

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Ghardaïa



Faculté des sciences de la nature et de vie et des sciences de la Terre

Département de biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En sciences biologique

Spécialités : Biochimie appliquée

Par :

M^{elle}. GUENDOUZ Hayat

M^{elle}. ZAOUI Safa

**Prédiction *in silico* du mode d'interaction entre des méthylxanthines
et des protéines de lait**

Devant le jury composé de :

M^{me}. MEZERAI R.	Maitre de conférences classe B	Univ. Ghardaïa	Présidente
M. BENBEKHTI Z.	Maitre-Assistant classe A	Univ. Ghardaïa	Encadrant
M^{elle}. KEBILI Z.	Maitre-Assistant classe A	Univ. Ghardaïa	Examinatrice

Année universitaire : 2020-2021

المخلص

تعتبر جزيئات الأيض الثانوي للنباتات في عمومها مركبات ذات أثر علاجي بما في ذلك جزيئات الميثيل اكرانتان اين اثبتت الدراسات تأثيرها العلاجي ضد نوبات إنقطاع النفس لدى الرضع الخدج، وإمكانية انتقالها عن طريق حليب الرضاعة من الأم نحو رضيعها،

تم من خلال هذا العمل التطرق لإرتباط بعض من جزيئات الميثيل اكرانتان: الكافيين ، الثيوبرومين ، الثيوفيلين والباراكرانتان مع بعض من بروتينات الحليب : ألفا لاكتالبومين ، بيتا-لاكتوجلوبولين ولاكتوفيرين عن طريق المحاكاة بالالتحام الجزيئي .

سمحت النمذجة من خلال تقنية الالتحام الجزيئي ببرنامج مجاني CBDOCK، التنبؤ بطريقة الترابط وتقارب الميثيل اكرانتان مع الاحماض الامينية المشكلة لموقع التثبيت وبتحديد الطاقة الحرة لتكوين مختلف المعقدات الثنائية بين بروتين الحليب وجزيئات الميثيل اكرانتان .

أظهرت نتائج المحاكاة المحصل عليها، أنه بالمقارنة مع الألفا لاكتالبومين و البيتا-لاكتوجلوبولين، اللاكتوفيرين يشكل أكثر المعقدات الثنائية بروتين- ميثيل كزانتان ثباتاً مع تناقص في الألفة وفقاً لقيم طاقة الإرتباط -7.6 كيلو كالوري / مول للباراكسانتين ، 7.5 - كيلو كالوري / مول للكافيين والثيوبرومين ، -7.4 كيلو كالوري / مول للثيوفيلين . كما بينت النتائج كذلك أن قوى الإرتباط الرئيسية المساهمة في تشكل المعقد هي الأواصر الهيدروجينية والتفاعلات الكارهة للماء.

الكلمات الدالة: ، الميثيل اكرانتان ، ألفا لاكتالبومين ، بيتا-لاكتوجلوبولين ، اللاكتوفيرين ، الإلتحام الجزيئي ، طاقة الإرتباط ، قوى الإرتباط

Résumé

Les métabolites secondaires des plantes, dans leur majorité, ont montré un effet thérapeutique, en particulier les molécules de méthylxanthine, où des études ont prouvé leur effet thérapeutique contre les crises d'apnée chez les bébés prématurés, et la possibilité de sa transmission par le lait maternel de la mère à son nouveau-né,

Dans le cadre de ce travail, l'association de certaines molécules de méthylxanthine : caféine, théobromine, théophylline et paraxanthane avec certaines protéines du lait : alpha-lactalbumine, beta-lactoglobuline et lactoferrine a été abordée par des simulations de docking moléculaire.

La modélisation, par la technique du docking moléculaire réalisée via le serveur CBDOCK, a permis de prédire le mode de liaison et l'affinité des méthylxanthines aux acides aminés du site de liaison et de déterminer l'énergie libre de liaison de différents complexes binaires entre les protéines du lait et les molécules méthylxanthines.

Les résultats de simulation obtenus ont montré que, par rapport à l'alpha-lactalbumine et à la bêta-lactoglobuline, la lactoferrine forme le complexe dimère protéine-méthylxanthine le plus stable avec une affinité décroissante en fonction des valeurs d'énergie de liaison de -7,6 kcal/mol pour la paraxanthine, -7,5 kcal/mol pour la caféine et la théobromine -7,4 kcal/mol pour la théophylline.

Les résultats montrent en outre que les principales forces de liaison contribuant à la formation du complexe sont les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes.

Mots-clés : énergie d'interaction α lactalbumin, β -lactoglobulin, lactoferrin, methylxanthines, docking.

Abstract

Secondary plant metabolites in there majority are regarded as compounds with therapeutic effect, especially methylxanthin molecules, where studies have proven its therapeutic effect against apnea attacks in premature babies, and the possibility of its transmission through breast milk from the mother to her newborn,

Through this work, the association of some methylxanthin molecules: caffeine, theobromine, theophylline and paraxanthan with some milk proteins: alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin and lactoferrin has been approached by molecular docking simulations.

The modeling, by the molecular docking technique with the CBDOCK server, allowed to predict the binding mode and the affinity of thus methylxanthins to the amino acids of the binding site and to determine the free binding energy of different binary complexes between milk proteins and methylxanthin molecules.

The obtained simulation results showed that, compared to alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin, lactoferrin forms the most stable protein-methylxanthin dimer complex with decreasing affinity as a function of binding energy values of -7.6 kcal/mol for paraxanthin, -7.5 kcal/mol for caffeine and theobromine -7.4 kcal/mol for theophylline. The results also showed that the main bonding forces contributing to the formation of the complex are hydrogen bonds and hydrophobic interactions.

Keywords: méthylxanthines, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, lactoferrin, docking, binding energy, bonding forces.

Remerciements

Après avoir rendu grâce à **ALLAH** qui nous donné la force et la volonté d'effectuer ce travail

Nous voudrions dans un premier temps remercier, notre directeur de mémoire, **M^r BENBEKHTI Zineddine** Maitre-assistant classe « A » au département de biologies à l'université de Ghardaïa, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils sur l'orientation que celui ces devons prendre.

Par ailleurs nous remercions à **M^{me}. MEZERAI Rabiha** Maitre de conférences classe « B » au département de biologie à l'université de Ghardaïa pour avoir accepté, d'évaluer ce mémoire.

De puis nous remercions aussi **M^{elle}. KEBILI Zohra** Maitre-assistant classe «A» au département de biologie de à l'université de Ghardaïa pour avoir accepté, examiner ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements au corps professoral et au personnel administratif de l'Université de Ghardaïa pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts durant les années académiques.

Sans oublier nos familles et amis qui nous ont encouragée durant notre mémoire.

À tous ces intervenants, nous présentons nos remerciements, nos respects et nos gratitude.

Dédicaces

Je dédicace ce travail

À ma fleur, à m'ange, à ma chérie, à ma modèle, à **ma mère Malika** sont précieux ...
Les phrases me trahissent, je ne peux pas vos décrire, je ne peux pas exprimer mon amour pour vous.

Je t'ai remercié, par votre présence et par vous encouragements. Avec vous je n'ai rien crain, vous avez instillé dans mon âme un sentiment de confiance, de fierté, de responsabilité et de patience tant que tu m'as inondé de tes conseils éclairés pour affronter les difficultés de la vie je prie à **ALLAH** de prolonger votre vie et de vous donner santé, bien-être et tranquillité d'esprit.

Je prie à **ALLAH** de m'aider à êtres votre bon fruit. A L'âme de **ma grande-mère Hadda**, qui était fatiguée de se reposer, craquée pour être heureuse, et qui travaillait pour grandir

A mon **père Abdel Kader**. Tu resteras mon héros et courageux dans les choses les plus simples que tu les fasses, peu importe à quel point les gens autour de moi sont formidables. Je prie **ALLAH** de prolonger votre vie et de vous donner le bien-être

A mon cher **oncle Mohammed**, celui, qui a trempé la coupe vide pour me donner une goutte d'amour, à celui dont le bout des doigts nous a donné un moment de bonheur à celui qui a moissonné les épines de mon chemin pour préparer la voie de la connaissance au grand cœur, que **ALLAH** prolonge sa vie.

A mes **tantes Fatna et Fatiha**, vous qui m'avez montré ce qu'il y a de plus belle que la vie,

À celles qui ont été mon refuge, à celles avec qui j'ai vécu les plus beaux moments, merci, que **ALLAH** prolonge votre vie et vous donne le bonheur.

Hayat

Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie cette mémoire de Master à :

A Ma tendre **Mère Malika** : Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A Mon très cher **Père Ahmed** : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

A mes grands-mères et à tous les cousins.

A mes sœurs : Hamida, Khadija, Rabab et Soumaia.

A mes chers amis : Souad, Roumaissa, Raufida, et Khadija.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

Sans oublier mon binôme Hayat pour son moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet

Safa

Liste des abréviations

Å : Angstrom

AA : Acide amine

AMPc : Adénosine mono phosphate cyclique

C: Degré Celsius

CAF: caféine

kcal: Kilocalories

kDa: Kilo Dalton

kg : Kilogramme

Mol: mole

pH: potentiel hydrogène

PRX: Paraxanthine

PDB: Protein Data Bank

THB: Théobromine

THP: Théophylline

2D : deux dimensions

3D : tridimensionnel

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la caféine et l' α -lactalbumine	16
Tableau 02 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la paraxanthine et l' α -lactalbumine	18
Tableau 03 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théobromine et l' α -lactalbumine	20
Tableau 04 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théophylline et l' α -lactalbumine.....	22
Tableau 05 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la caféine et la β -lactoglobuline	24
Tableau 06 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la paraxanthine et la β -lactoglobuline	26
Tableau 07 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théobromine et la β -lactoglobuline.....	28
Tableau 08 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théophylline et la β -lactoglobuline	30
Tableau 09 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la caféine et la lactoferrine	32
Tableau 10 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la paraxanthine et la lactoferrine	34
Tableau 11 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théobromine et la lactoferrine.....	36
Tableau 12 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théophylline et la lactoferrine	38

Liste des Figures

Figure 1 : Composition en protéines du lait des bovins	4
Figure 2 : Structure tertiaire (A) et domaines structuraux d' α lactalbumine	4
Figure 3 : Schéma des structures secondaire et tertiaire de la β -lactoglobuline	6
Figure 4 : Modèle tridimensionnel de la structure de lactoferrine	7
Figure 5 : structures chimiques de quelques méthylxanthine	9
Figure 6 : Diagramme d'interactions clés entre la caféine et l' α -lactalbumine.....	15
Figure 7 : Diagramme d'interactions clés entre la paraxanthine et l' α -lactalbumine.....	17
Figure 8 : Diagramme d'interactions clés entre la théobromine et l' α -lactalbumine	19
Figure 9 : Diagramme d'interactions clés entre la théophylline et l' α -lactalbumine	21
Figure 10 : Diagramme d'interactions clés entre la caféine et la β -lactoglobuline	23
Figure 11 : Diagramme d'interactions clés entre la paraxanthine et la β -lactoglobuline	25
Figure 12 : Diagramme d'interactions clés entre la théobromine et la β -lactoglobuline.....	27
Figure 13 : Diagramme d'interactions clés entre la théophylline et la β -lactoglobuline	29
Figure 14 : Diagramme d'interactions clés entre la caféine et la lactoferrine	31
Figure 15 : Diagramme d'interactions clés entre la paraxanthine et la lactoferrine	33
Figure 16 : Diagramme d'interactions clés entre la théobromine et la lactoferrine.....	35
Figure 17 : Diagramme d'interactions clés entre la théophylline et la lactoferrine	37
Figure 18 : Variation des énergies de liaison en fonction de type de méthylxanthins et de la protéines de lait.....	39

Table des matières

Introduction.....	1
I. Synthèse bibliographique.....	3
I.1. Protéines du lait	3
I.1.1. Alpha lactalbumine :.....	3
I.1.2. Beta lactoglobuline :.....	5
I.1.3. Lactoferrine :.....	6
I.2. Méthylxanthines.....	8
I.2.1. Types chimiques des méthylxanthines	8
I.2.2. Sources naturelles des méthylxanthines	10
I.2.3. Activités biologiques des méthylxanthines	10
II. Matériel et méthodes.....	12
II.1. Matériels	12
II.1.1. Machine de calcul	12
II.1.2. Logiciels	12
II.2. Méthodes.....	13
II.2.1. Préparation des structures des ligands.....	13
II.2.2. Préparation des structures des protéines.....	13
II.2.3. Prédiction des sites de liaison et docking moléculaire.....	13
II.2.4. Analyse des résultats	14
III. Résultats et discussions.....	15
III.1. Etude de l'interaction entre l' α -lactalbumine et les méthylxanthines	15

III.1.1.	Complexe binaire α -lactalbumine - caféine	15
III.1.2.	Complexe binaire α -lactalbumine - paraxanthine	17
III.1.3.	Complexe binaire α -lactalbumine - théobromine.....	19
III.1.4.	Complexe binaire α -lactalbumine - théophylline	21
III.2.	Etude de l'interaction entre la β -lactoglobuline et les méthylxanthines ...	23
III.2.1.	Complexe binaire β -lactoglobuline - caféine	23
III.2.2.	Complexe binaire β -lactoglobuline - paraxanthine	25
III.2.3.	Complexe binaire β -lactoglobuline - théobromine.....	27
III.2.4.	Complexe binaire β -lactoglobuline - théophylline.....	29
III.3.	Etude de l'interaction entre la lactoferrine et les méthylxanthines	31
III.3.1.	Complexe binaire lactoferrine - caféine	31
III.3.2.	Complexe binaire lactoferrine - paraxanthine	33
III.3.3.	Complexe binaire lactoferrine - théobromine	35
III.3.4.	Complexe binaire lactoferrine - théophylline.....	37
IV.	Conclusion	41
	Références bibliographiques	39
	Annexes	I

Introduction

Introduction

L'interaction protéines-ligands est cruciale pour déchiffrer les processus biologiques, la biologie structurale et les relations structure-fonction, les mécanismes d'activation et de régulation des voies métaboliques, etc... (Szklarczyk *et al.*, 2016).

La recherche élucidant le mode d'interaction au niveau des sites d'interaction comprend généralement la modélisation *in silico*, Cette simulation particulièrement adaptée aux études mécaniques moléculaires permet la prédiction des interactions par stratégie plus simple et plus rapide à mettre en œuvre et coûte moins cher que l'utilisation des méthodes expérimentales. Elle reste une bonne alternative qui permet à la recherche en pharmacologie d'avancer plus vite (Zait et Berkane, 2016).

La caféine, la théobromine, la théophylline et la paraxanthine sont des substances naturelles marquante de la caste des méthylxanthines, qui ont quelques-uns fonctions biologiques, une capacité anti-inflammatoire, anti-cancéreux et antioxydant. Il a été démontré que ces biomolécules bioactives ont des effets sur le système immunitaire, le système digestif, le système respiratoire et le système nerveux central. Tandis que la caféine protège contre le stress oxydatif dans la maladie d'Alzheimer (Cadoná *et al.*, 2021; Rodak *et al.*, 2021).

Des études antérieures ont montré que les méthylxanthines ont le potentiel de se lier à différentes protéines du corps animal et principalement à l'albumine sérique (Islam *et al.*, 2016), d'autres études montrent que ces molécules de méthylxanthine peuvent se lier au lysozyme (Sonu *et al.*, 2016), et que les méthylxanthines exogènes peuvent se retrouver dans le lait maternel et participer au traitement de l'apnée chez les prématurés. Ces études révèlent la présence de méthylxanthines dans les fluides biologiques et leur capacité à se lier aux protéines sans traiter le mode de liaison.

Notre étude *in silico* vise à caractériser le mode et les énergies d'interaction de certaines molécules de méthylxanthine avec des protéines constitutives du lait par la méthode du docking moléculaire (Hart et Grimble, 1990; Oñatibia-Astibia *et al.*, 2016).

Notre mémoire est subdivisé en trois parties :

- La partie synthèse bibliographique, comprend une description de certaines protéines du lait, leurs structures et caractéristiques et leurs propriétés physico-chimiques ainsi qu'une classification chimique et les activités biologiques des méthylxanthines ;
- La partie matériel et méthodes consacrée à la présentation du logiciel utilisé, les étapes de travail et les paramètres fixés pour la prédiction du mode d'interaction entre les protéines du lait et les méthylxanthines ;
- L'analyse et la discussion des résultats obtenus.

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1. Protéines du lait

Le lait est un liquide biologique produit par les glandes mammaires chez les mammifères. Cette boisson largement consommée est essentielle à l'alimentation de plusieurs millions de personnes dans le monde est reconnu comme étant utile pendant l'enfance et l'adolescence (**Visioli et Strata, 2014**), En raison de sa composition (protéine 94%, calcium 3%, phosphore 2,2%, acide citrique 0,5% et magnésium 0,1%) il fournit d'importantes macros et micronutriments (**Ainouche et Bouslah, 2016**).

Cet aliment est riche en protéines qui se distinguent en deux groupes (**Figure 1**) :

- **Les caséines** dont le poids moléculaire varie entre 19.10^3 et 25.10^3 Da, représentent 80% des protéines et entre 2.5 et 2.7% du poids total de lait. Ces macromolécules forment une dispersion colloïdale composée de fractions nommées : α S1, α S2 c, β , κ et γ caséine (**Ainouche et Bouslah, 2016**).
- **Les protéines sériques** : représentent 20% de la masse protéique totale de lait avec une valeur nutritionnelle importante (**Lapointe-Vignola et Québec, 2002**), abondantes dans le lactosérum et se distinguent en beta lactoglobuline, en α lactalbumine, en immunoglobuline, en albumine sérique et en lactoferrine.

I.1.1. Alpha lactalbumine :

Une protéine globulaire compacte, classée comme une métalloprotéine calcique avec un poids moléculaire est 14,4 kDa et un point isoélectrique situé entre un pH de 4,2 et 4,5 et forme des émulsions plus stables à pH 7 (**Lam et Nickerson, 2015**). Elle Constitué environ 22% du total des protéines sériques et environ 36% de protéines de lactosérum dans lait maternel et environ 3,5% des protéines totales environ 17% de protéines de lactosérum dans le lait bovin (**Layman et al., 2018**) .

La majorité des α -lactalbumines y compris celles des humaines et des bovines, se composent de 123 résidus d'acides aminés dont la grande proportion est celle des acides aminés essentiels (**Permyakov et Berliner, 2000**), relativement riche en tryptophane, lysine, cystéine, leucine, isoleucine et valine et fixent des ions cationiques Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ et K^+ et présentent plusieurs sites de liaison Zn^{2+} (**Layman et al., 2018**).

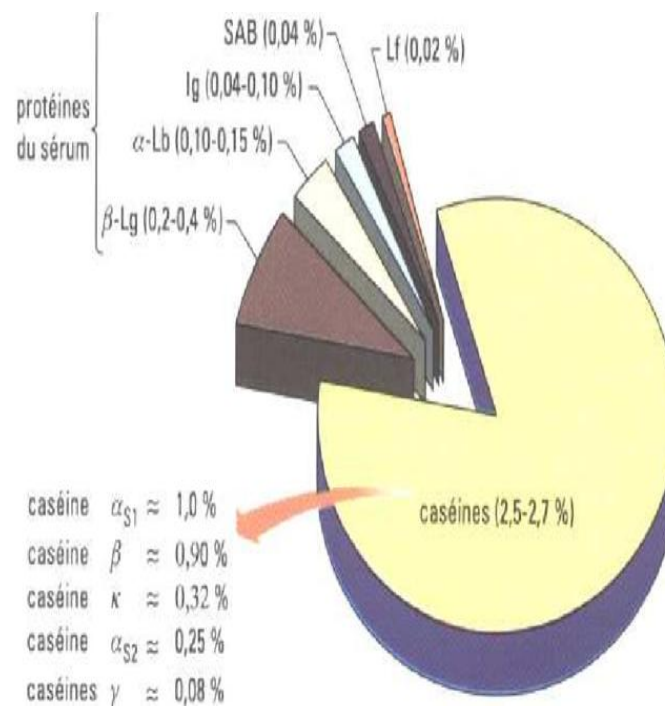


Figure 1 : Composition en protéines du lait des bovins (Lapointe-Vignola et Québec, 2002)

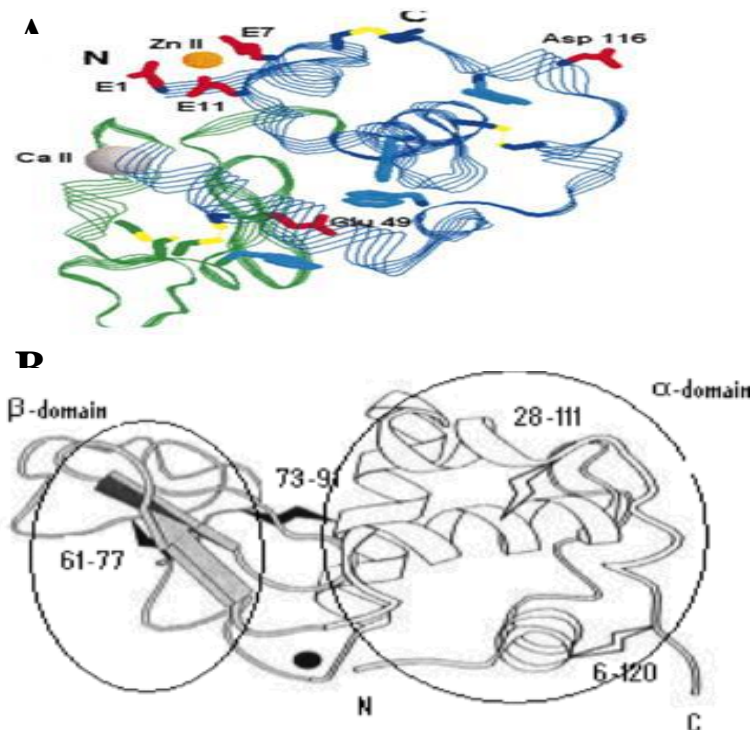


Figure 2 : Structure tertiaire (A) et domaines structuraux d'α lactalbumine (Permyakov et Berliner, 2000; Kamau *et al.*, 2010)

La structure secondaire (**Figure 2B**) d' α -lactalbumine est marquée par deux domaines structuraux : le domaine dit **alpha** riche en structure d'hélices α et un domaine dit **bêta** se compose de trois brins β antiparallèles (**Brew *et al.*, 1979**).

La structure tertiaire issue de la cristallographie au rayon X (**Figure 2A**) (**Kamau *et al.*, 2010**) montre que la conformation spatiales est stabilisée par quatre ponts disulfures contribuent au maintien de la structure en boucle du site de fixation du cation Ca^{+2} :

un relie les deux domaines, établie entre les cystéines 73 et 91. Les trois ponts disulfures restants relient les résidus cystéines 6 et 120, cystéines 28 et 111 ainsi que les cystéines 61 et 77 (**Wal, 2011**) et l'existence d'une similarité structurale entre l' α -lactalbumine et le lysozyme (**Sharma *et al.*, 2015**) .

I.1.2. Bêta lactoglobuline :

Présente dans le monde animal sous deux variantes génétique qui diffèrent par la nature de deux acides aminés en position 64 et 118 : le variant A contenant par ordre l'acide aspartique et la valine dans ces positions et le variant B contenant la glycine et l'alanine (**Hernández-Ledesma *et al.*, 2008; Roufik, 2005**), la β -lactoglobuline est la protéine la plus abondante dans le lait et représente environ 10-15% des protéines totales et 58% des protéines du lactosérum (**Aich *et al.*, 2015**).

La β -lactoglobuline une protéine globulaire compacte composée de 162 acides aminés et présente un poids moléculaire de 18400 kDa, sa composition en acides aminées lui confère un caractère acide avec un point isoélectrique inférieur à 3 (**Moualek, 2011**) et thermolabile avec des températures de dénaturation entre 65°C et 90°C .

La structure secondaire comporte un barillet β à huit brins (brins A – H) suivis d'une hélice α à trois tours, et d'un dernier brin β (brin I) qui fait partie de l'interface de dimérisation au niveau de la structure quaternaire (**Figure 3**).

La structure tertiaire du β -lactoglobuline montre la présence d'un calice central formés de feuilletts β antiparallèles assurant un site de fixation hydrophobe permet de clouer les petites molécules hydrophobes (**Breux, 2013**).

La structure quaternaire est principalement en forme de dimère préservé dans une gamme de pH varie entre 2 et 8, à force ionique modérée et à des températures supérieures à 20 °C (**Mercadante *et al.*, 2012**).

Il a également été démontré que l'interaction de la β -lactoglobuline avec les bicouches phospholipidiques augmente la teneur en protéines α -hélicoïdales. Par conséquent, la transition entre les états natif et α -hélicoïdal, en présence de phospholipides, peut avoir une importance physiologique significative pour comprendre l'interaction de la β -lactoglobuline avec les membranes biologiques (Viseu *et al.*, 2004).

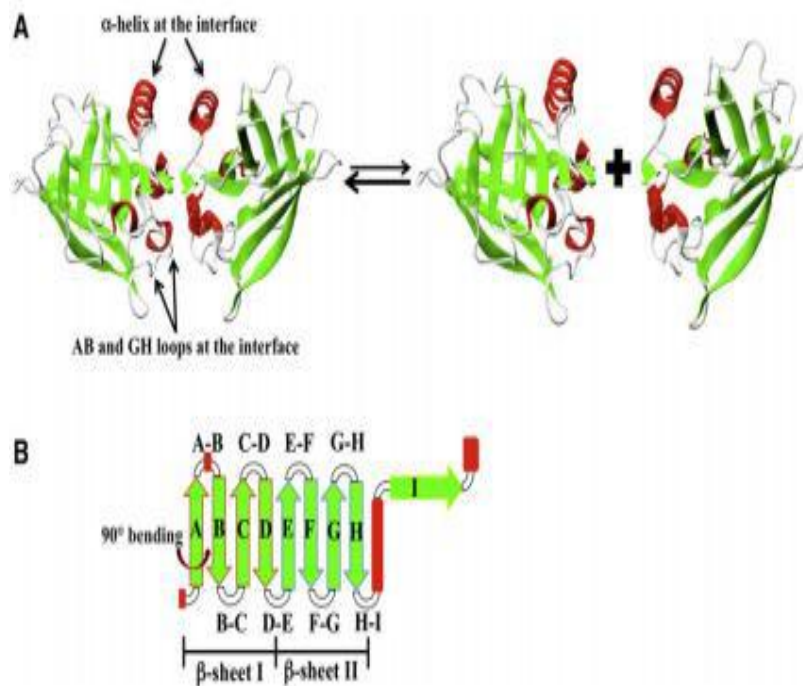


Figure 3 : Schéma des structures secondaire et tertiaire de la β -lactoglobuline (Mercadante *et al.*, 2012)

I.1.3. Lactoferrine :

Une protéine de la famille transferrine produite par les cellules épithéliales de la muqueuse chez diverses espèces de mammifères, elle lie avec le fer non hémique pour transporter ce dernier dans le sérum sanguin (Pierce *et al.*, 2009).

Elle est constituée d'un polypeptide simple glycosylé contenant 700 acides aminés et enroulé en formant deux lobes identiques globulaires N et C riche en structure secondaire en hélice α , chaque lobe est structuré en deux domaines liés en synergie avec un atome minéral et un ion carbonate (Figure 4) (González-Chávez *et al.*, 2009). Le pI théorique de lactoferrine est très élevé, soit un point isoélectrique de 9,4 (Brisson, 2006).

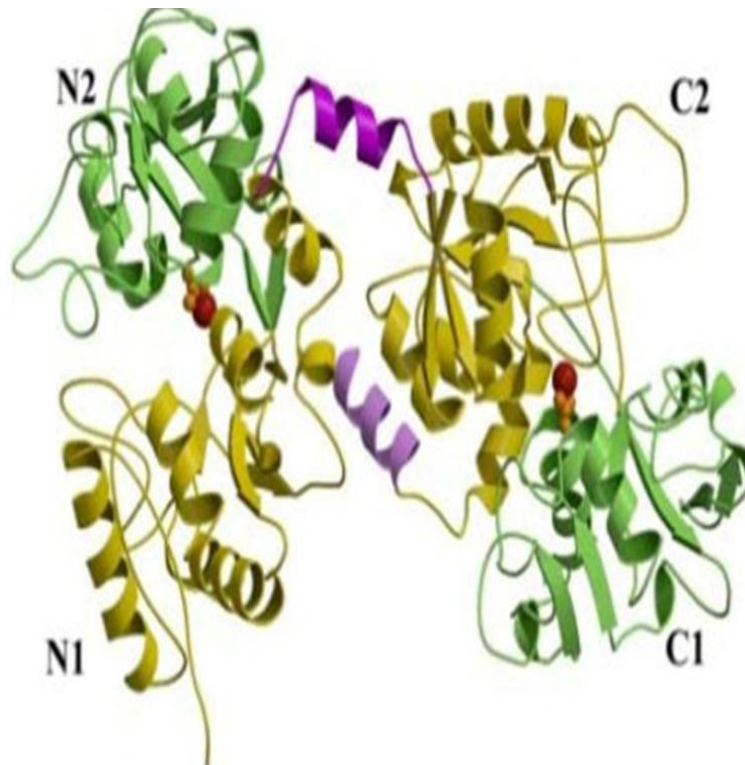


Figure 4 : Modèle tridimensionnel de la structure de lactoferrine
(Berlutti *et al.*, 2011)

Les protéines de lait sont utilisées dans les domaines alimentaire et pharmaceutique comme un constituant des nanoparticules de transport pour de nombreux composés chimiques naturels ou de synthèse. elles sont utilisées comme un transporteur idéal du flutamide ; une molécule avec activité anticancéreuse chez les souris atteintes d'un cancer de la prostate (Elzoghby *et al.*, 2013), comme transporteur de fer homologue à un transporteur transmembranaire et à une lipoprotéine complémentaire (Brooks *et al.*, 2014) , pour la bio-distribution appropriée des flavonoïdes d'agrumes (Sahih et Ghayeb, 2014) et l'épigalocatéchine-3-gallate (Al-Hanish *et al.*, 2016). Elles servent également de supports pour les xanthones (Rahayu *et al.*, 2020) et pour enrichir les formulations alimentaires en d'oleuropéine (Katouzian *et al.*, 2020).

L' α -lactalbumine est la deuxième protéine la plus abondante dans des concentrés de protéines de lactosérum. Elle est potentiellement utilisée dans le traitement du cancer, de la sarcopénie, des troubles de l'humeur et des convulsions. Elle est également utilisée

comme complément alimentaire pour favoriser la santé et la fonction de système nerveux (Layman *et al.*, 2018).

La β -lactoglobuline est une protéine importante pour la santé humaine, avec une contribution dans l'abaissement du taux de cholestérol et les taux des microbes pathogènes (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008). La β -lactoglobuline est récemment utilisée comme stabilisante dans les systèmes redox pour développer de nouvelles nanoparticules de sélénium (Zhang *et al.*, 2018). Suite d'une étude prospective *in vitro* et *in vivo*, des peptides dérivés de la β -lactoglobuline présentent un potentiel pour le traitement du SRAS-CoV-2 (Çakır *et al.*, 2021).

la première application de lactoferrine dans un produit commercial date des années quatre-vingts (Industrie laitière de Morinaga en 1986) (Wakabayashi *et al.*, 2006). La lactoferrine est approuvée comme ingrédient dans les produits alimentaires par l'autorité européenne de sécurité des aliments et elle est utilisée dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et dans la production d'additifs alimentaires (Hao *et al.*, 2019).

Une étude clinique sur le *Tinea pedis*, responsable d'une infection fongique de la peau, a montré que l'administration orale de lactoferrine améliore significative des symptômes dermatologiques de manière dose-dépendante dans une plage de 0,6 à 2,0 g/jour (Tomita *et al.*, 2002). La lactoferrine présente aussi une activité antimicrobienne bactériostatique par isolement du fer libre et élimination du substrat nécessaire à la croissance bactérienne (Giansanti *et al.*, 2016).

I.2. Méthylxanthines

Les méthylxanthines sont des alcaloïdes hétérocycliques formant un groupe de composés phyto-chimiques dérivés de la xanthine à base de purine, caractérisés par un effet inhibiteur sur la phosphodiesterase (Monteiro *et al.*, 2016).

II.2.1. Types chimiques des méthylxanthines

a) Caféine ou 1, 3,7-triméthylxanthine de formule chimique globale $C_8H_{10}N_4O_2$. Elle est caractérisée par trois substitutions méthyle au niveau des nitrogènes 1, 3 et 7 de la structure de la xanthine ;

b) Théophylline ou 1,3-diméthylxanthine de formule chimique globale $C_7H_8N_4O_2$. Elle est caractérisée par deux substitutions méthyle au niveau des nitrogènes 1 et 3 de la structure de la xanthine ;

c) Théobromine ou 3,7-diméthylxanthine de formule chimique globale $C_7H_8N_4O_2$ elle est caractérisée par deux substitutions méthyle au niveau des nitrogènes 3 et 7 de la structure de la xanthine ;

d) Paraxanthine ou 1,7-diméthylxanthine de formule chimique globale $C_7H_8N_4O_2$, elle est caractérisée par deux substitutions méthyle au niveau des nitrogènes 1 et 7 de la structure de la xanthine (**Bradley, 1989**).

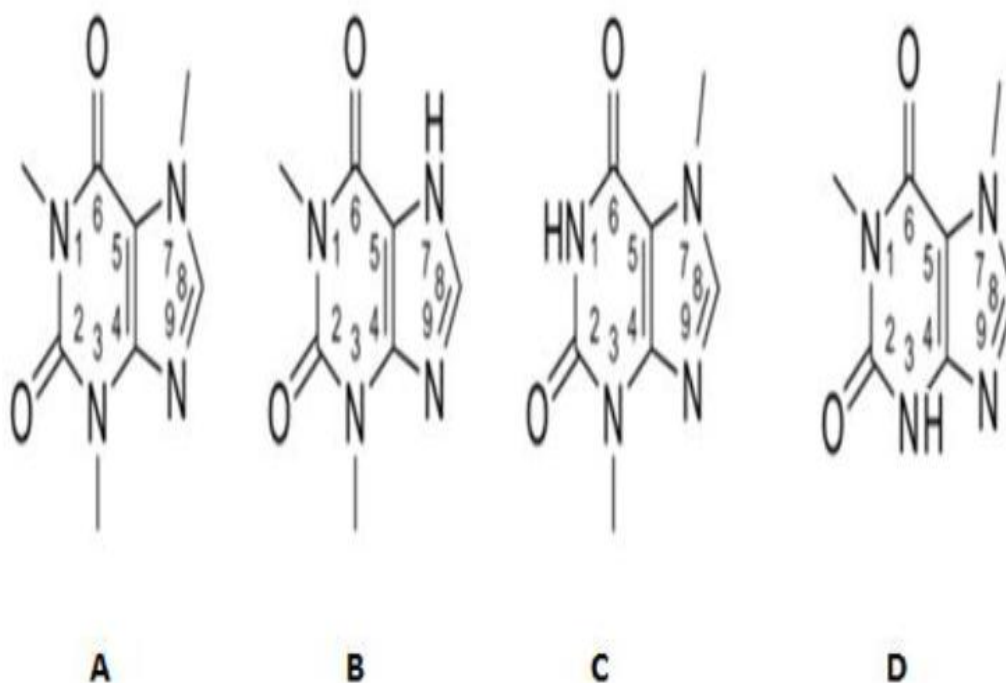


Figure 5 : structures chimiques de quelques méthylxanthines

(Salihović *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2016)

II.2.2. Sources naturelles des méthylxanthines

Les méthylxanthines ont été détectées dans près de 100 espèces de 13 ordres du règne végétal. De nombreuses plantes contenant des méthylxanthines, telles que le café, le thé, le maté, les noix de kola et les fèves de cacao sont couramment utilisées dans la production de boissons et d'aliments ingérés quotidiennement par de nombreuses personnes. Le thé, caractérisé par une abondance de la théophylline (Franco *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2016).

Les caféiers sont riches en caféine dans les grains et les jeunes feuilles des pousses de premier rinçage de *Camellia sinensis*, *Camellia assamica*, *Camellia tallensis* et *Camellia kissi* (Sanchez, 2017).

II.2.3. Activités biologiques des méthylxanthines

La caféine stimule le système nerveux central et le système respiratoire, tandis que la théophylline est moins puissante sur ces cibles et que la théobromine est considérée comme pratiquement inactive à cet égard (Salihović *et al.*, 2014).

Certains des effets bénéfiques rapportés pour les méthylxanthines peuvent être associés aux propriétés antioxydants attribuées à ces composés. Des études révèlent que la caféine est un piègeur efficace des radicaux hydroxyles et des radicaux alcoylés et cela peut soutenir le rôle antioxydant proposé pour ce composé dans la protection contre les dommages cellulaires en diminuant la peroxydation lipidique.

La théobromine présente également des propriétés antioxydantes et capable de se lier à Cu (II) à Cu (I) et de le réduire (Monteiro *et al.*, 2016).

Le mécanisme d'action le plus important des méthylxanthines consiste à bloquer les récepteurs de l'adénosine et à inhiber de manière compétitive l'action de l'adénosine dans les cellules. Cette inhibition entraîne une augmentation de la libération d'hormones, telles que la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine, L'adénosine peut exercer de multiples actions sur le système nerveux central, mais aussi sur le cœur, les vaisseaux sanguins et même d'autres systèmes, qui dépendent tous de l'activation des récepteurs de l'adénosine. Les récepteurs de l'adénosine sont classés en fonction de leur capacité à diminuer ou à augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc (Oñatibia-Astibia *et al.*, 2016). Les récepteurs A1 et A3 sont couplés aux protéines Gi et leur stimulation entraîne une diminution des niveaux d'AMPc intracellulaire. Au contraire, la stimulation des récepteurs A2A et A2B augmente les niveaux d'AMPc via les protéines Gs.

Les méthylxanthines sont capables d'inhiber les quatre sous-types de récepteurs de l'adénosine (A1, A2A, A2B et A3), mais la plupart de leur action est médiée par l'inhibition des types de récepteurs A1 et A2A (**Gottwalt et Tadi, 2021**).

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Machine de calcul

Les exécutions des calculs nécessaires pour la caractérisation du mode d'interaction entre les méthylxanthines et les protéines de lait, ont été réalisées par deux micro-ordinateurs, le premier est de marque acer avec un processeur d'Intel®Disc™ N3350 et capacité du mémoire 2GB DDR3 sous le système d'exploitation de Windows 10, et le deuxième de marque le novo.

II.1.2. Logiciels

- **Marvin Sketch** : un Outil de dessin et d'édition de molécules chimiques, fourni sous une licence académique de ChemAxon (**Ertl, 2010**).
- **Avogadro** : un éditeur des structures moléculaires, important des fichiers spécifiques pour l'affichage, offrant un rendu flexible et de haute qualité et un grand nombre de plugins. conçu pour être utilisé dans les domaines de la chimie computationnelle, de la modélisation moléculaire, de la bioinformatique, de la science des matériaux et des domaines connexes(**Hanwell et al., 2012**) ;
- **Chimera** : un programme de traitement et de visualisation de protéines et de petites molécules dans de nombreux formats différents. Il peut produire des images et des animations de haute qualité (**Goddard et al., 2018**);
- **CB-Dock** est un outil l'amarrage aveugle protéine-ligand guidé par la détection de zones de fixation accessible via internet (**Liu et al., 2020**), la première étape consiste à révéler les sites de liaison putatifs, ces paramètres sont requis pour l'amarrage moléculaire à l'aide d'AutoDock Vina (**Trott et Olson, 2010**);
- **LigPlot+** "un logiciel graphique permettant de générer automatiquement de multiples diagrammes 2D d'interactions ligand-protéine à partir de coordonnées 3D. Les diagrammes représentent les modèles d'interaction par liaison hydrogène et les contacts hydrophobes entre le ou les ligands et les éléments de la chaîne principale ou de la chaîne latérale de la protéine"(**Laskowski et Swindells, 2011**).

II.2. Méthodes

L'amarrage moléculaire est généralement effectué entre les petites molécules et les grandes molécules cibles, pour comprendre la reconnaissance moléculaire et structurale, il permet la prédiction du site de liaison, le mode et les énergies de fixation (**Morris et Lim-Wilby, 2008**).

II.2.1. Préparation des structures des ligands

Par Marvin sketch ont été dessinées les structures chimiques des composés, suivent : paraxanthine, caféine, théophylline et théobromine, les structures des protéines ont été préparées en fixant les paramètres suivants:

- le champ de la force (force Field) : Extension → Molécule machine → setup up → GAFF.
- optimisation géométrique : nombre d'itérations de 1000 et un algorithme du Steepest Descent avec une énergie convergence de 10^{-9} kJ/mol.

Les structures 3D obtenus ont été enregistrées sous le format sdf par logiciel Avogadro (**Hanwell et al., 2012**).

II.2.2. Préparation des structures des protéines

Nous avons obtenu les modèles des structures des protéines (α -lactalbumine : **1BLF**, β -lactoglobuline : **1GXA**, lactoferrine : **1F6S**) issus de la base des données Protéine Data Bank (**Kouranov et al., 2006**).

La préparation est assistée par logiciel Chimera pour l'élimination automatique des molécules d'eau et l'ajoute des atomes d'hydrogènes polaires.

II.2.3. Prédiction des sites de liaison et docking moléculaire

Le docking moléculaire est une technique importante pour découvrir les interactions possibles entre une protéine et ligand. Il utilise les fonctions énergétiques les plus faibles pour analyser l'ajustement spécifique de ligand au niveau de la poche de liaison du récepteur.

Les calculs de docking était réalisés à l'aide du serveur CBDOCK (**Liu et al., 2020**) où les modèles tridimensionnels des protéines étaient traités sous le format pdb et ceux des ligands sous le format mol. Le nombre de cavité à prédire était fixé à 20.

II.2.4. Analyse des résultats

L'analyse consiste à déterminer le nombre, le type des interactions et des ponts hydrogènes établis entre le ligand et les acides aminés au niveau des sites de fixation dont le complexe protéine-ligand présente l'énergie de liaison la plus fiable.

Résultats et discussions

III. Résultats et discussions

III.1. Etude de l'interaction entre l' α -lactalbumine et les méthylxanthines

III.1.1. Complexe binaire α -lactalbumine - caféine

Le complexe de caféine et α -lactalbumine est caractérisé par une énergie de liaison égale à - 4,9 kcal/mol et fait intervenir un total de 29 atomes, 11 du côté du ligand et 18 du côté de la protéine, séparés par des distances variant de 2,49 à 3,89 Å.

Le site de liaison à l' α -lactalbumine présente des surfaces hydrophiles et hydrophobes caractérisées par la présence de sept acides aminés : Ile89, Thr86, Leu85, Asp84, Asp83, Asp14, Glu11.

La liaison de la caféine est maintenue par trois ponts hydrogène dont deux sont établis par le résidu Thr86 avec des longueurs de 2,94 et 2,96 Å par la contribution des atomes; N et OG1 respectivement, le dernier de 3,19 Å de longueur par Leu85 via l'atome d'azote. Le ligand participe à ces liaisons par l'atome O1 (**Figure 6**). Les résultats de l'analyse LigPlot+ montrent que le complexe est aussi maintenu par 26 interactions hydrophobes et de Van Der Waals établies par tous les acides aminés du site de liaison et principalement via le résidu Glu11 (**Tableau 01**).

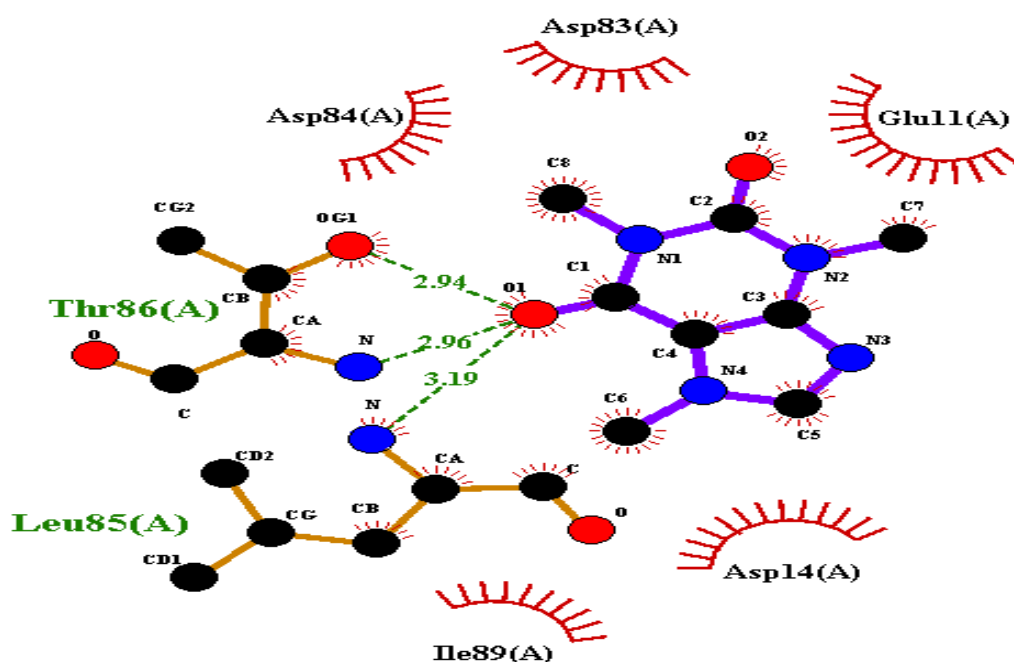


Figure 6 : Diagramme d'interactions clés entre la caféine et l' α -lactalbumine

Tableau 01 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la caféine et l' α -lactalbumine

		Caféine										
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	N2	O1	O2
Ile89	CD1						3,71					
Thr86	CA						3,81				3,67	
	CB										3,89	
	OG1	3,82					3,61					
Leu85	C										3,41	
	CA										3,57	
	CB										3,79	
	N								3,73			
Asp84	CA								3,85			
	OD1								3,87			
Asp83	O								3,55			
Asp14	OD2					3,57	3,60					
Glu11	CA							3,88		3,83		
	CD		3,87									3,52
	CG		3,59							3,81		3,46
	O			3,57	3,61	3,44						
	OE2								3,87			

Tableau 02 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la paraxanthine et l' α -lactalbumine

		Paraxanthine								
		C2	C3	C5	C6	C7	N2	N3	O1	O2
Ala106	CB									3,74
Leu105	N					3,48				
	C									3,46
Trp104	CA					3,88				3,47
	CB									3,83
Tyr103	O					3,31				
Glu49	CD								3,77	
	OE2				3,47					
	C							3,85		
	CA		3,71				3,36	3,63		
Thr33	CB						3,74			
	O		3,84	3,86						
	OG1	3,52								
His32	O		3,55							

III.1.3. Complexe binaire α -lactalbumine - théobromine

La formation de complexe binaire entre la théobromine et α -lactalbumine caractérisé par une énergie de liaison égale à -4,8 kcal/mol, fait intervenir un total de 27 atomes dont 10 du côté du ligand et 16 du côté de la protéine, séparés par des distances varient entre 2,92 et 3,90 Å.

Le site de fixation au niveau d' α -lactalbumine a un caractère hydrophobe et se caractérise par la présence de six acides aminés : Thr33, Glu49, Tyr103, Trp104, Leu105 et Ala106.

La pose résultante de l'étude de la théobromine, prendre une orientation qui permet l'établissement de deux ponts hydrogènes de longueurs de 2,96 et 3,32 Å, assurés par le résidu Thr33 via l'atome d'oxygène OG1. Le ligand contribue à ces interactions via les atomes O2, N1 (**Figure 8**).

Les résultats montrent que la liaison du ligand est maintenue également par 22 interactions hydrophobes et de Van Der Waals (**Tableau 03**).

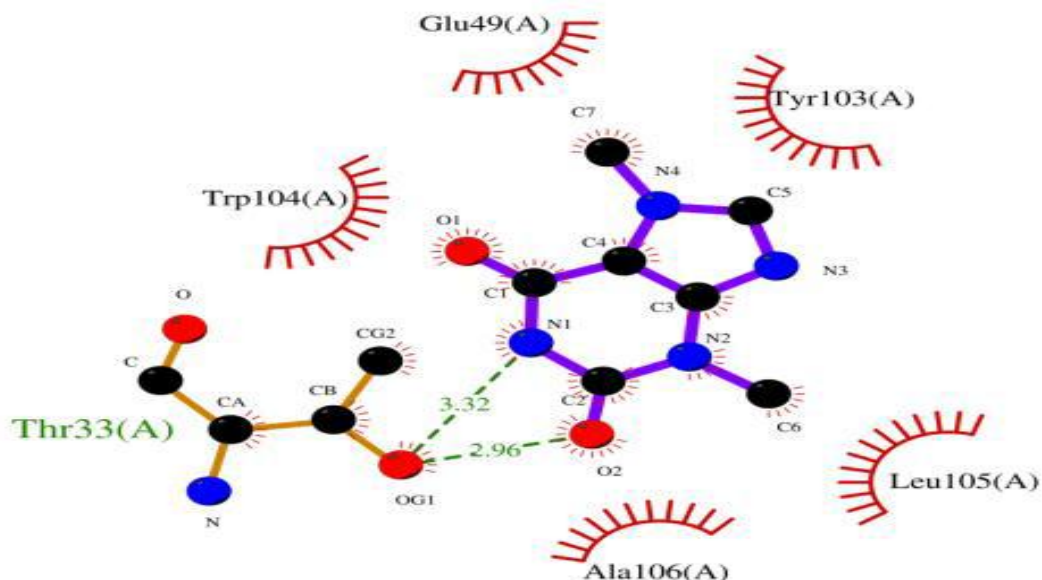


Figure 8 : Diagramme d'interactions clés entre la théobromine et l' α -lactalbumine

Tableau 03 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théobromine et l' α -lactalbumine

		Théobromine									
		C1	C2	C3	C4	C6	C7	N1	N2	O1	O2
Ala106	CB										3,36
Leu105	CB			3,80		3,60			3,66		
	N		3,90								
	C	3,69						3,67		3,70	
Trp104	CA										
	CG									3,81	
	CD1	3,84						3,64		3,27	
	CD2									3,48	
Tyr103	CE2									3,30	
	CZ						3,84				
	O	3,58			3,60		3,46				
Glu49	OE1						3,45				
	CA										3,68
Thr33	CB										3,76
	CG2							3,60			
	OG1		3,57								

III.1.4. Complexe binaire α -lactalbumine - théophylline

La formation du complexe de la théophylline et α -lactalbumine se caractérise par une énergie de liaison égale à -5 kcal/mol et fait intervenir un total de 26 atomes dont 10 du côté du ligand et 16 du côté de la protéine, séparées par des distances varient de 3,07 à 3,89 Å.

Le site de liaison à la β -lactoglobuline présente des surfaces hydrophiles et hydrophobes caractérisées par la présence de 11 acides aminés : Cys160, Gln159, Glu158, Glu157, Leu156, Gln59, Glu44, Val43, Tyr20, Trp19, Thr18.

La position et l'orientation de la théophylline permettent l'établissement de deux ponts hydrogènes de longueurs de 3,07 et 3,10 Å, assurés par les résidus Thr33, Ala106 via deux atomes N et OG1 respectivement. Le ligand contribue à ces interactions via l'atome d'oxygène O1 (**Figure 9**).

Les résultats montrent en plus que la fixation du ligand sur la protéine est maintenue également par 20 interactions hydrophobes et de Van Der Waals, principalement via Trp104 et Ala106 avec cinq interactions chacun. Alors que, His32, Thr33, Glu49, Tyr103, Trp104, Leu105 forment séparément entre une et trois interactions (**Tableau 04**).

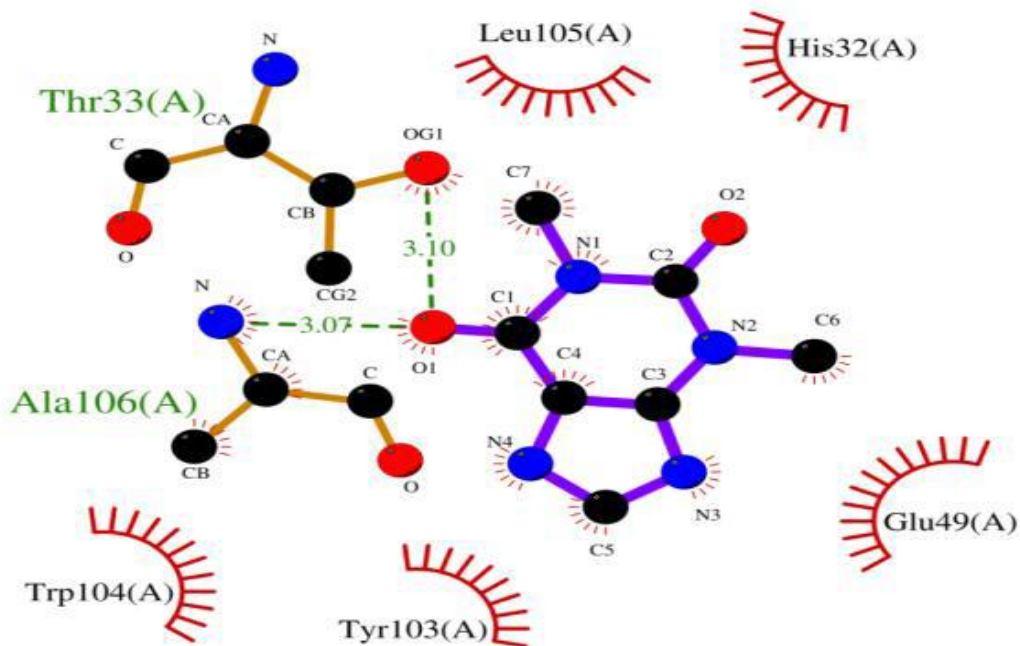


Figure 9 : Diagramme d'interactions clés entre la théophylline et l' α -lactalbumine

Tableau 04 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théophylline et l' α -lactalbumine

		Théophylline								
		C1	C4	C5	C6	C7	N1	N3	N4	O1
Ala106	CA					3,47				3,89
	CB									3,50
	N	3,78				3,65				
Leu105	CB						3,85			
	N		3,50							
Trp104	C									3,39
	CA							3,45		3,47
	CB									3,78
	CD1								3,61	
Tyr103	CE2			3,60						
	O			3,47						
Glu49	CD							3,75		
	OE1				3,87					
	OE2			3,60						
Thr33	OG1	3,84								
His32	O					3,57				

III.2. Etude de l'interaction entre la β -lactoglobuline et les méthylxanthines

III.2.1. Complexe binaire β -lactoglobuline - caféine

Le complexe de caféine et la β -lactoglobuline est caractérisé par une énergie de liaison égale à -6,1 kcal/mol et fait intervenir un total de 30 atomes, 11 du côté du ligand et 19 du côté de la protéine, séparés par des distances varient de 3,12 à 3,88 Å.

Le site de liaison à la β -lactoglobuline présente des surfaces hydrophile et hydrophobe caractérisées par la présence de 11 acides aminés : Cys160, Gln159, Glu158, Glu157, Leu156, Gln59, Glu44, Val43, Tyr20, Trp19, Thr18.

La liaison de la caféine est assurée par un seul pont hydrogène, établi par le résidu Val43 avec une longueur de 3,20 Å, une interaction assurée par la contribution des deux atomes N3 et O de ligand et de la protéine respectivement (**Figure 10**).

Les résultats de l'analyse LigPlot+ montrent que le complexe est aussi maintenu par 26 interactions hydrophobes et de Van Der Waals établies par l'ensemble des acides aminés du site de liaison (**Tableau 05**).

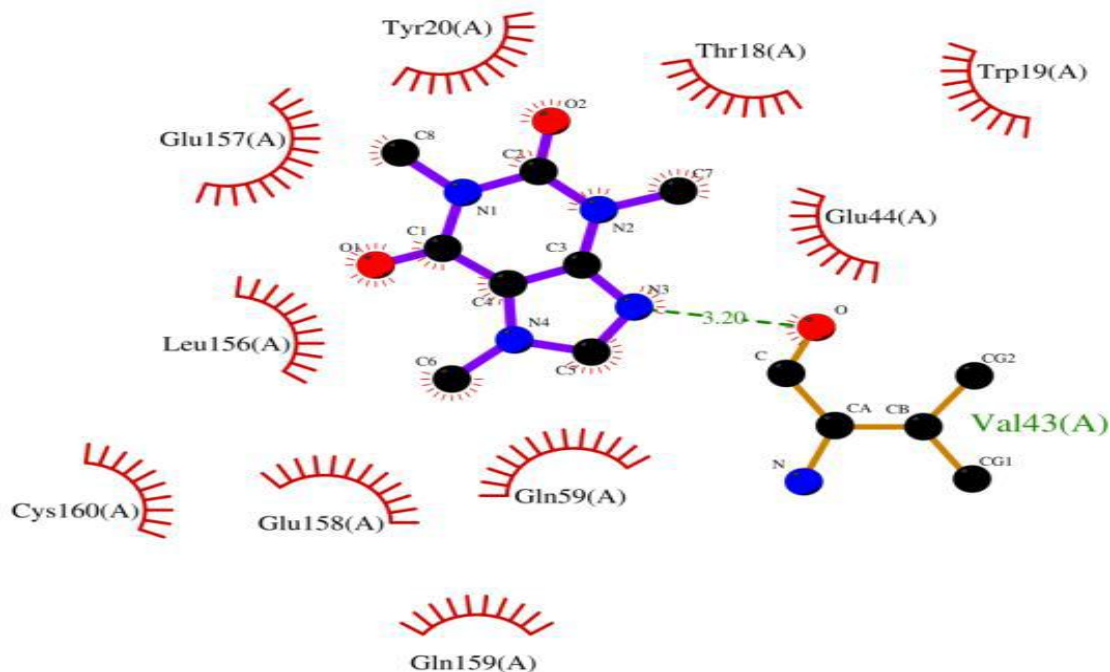


Figure 10 : Diagramme d'interactions clés entre la caféine et la β -lactoglobuline

Tableau 05 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la caféine et la β -lactoglobuline

		Caféine									
		C1	C2	C4	C5	C6	C7	C8	N3	O1	O2
Cys160	N					3,71					
Gln159	CA					3,85					
Glu158	C									3,36	
	O					3,12					
Glu157	C										
	CD							3,83			
	O							3,64			
	OE1							3,42			
Leu156	O	3,46		3,69							
Gln59	CD					3,70					
	NE2				3,63	3,53					
	OE1				3,57	3,87					
Glu44	CA								3,62		
Val43	O				3,40						
Tyr20	CE2		3,69				3,70		3,65		3,74
	CZ						3,58				3,63
	OH		3,87								
Trp19	O						3,44				
Thr18	CG2						3,62				

III.2.2. Complexe binaire β -lactoglobuline - paraxanthine

Le complexe de paraxanthine et la β -lactoglobuline de la plus faible énergie de liaison égale à -6,1 kcal/mol implique un total de 26 atomes, 9 du côté du ligand et 16 du côté de la protéine, séparés par des distances comprises entre 2,80 et 3,90 Å.

Le site de liaison à la β -lactoglobuline est caractérisé par la présence de neuf acides aminés: Tyr20, Tyr42, Val43, Gln59, Leu156, Glu158, Gln159, Cys160, His161.

La liaison de la paraxanthine est assurée par deux ponts hydrogènes établis par les acides aminés Cys160 et Glu158 via les atomes N et O2 des deux résidus respectivement, de longueur de 2,80 et 3,16 Å le ligand contribue à ces liaisons par deux atomes O2 et N2 (Figure 11).

Les résultats de l'analyse LigPlot+ montrent que la liaison du ligand est stabilisée par 24 interactions hydrophobes et de Van Der Waals établies par tous les acides aminés du site de liaison mis appart le résidu Tyr20 (Tableau 06).

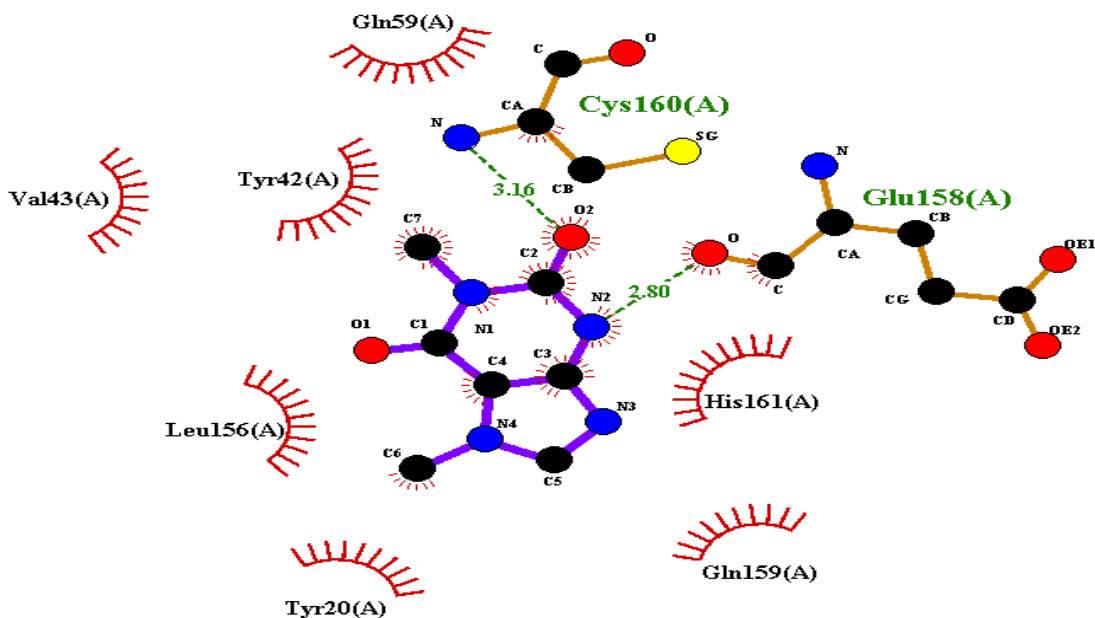


Figure 11 : Diagramme d'interactions clés entre la paraxanthine et la β -lactoglobuline

Tableau 06 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la paraxanthine et la β -lactoglobuline

		Paraxanthine							
		C2	C3	C4	C6	C7	N1	N2	O2
His161	CE1					3,46	3,87		3,85
	ND1	3,76							
Cys160	CA								3,75
Gln159	CA							3,56	
Glu158	C							3,46	
	O	3,59	3,42						
Leu156	O		3,83	3,67					
Gln59	CD	3,74							3,69
	NE2	3,62							
	OE1	3,76				3,64			
Val43	C					3,83			
	O					3,09			
Tyr42	C					3,77			
	CB					3,42			3,49
Tyr20	CE2				3,72				
	CZ				3,90				
	OH				3,86				

III.2.3. Complexe binaire β -lactoglobuline - théobromine

La formation de complexe binaire le plus stable entre la théobromine et β -lactoglobuline caractérisé par une énergie de liaison égale à -6,2 kcal/mol, fait intervenir un total de 26 atomes dont 10 du côté du ligand et 16 du côté de la protéine du lait, séparés par des distances varient entre 2,83 et 3,86 Å.

Le site de fixation au niveau de la β -lactoglobuline a un caractère hydrophobe dominant et se caractérise par la présence de neuf acides aminés : Tyr20, Tyr42, Val43, Gln59, Leu156, Glu158, Gln159, Cys160, His161.

La pose résultante de l'étude de la théobromine, prendre une conformation qui permette l'établissement de deux ponts hydrogènes de longueurs de 2,83 et 3,12 Å, assurés par les résidus Cys160 et Glu158 via les atomes d'oxygène O et d'azote N respectivement (Figure 12).

Les résultats montrent que la liaison du ligand est également maintenue par 23 interactions hydrophobes et de Van Der Waals avec des distances entre les atomes varient de 3,08 à 3,86 Å (Tableau 07).

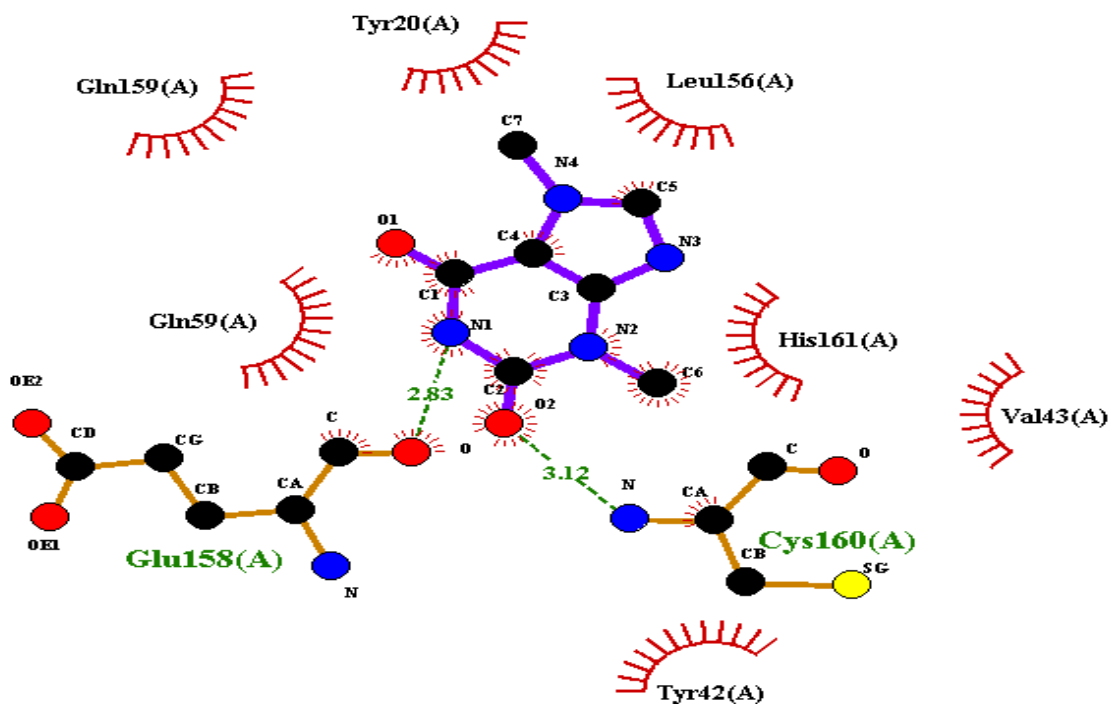


Figure 12 : Diagramme d'interactions clés entre la théobromine et la β -lactoglobuline

Tableau 07 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théobromine et la β -lactoglobuline

		Théobromine								
		C1	C2	C4	C5	C6	N1	N2	O1	O2
His161	CE1					3,40		3,85		3,81
	ND1		3,74							
Cys160	CA									3,70
Gln159	CA						3,52			
	OE1	3,74								
Glu158	C						3,48		3,77	
	O	3,59	3,41							
Leu156	O			3,81						
Gln59	CD		3,74							3,76
	NE2		3,62							
	OE1		3,76			3,74				
Val43	C				3,86					
	O				3,08					
Tyr42	C				3,84					
	CB					3,49				3,49
Tyr20	CE2				3,76					

III.2.4. Complexe binaire β -lactoglobuline - théophylline

La formation du complexe de la théophylline et β -lactoglobuline se caractérise par une énergie de liaison égale à -6,2 kcal/mol et fait intervenir un total de 28 atomes dont 10 du côté du ligand et 18 du côté de la protéine, séparés par des distances variant de 2,85 à 3,90 Å.

Le site de fixation au niveau de la β -lactoglobuline a un caractère hydrophobe est caractérisé par la présence de huit acides aminés : Trp19, Tyr20, Gln59, Leu156, Glu157, Glu158, Gln159, His161.

La position et l'orientation de la théophylline permettent l'établissement d'un seul pont hydrogène de longueur égale à 2,85 Å, assurés par le résidu Glu158 via l'atome d'oxygène O. Le ligand contribue à ces interactions via l'atome d'azote N4 (**Figure 13**).

Les résultats montrent que la fixation du ligand sur la protéine est maintenue également par 27 interactions hydrophobes et de Van Der Waals, principalement via Glu158 avec sept interactions. Alors que les autres résidus forment séparément entre une et quatre interactions (**Tableau 08**).

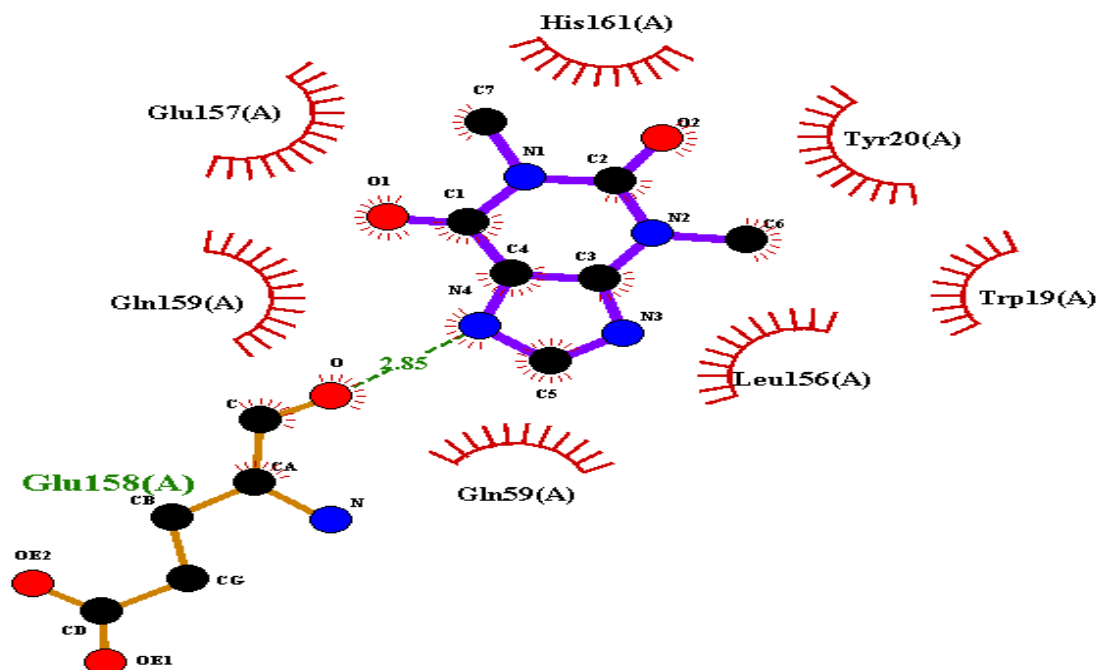


Figure 13 : Diagramme d'interactions clés entre la théophylline et la β -lactoglobuline

Tableau 08 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théophylline et la β -lactoglobuline

		Théophylline									
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	N4	O1	O2
His161	CE1					3,86					
	ND1					3,71					
Gln159	CA								3,60	3,73	
Glu158	C	3,85							3,63	3,13	
	CA									3,69	
	O	3,70			3,44	3,78					
Glu157	C									3,59	
	O							3,81			
	OE1							3,89			
Leu156	O	3,89	3,79	3,74	3,80						
Gln59	CD					3,63					
	NE2				3,90	3,59					
	OE1					3,52					
Tyr20	CE2						3,67				3,57
	CD2				3,85						
	CZ										3,72
Trp19	O						3,30				

III.3. Etude l'interaction entre la lactoferrine et les méthylxanthines

III.3.1. Complexe binaire lactoferrine - caféine

La formation de complexe binaire le plus stable entre la caféine et la lactoferrine caractérisé par une énergie de liaison égale à -7,5 kcal/mol, fait intervenir un total de 28 atomes dont 11 du côté du ligand et 17 du côté de la protéine du lait, séparées par des distances varient entre 3,06 et 3,88 Å.

Le site de fixation au niveau de la lactoferrine a un caractère hydrophobe dominant et se caractérise par la présence de neuf acides aminés : Ile11, Glu15, Arg121, Ser185, Phe190, Gly191, His153, Arg296, Asp297.

La pose résultante de l'amarrage de la caféine, prendre une conformation qui permet l'établissement de quatre ponts hydrogènes de longueurs varient de 3,06 à 3,21 Å, dont deux assurés par les résidus Arg121 et Glu158 via les atomes d'oxygène O et d'azote N respectivement (**Figure 14**).

Les résultats montrent que la liaison du ligand est également maintenue par 23 interactions hydrophobes et de Van Der Waals avec des distances entre les atomes varient de 3,08 à 3,86 Å (**Tableau 09**).

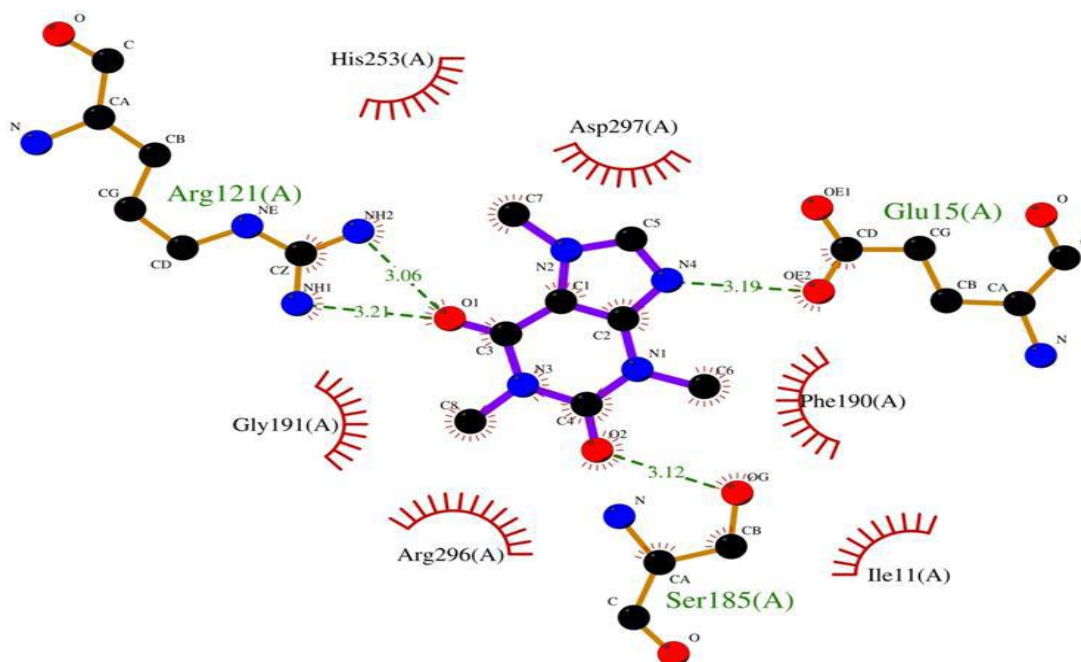


Figure 14 : Diagramme d'interactions clés entre la caféine et la lactoferrine

Tableau 09 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la caféine et la lactoferrine

		Caféine									
		C1	C2	C3	C4	C6	C7	C8	N3	O1	O2
Asp297	O	3,75	3,74								
Arg296	O				3,80			3,35			
His253	CA						3,79				
Gly191	CA							3,50			
Phe190	CD2				3,78			3,88			
	CE2				3,69			3,75	3,84		3,77
Ser185	CA										3,83
	CB										3,64
	OG					3,23					
Arg121	CZ						3,85			3,57	
	NH1			3,60							
	NH2						3,43				
Glu15	CD					3,30					
	OE		3,85								
	OE2					3,81					
Ile 11	CD1					3,60					

III.3.2. Complexe binaire lactoferrine - paraxanthine

Le complexe formé entre la paraxanthine et la lactoferrine est caractérisé par une énergie de liaison de -7,6 kcal/mol et implique un total de 28 atomes ; 10 de la paraxanthine et 18 de la lactoferrine. Ces atomes assurent des interactions chimiques avec des distances de l'ordre de 3,60 à 3,90 Å (**Tableau 10**).

Le complexe forme trois liaisons hydrogène conventionnelles; l'une entre l'atome N2 de la paraxanthine et le groupement hydroxyle OH du résidu Tyr524 de la lactoferrine, d'une distance de 3,05 Å ; l'autre interaction non covalente se forme entre l'atome N3 de la paraxanthine

et les atomes; NH1 et NH2 d' Arg463 avec des distances de 3,14 Å et 3,29 Å respectivement.

En outre, sept interactions hydrophobes et de Van Der Waals sont formées avec les résidus d'acides aminés: Val 350, Glu354, Asn393, Asn638, Leu640, Phe641 et Asn642 (**Figure 15**).

Les résultats de l'analyse par LigPlot+ montrent que le complexe est aussi maintenu par 21 interactions hydrophobes et de Van Der Waals établies par l'ensemble des acides aminés du site de fixation (**Tableau 10**).

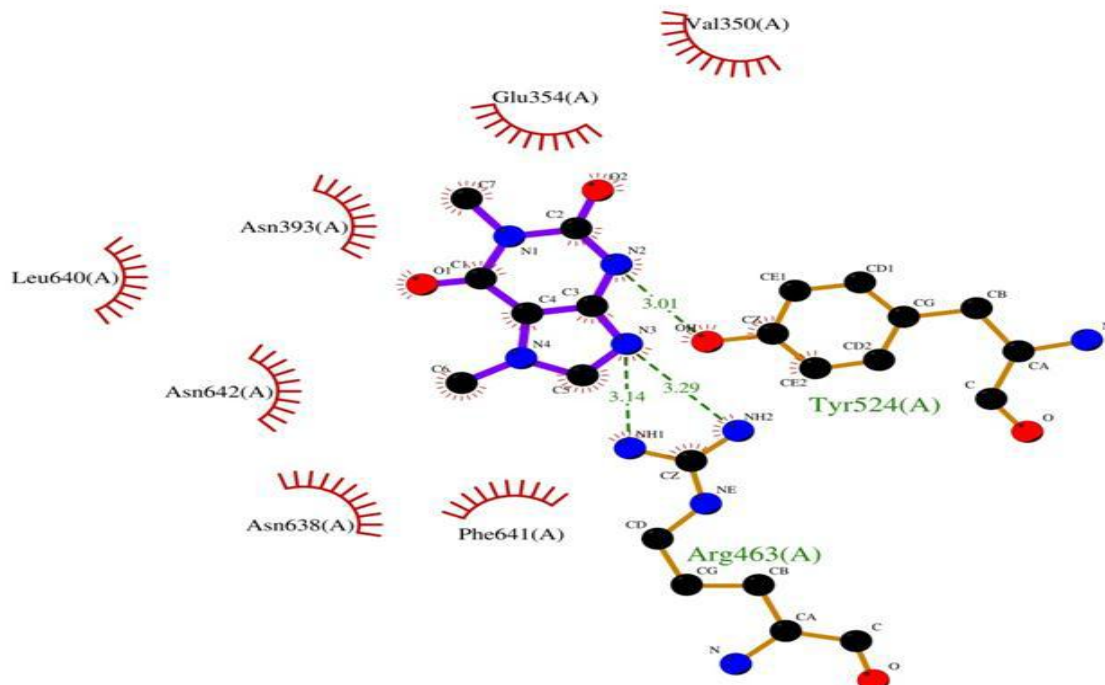


Figure 15 : Diagramme d'interactions clés entre la paraxanthine et la lactoferrine

Tableau 10 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la paraxanthine et la lactoferrine

		Paraxanthine									
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	N2	O1	O2
Asn642	OD1						3,79				
	CG						3,89				
	N						3,64				
Phe641	C						3,66				
Leu640	C								3,76		
Asn638	CB					3,90					
	O				3,87	3,58	3,69				
Try524	OH		3,48								
	CZ								3,86		
	CE2								3,81		
Arg463	NH2					3,55					
	HN1			3,60							
	CZ								3,60		
Asn393	O							3,70			
Glu354	OE2	3,76						3,66			
Val350	CG2							3,71			3,67
	CB										3,71

III.3.3. Complexe binaire lactoferrine - théobromine

Le complexe formé entre la théobromine et la lactoferrine est caractérisé d'énergie d'interaction du -7,5 kcal/mol qui adhèrent un total de 27 atomes dont 11 par la théobromine et 16 de la lactoferrine assurent des interactions hydrophobes et de Van Der Waals avec des distances varient du 3,31 à 3,89 Å (**Tableau 11**).

Le site de fixation de théobromine au niveau de lactoferrine est caractérisé par 11 résidus des acides aminés: Val350, Glu354, Thr377, Arg393, Leu394, Asp395, Tyr398, Arg463, Tyr524 et Arg638.

Le complexe résulte d'interaction hydrogène entre l'atome O1 de théobromine et l'atome OG1 d'hydroxyle de résidu Thr377 de la lactoferrine à une distance de 3,11 Å et des interactions hydrophobes et de Van Der Waals par les acides aminés : Val350, Glu354, Arg393, Leu394, Asp395, Tyr398, Arg463, Tyr524, His595 et Asn638 (**Figure 16**).

Les résultats de l'analyse par LigPlot+ montrent que le complexe est aussi maintenu par 27 interactions hydrophobes et de Van Der Waals établies par l'ensemble des acides aminés du site de liaison (**Tableau 11**).

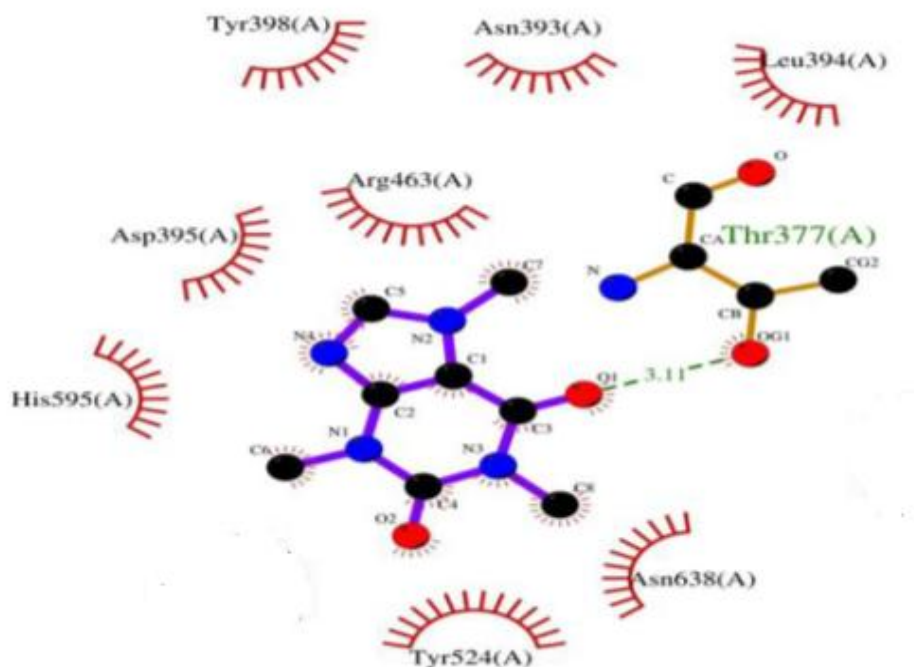


Figure 16 : Diagramme d'interactions clés entre la théobromine et la lactoferrine

Tableau 11 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théobromine et la lactoferrine

		Théobromine										
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	N3	N4	O2
Asn638	CB						3,87					
	O				3,84		3,47					
His595	CE1					3,77					3,66	
	ND1					3,68						
Tyr524	OH	3,78		3,42	3,87				3,89			
	CE2				3,59				3,67	3,86		3,50
Arg463	NH2		3,87				3,70					
	NH1		3,45				3,78					
	CZ		3,89								3,48	
Tyr398	CE2							3,80				
	CD2							3,61				
Asp395	CB					3,89						
	N					3,79						
Leu394	CD2							3,84				
Asn393	O							3,70				
Thr377	OG1							3,80				

III.3.4. Complexe binaire lactoferrine - théophylline

Le complexe formé entre la théophylline et la lactoferrine est caractérisé d'énergie d'interaction de -7,4 kcal/mol qui adhèrent un total de 26 atomes dont 10 du côté de la théophylline et 16 du côté de la lactoferrine assurent des interactions hydrophobes et de Van Der Waals avec des distances séparatives varie du 3,24 à 3,90 Å (**Tableau 12**).

Le site de fixation de théophylline au niveau de lactoferrine est caractérisé par neuf résidus des acides aminés : Phe64, Val350, Glu354, Thr377, Asn393, Arg463, Tyr542, His595 et Leu640 (**Figure 17**).

Le complexe théophylline-lactoferrine inclut quatre interactions hydrogène : la première entre l'atome N2 de la théophylline et l'atome O du résidu Leu640 à une longueur de 2,93 Å, la seconde mesurant 3,09 Å, est établie entre l'oxygène de la théophylline et l'azote N2 de l'amide du résidu Asn393, les autres liaisons hydrogène : sont formées entre l'atome O2 de la théophylline et l'atome NH2 et l'atome OH1, des résidus Arg463 et Tyr524 d'une longueur de 2,95 Å et 3,11 Å respectivement (**Figure 17**). De plus, il est stabilisé par des interactions non covalentes via les résidus acides aminés : Val350, Glu354, Thr377, Asn393, Arg463, Tyr524, His595 et Leu640 (**Tableau 12**).

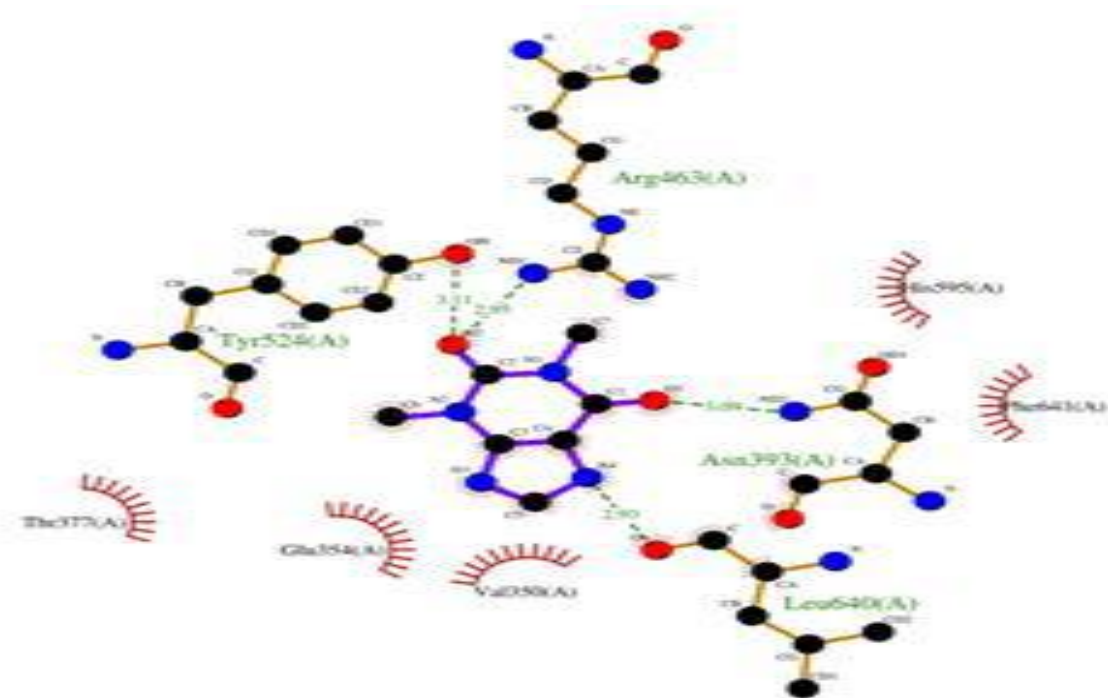


Figure 17 : Diagramme d'interactions clés entre la théophylline et la lactoferrine

Tableau 12 : Caractéristiques des interactions hydrophobes et de Van Der Waals prédites entre la théophylline et la lactoferrine

		Théophylline									
		C1	C3	C4	C5	C6	C7	N3	N4	O1	O2
Leu640	O	3,85		3,66							
	C								3,55	3,65	
	CA								3,75		
His595	ND1						3,82				
Tyr524	OH					3,42					
Arg463	NH2						3,67				
	CZ										3,70
Asn393	O	3,90	3,84	3,29	3,25						
	C								3,77		
Thr377	OG1					3,36					
Glu354	OE2		3,24	3,62	3,58						
	OE1				3,63						
	CD							3,72			
Val350	CG2					3,67		3,60			
	CB					3,74					

Il sort de cette étude que :

- Les énergies de liaison des quatre méthylxanthines sont marquées par des valeurs négatives, indiquent que la paraxanthine, la théobromine, la théophylline et la caféine sont susceptibles de former des complexes binaires thermodynamiquement favorable avec l' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline et la lactoferrine et partagent le même site de liaison de caractère hydrophobe dominant ;
- Les méthylxanthines sont liées avec les protéines du lait par des ponts hydrogène, des interactions hydrophobes et de Van Der Waals quel que soit le nombre ou la position des groupes méthyles du ligand;
- Les valeurs des énergies de liaison obtenues entre les méthylxanthines et l' α -lactalbumine varient de -4,8 à -5 kcal/mol, ce qui suggère une interaction réversible, spontanée et de faible affinité entre les quatre ligands et la protéine. La théophylline présente la plus grande affinité et la plus faible énergie de liaison de -5 kcal/mol, suivie par la paraxanthine et la caféine ;
- Les valeurs des énergies de liaison obtenues entre les méthylxanthines et la β -lactoglobuline sont proches et se situent entre -6,1 et -6,2 kcal/mol, ce qui suggère une interaction réversible et spontanée entre les quatre méthylxanthines et la protéine ;
- Les valeurs des énergies de liaison obtenues entre les méthylxanthines et la lactoferrine sont similaires et vont de -7,4 à -7,6 kcal/mol, ce qui suggère une interaction réversible et spontanée entre les quatre méthylxanthines et cette protéine. La paraxanthine présente l'affinité la plus élevée et l'énergie de liaison la plus faible de -7,6 kcal/mol, suivie par la caféine, la théobromine et la théophylline ;

La figure18 montre que, parmi les trois protéines du lait étudiées, les meilleures interactions ont été obtenues entre les méthylxanthines et la lactoferrine, avec les affinités les plus élevées et les énergies de liaison les plus faibles, la plus faible étant de -7,6 kcal/mol.

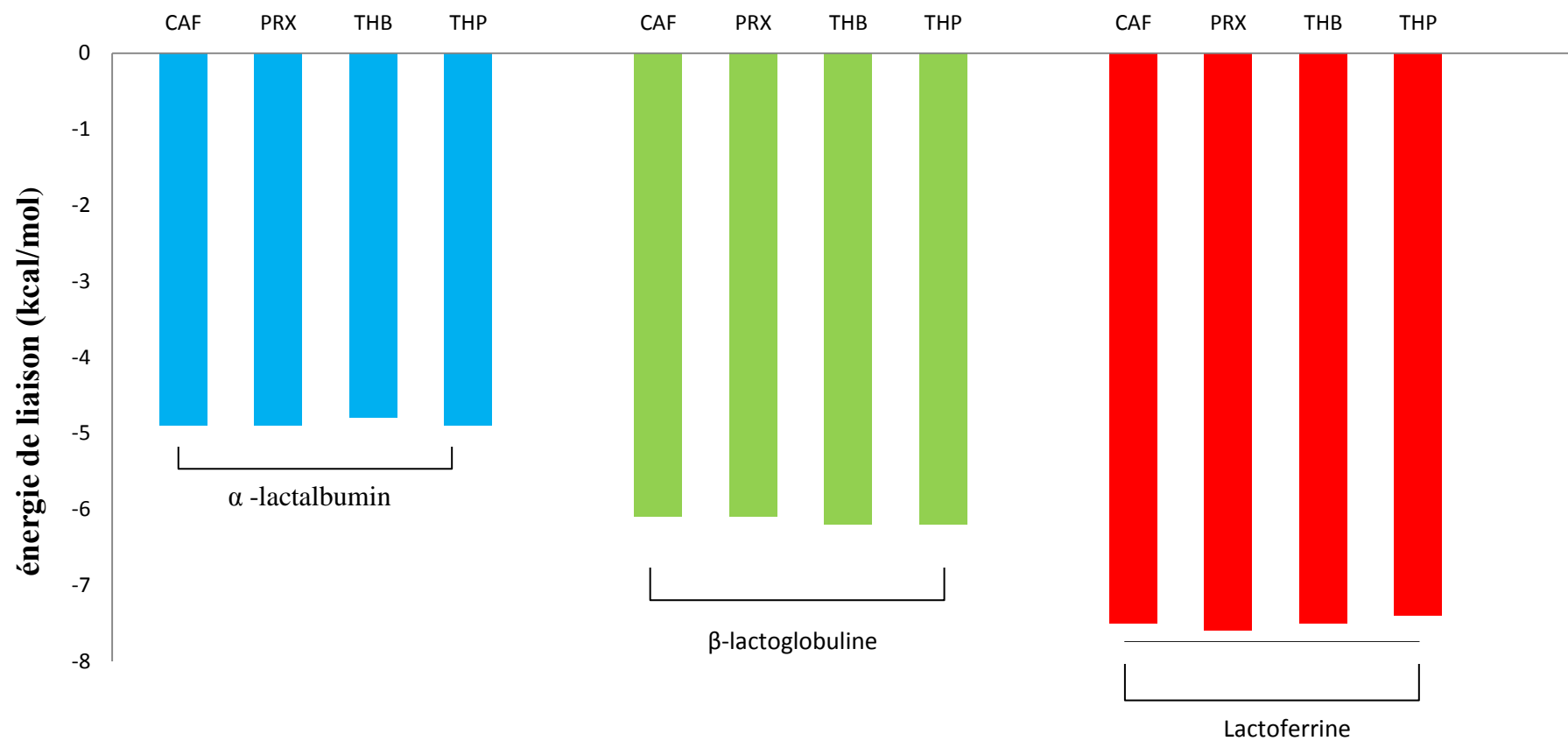


Figure 18 : Variation des energies de liaison en fonction de type de méthylxanthins et de la proteins de lait

Conclusion

IV. Conclusion

Dans ce travail, une étude de modélisation *in silico* des interactions moléculaires entre les protéines du lait et les molécules de méthylxanthines a été réalisée via un docking moléculaire semi-rigide par le logiciel CB-Dock.

Les énergies de liaison et les interactions chimiques formées dans les complexes ligand-protéine sont utilisées pour analyser les interactions entre les différentes molécules de méthylxanthines testées et les protéines du lait. Les résultats obtenus montrent que les trois complexes binaires formés entre la lactoferrine et la paraxanthine, la caféine et la théobromine ont les plus faibles valeurs d'énergie de liaison entre -7,6 kcal/mol et -7,5 kcal/mol et sont également considérés comme les plus stables.

Notre perspective est d'étudier par des méthodes spectroscopiques et des mesures via des approches thermodynamiques, les complexes formés entre les méthylxanthines et le lait et les protéines du lait pour valider ce résultat. Dans un second temps, d'enrichir le lait maternel ou le lait reconstitué avec ces molécules bioactives et d'étudier l'effet de la formation des complexes méthylxanthines-protéines sur la structure des protéines et sur l'activité et les paramètres liés à la pharmacologie de la caféine, de la théophylline, de la paraxanthine et de la théobromine.

Références bibliographiques

1. **Aich, R., Batabyal, S., et Joardar, S. N. (2015).** Isolation and purification of beta-lactoglobulin from cow milk. *Veterinary World*, 8(5), 621 .
2. **Ainouche, Y., et Bouslah, L. (2016).** *étude de la qualité du lait cru de vache issu de différents élevages de la wilaya de Bouira et de Boumerdes.* universités M'Hamed Bouguerra Boumerdès.J. Boumerdès .
3. **Al-Hanish, A., Stanic-Vucinic, D., Mihailovic, J., Prodic, I., Minic, S., Stojadinovic, M., Radibratovic, M., Milcic, M., et Velickovic, T. C. (2016).** Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Food Hydrocolloids*, 61, 241-250 .
4. **Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., et Valenti, P. (2011).** Antiviral properties of lactoferrin—a natural immunity molecule. *Molecules*, 16(8), 6992-7018 .
5. **Bradley, P. B. (1989).** *Introduction to neuropharmacology.* Butterworth-Heinemann .
6. **Brew, K., Richardson, R. H., et Sinha, S. K. (1979).** Structural basis of the regulation of galactosyltransferase. In *From Gene to Protein: Information Transfer in Normal and Abnormal Cells* (pp. 433-447). Elsevier .
7. **Brisson, G. (2006).** *étude des propriétés physico-chimiques de la lactoferrine et de son fractionnement par procédés membranaires.* University de Laval, Canada.
8. **Brooks, C .L., Arutyunova, E., et Lemieux, M. J. (2014).** The structure of lactoferrin-binding protein B from *Neisseria meningitidis* suggests roles in iron acquisition and neutralization of host defences. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(10), 1312-1317 .
9. **Cadoná, F. C., Dantas, R. F., de Mello, G. H., et Silva-Jr, F. P. (2021).** Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1 .20-
10. **Çakır, B., Okuyan, B., Şener, G., et Tunali-Akbay, T. (2021).** Investigation of beta-lactoglobulin derived bioactive peptides against SARS-CoV-2 (COVID-19): In silico analysis. *European Journal of Pharmacology*, 891, 173781 .
11. **Elzoghby, A. O., Saad, N. I .,Helmy, M. W., Samy, W. M., et Elgindy, N. A. (2013).** Ionically-crosslinked milk protein nanoparticles as flutamide carriers for effective anticancer activity in prostate cancer-bearing rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85 .451-444 ,(3)
12. **Ertl, P. (2010).** Molecular structure input on the web. *Journal of cheminformatics*, 2(1), 1-9 .

13. **Franco, R., Oñatibia-Astibia, A., et Martínez-Pinilla, E. (2013).** Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients*, 5(10), 4159-41 .73
14. **Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L., et Antonini, G. (2016).** Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals*, 9(4), 61 .
15. **Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Morris, J. H .,et Ferrin, T. E. (2018).** UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science*, 27(1), 14-25 .
16. **González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., et Rascón-Cruz, Q. (2009).** Lactoferrin: structure, function and applications. *International journal of antimicrobial agents*, 33(4), 301. e301-301. e308 .
17. **Gottwalt, B., et Tadi, P. (2021).** Methylxanthines. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing .
18. **Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., et Hutchison, G. R. (2012).** Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, 4(1), 1-17 .
19. **Hao, L., Shan, Q., Wei, J., Ma, F., et Sun, P. (2019).** Lactoferrin: major physiological functions and applications. *Current Protein and Peptide Science*, 20(2), 139-144 .
20. **Hart, A. D., et Grimble, R. (1990).** The effect of methylxanthines on milk volume and composition, and growth of rat pups. *British Journal of Nutrition*, 64(2), 339-350 .
21. **Hernández-Ledesma, B., Recio, I., et Amigo, L. (2008).** β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino acids*, 35(2), 257-265 .
22. **Islam, M. M., Sonu, V. K., Gashnga, P. M., Moyon, N. S., et Mitra, S. (2016).** Caffeine and sulfadiazine interact differently with human serum albumin :A combined fluorescence and molecular docking study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 152, 23-33 .
23. **Kamau, S. M., Cheison, S. C., Chen, W., Liu, X. M., et Lu, R. R. (2010).** Alpha-lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 197-212 .
24. **Katouzian, I., Jafari, S. M., Maghsoudlou, Y., Karami, L., et Eikani, M. H. (2020).** Experimental and molecular docking study of the binding interactions between bovine α -lactalbumin and oleuropein. *Food Hydrocolloids*, 105, 105859 .

25. Kouranov, A., Xie, L., de la Cruz, J., Chen, L., Westbrook, J., Bourne, P. E., et Berman, H. M. (2006). The RCSB PDB information portal for structural genomics. *Nucleic acids research* 34 ,(suppl_1), D302-D305 .
26. Lam, R. S., et Nickerson, M. T. (2015). The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. *Food chemistry*, 173, 163-170 .
27. Lapointe-Vignola, C .,et Québec, F. d. t. l. d. (2002). *Science et technologie du lait: transformation du lait*. Presses internationales Polytechnique.
28. Laskowski, R. A., et Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. In: ACS Publications.
29. Layman, D. K., Lönnerdal, B., et Fernstrom, J. D. (2018). Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition reviews*, 76(6), 444-460 .
30. Liu, Y., Grimm, M., Dai, W.-t., Hou, M.-c., Xiao, Z.-X., et Cao, Y. (2020). CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(1), 138-144 .
31. Mercadante, D., Melton, L. D., Norris, G. E., Loo, T. S., Williams, M. A., Dobson, R. C., et Jameson, G .B. (2012). Bovine β -lactoglobulin is dimeric under imitative physiological conditions: dissociation equilibrium and rate constants over the pH range of 2.5–7.5. *Biophysical Journal*, 103(2), 303-312 .
32. Monteiro, J. P., Alves, M. G., Oliveira, P. F., et Silva, B. M. (2016). Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules*, 21(8), 974 .
33. Morris, G. M., et Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. In *Molecular modeling of proteins* (pp .(382-365 .Springer .
34. Moualek, I. (2011). *Caractérisation du lait de chèvre collecté localement : Séparations chromatographiques et contrôles électrophorétiques des protéines* UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI .Algerie
35. Oñatibia-Astibia, A., Martínez-Pinilla, E., et Franco, R. (2016).The potential of methylxanthine-based therapies in pediatric respiratory tract diseases. *Respiratory medicine*, 112, 1-9 .
36. Permyakov, E. A., et Berliner, L. J. (2000). α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS letters*, 473(3), 269-274 .
37. Pierce, A., Legrand, D., et Mazurier, J. (2009). La lactoferrine: une protéine multifonctionnelle. *médecine/sciences*, 25(4), 361-369 .

38. **Rahayu, P., Andriani, R., et Maligan, J. (2020).** Molecular docking studies and physicochemical properties on the interaction of xanthone with whey protein (β -lactoglobulin and α -lactalbumin). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* ,
39. **Rodak, K., Kokot, I., et Kratz, E. M. (2021).** Caffeine as a Factor Influencing the Functioning of the Human Body—Friend or Foe? *Nutrients*, 13 .3088 ,(9)
40. **Roufik, S. (2005).** *étude des interactions β -lactoglobuline bovine:peptides bioactifs et digestibilité in vitro des complexes.* University of Laval .[.
41. **Sahihi, M., et Ghayeb, Y. (2014).** An investigation of molecular dynamics simulation and molecular docking: Interaction of citrus flavonoids and bovine β -lactoglobulin in focus. *Computers in biology and medicine*, 51, 44-50 .
42. **Salihović, M., Huseinović, S., Špirtović-Halilović, S., Osmanović, A., Dedić, A., Ašimović, Z., et Završnik, D. (2014).** DFT study and biological activity of some methylxanthines. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 42, 31-36 .
43. **Sanchez, J. M. (2017).** Methylxanthine content in commonly consumed foods in Spain and determination of its intake during consumption. *Foods*, 6(12), 109 .
44. **Sharma, D., Hanson, L. Å., Korotkova, M., Telemo, E., et Ogra, P. (2015).** Human Milk: Its Components and Their Immunobiologic Functions. In *Mucosal Immunology* (pp. 2307-2341). Elsevier .
45. **Sonu, V. K., Islam, M. M., Rohman ,M. A., et Mitra, S. (2016).** Lysozyme binding ability toward psychoactive stimulant drugs: Modulatory effect of colloidal metal nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 514-522 .
46. **Szklarczyk, D., Santos, A., Von Mering, C., Jensen, L. J .,Bork, P., et Kuhn, M. (2016).** STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic acids research*, 44(D1), D380-D384 .
47. **Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., et Hayasawa, H. (2002).** Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 109-112 .
48. **Trott, O., et Olson, A. J. (2010).** AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461 .

49. **Viseu, M. I., Carvalho, T. I., et Costa, S. M. (2004).** Conformational transitions in β -lactoglobulin induced by cationic amphiphiles: equilibrium studies. *Biophysical Journal*, 86(4), 2392-2402 .
50. **Visioli, F., et Strata, A. (2014).** Milk, dairy products, and their functional effects in humans: a narrative review of recent evidence. *Advances in nutrition*, 5(2), 131-143 .
51. **Wakabayashi, H., Yamauchi, K., et Takase, M. (2006).** Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16(11), 1241-1251 .
52. **Wal, J.-M. (2011).** Allergénicité des protéines laitières. *Innovations agronomiques*, 13, 25-43 .
53. **Zait, M., et Berkane, R. (2016).** *Interactions protéine-ligands:cas de la farnésyl transférase et des flavonoïdes des Frères Mentouri Constantine* .[.
54. **Zhang, J., Teng, Z., Yuan, Y., Zeng, Q.-Z., Lou, Z., Lee, S.-H., et Wang, Q. (2018).** Development, physicochemical characterization and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by beta-lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1406-1413 .

Annexes

Annex1 : liste des vingt acides aminés de base

acide aminé	Code en trois lettres
Glycine	Gly
Alanine	Ala
Leucine	Leu
Isoleucine	Ile
Méthionine	Met
Proline	Pro
Phénylalanine	Phe
Tryptophane	Trp
Sérine	Ser
Cystéine	Cys
Asparagine	Asn
Glutamine	Gln
Lysine	Lys
Arginine	Thr
Thréonine	Asp
Acide glutamique	Glu
Tyrosine	Tyr
Histidine	His

