineur

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine (LCMC) de l'Université Constantine 1, sous la direction de Madame Leïla BENCHARIF, professeur à l'Université Constantine 1, que je tiens à remercier pour m'avoir accueillie dans le laboratoire et d'avoir jugé ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Mustapha BENCHARIF, professeur à l'Ecole Normale Supérieure- Université Constantine 3, de m'avoir donné ce sujet qui correspond à mes souhaits, et de m'avoir encadrée. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté.

J'adresse mes remerciements à Monsieur H. MEHDIOUI, professeur à l'Hôpital Universitaire de Constantine, pour avoir accepté de présider le jury.

Je remercie Madame Chantal HOUEE-LEVIN, professeur à l'Université d'Orsay, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire lors de mes stages, ainsi que pour avoir accepté de juger mon manuscrit.

Je remercie également Madame Reguia BENCHERAIET, maître de conférence à l'Université Constantine 1 et Monsieur Tahar BENLECHEB, maître de conférence à l'Université de Khenchela, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Je suis reconnaissante à Monsieur Abdelghani MAY, maître-assistant au Département de Chimie pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci à tous les membres de mon laboratoire pour l'ambiance générale.

Table des matières

Introduction générale.....	1
I. Références.....	4
Xanthine Oxydase.....	6
I. Introduction.....	7
II. Distribution et Localisation.....	7
III. Structure de la xanthine oxydase.....	8
IV. Mécanisme d'action de la xanthine oxydase.....	9
V. La conversion XDH ↔ XO.....	12
VI. Rôle pathologique de la XO.....	14
VI.1 Rôle de la xanthine oxydase dans l'ischémie-reperfusion.....	14
VI.2 Rôle de la xanthine oxydase dans le diabète.....	15
VI.3 Rôle de la xanthine oxydase dans la maladie de la goutte.....	16
VII. Les inhibiteurs de la XO.....	18
VII.1 Allopurinol.....	20
VII.2 Fébuxostat.....	21
VII.3 Les folates.....	21
VII.4 Les polyphénols.....	22
VII.5 Les flavonoïdes.....	23
VIII. Références.....	25
In silico.....	31
I. Introduction.....	32
II. Interaction chalcones-xanthine oxydase.....	35
II.1 Interaction CHAL1-XO.....	35
II.2 Interaction CHAL2-XO.....	36
II.3 Interaction CHAL3-XO.....	36
II.4 Interaction CHAL4-XO.....	37
II.5 Interaction CHAL5-XO.....	38
II.6 Interaction CHAL6-XO.....	39

II.7	Interaction allopurinol-XO.....	39
III.	Propriétés pharmacocinétique ou Drug-Like	41
IV.	Calcul du spectre théorique de CHAL1	43
V.	Conclusion	48
VI.	Référence.....	49
In vitro	52
I.	Introduction.....	53
II.	Matériels et Méthodes utilisés	53
II.1	Irradiation.....	53
II.1.1	Appareillage.....	53
II.1.2	Mode Opérateur.....	54
II.2	Analyse des solutions irradiées	54
II.3	Incubation de CHAL1 et CHAL2 avec le peroxyde d'hydrogène.....	55
II.4	Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase	55
II.5	Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase en présence du Cytochrome C	55
II.6	Réaction de CHAL1 avec XO en présence de la xanthine	55
II.7	Suivi cinétique à 295 nm de la réaction X/XO en présence de CHAL1	56
III.	Résultats et Discussion	56
III.1	Radiolyse de CHAL1 et CHAL2	56
III.1.1	Spectres RMN et spectres IR.....	58
III.1.2	Incubation de CHAL1 et CHAL2 avec le peroxyde d'hydrogène	60
III.1.3	Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase.....	62
III.1.4	Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase en présence du Cytochrome C.....	68
III.1.5	Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase en présence de la xanthine.....	69
III.1.6	Suivi cinétique à 295 nm de la réaction de la xanthine avec la xanthine oxydase en présence de CHAL1 et CHAL2.....	73
IV.	Conclusion	77
V.	Références	78
	Conclusion Générale.....	79
	Annexe.....	82

I. Références.....85

Introduction générale

Les progrès réalisés ces dernières années dans la compréhension des événements induits par les différents facteurs de risque de plusieurs pathologies et leurs complications ont montré le rôle important du stress oxydant [1].

Ce phénomène est défini par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives d'oxygène (radicaux libres) et les défenses de l'organisme. Ces espèces produites peuvent altérer des cibles biologiques à savoir l'ADN et les membranes cellulaires [2]. Au niveau vasculaire par exemple, elles entraînent une activation endothéliale, une réponse inflammatoire et une prolifération des cellules musculaires lisses [3].

La xanthine oxydase est une des principales sources de ces radicaux libres [4]. Les dernières investigations ont révélé son implication dans plusieurs pathologies telles que le diabète [5], les problèmes cardiovasculaires [6], l'ischémie-reperfusion [7], l'hyperuricémie et la goutte [8]. L'inhibition de cette enzyme est une approche thérapeutique très utilisée dans le traitement ou la prévention de plusieurs maladies.

L'allopurinol est le premier inhibiteur de la xanthine oxydase [9] ; il appartient à la famille des purines. Cette molécule s'attache d'une manière compétitive à la xanthine oxydase en inhibant la production de l'acide urique. D'une manière générale, cet agent est utilisé dans le traitement de la goutte [10]. Les dernières études ont montré qu'il peut être aussi utilisé dans le traitement du diabète type 1 et également dans celui des problèmes cardiovasculaires [5, 11].

Malheureusement, l'administration de l'allopurinol chez certains patients a conduit au développement de quelques réactions allergiques connues par l' AIS (Allopurinol Intolerance Syndrome) [12]. Ces symptômes sont dus au métabolite secondaire de l'allopurinol appelé oxypurinol [13] qui joue aussi le rôle d'un inhibiteur compétitif de la xanthine oxydase. Une alternative pour le traitement de ce syndrome est la recherche de nouveaux composés sans cycle purine pour empêcher la formation de l'oxypurinol.

Le second inhibiteur est le fébuxostat (dérivé 2-arylthiazole), un inhibiteur sélectif de la xanthine oxydase [14]. En occupant le canal de l'enzyme conduisant au site actif, le fébuxostat bloque l'accès du substrat naturel de la xanthine oxydase, ce qui réduit la production de l'acide urique. Cette molécule inhibe à la fois les formes réduite et oxydée de la xanthine oxydase. Bien qu'il soit efficace sur l'hyperuricémie,

cet inhibiteur trouve des limites d'utilisation en cas d'insuffisance rénale sévère, de problème hépatique, et il est contre-indiqué chez les sujets de moins de 18 ans [15].

Cependant, la recherche de nouveaux composés capables d'inhiber d'une manière sélective la xanthine oxydase a fait l'objet de nombreuses études. La majorité des composés testés ont été extraits des plantes médicinales utilisées déjà comme remède pour certaines maladies provoquées par la xanthine oxydase. Les plus étudiés sont les polyphénols, les flavonoïdes, les coumarines..... Plusieurs inhibiteurs de cette enzyme ont été identifiés, mais leur affinité était insuffisante pour envisager un développement pharmacologique.

Dans ce contexte, nous avons testé l'effet de nouveaux composés, des chalcones quinoléiques [16], sur l'activité de la xanthine oxydase de formule générale $Ar_1-CH=CH-CO-Ar_2$ avec Ar_1 = noyau quinolye diversement substitué et Ar_2 = noyau phényle diversement substitué. Les études déjà menées sur ces composés montrent qu'ils possèdent une activité antibactérienne [17] et anticancéreuse [18]. Mais sont-ils antigoutteux ?

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse, nous avons essayé de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction de ces cétones α,β - insaturées avec la xanthine oxydase. Pour cela, nous avons utilisé la méthode du docking moléculaire. Nous avons évalué l'énergie d'interaction de ces ligands d'une part, et d'autre part, nous avons identifié les liaisons impliquées avec le site actif de l'enzyme. Nous avons entrepris ensuite une étude par suivi cinétique pour mesurer le degré d'inhibition de la xanthine oxydase.

Le manuscrit se présente de la manière suivante :

Dans un premier chapitre, nous présentons la xanthine oxydase, l'enzyme utilisée dans cette étude, avec sa structure, sa localisation dans l'organisme et son implication directe dans certaines pathologies.

Dans un second chapitre, nous décrivons la technique de modélisation que nous avons utilisée dans la détermination des interactions de la xanthine oxydase avec les ligands choisis. Et nous présentons les résultats obtenus.

Le troisième chapitre est consacré à l'évolution de l'activité inhibitrice des chalcones avec un groupement quinoléine vis-à-vis la xanthine oxydase. Nous avons fait précéder la conclusion par une discussion générale de nos résultats.

I. Références

- [1] Houée Levin. C, Sicard Roselli. C, Bergès. J, Chimie et Biochimie radicalaire, Edition Belin, 2005.
- [2] Favier. A, Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique, 2003 ; 108-115.
- [3] Shackelford. R. E, Kaufmann. W. K, Paules. R. S, Oxidative stress and cell cycle checkpoint Function, Free Radic Biol Med, 2000; 28:1387–404.
- [4] Kelley. E. E, Khoo. N. H, Hunley. N.J, Malik. U.Z, Freeman. B.A, Tarpey.M.M, Hydrogen Peroxide is the Major Oxidant Product of Xanthine Oxidase, Free Radic Biol Med, 2010; 48 (4): 493-498.
- [5] Suriyajothi. M.A, Sangeetha.R, Venkateswari.R, Activity of xanthine oxidase in Diabetics: Its correlation with aging, Pharmacologyonline, 2011; 2: 128-133.
- [6] Cai. H, Harrison. D.G, Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The role of oxidant stress, Circulation Research, 2000; 87:840-844.
- [7] Granger. D. N, Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury, Am J. Physiol Heart Circ Physiol, 1988; 255:1269-1275.
- [8] Bennesser Alaoui. H, Tazi Mezalek. Z, Harmouche. H, Aouni. M, Maaouni. A, La goutte : nouvelles recommandations, Espérance Médicale, 2010 ; 17 (166) : 119-133.
- [9] Biagi. G, Costantini. A, Costantino. L, Giorgi. I, Livi. O, Pecorari. P, Rinaldi. M, Scartoni. V, Synthesis and Biological Evaluation of New Imidazole, Pyrimidine, and Purine Derivatives and Analogs as Inhibitors of Xanthine Oxidase, J. Med. Ch, 1996 ; (39) 2529-2535.
- [10] Pillinger. M. H, Rosenthal. P, Abeles. A. M, Hyperuricemia and gout: new insights into pathogenesis and treatment, Bull NYU Hosp Jt Dis, 2007;65:215-21.
- [11] Cardillo. C, Kilcoyne. C. M, Cannon III. R.O, Quyyumi. A. A, Panza. J. A, xanthine oxidase Inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients, Hypertension, 1997; 30: 57-63.

- [12] Lioté. F, Van Reth. C, Les manifestations d'intolérance à l'allopurinol en 1996. In: Kahn. M. F, Kuntz. D, Dryll. A, Meyer. O, Bardin. T, Guérin. C, editors, L'Actualité Rhumatologique 1996. Paris: Expansion Scientifique Française; 1996. p. 328–37.
- [13] Galbusera. C, Orth. P, Fedida. D, Spector. T, Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase, *Biochemical Pharmacology*, 2006; 71: 1747-1752.
- [14] Malik. U. Z, Hundley. N. J, Romero. G, Radi. R, Freeman. B. A, Tarpey. M.M, Kelley. E.E, Febuxostat Inhibition of Endothelial-Bound XO: Implications for Targeting Vascular ROS Production, *Free Radic Biol Med*, 2011; 51(1): 179–184.
- [15] Perez Ruiz. F, Les nouveaux traitements de la goutte (New treatments for gout), *Revue du Rhumatisme*, 2007 ; 74 (7) 624-626.
- [16] Bouraiou. A, Synthèse d'hétérocycles quinoléiques à visée thérapeutique et d'analogues structuraux de produits naturels, Thèse soutenue 27 Mai 2009.
- [17] Hong. C. Y, Kim. Y. K, Chang. J. H, Kim. S. H, Choi. H, Nam. D. H, Kim. Y. Z, Kwak. J. H, *J. Med. Chem*, 1997; 40, 3584.
- [18] R. Rezig ; M. Chebah ; S. Rouati, Synthesis of Some Quinolyyl Aryl $\alpha\beta$ -unsaturated ketones, *J. Soc. Alg. Chem*, 2000; 10 (1) 111.

Xanthine Oxydase

I. Introduction

La xanthine oxydase (XO) est une molybdoflavoenzyme qui a été identifiée par Schardinger en 1902 [1]. Sa structure cristalline représentée sur la figure 1 a été déterminée en 2000 par Enroth et coll. [2]. Elle est obtenue par une transformation protéolytique de la xanthine déhydrogénase. En effet, on distingue deux types de xanthine oxydase dans les cellules, l'une la xanthine déshydrogénase (XD) et l'autre, la xanthine oxydase (XO), les deux enzymes étant interconvertibles.

La xanthine oxydase peut avoir plusieurs origines [3,4] dont la plus simple est celle obtenue par la purification du lait des bovins [5].

Depuis que McCord et Fridovich ont montré que la XO est une source de génération des radicaux libres [6], de nombreuses études ont été réalisées et montré son implication dans plusieurs pathologies telles que l'infection virale [7], l'inflammation [8], les tumeurs de cerveau [9], les problèmes cardiovasculaires [10] et dans le processus de l'ischémie-reperfusion [11]. Il est admis que cette dernière est à l'origine de l'ensemble des pathologies citées précédemment et à bien d'autres.

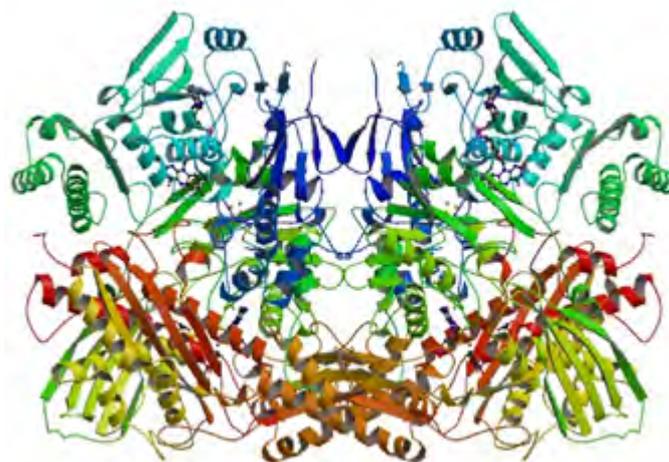


Figure 1. Structure cristalline de la xanthine oxydase (1fiq)

II. Distribution et Localisation

La distribution cellulaire de XO a été mise en évidence en 1981 par Jarasch et coll. [12] chez les bovins pour lesquels ils ont montré la présence de cette enzyme, en

particulier dans l'endothélium capillaire des cellules mammaires [12], en utilisant des anti-corps anti-bovins MFGM [13]. Parallèlement, chez l'homme, Moriwaki et coll. [14] ont mis en évidence la présence de la xanthine oxydase dans les cellules du tractus digestif et dans le foie en utilisant des anticorps polyclonaux anti-XO des cellules hépatiques. De leur côté, Linder et coll. [15] l'ont trouvé au niveau des hépatocytes, des cellules hépatiques, des entérocytes du jéjunum et des glandes mammaires par des biopsies tissulaires. D'autre part, l'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-XO du lait humain [15] indique la présence de XO dans les cellules endothéliales capillaires du jéjunum et dans le muscle squelettique. Des études microscopiques des cellules endothéliales humaines ont confirmé non seulement la présence de XO dans le cytoplasme, mais également dans la surface des cellules membranaires de manière asymétrique [16]. L'étude cytoplasmique montre que la XO est concentrée dans la région périnucléaire sous forme de vésicules dont le rôle reste inconnu [13].

III. Structure de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase est un homodimère ou complexe de protéines constitué de deux sous-unités identiques, de masse moléculaire de 290 kDa. Durant la catalyse de la dégradation des bases puriques, chacun des monomères agit seul [17]. Chaque sous-unité contient un dinucléotide adénine-flavine (FAD), deux clusters [2Fe-2S] et un atome de molybdène (Mo) [17]. Ce dernier est biologiquement inactif s'il n'est pas attaché au pyranoptérine [18]. Dans son état oxydé, le Mo se lie au pyranoptérine par une liaison dithiolène [19] formant une géométrie carrée pyramidale comme présenté sur la figure 2.

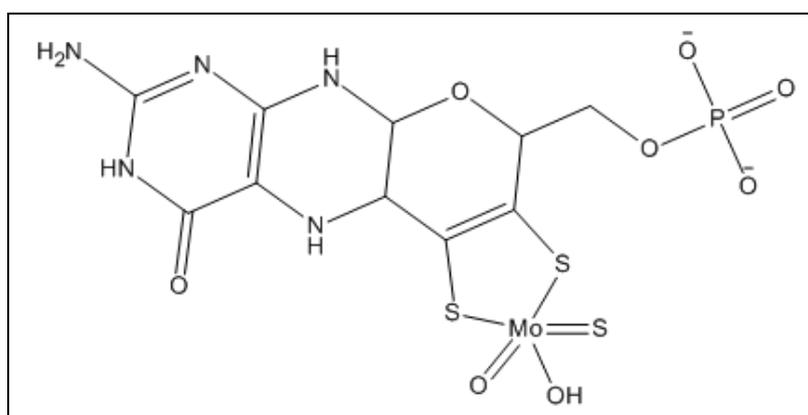


Figure 2. Structure du molybdoptérine

La xanthine oxydase possède deux sites actifs distincts, communiquant par une chaîne interne de transport d'électrons, utilisant les ponts de [2Fe-2S] [20] comme représenté sur la figure3.

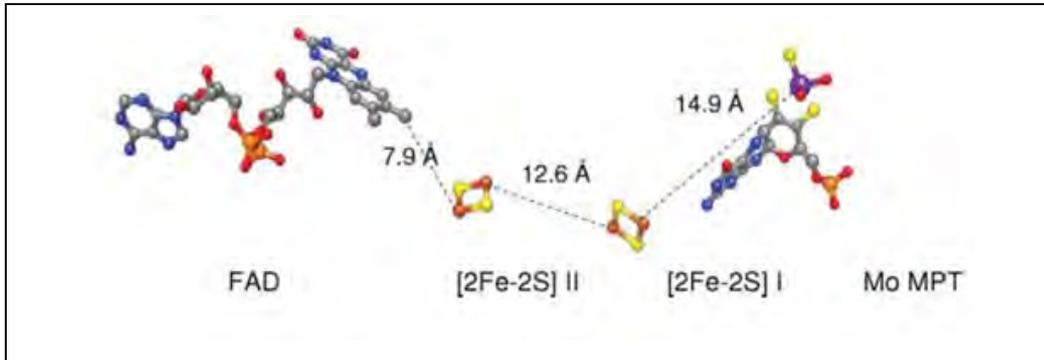


Figure 3. Transferts d'électrons du centre Mo vers le centre FAD en passant par les ponts [2Fe-2S]

Le gène qui code pour la xanthine oxydoréductase (XOR) humaine est localisé dans la bande p22 du chromosome 2 ; il est formé de 36 exons et 35 introns. Sa séquence, illustrée par le schéma 1, est de 1333 acides aminés ; elle est quasi homologue à celle de la XOR de la souris et du rat [21].



Schéma 1. La séquence de la xanthine oxydoréductase

IV. Mécanisme d'action de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme indispensable au métabolisme des purines [22]. Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique [23] comme le montre la figure 4.

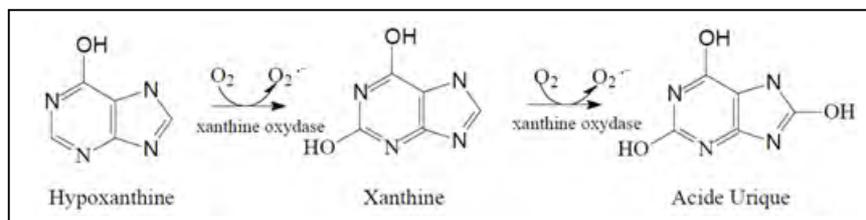


Figure 4. Le processus enzymatique catalysé par la XO

Le mécanisme d'action s'effectue en deux étapes représentées sur la figure 5.

- La première étape est une demi-réaction de réduction qui a lieu au niveau du centre Mo. Elle est caractérisée par la réduction de Mo(VI) en Mo(IV) et l'oxydation de la xanthine en acide urique. Pour continuer sa fonction catalytique, le molybdène perd les deux électrons.

Ces derniers sont transférés au centre FAD par l'intermédiaire des clusters Fe₂/S₂ [24]. Sachant que les centres Fe₂/S₂ peuvent être considérés comme des pompes d'électrons.

- La deuxième est une demi-réaction d'oxydation qui se déroule au centre FAD.

Dans cette étape, si la réaction est catalysée par la XDH, FADH₂ transfère les deux électrons au NAD⁺ pour donner NADH [25]. Si elle est catalysée par la XO, les électrons seront transférés à l'oxygène moléculaire O₂ pour produire le radical superoxyde (O₂^{•-}) d'une manière univalente, ou d'une manière bivalente en donnant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) [26]. Ce dernier forme, par les réactions de Fenton et/ou Haber-Weiss, le radical hydroxyle (OH[•])[27].

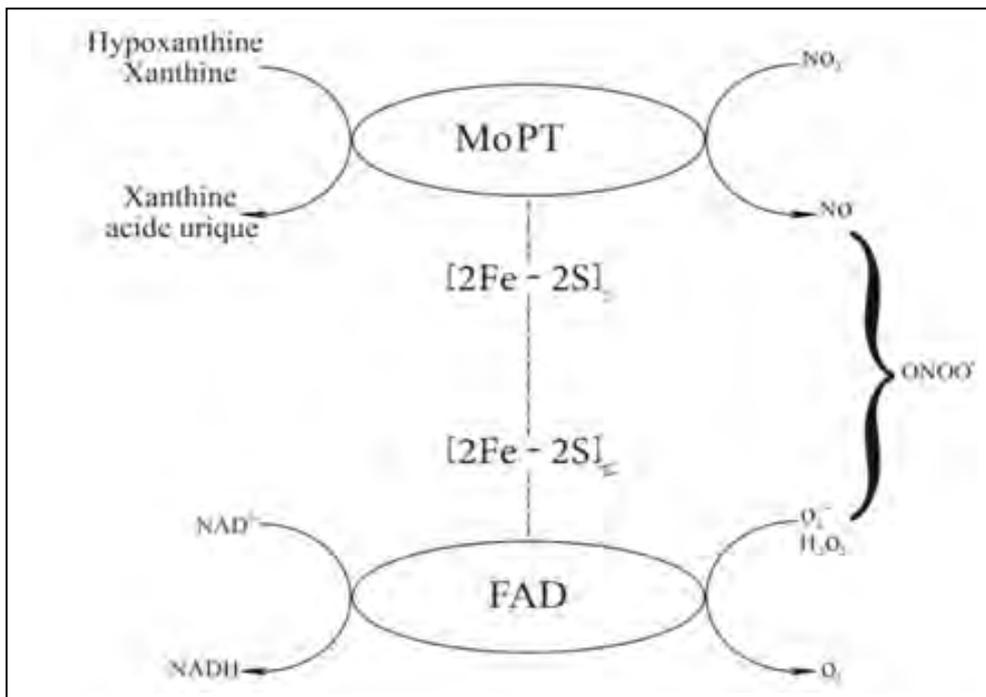


Figure 5. Représentation du mécanisme réactionnel de la XO

Il est important de signaler que les deux étapes citées précédemment peuvent être observées par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible. Dans son état oxydé, le spectre de la XO est caractérisé par une bande d'absorption entre 400 et 500 nm. Cette bande est attribuée au centre FAD et aux deux centres [2Fe-2S] [28].

A son état réduit, nous constatons la disparition de cette bande comme le montre la figure 6. Sous atmosphère d'air, la xanthine oxydase est rapidement réoxydée.

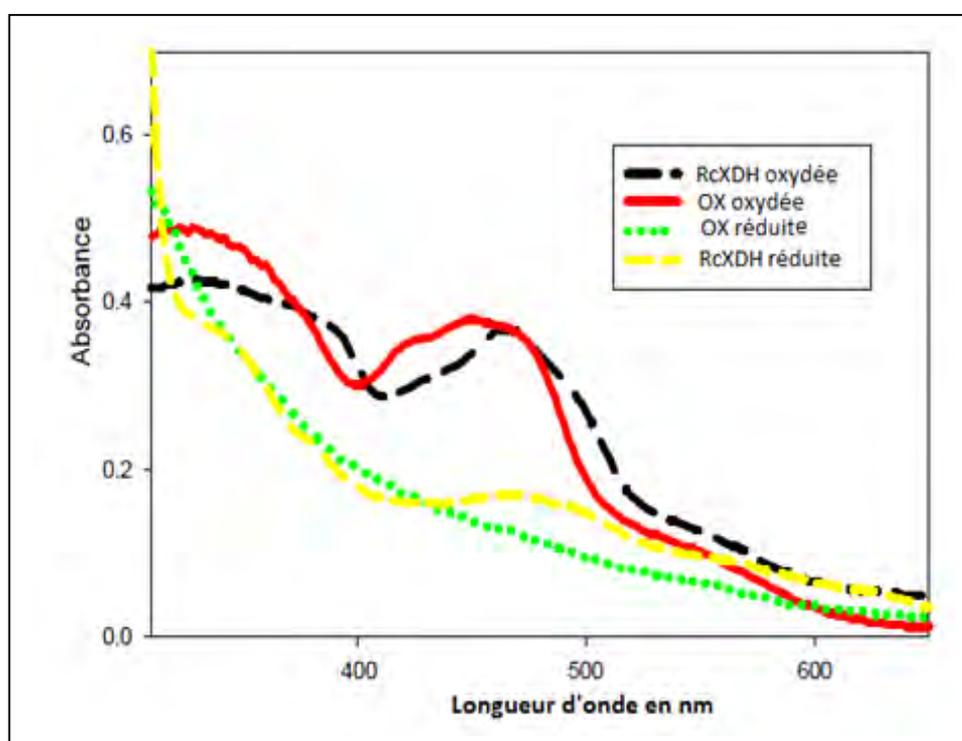


Figure 6. Spectre d'absorption de la XO de bovin et de la XDH de *Rhodobacter capsulatus* (Thèse d'Amy. L Stockert, université d'Ohio 2004)

La XOR fonctionne de la même manière que le NADH oxydase et la NO synthase (NOS) [29]. En présence de nitrite (NO_2^-) et la xanthine ou le NADH, la xanthine oxydase produit NO^\cdot au niveau du site Mo [30]. Ce radical se lie au radical superoxyde

$O_2^{\cdot -}$ produit par le site FAD pour donner une molécule oxydante non radicalaire très toxique : le peroxyxynitrite (ONOO⁻) [31] comme le montre la Figure 6.

Le mécanisme réactionnel de la xanthine oxydase est un bi-bi ping-pong typique [32,33] ; nous pouvons le résumer par la représentation de Cleland comme le montre la figure 7.

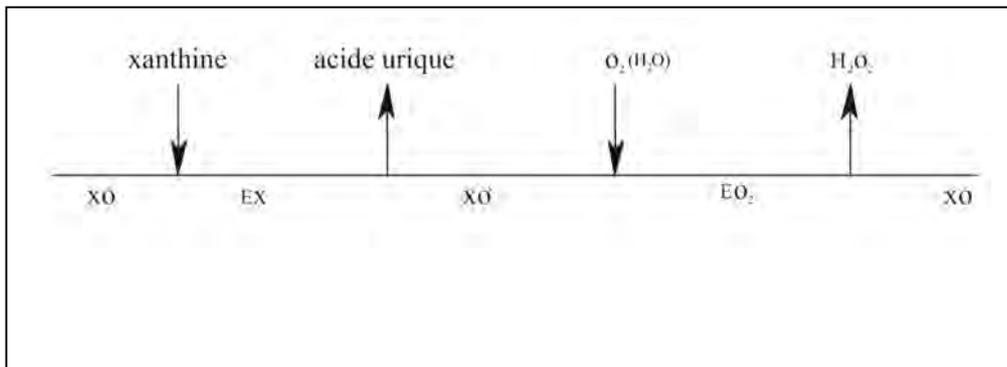


Figure 7. Représentation du mécanisme bi-bi ping-pong de la xanthine oxydation selon la notation de Cleland.

La xanthine se fixe sur l'enzyme et donne le premier produit qui est l'acide urique ; ensuite l'oxygène se fixe comme un second substrat et produit le radical superoxyde, sachant que la xanthine oxydase utilise l'eau comme source d'oxygène, plutôt que l'oxygène moléculaire [34].

V. La conversion XDH ↔ XO

La xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO) sont deux formes différentes du même métaloflavoenzyme utilisée dans l'oxydation des bases purines [35]. Au centre Mo, les deux formes catalysent l'oxydation de la xanthine en acide urique de la même manière. Au centre FAD, la XDH préfère utiliser le NAD⁺ comme accepteur d'électrons ; par contre, la XO utilise l'oxygène moléculaire.

L'analyse d'une solution de XDH fraîchement préparée à partir d'organe mammifère montre que l'activité réductase xanthine/NAD⁺ est plus élevée que celle xanthine/O₂ même en présence de l'oxygène [36].

Des études menées par C. Enroth et coll. [2] sur la structure cristalline de la XDH protéolysée par la pancréatine ont montré que les acides aminés responsables de la conversion de la XDH en XO se trouvent dans le site FAD du site actif. Lors de la conversion, la chaîne latérale du Phe549 se rapproche de celle d'Arg427 (figure 8). Cette transition permet à la chaîne latérale de l'Arg426 de se lier au C6 du FAD à la place de la chaîne latérale de l'Asp429, changeant ainsi le potentiel électrostatique autour du centre FAD. Ce processus entraîne un déplacement de plusieurs acides aminés de 20Å par rapport à leur position initiale. La nouvelle position de Gln423---Lys433 bloque l'accès du NAD⁺ au centre FAD, impliquant une conversion irréversible de la XDH en XO [37].

In vitro, la conversion de la XDH en XO est associée à l'oxydation des groupements thiols qui induit une génération importante des radicaux superoxyde. Le retour de la balance redox cellulaire vers les potentiels négatifs convertirait la XO en XDH.

In vivo, le caractère réversible de cette conversion induit la production de la XO donnant des radicaux superoxyde nocifs. Demeure un problème non encore résolu à notre connaissance [38].

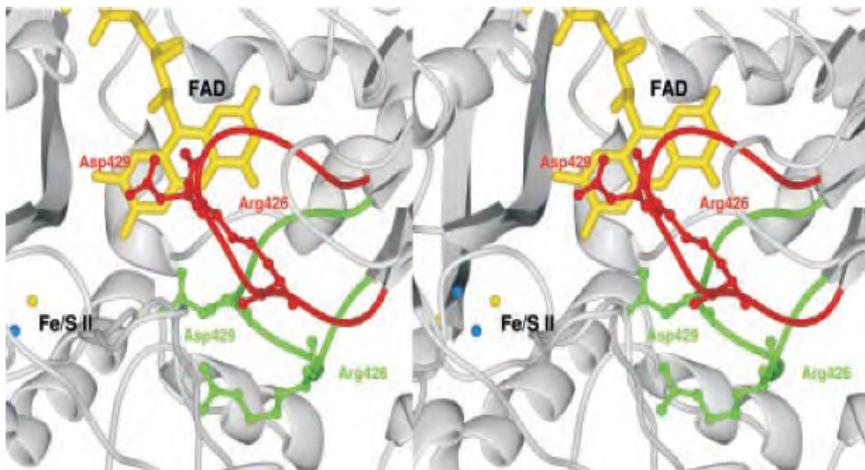


Figure 8 : Représentation stéréochimique du centre FAD lors de la conversion de la XDH en XO. Enroth *et al.* (2000) *PNAS* **97**, 10723-10728.

VI. Rôle pathologique de la XO

Physiologiquement, la XO est impliquée dans plusieurs réactions chimiques telles que l'oxydation des purines, des ptérines, des hétérocycles aromatiques et des aldéhydes aliphatiques ou aromatiques [22]. Ainsi, elle contribue à l'activation et à la désintoxication des composés endogènes et des xénobiotiques [39].

Plusieurs études ont montré que la sécrétion de la XO est réglée en près et post-transcription par le peroxyde d'hydrogène et le calcium [40]. Au niveau des cellules endothéliales hypoxiques, la XO est phosphorylée par le p38 MAP Kinase et la caséine kinase II. Ceci est nécessaire pour l'activation de l'enzyme au cours de l'hypoxie [41]. La XO est utilisée comme marqueur dans l'insuffisance hépatique et les lésions intestinales [42]. Elle joue aussi le rôle de médiateur incriminé dans la lésion d'organes dans plusieurs physiopathologies à savoir l'ischémie-reperfusion hépatique, choc hémorragique, l'athérosclérose et la drépanocytose [43], comme nous allons le présenter sur le paragraphe suivant.

VI.1 Rôle de la xanthine oxydase dans l'ischémie-reperfusion

A la fin des années 80, Granger et coll. [44,45] ont remarqué que la lésion intestinale ischémique apparue en reperfusion est atténuée en présence du superoxyde dismutase.

A partir de cette observation, le phénomène d'ischémie-reperfusion a été expliqué par l'hypothèse représentée sur la figure 9.

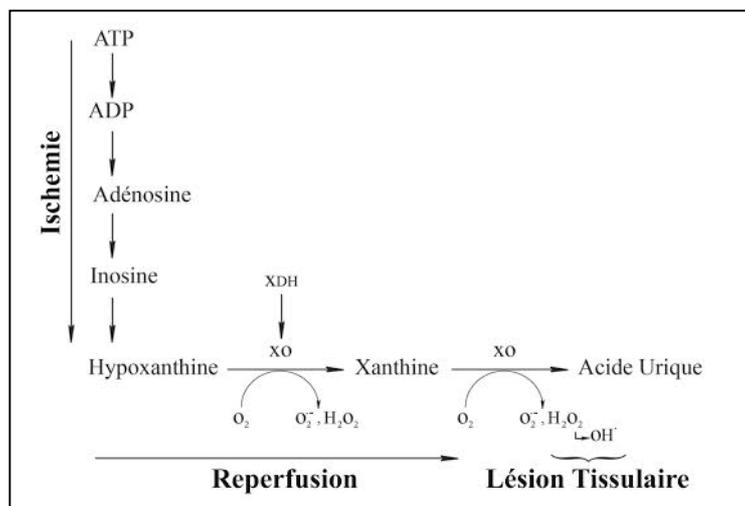


Figure 9. Le processus d'ischémie-reperfusion

Durant l'ischémie, l'augmentation du gradient ionique transmembranaire provoque l'augmentation du calcium cytosolique. Ceci implique l'activation des protéases Ca^{+2} dépendant qui sont responsables de la conversion irréversible de la XDH en XO. Parallèlement, on note l'accumulation de l'hypoxanthine produite par le catabolisme de l'ATP.

Lors de la reperfusion, la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique produisant ainsi le radical superoxyde. Ce dernier se réduit en peroxyde d'hydrogène provoquant la lésion tissulaire.

Ce processus est responsable d'un dysfonctionnement endothéliale observé dans les accidents cérébraux et cardiovasculaires.

VI.2 Rôle de la xanthine oxydase dans le diabète

Le diabète désigne un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie résultant du défaut de la sécrétion ou de l'action de l'insuline, ou les deux conjuguées [46]. La majorité (90%) des états diabétiques est constituée par une maladie assez mal définie, longtemps asymptomatique, qui survient après la cinquantaine. Ceci est connu par le diabète de type II. A l'opposé du précédent, le diabète de type I est beaucoup plus rare. Il s'agit d'une affection bruyante reconnu par des signes cliniques souvent intense (polyurie, polydipsie, amaigrissement...) et survenant dans l'enfance et l'adolescence ou chez l'adulte jeune [47].

Il existe d'autres formes de diabète telles que le diabète gestationnel, le diabète génétique et le diabète secondaire à une prise de certains médicaments ou à une pancréatite.

Depuis 2000, l'équipe de Paolo Meda [48] a émis une nouvelle hypothèse qui repose sur l'idée que l'anomalie de la sécrétion de l'insuline dans le diabète de type II n'est pas due au dysfonctionnement des cellules β , mais peut être le résultat d'une désynchronisation entre elles [48]. Ce comportement est attribué à la connexine 36(Cx36), une protéine transmembranaire qui se trouve exclusivement sur les cellules β du pancréas et sur certains neurones, et qui permet l'échange des signaux chimiques entre ces cellules [49].

Le diabète est responsable d'un taux élevé de complications dégénératives à savoir la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie et les accidents cardiovasculaires et cérébraux [50]. Ces complications sont dues à un déséquilibre entre la production des radicaux libres responsables de l'oxydation des cellules, et la production des antioxydants issus du système de défense. Ce problème a été longtemps attribué à des facteurs exogènes tels que le tabac et la pollution et/ou endogènes tels que l'inflammation et l'activité de certaines enzymes (la xanthine oxydase, les prostaglandines (PG), NADH oxydase et l'acyl-coA oxydase).

Les dernières études ont démontré que la plupart des lésions tissulaires apparaissent au voisinage de XO. A partir de cette idée, Suriyajothi et coll. [51] ont établi le lien entre le diabète et l'activité de cette enzyme. Ils ont montré que l'activité de la xanthine oxydase est augmentée chez les sujets diabétiques par rapport aux non-diabétiques. Cette augmentation est plus élevée chez les sujets âgés. Ils ont remarqué aussi que l'activité de la XO est plus significative dans le foie et l'intestin. Ils ont signalé que le taux d'acide urique est le même chez les diabétiques. Ils concluent alors que les radicaux libres produits par la XO sont responsables des complications du diabète. A titre indicatif, ils suggèrent que la XO peut être utilisée comme un des marqueurs du diabète.

VI.3 Rôle de la xanthine oxydase dans la maladie de la goutte

L'arthropathie microcristalline est caractérisée par la formation de cristaux à l'intérieur de l'articulation entraînant des crises d'arthrite chroniques telle que la goutte [52].

Cette maladie était déjà connue dans l'antiquité. Les Grecs l'ont nommée « podagre », ce mot signifiant « prise au piège par le pied », le mot goutte n'étant apparu que vers le IX^{ème} siècle. Dans l'antiquité, les médecins pensaient qu'un poison contenu dans les humeurs pénétrait goutte à goutte dans les jointures. En 1854, Garrod a émis l'existence d'une substance dans le sérum des goutteux qui pénètre dans les articulations et induit l'inflammation [53].

En 1961, McCarthy et Hollander ont découvert que cette substance est l'acide urique [54].

Cet acide dérive de deux sources :

- le catabolisme des acides nucléiques alimentaires et cellulaires,
- le catabolisme des purines.

Dans l'organisme, le catabolisme des purines représenté par le schéma 2 est la voie principale de génération de l'acide urique. Il est obtenu via l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase. Au niveau plasmatique et en présence de métaux alcalins (Na^+ , K^+), l'acide urique se trouve sous forme de cristaux d'urate (figure 10).

En cas :

- d'hyperproduction d'acide urique induit par les mécanismes suscités ($> 70\text{mg/l}$),
- de diminution de la destruction ou de l'élimination urinaire,
- ou les deux mécanismes à la fois,

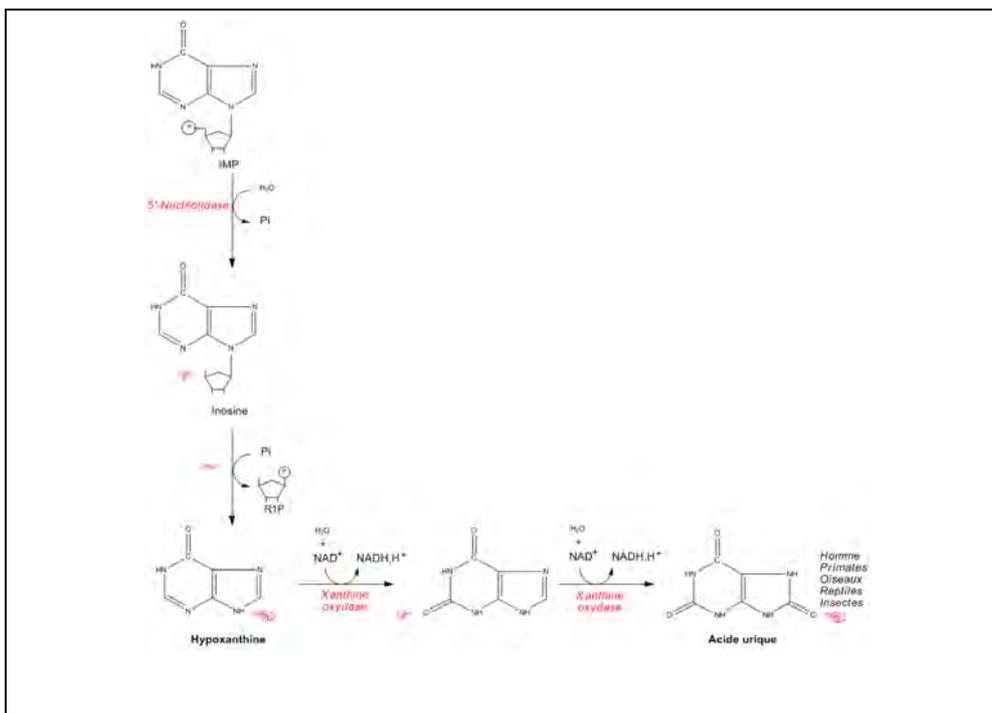


Schéma 2. Rôle de la xanthine oxydase dans le catabolisme des purines. (Moussard. C, Biochimie Structurale et métabolique, Edition de boeck, 2006).

L'urate forme des microcristaux peu solubles à basse température. Alors, ils se déposent au niveau des articulations périphériques ou bien sur des organes peu ou non vascularisés comme le cartilage et les tendons. Au niveau des reins, l'apparition des lithiases uriques est due à l'acidité urinaire [55].

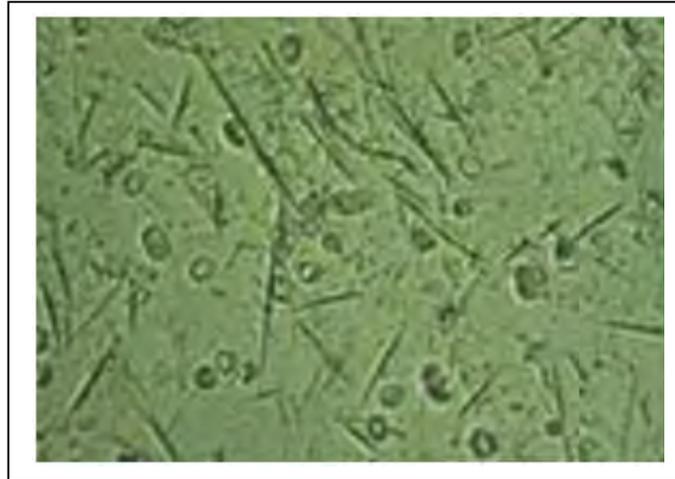


Figure 10. Cristaux d'urate qui s'accumulent au niveau des articulations et provoquent la goutte

Le traitement de plusieurs pathologies fonctionnelles peut être efficace s'il y a inhibition de la xanthine oxydase. Les inhibiteurs les plus connus de la XO sont utilisés dans le traitement de la goutte. Cependant, d'autres pathologies peuvent régresser par réduction simultanée du taux de l'acide urique et de celui du radical superoxyde dans les cellules humaines. Dans la littérature, il est rapporté plusieurs types d'inhibiteurs comme nous allons l'évoquer dans le paragraphe suivant.

VII. Les inhibiteurs de la XO

Le premier remède utilisé contre le rhumatisme musculaire articulaire est la colchicine (figure 11), une molécule isolée du bulbe et des graines du colchique (figure 12). Bien qu'elle fût efficace contre l'inflammation goutteuse, elle était incapable de diminuer le taux élevé de l'acide urique [56]. En 1951, Gutman et coll. ont mis au point le premier hypo-uricémiant appelé probénécide (figure 13). Son mode d'action est basé sur l'inhibition de la réabsorption tubulaire des urates [57]. Cependant, pour

avoir des résultats meilleurs, les recherches sont dirigées vers l'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase.

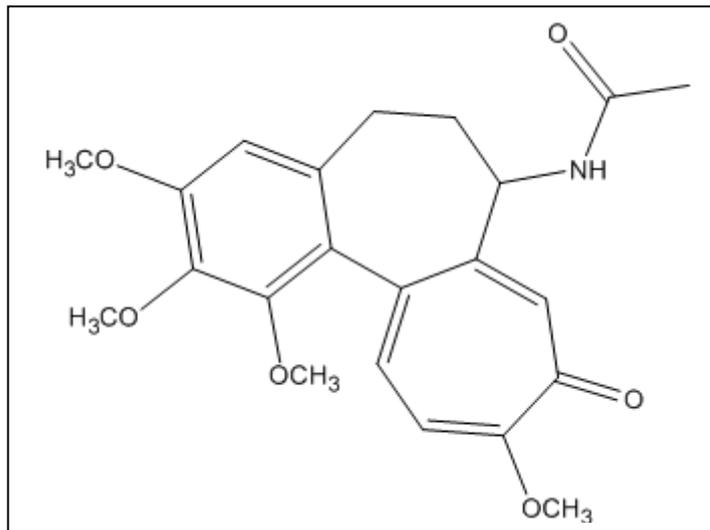


Figure11. Structure de la colchicine



Figure 12. Le colchique

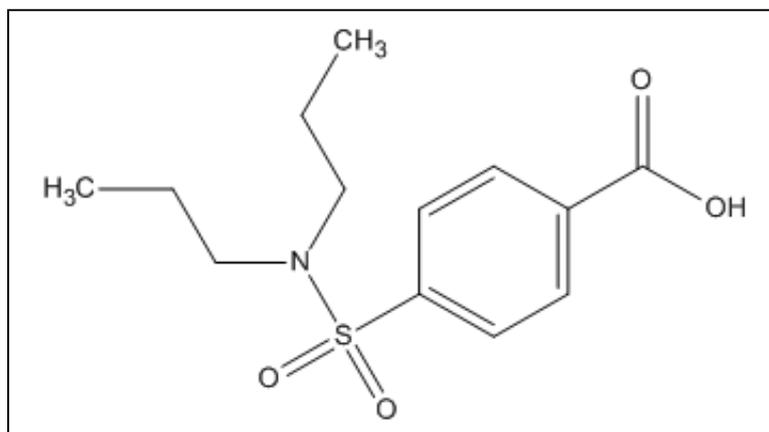


Figure 13. Structure du probénécide

Les inhibiteurs de la XO sont soit des composés purines tels que l'allopurinol et l'oxypurinol, ou bien non purines tels que le fébuxostat comme le décrit le paragraphe suivant.

VII.1. Allopurinol

Depuis 1963 à ce jour, l'allopurinol (figure 14) est le traitement le plus efficace de la goutte [58,59]. Son analogie structurale avec la xanthine et l'hypoxanthine lui permet d'être un inhibiteur compétitif de la XO. Lors de sa réaction avec la xanthine oxydase, il se transforme en oxypurinol (alloxanthine), métabolite actif agissant lui-même comme inhibiteur de la XO.

En 1970, il a été démontré que durant sa conversion en oxypurinol, l'allopurinol produit des radicaux superoxyde. En 2006, Galbusera et coll. non seulement ont confirmé le résultat précédent, mais ont trouvé que la quantité du superoxyde produite est similaire à celle obtenue par la réaction xanthine/xanthine oxydase. Ils concluent alors que l'inhibition des radicaux observée in vitro et in vivo est attribuée à son métabolite, l'oxypurinol [60].

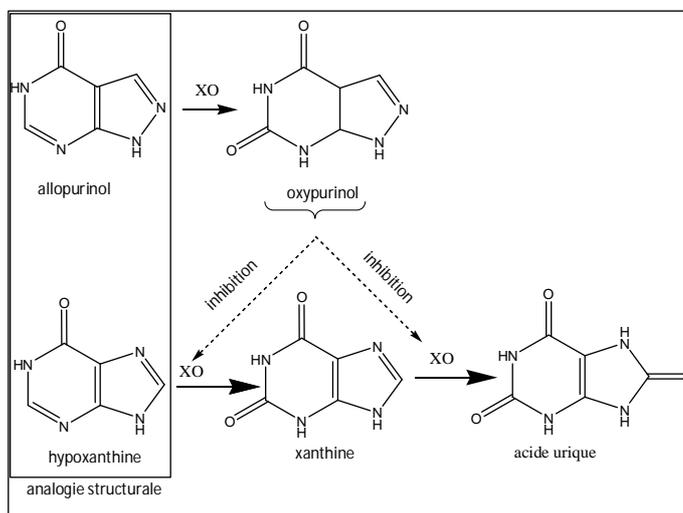


Figure 14. Effet de l'allopurinol sur la réaction de la xanthine oxydase

VII.2. Fébuxostat

L'année 2006 a été marquée pour le traitement de la goutte par l'apparition d'un nouveau médicament. Il s'agit de l'acide 2-[3-cyano-4-isobutoxyphenyl]-4-méthylthiazole-5-carboxylique appelé fébuxostat (figure 15) [61,62], un inhibiteur sélectif de la XO. Contrairement à l'allopurinol, il peut s'attacher à la forme oxydée ou réduite du molybdène. En 2009, Edward et coll. [63] ont confirmé son effet puissant sur la goutte par rapport à l'allopurinol. Nous trouvons que ce produit n'a pas assez de recul pour juger son efficacité et ses effets secondaires probables qui peuvent être observés à long terme.

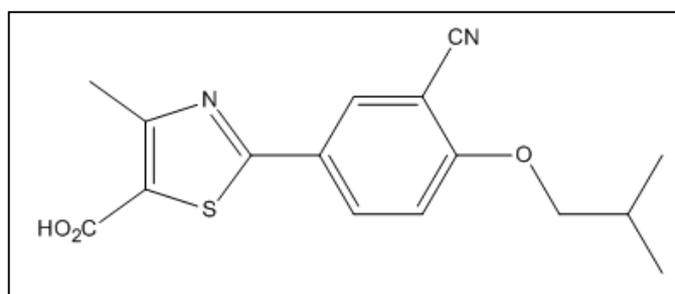


Figure 15. Structure du Fébuxostat

In vitro, plusieurs composés agissent sur l'activité de la xanthine oxydase. Par conséquent, ils peuvent régesser la maladie de la goutte tels que les folates, les polyphénols ou les flavonoïdes.

VII.3. Les folates

En 1984, A.S.Lewis et coll. ont testé l'effet de la méthotrexate et des composés folates sur l'activité de la XO. Ils ont suggéré que les folates sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase avec une constante d'inhibition (IC) inférieure à celle obtenue par l'allopurinol [64].

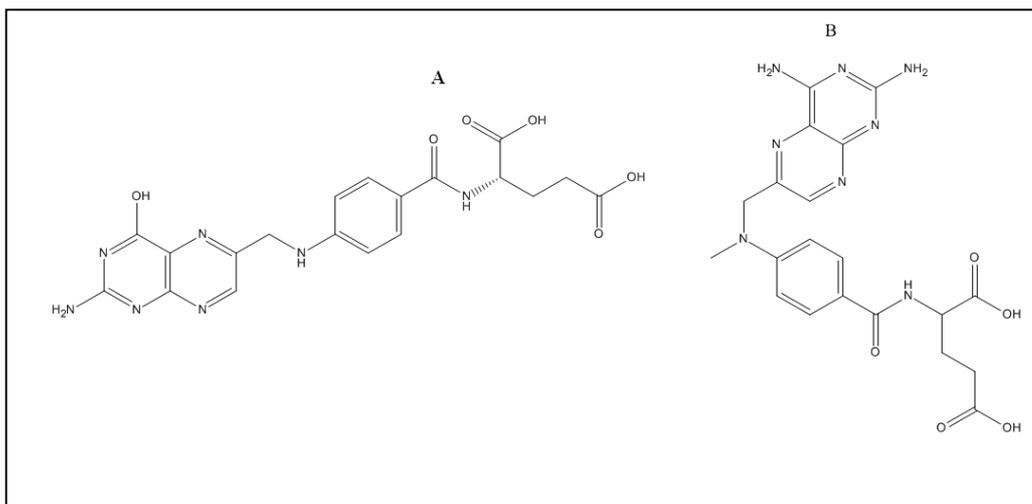


Figure 16. Structure de l'acide folique (A) et le méthotrexate (B)

VII.4. Les polyphénols

En 1999, dans une étude menée sur 26 espèces chimiques extraites de 18 familles de plantes utilisées comme remède contre la goutte, P. Owen et coll. [65] ont montré que ces plantes inhibent l'activité de la xanthine oxydase. Ils ont suggéré qu'il y a une corrélation entre l'activité inhibitrice de ces plantes et leur teneur en polyphénols et en tanins.

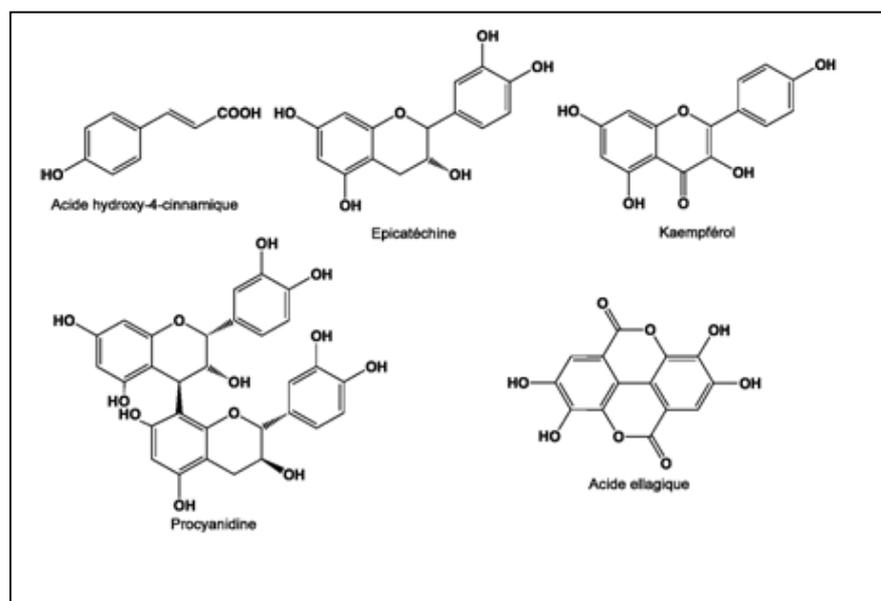


Figure 17. Structure chimique de quelques composés polyphénols

VII.5. Les flavonoïdes

En 1994, Hanasaki et coll. ont montré que cette famille de composés agit sur l'activité de la xanthine oxydase en inhibant à la fois la production de l'acide urique et celle du radical superoxyde [66]. En 1998, Cos et coll. [67] ont confirmé ce résultat et ont établi une relation entre la structure chimique de ces composés et leur pouvoir inhibiteur.

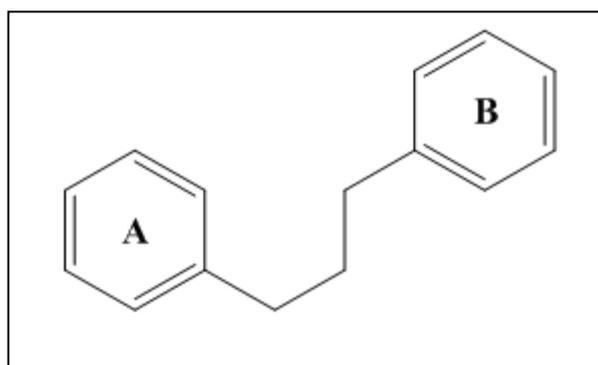


Figure 18. Structure de base des flavonoïdes

Au niveau de notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à une nouvelle famille de composés. Il s'agit des composés portant la fonction cétone α,β -insaturée (figure 19). Des dérivés de la quinoléine sont connus pour leurs activités antibactérienne [68] et anticancéreuse [69] et la particularité de cette famille de composés réside dans sa diversité en pharmacophores.

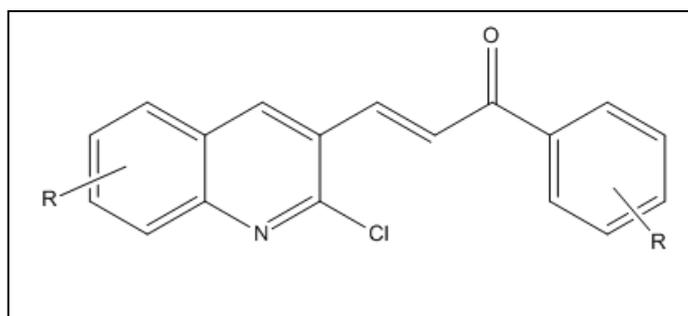


Figure 19. Structure du composé cétone quinoléique α,β -insaturée

Les composés testés dérivent de la chaconone, comportant un noyau quinoléique et un aryle différemment substitués. Depuis la découverte de l'activité antipaludique de la quinine en 1638 [70], les dérivés quinoléiques sont devenus des précurseurs

essentiels pour la synthèse de composés thérapeutiques. Les chalcones sont également connues pour leur activité inhibitrice de la xanthine oxydase.

Ces données probantes nous ont suggéré à tester l'activité antigoutteuse et anti-radicalaire de six nouveaux dérivés de la quinoléine élaborés au sein du Laboratoire des Substances Naturelles d'Origine Végétale et de Synthèse Organique de l'Université Constantine 1.

Notre démarche consistera d'abord à prédire par la méthode du docking moléculaire, la conformation active et l'orientation relative de chacune de ces molécules par rapport à la cible d'intérêt, la xanthine oxydase (Test In Silico). Ensuite, nous suivrons la réaction de ces ligands avec l'enzyme choisie par spectrophotométrie d'absorption (Test In Vitro).

VIII. Références

- [1] Schardinger. F, Über das Verhalten der Kuhmilch gegen Methyleneblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. *Untersuchung Nahrungs Genussmittel*, 1902; 5: 1113-1121.
- [2] Enroth. C, Eger. B. T, Okamoto. K, Nishino. T, Pai. E. F, Crystal Structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000 ; 97: 10723-10728.
- [3] Bray. R, Molybdenum iron-sulfur hydroxylases and related enzymes, New York. Academic. Press, 1975; 299-419.
- [4] Waud. W, Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent forms of rat liver xanthine dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys*, 1976; 354-364.
- [5] Massey. V, Harris. C. M, Milk xanthine dehydrogenase: the first one hundred years, *Biochem. Soc. Trans*, 1997; 25: 750-755.
- [6] McCord. J.M, Fridovich. I, The reduction of cytochrom c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem*, 1968; 243: 5753-5760.
- [7] Akaike. T, Dependence on O₂- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice, *J. Clin. Invest*, 1990; 739-745.
- [8] Blake. D.R, Stevens. C.R, Sahinoglu. T.M, Ellis. G, Gaffney. K, Edmonds. S, Benboubetra M, Harrison. R, Jawed. S, Kanezler. J, Miller. T.M, Winyord. P.G, Zhang. Z, Xanthine oxidase: Four roles for the enzyme in rheumatoid pathology, *Biochem. Soc. Trans*, 1997; 25: 812-816.
- [9] Kokoglu. E, Xanthine oxidase levels in human brain tumors, *Cancer. Lett*, 1990; 179-181.
- [10] Griendling. K.K, Sorescu.D, Ushio-Fukai. M, NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease, *Circ. Res*, 2000; 86:494-501.
- [11] Granger.D.N, McCord. J.M, Parks. D.A, Hollwarth. M.E, Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine, *Gastroenterology*, 1986; 90:80-84.

- [12] Jarasch. E. D, Localisation of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium, *Cell*, 1981; 25: 67-82.
- [13] Roger. H, structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?, *Free Radical and Medicine*, 2002; 33: 774-797.
- [14]Moriwaki. y, Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human tissues, *Acta. Histochem. Cytochem*, 1996; 153-162.
- [15] Linder. N, Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues, *Lab. Invest*, 1999; 967-974.
- [16] Rouquette. M, Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture, *FEBS. Lett*, 1998 ; 551-960.
- [17] Olson. J. S, Ballou. D. P, Palmer. G, Massey. V, *J. Biol. Chem*, 1974 ; 249 :4363-4382.
- [18] Al-Omar. M, El-Subbagh. H.I, Beedhan.C, Smith. J, Role of Molybdenum Hydroxylases in Diseases, *Saudi. Pharmaceutical. Journal*, 2005; 13:1-13.
- [19] Eun-Young. C, Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase, *J. Inorg. Biochem*, 2004; 841-848.
- [20] Cao.H, Pauff. J. M, Hille. R, Substrate Orientation and Catalytic Specificity in the action of xanthine oxidase: The Sequential Hydroxylation of Hypoxanthine to uric acid, *J. Biol.Chem*, 2010; 36: 28044-28053.
- [21] Xu. P, Huecksteadt. T, Harrison. R, Hoidal. J.R, Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1994; 199: 998-1004.
- [22] Moussard. C, *Biochimie Structurale et métabolique*, Edition de boeck, 2006.
- [23] Escribano. J, Garcia-Canovas. F, Garcia-Carmona. F, A kinetic Study of Hypoxanthine oxidation by milk xanthine oxidase, *Biochem. J*, 1988; 254: 829-833.
- [24] Hille. R, Anderson. R.F, Electron transfer in milk xanthine oxidase as studied by pulse radiolysis, *J. Biol. Chem*, 1991; 266: 5608-5615.
- [25] Hille. R, Massey. V, Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase, *J. Biol. Chem*, 1981; 256: 9090-9095.

- [26] Kelley. E. E, Khoo. N. H, Hunley. N.J, Malik. U.Z, Freeman. B.A, Tarpey.M.M, Hydrogen Peroxide is the Major Oxidant Product of Xanthine Oxidase, *Free Radic Biol Med*, 2010; 48 (4): 493-498.
- [27] Grieve. D. J, Byrne. J. A, Cave. A.C, Role of oxidative stress in cardiac remodelling after myocardial infarction, *Heart. Lung Circ*, 2004; 13: 132-138.
- [28] Amy L. Stockert, "Thèse de doctorat" In the Graduate School of The Ohio State University, 2004.
- [29] Zhang. Z, Naughton. D, Winyard. P.G, Benjamin. N, Blake. D.R, Symons. M.C.R, Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1998; 249: 767-772.
- [30] Cai. H, Harrison. D.G, Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The role of oxidant stress, *Circulation Research*, 2000; 87:840-844.
- [31] Godber. B.L.J, Doel. J.J, Durgan. J, Eisenthal. R, Harrison. R, A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase, *FEBS Lett*, 2000; 475, 93-96.
- [32] Chapter3, In vitro and in silico inhibition studies on xanthine oxidase with tea polyphénols, University of PRETORIA, 58-89.
- [33] Louisot. P, *Biochimie Générale et médicale/ structurale, métabolique et sémiologique*. Villeurbanne/Paris : Simep 1983.
- [34] Coi. E. Y, Stockert. A. L, Leimkühler. S, Hille. R, Studies on mechanism of action of xanthine oxidase, *J. Inorg. Bioch*, 2004; (98): 841-848.
- [35] Hille. R, *Chem. Rev*, 1996 ; 96 : 2757–2816.
- [36] Nishino. T, Okamoto. K, Kawaguchi. Y, Hori. H, Matsumura. T, Eger.B.T, Pai. E.F, Nishino, Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: Identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant, *J. Biol. Chem*, 2005; 280: 24888-24894.
- [37] Massey. V, Schopfer. L. M, Nishino. T, Nishino. T, *J. Biol. Chem*, 1989 ; 264 : 10567–10573.

- [38] Deby. C, Deby-Dupont. G, L'oxygène et la vie : Tome1- Initiation au métabolisme de l'oxygène, Université de Liège- Centre de l'oxygène, Recherche et Développement (CO2RD).
- [39] Pcher. P, Nivorozhkin. A, SzabÓ. C, Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol, *Pharmacol. Rev*, 2006; 58:87-114.
- [40] McNally. J. S, Saxena. A, Cai. H, Dicalov. S, Harrison. D. G, Regulation of xanthine oxidoreductase Protein Expression by Hydrogen peroxide and Calcium, *Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol*, 2005 ; 25 : 1623-1628.
- [41] Kayyali. U. S, Donaldson. C, Huang. H, Abdelnour. R, Hassoun. P. M, Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia, *J. Biol. Chem*, 2001; 276:14359-14365.
- [42] Aslan. M, Ryan. T. M, Adler. B, Townes. T. M, Parks. D. A, Thompson. J. A, Tousson. A, Gladwin. M. T, Patel. R. P, Tarpey. M. M, Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 5215–15220.
- [43] Houston. M, Estevez. A, Chumley. P, Aslan. M, Marklund. S, Parks. D. A, Freeman. B. A, Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium: kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *Jiol. Chem*, 1999, 274:4985–4994.
- [44] Granger. D. N, McCord. J. M, Parks. D. A, Hollwarth. M. E, Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine, *Gastroenterology*, 1986; 90:80–84.
- [45] Granger. D.N, Rutili. G, McCord. J. M, Superoxide radicals in feline intestinal ischemia, *Gastroenterology*, 1981; 81:22–29.
- [46] Monier. L, *Livre de Diabétologie*, Edition 2010.
- [47] International expert committee, Report on the role of the A_{1c} assay in the diagnostic of diabetes, *Diabetes Care*, 2009; 32: 1327-1334.

- [48]Charollais. A, Gjinovci. A, Huarte. J, Bauquis. J, Nadal. A, Martín. F, Andreu. F, Sánchez-Andrés. J. V, Calabrese. A, Bosco. D, Soria. B, Wollheim. C. B, Herrera. P. L, Meda. P, Junctional communication of pancreatic b-cells contributes to the in vivo control of insulin secretion and glucose tolerance, *J. clin. Investigation*, 2000;
- [49]Ravier. M. A, Güldenagel. M, Charollais. A, Gjinovci. A, Caille. D, Söhl. G, Wollheim. C. B, Willecke. K, Henquin. J. C, Meda. P, Loss of connexin 36 Channels Alters β -Cell coupling, Islet Synchronization of Glucose-Induced Ca^{2+} and insulin Oscillations, and Basal Insulin Release, *Diabetes*, 2005; 54: 1798-1807.
- [50] Coulomb. A, Halimi. S, Chaskilevitch. I, Sept propositions pour faire face à l'épidémie silencieuse du XXI^e siècle, le livre blanc du diabète ; Société francophone du diabète.
- [51] Suriyajothi. M.A, Sangeetha.R, Venkateswari.R, Activity of xanthine oxidase in Diabetics: Its correlation with aging, *Pharmacologyonline*, 2011; 2: 128-133.
- [52] Roddy. E, Doherty. M, Epidemiology of gout, *Arthritis Research & Therapy*, 2010; 12:223.
- [53] Krishnan. E, Inflammation, oxidative stress and lipids: the risk triad for atherosclerosis in gout, *Rheumatology*, 2010; 49:1229–1238.
- [54] McCarty. D. J, Hollander. J. L, Identification of urate crystals in gouty synovial fluid, *Annals of Internal. Medicine*, 1961, 54; 452-460.
- [55] Scott. J. T, New Knowledge of the pathogenesis of gout, *J. Clin. Path*, 12, suppl. (Roy. Coll. Path) 31, 205-213.
- [56] Mérat. F. J, De Lens. A. J, Dictionnaire Universel de matière Médicale et de thérapeutique générale, Tome second : Société Belge de Librairie ; 1837.
- [57] Gutman. A. B, Yu. T. F, *Trans. Ass. Amer. Phys*, 1951; 64: 279.
- [58] Kuntz. D, Lioté. F, Goutte, *Encycl. Méd. Chir, Appareil locomoteur*, 2003;14 : 270-A- 10: 23.
- [59] Pillinger. M. H, Rosenthal. P, Abeles. A. M, Hyperuricemia and gout: new insights into pathogenesis and treatment, *Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis*, 2007; 65:215-21.

- [60] Galbusera. C, Orth. P, Fedida. D, Spector. T, Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase, *Biochemical Pharmacology*, 2006; 71: 1747-1752.
- [61] Malik. U. Z, Hundley. N. J, Romero. G, Radi. R, Freeman. B. A, Tarpey. M.M, Kelley. E.E, Febuxostat Inhibition of Endothelial-Bound XO: Implications for Targeting Vascular ROS Production, *Free Radic Biol Med*, 2011; 51(1): 179–184.
- [62] Perez-Ruiz. F, Les nouveaux traitements de la goutte (New treatments for gout), *Revue du Rhumatisme*, 2007; 74 (7): 624-626.
- [63] Edwards. N. L, Febuxostat: a new treatment for hyperuricaemia in gout, *RHEUMATOLOGY*, 2009; 48: 15-19.
- [64] Lewis. A. S, Murphy. L, McCalla. C, Fleary. M, Purcell. S, Inhibition of Mammalian Xanthine oxidase by Folate Compounds and Amethopterin, *J. Biol. Chem*, 1984; 259: 2-15.
- [65] Owen. P. L, Johns. T, Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout, *J. Ethnopharmacology*, 1999; (64):149-160.
- [66] Hanasaki. Y, Ogawa. S, Fukui. S, The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free. Radic. Biol. Med*, 1994; 16: 45-850.
- [67] Cos. P, Ying. L, Calomme. M, Hu. J.P, Cimanga. K, Van-Poel. B, Pieters. L, Vlietinck. A.J, Vanden Berghe. D, Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *J. Nat. Prod*, 1998, 61: 71-76.
- [68] Hong. C. Y, Kim. Y. K, Chang. J. H, Kim. S. H, Choi. H, Nam. D. H, Kim. Y. Z, Kwak. J. H, *J. Med. Chem*, 1997; 40, 3584.
- [69] R. Rezig ; M. Chebah ; S. Rouati, Synthesis of Some Quinolyyl Aryl $\alpha\beta$ -unsaturatedketones, *J. Soc. Alg. Chem*, 2000; 10 (1) 111.
- [70] Halin. F. E, Ed.Antibiotics. Springer-Verlag, New York , 1979; 5: 353.

In silico

I. Introduction

Les études menées ces dernières années dans le domaine de la biologie cellulaire ont mis en relief l'importance du rôle de l'étude de l'interaction protéine-ligand. En effet, elle se trouve à la base de tous les processus biologiques tels que les réactions enzymatiques, la transmission du signal et la régulation physiologique. L'analyse des différents mécanismes engagés par cette interaction est une étape essentielle dans la mise au point de nouvelles molécules thérapeutiques.

La caractérisation des différents types d'interactions mis en jeu lors de la formation du complexe protéine-ligand, exigeait au préalable l'utilisation de quelques techniques expérimentales comme la cristallographie et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Le développement de l'outil informatique et les techniques de la modélisation moléculaire a permis aux chercheurs de s'orienter davantage vers la simulation et le docking moléculaire.

L'objectif de cette méthode est de prédire la position et l'orientation du ligand dans le site récepteur d'une protéine donnée d'une part, et d'identifier le type d'interaction établie lors de la formation du complexe protéine-ligand d'autre part.

Les années 80 ont été marquées par l'écriture des premiers codes du docking moléculaire tel que la première version du logiciel Dock [1]. Ces programmes ont été conçus à partir du modèle "clé-serrure" proposé en 1890 par Emil Fisher [2]. Ce docking appelé "rigid-body" ne prend pas en considération les modifications conformationnelles qui peuvent avoir lieu lors de la fixation du ligand dans le site récepteur de la protéine.

Au cours des années 90, les nouveaux logiciels du docking prenaient en considération la flexibilité du ligand en se basant sur la théorie dite "de la conformation induite" proposé en 1958 par Daniel Koshland [3].

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

- Les algorithmes de recherche systématique : ils sont basés sur Les méthodes de la reconstruction incrémentales. Il consiste à couper le ligand en fragments rigides, à placer le fragment de base et ensuite de reconstituer le ligand de départ en ajoutant les fragments de manière incrémentale. Au cours de cette

étape toutes les coordonnées géométriques sont prises en considération. Cette méthode est utilisée dans les programmes LUDI [4] et FLEXX [5].

- Les algorithmes de recherche aléatoire ou les algorithmes stochastiques :
Dans ce cas, il y a les algorithmes génétiques (AG) [6] et les algorithmes basés sur la méthode Monté Carlo (MC) [7]. Le principe de ces programmes consiste à imposer au ligand des changements conformationnels aléatoires, puis en utilisant une fonction de probabilité notée "fitness function" élire la meilleure conformation possible. La première conformation acceptée sera le point de départ pour un nouveau changement aléatoire. Cette technique est utilisée dans le programme ICM (Internal Coordinate Mechanics) [8]. Les algorithmes génétiques sont utilisés par les programmes Autodock [9] et Gold [10].
Afin de limiter le calcul, le programme PRO_LEAD [11] utilise l'algorithme de recherche nommé Tabou. Il consiste à explorer l'espace conformationnel en interdisant les zones de l'espace déjà explorées dites (tabou). Les nouvelles conformations acceptées sont celles qui présentent un RMSD (Root-Mean-Square-Deviation) proche des conformations précédentes.
- Les algorithmes déterministes ou de simulation : la méthode la plus connue est la dynamique moléculaire [12]. Cette technique est rarement utilisée en docking à cause des problèmes rencontrés lors des barrières énergétiques.

Bien que ces nouveaux logiciels "Flexible-Ligand" modélisent mieux l'interaction protéine- ligand que les logiciels de type "rigid-body", ils ne prennent pas, cependant, en considération la variabilité structurale de la protéine lors de la fixation du ligand. La flexibilité de la protéine reste un challenge dans le développement des nouveaux logiciels de docking, mais des programmes comme FlexE [13] considèrent la flexibilité de la protéine de manière localisée sur certains acides aminés.

Dans ce travail, pour modéliser l'interaction protéine-ligand nous avons utilisé l'algorithme Argusdock intégré dans le programme ArgusLab 4.0.1 [14]. Il est basé sur une technique exhaustive où la flexibilité du ligand est prise en compte grâce aux multiples conformations issues des différentes translations et rotations autour des liaisons acycliques.

Les différents complexes (ligand-récepteur) obtenus sont générés et classés par ordre décroissant selon une fonction de score. Cette fonction permet d'estimer l'enthalpie

libre (ΔG) ou l'affinité du ligand pour son récepteur. La fonction utilisée dans cette étude est Ascore [15], elle est empirique et inspirée de celle de Böhm développée en 1994 [16]. Elle est basée sur l'idée que l'énergie de liaison peut être évaluée comme la somme pondérée de termes non corrélés [17]. Ces termes (Equation. 1) peuvent être des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobiques, des interactions ioniques et quelques pénalités entropiques attribuées à la désolvatation ou au nombre de torsion par ligand.

$$\Delta G_{interaction} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_H + \Delta G_{déformation} + \Delta G_{hydrophobique} + \Delta G_0$$

→ **Equation. 1**

Où ΔG_{vdw} représentent les interactions de van der Waals entre le ligand et la protéine, ΔG_H les liaisons hydrogène, $\Delta G_{déformation}$ les pénalités de déformation et $\Delta G_{hydrophobique}$ les interactions hydrophobes. ΔG_0 Est une constante qui exprime la perte entropique liée à la formation du complexe. Bien qu'elles soient plus simples à calculer que les fonctions basées sur les champs de force, leur inconvénient provient de leur dépendance des données utilisées lors de leur calibration [17]. La perfection de ces fonctions empiriques évolue avec le nombre de complexes définis par des données structurales et des affinités plus précises [18].

Les coordonnées cristallographiques de la xanthine oxydase utilisées dans cette étude sont obtenues à partir de la structure cristalline du complexe XO-Salicylate déterminée par Enroth et coll. [19] (code PDB 1fiq), avec une résolution de 2,50 Å. Le salicylate est un inhibiteur compétitif de la xanthine oxydase [20]. Avant d'entamer les calculs du docking, notre recherche s'est focalisée sur le site actif tel qu'il est déterminé expérimentalement. Pour cela, nous avons considéré le centre Mo et tous les résidus qui se trouvent à une distance de 3,5 Å des atomes de salicylate.

La structure du ligand est optimisée par la méthode UFF (Universal Force Field) [21] puis affinée par la méthode AM1 (Austin Model1) [22]. Au cours du docking, le site actif de l'enzyme est considéré comme rigide.

Dans ce chapitre, nous étudions six nouveaux composés au moyen de la méthode décrite précédemment et dont les structures sont représentées en annexe. Nous

montrons les différentes positions adaptées au sein du site actif avec les interactions les plus significatives. La fonction de score est utilisée pour nous indiquer le complexe le plus stable. Ensuite, nous avons évalué quelques propriétés pharmacocinétiques pour déterminer la biodisponibilité de ces composés.

II. Interaction chalcones-xanthine oxydase

Afin d'élucider le mécanisme d'action de nos chalcones sur la xanthine oxydase, nous avons modélisé les différents types d'interactions apparus lors de la liaison chalcone-site actif. Ensuite, nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus par l'allopurinol.

II.1 Interaction CHAL1-XO

CHAL1 a formé avec la xanthine oxydase un complexe stable avec une énergie de -11,63 Kcal/mol. En s'attachant au centre du molybdène, CHAL1 s'est orienté de la même manière que le salicylate. Le ligand est entouré de ARG 880, GLU 802 et THR 1010 comme le montre la Figure 20, ces résidus jouent un rôle important dans la réaction catalytique de la xanthine oxydase. Elles sont responsables de la transformation du substrat en acide urique [23]. En utilisant les techniques du docking moléculaire, nous avons remarqué que CHAL1 a interagi avec le site actif de la xanthine oxydase seulement par des interactions hydrophobiques. Nous supposons alors que cette molécule ne va pas être métabolisée.

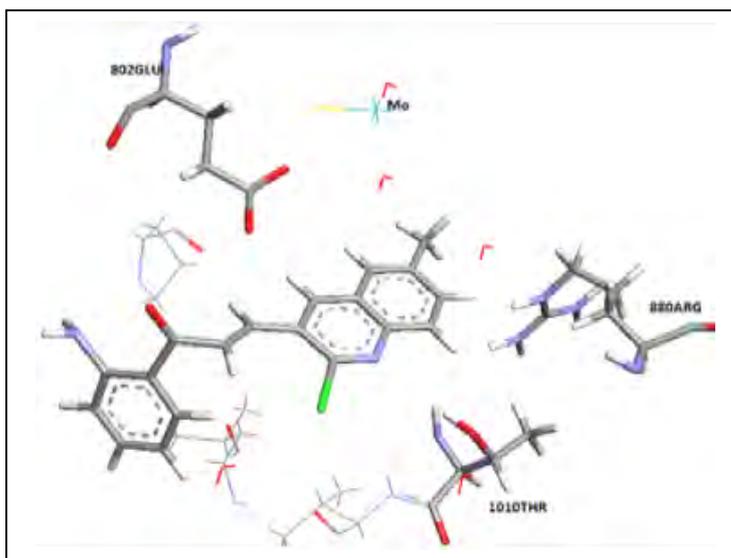


Figure 20. Positionnement de CHAL1 au site actif de la xanthine oxydase

II.2 Interaction CHAL2-XO

CHAL2 diffère de CHAL1 par le positionnement du méthyle sur le quinolyne. Ce changement a permis au CHAL2 de former un complexe plus stable avec une énergie de -12,48 Kcal/mole. En plus des interactions hydrophobiques, ce ligand a formé deux liaisons hydrogènes avec deux molécules d'eau du site actif à des distances de 2,91 Å et 2,00 Å.

En pénétrant dans le centre du molybdène, comme le montre la Figure 21, CHAL2 s'est orienté de la même manière que CHAL1.

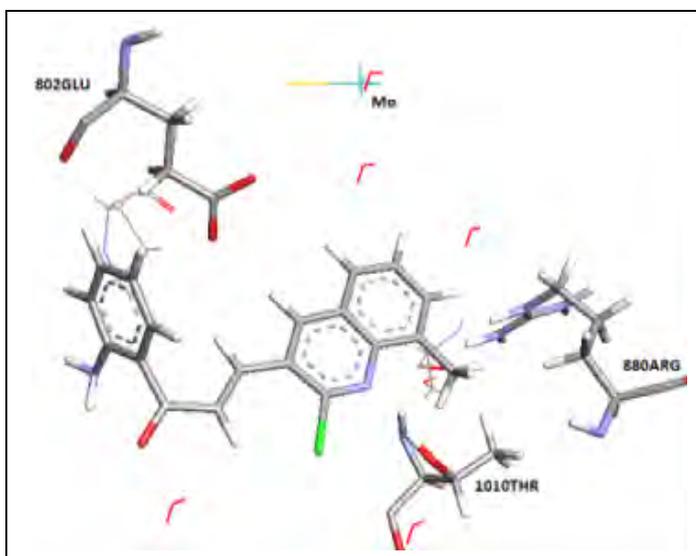


Figure 21. Positionnement de CHAL2 au site actif de la xanthine oxydase

II.3 Interaction CHAL3-XO

Pour CHAL3 nous avons remplacé le groupement amine (NH₂) sur l'aryle par un groupement (OH). Le méthyle sur le quinolyne est dans la même position que CHAL1. Ce changement a permis la formation d'un complexe relativement plus stable que CHAL1 avec une énergie de -12,35 Kcal/mole. L'oxygène du groupement (OH) a formé deux liaisons hydrogène avec deux molécules d'eau du site actif à des distances de 2,63 Å et 2,76 Å. Nous avons remarqué pour ce ligand que l'oxygène de la fonction cétone a formé une liaison hydrogène avec ASN768 à une distance de 2,98 Å. Cette molécule a interagi aussi avec la xanthine oxydase par des interactions

hydrophobiques. En se fixant au site actif de la xanthine oxydase, CHAL3 s'est orienté de la même manière que CHAL1 et CHAL2 (Figure 22).

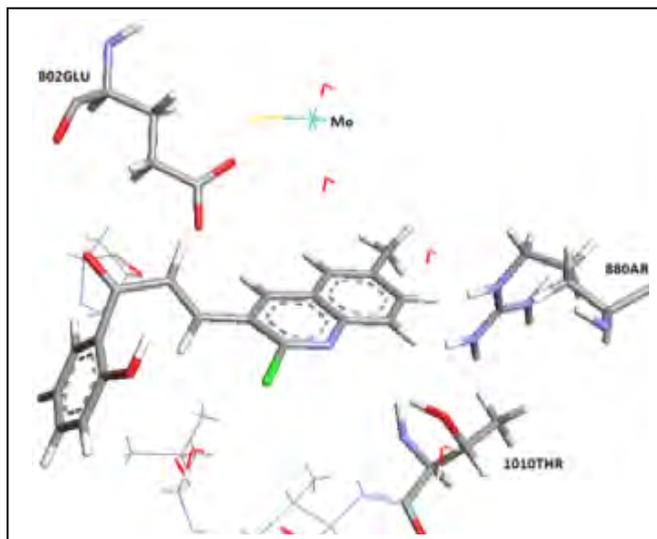


Figure22. Positionnement de CHAL3 au site actif de la xanthine oxydase

II.4 Interaction CHAL4-XO

Par rapport aux autres ligands CHAL4 ne possède aucune substitution sur le quinolyle. Sur l'aryle le groupement amine (NH₂) est remplacé par un méthyle (CH₃). Nous avons remarqué que ce ligand a formé le complexe le plus stable avec une énergie de -13,02 Kcal/mole. Nous constatons que La diminution de l'encombrement stérique autour du quinolyle a permis à ce ligand de pénétrer plus facilement dans la cavité du site actif (Figure 23). Accordant ainsi la formation d'une liaison hydrogène entre l'azote du quinolyle et THR1010 à une distance de 2,99 Å. L'oxygène de la fonction cétone a formé une liaison hydrogène avec une molécule d'eau du site actif à une distance de 2,66 Å. CHAL4 a établi également avec la xanthine oxydase des interactions hydrophobiques.

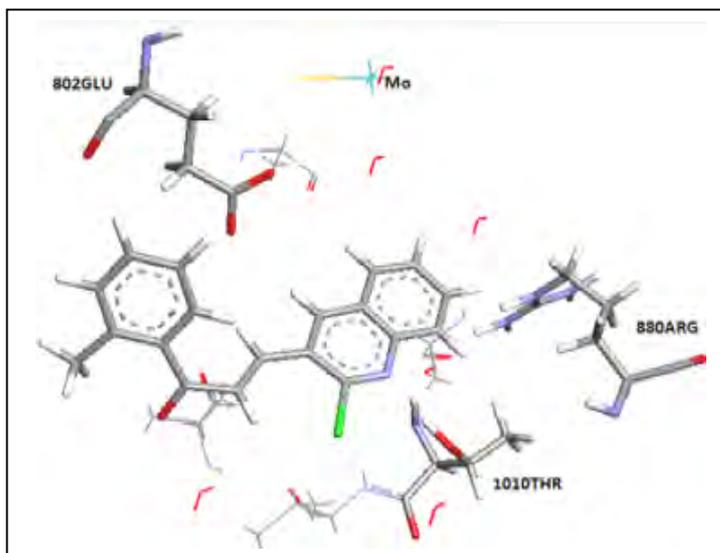


Figure23.Positionnement de CHAL4 au site actif de la xanthine oxydase

II.5 Interaction CHAL5-XO

Dans le cas de cette molécule le méthyle sur le quinolyne est en position 6 comme pour CHAL1, l'aryle est substitué par deux groupements méthoxy en position 3' et 4'.

Ce ligand s'introduit dans le site récepteur de la xanthine oxydase de la même manière que CHAL1 (Figure 24). En plus des interactions hydrophobiques, l'oxygène du groupement méthoxy en position 4' a formé une liaison hydrogène avec une molécule d'eau du site actif à une distance de 2,54 Å. CHAL5 a formé avec notre enzyme un complexe stable avec une énergie libre de -11,25 Kcal/mole.

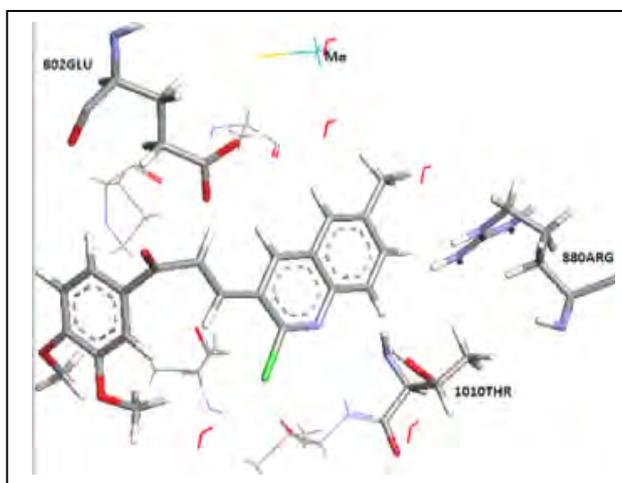


Figure24.Positionnement de CHAL5 au site actif de la xanthine oxydase

II.6 Interaction CHAL6-XO

CHAL6 diffère de CHAL5 par le positionnement du méthyle sur le quinolyne. Ce ligand s'adapte mieux dans la cavité du site actif de la xanthine oxydase que CHAL5. Il a formé un complexe stable (Figure 25) avec une énergie de -11,41 Kcal/mole. Ce résultat nous confirme que le complexe chalcone/xanthine oxydase est plus stable quand il n'y a pas de substitution sur le quinolyne en position 6. CHAL6 s'est fixé au site actif par des interactions hydrophobiques et une seule liaison hydrogène. Cette dernière a été formée par l'oxygène du groupement méthoxy en position 6' et une molécule d'eau à une distance de 1,98 Å.

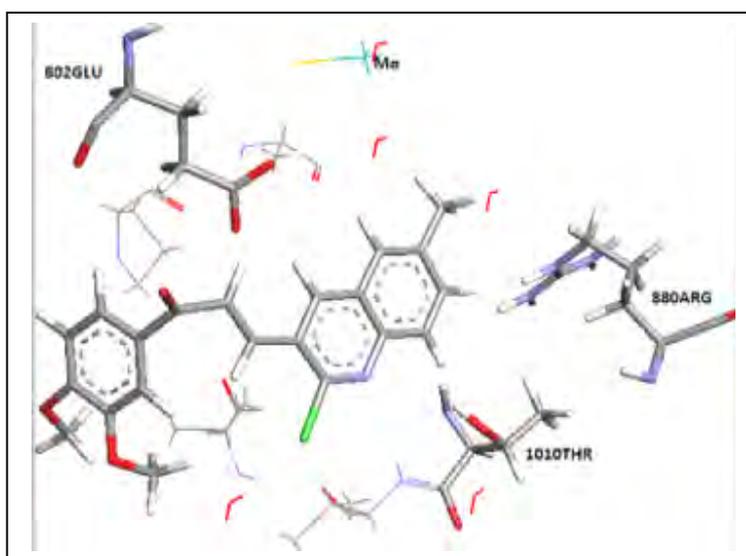


Figure25.Positionnement de CHAL6 au site actif de la xanthine oxydase

II.7 Interaction allopurinol-XO

Allopurinol est un inhibiteur compétitif de la xanthine oxydase. Connu par son analogie structurale avec la xanthine, le substrat naturel de cette enzyme. Lors de sa fixation au site actif de la xanthine oxydase, l'allopurinol s'est attaché au site du molybdène (Figure 26). Il a formé quatre liaisons hydrogènes et deux interactions hydrophobiques. Les liaisons hydrogènes ont été formées avec GLU802 à des distances

de 2,77 Å et 2,99 Å et avec THR1010 à des distances de 2,79 Å et 2,65 Å. Ce complexe possède une énergie de liaison de -6,51 kcal/mole.

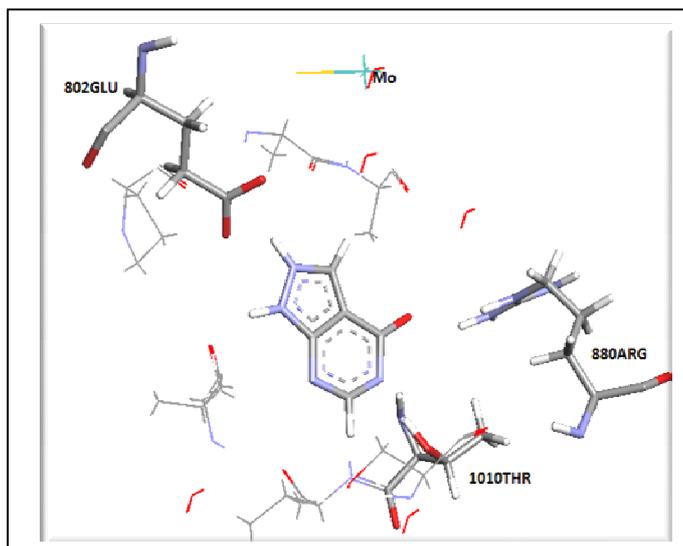


Figure 26. Positionnement de l'allopurinol au site actif de la xanthine oxydase

L'analyse des résultats obtenus par la méthode du docking moléculaire nous a permis de constater que :

- ✓ En interagissant avec la xanthine oxydase, les six chalcones ont pénétré dans le site du molybdène avec la même orientation. Ils étaient entourés de GLU802, ARG880 et THR1010. Ces résidus représentent le site catalytique de la xanthine oxydase.
- ✓ Lors de leur fixation au site récepteur, la majorité des interactions chalcone/XO étaient des hydrophobiques. Nous supposons alors que ces ligands possèdent un caractère lipophile. Ceci confère à ces complexes une meilleure stabilité par rapport à l'allopurinol.
- ✓ CHAL1 n'a réagi avec la xanthine oxydase que par des interactions hydrophobiques. Ceci nous permet de supposer que ce ligand ne pourra pas être métabolisé par la xanthine oxydase.
- ✓ Avec une quinolyle non substituée, nous avons eu le complexe le plus stable avec une énergie de -13,02 Kcal/mole.
- ✓ Tous les substituants du phényle contenant de l'oxygène ont établi une liaison hydrogène avec le site actif de la xanthine oxydase. Cependant, la substitution

du phényle intervient dans la stabilité du complexe Ligand/récepteur et pourrait donc augmenter le caractère inhibiteur de ces ligands.

- ✓ Les molécules testées présentent une meilleure affinité à l'enzyme que son inhibiteur compétitif. Elles peuvent avoir donc un caractère inhibiteur important pour la xanthine oxydase.

Ces résultats nous ont encouragés à tester davantage d'autres propriétés de ces molécules.

III. Propriétés pharmacocinétique ou Drug-Like

Une substance sera peu absorbée dans le sang si :

1. Sa masse molaire est supérieure à 500 g/mole.
2. Elle possède plus de 5 donneurs de liaisons hydrogènes.
3. Elle possède plus de 10 accepteurs de liaisons hydrogènes.
4. Sa valeur de LogP est supérieure à 5.

Il s'agit de la règle de cinq de Lipinski [24], elle est utilisée pour l'identification des composés Drug-Like. Les molécules auxquelles s'applique la proposition 1 seront peu solubles et ne traverseront que difficilement les membranes cellulaires. Ceux qui répondent aux règles 2 et/ou 3 sont trop polaires pour franchir les membranes cellulaires. Ceux qui sont conformes à la règle 4 sont peu solubles en solution aqueuse et seront inaptes d'atteindre la surface des membranes. La molécule donc doit être suffisamment hydrophile pour être soluble dans le sang, et hydrophobe pour traverser les membranes cellulaire [25]. Cependant, nous avons évalué ces paramètres pour nos différents inhibiteurs.

Tableau 1: Propriétés moléculaires des six ligands

Composé	Natomes	n O, N	n OH, NH	n rot	LogP	M.W
CHAL1	23	3	2	3	4,44	322,795
CHAL2	23	3	2	3	4,42	322,795
CHAL3	23	3	1	3	4,94	323,779
CHAL4	22	2	0	3	4,98	307,78
CHAL5	26	4	0	5	4,65	367,832
CHAL6	26	4	0	5	4,63	367,832

n OH, NH : nbre de donneurs de liaisons H.

n O, N : nbre d'accepteurs de liaisons H.

n rot : nbre de liaisons acycliques.

M.W : masse molaire g/mole.

LogP: coefficient de partition ou coefficient de partage (octanol/eau), égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau $\text{LogP} = \text{Log}(C_{\text{oct}} / C_{\text{eau}})$. Cette mesure permet d'appréhender le caractère lipophile d'une molécule.

Il ressort de ce tableau (Table 1) que les six ligands répondent aux cinq critères de Lipinski. Comme nous l'avons prévu, le résultat de LogP montre que nos molécules possèdent un caractère lipophile. Elles peuvent être biodisponibles et contribuer au développement de nouveau inhibiteur de la xanthine oxydase. Des tests in vitro et in vivo de l'activité inhibitrice de ces molécules sont donc souhaités pour confirmer les résultats obtenus par la méthode du docking moléculaire.

Avant d'entamer ces tests, nous avons jugé nécessaire de déterminer quelques propriétés optiques de ces chalcones par la méthode TDDFT [26]. Ces calculs nous ont permis d'identifier les fragments responsables des transitions optiques observées par la spectrophotométrie d'absorption. Le spectre d'absorption calculé sera comparé à celui obtenu expérimentalement.

IV. Calcul du spectre théorique de CHAL1

Pour tracer le spectre d'absorption de CHAL1 représenté sur la Figure 27, nous avons entrepris un calcul TDDFT basée sur la technique TZP/BP86 [27]. Le résultat obtenu révèle la présence de quatre bandes d'absorption décalées par rapport au spectre expérimentales.

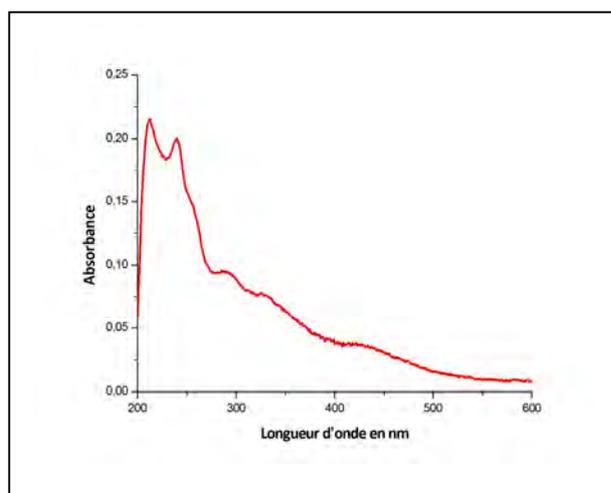


Figure 27. Spectre expérimental de CHAL1-10 μ M

- Un pic à 240 nm principalement associé à la transition HOMO-6 à LUMO+1 et à la transition HOMO-4 à LUMO+2.
- Une bande I entre 280 nm et 297 nm avec λ_{\max} = 289 nm originaire de la transition HOMO-6 à LUMO.
- Une bande II entre 310 nm et 340 nm avec λ_{\max} = 330 nm associée à la transition HOMO à LUMO+3.
- Un épaulement entre 400 nm et 460 nm avec λ_{\max} = 440 nm attribué à la transition HOMO-3 à LUMO.

Sur le Tableau 2, nous résumons les différentes transitions optiques observées avec leur taux de participation.

La bande à 260 nm est attribuée à la transition HOMO-2 à LUMO+2 et HOMO-2 à LUMO+3.

Tableau 2.Principales transitions calculées pour CHAL1

Expérimentale (nm)	Théorique		Transitions
	λ (nm)	F(ua)	
214	211.649	0.357	H-5→L+5 (22%) H-4→L+5 (13%) H-4→L+6 (15%)
240	246.9105	0.288	H-6→L+1 (32%) H-4→L+2 (23%) H-2→L+4 (13%)
260	256.9208	0.115	H-2→L+2 (19%) H-2→L+3 (12%) H-9→LUMO (11%)
289	290.6214	0.125	H-6→LUMO (52%) H-2→L+2 (23%)
330	322.725	0.074	HOMO→L+3 (54%) H-2→L+1 (25%)
440	406.511	0.0304	H-3→LUMO (86%)

A partir du Table 3 et la Figure 29, nous avons constaté que les orbitales moléculaires frontières HOMO-3 et LUMO responsables de la bande d'absorption observée à 440 nm sont principalement localisées sur les trois fragments. Les OMF attribuées à la bande d'absorption de longueur d'onde 330 nm sont localisées sur le fragment F1 et F3. Celles qui sont associées à la bande d'absorption observée à 289 nm sont localisées sur les fragments F1 et F2. Sachant que nous avons divisé la molécule CHAL1 en trois fragments comme le montre la Figure 28.

En observant la forme des orbitales moléculaires frontières responsables des transitions décrites précédemment, nous constatons qu'il s'agit d'un transfert de charge de type $\pi \rightarrow \pi^*$.

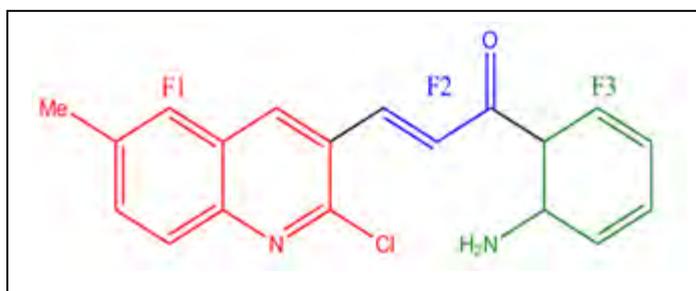


Figure28.Les trois fragments de CHAL1

Tableau 3. Localisation des orbitales moléculaires frontières

orbitales	Energie (eV)	Compositions		
		F1%	F2%	F3%
HOMO-9	-7.714	98.03	0.64	1.33
HOMO-8	-7.611	90.99	7.53	1.48
HOMO-7	-7.461	0.97	4.82	94.21
HOMO-6	-7.151	66.23	31.40	2.37
HOMO-5	-6.427	95.29	4.21	0.50
HOMO-4	-6.212	90.60	7.52	1.88
HOMO-3	-6.044	7.62	15.32	77.07
HOMO-2	-5.918	52.81	40.54	6.65
HOMO-1	-5.249	1.77	73.28	24.95
HOMO	-4.876	1.34	7.48	91.18
LUMO	-3.116	48.98	39.78	11.24
LUMO+1	-2.468	74.42	17.62	7.96
LUMO+2	-1.714	55.10	21.18	23.73
LUMO+3	-1.064	96.58	0.91	2.51
LUMO+4	-0.876	92.29	3.05	4.66
LUMO+5	-0.710	45.42	22.19	32.38
LUMO+6	-0.471	4.35	4.78	90.88

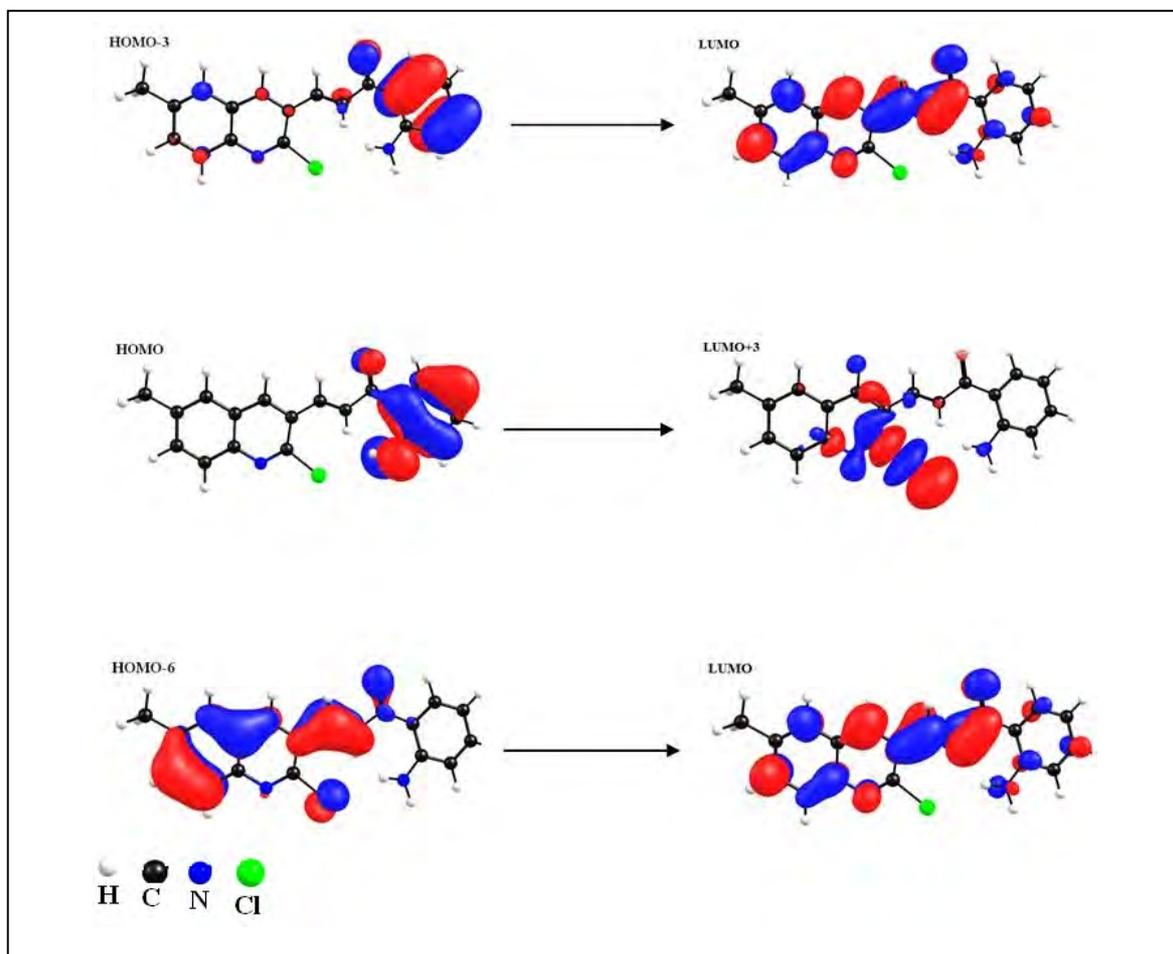


Figure 29. Représentation des orbitales moléculaires frontières

V. Conclusion

Les résultats obtenus au cours du docking moléculaire montrent que nos six chalcones présentent une meilleure affinité pour l'enzyme que l'allopurinol. CHAL4, avec une énergie de liaison de -13,02 Kcal/mol, semble être le meilleur inhibiteur de l'enzyme.

Les six ligands sont orientés dans le site actif de la XO de la même manière que le salicylate. Dans la catalyse enzymatique, l'orientation adéquate du ligand est essentielle pour que les résidus du site actif puissent réduire la barrière d'énergie de la réaction. Nous avons constaté aussi que ces composés possèdent un caractère lipophile important ce qui leur permet de former des complexes plus stables que celui obtenu par l'allopurinol. Nous avons remarqué aussi que la quinolyne non substituée peut former avec la XO un complexe plus stable. Toutes ces remarques peuvent être utilisées dans le développement de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la xanthine oxydase.

Les six ligands satisfont aux cinq critères de Lipinski et par conséquent deviennent des candidat-médicament potentiels. L'étude théorique des propriétés optiques de CHAL1 nous a permis de préciser l'origine de l'apparition des différentes bandes d'absorption.

VI. Référence

- [1] Kuntz. I.D, Blaney. J.M, Oatley. S.J, Langridge. R, Ferrin. T.E, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *J. Mol. Biol*, 1982; 161, 269-288.
- [2] Antoniotti. S, Cours de biocatalyse, université nice Sophia Antipolis, 2008.
- [3] Koshland. D. E, The key-lock Theory and the Induced Fit Theory, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 1994; 33, 2375-2378.
- [4] Böhm. H.J, The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors, *J. Comput. Aided Mol. Des*, 1992; 6, 61-78.
- [5] Kramer. B, Rarey. M, Lengauer. T, Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking, *Proteins*, 1999; 37, 228-241.
- [6] Morris. G. M, Goodsell. D. S, Halliday. R. S, Huey. R, Hart. W. E, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical free energy function, *J. Comput. Chem*, 1998; 19, 1639-62.
- [7] Hart. T. N, Read. R.J, A multiple-start Monte Carlo docking method, *Proteins*, 1992; 13, 206-222.
- [8] Abagyan. R, Totrov. M, Kuznetsov. D, ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation, *J. Comput. Chem*, 1994 ; 15, 488-506.
- [9] www.Scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock.
- [10] Verdonk. M.L, Cole. J.C, Hartshorn. M.J, Murray. C.W, Taylor. R.D, Improved protein-ligand docking using GOLD, *Proteins*, 2003; 52, 609-623.
- [11] Baxter. C. A, Murray. C.W, Clark. D.E, Westhead. D.R, Eldridge. M.D, Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity, *Proteins*, 1998; 33, 367-382.
- [12] Cho. A. E, Wendel. J. A., Vaidehi. N, The MPSim-Dock hierarchical docking algorithm: application to the eight trypsin inhibitor cocrystals, *J. Comput. Chem*, 2005; 26, 48-71.
- [13] Claussen. H, Buning. C, Rarey. M, Lengauer. T, FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations, *J. Mol. Biol*, 2001; 308, 377-395.
- [14] www.ArgusLab.com, Planaria Software LLC, Seattle, WA, USA.
- [15] Oda. A, Takahashi. O, Validation of ArgusLab Efficiencies for Binding Free Energy Calculations, *Chem-Bio. Informatics. J*, 2009 ; 9 :52-61.

- [16] Böhm. H.J, The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 1994; 8 (3) : 243-256.
- [17] Wang. R, Lai. L, Wang. S, Further development and Validation of empirical scoring functions for structure based binding affinity prediction, *J. Comp-Aided. Molecular. Design*, 2002; 16:11-26.
- [18] Janairo. J. I. B, Janairo. G. C, Homology modelling and comparative docking analysis of two naturally occurring pancreatic glucokinase mutants, *Philippine Science Letters*, 2012; 5(1): 1-6.
- [19] Enroth. C, Eger. B. T, Okamoto. K, Nishino. T, Pai. E. F, Crystal Structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000 ; 97: 10723-10728.
- [20] Lin. C. M, Chen. C. S, Chen. C. T, Liang. Y.C, Lin. J. K, Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase, *Biochem. Biophys. Research. Communications*, 2002; 294: 167-172.
- [21] Rappe. A. K, Casewit. C. J, Colwell. K. S, Goddard III. W. A, Skiff. W. M, UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992; 114: 10024-10035.
- [22] Dewar. M. J. S, Zoebisch. E. G, Healy. E. F, Stewart. J. J. P, AM1: A General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985; 107: 3902-3909.
- [23] Cao.H, Pauff. J. M, Hille. R, Substrate Orientation and Catalytic Specificity in the action of xanthine oxidase: The Sequential Hydroxylation of Hypoxanthine to uric acid, *J. Biol.Chem.*, 2010; 36: 28044-28053.
- [24]Lipinski. C. A, Lombardo. F, Dominy. B. W, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 1997 ; 23 : 3-25.
- [25] Subramanian. K, Ramainan. A, Development of a less toxic dichloroacetate analogue by docking and descriptor analysis, *Bioinformation*, 2010; 5: 73-76.

[26] Dreuw. A, Head-Gordon. M, Single-reference ab initio methods for the calculation of excited states of large molecules, *Chem Rev*, 2005; 105, 4009–4037.

[27] Schmidt. M. W et al. *J. Comput. Chem*, 1993 ; 14, 1347–1363.

In vitro

I. Introduction

La xanthine oxydase est une enzyme qui génère des radicaux superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en réduisant l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique. Pour déterminer la capacité d'une molécule à piéger ces radicaux libres, plusieurs approches ont été développées. La plus simple et rapide est celle qui utilise le radical DPPH (1,1-DiPhenyl-2-Picryl-Hydrazyl). Cette méthode est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant [1]. Le DPPH est un radical stable au cours du temps et utilisable avec des différents solvants.

Pour les flavonoïdes, S.V. Jovanovic et coll. ont utilisé une méthode fondée sur la radiolyse pulsée [2]. Cette méthode se base sur la réactivité des flavonoïdes avec les espèces radicalaires issues de la radiolyse.

Avant de tester l'activité de la xanthine oxydase en présence des chalcones de quinoléine, il nous est apparu important d'étudier de la même manière que pour les flavonoïdes, le comportement de CHAL1 et CHAL2 face aux espèces radicalaires formées par radiolyse.

II. Matériels et Méthodes utilisés

II.1 Irradiation

II.1.1 Appareillage

Nous avons utilisé un irradiateur expérimental à base de Cobalt 60 panoramique installé au Laboratoire de Chimie Physique à l'université d'Orsay-Paris Sud. Le débit de dose fournie par l'irradiateur à l'instant t est exprimé par la formule :

$$D = D_0 \exp(-Ln2t/T)$$

sachant que :

D est le débit de dose à l'instant t (Gy/s),

D_0 est le débit de dose à l'instant $t=0$,

T est la période de la source radioactive.

II.1.2 Mode Opérateur

Nous avons irradié 1 mL d'une solution de CHAL1 à 10 μ M et 1mL de CHAL2 à 10 μ M pendant 10, 20 et 30 mn. Avant irradiation, chacun des deux composés est d'abord dissous dans un mélange de 50% éthanol et 50% eau constituant la solution mère (93 μ M) ; la solution obtenue est diluée dans le tampon phosphate 50mM à pH=7,5 jusqu'à atteindre la concentration voulue.

Le débit de la dose est de 16,9 Gy/mn et les solutions sont placées sous atmosphère d'air.

II.2 Analyse des solutions irradiées

Les solutions irradiées sont caractérisées par différentes techniques.

Elles sont analysées par la spectrophotométrie d'absorption, le spectrophotomètre UV-VIS utilisé étant un appareil THERMO ELECTRON.

Elles sont également caractérisées par résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'aide d'un spectromètre Bruker 250 MHz DPX avance. Les spectres du proton (^1H) et du carbone (^{13}C) sont mesurés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) deutéré en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne. Les spectres obtenus sont comparés avec ceux du proton (^1H) et du carbone (^{13}C) de la CHAL1 à 10 μ M et la CHAL2 à 10 μ M non irradiées.

Nous avons utilisé le spectrophotomètre IR pour suivre la stabilité de la fonction cétone de la chalcone. C'est un spectromètre à transformée de Fourier Shimadzu F IR-8201 PC.

Nous avons effectué la chromatographie sur couche mince (CCM) des deux composés irradiés et de leurs témoins (non irradiés). Les dépôts ont été réalisés comme suit:

-dépôt CHALX0 : chalcone témoin

-dépôt CHALX : chalcone irradiée avec une dose de 507 Gy

Après dépôts des composés, la plaque de chromatographie est placée verticalement dans un fond d'éluant constitué d'un mélange éther de pétrole/éthanol (7/3).

II.3 Incubation de CHAL1 et CHAL2 avec le peroxyde d'hydrogène

Pour voir la stabilité des chalcones en présence du peroxyde d'hydrogène formé lors de la réaction de la xanthine oxydase, nous avons incubé CHALX à 10 μ M dans 1mM de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ pendant 2, 4 et 24 heures et nous avons comparé le spectre d'absorption de ces solutions avec le spectre de CHAL1 à 10 μ M non incubé.

II.4 Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase

Le mélange réactionnel est constitué de 7 $\times 10^{-3}$ U/mL de xanthine oxydase et de différentes concentrations de CHAL1 en tampon phosphate de 50 mM à pH=7,5 pour un volume final de 1mL. Le suivi se fait par spectrophotométrie UV-Visible avec pour solution de référence, 7 $\times 10^{-3}$ U/mL de xanthine oxydase dans 50 mM de tampon phosphate pour un volume final de 1 mL. La réaction est effectuée à température ambiante et à pH=7,5.

II.5 Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase en présence du Cytochrome C

Dans une cuvette de 1 mL, nous avons placé 7 $\times 10^{-3}$ U/mL de xanthine oxydase, 10⁻⁵ M de cytochrome C, 50 μ M de CHAL1, 100 μ M d'EDTA dans 50mM de tampon phosphate. La référence contient 7 $\times 10^{-3}$ U/mL xanthine oxydase, 10⁻⁵M Cytochrome C, 100 μ M EDTA dans 50mM de tampon phosphate.

En absence de cytochrome C, nous avons mélangé 50 μ M de CHAL1 avec 7 $\times 10^{-3}$ U/mL de xanthine oxydase dans 50mM de tampon phosphate pour un volume final de 1 mL. La référence contient 7 $\times 10^{-3}$ U/mL de xanthine oxydase dans 50mM de tampon phosphate pour un volume final de 1mL. Les deux tests ont été réalisés à température ambiante et à pH=7,5.

II.6 Réaction de CHAL1 avec XO en présence de la xanthine

Nous avons suivi par absorption la réaction de CHAL1 à différentes concentrations avec la xanthine oxydase 7 $\times 10^{-3}$ U/mL en présence de la xanthine 50 μ M à différents temps d'incubation. Les réactions ont été réalisées à température ambiante et à pH= 7,5.

II.7 Suivi cinétique à 295 nm de la réaction X/XO en présence de CHAL1

Nous avons placé dans une cuvette de 1 mL, 7×10^{-3} U/mL de xanthine oxydase et 50 μ M de xanthine dans 50mM de tampon phosphate. La référence contient 7×10^{-3} U/mL de xanthine oxydase dans 50mM de tampon phosphate pour un volume final de 1 mL.

En présence de CHAL1, à différentes concentrations, le mélange réactionnel est formé de 7×10^{-3} U/mL de xanthine oxydase dans 50mM de tampon phosphate. La réaction commence par l'ajout de 50 μ M de xanthine, pour un volume final de 1 mL.

Avant d'ajouter de la xanthine, CHAL1 a été incubée avec la xanthine oxydase pendant 10 minutes. La référence contient 7×10^{-3} U/mL de xanthine oxydase, CHAL1 à différentes concentrations dans 50mM de tampon phosphate pour un volume final de 1 mL. Ces tests sont réalisés à température ambiante et à pH= 7,5.

III. Résultats et Discussion

III.1 Radiolyse de CHAL1 et CHAL2

Sur les figures 30 et 31, nous avons reporté les spectres d'absorption d'une solution de CHAL1 et d'une solution de CHAL2, chacune à 10 μ M. Nous représentons le spectre témoin de la solution non irradiée et ceux de la solution irradiée avec les doses suivantes : 169 Gy, 338 Gy et 507 Gy.

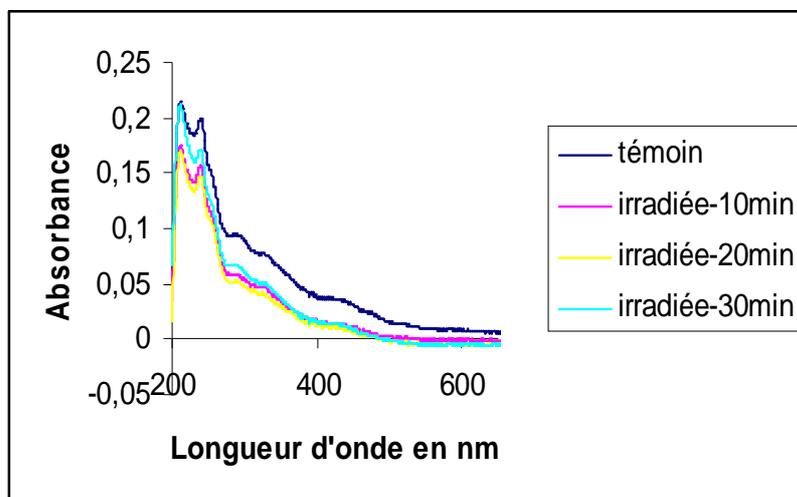


Figure 30. Spectre d'absorption d'une solution de CHAL(1)-10 μ M avant et après irradiation avec des doses de 169 Gy, 338 Gy, 507 Gy. Le débit de dose est égal à 19,6 Gy/min.

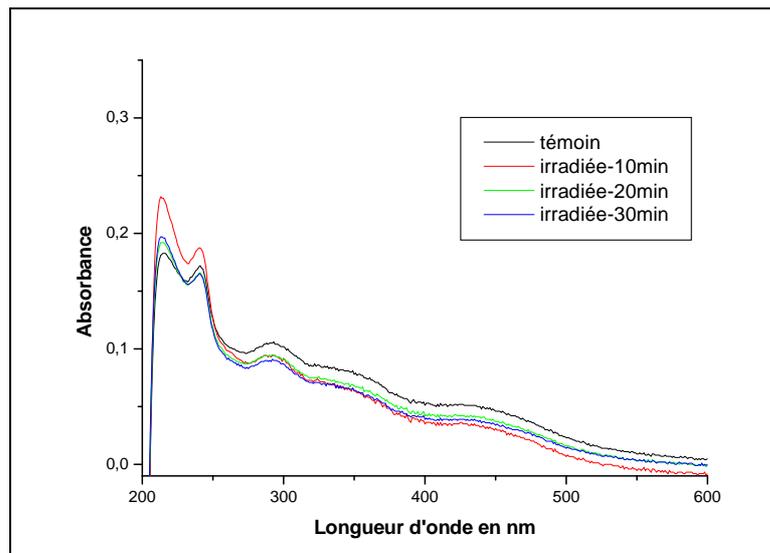


Figure 31. Spectre d'absorption d'une solution de CHAL2-10 μ M avant et après irradiation avec des doses de 169 Gy, 338 Gy, 507 Gy

Les spectres UV-Visible de CHAL1 et CHAL2 sont similaires; ils possèdent un pic à 240 nm, une bande I entre 280nm et 297nm avec λ_{\max} = 289 nm, une bande II entre 310 nm et 340 nm avec λ_{\max} = 330 nm et un épaulement entre 400 nm et 460 nm avec λ_{\max} = 440 nm représentant la conjugaison entre les cycles aromatiques et la fonction cétone α,β insaturée comme il a été montré sur le spectre théorique. Sachant que les espèces réactives produites par la radiolyse du solvant absorbent entre 200 et 240 nm, nous n'avons constaté pour les solutions irradiées aucune disparition des bandes d'absorption caractérisant CHAL1 et CHAL2. Il n'y a pas d'apparition de nouveaux pics. Le spectre d'absorption de CHAL1 et de CHAL2 n'a pas changé même à forte dose d'irradiation (507 Gy). Ceci nous permet de supposer que CHAL1 et CHAL2 n'ont pas été affecté par l'irradiation.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons réalisé les chromatogrammes de solutions de CHAL1 et CHAL2 à 10 μ M irradiées et non irradiées.

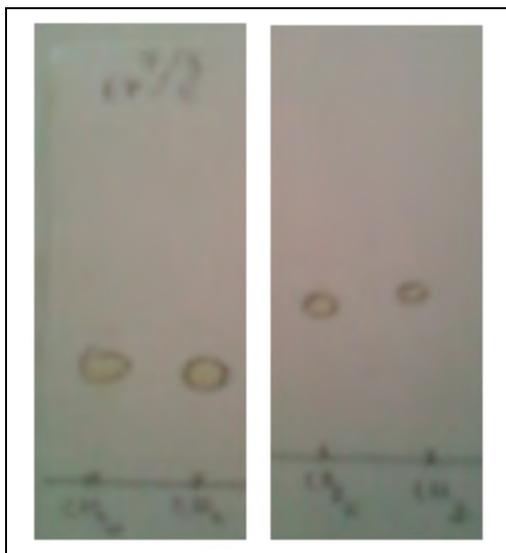


Figure 32.CCM réalisée dans un mélange Ether de pétrole/Ethanol (7/3)

Pour chaque composé, le chromatogramme représenté sur la figure 32 indique deux taches jaunes possédant le même rapport frontal (R_f) signifiant ainsi qu'il s'agit bien du même produit.

Ce résultat renforce l'idée que CHAL1 et CHAL2 n'ont pas été affectées par l'irradiation.

Pour confirmer ce résultat, nous avons analysé la solution irradiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par spectroscopie IR. D'un point de vue IR, pour chaque solution, irradiée ou non, on enregistre toujours le pic correspondant à la fonction C=O, vers 1645 cm^{-1} . Les spectres obtenus par RMN sont comparés avec les spectres du proton (^1H) et du carbone (^{13}C) de CHAL1 et CHAL2 à $10\mu\text{M}$ non irradiée.

Les résultats RMN des solutions irradiées et non irradiées sont identiques comme constaté sur les valeurs des spectres ci-dessous.

III.1.1 Spectres RMN et spectres IR

- CHAL1- $10\mu\text{M}$ irradiée

I.R (KBr): $\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)} = 1645,2\text{ (C=O)}$.

RMN ^1H (δ ,ppm, JHz): 9,10 (H4, s, 1H), 8,17 (H β , d, $j=15,3$, 1H) 8,00 (H α , d, $j=15,3$, 1H), 7,94 (H δ , d, $j=8,7$, 1H), 7,50-7,81 (H5, H7, H δ' , m, 3H), 7,34 (H5', t, $j=8,3$, $j=8,3$, 1H),

6,84(H3', dd, j=8,3, j=1,1, 1H) 6,64 (H4', t, j=8,2, j=8,2, 1H), 3,61(NH2,s,2H), 2,142(CH3,s, 3H).

RMN 13C (δ ,ppm): 190,066 (CO), 152,743 (C), 149,181 (C), 146,070 (C), 138,104 (C), 136,995 (CH), 136,241 (C), 135,236 (CH), 134,473 (CH), 131,866 (CH), 129,098 (CH), 127,987 (C), 127,812(CH), 127,566 (C), 127,498 (CH), 117,446 (C), 115,067 (CH), 114,737 (CH), 21,560.

- CHAL1-10 μ M témoin non irradiée

I.R (KBr): ν (cm^{-1}) =1643,2 (C=O, cétone).

RMN 1H (δ ,ppm, JHz): 9,12 (H4, s, 1H), 8,18 (H β , d, j=15,3, 1H), 7,9 (H α , d, j=15,3, 1H), 7,87 (H δ , d, j=8,7, 1H), 7,50-7,81 (H5, H7, H6', m, 3H), 7,33 (H5', t, j=8,3, j=8,3, 1H), 6,9 (H3', dd, j=8,3, j=1,1, 1H) 6,63(H4', t, j=8,2, j=8,2, 1H), 3,55(NH2,s,2H), 2,55(CH3,s, 3H).

RMN 13C (δ ,ppm): 190,07 (CO), 152,758 (C), 149,178 (C), 146,094 (C), 138,064 (C), 136,999 (CH), 136,229 (C), 135,190 (CH), 134,426 (CH), 131,873 (CH), 128,047 (CH), 127,843 (C), 127,720 (CH), 127,556 (C), 127,498 (CH), 117,489 (C), 116,901 (CH), 115,024 (CH), 21,574.

- CHAL2-10 μ M irradiée

I.R (KBr): ν (cm^{-1}) =1645,2 (C=O, cétone).

RMN 1H (δ ,ppm, JHz): 9,205 (H4, s, 1H), 8,163 (H β , d, j=15,5, 1H) 7,975 9 (H5, dd, j=9,1 et j=2.4, 1H), 7,73 (H6, d, j=8,8, 1H), 7,25-7,72 (H7, H5',H6', m, 3H), 7,73 (H α , d, j=15,5, 1H), 6,65(H3', dd, j=8,3, j=1,1, 1H) 6,64 (H4', t, j=8,2, j=8,2, 1H), 3,63(NH2,s,2H), 2,08(CH3,s, 3H).

RMN 13C (δ ,ppm): 208 (CO), 190 (CO), 153.2 (C), 137.98 (C), 136,26 (C), 135.955 (CH), 135,22 (CH), 132.31 (CH), 132,01 (C), 129,84 (CH), 128,28 (CH), 128,06 (CH), 127.61(C), 126.94 (CH), 117.46(CH), 115(CH), 31.533(CH3).

- CHAL2-10 μ M témoin non irradiée

I.R (KBr): ν (cm^{-1}) =1643,2 (C=O, cétone).

RMN 1H (δ ,ppm, JHz): 9,206 (H4, s, 1H), 8,16 (H β , d, j=15,5, 1H), 7,9 (H5, dd, j=9,1 et j=2.4, 1H), 7,68 (H6, d, j=8,8, 1H), 7,25-7,62 (H7, H5',H6', m, 3H), 7,75 (H α , d, j=15,5,

1H), 6,67 (H3', dd, j=8,3, j=1,1, 1H) 6,63(H4', t, j=8,2, j=8,2, 1H), 3,50(NH2,s,2H), 2,55(CH3,s, 3H).

RMN 13C (δ ,ppm): 190,8 (CO), 152,9 (C), 149,3 (C), 146,5 (C), 138,1 (CH), 136,25 (CH), 136 (CH), 135,2 (C), 132,1 (CH), 131,875 (CH), 128,12 (CH), 127,55 (C), 126,875 (CH), 117,5(CH), 115 (CH), 18(CH3).

Ainsi, CHAL1 et CHAL2 n'ont subi aucune modification durant l'irradiation.

Après ce résultat qui montre clairement qu'il n'y a pas de réaction entre les chalcones testées et les espèces radiolytiques produites par l'irradiation, nous avons supposé utile d'étudier leur réaction avec le peroxyde d'hydrogène décrit dans le paragraphe suivant.

III.1.2 Incubation de CHAL1 et CHAL2 avec le peroxyde d'hydrogène

Bien que ce soit insuffisant, l'allure des spectres d'absorption des solutions de CHAL1 et CHAL2 incubées dans 1 mM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peut révéler une éventuelle modification de nos molécules.

Pour étudier le comportement de ces chalcones vis-à-vis peroxyde d'hydrogène, nous avons comparé le spectre d'absorption de CHAL1 à 10 μ M non incubée avec le spectre de la même solution incubée dans 1mM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 2, 4 et 24 heures. La manipulation a été répétée dans les mêmes conditions pour CHAL2.

Sachant que le grand pic vers 207 nm caractérise le H₂O₂, nous constatons que CHAL1 et CHAL2 semblent rester inchangés en présence de H₂O₂ comme le montre les figure 33-35.

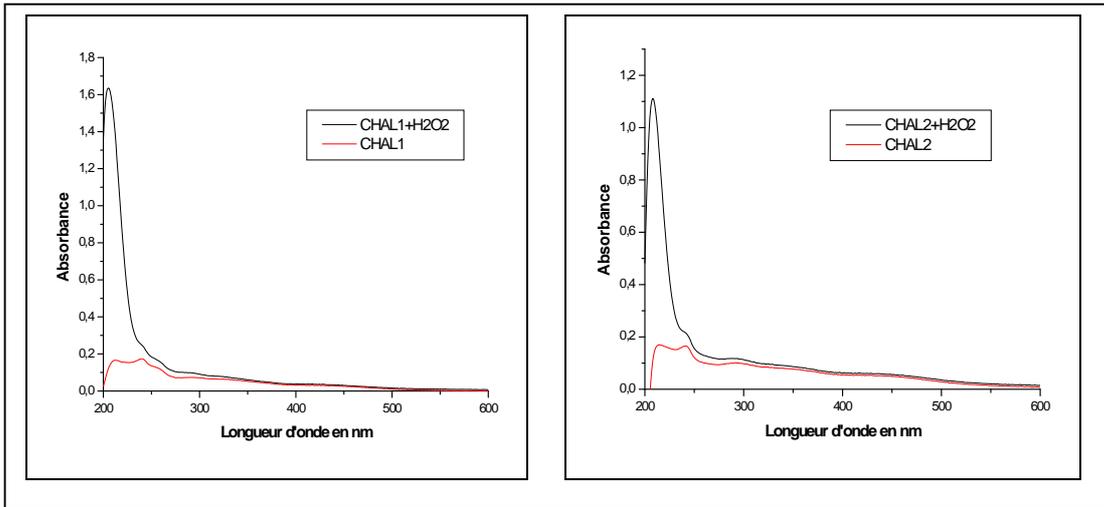


Figure 33. Spectre d'absorption de CHAL1 et CHAL2 à 10 μ M incubée pendant 2 heures dans 1mM de H2O2 superposé sur le spectre des mêmes solutions témoins.

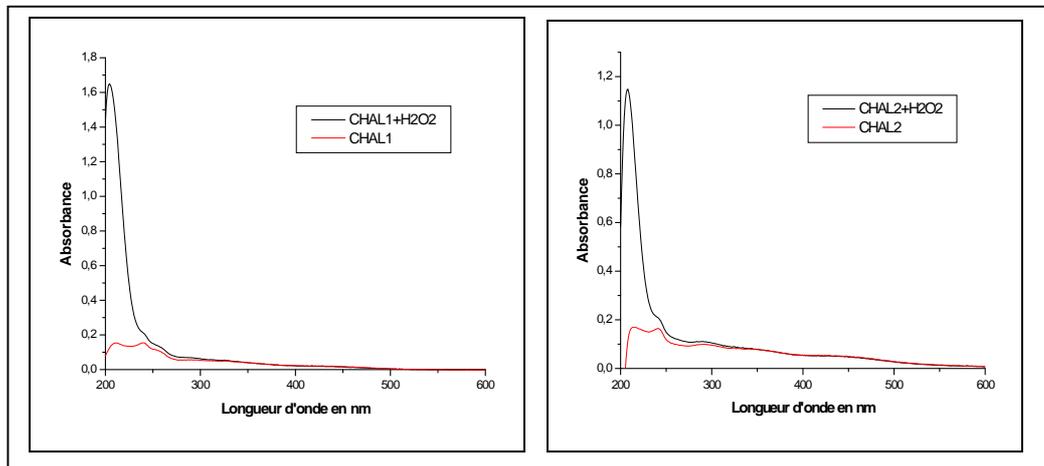


Figure 34. Spectre d'absorption de CHAL1 et CHAL2 à 10 μ M incubée pendant 4 heures dans 1mM de H2O2 superposé sur le spectre des mêmes solutions témoins.

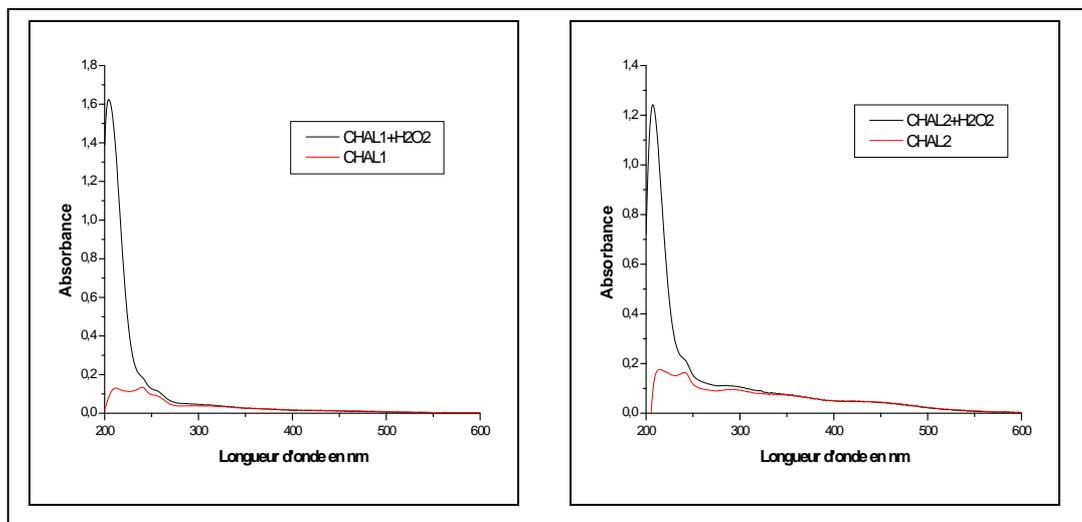


Figure 35. Spectre d'absorption de CHAL1 et CHAL2 à 10 μ M incubée pendant 24 heures dans 1mM de H2O2 superposé sur le spectre des mêmes solutions témoins.

A 10 μ M, CHAL1 et CHAL2 n'ont pas réagi avec le peroxyde d'hydrogène. Ce résultat inattendu corrèle avec ceux publiés par Mokrini et coll. [3].

Après ces résultats caractérisant le comportement des molécules CHAL1 et CHAL2 vis-à-vis des radicaux libres, nous avons entrepris l'étude de l'activité de celles-ci avec la xanthine oxydase.

III.1.3 Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase

L'évolution de la réaction de la xanthine oxydase en présence de CHAL1 à différentes concentrations initiales en fonction du temps est représentée sur les figures 36-41. Les cinq concentrations choisies sont 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M et 75 μ M et les temps d'incubation varient de 0 mn à 60 mn.

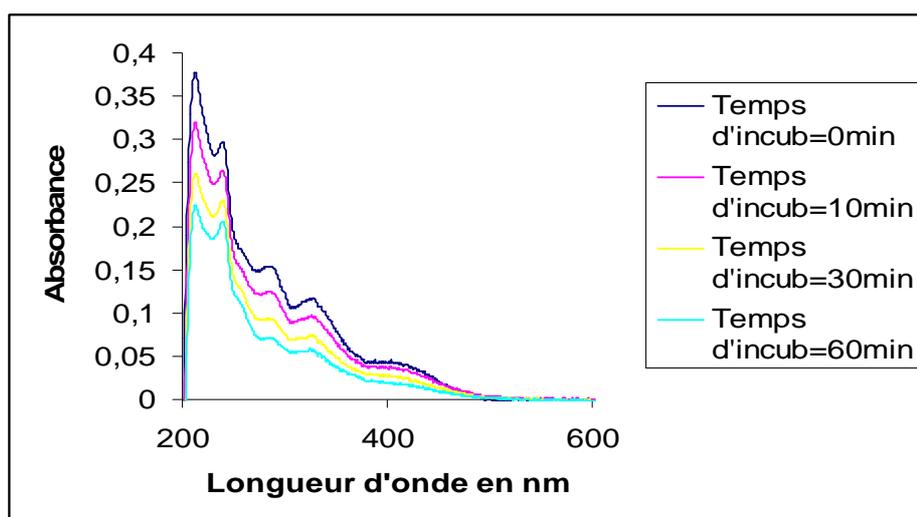


Figure 36. Suivi du spectre d'absorption de la réaction de CHAL(1)-10 μ M avec la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL à différents temps d'incubation.

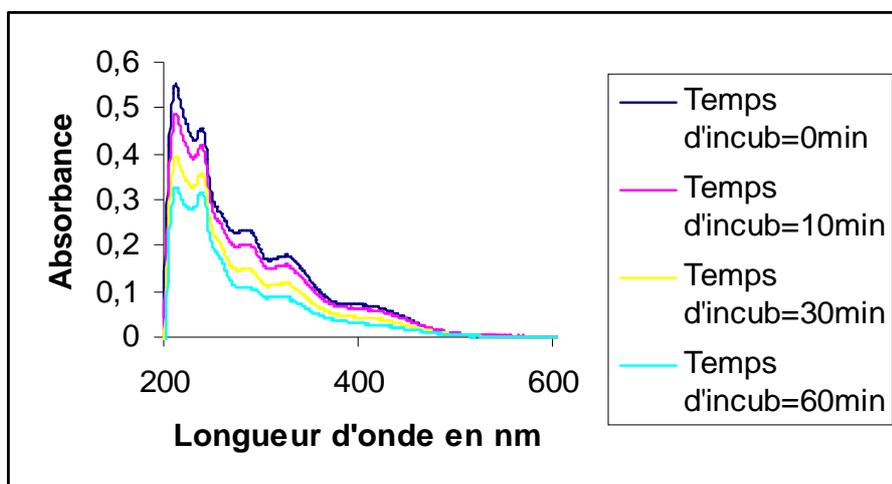


Figure 37. Suivi du spectre d'absorption de la réaction de CHAL(1)-20µM avec la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL à différents temps d'incubation

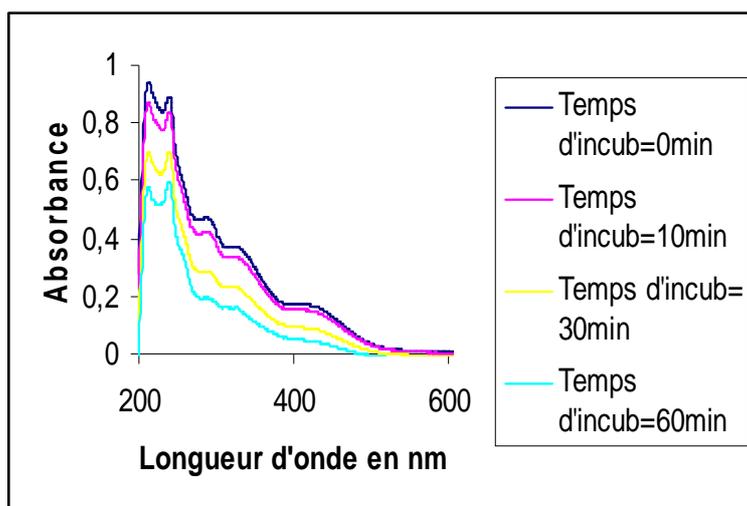


Figure 38. Suivi du spectre d'absorption de la réaction de CHAL(1)-30µM avec la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL à différents temps d'incubation.

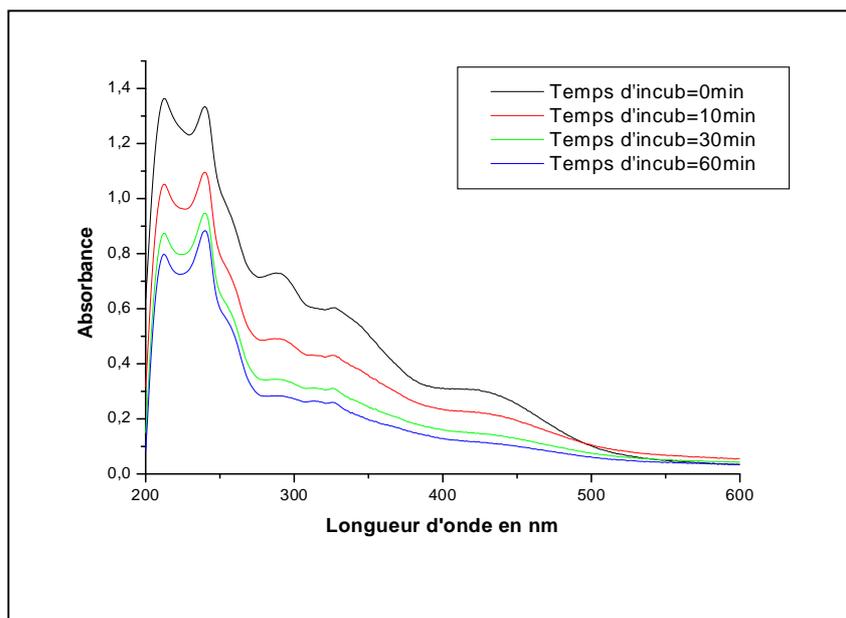


Figure 39. Suivi du spectre d'absorption de la réaction de CHAL(1)-50 μM avec la xanthine oxydase 7 × 10⁻³ U/mL à différents temps d'incubation

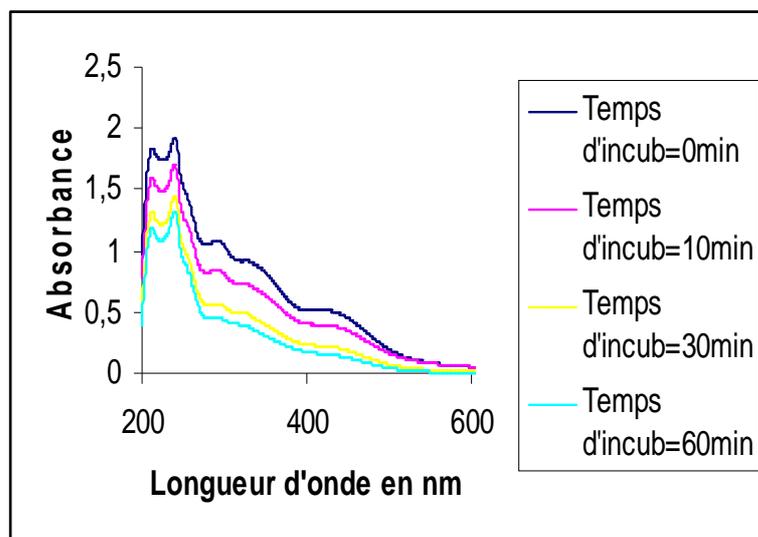


Figure 40. Suivi de spectre d'absorption de la réaction de CHAL(1)-75 μM avec la xanthine oxydase 7 × 10⁻³ U/mL à différents temps d'incubation

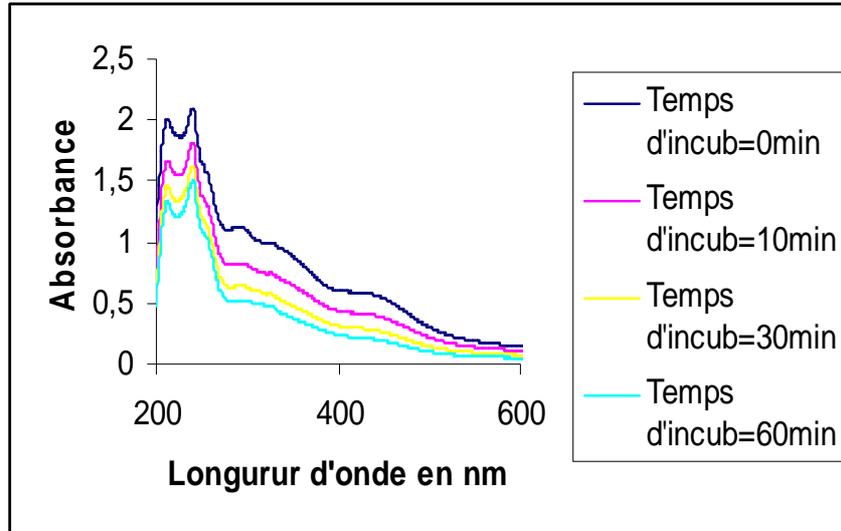


Figure 41. Suivi du spectre d'absorption de la réaction de CHAL(1)-93µM avec la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL à différents temps d'incubation.

Les bandes caractérisant CHAL1 n'ont pas disparu en fonction du temps d'incubation. Cependant leur intensité diminue. Une cinétique de réaction a été entreprise à 240 nm, 289 nm, 330 nm et 440 nm et à différentes concentrations en CHAL1. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 42.

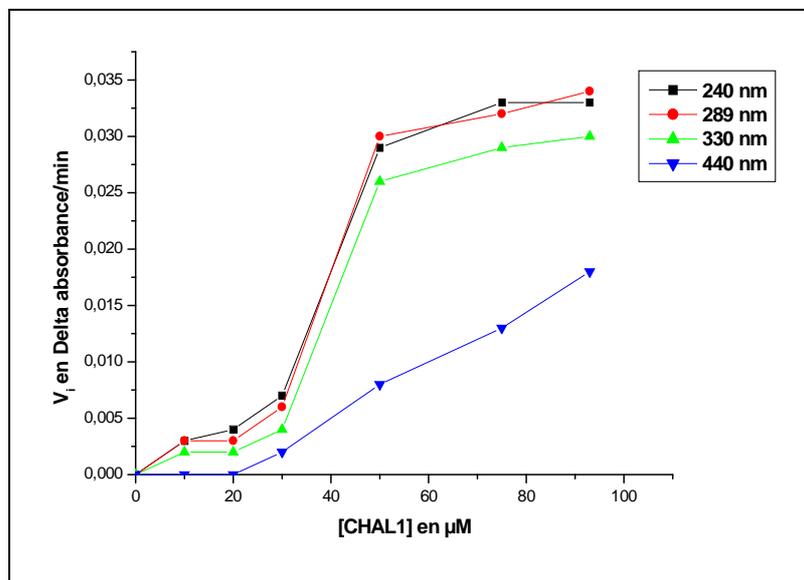


Figure 42. La vitesse initiale de la réaction de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL avec CHAL1 à 240 nm, 289 nm, 330 nm et 440 nm. La référence est constituée de 7×10^{-3} U/mL de xanthine oxydase dans 50mM de tampon phosphate. La réaction a été réalisée à température ambiante.

L'allure des courbes représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration en CHAL1 est la même pour les petites longueurs d'onde (240 et 289 nm). La vitesse commence à diminuer à partir de 330 nm. La régression est remarquable à 440 nm.

Cette diminution est expliquée par l'apparition d'une éventuelle entité qui absorbe à cette longueur d'onde. Ce résultat peut faire l'objet de deux hypothèses :

- lors de sa réaction avec la xanthine oxydase, CHAL1 est métabolisée;
- il y a apparition d'une forme oxydée de la xanthine oxydase.

En observant le spectre de CHAL1 à 10 μ M en présence de la xanthine oxydase et celui de CHAL1 à 10 μ M irradiée, nous avons constaté la même allure. Leur superposition est représentée sur la figure 43.

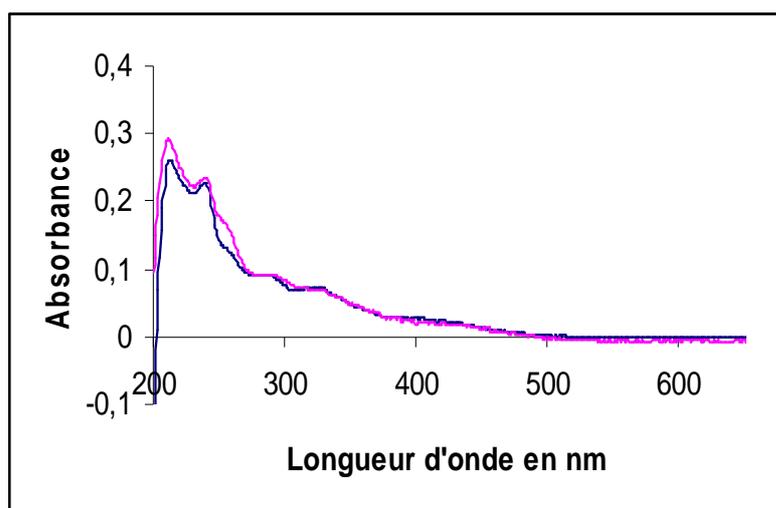


Figure 43. Spectre d'absorption de CHAL(1)-10 μ M avec la xanthine oxydase 7 \times 10⁻³U/mL (Bleu). Spectre d'absorption de CHAL(1)-10 μ M irradiée avec 507 Gy (Rose).

Contrairement à la première hypothèse émise, nous suggérons que CHAL1 n'a pas été métabolisée lors de sa réaction avec la xanthine oxydase. Ceci est d'ailleurs en corrélation avec le résultat obtenu par le docking moléculaire.

La xanthine oxydase possède deux sites actifs distincts, communiquant par une chaîne de transport d'électrons interne. Nous pouvons ainsi avoir deux formes de la xanthine oxydase, une oxydée et l'autre réduite. Ainsi, la vitesse de réaction de la XO à 440 nm peut diminuer donc par ré-oxydation de la xanthine oxydase.

A partir des courbes représentées sur la figure 42, nous avons évalué la constante d'équilibre de dissociation K_d . Cette constante est un indicateur de l'affinité de ce ligand pour la xanthine oxydase. Plus la valeur de K_d est faible, plus l'affinité de l'enzyme est grande.

K_d représente la concentration du ligand correspondant à la vitesse $V_{max}/2$; sa valeur est de 40 μM et traduit une grande affinité pour la xanthine oxydase.

III.1.4 Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase en présence du Cytochrome C

Pour éviter l'interférence de l'origine de production des radicaux superoxyde, nous nous sommes posés la question suivante: est-ce que la réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase produit des radicaux superoxyde ?

Pour cela, nous avons suivi cinétiquement à 550 nm la réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase en présence et en absence du cytochrome C comme le montre la figure 44.

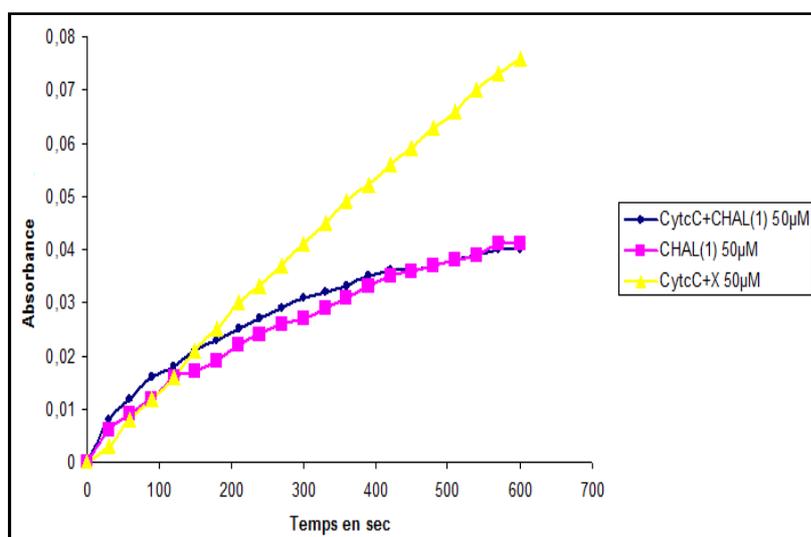


Figure 44. Suivi cinétique de la réaction de CHAL1- 50µM avec la xanthine oxydase 7×10^3 U/mL en présence (●) et en absence (■) du cytochrome C 10^{-5} M. (▲) représente la réduction du Cytochrome C 10^{-5} M par la réaction de la xanthine oxydase 7×10^3 U/mL et 50µM de xanthine.

L'évolution de la densité optique à 550 nm est la même en présence et en absence du Cytochrome C. Il semble donc qu'il n'y a pas de production d'ions superoxyde lors de la réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase.

Les résultats obtenus précédemment indiquent que la CHAL1 ne se modifie pas par l'irradiation et qu'en sa présence, la xanthine oxydase ne produit pas des radicaux superoxyde. Il est apparu important de revoir son comportement en présence du substrat naturel. Pour cela, nous caractérisons d'abord les différentes molécules qui peuvent être trouvées dans le mélange réactionnel à savoir la xanthine, la xanthine oxydase et l'acide urique.

La xanthine est une molécule qui absorbe de la lumière dans le domaine ultra violet (200 à 400 nm), elle est caractérisée par un pic vers 270 nm. La XO est définie par un pic vers 280 nm. La conversion de la xanthine par la xanthine oxydase produit de l'acide urique, une molécule caractérisée par un λ_{\max} égale à 295 nm avec un coefficient d'extinction qui égale $\Delta\epsilon_{295} = 9,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [4].

En conclusion, la réaction de CHAL1 avec la XO en présence de la xanthine peut être entreprise sans confusion des bandes particulières du complexe et des molécules étudiées précédemment.

III.1.5 Réaction de CHAL1 avec la xanthine oxydase en présence de la xanthine

Les spectres d'absorption de la réaction de CHAL1 à différentes concentrations avec la xanthine oxydase en présence de la xanthine et à différents temps d'incubation sont représentés sur les figures 45-47.

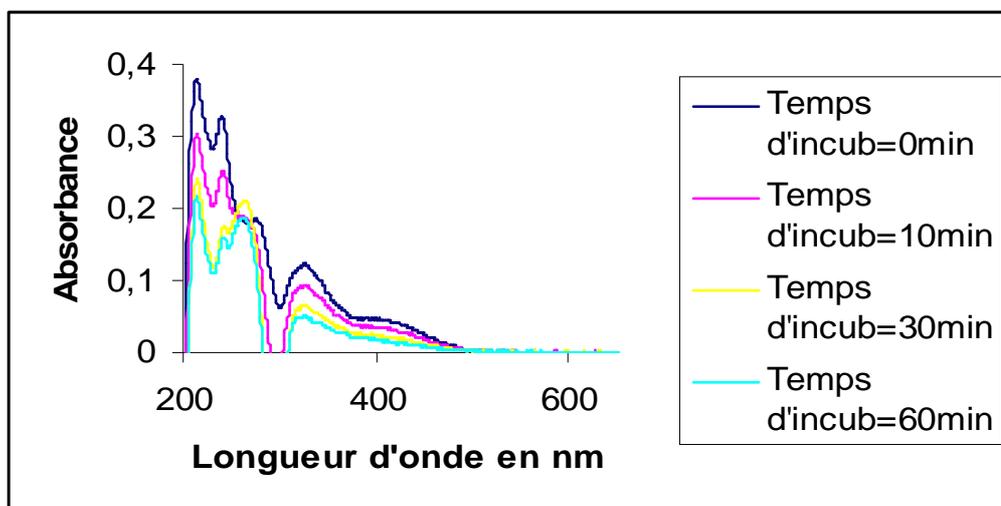


Figure 45. Suivi par absorption de la réaction de la xanthine oxydase $7 \times 10^{-3} \text{ U/mL}$ avec CHAL1- $10 \mu\text{M}$ en présence de $50 \mu\text{M}$ de xanthine. La référence contenant $7 \times 10^{-3} \text{ U/mL}$ xanthine oxydase, $50 \mu\text{M}$ xanthine dans 50 mM Tampon phosphate pour un volume final de 1 mL . La réaction a été effectuée à température ambiante et à $\text{pH} = 7,5$.

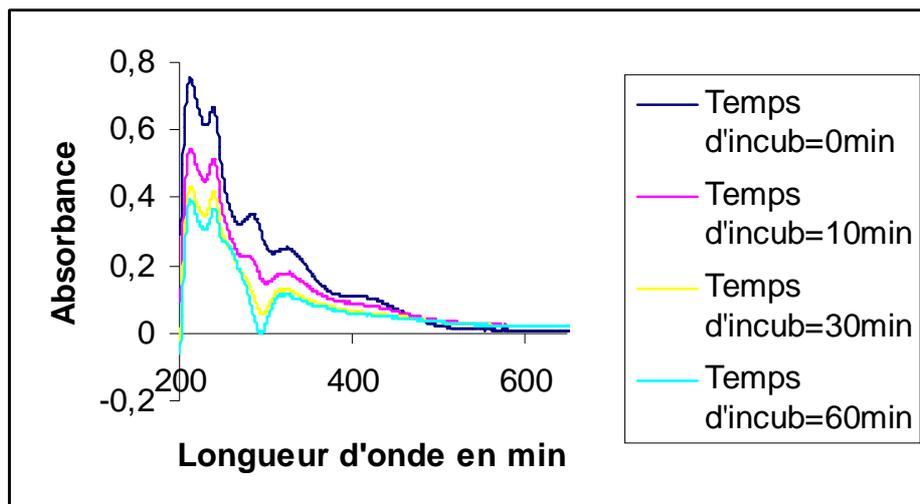


Figure 46. Suivi de spectre d'absorption de la réaction de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL avec CHAL(1)- $20 \mu\text{M}$ en présence de $50 \mu\text{M}$ de xanthine. La référence contenant 7×10^{-3} U/mL xanthine oxydase, $50 \mu\text{M}$ xanthine dans 50mM Tampon phosphate pour un volume final de 1mL .

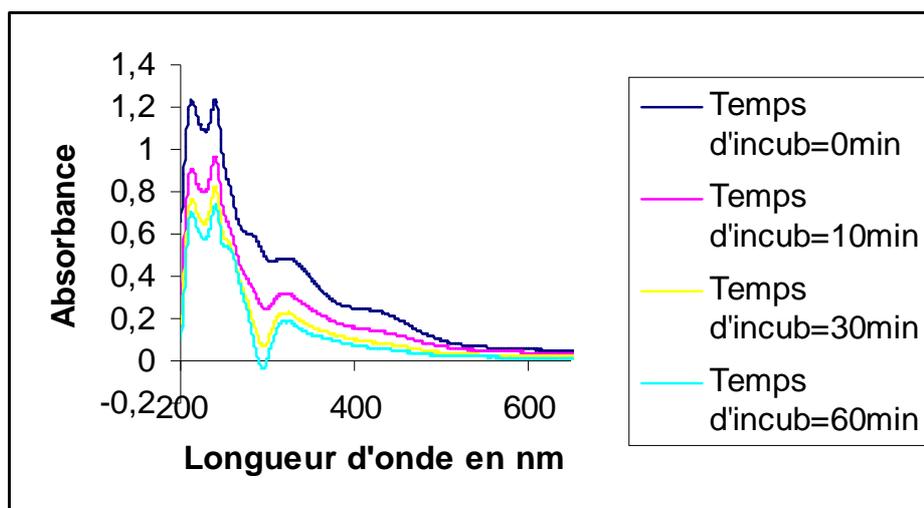


Figure 47. Suivi de spectre d'absorption de la réaction de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL avec CHAL(1)- $50 \mu\text{M}$ en présence de $50 \mu\text{M}$ de xanthine. La référence contenant 7×10^{-3} U/mL xanthine oxydase, $50 \mu\text{M}$ xanthine dans 50mM Tampon phosphate pour un volume final de 1mL .

Ainsi, les molécules présentes dans le mélange absorbent de 200 à 300 nm. A partir de 330 nm, l'absorption correspond uniquement à CHAL1. Elle est précédée par une

faible absorbance vers 295 nm caractérisant la formation de l'acide urique dans la cuvette de référence. Par conséquent, CHAL1 a inhibé l'activité de la xanthine oxydase.

La superposition du spectre d'absorption de la réaction de CHAL1 avec la XO à 0 mn et à 30 mn d'incubation, et du spectre d'absorption de la même réaction en présence de la xanthine pour les mêmes temps d'incubation est représentée sur les figures 48 et 49.

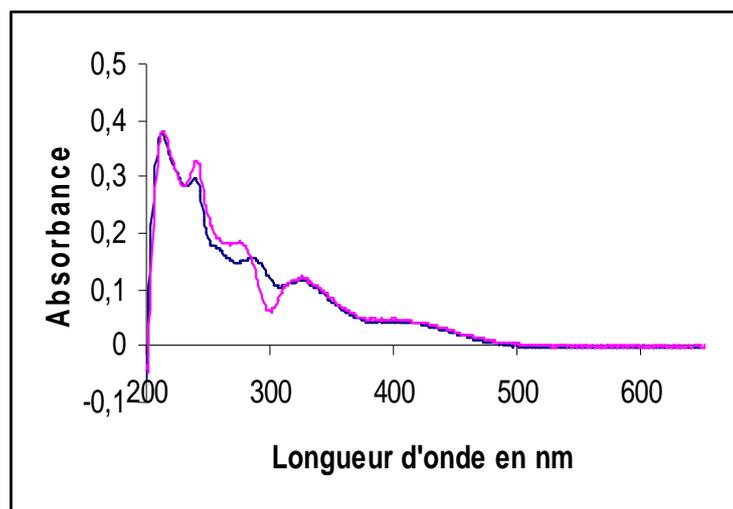


Figure 48. Spectre d'absorption de la réaction de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL avec CHAL(1)-10µM en présence (—) et en absence (—) de 50µM de xanthine sans incubation. La réaction a été effectuée à température ambiante et à pH= 7,5.

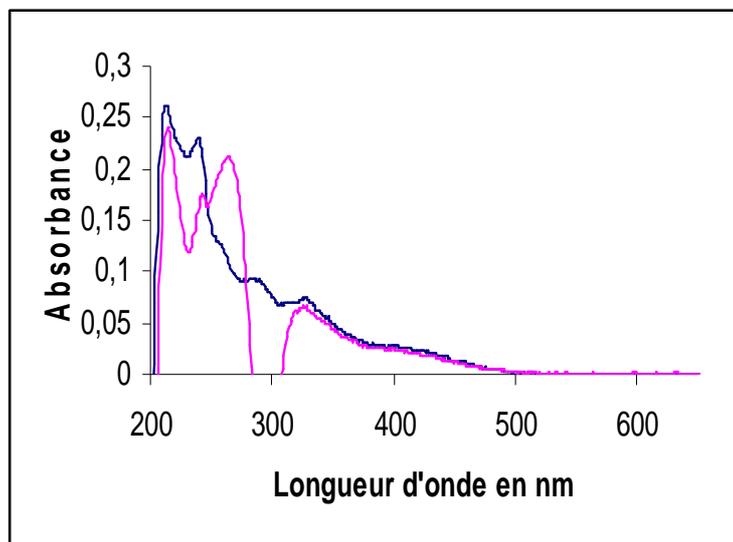


Figure 49. Spectre d'absorption de la réaction de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL avec CHAL(1)-10µM en présence (—) et en absence (—) de 50µM de xanthine pendant 30 min d'incubation. La réaction a été effectuée à température ambiante et à pH= 7,5.

A partir de 330 nm, les spectres d'absorption semblent inchangés en présence et en absence de la xanthine.

Pour préciser l'aspect compétitif de la CHAL1 vis-à-vis du substrat naturel, nous avons étudié la variation des absorbances en fonction du temps d'incubation à 330 nm et 440 nm. Sur les figures 50-51, nous avons reporté les résultats obtenus de la réaction CHAL1/XO en absence et en présence de la xanthine. L'allure des deux courbes est pratiquement la même, traduisant ainsi des vitesses de réaction semblables qui deviennent égales à 10 mn.

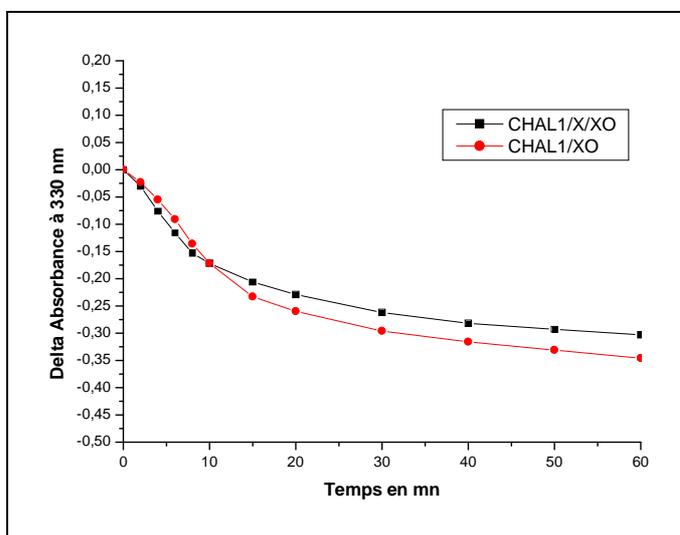


Figure 50. Suivi cinétique à 330 nm de la réaction de CHAL-50µM avec la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL en absence et en présence de 50µM de xanthine. La réaction a été suivie à température ambiante et à pH=7,5.

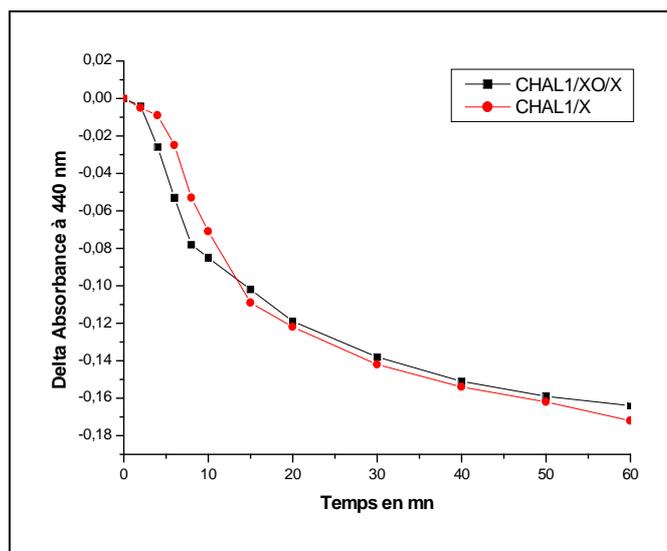


Figure 51. Suivi cinétique à 440 nm de la réaction de CHAL1-50µM 50 avec la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL en absence et en présence de 50µM de xanthine. La réaction a été suivie à température ambiante et à pH=7,5.

Bien que ces résultats soient en faveur de l'absence d'effet sur la réaction de CHAL1 avec la XO en présence de la xanthine, nous soulignons cependant une affinité plus importante que celle du substrat naturel, et par conséquent une plus faible production d'acide urique que nous étudions dans le paragraphe suivant.

III.1.6 Suivi cinétique à 295 nm de la réaction de la xanthine avec la xanthine oxydase en présence de CHAL1 et CHAL2

En présence d'oxygène, la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante :

Xanthine oxydase



La capacité d'une molécule à inhiber la xanthine oxydase est évaluée en fonction de la quantité d'acide urique formée. La mesure d'acide urique formée s'est effectuée par spectrophotométrie d'absorption selon la méthode d'Owen et coll. [5]. Le spectre d'absorption de la molécule d'acide urique est caractérisé par un maximum à 295 nm, $\Delta\epsilon_{295} = 9,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [4].

Avant de tester la production d'acide urique par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase en présence de CHAL1 et CHAL2 (séparément) à différentes concentrations, nous avons réalisé un suivi cinétique témoin avec uniquement de la xanthine et de la xanthine oxydase. Les résultats obtenus sont représentés sur les figures 52-53 qui laissent apparaître un important potentiel d'inhibition.

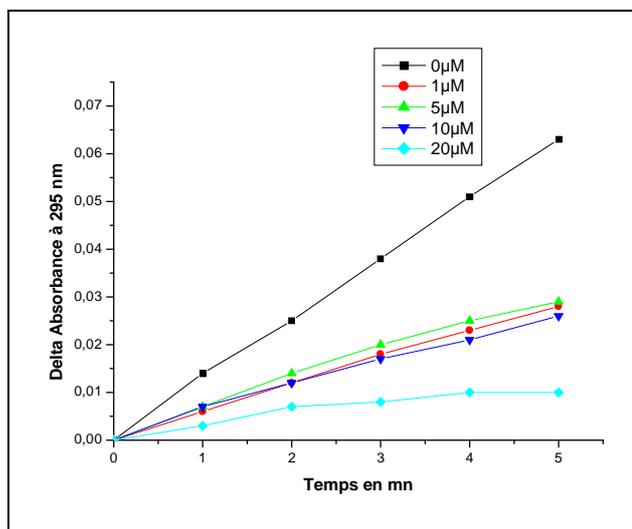


Figure 52. Suivi cinétique de la formation d'acide urique après incubation de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL avec CHAL1 pendant 10 min.

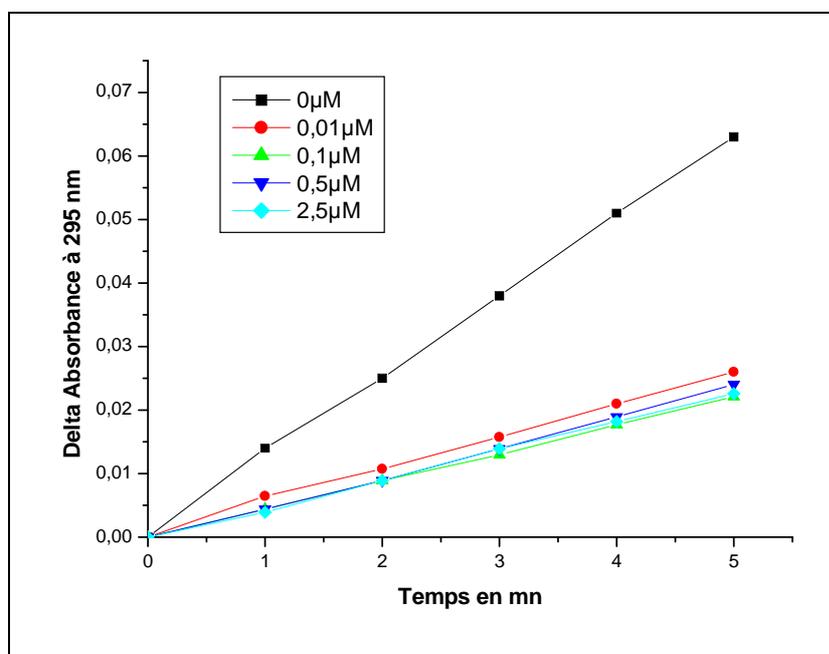


Figure 53. Suivi cinétique de la formation d'acide urique après incubation de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/mL avec CHAL2 pendant 10 min.

Les droites obtenues représentent l'évolution de la formation d'acide urique en fonction du temps. A temps constant, plus la tangente est grande, plus le potentiel d'inhibition est faible.

La présence des chalcones quinoléiques étudiées dans le mélange réactionnel a diminué l'activité de la xanthine oxydase qui varie en fonction de la concentration en CHAL1 et CHAL2. Le pourcentage d'inhibition est évalué par l'équation equ.2.

$$PID = \frac{(V_{0c} - V_0)}{V_{0c}} \times 100 \rightarrow equ.2$$

sachant que :

V_{0c} : vitesse initiale (Δ absorbance/min) de la réaction enzymatique sans CHAL1.

V_0 : vitesse initiale de la réaction enzymatique en présence de CHAL1 à différentes concentrations.

Les valeurs calculées sont reportées sur le tableau 4.

Tableau 4. Résultats expérimentaux d'inhibition de la xanthine oxydase 7×10^{-3} U/m par CHAL1 et CHAL2 à différentes concentrations

[xanthine]0	[CHAL1]0	V0	PID	[CHAL2]0	V0	PID
50	0	12×10^{-3}	0	0	12×10^{-3}	0
50	5	7×10^{-3}	41,67	0,01	$4,9 \times 10^{-3}$	59
50	10	6×10^{-3}	50,00	0,1	$4,1 \times 10^{-3}$	65,83
50	20	$3,5 \times 10^{-3}$	70,83	0,5	$2,2 \times 10^{-3}$	81,66

[Xanthine]0= Concentration molaire initiale de la xanthine (μ M);

[CHAL1]0= Concentration molaire initiale de CHAL1 (μ M);

[CHAL2]0= Concentration molaire initiale de CHAL2 (μ M);

V0= Vitesse initiale (Delta absorbance/min);

PID= pourcentage du degré d'inhibition, equ.2

A 20μ M, CHAL1 inhibe 70% de l'activité de la xanthine oxydase. Nous supposons que l'inhibition de la réduction du cytochrome C par CHAL1, remarqué précédemment, est due essentiellement à l'inhibition de la réaction X/XO.

Pour la CHAL2, la position du méthyle sur la quinolyle induit une inhibition de près de 82% de l'activité de la XO à une concentration de 0,5 μ M.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons montré que CHAL1 et CHAL2 ne réagissent pas avec les espèces réactives d'oxygènes en utilisant la radiolyse Gamma. En effet, nous avons montré que même à forte dose d'irradiation il n'y a pas de dégradation de nos molécules. Par conséquent, l'oxygène moléculaire inhibe la réaction entre les radicaux libres produits par la radiolyse et nos molécules.

Nous avons montré aussi que la position du méthyle Sur la quinolyne induit une inhibition remarquable de l'activité de la XO.

Nous avons mis en évidence que la réaction de CHAL1 avec la XO ne produit pas des radicaux superoxyde.

Nous proposons que la CHAL2 présente une plus grande affinité pour la xanthine oxydase que CHAL1 et que le substrat naturel.

Tous ces résultats sont reproduits par l'étude et les tests *in silico* obtenus précédemment.

V. Références

- [1] Burits. M, Bucar. F, Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytotherapy Research*, 2000; 14, 323-328.
- [2] Jovanovic. S.V, Steenken. S, Tosic. M, Marjanovic. B, Simic. M.G, Flavonoids as antioxidants, *J. Am. Chem. Soc*, 1994 ; 116: 4846-4851.
- [3] Mokrini. R, Mécanismes radicalaires dans la dégradation de composées phénoliques en chimie sous rayonnement : Radiolyse Gamma des chalcones et de l'acide férulique en solutions alcooliques, thèse de doctorat de l'université de Limoges, 2006.
- [4] Galbusera. C, Orth. P, Fedida. D, Spector. T, Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase, *Biochemical Pharmacology*, 2006; 71: 1747-1752.
- [5] Owen. P. L, Johns. T, Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout, *J. Ethnopharmacology*, 1999; (64):149-160.

Conclusion Générale

L'objectif de nos travaux est de définir une démarche conceptuelle de nouveaux inhibiteurs de différentes enzymes responsables des pathologies courantes. Nous nous sommes intéressés particulièrement à la xanthine oxydase qui après dégradation des nucléotides (AMP, GMP) agit sur les résidus résultants pour former l'acide urique. Elle est à l'origine de l'hyperuricémie, pathologie connue sous le nom de la goutte. A notre connaissance, l'allopurinol est la seule molécule utilisée dans le traitement de cette maladie.

Au cours de nos travaux, une nouvelle molécule appelée Fébuxostat est publiée comme inhibiteur de la xanthine oxydase et commercialisée depuis 2009. Dans le cadre de la conception de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydase, nous avons défini quelques critères pour l'élaboration de ligands de meilleure affinité pour l'enzyme.

La démarche suivie consiste dans une première étape, à caractériser les interactions mises en jeu lors de la réaction de la xanthine oxydase avec les six nouveaux composés qui sont des chalcones de quinoléine (CHAL1 à CHAL6). Pour vérifier quelques propriétés pharmacocinétiques qui permettent d'estimer la biodisponibilité de ces ligands, nous avons appliqué la règle de cinq de Lipinski.

Le docking moléculaire nous a permis d'obtenir des grandeurs structurales qui rentrent dans la compréhension de la position et de la présence d'atomes d'oxygène dans les substituants du phényle par rapport à la nature des liaisons établies par le récepteur. Ces liaisons de type hydrogène sont relativement faibles mais importantes dans l'édifice biologique.

Nous avons montré qu'un recouvrement stérique minimal autour du fragment quinolyte de la chalcone permet de faciliter l'introduction du ligand dans la cavité catalytique de l'enzyme. La stabilité dans le site récepteur de la xanthine oxydase est assurée par les interactions hydrophobiques lors de la réaction CHAL/XO. Nous avons montré que la distribution tissulaire, c'est-à-dire le passage des ligands à travers les membranes lipidiques et plasmiques, est facilitée par le caractère lipophile.

Les résultats obtenus lors de l'évolution des grandeurs thermodynamiques du complexe CHAL/XO indiquent une stabilité plus intéressante des six ligands testés par rapport à l'inhibiteur utilisé, l'allopurinol.

Pour évaluer l'influence de la position du groupement méthyle du fragment quinolye de la chalcone sur le potentiel d'inhibition de la xanthine oxydase, nous avons effectué une cinétique de la réaction avec deux des six ligands. En effet, les tests in vitro en présence de CHAL1 et CHAL2 ont confirmé les résultats obtenus in silico. Ces deux molécules ont formé avec la xanthine oxydase des complexes stables et ont inhibé l'activité de la xanthine oxydase. Nous avons montré que lorsque le groupement méthyle est en position 8, il suffit alors de 0,5 μ M de CHAL2 pour inhiber 82% de l'activité de la xanthine oxydase.

Annexe

Synthèse des chalcones

Les chalcones sont synthétisées par réaction de condensation entre un aldéhyde et une cétone: les aldéhydes à noyaux quinoléiques sont préparés à partir d'un mélange de dérivés de phénylacétamide en présence de POCl_3/DMF . Le produit obtenu est un 2-chloro-3-formylquinoléine.

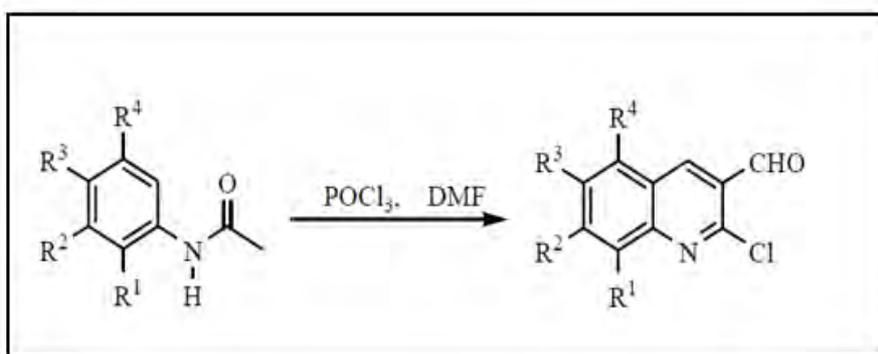


Figure 54. Préparation de 2-chloro-3-formylquinoléine

La préparation des chalcones est réalisée par action de dérivés de l'acétophénone à différentes substitutions sur les dérivés du 2-chloro-3-formylquinoléine en milieu basique EtOH/NaOH [1].

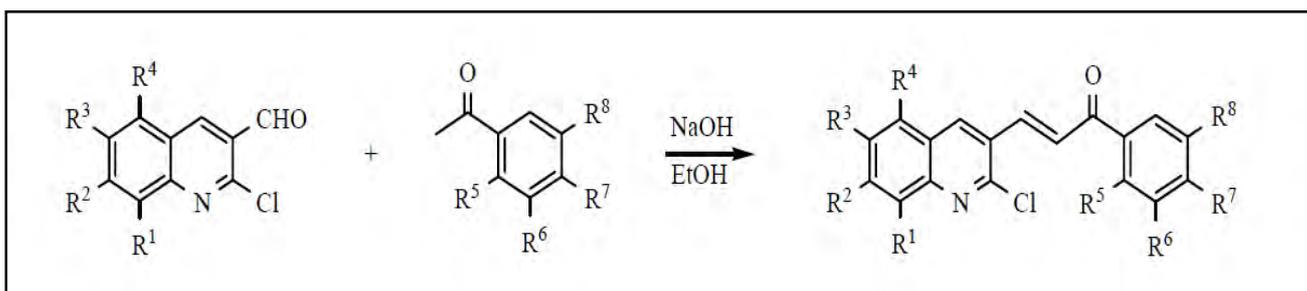
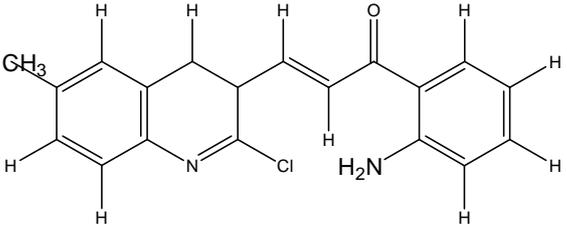
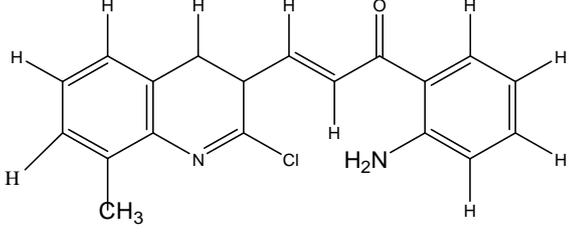
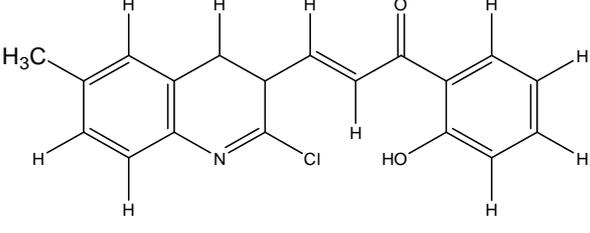
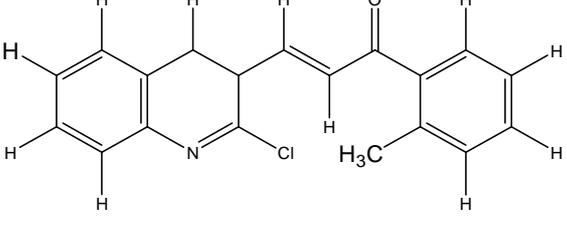
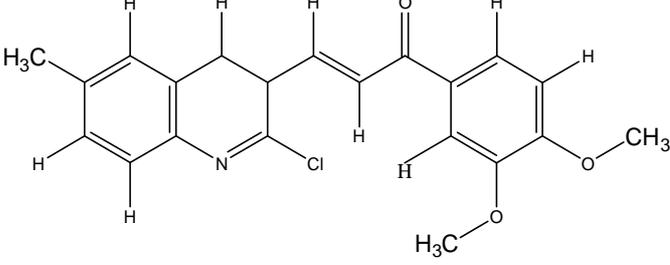
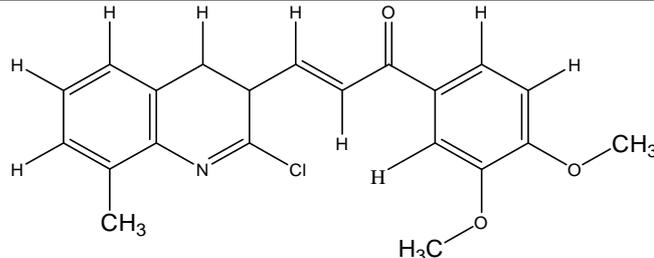


Figure 55. Dérivés de chalcones quinoléiques synthétisés

Les différents dérivés utilisés dans ce travail sont représentés dans le tableau suivant.

Structure	Code	Energie libre
 <p>1-(2'-amino-phényl)-3-[3-(2-chloro-6-méthyl-quinoly)]prop-2-èn-1-one</p>	CHAL1	-11,63 Kcal/mole
 <p>1-(2'-amino-phényl)-3-[3-(2-chloro-8-méthyl-quinoly)]prop-2-èn-1-one</p>	CHAL2	-12,48 Kcal/mole
 <p>1-(2'-hydroxy-phényl)-3-[3-(2-chloro-6-méthyl-quinoly)]prop-2-èn-1-one</p>	CHAL3	-12,35 Kcal/mole
 <p>1-(2'-méthylphényl)-3-[3-(2-chloroquinoly)]prop-2-èn-1-one</p>	CHAL4	-13,02 Kcal/mole
 <p>1-(3',4'-diméthoxyphényl)-3-[3-(2-chloro-6-méthyl-quinoly)]prop-2-èn-1-one</p>	CHAL5	-11,25 Kcal/mole

 <p data-bbox="223 470 1037 560">1-(3',4'-diméthoxyphényl)-3-[3-(2-chloro-8-méthyl-quinolyl)prop-2-èn-1-one</p>	<p data-bbox="1085 291 1165 336">CHAL6</p>	<p data-bbox="1212 291 1340 380">-11,41 Kcal/mole</p>
--	--	---

I. Références

[1] Bouraiou. A, Thèse de Doctorat, Université de Constantine1, 2009.

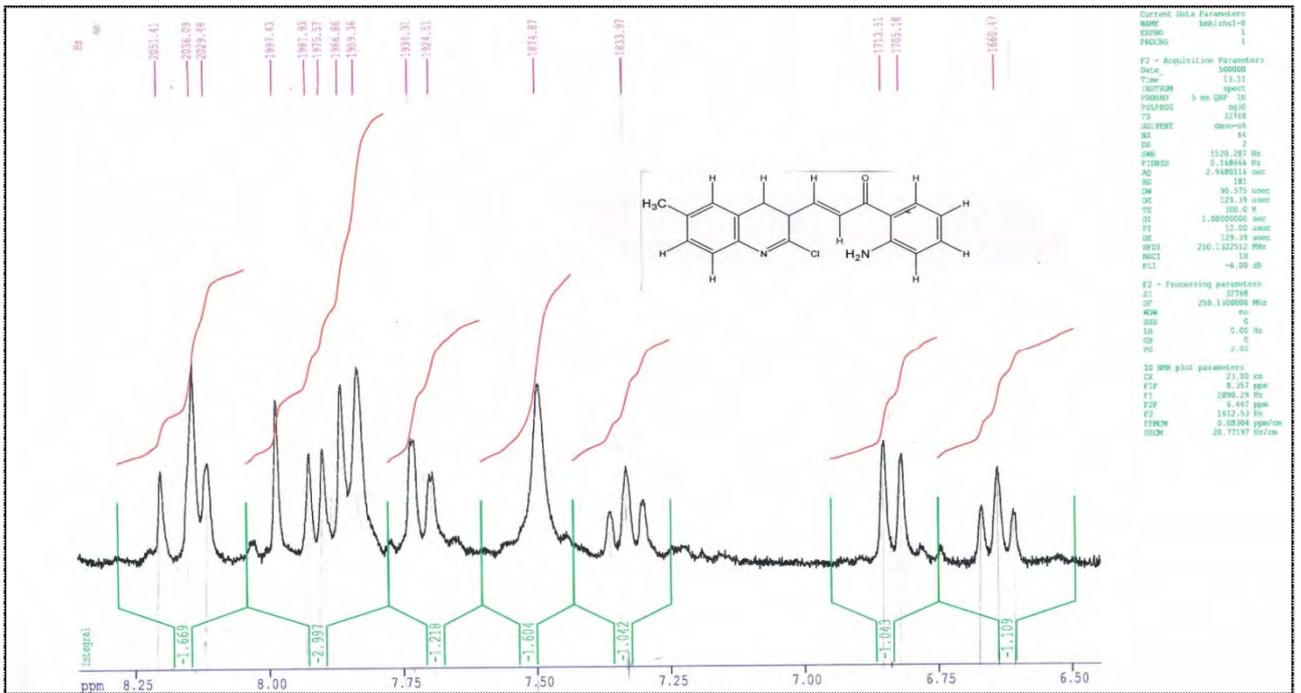


Figure 56. Spectre RMN proton (^1H) de CHAL1-10 μM non irradiée

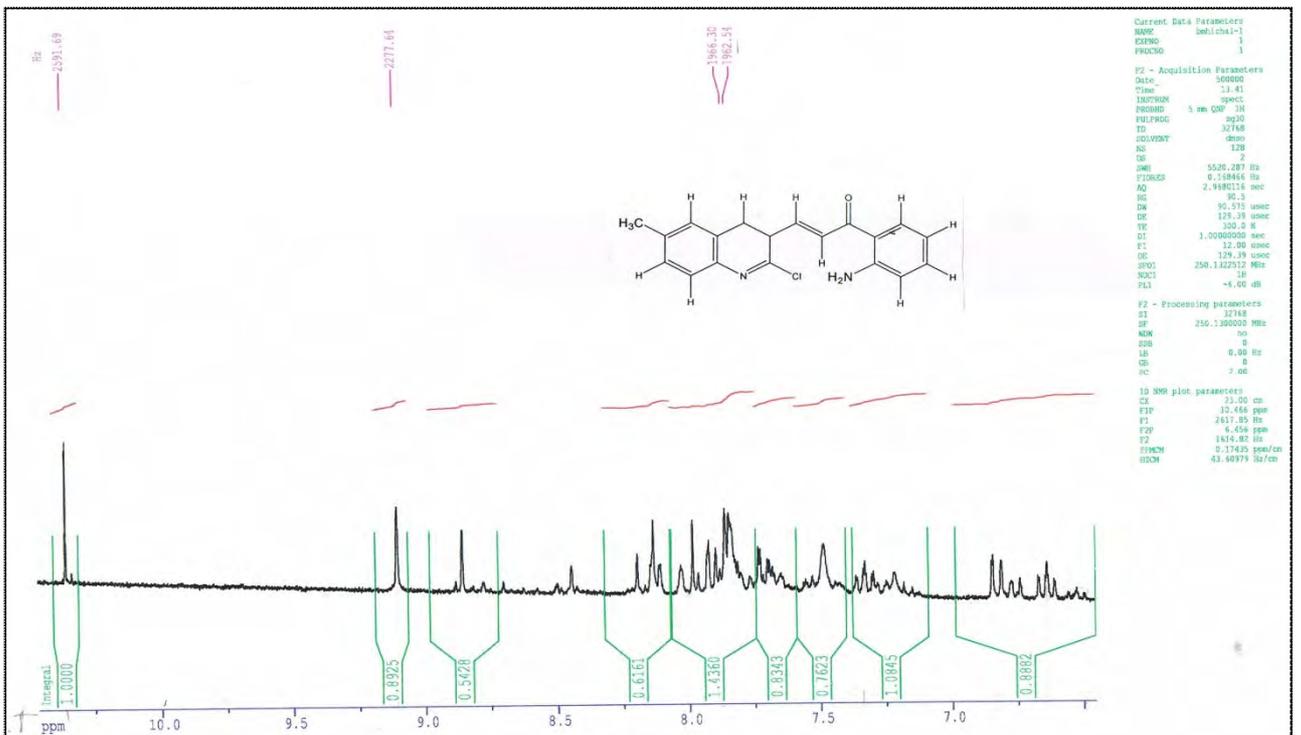


Figure 57. Spectre RMN proton (^1H) de CHAL1-10 μM irradiée avec une dose de 507 Gy

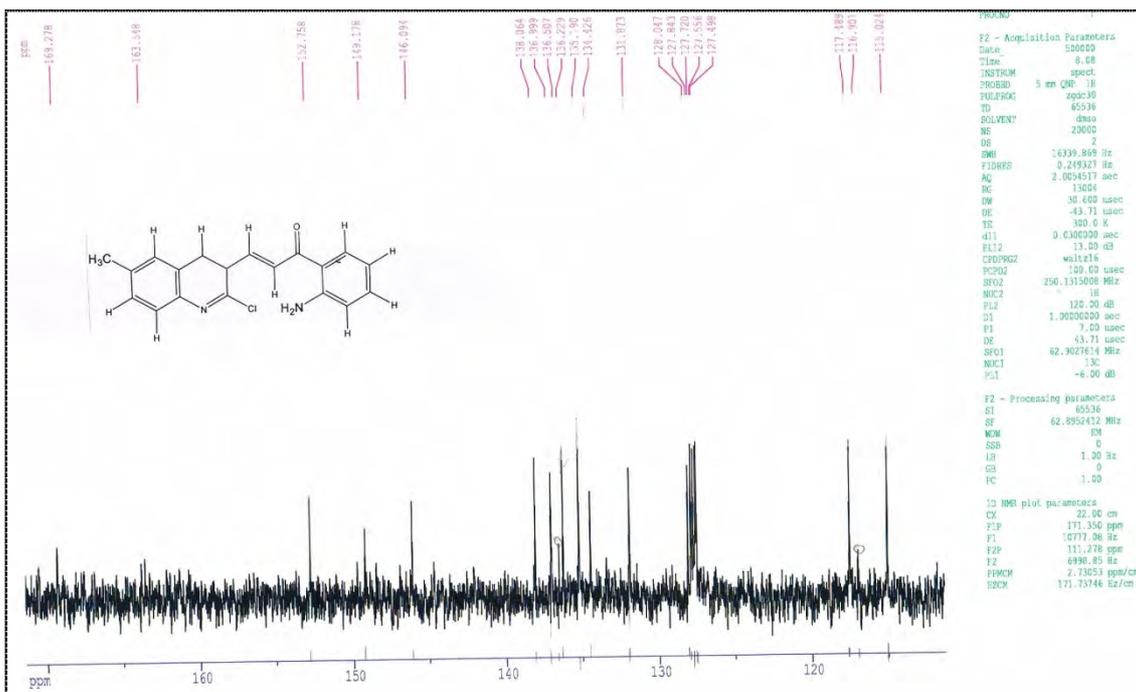


Figure 58. Spectre RMN carbone (^{13}C) de CHAL1-10 μM non irradiée

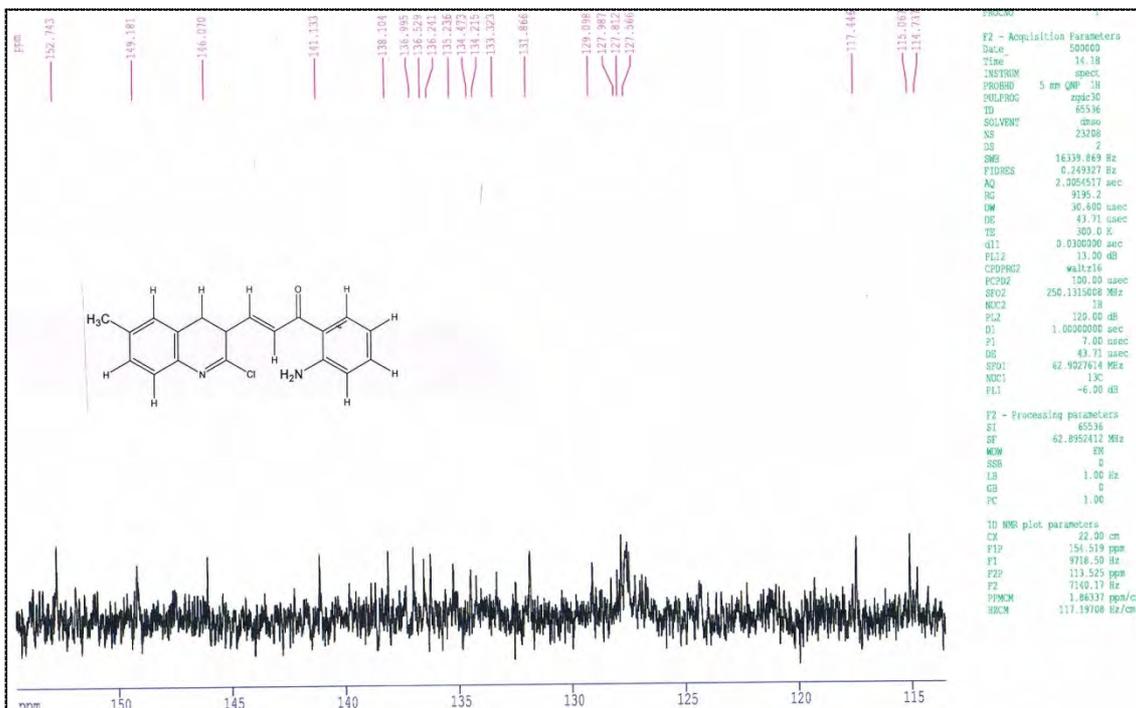


Figure 59. Spectre RMN carbone (^{13}C) de CHAL1-10 μM irradiée avec une dose de 507 Gy

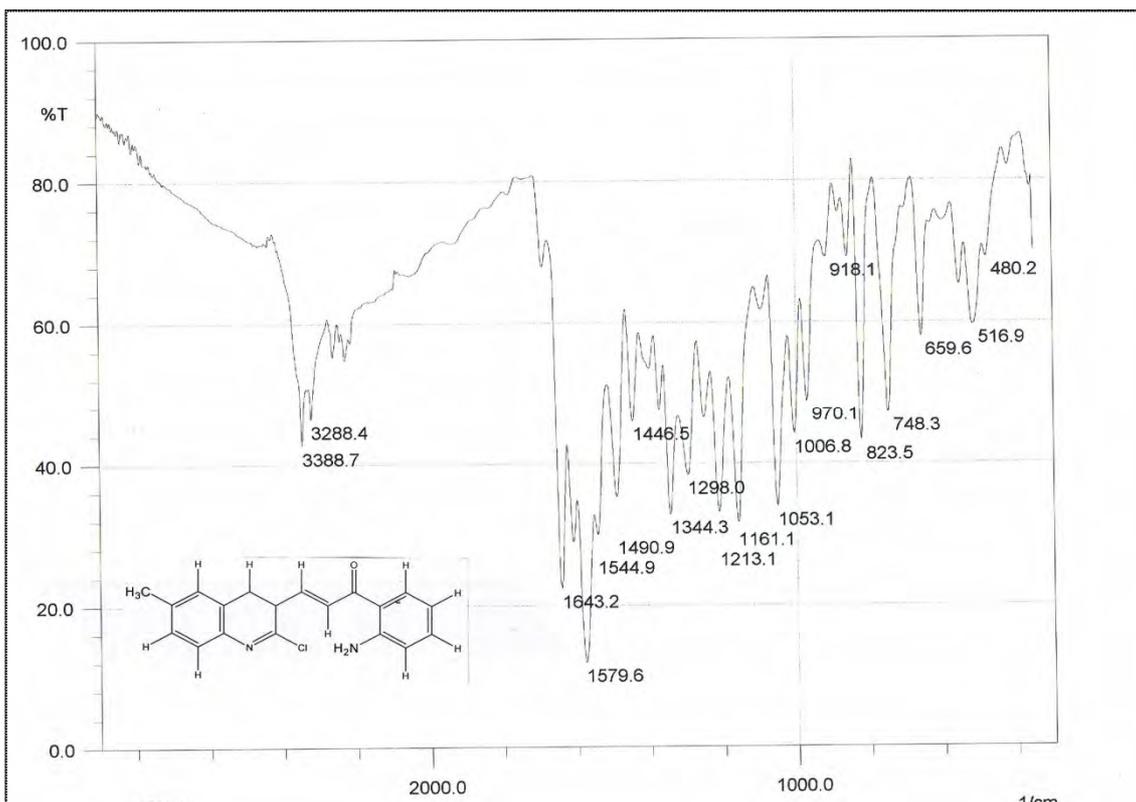


Figure 60. Spectre IR de CHAL-1-10µM non irradiée

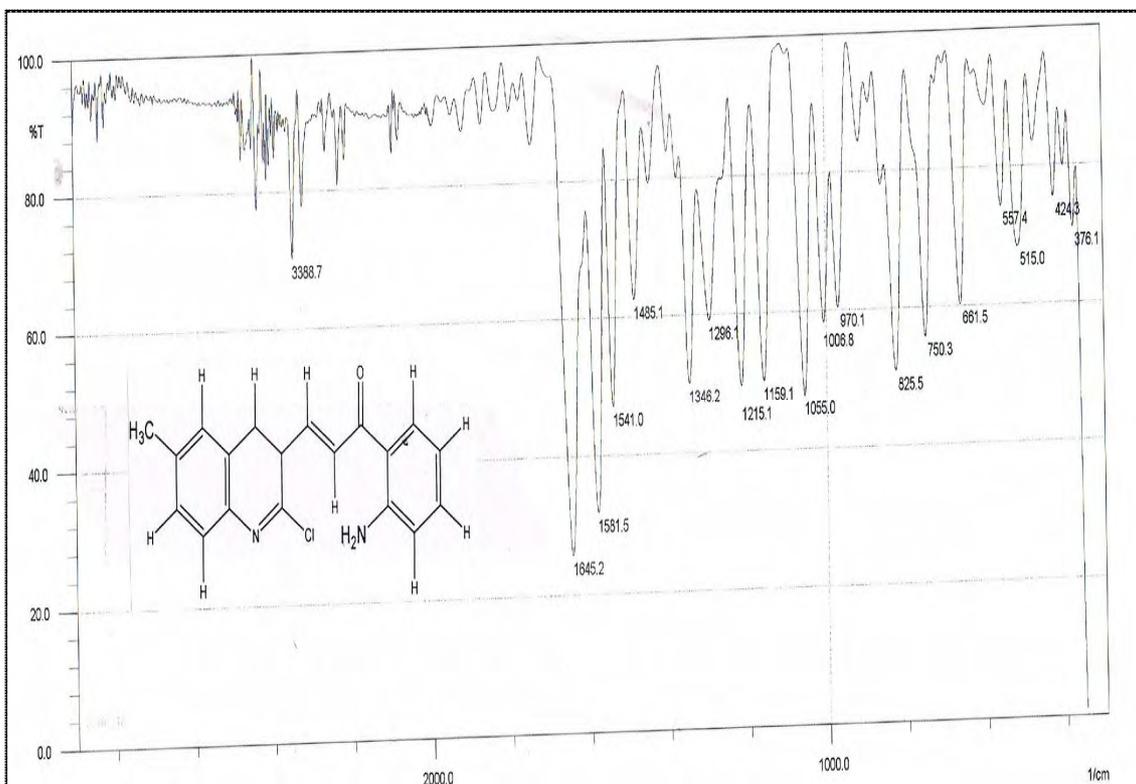


Figure 61. Spectre IR de CHAL-1-10µM irradiée avec une dose de 507 Gy

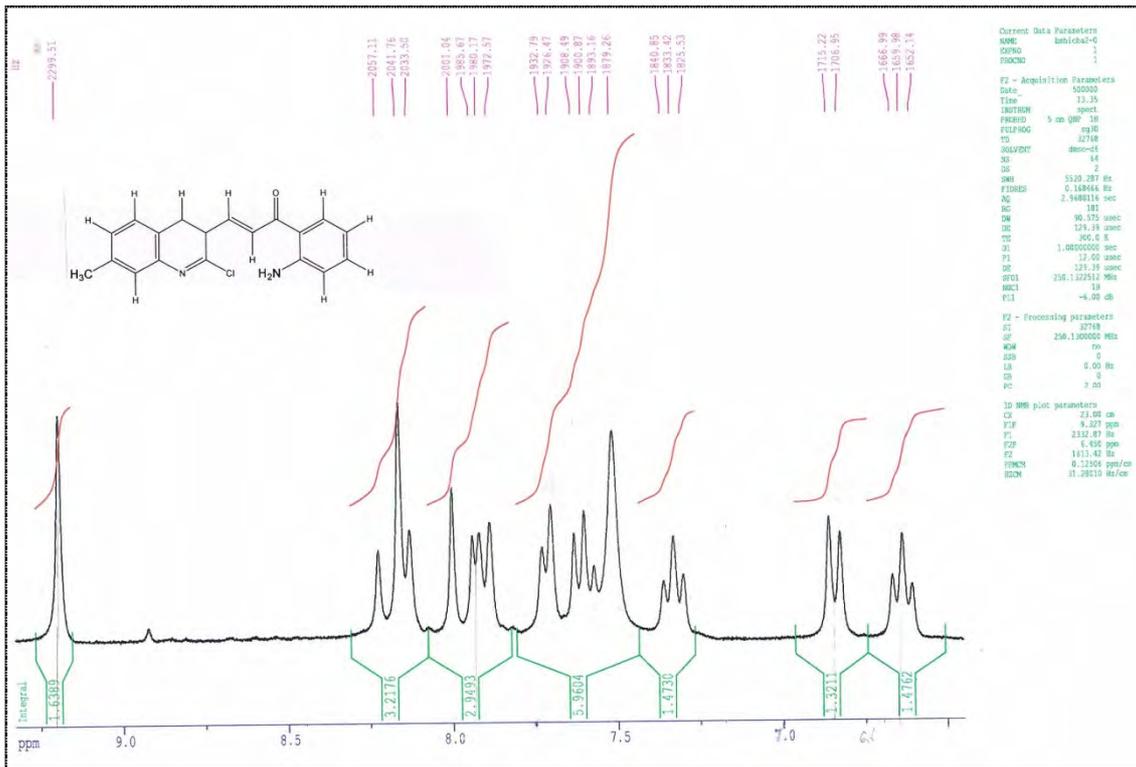


Figure 62. Spectre RMN proton (^1H) de CHAL2-10 μM non irradiée

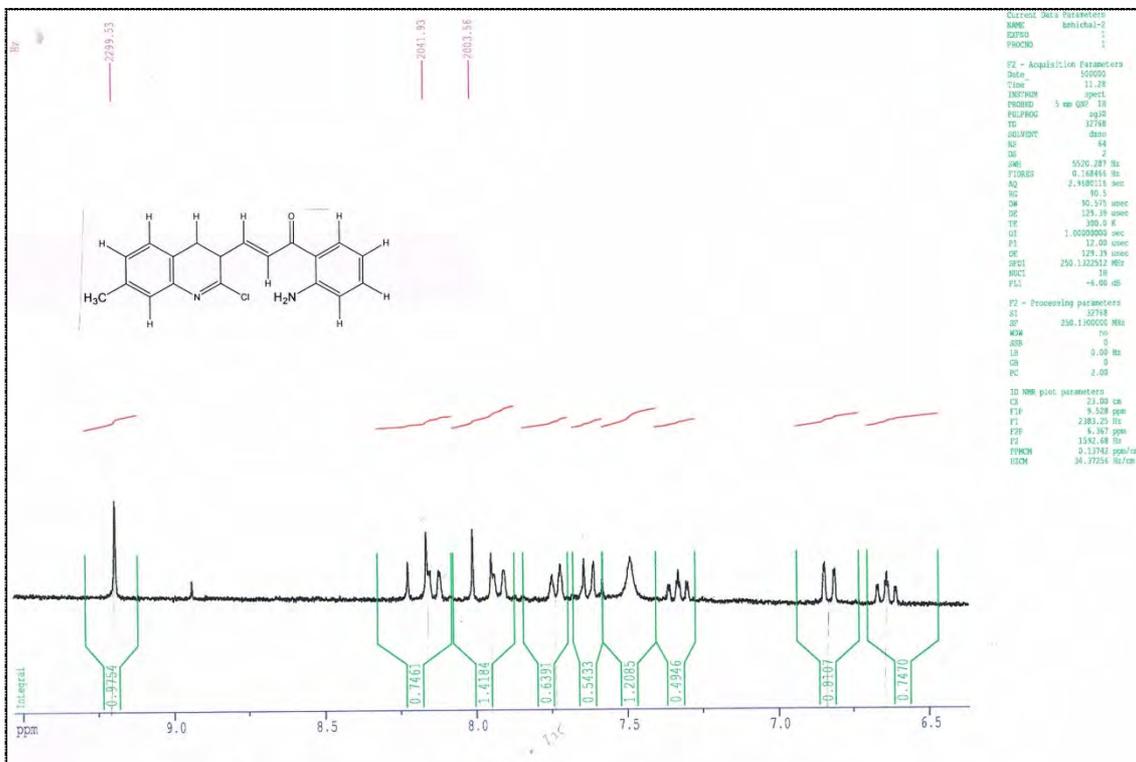


Figure 63. Spectre RMN proton (^1H) de CHAL2-10 μM irradiée avec une dose de 507 Gy

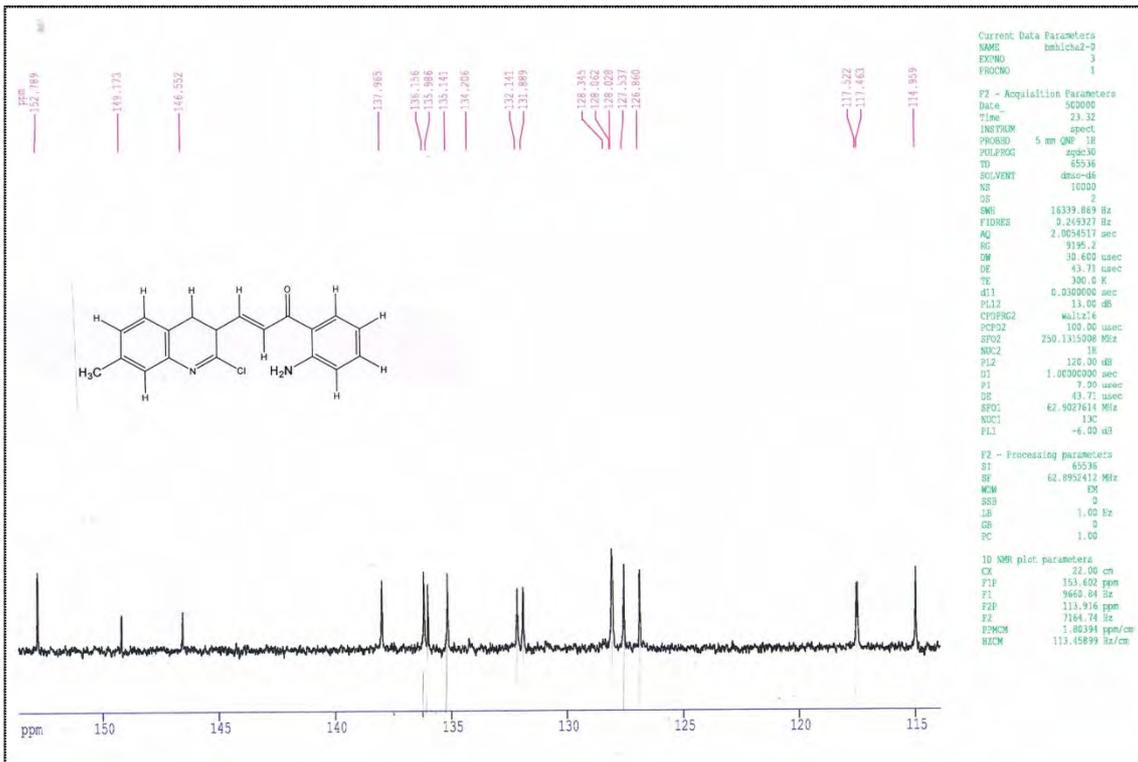


Figure 64. Spectre RMN carbone (^{13}C) de CHAL2-10 μM non irradiée

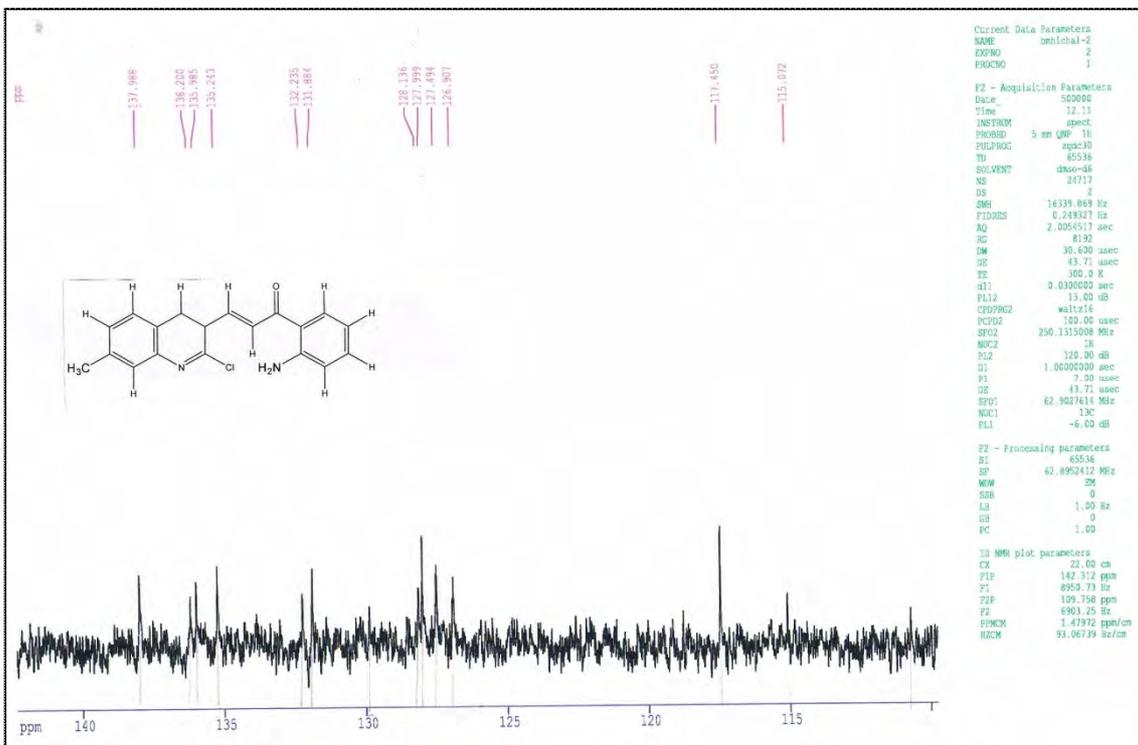


Figure 65. Spectre RMN carbone (^{13}C) de CHAL2-10 μM irradiée avec une dose de 507 Gy

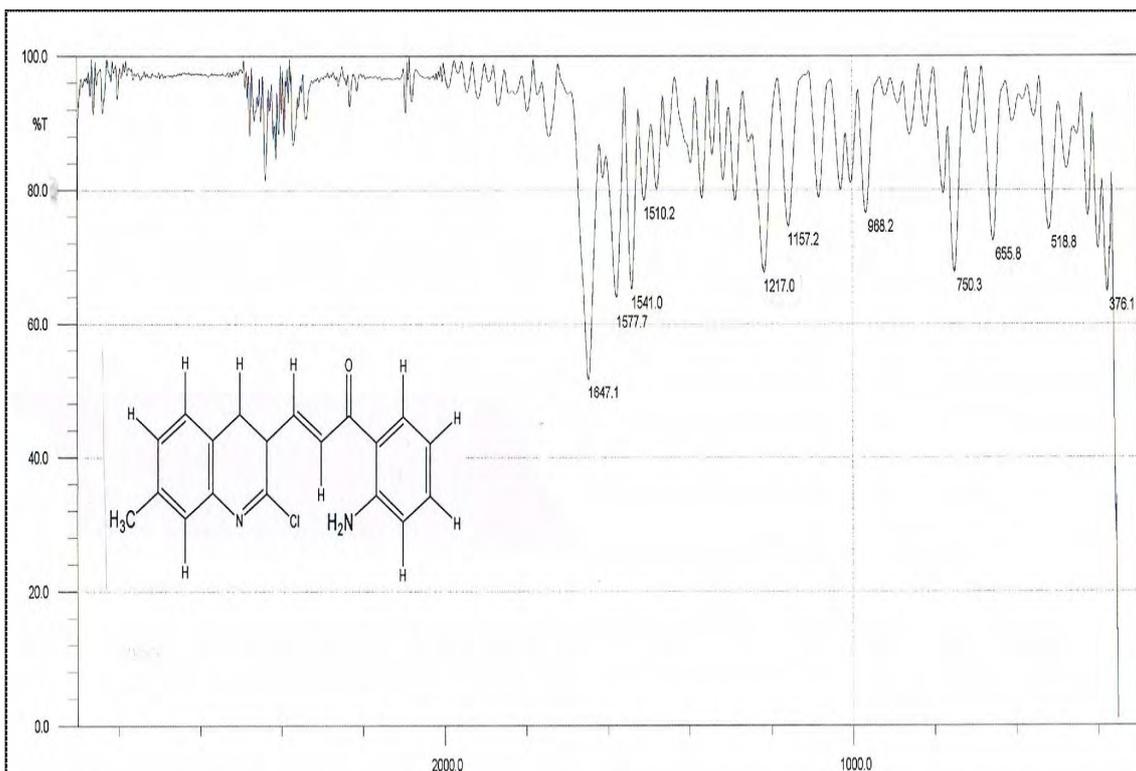


Figure 66. Spectre IR de CHAL2-10µM non irradiée

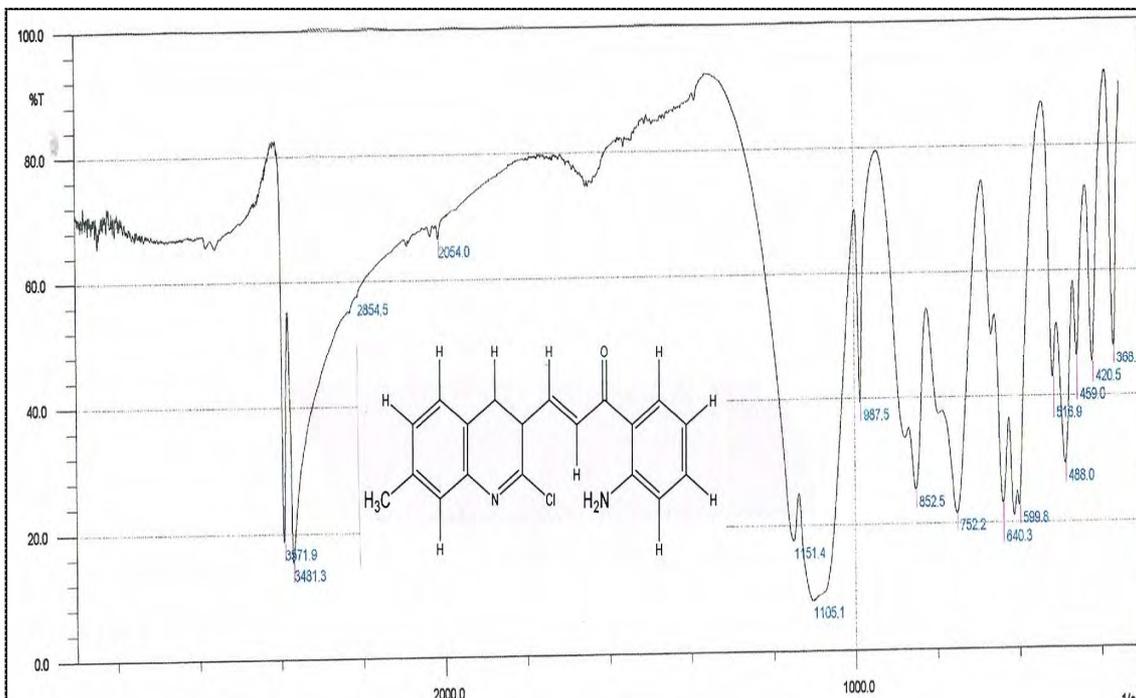


Figure 67. Spectre IR de CHAL2-10µM irradiée avec une dose de 507 Gy

Cinétique
enzymatique [1]

Les enzymes, qui sont, les catalyseurs biologiques de toutes les réactions au sein d'un organisme occupent une place essentielle dans le domaine du développement des médicaments. Leur dysfonctionnement est généralement responsable de l'apparition de plusieurs pathologies. L'inhibition de ces enzymes est une approche thérapeutique très utilisée dans le traitement ou la prévention de plusieurs maladies.

Ceci se fait par l'étude de la cinétique enzymatique qui nous permet de déterminer les caractéristiques de la catalyse, l'activité de ces enzymes et les effets des effecteurs (activateurs ou inhibiteurs).

L'activité enzymatique se mesure par la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme :



avec S : substrat, P : produit et E : enzyme.

$$V = d[P]/dt$$

A pH et à température constants, la vitesse de la réaction est en fonction des concentrations en enzyme.

I - Les paramètres de la cinétique

1- A [S] constante et à [E] variable

Le suivi cinétique de la réaction de l'enzyme à différentes concentrations avec le substrat à une concentration constante et à différents temps d'incubation est représenté par les courbes suivantes (**Figure1**).

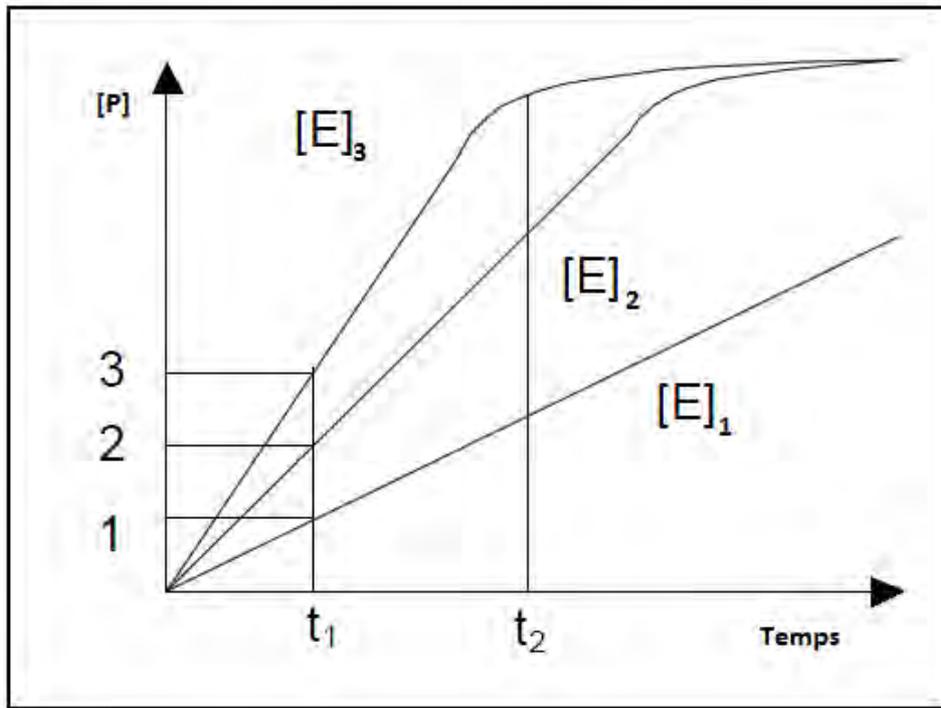


Figure1. Influence de concentrations croissantes de l'enzyme $[E]$ pour une même concentration de substrat $[S]$ sur la concentration du produit formé $[P]$.

Ces courbes montrent que la vitesse initiale varie en fonction de la concentration en enzyme. Nous remarquons aussi que les vitesses initiales (Temps ≈ 0) sont constantes. A partir de ces courbes nous pouvons tracer le graphe des vitesses initiales (V_i) en fonction de la concentration en enzyme (**Figure2**).

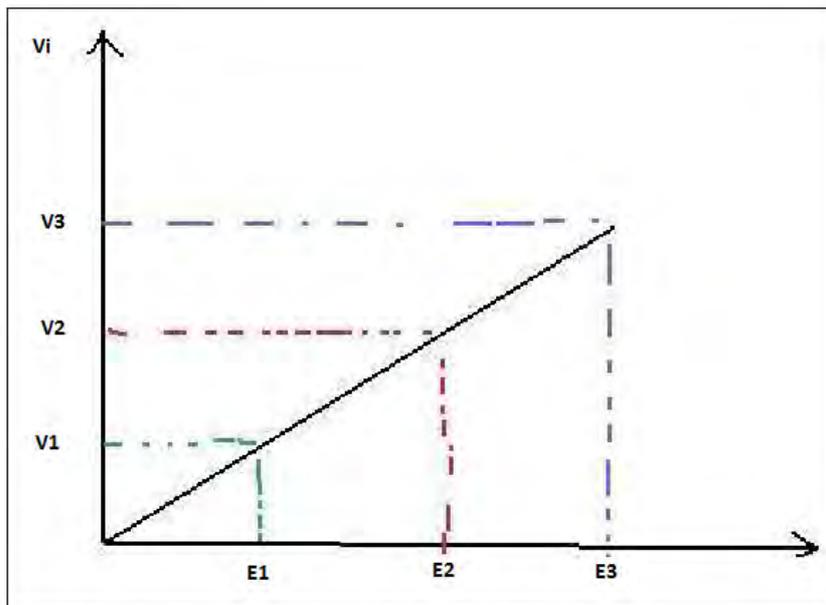


Figure2. Influence de concentrations croissantes de l'enzyme $[E]$ pour une même concentration de substrat $[S]$ sur la vitesse initiale de la réaction V_i .

Ce graphe montre clairement que la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration en enzyme.

2- A [E] constant et à [S] variable

Le suivi cinétique de la réaction de l'enzyme à une concentration constante avec le substrat à différentes concentrations nous a permis de tracer les courbes suivantes (Figure3).

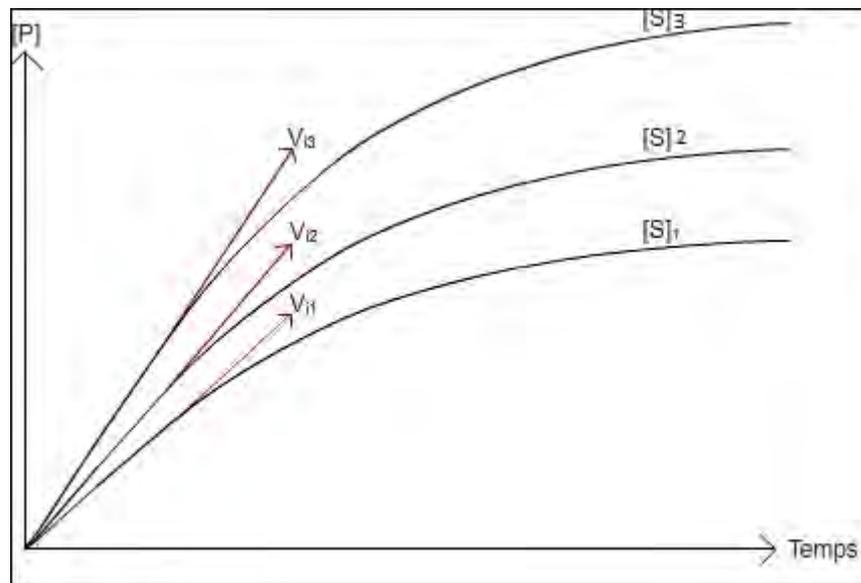


Figure3. Influence de concentrations croissantes du substrat ($[S_3] > [S_2] > [S_1]$) pour une même concentration d'enzyme [E] sur la concentration du produit formé [P].

Nous remarquons que la vitesse initiale augmente en fonction de la concentration en substrat jusqu'à ce qu'elle atteigne une certaine limite appelée V_{max}.

Ces courbes nous permettent de tracer le graphe de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat.

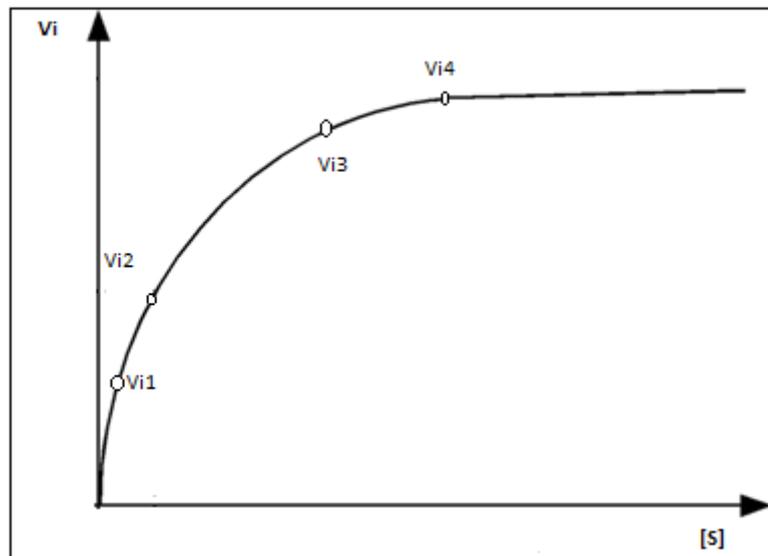


Figure4. Influence de concentrations croissantes du substrat pour une même concentration d'enzyme [P] sur la vitesse initiale de la réaction V_i .

Pour les enzymes dites michaeliennes, le cas de la majorité des enzymes, nous obtenons une hyperbole. A partir de cette dernière, nous pouvons définir la constante de Michaelis, qui présente la concentration en substrat nécessaire pour obtenir $V_i = \frac{V_{max}}{2}$

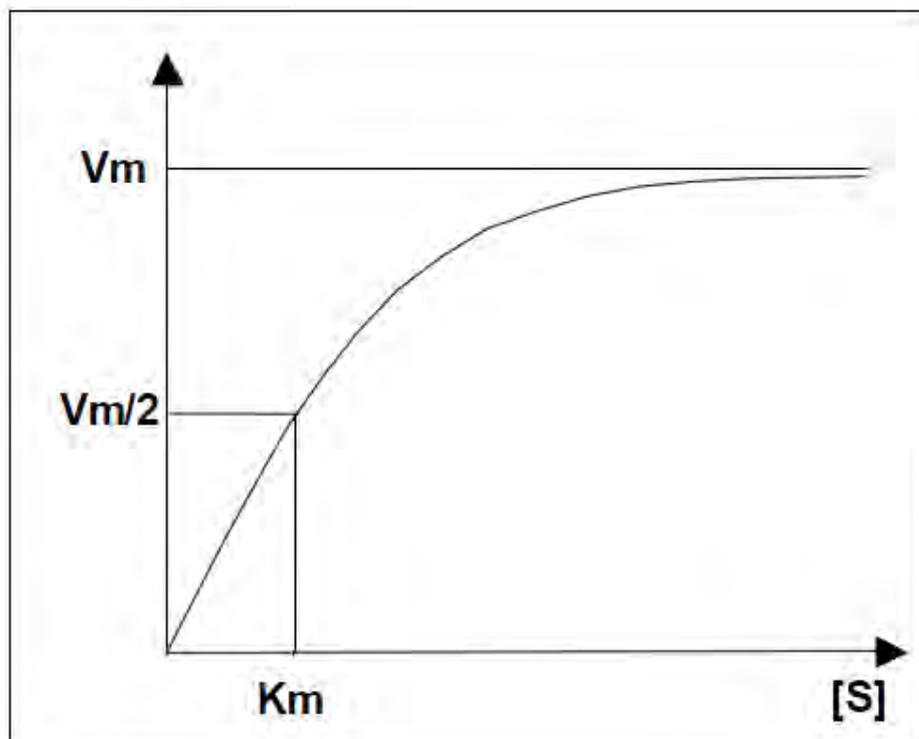
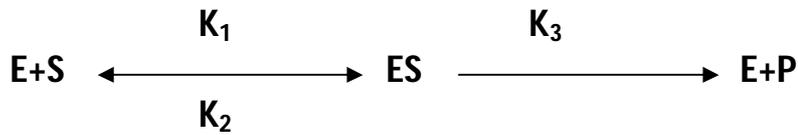


Figure5. Représentation graphique de la constante de Michaelis.

Pour trouver l'équation de cette hyperbole nous avons :



d'où:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

et

$$V_i = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

Pour la plus part des enzymes, la première réaction est totalement réversible car le substrat se fixe sur l'enzyme puis se détache sans être métabolisée. Le k_3 est donc négligeable devant le k_2 .

On aura donc :

$$K_m = \frac{k_2}{k_1}$$

Dans ce cas le K_m correspond à la constante de dissociation du complexe **ES** en **E+S**.

Ceci nous donne une idée sur l'affinité de l'enzyme pour le substrat, plus le K_m est grand plus l'affinité est faible. Le K_m est donc une constante qui ne dépend pas de la concentration de l'enzyme mais de son site de fixation.

V_{max} est constante pour une concentration en enzyme donnée, elle nous indique la capacité catalytique de l'enzyme.

II - Méthodes graphiques pour déterminer Vmax et Km

1- Représentation Lineweaver et Burk

Afin de déterminer Vmax et Km, la méthode graphique la plus utilisée et celle de Lineweaver et Burk. Il s'agit d'une représentation en coordonnées inverses $\frac{1}{v_i}$ = f $(\frac{1}{[S]})$.

Cette représentation nous permet de trouver de manière assez précise $-\frac{1}{K_m}$ et $\frac{1}{V_{max}}$.

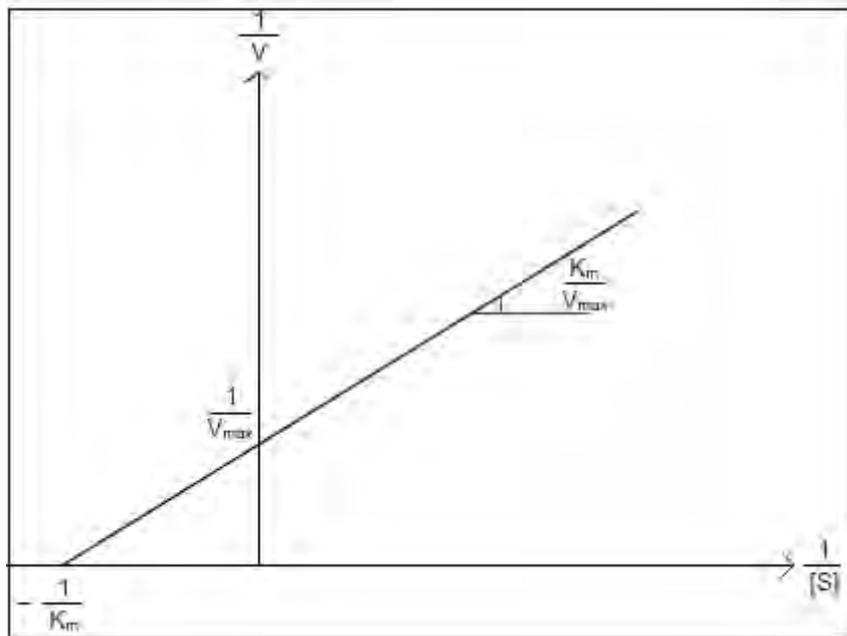


Figure 6. Représentation graphique de Lineweaver et Burk de la constante de Michaelis

Malheureusement, pour appliquer cette représentation, il nous faut beaucoup de points expérimentaux et la barre d'erreur devient plus grande pour les $\frac{1}{[S]}$.

2- Représentation Eadie-Hofstee

La relation utilisée est $\frac{v}{[S]} = \frac{V_m}{K_m} - \frac{v}{K_m}$. La pente représente $-\frac{1}{K_m}$, les intersections avec les axes donnent $\frac{V_m}{[S]}$ et V_m .

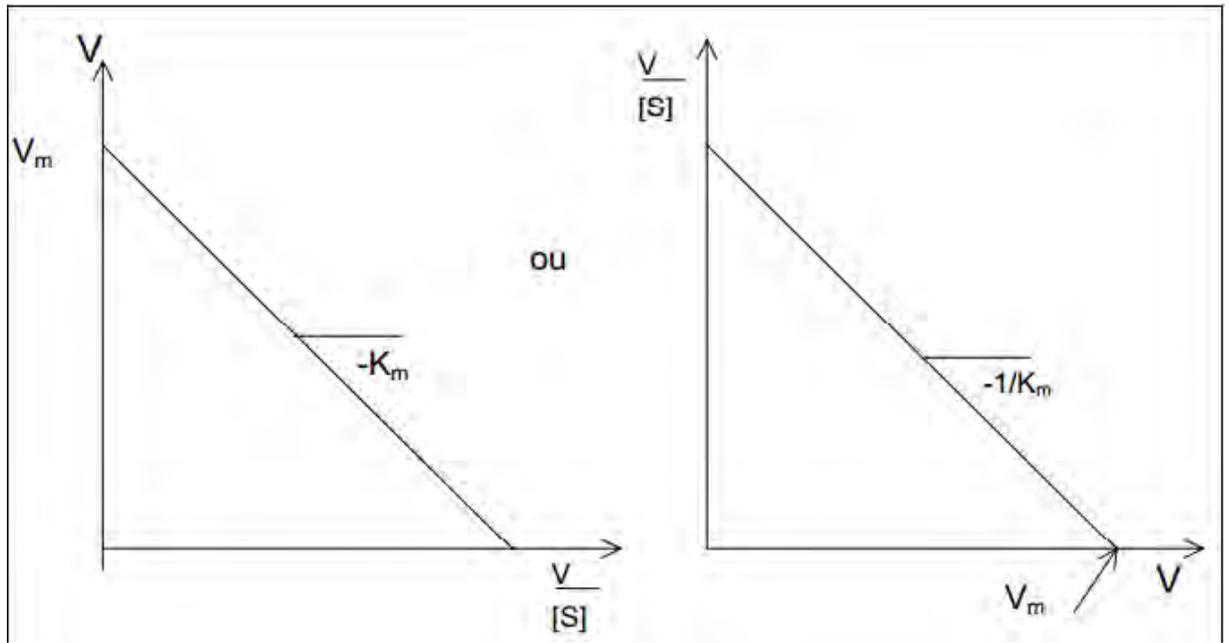


Figure 7. Représentation graphique d'Eadie-Hofstee de la constante de Michaelis

3- Représentation de Hanes-Woolf

Dans ce cas la relation utilisée est $\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_m}[S] + \frac{K_m}{V_m}$

L'extrapolation de la droite donne $-K_m$ à l'intersection avec l'axe des abscisses et la pente représente $\frac{1}{V_m}$.

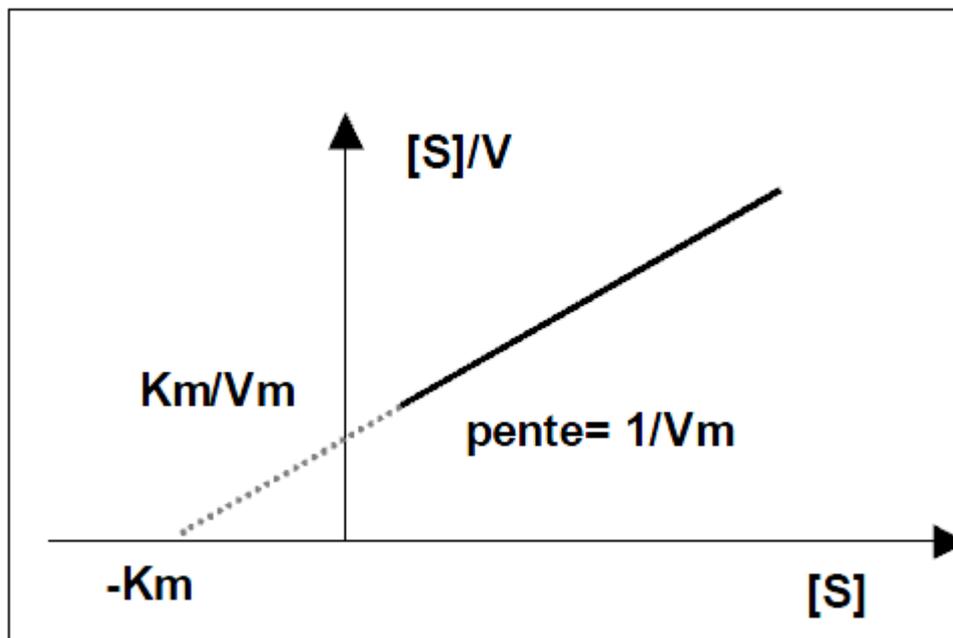


Figure 8. Représentation graphique de Hanes-Woolf de la constante Michaelis

4- Représentation Cornish Bowden

Pour réaliser cette représentation, il nous faut trois expériences pour trois différentes concentrations en substrat. Ensuite, nous devons placer les différentes valeurs de $- [S]$ sur l'axe des abscisses et celles de V_i sur l'axe des ordonnées. Nous obtiendrons alors un faisceau de droites qui se croisent en un seul point dont l'abscisse sera le K_m et l'ordonnée la V_{max} .

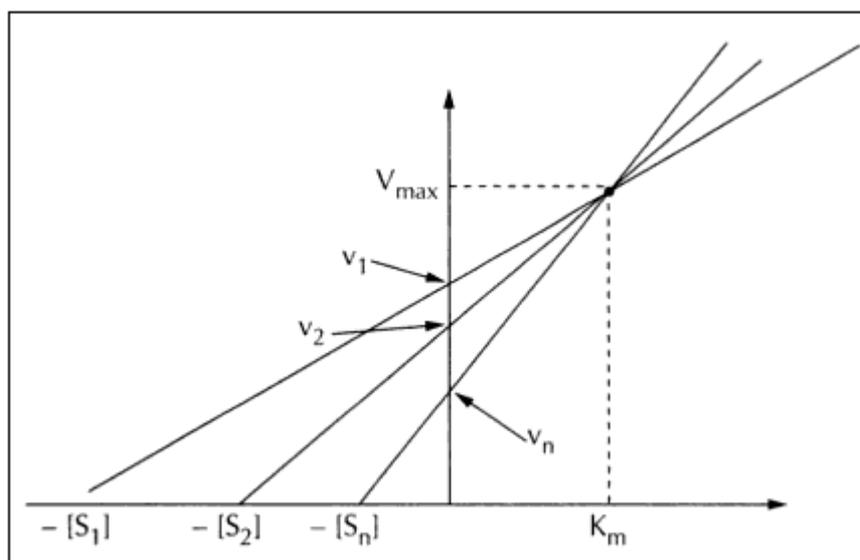


Figure 9. Représentation de Cornish Bowden de la constante de Michaelis

III - Les inhibiteurs d'enzymes

Les inhibiteurs d'enzymes sont des molécules qui bloquent l'activité de l'enzyme. De point de vue graphique la courbe $V_i = f([I])$ est une parabole décroissante comme le montre le graphe suivant :

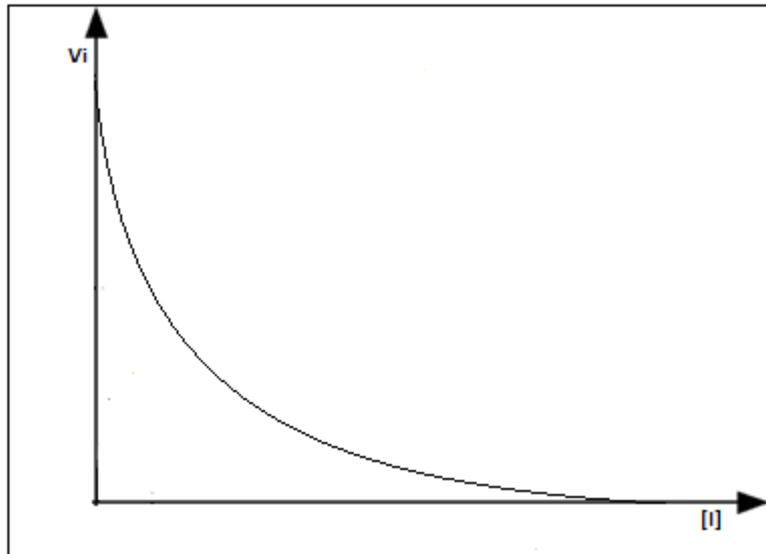


Figure10. Représentation graphique de la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'inhibiteur

Selon leur mode de fixation, nous avons plusieurs types d'inhibiteurs.

1- Les inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles sont des molécules qui peuvent dénaturer l'enzyme de manière non spécifique.

2- Les inhibiteurs réversibles compétitifs

Dans le cas de l'inhibition compétitive la fixation de l'inhibiteur empêche celle du substrat et vis versa. Ceci se fait en présence d'une analogie structurale entre les deux molécules et un seul site de fixation. La compétition peut être aussi réalisée lorsque l'inhibiteur et le substrat ont des sites de fixation distincts mais se recouvrent, ou bien l'encombrement stérique d'une molécule empêche l'autre à se fixer.

Nous avons simultanément :



et



Nous remarquons la formation des complexes ES et EI mais pas le complexe ESI.

La constante d'inhibition K_i est définie comme suit :

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

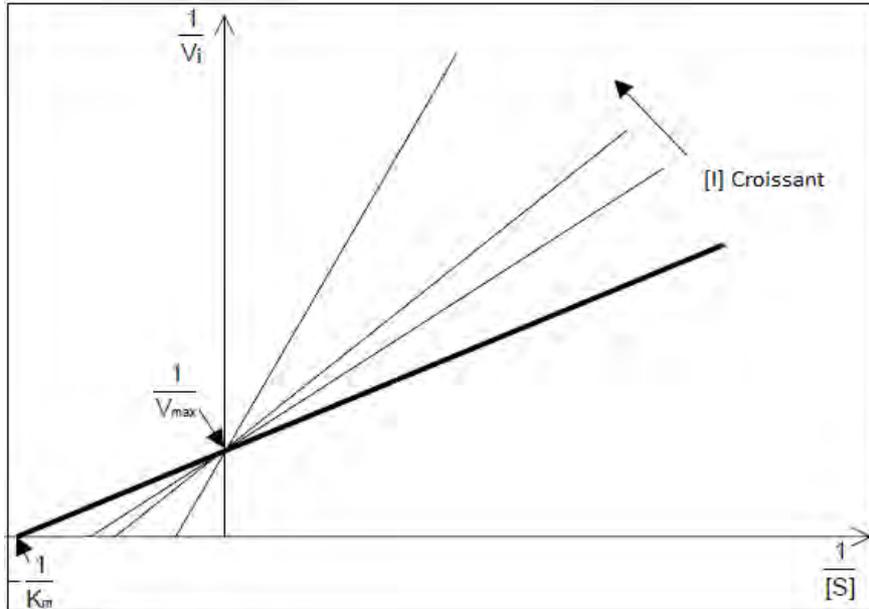
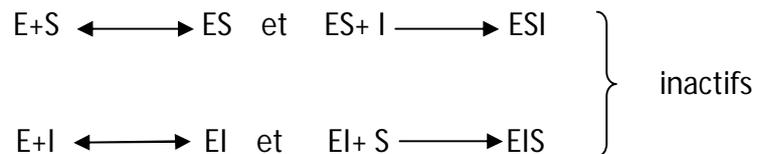


Figure 11. Représentation Lineweaver et Burk de l'inhibition compétitif

3- Les inhibiteurs réversibles non compétitifs

Contrairement aux inhibiteurs compétitifs, les non compétitifs n'ont aucune analogie structurale avec le substrat. Ils possèdent un site spécifique de fixation ce que leur permet de se fixer à l'enzyme E libre ou au complexe enzyme-substrat ES.



La fixation de I sur l'enzyme ne modifie pas K_m et la fixation de S sur l'enzyme ne modifie pas le K_i .

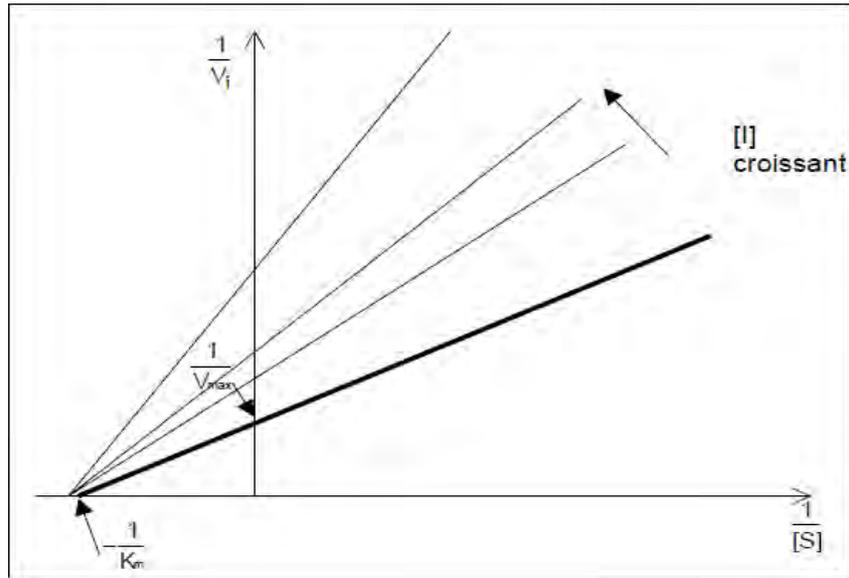


Figure 12. Représentation Lineweaver et Burk de l'inhibition non compétitif

4- Les inhibiteurs réversibles incompétitifs

L'inhibiteur incompétitif ne se fixe jamais sur l'enzyme libre mais uniquement sur le complexe enzyme substrat.

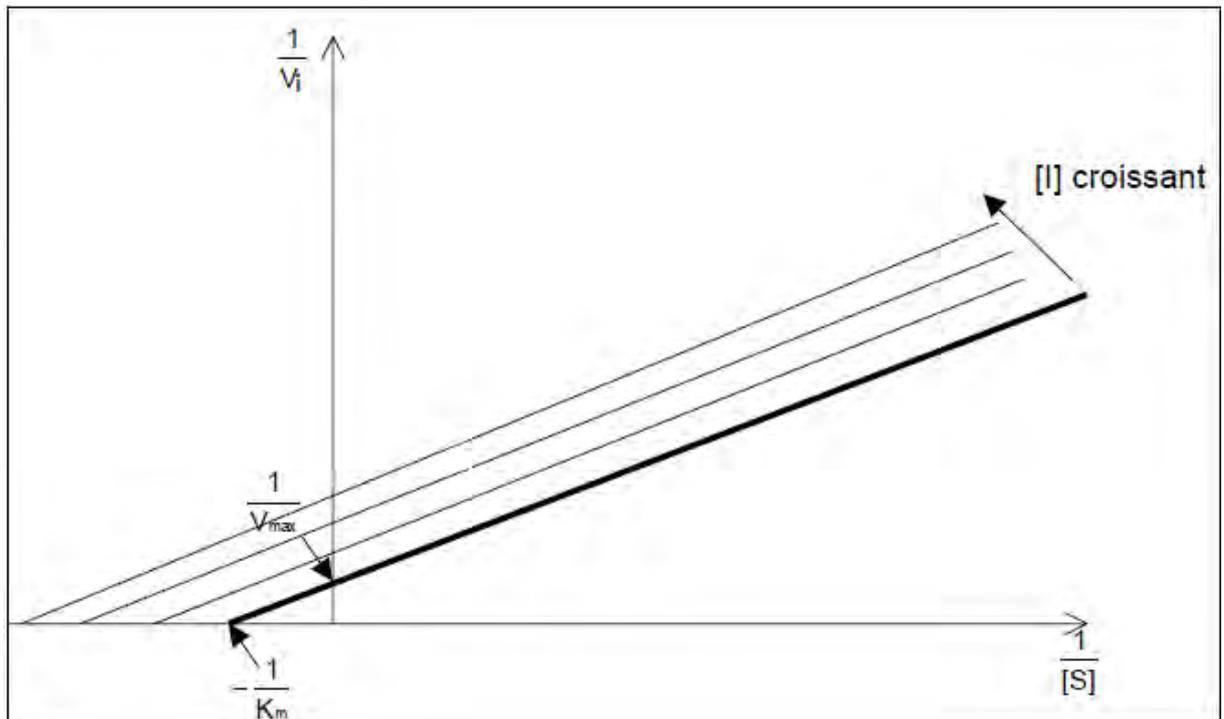
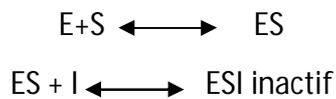


Figure 13. Représentation Lineweaver et Burk de l'inhibition incompétitif

Référence:

[1] Louisot. P, Biochimie générale et médicale/ structural, métabolique et séméiologique. Villeurbanne/Paris : Simep, 1983

Abstract

Xanthine oxidase is an ubiquitous cytoplasmic protein that catalyzes the last two steps of purine catabolism. It is one of the main sources of reactive oxygen species. The latest studies have shown its involvement in several pathologies such as diabetes, cardiovascular problems, ischemia -reperfusion, hyperuricemia and gout. Inhibition of this enzyme is necessary in the treatment or the prevention of several diseases.

The interest of this work is based on the development of new inhibitors of xanthine oxidase which can serve as precursors in the development of a new drug capable of interacting with the target in a selective manner and with less adverse effects.

In the first part, *in silico* modeling has allowed us to determine the type of interaction that is involved in the binding of six new ligands (CHAL1 - CHAL6) in the active site of XO. The results showed that complex CHAL / XO are more stable than which is formed by allopurinol (known as competitive inhibitor of XO, used as a drug against gout. So, quinoleic chalcones have a better affinity for the XO than allopurinol. To survive inside the human body and exercise their biological activity, bioavailability of these molecules was evaluated while calculating their pharmacokinetic properties from the Lipinski rules.

In the second part, *in vitro* tests with the presence of CHAL1 CHAL2 allowed us to confirm the results found previously. At very low concentration, these two molecules could inhibit more than 70 % of the activity of xanthine oxidase.

Keywords: xanthine oxidase, chalcone, molecular docking, modeling, inhibition.

الملخص:

يعمل الكزننتين أكسيداز، والذي هو بروتين سيتوبلازمي موجود في كل أجزاء الجسم، على تحفيز آخر مرحلتين من مراحل استقلاب البورينات. كما يعتبر واحدا من المصادر الأساسية لإنتاج مشتقات فعالة مؤكسجنة.

الدراسات الأخيرة أظهرت مشاركتها في إحداث العديد من الأمراض مثل السكري وبعض المشاكل في عضلة القلب كنقص التروية وإعادة إشباع الخلايا و كذا مرض فرط حمض اليوريك أو ما يعرف بمرض النقرس. و بالتالي فإن تثبيط هذا الأنزيم هو من الوسائل الضرورية لعلاج أو الوقاية من العديد من الأمراض.

ركزنا في دراستنا هذه على تطوير مثبطات لأنزيم الكزننتين أكسيداز مما يساعد في تطوير أدوية جديدة قادرة على التداخل مع الهدف بطريقة اختيارية وبأقل الأضرار الممكنة.

استعملنا في الجزء الأول من هذه المذكرة وسائل النمذجة الجزيئية (*in silico*) التي سمحت لنا من تحديد نوع التداخل الذي حدث أثناء ارتباط ستة مركبات شالكونية جديدة (**CHAL1-CHAL6**) بالموقع النشط **OX**. النتيجة أظهرت أن المعقدات **XO/CHL** هي أكثر استقرارا من تلك التي تشكلت من الارتباط بالجزيء "ألوبيرنول" (وهو مثبط يستعمل كدواء لمرض النقرس).

إذن جزيئات "الشالكون" لدينا أظهرت ألفة تجاه أنزيم الكزننتين أكسيداز أكثر من جزيء "ألوبيرونول". و من جهة أخرى، تم تقييم مميزات البيولوجية من خلال حساب خواصها الدوائية باستعمال قواعد "ليبينسكي، Lipinski"، وذلك من أجل معرفة إلى أي مدى ستتمكن هذه الجزيئات من الحياة في جسم الإنسان لممارسة نشاطها البيولوجي.

في الجزء الثاني من هذه المذكرة، سمحت اختبارات (*in vitro*) في وجود كل من الجزيئين **CHAL1** و **CHAL2** من تأكيد النتائج المحصل عليها في الجزء الأول. أين تمكن هذين الجزيئين، وعند تراكيز صغيرة، من تثبيط 70% من نشاط إنزيم الكزننتين أكسيداز.

كلمات مفتاحية: الكزننتين أكسيداز، شالكون، الدوكرة الجزيئية، النمذجة، التثبيط.

Résumé

La xanthine oxydase est une protéine cytoplasmique ubiquitaire qui catalyse les deux dernières étapes du catabolisme des purines. Elle est l'une des principales sources des espèces réactives d'oxygène. Les dernières études ont montré son implication dans plusieurs pathologies telles que le diabète, les problèmes cardiovasculaires, l'ischémie-reperfusion, l'hyperuricémie et la goutte. L'inhibition de cette enzyme est ainsi nécessaire dans le traitement ou la prévention de plusieurs maladies.

L'intérêt de ce travail repose sur la mise au point de nouveaux inhibiteurs de la xanthine oxydase qui peuvent jouer le rôle de précurseurs dans l'élaboration d'un nouveau médicament capable d'interagir avec cette cible d'une manière sélective et avec moins d'effets indésirables.

Dans la première partie, la modélisation *in silico* nous a permis de déterminer le type d'interactions mis en jeu lors de la fixation de six nouveaux ligands (CHAL1 à CHAL6) dans le site actif de la XO. Les résultats obtenus semblent montrer que les complexes CHAL/XO sont plus stables que celui formé par l'allopurinol (inhibiteur compétitif de la XO, utilisé comme médicament contre la goutte). Les chalcones à noyau quinoléine étudiées possèdent une affinité meilleure pour la XO que l'allopurinol. Pour pouvoir survivre dans l'organisme humain et exercer leur activité biologique, la biodisponibilité de ces molécules a été évaluée tout en calculant leurs propriétés pharmacocinétiques à partir des règles de Lipinski.

Dans la deuxième partie, les tests *in vitro* effectués en présence de CHAL1 et CHAL2 nous ont permis de confirmer les résultats trouvés précédemment. A très faible concentration, ces deux molécules ont pu inhiber plus de 70% de l'activité de la xanthine oxydase.

Mots clés : xanthine oxydase, chalcones, docking moléculaire, modélisation, inhibition.