



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la
vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Hanane CHEBICHEBE et Nour El-Houda AOUAM

Le : 10 / 10 / 2020.

Thème

**Mise en évidence d'ELISA sandwich pour le
dosage de la xanthine oxydase humaine**

Jury :

| | | | | |
|------|---------------------|-----|----------------------|------------|
| M. | Amirouch DEGHIMA | MAA | Université de Biskra | Président |
| Mme. | Hayat TRABSA | MCB | Université de Biskra | Rapporteur |
| Mme. | Fatiha BENGUERAICHI | MAA | Université de Biskra | Examineur |

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciement

*Tout d'abord, nous exprimons notre profond remerciement à **ALLAH** qui nous a donné le courage, la volonté et la patience d'achever ce travail.*

*Nous remercions infiniment notre encadreur **Dr. TRABSA Hayat** de nous avoir proposée ce sujet de mémoire. Merci pour toutes votre disponibilité et pour tous les efforts que vous avez fourni afin de nous aider à réaliser notre travail de recherche dans le délai prévu. Nous le remercions pour ses conseils, ses informations ainsi pour sa patience durant cette année.*

Nous remercions les membres du jury pour avoir accepté de consacrer un peu de votre temps pour juger notre travail. Un grand merci.

*Nous tenons à remercier tous les ingénieurs du laboratoire dans notre département, en particulier, **Mm Moufida**, pour ses encouragements et ses conseils. Merci pour votre gentillesse et votre écoute.*

*Nous remercions : **Ahmed BACHA, Chaouchi BEN RIALA, Faten MENNANI, Rabab MEDJNICHI, Samir GHANMI**, et d'autres amies de nous avoir fourni les échantillons du lait et du sang en particulier **Imen SAKOUB, Hiba SAADI** qu'elles nous ont aidés à la collection, le prélèvement et la conservation des échantillons sanguins.*

Sans oublier nos collègues du travail chaqu'un par son nom, merci pour votre collaboration et votre aide durant la période de pratique.

Houda & Hanane

Dédicace

A mes chers parents,

Qui sont à l'origine de toutes mes réussites. Merci pour votre confiance et votre soutien permanent.

Papa !

Tu m'as toujours soutenu dans mes études. Encore aujourd'hui tu essaies de suivre ce que je fais et tu m'apportes toujours l'aide nécessaire pile au bon moment.

Maman !

Aucun mot ne sera assez fort pour te remercier de tout ce que tu as fait ces dernières années, pour tout ce que tu fais et ce que tu feras. Ton dévouement et tes encouragements sont inestimables, pour moi, pour nous quatre. Tu es mon modèle, mon roc et mon réconfort.

A mon fiancé

En témoignage de ma gratitude pour ses encouragements, sa patience, son aide et son incitation à poursuivre mon rêve.

A mes adorables frères et sœurs

Fodhil, Lakhdar et Abderrahmane, pour votre simple présence, vos encouragements ou votre soutien.

A ma belle Noussa, Je te remercie d'être la sœur que tu es, toujours gentille et intelligente. Tu comptes énormément pour moi.

A ma chère binôme hanane

Merci pour ta présence et t'amitié sans faille. Je n'oublie pas ton père. Je vous remercie chaleureusement pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre écoute.

A Manel Cherassi

D'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments longue vie à nous ! et aussi mon oncle Nacer et ma tante hanane.

A Amani Medjnichi

Tu es toujours une sœur fidèle, tu es une belle addition à la vie.

Sans oublier ma famille

*Mes oncles, ma tante **Hadda TRIA** et ses filles.*

Aux membres de notre promotion 2019-2020

D'étaient unis tout le long des cinq ans. Nous les remercions pour leur soutien moral et physique. Nous remercions aussi tous mes amis qui ont de près ou de loin contribué à l'élaboration de ce mémoire.

...Nour el houda

Dédicace

A mes chers parents,

Qui sont à l'origine de toutes mes réussites. Pour votre confiance et votre soutien permanent

Papa !

En exprimant ma gratitude, mon profond amour et ma passion, pour sa confiance, son soutien moral et matériel et pour son amour infini.

Maman !

En témoignage de ma profonde gratitude et de mon incontestable reconnaissance, pour tous les sacrifices qu'elle me contente, toute la confiance qu'elle m'accorde et tout l'amour dont elle m'entoure.

A mes adorables frères et sœurs

Ahmed, Ibrahim, Khaled et Azzedine, pour votre simple présence, vos encouragements ou votre soutien.

A mes belles Hamama, Farida et Nour, Je te remercie d'être les sœurs que vous êtes, toujours gentilles et intelligents. Vous comptez énormément pour moi.

A ma chère binôme houda

Grosse dédicace pour l'effort qu'elle a fourni notamment par s'aller-retour quotidien de 56 Kms durant toute la durée de notre travail, ce que je ne suis pas sûr de pouvoir faire.

A Sabah Ben Riala

Tu étais la sœur et l'amie, je t'ai toujours trouvée à mes côtés en toutes circonstances, bonnes et mauvaises.

A Samah Ghazzel

Merci pour t'amitié et ton aide moral.

Sans oublier ma famille.

Aux membres de notre promotion 2019-2020

D'étaient unis tout le long des cinq ans. Nous les remercions pour leur soutien moral et physique. Nous remercions aussi tous mes amis qui ont de près ou de loin contribué à l'élaboration de ce mémoire.

...hanane

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Remerciement | |
| Dédicace | |
| Table des matières | |
| Liste des Tableaux..... | I |
| Liste des Figures..... | II |
| Liste des abréviations | III |
| Introduction..... | 1 |
| Partie 1 Synthèse bibliographique | |
| Chapitre 1 Xanthine oxydoréductase | |
| 1.1. Définition..... | 3 |
| 1.2. Gène | 3 |
| 1.3. Structure | 3 |
| 1.4. Formes et mode d'action de la XOR..... | 4 |
| 1.5. Distribution de la XOR..... | 5 |
| 1.6. Implications de la XOR | 6 |
| 1.6.1. Implications physiologiques..... | 6 |
| 1.6.2. Implications pathologiques | 6 |
| 1.7. Inhibition de la XOR | 8 |
| Partie 2 Partie expérimentale | |
| Chapitre 2 Matériel et Méthodes | |
| Partie I : Travail pratique réalisé | 9 |
| 1.1. Matériel..... | 9 |
| 1.1.1. Matériel biologique..... | 9 |
| 1.1.2. Produits chimique | 9 |
| 1.1.3. Appareillage | 10 |
| 1.2. Méthodes | 10 |
| 1.2.1. Purification de la XOH | 10 |
| Partie II : Etude comparative des recherches réalisées sur la XOR | 12 |
| 2.1. Matériel..... | 12 |
| 2.2. Méthodes analysées..... | 12 |
| 2.2.1. Purification de la XOR..... | 12 |
| 2.2.2. Purification des ACs polyclonaux anti-XOR..... | 14 |
| 2.2.2.1. Western blot..... | 16 |
| 2.2.2.2. Immunodiffusion d'Ouchterlony | 17 |
| 2.2.3. Dosage de la XOH..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.2.3.1. ELISA double – Sandwich..... | 18 |
| 2.2.3.2. ELISA compétitive | 19 |
| 2.2.3.3. Radiométrie | 20 |
| 2.2.3.4. Fluorimétrie | 20 |
| 2.2.3.5. Chimiluminescence..... | 21 |
| 2.2.3.6. HPLC | 22 |
| 2.2.3.7. Spectrophotométrie UV-Visible | 22 |
| 2.2.3.8. Colorimétrie..... | |
| Chapitre 3 Résultats et discussion | |
| Partie I : Travail pratique réalisé | 24 |
| 1.1. Purification de la XOH..... | 24 |
| 1.1.1. Précipitation différentielle par SA..... | 24 |
| 1.1.2. Dialyse | 24 |
| 1.1.3. Chromatographie d'affinité | 24 |
| 1.1.4. Test de Bradford | 25 |
| Partie II : Etude comparative des recherches réalisées sur la XOR | 25 |
| 2.1. Purification de la XOH..... | 25 |
| 2.1.1. Extraction | 25 |
| 2.1.1.1. Préparation de la crème | 25 |
| 2.1.1.2. Précipitation différentiel par SA..... | 27 |
| 2.1.1.3. Dialyse..... | 28 |
| 2.1.2. Purification | 28 |
| 2.1.3. Analyse..... | 29 |
| 2.2. Purification des ACs anti-XOR | 30 |
| 2.2.1. Immunisation..... | 30 |
| 2.2.1.1. Choix de l'animal..... | 30 |
| 2.2.1.2. Voie d'administration et dose..... | 30 |
| 2.2.1.3. Rappelle..... | 31 |
| 2.2.1.4. Collection du sang | 32 |
| 2.2.2. Purification | 32 |
| 2.2.3. Analyse..... | 32 |
| 2.3. Dosage de la XOR..... | 34 |
| Conclusion | 37 |
| Bibliographie | |
| Annexes | |
| Résumés | |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau.1. Groupes des sujets sains utilisés pour le dosage de la XOR. | 9 |
| Tableau.2. Listes des produits chimiques. | 9 |
| Tableau.3. Volumes utilisés dans chaque étape de purification de la XO. | 10 |
| Tableau.4. Quelques protocoles de purification et des points de différence entre les techniques. | 13 |
| Tableau.5. Production des ACs polyclonaux anti-XOR. | 16 |
| Tableau.6. Différentes techniques du dosage de XOR. | 18 |
| Tableau.7. Pureté et activité enzymatique de la XO. | 29 |
| Tableau.8. Valeurs de la XO dans différentes situations pathologiques. | 34 |

Liste des Figures

| | |
|---|----|
| Figure.1. Structure de la xanthine oxydase bovine (XOB)..... | 4 |
| Figure.2. Modèle de structure de la XDH et la XO..... | 4 |
| Figure.3. Mécanisme catalytique de la XOR..... | 5 |
| Figure.4. Etapes de préparation du RB..... | 11 |
| Figure.5. Etapes de purification de la XOH..... | 11 |
| Figure.6. Résumé des protocoles choisis du purification de la XOR..... | 13 |
| Figure.7. Production et purification des antisérums anti-XOR..... | 15 |
| Figure.8. Double immunodiffusion d'Ouchterlony..... | 17 |
| Figure.9. Etapes d'ELISA double sandwich..... | 19 |
| Figure.10. Test de Bradford..... | 25 |
| Figure.11. Tampons utilisés dans la séparation et la solubilisation de la crème..... | 26 |
| Figure.12. Test de spécificité des ACs anti-XO purifiés..... | 33 |
| Figure.13. Niveau de la XOR dans différentes catégories pathologiques..... | 35 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------------------------|--|
| ACs | Anticorps |
| AC-Ag | Complexe anticorps-antigène |
| ACF | Adjuvant Complet de Freund |
| AIF | Adjuvant Incomplet de Freund |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| AU | Acide Urique |
| BME | β -mercaptoéthanol |
| BSA | Albumine de sérum bovin |
| CNBr | Bromure de Cyanogène |
| CPA | Cellule Présentatrice d'Antigène |
| CuSO ₄ | Sulfate de cuivre |
| DTPA | Acide Diéthylène Triamine Penta Acétique |
| EDTA | Éthylène Diamine Tétra Acétique |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| ERN | Espèces Réactives de l'Azote |
| ERO | Espèces Réactives d'Oxygène |
| FAD | Flavine Adénine Di-nucléotide |
| FBX | Febuxostat |
| Fe / S | Fer / Soufre |
| FPLC | Chromatographie liquide de protéine rapide |
| GAG | Glycosaminoglycanes |
| HA | Hydroxyapatite |
| HCl | Chlorure d'hydrogène |
| HClO ₄ | Acide perchlorique |
| HEPES | Acide 4-(2-Hydroxyéthyl) -1-Pipérazine Ethane Sulfonique |
| HPLC | Chromatographie en Phase Liquide a Haute Performance |
| H ₂ O ₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| H ₂ SO ₄ | Acide sulfurique |
| HRP | Peroxydase de raifort |
| Ig | Immunoglobulines |
| IL | Interleukine |
| IR | Ischémie Reperfusion |
| K ₂ CO ₃ | Carbonate de potassium |
| KH ₂ PO ₄ | Potassium Phosphate Monobasique |
| K ₂ HPO ₄ | Potassium Phosphate Dibasique |
| KOH | Hydroxyde de potassium |
| LDL | Lipoprotéines de basse densité |
| MFGM | Membrane des Globules Gras du Lait |
| Mo | Molybdène |
| Mo-Co | Molybdo-coptérine |
| MPO | Myéloperoxydase |

| | |
|----------------------------------|---|
| NaCl | Chlorure de Sodium |
| Na ₂ CO ₃ | Carbonate de sodium |
| NAD ⁺ | Nicotinamide Adénine Di-nucléotide |
| NADH | Nicotinamide Adénine Di-nucléotide réduit |
| NaH ₂ PO ₄ | Sodium Phosphate Dibasique |
| Na ₂ HPO ₄ | Sodium Phosphate Dibasique |
| NaOH | Hydroxyde de Sodium |
| NaSCN | Thiocyanate de sodium |
| NH ₄ OH | Hydroxyde d'ammonium |
| NF-κB | Facteur de Nécrose κB |
| NO | Oxyde Nitrique |
| O ₂ | Oxygène |
| O ²⁻ | Anion superoxyde |
| OPD | Orthophenylène diamine |
| PBS | Tampon phosphate salin |
| PMSF | Fluorure de Phényl Méthyl Sulfonyle |
| PPAR-γ | Récepteur Activé par les Proliférateurs de Peroxysomes-γ |
| PSH | Protéines sériques humain |
| RB | Réactif de Bradford |
| RLU | Unités de lumière relative |
| SA | Sulfate d'Ammonium |
| SDS-PAGE | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium |
| SF | Liquide synovial |
| TCA | Acide Trichloroacétique |
| TNF-α | Facteur de Nécrose Tumorale-α |
| Tris / HCL | Tris Hydrochloride |
| XDH | Xanthine Déshydrogénase |
| XO | Xanthine Oxydase |
| XOB | Xanthine Oxydase Bovine |
| XOH | Xanthine Oxydase Humain |
| XOR | Xanthine Oxydoréductase |

Introduction

Introduction

Ces dernières années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », qui se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires (ou réactives) de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes (Favier, 2003 ; Migdal et Serres, 2011), ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec une perturbation des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Sergent et *al.*, 2001).

Le stress oxydant n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique qui est impliqué dans le développement de plus de 200 pathologies (maladies cardiovasculaires, dégénératives et inflammatoires, cancer, diabète, sida...) (Pincemail, 2001).

Parmi les sources des radicaux libres la XO, qui catalyse l'hydroxylation oxydative des substrats puriques et la réduction subséquente d'oxygène (O₂) avec la génération des ERO, soit le radical anion superoxyde (O⁻²) ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Borges et *al.*, 2002).

Cette enzyme devenue un axe principal de plusieurs chercheurs qui ont mesuré sa concentration dans des nombreuses maladies, telles que les maladies inflammatoires (Martinez-Hervas et *al.*, 2010), hépatiques (Battelli et Tomassoni, 2001) et cancéreuses (Kohsari et *al.*, 2020).

Ce qui a poussé notre encadreur et ses collègues d'essayer d'introduire cette enzyme comme un paramètre clinique dans la détection de ces maladies à travers de nombreuses études, mais ce qui a attiré l'attention, c'est le manque total de références sur son dosage physiologique et la différence dans les méthodes de mesure avec des différents résultats telles que la radiométrie, la spectrophotométrie et Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), donc un projet mené par notre encadreur basé sur la mise en évidence du dosage de la xanthine oxydase humain (XOH) par une méthode immunoenzymatique ELISA double sandwich dans les sérums des personnes sains regroupés selon le sexe, l'âge et le tabagisme, dans le but d'étudier l'influence de ces facteurs sur sa concentration.

Afin de réaliser cette étude, nous avons collectés les échantillons sanguins puis en a purifié la xanthine oxydoréductase (XOR) à partir de lait humain par une série de précipitation puis sa purification par une chromatographie d'affinité. Dans notre plan de travail, nous avons voulu utiliser la XOR purifiée dans la production des anticorps (ACs) anti-

XOR, afin de détecter l'enzyme par cette méthode. En raison de la pandémie mondiale (Corona-virus 2019), un confinement a été imposée à tous les établissements, y compris les laboratoires, nous sommes obligés d'arrêter et de ne pas terminer nos travaux pour atteindre les objectifs souhaités, et pour cela nous avons pris la décision de faire une étude comparative entre des recherches réalisées sur cette enzyme dans la purification, la production des ACs polyclonaux et son dosage dans les liquides biologiques.

Partie 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Xanthine oxydoréductase

1.1. Définition

La XOR est une hydroxylase molybdène prototypique (Okamoto et *al.*, 2004), appartenant à la famille de métalloflavoenzymes (Battelli et *al.*, 2019), elle est identifiée pour la première fois il y a près d'un siècle dans le lait (Berry et Hare, 2004). Elle est hautement conservée au cours de l'évolution (Battelli et *al.*, 2014) avec une large distribution phylogénétique des organismes procaryotes à l'homme (Battelli et *al.*, 2018). C'est une enzyme clé du métabolisme des purines qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et finalement au produit l'acide urique (AU) (Mao et *al.*, 2019).

1.2. Gène

La XOR est le produit d'un seul gène (Kurosaki et *al.*, 1996) qui est situé sur le bras cours (Berry et Hare, 2004) du chromosome 2 p 22 (Liu et *al.*, 2018). Le gène couvre au moins 60 kb composé de 36 exons et 35 introns, la gamme de tailles d'exon est de 53 à 279 pb et les tailles d'introns vont de 0.2 à plus de 8 kb (Xu et *al.*, 1994) et la structure exon-intron est très conservés (Harrison, 2002). La transcription d'ARN_m contient un cadre de lecture ouvert de 3999 pb codant pour 1333 acides aminés (Berry et Hare, 2004). Ce gène contient plusieurs sites de liaison possibles pour la modification de la traduction : quatre sites de liaison CCAAT/amplificateur, trois éléments sensibles à l'interleukine-6 (IL-6), un site du facteur de nécrose κ B (NF- κ B) et des unités sensibles au facteur de nécrose tumorale- α (TNF α), à l'interféron γ et à IL-1 (Schmidt et *al.*, 2019), il est exprimé de façon constitutive dans la plupart des tissus et il est régulé au niveau transcriptionnel par des multiples facteurs dont les hormones, les facteurs de croissance et les cytokines inflammatoires, ainsi que les stimuli irritatifs (Xu et *al.*, 2019).

1.3. Structure

La XOR est un molybdoenzyme (Maia et Moura, 2018) homodimérique (Masuoka et Kubo, 2018). Sous sa forme holoenzymatique, l'enzyme a une masse de 300 kDa (Kurosaki et *al.*, 1996) et était considéré comme composé de deux sous-unités identiques (Figure 1) avec une masse moléculaire de 150 kDa (Moriwaki et *al.*, 1993). Chacune des sous-unités est composée de trois domaines : un domaine N-terminal de 20 kDa contenant deux centres de fer et de soufre (Fe / S), un domaine central flavine adénine di-nucléotide (FAD) de 40 kDa et un domaine C-terminal de 85 kDa de liaison de molybdoptérine (Pacher et *al.*, 2006 ; Okamoto et *al.*, 2013).

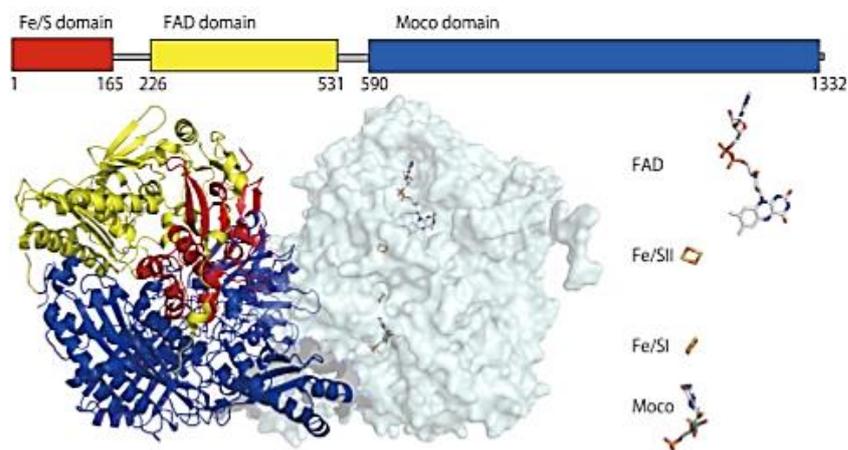


Figure.1. Structure de la xanthine oxydase bovine (XOB). Structure primaire des sous-unités de la XOB est illustrée comme trois domaines connectés avec deux peptides de liaison. Le N-terminal (rouge), le C-terminal (bleu) et le domaine intermédiaire (jaune), les domaines contiennent les centres (Fe / S), le Centre molybdo-coptérine (Mo-co) et le centre FAD, respectivement. A gauche la structure homodimérique de la XOB est illustrée avec une sous-unité comme modèle de ruban et l'autre comme un modèle de remplissage d'espace avec un arrangement de cofacteur à droite (Nishino et Okamoto, 2015).

1.4. Formes et mode d'action de la XOR

La XOR existe sous deux formes, la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) et la XO (EC 1.1.3.22) (Masuoka et Kubo, 2018). Les deux formes enzymatiques sont identiques pour la taille, de la composition des sous-unités et les exigences de cofacteur (Figure 2) (McManaman et Bain, 2002).

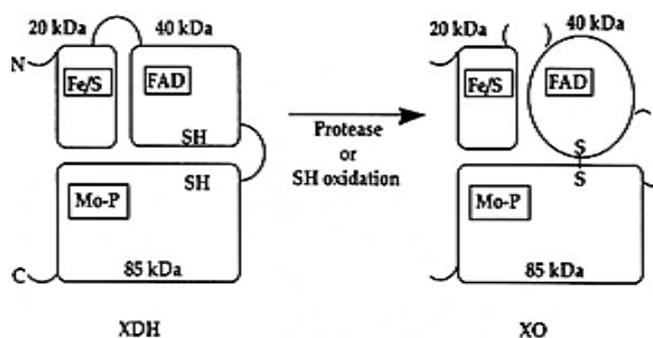


Figure.2. Modèle de structure de la XDH et la XO. Une seule sous-unité de la protéine dimère est représentée, la XDH peut être convertie en XO de manière irréversible par protéolyse limitée ou de manière réversible par oxydation des cystéines en cystines, lors de la protéolyse, la conversion de la XDH en XO s'accompagne du clivage des trois fragments de 20, 40 et 85 kDa (Borges et *al.*, 2002).

La XOR existe dans la plupart des tissus des mammifères sous forme déshydrogénase (Berry et Hare, 2004) mais sous certaines conditions, notamment ischémie et / ou hypoxie (Pauff et Hille, 2009), il a été démontré que la XO dérive d'une déshydrogénase dépendante du nicotinamide adénine di-nucléotide (NAD^+), soit irréversiblement par protéolyse limitée (Figure 2) (Battelli et *al.*, 1999), calcium-dépendantes (Day et *al.*, 2016) après Lys551 ou Lys569 (numérotation XOB) (Maia et Moura, 2018) soit de manière réversible par voie

chimique ou oxydation enzymatique des groupes thiol (Battelli et *al.*, 1999), plus précisément, Cys 535 et Cys 992 (Harrison, 2002). Il y a donc une inter-conversion réversible entre XDH et XO (Russ et Takeshi, 1995).

Le mécanisme catalytique de la XOR est illustré dans la figure 3, le Mo-Co est le site de l'oxydation des purines et la réduction de NAD^+ en nicotinamide adénine di-nucléotide réduit (NADH), et / ou celui d' O_2 en H_2O_2 et O_2^- se produit au niveau du site FAD. Les deux groupes Fe / S fournissent le conduit pour le flux d'électrons entre le Mo-Co et le FAD (Enroth et *al.*, 2000 ; Luna et *al.*, 2019), la XDH utilise le NAD^+ comme son accepteur final d'électrons en catalyse (Pauff et Hille, 2009), mais la XO n'utilise que l' O_2 comme un accepteur d'électrons (Vorbach et *al.*, 2003). Les deux formes de l'enzyme montrent une activité NADH oxydase, avec génération des ERO, mais la XDH est un peu plus efficace (Ahmane et *al.*, 2019).

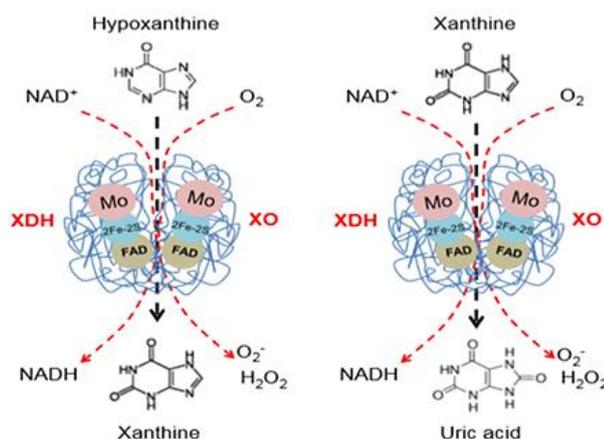


Figure.3. Mécanisme catalytique de la XOR. La XOR catalyse l'oxydation de la xanthine et l'hypoxanthine au site Mo et la réduction du NAD^+ et O_2 au site FAD (Chen et *al.*, 2016).

1.5. Distribution de la XOR

La XOR a été purifiée à partir du lait de vache, étudié de manière approfondie au début des années 70 et a été rapporté comme la deuxième protéine la plus abondante sur la membrane des globules gras du lait (MFGM) (Borges et *al.*, 2002), elle est fortement exprimée dans les seins allaitants (Battelli et *al.*, 2019). La XOR a une expression tissulaire, où elle est exprimée dans divers organes y compris le foie, les reins et l'intestin (Kusano et *al.*, 2019). De plus, la XOR a été détecté dans les voies gastro-intestinales (Xu et *al.*, 2019), peau, thymus, tissus adipeux blanc (Jarasch et *al.*, 1981), dans le cerveau, les poumons et le mésentère (Moriwaki et *al.*, 1993). L'activité de cette enzyme a été démontré dans la langue, les tubules, les glandes surrénales (Moriwaki et *al.*, 1998), le placenta, le pancréas, la prostate, les testicules, les ovaires et les leucocytes du sang périphérique (Xu et *al.*, 1994). Aussi, une

légère activité a été trouvée dans la rate, les muscles squelettiques et le cœur (Fried et Fried, 1974). Fait intéressant, les microvascularisations des cellules endothéliales humaines de plusieurs tissus ont été identifiées comme ayant des niveaux élevés d'activité XOR (Battelli et al., 2014), qui se lie via des interactions avec les glycosaminoglycannes (GAG) (Schmidt et al., 2019) sur leurs surfaces apicales (Cantu-Medellin et Kelley, 2013), bien qu'une activité significative de cette enzyme a été trouvée chez les muqueuses nasales (Giler et al., 1975).

D'autre part, la XOR ayant une localisation subcellulaire, c'est une enzyme cytosolique (Borges et al., 2002) mais récemment, elle a été identifiée par microscopie électronique dans les peroxyosomes des hépatocytes et dans divers organites de Kupffer et les cellules sinusoidales, y compris le réticulum endoplasmique rugueux, les lysosomes et les vésicules endocytaires (Berry et Hare, 2004). Vanden Munckhof et ses collègues ont identifié une activité XOR dans la matrice cytoplasmique des entérocytes (Harrison, 2002).

1.6. Implications de la XOR

1.6.1. Implications physiologiques

Récemment, des preuves ont été rapportées concernant l'implication de la XOR dans la sécrétion du lait des mammifères (Mandava et Batchu, 2016), la XOR peut également avoir une activité antimicrobienne, comme cela a été démontré dans le lait (Ozturk et al., 2020), le sang et le foie (Borges et al., 2002).

La XOR endothéliale joue un rôle physiologique dans la signalisation inflammatoire, la régulation de la production de l'oxyde nitrique (NO) et une fonction vasculaire, auxquels elle contribue directement à la génération des ERO et d'AU et aussi indirectement avec des radicaux libres dérivés de l'AU (Battelli et al., 2014) qui agit comme un puissant antioxydant (Mandava et Batchu, 2016).

Les souris *knock-out-XOR* présentent une diminution de l'adiposité, suggérant l'implication potentielle de l'activité de la XOR dans la régulation de l'adipogenèse et du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes- γ (PPAR- γ) à un stade précoce de la différenciation des cellules adipeuses (Washio et al., 2017).

1.6.2. Implications pathologiques

D'après Okamoto et ses collègues (2013) la XOR est une cible de médicaments pour la thérapie de la goutte ou de l'hyperuricémie, la suraccumulation de l'AU est responsable du développement de la goutte (Toshiya et al., 2019), lorsque il y a un excès d'AU dans le sang, les cristaux d'urate ont tendance à précipiter et à s'agréger à des températures relativement basses, une inflammation douloureuse se produit lorsque les globules blancs attaquent les

dépôts cristaux, conduisant aux symptômes connus collectivement comme la goutte (Mitomo et *al.*, 2019) qui est la forme la plus fréquente d'arthrite inflammatoire (Tu et *al.*, 2017). L'hyperuricémie, comme une sorte de maladie métabolique qui résulte d'un déséquilibre entre la production et l'excrétion d'AU (Hu et *al.*, 2017), est fortement associée à une diminution des fonctions des reins, augmentant ainsi le risque d'événements cardiovasculaires, d'accident vasculaire cérébral et provoquant un dysfonctionnement des cellules constituant les vaisseaux sanguins et le tissu adipeux. Elle s'accompagne fréquemment d'obésité et de syndrome métabolique (Washio et *al.*, 2017).

Les taux élevés d'AU sont aussi corrélés à un dysfonctionnement endothélial et une stimulation de la rénine plasmatique (Bardin et Cohen-Solal, 2011).

La XOR est un régulateur clé du stress oxydatif (Tziomalos, 2009), dans les conditions pathologiques tel que l'inflammation ou l'hypoxie conduisent à une production et une immobilisation accrue de la XOR et augmente à leur tour, le stress oxydatif (Lytvyn et *al.*, 2015 ; Washio et *al.*, 2017) qui reflète un déséquilibre entre la production des ERO et la capacité du système à déplacer des réactifs intermédiaires ou pour réparer les dommages qui résulte dans notre corps (Isik et *al.*, 2016), cet action a été signalée dans divers systèmes rénaux et des maladies cardiovasculaires (Lytvyn et *al.*, 2015), suggérant que l'activité plasmatique de la XOR pourrait être un nouveau biomarqueur métabolique (Furuhashi et *al.*, 2019).

L'activité accrue de la XOR est supposée être important dans la médiation des lésions oxydatives dans l'ischémie reperfusion (IR), pendant l'ischémie, l'adénosine triphosphate (ATP) dégénère en xanthine et hypoxanthine, augmentant ainsi les niveaux de substrat de la XOR, ce qui entraîne une augmentation de la production de ERO, ces derniers sont impliqués dans la blessure endothéliale (Poss et *al.*, 1996) et peuvent perturber la physiologie des cellules normales, menant éventuellement à la mort cellulaire (Van Hoorn et *al.*, 2002).

Se-Hyun Oh et ses collaborateurs (2019) ont démontré que l'inhibition de La XOR par le febuxostat (FBX) a considérablement diminué la migration des cellules cancéreuses du sein, ces résultats indiquent que la XO représente une nouvelle cible thérapeutique pour l'inhibition de la prolifération, de la migration et des métastases cellulaires dans le cancer du sein.

L'activité de la XO sérique est l'indicateur le plus exigeant dans les lésions hépatiques aiguës (Mchale et *al.*, 1979), l'intoxication aiguë (Zhang et *al.*, 2011) et le rhumatisme (Miesel et Zuber, 1993).

1.7. Inhibition de la XOR

L'inhibition de l'activité de la XOR peut se produire soit par interaction avec son centre de Mo, ou par la liaison avec le site FAD (Battelli et *al.*, 2018 ; Battelli et *al.*, 2019 ; Luna et *al.*, 2019). Allopurinol et FBX comme médicaments contre la goutte ou l'hyperuricémie, peut inhiber efficacement la XOR (Qingyong et *al.*, 2019), en réduisant ainsi la formation d'AU (Day et *al.*, 2016). Une multitude flavonoïdes ont été signalé comme des inhibiteurs naturels de la XOR (Qingyong et *al.*, 2019).

Partie 2

Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Partie I : Travail pratique réalisé

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

Lait : le lait humain (650 ml) a été recueilli auprès de plusieurs femmes de Biskra au cours de la première semaine de leur accouchement, le lait a été stocké à une température de - 20 °C. Le lait bovin (12 L) est fraîchement obtenu d'une vache d'une maison à différentes régions de Biskra, et traité directement à l'arrivée au laboratoire pour la purification de la XOR.

Sérums humains : les sérums des sujets sains (170) sont regroupés selon le sexe, l'âge et le tabagisme (Tableau 1), les prélèvements sont réalisés à une polyclinique à Biskra et ont été stocké à - 4 °C.

Tableau.1. Groupes des sujets sains utilisés pour le dosage de la XOR.

| Groupe | Code | Age | Abréviation | Nombre |
|--------|------|-----------|-------------------------|--------|
| 1 | A | [19 – 29] | Femme jeune | 22 |
| 2 | B | [30 – 50[| Femme adulte | 22 |
| 3 | C | [19 – 29] | Homme jeune non-fumeur | 18 |
| 4 | D | [19 – 29] | Homme jeune fumeur | 18 |
| 5 | E | [30 – 50[| Homme adulte non-fumeur | 20 |
| 6 | F | [30 – 50[| Homme adulte fumeur | 20 |

1.1.2. Produits chimique

L'ensemble des produits et réactifs chimiques utilisés dans ce travail sont illustrés dans le tableau 2.

Tableau.2. Listes des produits chimiques.

| Produit | Formule chimique | Marque |
|---|---|---------------------|
| Albumine bovine sérum fraction V (BSA) | - | BIOCHEM chemopharma |
| Bleu de Coomassie G250 | C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂ | BIOCHEM chemopharma |
| Ethylène Diamine Tetraacétique Acide di-sodium (EDTA) | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ 2H ₂ O | BIOCHEM chemopharma |
| Azoture de sodium | NaN ₃ | BIOCHEM chemopharma |
| 1-Butanol 99.9 % | C ₄ H ₁₀ O | HONEYWELL |
| Ethanol 96 % | C ₂ H ₅ OH | HONEYWELL |
| Chlorure de Sodium | NaCl | SIGMA-ALDRICH |
| Di-sodium hydrogène phosphate anhydre | Na ₂ HPO ₄ | SIGMA-ALDRICH |
| Sodium dihydrogène phosphate anhydre | NaH ₂ PO ₄ | SIGMA-ALDRICH |
| Gel d'agarose-héparine | - | SIGMA-ALDRICH |
| Potassium phosphate Dibasique | K ₂ HPO ₄ | SIGMA-ALDRICH |

1.1.3. Appareillage

Agitateurs magnétique (HANNA / Stuart), micro-centrifugeuse réfrigérée (Hettich ZENTRIFUGENMIKRO 200 R), balance normale (Scout SE-OHAUS), balance de précision (KERN-ABJ, Max 220 g - Min 10 mg), pH mètre (checker by HANNA), microplaque THERMO scientific, pompe (Masterflex L / S) et une colonne de chromatographique.

1.2. Méthodes

1.2.1. Purification de la XOH

La purification de la XOH est réalisée selon la méthode de Baghiani et *al.* (2003) avec quelques modifications. Toutes les sous opérations sont effectués à 4 °C.

Une précipitation différentielle a été fait par l'ajout de SA 15 % (p / v) au lait humain / bovine, le mélange a été incubé sous agitation douce pendant 1 h 30 min puis centrifugé à 14000 rpm pendant 40 min, le surnageant récupérée a été précipitée par l'ajout progressive de SA 20 % (p / v) sous agitation douce pendant 1 h 30 min suivi par une centrifugation 14000 rpm / 40 min, le précipité a été récupéré et dissout dans un petit volume de tampon phosphate de sodium (PBS) (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 25 mM, pH 7.8) et laissé sous agitation douce une nuit. La suspension a été dialysé 2 fois contre le même tampon pendant une nuit sous agitation douce et le dialysat a été centrifugé à 14000 rpm pendant une heure pour l'obtention d'extrait protéique brute. Les volumes utilisés dans chaque étape sont montrés dans le tableau 3.

Tableau.3. Volumes utilisés dans chaque étape de purification de la XOH.

| Etape | Echantillon initiale | Précipitation au SA 15 % | Surnageant | Précipitation au SA 20 % | Culot | Extrait brute |
|-------|-------------------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|-------|---------------|
| Vol | 50 ml | 70 ml | 64 ml | 80 ml | 14 ml | 12 ml |

Vol : volume.

L'extrait protéique brute obtenu a été soumis à une chromatographie d'affinité afin de purifier l'enzyme en utilisant une colonne contenant un gel d'agarose-héparine après avoir calibrer le débit de la phase mobile à 0.04 ml / min, la colonne a été lavée par la phase mobile (PBS 25 mM, pH 7.8) et l'élution des molécules retenues a été fait par l'augmentation de la force ionique en utilisant un tampon PBS contenant 0.4 M NaCl et la collection a été fait manuellement avec une vitesse de 1 tube / 4 min. La détection d'élution a été fait par le réactif de Bradford (RB) sur des plaques de micro-titration avec une gamme d'étalonnage de BSA, les étapes de préparation du RB sont présentées dans la figure 4 et les étapes de la purification sont résumés dans la figure 5.

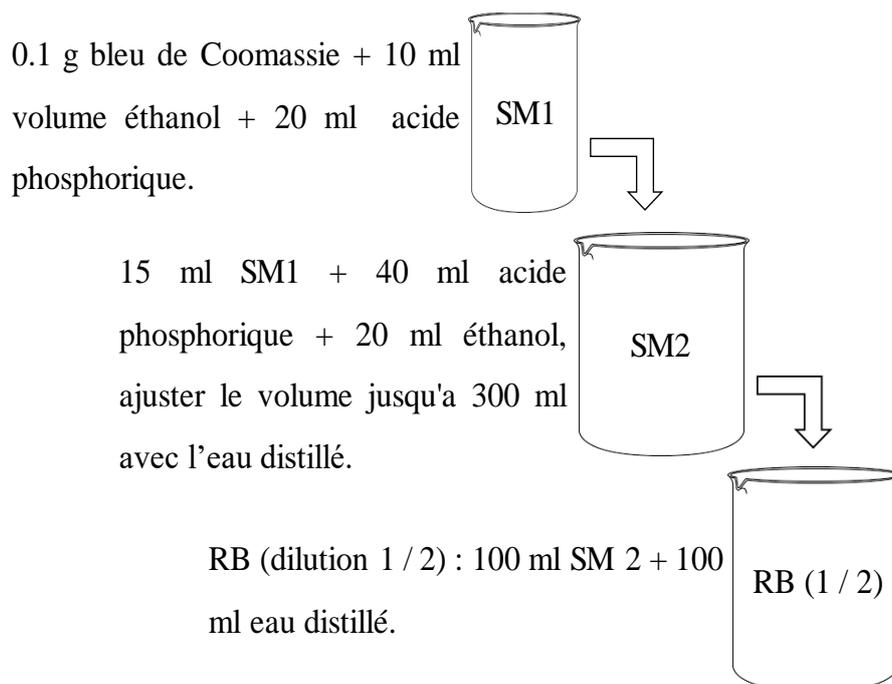


Figure.4. Etapes de préparation du RB. Une solution mère 1 (SM1) de 15 ml préparée a été utilisée pour la préparation d'une SM2 qu'est subi une dilution de 50 % afin d'obtenir un RB dilué 1 / 2. Toutes les étapes sont effectuées à l'abri de la lumière.

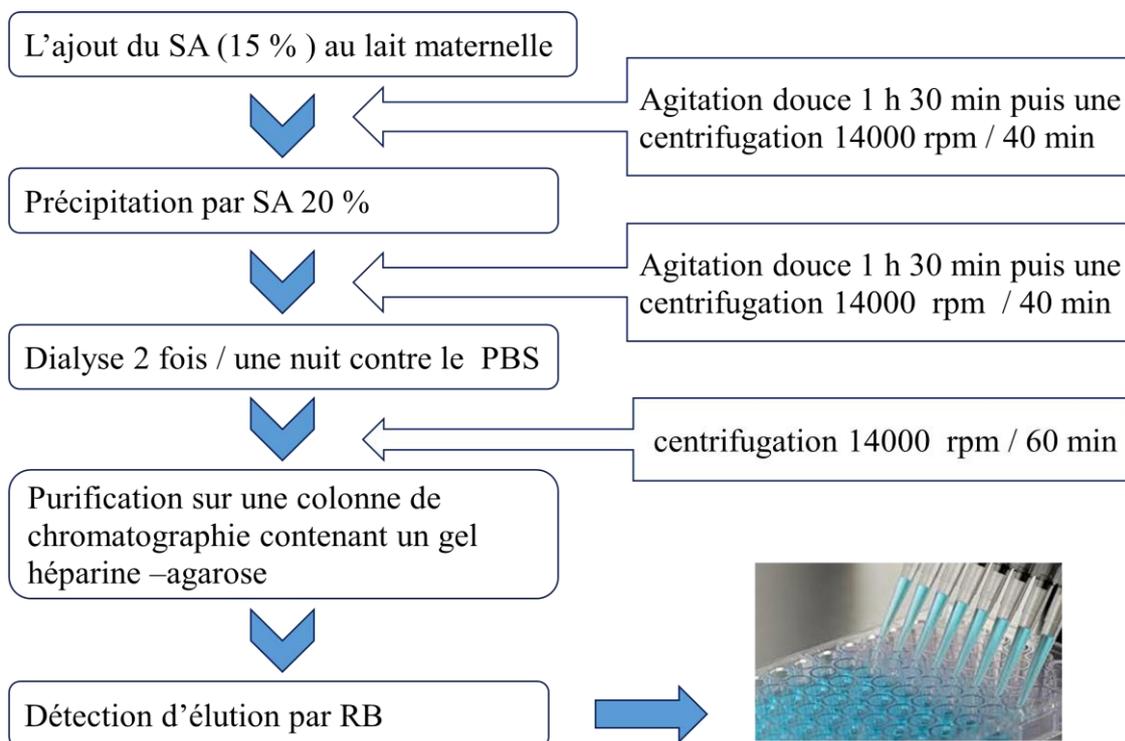


Figure.5. Etapes de purification de la XOH. Après une série de précipitation, le précipité est dialysé avant de passer dans une colonne de la chromatographie d'affinité suivi par une détection par la méthode de Bradford. Toutes les sous opérations sont effectués à 4 °C.

Partie II : Etude comparative des recherches réalisées sur la XOR

Dans notre plan de travail, nous avons voulu de purifier la XOR et l'utiliser dans la production des ACs anti-XOR, afin de détecter l'enzyme dans les sérums des personnes sains regroupés selon le sexe, l'âge et le tabagisme par la méthode d'ELISA double-sandwich, dans le but d'étudier l'influence de ces facteurs sur sa concentration.

En raison du covid-19, notre travail pratique a été cessé et pour cela nous avons fait une étude comparative des recherches réalisées sur la XOR.

2.1. Matériel

A cause de la variabilité des recherches, tous le matériel biologique, l'appareillage et les produits chimiques utilisés dans les travaux analysés dans la purification, la production d'antisérum ou bien le dosage de la XOR sont illustrés dans l'annexe 2.

2.2. Méthodes analysées

2.2.1. Purification de la XOR

Afin de mieux présenter notre travail, nous avons fait une comparaison entre deux protocoles de purification de la XOR à partir de lait humain, le premier réalisé par Sanders et ses collaborateurs (1997) et qu'est suivi par Martin (2004), Al-Muhtaseb (2012) et leurs collaborateurs et le deuxième par Battelli et ses collègues (1999).

La figure 6 représente un résumé des étapes principaux et commun entre les deux, toutes les méthodes d'isolement utilisent la crème comme matériel de départ laquelle subie d'une précipitation par SA, le précipité obtenue est dialysé pendant une nuit contre un tampon adapté avant d'appliquer sur une colonne de chromatographie suivie par une dialyse pendant une nuit.

L'enzyme purifié est répartie dans des éppendorfs et conservée généralement à -20 °C. Selon Kostić et ses collègues (2015), la pureté d'enzyme est vérifiée en mesurant le rapport A_{280} / A_{450} et la mesure de s'activité s'effectuée dans un tampon généralement de pH 7.4 à 25 ou 37 °C, la période d'incubation est réalisée par différents auteurs de 15 à 30 min. La détermination spectrophotométrique basé sur la mesure de la production d'AU à partir de la xanthine ou substrat d'hypoxanthine à environ 295 nm dans des conditions aérobiques.

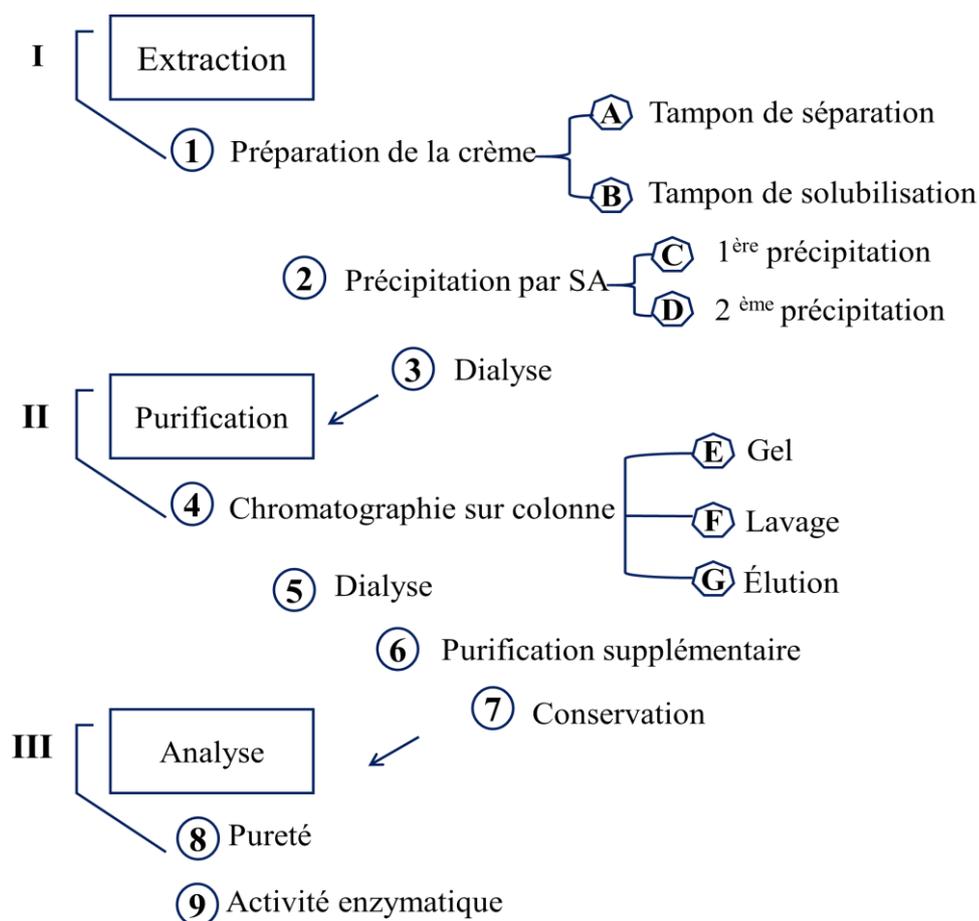


Figure.6. Résumé des protocoles choisis de la purification de la XOR. Les protocoles divisés en trois étapes essentielles, extraction puis purification et enfin l’analyse. Tous les étapes sont effectuées à 4 °C.

Le détail des étapes mentionnées dans la figure 6 est illustré dans le tableau 4 avec des points de différence entre ces techniques.

Tableau.4. Quelques protocoles de purification et des points de différence entre les techniques.

| Auteurs | | Sanders et al (1997) Martin et al (2004) Al-Muhtaseb et al (2012) | Battelli et al (1999) |
|---------|---|--|--|
| Etapes | | | |
| I | 1 | A | EDTA (1 mM), fluorure de phényl méthyl sulfonyle (PMSF) (0.1 mM) et salicylate de sodium (1.25 mM). |
| | | B | K ₂ HPO ₄ (0.2 M), contenant EDTA (1 mM), PMSF (0.1 mM), salicylate de sodium (1.25 mM). Butanol. |
| | 2 | C | 15 %. |
| | | D | 20 %. |
| | 3 | Tampon A : PBS (25 mM) de pH 7.4 contenant EDTA (1 mM) et PMSF (0.1 mM). | Tampon B : PBS (0.2 M) de pH 6. |

| | | | | |
|-----|-----------------------|---|--|---|
| II | 4 | E | Héparine insolubilisé sur agarose réticulé à 4 % (Sigma), équilibré par le tampon A. | Hydroxyapatite (HA) (Clarkson, Williamsport), équilibrée par le tampon B. |
| | | F | Tampon A + 0.1 M de NaCl. | Tampon B. |
| | | G | Tampon A + 0.4 M de NaCl. | Tampon B + 0.5 % (p / v) de SA. |
| | 5 | Na / Bicine (50 mM) de pH 8.3 contenant NaCl (50 mM). | ND. | |
| | 6 | | Filtration à travers un filtre de seringue (0.22 µm). | Précipitation par SA (55 %). |
| | | | Application à un piège Hi-Trap équilibré colonne échangeuse d'ions mono-Q (Pharmacia) pour FPLC et élution avec Na / Bicine de (50 mM) de pH 8.3, suivie d'une augmentation du gradient de sel (0.05 à 1.0 M NaCl) dans le tampon. | Filtration sur gel sur une colonne de Sephadex G25 grossier (Pharmacia LKB Biotech), équilibrée avec H ₂ O a pH 9. L'éluat a été appliqué sur une colonne DE 52 (Whatman) équilibrée avec KOH et l'élution avec KH ₂ PO ₄ (0 - 0.1 mM) dans KOH. |
| | | Dialyse contre Na / Bicine (50 mM), pH 8.3. | Précipitation par SA (55 %) et dialyse par PBS (0.02 mM) de pH 7.5. | |
| 7 | Azote liquide -80 °C. | -20°C | | |
| III | 8 | Mesure de rapport A ₂₈₀ / A ₄₅₀ | Mesure de rapport A ₂₈₀ / A ₄₅₀ | |
| | 9 | Détection de la production d'AU par spectrophotométrie à 295 nm, à 37.0 ± 0.2 °C en air saturé par Na / Bicine (50 mM, pH 8.3) contenant 100 µM de la xanthine. | Détection de la production d'AU par spectrophotométrie à 292 nm à 28 ° C. | |

I : extraction ; II : purification ; III : analyse ; 1 : Préparation de la crème ; 2 : Précipitation par SA ; 3 : Dialyse ; 4 : Chromatographie sur colonne ; 5 : Dialyse ; 6 : Purification supplémentaire ; 7 : Conservation ; 8 : Pureté ; 9 : Activité enzymatique ; A : Tampon de séparation ; B : Tampon de solubilisation ; C : 1ère précipitation ; D : 2^{ème} précipitation ; E : Gel ; F : Lavage ; G : Éluion ; DE 52 : nom commercial de cellulose diéthylaminoéthyle (DEAE-C) ; FPLC : Chromatographie liquide de protéine rapide ; KOH : hydroxyde de potassium ; ND : non définie.

2.2.2. Purification des ACs polyclonaux anti-XOR

Dans notre travail pratique prévu pour ce mémoire (Partie I), nous avons purifié la XOR afin de la mettre dans une préparation antigénique et la production d'antisérum anti - XOR qui devait être purifié pour avoir des ACs primaires utilisés dans le dosage de cette enzyme par la méthode ELISA double sandwich. Puisque tout le travail a cessé, nous avons sélectionné deux méthodes de production des ACs polyclonaux anti-XOR ((Sullivan et *al.*, 1982) et (Battelli et *al.*, 1999)) et notre attention a attirée sur la manière de travail par eux, y compris la stimulation immunitaire, l'extraction des ACs et enfin l'analyse qu'est très importante à cette étape.

Pour obtenir des ACs polyclonaux anti - XOR, généralement des lapins de nouvelle Zélande sont immunisés à plusieurs reprises sous-cutanées avec une préparation d'antigène

(Ag) qu'est la XOR et un adjuvant, afin d'augmenter la réponse immunitaire. la plupart des cas l'adjuvant utilisé dans la première injection est l'adjuvant complet de Freund (ACF) comme le montre la figure 7, tandis que dans les injections suivantes se font par l'adjuvant incomplet de Freund (AIF).

Lorsque la production d'ACs devient importante, le sang des lapins est récupéré par plusieurs méthodes : décaptage, veine d'oreille et ponction cardiaque. Après le prélèvement, le sang est laissé coaguler avant centrifuger afin d'obtenir l'antisérum pour la purification des ACs au laboratoire. La purification des ACs anti-XOR passe par différentes étapes débutant par une précipitation différentielle de SA (33 %), passant par une dialyse contre un tampon idéal et terminant par une chromatographie d'immuno-affinité avec une phase stationnaire qui présente une affinité vis-à-vis la XOR (avec ou sans bras espaceur).

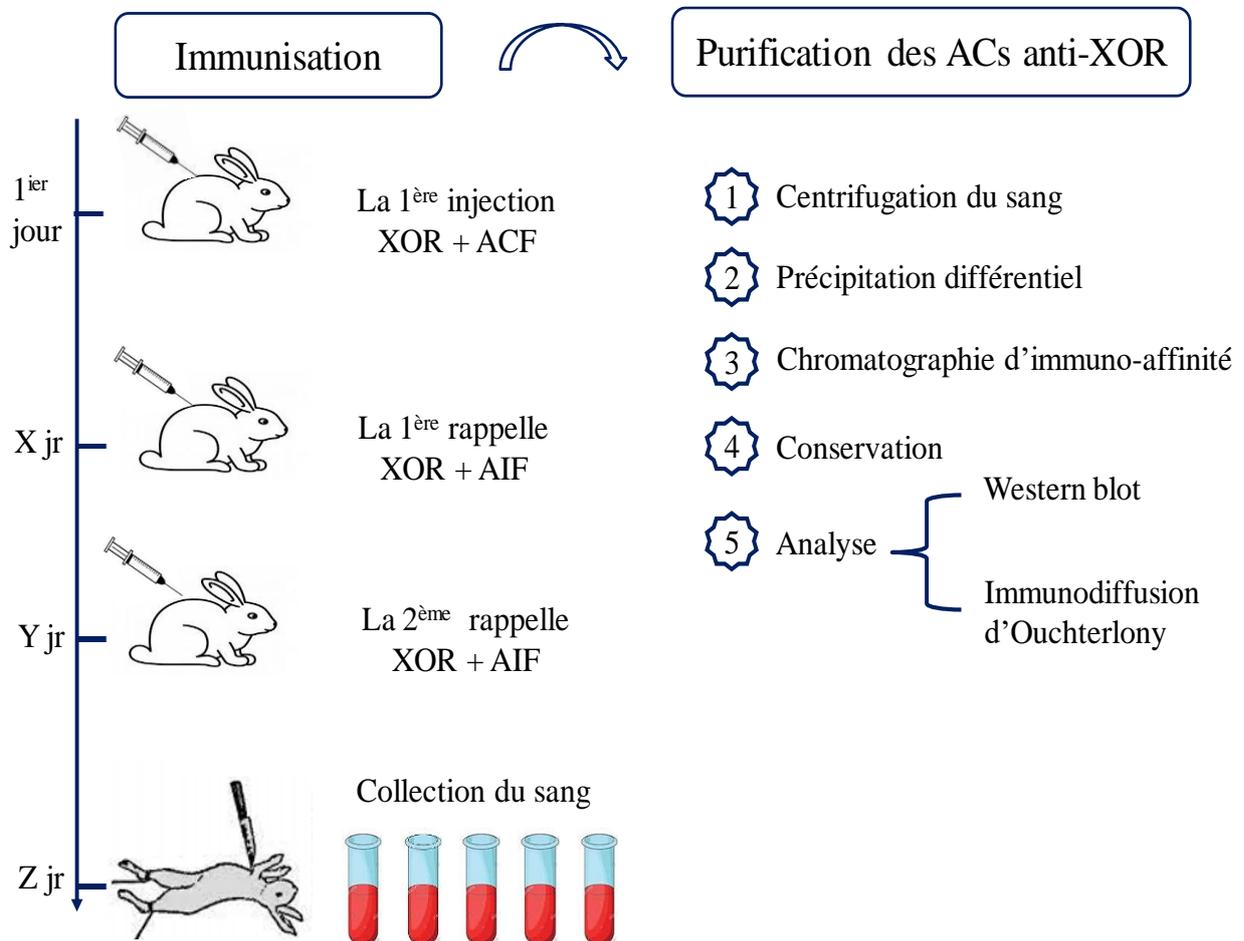


Figure.7. Production et purification des antisérums anti-XOR. Deux étapes essentielles l'immunisation des lapins puis la production des ACs anti-XOR.

Le tableau suivant présenté le détail des étapes montrés dans la figure 7 avec la différence entre les deux protocoles choisis.

Tableau.5. Production des ACs polyclonaux anti-XOR.

| Protocole | Battelli et <i>al.</i> , 1999 | Sullivan et <i>al.</i> , 1982 |
|-----------------------------------|--|--|
| Animaux | Lapins de Nouvelle-Zélande mâles, pesant 2 à 3 kg. | Lapins blancs de Nouvelle Zélande. |
| Voie d'administration | Sous-cutanée. | Plusieurs sites près des ganglions lymphatiques axillaires. |
| Dose | - XOH (650 µg, pureté = 5.4) dans l'ACF (1 ^{ère} injection). - XOH (350 µg) dans l'AIF. | - XOB de (200 µg, pureté = 4.8) dans l'ACF (1 ^{ère} injection) et l'AIF dans la 2 ^{ème} injection. |
| Rappelle | 2 fois chaque 3 semaines. | 2 fois chaque 10 jours. |
| Collection du sang | D'une incision d'oreille à 5 jours d'intervalle après la 2 ^{ème} injection. Le sang laissé coagulé 1 h à T° ambiante puis 12 à 18 h à 4 °C. | Du veine d'oreille pendant plusieurs jours, après 10 jours de l'injection finale. |
| Centrifugation | 1500 g pendant 5 min à 4 °C. | ND. |
| Précipitation différentiel | ND. | ND. |
| Chromatographie d'immuno-affinité | Gel | Sépharose 4B activée par CNBr (Pharmacia LKB Biotech) et couplé à des PSH. |
| | Elution | PBS (0.005 M, pH 7.5), contenant NaCl (0.5 M), 20 ml / h. |
| | | Tris / HCl (40 ml, 0.1 M, pH 7.5) contenant 3 M NaSCN. |
| Conservation | A -20 °C. | Traité par les inhibiteurs des protéases. |
| Analyse | Western blot | Immunodiffusion d'Ouchterlony |

ND : non définie ; NaSCN : Thiocyanate de sodium ; PSH : protéines sériques humaines ; T° : température ; Tris / HCl : Tris Hydrochloride.

La spécificité des ACs anti-XOR purifiés est tester par les méthodes montrées dans le tableau précédant.

2.2.2.1. Western blot

Battelli et ses collègues (1999) ont testé la spécificité de l'antisérum produit vis-à-vis la XOH par immunoblotting. Les échantillons ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose après SDS - PAGE à 7.5 %. Tout supplémentaire capacité de liaison sur la nitrocellulose a été bloquée en utilisant 0.1 % de caséine. Les protéines immobilisées ont détecté par des ACs primaires contenant antisérum du lapin et ACs secondaires biotinylés anti-lapin (Sigma). Les immun précipités ont localisés par extravidine peroxydase conjuguée (Sigma) et incubé avec du 4-chloro-1-naphtol pour développement de la couleur.

2.2.2.2. Immunodiffusion d'Ouchterlony

La technique de double immunodiffusion est utilisée pour la détection de spécificité d'ACs vis-à-vis d'Ag dans les immuno-sérums, les fractions chromatographiques et les fractions cellulaires et pour obtenir des informations si les deux Ag sont identiques ou différents ou peuvent partager des déterminants antigéniques communs. Dans cette technique, l'Ag et l'AC se diffusent l'un vers l'autre à travers l'agarose poreux. Une couche d'épaisseur de 2 mm du gel d'agarose est préparée sur une lame de verre rectangulaire. Les puits circulaires (qui sont 10 à 15 mm d'intervalle) sont perforés dans le gel d'agarose. L'Ag et l'AC se diffusent, s'ils reconnaissent les uns aux autres (sont spécifiques), ont tendance à former des complexes immuns insolubles (précipité) qui apparaît comme une bande laiteuse (ligne / bande de précipitation) cela peut être vu à l'œil nu. La bande de précipitation apparaît à un point d'équivalence où la concentration d'Ag et l'AC spécifique est équivalent. Les protéines non précipitées peuvent être lavées. La bande de précipité peut être rendue visible par la fixation et la coloration avec Amido noir ou Blue de Coomassie Brillant R-250 (Basha, 2020). La méthode nécessite 6 à 48 heures pour la détection d'une réaction spécifique Ag - AC. Le gel est ensuite coloré et décoloré jusqu'à ce que les lignes de précipitation soient visibles au maximum (Hornbeck, 1991).

Sullivan et ses collaborateurs (1982) ont testé la spécificité des ACs anti-XOB purifiés par la technique de double immunodiffusion sur un gel d'agarose (Figure 8), la XOB dans le puits central (cw), les ACs contre MFGM dans les puits 1, 2, 3 et les ACs spécifiques purifiés par affinité contre XOB dans les puits 4, 5, 6.

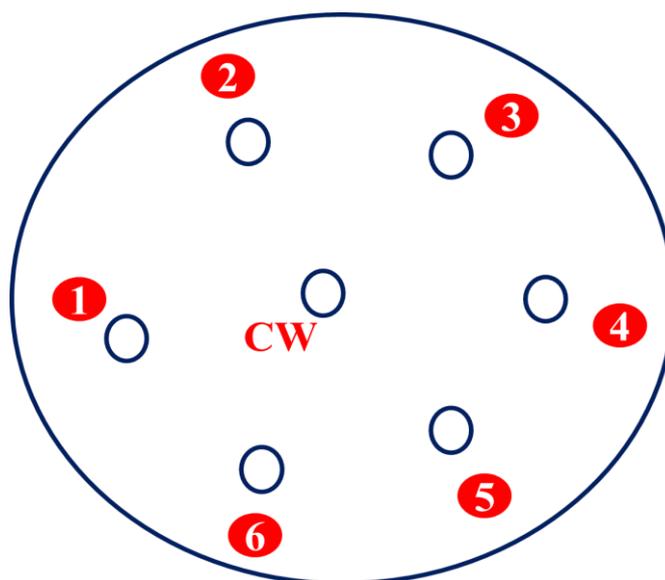


Figure .8. Double immunodiffusion d'Ouchterlony.

2.2.3. Dosage de la XOR

Nous avons voulu de doser la XOR dans le sang des personnes sains par une méthode ELISA double sandwich, mais à cause de la raison mentionné au-dessus, nous avons pris la décision de faire une collection des techniques utilisés pour ce dosage, afin de faire une étude comparative entre l'ELISA double sandwich et ces techniques et par suite la détection du taux de la XOR dans des différent caractéristiques cliniques et mettre en évidence s'implication dans ces situations quelques soit physiologiques ou bien pathologiques., le tableau 6 représente les différentes méthodes du dosage de cette enzyme suivie par quelques chercheurs.

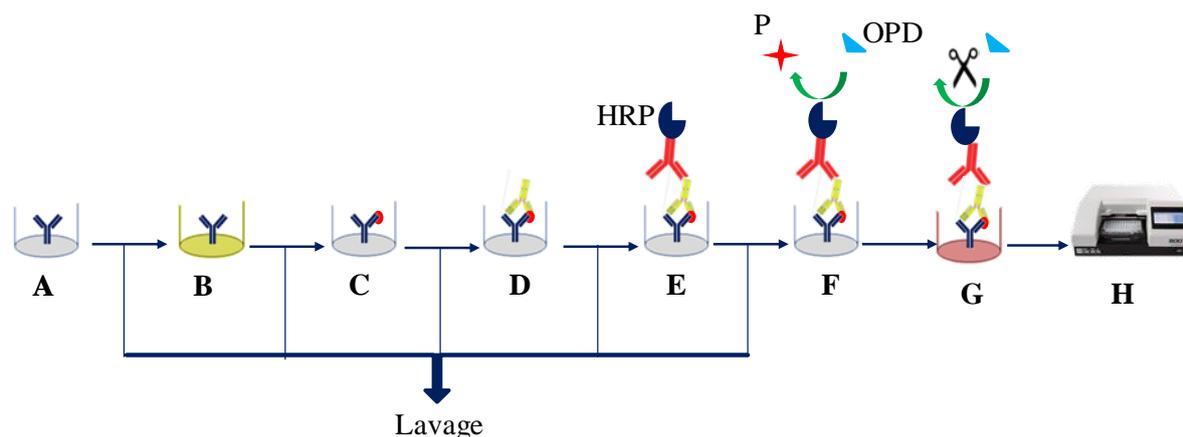
Tableau.6. Différentes techniques du dosage de XOR.

| L'auteur | Catégories traités | Techniques |
|----------------------------|---|-------------------------------|
| (Hanachi et al., 2009) | Polyarthrite rhumatoïde Hydarthrose Hémarthrose et autres inflammations | ELISA double-Sandwich |
| (Battelli et al., 1999) | Maladie hépatique | Elisa compétitive |
| (Giler et al., 1975) | Jaunisse hémolytique | Radiométrie |
| (Mchale et al., 1979) | Maladie rénale | Fluorimétrie |
| (Miesel et Zuber, 1993) | Maladies rhumatiques | Chimiluminescence |
| (Yamamoto et al., 1996) | Goutte | HPLC |
| (Raghuvanshi et al., 2007) | Infarctus du myocarde | Spectrophotométrie UV-Visible |
| (Isik et al., 2016) | Syndrome des ovaires poly-kystiques. | Colorimétrie |
| (Meijer et al., 2018) | Variation inter-individuel (sexe). | |

2.3.1. ELISA double – Sandwich

Pour quantifier la XOR, l'antisérum dilué (1 / 20), a été incubé dans une microplaque à 96 puits. Un liquide synovial (SF) a été ajouté à chaque puits et la XOR a été détecté avec des ACs humains purifiés par affinité anti-XOH. Après application des ACs anti-IgG du lapin marqué à la peroxydase de raifort (HRP), le substrat Orthophénylène diamine (OPD) a été ajouté, dans l'obscurité, la réaction a été arrêté après 10 - 20 minutes avec 50 µl acide sulfurique (H₂SO₄) (2 N).

Une concentration connue de la XOR a été utilisé pour construire une courbe standard (Hanachi et al., 2009). Les différentes étapes de cette technique sont résumées au-dessous dans la figure 9.



- A** : Adsorption des ACs anti – XOH. **E** : Ajout des ACs anti IgG du lapin conjugué à la HRP.
B : Blocage des sites libres. **F** : Ajout de substrat OPD.
C : Addition de SF. **G** : Arrêt de réaction par H₂SO₄.
D : Ajout des ACs primaire anti – XOH. **H** : Lecture de plaque à 492 nm.

Figure.9. Etapes d'ELISA double sandwich.

2.3.2. ELISA compétitive

Deux séries d'expériences sont effectuées en parallèle, le premier ensemble d'expériences suit le protocole d'ELISA indirect, tandis que l'expérience parallèle introduit des ACs primaires, qui sont déjà couplés avec des Ag via une incubation préalable. En fonction de la concentration de l'Ag dans la solution d'incubation, certaines parties des ACs restent non liées. Lorsque ces complexes sont ajoutés aux puits revêtus d'Ag, il y aura moins de chance pour les ACs primaires de réagir avec les Ag, car leurs sites de liaison sont préoccupés. Cette expérience en compétition avec la première série d'expériences (où les ACs ne sont pas pré-couplés avec des Ag) fournit un résultat de détection comparatif. Le signal reçu des ACs pré-couplés est inversement corrélé à la présence de l'analyte d'intérêt. Ce test est long, fastidieux et consomme de grands volumes d'échantillons. Néanmoins, il offre un haut degré de spécificité (Hosseini et *al.*, 2018).

La XOH (5 µg / ml) est adsorbé sur des plaques de micro-titrage dans un tampon de carbonate de sodium (Na₂CO₃) (0.05 mol / l, pH 9.6), et ont laissées pendant une nuit à 4 °C. Après avoir lavé deux fois (200 µl / puits) par PBS (pH 7.5) contenant 0.05 % de Tween 20 (v / v) (PBS - Tw 20), le blocage des sites libres est réalisé avec 200 µl / puits de BSA (1 %) ou de la caséine ou du sérum de veau fœtal (15 %) dans le PBS-Tw 20, pendant 1 h à 37 °C, pour réduire la liaison non spécifique, et ont lavés deux fois comme ci-dessus. Une courbe de compétition standard a réalisée avec des quantités scalaires de XOH et de sérum de lapin anti-XOH dans un volume final de 100 µl (ajusté avec du PBS-Tween). Après 3 h à 37 °C, les

plaques ont lavées cinq fois comme ci-dessus et incubées avec phosphatase alcaline conjugué (Sigma) anti - lapin 100 μ l / puits pendant 1 h à 37 °C et dilué de manière appropriée dans du PBS - Tween. L'étape de lavage a été répétée cinq fois et 100 ml d'une solution de substrat fraîchement préparée 4-nitrophényl phosphate (1 mg / ml) dans le tampon diéthanolamine (1 mol / l, pH 9.8) ont ajoutés et incubés à 37 °C pour le développement de la couleur. La réaction a été arrêtée avec hydroxyde de sodium (NaOH) (0.1 mol / l, 100 μ l / puits) et l' A_{450} a mesuré avec un lecteur de microplaques Biorad modèle 450. La détermination du sérum XOR a réalisée en mélangeant 50 μ l du sérum humain à tester avec du sérum anti - XOR de lapin dans le test décrit ci-dessus. La courbe standard a exécutée en présence de 50 μ l de sérum humain normal groupé, qui contient des quantités négligeables de XOR, et a ajoutée pour contrôler la désorption de l'Ag par 50 % de sérum humain, et le temps plus long consécutif pour le développement de la couleur. La récupération des molécules XOR par ELISA compétitif a testée en ajoutant des quantités scalaires de l'enzyme humaine pour contrôler des échantillons de sérum humain et en comparant les résultats à la courbe standard (Battelli et *al.*, 1999).

2.3.3. Radiométrie

Le sérum (100 μ l) est incubé avec un tampon PBS (250 μ l, 0.04 M, pH 8), contenant [8- 14 C] hypoxanthine (10 nmol, 25 mCi / mmol), à 37 °C pendant 3 heures. La réaction est stoppée par l'addition d'acide perchlorique (HClO₄) (100 μ l, 20 %). Les tubes ont mis dans l'H₂O bouillante pendant 15 minutes puis refroidis, centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes et les bases puriques libres dans le surnageant sont séparées en présence de supports par chromatographie en couche mince sur cellulose microcristalline (Avicel ®) en utilisant n-butanol : méthanol : H₂O : hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) 25 % (60 : 20 : 20 : 1, v / v) comme solvant dans la phase mobile.

Les purines ont été localisées sur le chromatogramme sous une lumière ultraviolette et la tâche d'AU est grattée, mise en suspension dans une solution de Bray et la radioactivité a été comptée dans un compteur à scintillation liquide Packard Tricarb modèle 3380. L'activité de l'enzyme est exprimée en unités / litre (U / l), une unité étant la quantité d'enzyme catalysant l'oxydation de 1 nmol d'hypoxanthine en AU dans une heure à 37 °C (Giler et *al.*, 1975).

2.3.4. Fluorimétrie

Dans les dosages fluorescents, l'enzyme convertit le substrat en produit final appelé fluorophores (généralement des hydrocarbures polyaromatiques ou hétérocycles). Les

fluorophores sont excités par la lumière d'une longueur d'onde spécifique et émettent de la fluorescence lorsqu'ils reviennent à l'état d'énergie d'origine. Les unités de fluorescence enregistrées sont généralement proportionnelles à la concentration de l'analyte d'intérêt. En comparaison avec le test colorimétrique, un test fluorescent est plus sensible. Cependant, il produit typiquement un signal de fond plus élevé en raison de la nature sensible du dosage fluorescent (Hosseini et *al.*, 2018). L'activité de la XOR a mesurée en surveillant la conversion du substrat 2-amino-4-hydroxypteridine au produit fluorescent 2-amino-4,7-dihydroxypteridine, en utilisant un spectrophotomètre à fluorescence Perkin-Elmer (modèle MPF-3) équipé d'un porte-cuve thermostaté et d'un enregistreur continu. La sensibilité était augmentée et que les valeurs de blanc diminuaient en réglant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission à 338 nm et 370 nm respectivement. Les mélanges réactionnels (volume final 3 ml) contenaient PBS (0.05 M, pH 7.8), EDTA (0.1 mM), substrat (4.5 μ M), sérum traité (0.2 ml) et quand c'est nécessaire par bleu de méthylène (0.33 mM). De tels mélanges ont été incubés à 30 °C habituellement pendant 1 heure, lorsque plusieurs échantillons devaient être analysés comme ce serait le cas en utilisation courante, les mélanges réactionnels ont mis à bouillir dans un bain-marie dans des tubes fermés recouverts d'une feuille d'aluminium de manière à empêcher la dégradation induite par la lumière du produit fluorescent. L'échelle du fluoromètre a fixée à 100 °, en utilisant une solution quinine de sulfate (16 nM dans 1 N (H₂SO₄)). La quantité de substrat convertie en produit en unité de temps est déterminée, la concentration de protéine dans les échantillons de sérum a mesurée par la méthode de biuret (Mchale et *al.*, 1979).

2.3.5. Chimiluminescence

Dans le cas des dosages immunologiques luminescents, l'enzyme convertit le substrat en un produit de réaction qui émet des photons lumineux, lorsqu'il revient d'un état excité électroniquement à l'état d'origine. Différents types de dosages luminescents, y compris la chimioluminescence. La lumière produite par une réaction chimique (principalement l'excitation par oxydation et formation d'intermédiaires de catalyse) entraîne une chimioluminescence, qu'est largement utilisée pour divers types de dosages immunologiques. En raison de la nature hautement sensible des composés luminescents, de tels dosages aboutissent à des signaux considérablement améliorés. Connue comme la technique de détection la plus sensible, la détection luminescente bénéficie d'une émission lumineuse intense et prolongée, d'un faible signal de fond, ainsi que d'une multiplication et d'une amplification du signal. La luminescence est mesurée en unités de lumière relative (RLU),

généralement proportionnelles à la concentration de l'analyte d'intérêt (Hosseini et *al.*, 2018). La XO a été déterminée par chimioluminescence, 1 ml contenant : sérum (100 µl), xanthine (100 µM), lucigénine (200 µM), acide diéthylène-triamine-penta-acétique (DTPA) (10 µM) dans un acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (100 µM, pH 7.4). La génération de O²⁻ a été surveillée dans un chimiluminomètre Berthold LB 953 C à 37 °C de 15 min et intégré. La XOR purifié par chromatographie est utilisé pour l'étalonnage, une unité de XOR convertit 1 µmol de xanthine en AU par minute (Miesel et Zuber, 1993).

2.3.6. HPLC

Le système HPLC se composait d'un appareil HPLC LC-6A (Shimadzu, Kyoto, Japon), d'un moniteur à fluorescence (RF 530, Shimadzu) et d'un enregistreur Chromatopac C-R3A (Shimadzu). La phase mobile était un tampon (KH₂PO₄ / K₂HPO₄, 20 mM, pH 2.2), le débit était de 1 ml / min et les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement de 345 et 410 nm. Une colonne Wakosil 5C18-200 (200 x 4.6 mm I.D.) (Wako) a été utilisée à température ambiante. Une courbe d'étalonnage linéaire pour l'isoxanthoptérine obtenue entre 1 nM et 250 nM. Le sang est collecté à partir des sujets dans des tubes à essai de 10 ml contenant EDTA puis immédiatement centrifugé à 1700 g, 10 min, 4 °C pour l'isolement du plasma. Après une pré-incubation de 5 min à 37 °C de tampon Tris-HCl (240 µl, 0.2 M, pH 9) contenant 113 µmol ptérine, la réaction enzymatique initiée par l'ajout de 60 µl de plasma. Après incubation de 240 min, 100 µl de mélange réactionnel ont été prélevés et ajoutés à des tubes de 1.5 ml contenant HClO₄ (100 µl, 4 %). Le mélange obtenu est mis sous une forte agitation et puis centrifugé à 15000 g (Modèle RM150, Tomy Seiki, Tokyo, Japon). Une portion de 150 µl du surnageant est neutralisé par carbonate de potassium (K₂CO₃) (6 µl, 5 M) et 20 µl du surnageant neutralisé ont été injectés dans la colonne. L'activité de la XOR plasmatique était mesurée en double et exprimée en picomoles de isoxanthoptérine produite par heure et par millilitre (pmol / h / ml) (Yamamoto et *al.*, 1996).

2.3.7. Spectrophotométrie UV-Visible

Le mélange d'essai de 3 ml était constitué d'un tampon Tris-HCl (0.3 ml, 50 mM pH 7.4), de sulfate de cuivre (CuSO₄) (0.3 ml, 10 mM), de xanthine (0.05 ml, 2.58 mM / ml) dans un tampon glycine (0.05 M, pH 7.4) et sang dilué (0.1 ml) et d'H₂O pour compléter le volume. Le changement d'absorbance a été enregistré à 290 nm à 15 secondes d'intervalle pendant une minute. L'unité d'activité a été définie comme un changement d'absorbance à 290 nm dans une minute par 1 ml d'une préparation enzymatique. Les protéines ont été

estimées par la méthode de Lowry en utilisant le réactif de folin du phénol et le BSA a été utilisée comme un standard (Raghuvanshi et *al.*, 2007).

2.3.8. Colorimétrie

Les niveaux de XOR ont été mesurés avec un test colorimétrique à 570 nm à l'aide de l'Amplex ® Red Xanthine / XO AssayKit (A22182, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le H₂O₂ et en présence de peroxydase, il réagit avec le réactif Amplex ® Red pour générer le produit d'oxydation fluorescent rouge résofurine, l'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en XOR et les résultats ont été calculés selon les normes (mU / ml). La limite inférieure de détection de ce kit était de 1 µU / ml / heure, la limite inférieure de quantification était 2 µU / ml / heure. L'activité de la XOR a été exprimée en µU / ml / heure (Isık et *al.*, 2016 ; Meijer et *al.*, 2018).

Chapitre 3

Résultats et discussion

Partie I : Travail pratique réalisé

1.1. Purification de la XOH

Comme les enzymes répandues l'isolement de la XOR à partir des différentes espèces, implique l'extraction de l'enzyme à partir d'une large gamme de matériaux : bactéries (Xin et *al.*, 2012), organes (Krenitsky et *al.*, 1986), lait de vache (Waud et *al.*, 1975), de chèvre (Atmani et *al.*, 2004), de chamelle (Baghiani et *al.*, 2003) et de lait humain qui nous intéresse dans ce travail.

1.1.1. Précipitation différentielle par SA

Il était courant de faire un fractionnement par le SA comme agent précipitant avant de faire une méthode de purification des protéines sophistiquée (Purwanto, 2016). L'utilisation de ces sels à une concentration spécifique pour les protéines, diminue leur solubilisation et favorise leur précipitation.

Lorsque la concentration en sel est augmentée, une partie des molécules d'H₂O est attirée par les ions salins, ce qui diminue le nombre de molécules d'H₂O disponibles pour interagir avec la partie chargée de la protéine. Les interactions protéine-protéine deviennent alors plus fortes que les interactions solvant - soluté. Par conséquent, les protéines s'associent et précipitent grâce aux interactions hydrophobes, ce processus est connu sous le nom de « salting-out » (Nioi, 2013).

Le SA est le sel de choix de précipiter les protéines à partir des solutions parce que la précipitation est due à une solubilité réduite et non à une dénaturation, les protéines granulées peuvent être facilement résolubilisé en utilisant des tampons standards (Grodzki et Berenstein, 2010).

1.1.2. Dialyse

Le précipité est ensuite dialysé contre 2 litres du tampon PBS (25 mM, pH 7.8) pendant une nuit, en utilisant une membrane semi-perméable sous une faible agitation à 4 °C, afin de diminuer tous les molécules diffusibles y compris le SA.

1.1.3. Chromatographie d'affinité

L'extrait protéique brut obtenu à partir de dialyse est purifiée par chromatographie d'affinité sur gel d'héparine - agarose, l'héparine est un polysaccharide appartient à la famille des GAG (Sarrazin, 2007) qui exprime une grande affinité au XOR (Schmidt et *al.*, 2019). La XOH est adsorbée au gel, le lavage se fait par le tampon dialyse et l'élution se fait avec le même tampon contenant 0.4 M NaCl.

1.1.4. Test de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique qui implique la liaison de bleu de Coomassie brillant G-250 aux protéines. Cette liaison provoque un déplacement du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm, Ce test est très reproductible et rapide avec le processus de liaison de colorant pratiquement complet en environ 2 min avec une bonne stabilité des couleurs pendant 1 h. Il y a peu ou pas interférence des cations tels que le sodium ou le potassium ni des glucides comme le saccharose (Bradford, 1976).

La détection a été fait manuellement par le RB (Figure 10). À l'injection la couleur est clair puis dans un certain temps elle devient plus sombre, l'apparition d'un seul pic (entourer en rouge) exprime la descende de toutes les protéines y a compris notre protéine d'intérêt la XOH. Nous pensons que le temps de lavage n'a pas été suffisant ce qu'explique l'apparition de deux pic et le deuxième pic n'a pas terminé, malgré que nous avons travaillé de manière stricte, donc nous proposons qu'il faut mettre en considération le temps de lavage pour obtenir des meilleurs résultats.

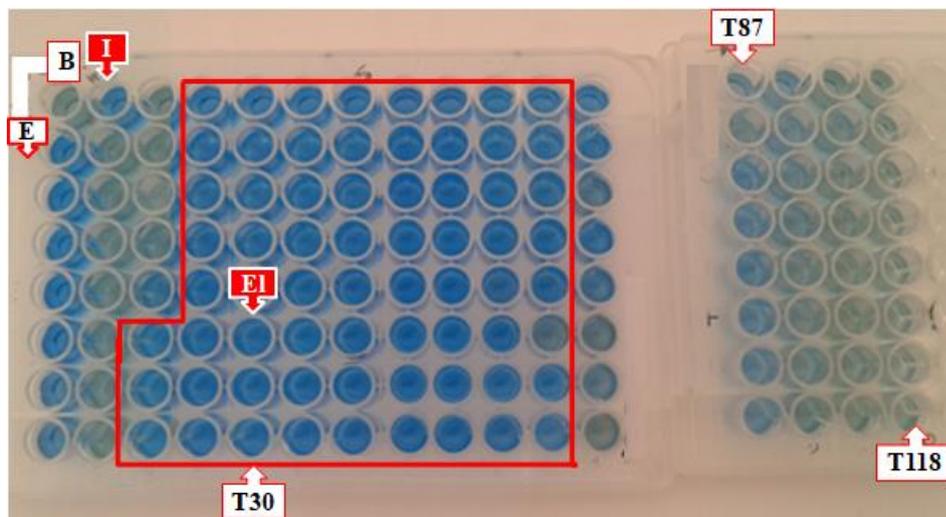


Figure.10. Test de Bradford. B (blanc) ; E (étalon) ; E1 (élution) ; I (injection) ; T (tube), l'apparition d'un 1^{er} pic encadré en rouge et le 2^{ème} n'a pas terminé.

Partie II : Etude comparative des recherches réalisées sur la XOR

2.1. Purification de la XOH

2.1.1. Extraction

2.1.1.1. Préparation de la crème

Selon Vanbergue (2017) la XOR est parmi les protéines dominantes de MFGM, donc il est certain qu'elle est liée à la crème et elle n'est pas libre dans le lactosérum (Polonovski et

al., 1949) et c'est ce qui a fait de la crème le matériel de départ d'extraction d'enzyme, selon de nombreux recherches (Benboubetra *et al.*, 1997 ; Atmani *et al.*, 2005 ; Vella *et al.*, 2014)

Le matériel membranaire peut être isolé à partir du lait selon différentes techniques, mais le rendement d'extraction et la composition des isolats obtenus dépendent fortement de la méthode utilisée. Il est donc primordial de choisir la technique d'isolement répondant le mieux aux objectifs de l'étude réalisée. Ces objectifs sont, par exemple : la sélectivité de la méthode : ceci implique l'obtention de composants membranaires exempts de contaminants (autres constituants du lait, notamment les caséines) ; le rendement d'extraction : la méthode doit alors permettre l'extraction d'un maximum de matériel membranaire ; une extraction totale des différents constituants : le matériel doit être extrait sans la moindre perte d'un quelconque élément constitutif de la membrane. Par conséquent, la crème est solubilisée dans des agents qui sont utilisés pour libérer l'enzyme des lipoprotéines membranaires (Kostić *et al.*, 2015), la figure 11 représente les différents tampons utilisés dans la séparation et la solubilisation de la crème dans les deux protocoles de purification de la XOR à comparer.

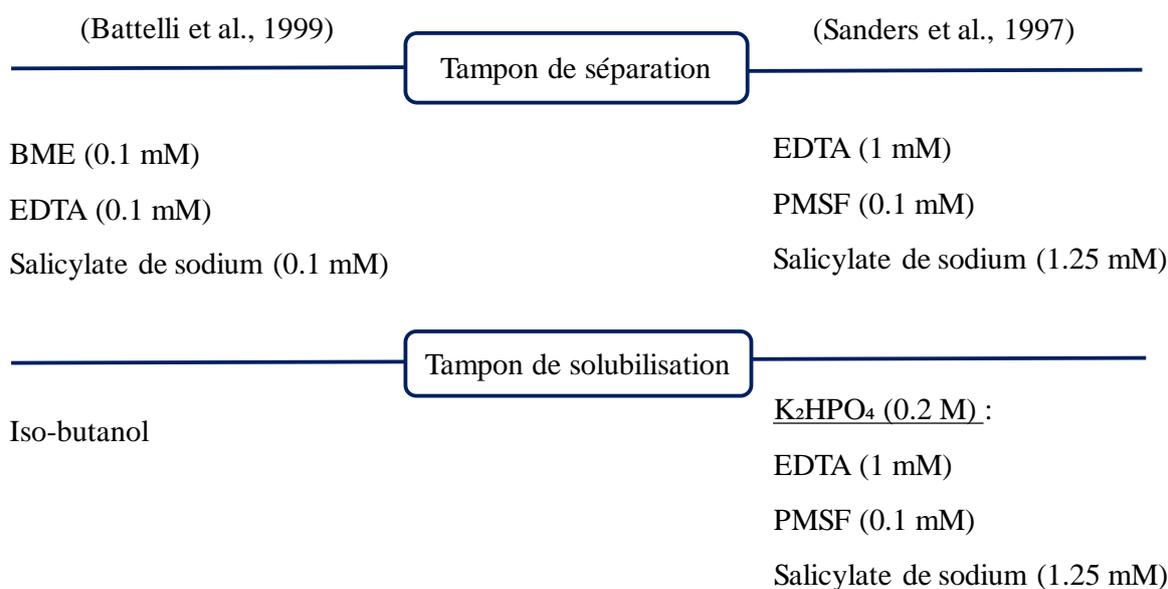


Figure.11. Tampons utilisés dans la séparation et la solubilisation de la crème.

La crème obtenue est débarrassée des constituants du lait écrémé par des simples lavages à l'aide des solutions adéquates. En effet, seuls les tampons contenant un minimum de 0.15 M de NaCl permettent l'élimination des caséines. La présence du NaCl dans les solutions lavantes permet, en outre, d'éviter une chute de la force ionique du milieu lors de la dilution des crèmes. Cette dernière entraînerait une déstabilisation précoce des globules gras et ainsi une perte de matériel membranaire. La séparation des MFGM est aisément réalisée par

centrifugation de lait non réfrigéré et non pasteurisé afin d'éviter des changements de composition au sein de la membrane (Danthine et *al.*, 1999).

Il peut être difficile d'éliminer complètement les protéases pendant la purification d'une protéine cible. Sauf si la protéine objet est complètement pure (homogène), même de petites quantités d'enzymes protéolytiques contaminantes peuvent provoquer de graves pertes d'activité il existe quatre types de protéases classés selon leur mécanismes de réaction moléculaire : la sérine, la cystéine (ou thiol), acide aminée acide (aspartate et glutamate) et métalloprotéases, l'utilisation d'EDTA dans un intervalle de concentration de 2 à 5 mM à complexer les ions métalliques divalents essentiels à l'action des métalloprotéases (Ó'Fágáin, 1996), nous remarquons que Sanders et ses collaborateurs ont utilisé une concentration d'EDTA (1 mM) dix fois plus que celui utilisé par Battelli et ses collègues (0.1 mM), les deux concentrations sont inférieure à l'intervalle approuvé.

Une concentration de PMSF (0.1 mM) a été ajouté aux tampons utilisés (Figure 12), le composé PMSF réagit de manière irréversible avec la sérine essentielle du site actif protéases à serine et les inactivant. Il peut également agir sur certaines protéases à cystéine (Ó'Fágáin et Colliton, 2017).

Le groupe thiol de la cystéine est sujet à des réactions oxydatives destructrices, l'utilisation de BME comme un agent réducteur peut les prévenir ou les minimiser (Ó'Fágáin, 2011), c'est pourquoi il a été utilisé par Battelli et ses collègues (1999) dans le tampon de séparation. En tant qu'un composé thiol, le BME est un réactif sulfhydryle puissant qui peut réduire la cystéine en cystine (Guo et *al.*, 2012).

Donc nous doutons que cette différence sera affectée sur les résultats de Battelli et ses collègues, alors nous attendons que leur préparation enzymatique est plus exposer au clivage par les métalloprotéases et le perdre d'activité enzymatique.

2.1.1.2. Précipitation différentiel par SA

Les deux protocoles sont renferme une précipitation différentielle avec une différence dans les pourcentages de SA utilisé. Ce sel est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Il est très hydrophile et compétitionne efficacement avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Les ions sulfates et ammonium sont relativement petits et peuvent facilement s'approcher des résidus chargés des protéines pour les neutraliser. Ce sel a aussi l'avantage de peu dénaturer les protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives.

Sanders et ses collaborateurs (1997) ont suivi une précipitation de 15 % puis 20 % de SA, tandis que Battelli et ses collègues (1999) ont utilisé le SA par les proportions suivant : 35 % puis 55 %, d'après ce qu'a été dit, nous attendons que le précipité obtenu par la méthode de Battelli et ses assistants (1999) soit la plus contaminant.

2.1.1.3. Dialyse

La dialyse est une méthode utilisée pour diminué la force ionique et de changer la concentration en sels d'une solution protéiques. Elle est basée sur le phénomène de diffusion à travers une membrane semi-perméable. Les molécules diffusibles vont traverser la membrane selon le gradient de concentration et la porosité de la membrane utilisée. Afin d'accélérer ce processus généralement le boudin de dialyse doit être mis sous agitation douce avec un volume de tampon plus grand que celui de la solution protéique et le changer du au minimum 2 fois / jours.

Deux tampon de dialyse utilisés le premier est le tampon A : PBS (25 mM, pH 7.4) contenant EDTA (1 mM) et PMSF (0.1 mM) par Sanders et ses collaborateurs (1997) et le deuxième est tampon B : PBS (0.2 M, pH 6) par Battelli et ses collègues (1999). Nous remarquons qu'il y a une différence dans le pH et la concentration des tampons utilisés qui va peut-être influence sur l'activité de la XOR purifié.

2.1.2. Purification

L'extrait protéique va soumis à une étape de purification en utilisant la chromatographie sur colonne dans laquelle le tampon peut être échangé, la chromatographie est une technique biophysique importante qui permet la séparation, l'identification et la purification des composants d'un mélange pour l'analyse qualitative et quantitative, les protocoles proposées au-dessus sont suivie deux types de chromatographies différentes : une de pseudo-affinité par l'utilisation d'hydroxyapatite qui est un phosphate de calcium cristallisé, Parmi ses propriétés biologiques l'attachement des protéines (Eichert et al., 2005), cette substance retient les protéines de deux façons : son calcium interagit avec les groupements acides des protéines (El Rhilassi,2014), alors que son phosphate interagit avec leurs groupements aminés (Benaziz et al., 2001), l'élution n'est pas ici faite avec un gradient de sel mais plutôt avec un gradient de phosphate (L'ajout des ions HPO_4^{2-}) pour réduire l'adsorption des acides aminées (El Rhilassi,2014),ce type de est suivi par Battelli et ses collègues (1999) et l'autre d'affinité (Sanders et al., 1997) où la purification a été basée sur l'interaction spécifique entre la XO et l'héparine, selon (Cantu-Medellin et Kelley, 2013 ; Lytvyn et al., 2015), la liaison à l'héparine est apparemment électrostatique (Adachi et al., 1993). L'héparine qui fait un

complexe avec la XO est attaché au support solide (résine), et retenu dans la colonne, alors que les protéines libres quittent la colonne, puis l'enzyme éluée en changeant sa force ionique par modification du pH ou l'ajout d'une solution saline (Coskun, 2016).

Les deux chercheurs ont met une purification supplémentaire dans laquelle le premier Sanders et ses collègues (1997) a fait une filtration de l'éluât à travers un filtre de seringue (0.22 μm) puis une FPLC où l'éluât a été fait par Na / Bicine de (50 mM, pH 8.3), suivie d'une augmentation du gradient de sel (0.05 à 1 M NaCl) dans le tampon et finalement une dialyse contre le même tampon pour diminuer la force ionique, d'un autre côté, Battelli et ses collaborateurs (1999) a fait une chromatographie d'exclusion sur une colonne de Sephadex G25 grossier équilibrée avec H₂O a pH 9. L'éluât a été appliqué sur une colonne DE 52 équilibrée avec KOH et l'éluât a été fait par KH₂PO₄ (0 - 0.1 mM) dans KOH, nous pensons que ces étapes c'est juste pour éliminer les sels et les contaminants résiduelles pour obtenir une enzyme plus pure.

2.1.3. Analyse

L'activité enzymatique spécifique (AES) et la pureté de La XO mesurée a été mentionnée dans le tableau suivant.

Tableau.6. Pureté et activité enzymatique de la XO

| Auteurs | PFR | AES ($\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$) |
|------------------------------------|-------|--|
| (Sanders et <i>al.</i> , 1997) | 5-5.5 | 0.149 |
| (Martin et <i>al.</i> , 2004) | 5-5.2 | ND |
| (Al-Muhtaseb et <i>al.</i> , 2012) | 5-5.2 | ND |
| (Battelli et <i>al.</i> , 1999) | 5.4 | 0.002019 |

PFR : rapport protéine / flavine

Le rapport protéine / flavine (PFR) est la mesure d' A_{280} / A_{450} par un spectre UV-Visible pour l'estimation de la pureté d'enzyme (Baghiani et *al.*, 2009). Les valeurs de pureté de la XO mentionnées dans le tableau sont entre 5 et 5.5, le meilleur résultat a été enregistré par Sanders et ses assistants (1997) par un PFR de 5.5, suivis par Battelli et ses assistants (1999) par une valeur de 5.4 puis une valeur de 5.2 trouvée par Martin (2004) et Al-Muhtaseb (2012) et leurs collègues. Par une comparaison, la technique utilisée par Sanders et ses collaborateurs (1997) est la meilleure en terme de pureté par rapport au l'autre méthode de Battelli et ses assistants (1999), nous attendons à ce que la différence de pureté soit due à la précipitation du crème et le type de chromatographie appliquée, où une précipitation différentielle par SA de 15 % et 20 % a été fait par Sanders et ses collaborateurs (1997) et d'autre de 35 % et 55 % a été fait par Battelli et ses assistants (1999) et c'est ce qui rend l'extrait brute encore plus contaminé que le premier. Les techniques d'affinité exploitent des

phénomènes de bio-reconnaissance très spécifiques et sont parfaitement adaptés aux purification de biomolécules. En chromatographie d'affinité, les propriétés l'adsorption spécifique de résine sont réalisés en attachant le ligand de manière covalente complémentaire de la biomolécule cible sur une matrice insoluble (Zachariou, 2008), selon cette concept le gel agarose-héparine peut être mieux que le HA pour l'obtention d'une XOR plus pure. Plusieurs travaux ont suivi la méthode de Sanders et ses collaborateurs (1997) et ont trouvé différentes valeurs de pureté : Atmani *et al.* (2005) de 5 à 5.5, Godber *et al.* (2005) de 5 à 5.2, cette légère différence dans les résultats peut être due aux conditions de travail en laboratoire au cours de la purification basant sur le PFR, nous suggestions une autre technique de purification avec une valeur de pureté de 6 est trouvé par (Harrison *et al.*, 1991). D'autre part, une grande différence entre l'AES trouvée par Sanders *et al.* (1997) et Battelli *et al.* (1999), dans lequel la deuxième est proche de zéro probablement l'enzyme a perdu s'activité au cours des différentes étapes de purification peut-être à cause des tampon d'élution utilisé dans les chromatographies ou les séries de précipitation avant et après la purification sans faire une dialyse pour diminuer la force ionique.

2.2. Purification des ACs anti-XOR

2.2.1. Immunisation

2.2.1.1. Choix de l'animal

Avant de commander les lapins pour l'immunisation, il faut vérifier leur état d'immunisation afin d'éviter des réactions croisées avec un autre Ag. Selon ce que nous pensons des lapins mal (2 - 3 Kg) de race Nouvelle-Zélande appartient à une race pure albinos sont utilisés grâce à leur réponse immunitaire accrue et sa manipulation facile par rapport au femelles qu'ont des perturbations hormonales.

2.2.1.2. Voie d'administration et dose

Les deux chercheurs ont pas utilisé l'Ag seul dans la préparation antigénique à injecter. L'Ag par lui-même n'est souvent pas un agent suffisamment stimulant dans le processus de recrutement du système immunitaire et la mise en place d'une réponse adaptative immune (Christelle, 2014), la définition d'une stratégie adjuvante pour optimiser la réponse immunitaire est une étape importante dans la production des ACs Anti-XOR, l'adjuvant est toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un Ag administré simultanément (Vermout, 2003). Selon Diamantstein *et al.* (1976) les adjuvants peuvent agir sur un ou plusieurs types cellulaires énumérés et que dans différentes situations,

lorsqu'on observe une immuno-potentialisation opérationnelle, il peut y avoir une stimulation de différentes combinaisons de ces types, l'adjuvant agit comme réservoir cellulaire d'Ag dont la libération peut s'étendre sur une longue période. Il permet de préserver l'intégrité conformationnel d'Ag et de le présenter aux cellules présentatrices d'Ag (CPA), ce mécanisme d'action confère trois avantages majeurs : maximiser la réponse en ACs neutralisants, maintenir l'affinité des ACs et augmenter la durée de la réponse immunitaire (Lacroix, 2013). Il existe une multitude d'adjuvants, de nature et d'origine extrêmement diverses, les adjuvants de Freund sont des émulsions eau dans huile minérale (émulsions E / H) sans l'ajout de mycobactéries tuées par la chaleur (AIF) ou avec l'ajout de mycobactéries tuées par la chaleur (ACF) (Erik, 2000).

Les injections doivent être effectuées par voie intramusculaire ou par voie sous-cutanée à l'aide d'aiguilles stériles après avoir désinfecté la peau d'animal avec 70 % d'éthanol, il est recommandé d'utiliser des seringues en verre, car l'injection des émulsions nécessite une pression plus élevée, c'est aussi recommandé de chauffer l'émulsion à température ambiante avant l'injection puisqu'il facilite l'écoulement d'émulsion à travers l'aiguille et le volume d'injection recommandé pour les lapins est 250 µl (Erik, 2000). Sullivan et ses collègues (1982) ont injecté une dose de 200 µg d'une XOB (PFR = 4.8) dans l'ACF (1^{ère} injection) et dans l'AIF (rappelles) tandis que Battelli et ses assistants (1999) ont injecté une dose de XOH (PFR = 5.4) trois fois plus que la dose précédente dans l'ACF (1^{ère} injection) et une dose de 350 µg dans l'AIF (rappelles), cette dose peut être ne respecte pas l'utilisation d'adjuvants à l'éthique d'animale. Au niveau cellulaire, les adjuvants sont stimulant à faible dose et inhibant à forte dose certaines enzymes membranaires essentielles (Simonin et *al.*, 1979).

2.2.1.3. Rappel

Pour des raisons éthiques d'animale, l'utilisation d'ACF doit être restreinte et ne jamais être utilisée simplement pour élever systématiquement une réponse ACs, il ne doit être utilisé que lorsqu'il est spécifiquement et scientifiquement justifié, comme pour déclencher une réponse immunitaire aux Ag faibles dans les cas où d'autres options ont échoué, même dans de tels cas, il devrait ne pas être utilisé plus d'une fois chez un animal, les rappels nécessitent des adjuvants d'émulsion ceux-ci devraient être AIF et non ACF (Erik, 2000) puisque l'AIF est un mauvais immuno-modulateur et caractérisé par un dépôt à court terme (inférieur à deux semaines) (Lacroix, 2013) et étant entendu qu'une stimulation répétée par un Ag pendant une longue période produira des titres d'ACs plus élevés qu'une exposition unique (OMS, 1976), nous pensons que ce sont les raisons pour lesquelles les deux auteurs (Battelli

et *al.*, 1999) et (Sullivan et *al.*, 1982) ont suivi un protocole d'immunisation qui renferme différentes rappels.

2.2.1.4. Collection du sang

Un prélèvement du sang dans une période inférieure à 20 jours après la dernière injection et dans un intervalle de 5 jours après la deuxième injection a été fait par Sullivan (1982), Battelli (1999) et leurs assistants respectivement. Selon Allard (2012), la demi-vie des immunoglobulines G (IgG) est d'environ 20 jours, nous conjecturons qu'elle est l'explication de la manière et la chronologie qui a été suivie dans la collection, pour obtenir une grande quantité d'ACs, Après le prélèvement, le sang a été laissé coaguler à 4 °C puis centrifuger pour le but d'obtenir un antisérum qui contient les IgG totaux avant de passer à l'étape suivante qui est la chromatographie d'immuno-affinité.

2.2.2. Purification

La purification des ACs se fait par immobilisation d'Ag, ce dernier est fixé sur un support insoluble dans une colonne de Chromatographie, les ACs sont adsorbés sur l'Ag immobilisé, les protéines non spécifiquement adsorbées sont éliminées par lavage et l'élution des ACs spécifique généralement se fait par un tampon de pH (2 - 2.2), pour conserver la conformation native des ACs, le pH de la solution doit être ajusté à une valeur neutre avec un tampon phosphate (1 M, pH 7) après l'élution (Muronetz et Korpela, 2003) par un tampon qui doit viser à rompre les différentes liaisons qui constituent une interaction protéine - protéine (AC - Ag) (Walls et Loughran, 2017).

Les deux chercheurs ont appliqué une chromatographie d'immuno-affinité avec une résine Sépharose 4B activée par CNBr, la différence est dans l'Ag immobilisé dans lequel Battelli et ses collaborateurs (1999) ont utilisé des protéines sériques humaines tandis que Sullivan et ses collègues (1982) ont utilisé la XOB, donc les premiers ont purifié les ACs totaux et les autres n'ont purifié que les ACs anti-XOB, aussi autre différence dans les tampons d'élution : PBS (0.005 M, pH 7.5), contenant NaCl (0.5 M), 20 ml / h pour (Battelli et *al.*, 1999) et Tris / HCl (40 ml, 0.1 M, pH 7.5) contenant 3 M NaSCN pour (Sullivan et *al.*, 1982). Cette point différent peut être influencer sur la purification, le rendement et la spécificité.

2.2.3. Analyse

La spécificité des ACs (anti-XOR) purifiées vis-à-vis l'Ag (XOR) a été confirmée par différentes méthodes, Sullivan et ses collaborateurs (1982) ont suivi la méthode

d'Immunodiffusion d'Ouchterlony tandis que Battelli et ses collègues (1999) ont choisi western blot, les résultats obtenus sont représentés dans la figure 12.

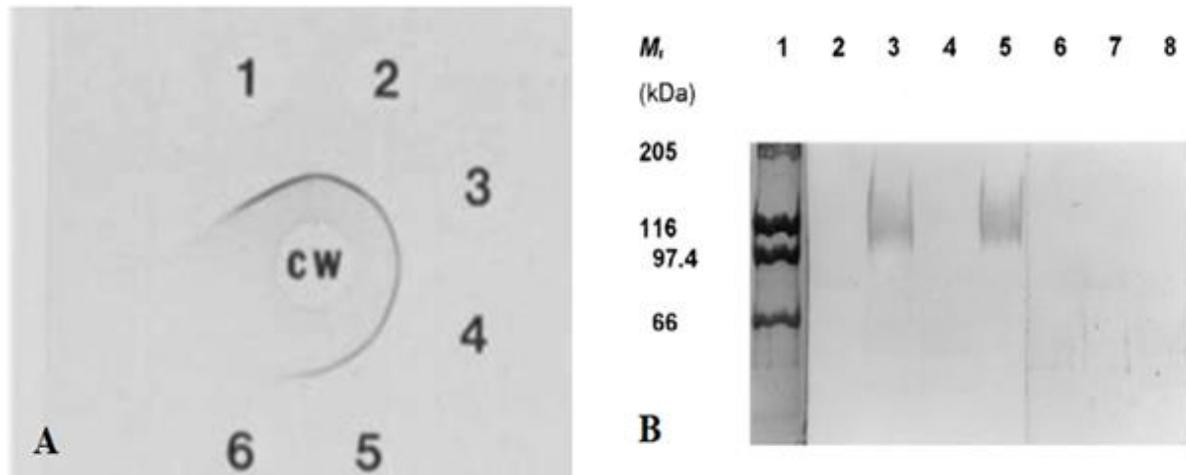


Figure.12. Test de spécificité des ACs anti-XO purifiés. (A) Immunodiffusion Ouchterlony, 5 µg XOB dans le puits central (cw), les ACs contre MFGM dans les puits 1, 2, 3 et les ACs spécifiques purifiés par affinité contre XOB dans les puits 4, 5, 6 (Sullivan et *al.*, 1982). (B) L'analyse par Western blot de la spécificité de l'antisérum de lapin vis-à-vis de la XOH, les marqueurs du poids moléculaire (piste1) ont été colorés avec du noir amido, les pistes 2 à 5 ont été sondées avec antisérum de lapin purifié, les pistes 6 à 8 avec du sérum de lapin pré-immun, comme ACs primaire et les pistes : 2 et 7, lait maternel ; 3, sérum humain additionné de XO ; 4 et 6, sérum humain ; 5 et 8, XO (Battelli et *al.*, 1999).

L'analyse d'Immunodiffusion d'Ouchterlony a été montrée que l'affinité des ACs purifiés contre MFGM (anti-MFGM) (Figure 13 - A), contenant dans les puits 1, 2 et 3 et l'affinité des ACs spécifiques purifiés contre la XOB contenant dans les puits 4, 5 et 6 ont également donné lieu à une seule ligne de précipitation lors de la réaction avec l'enzyme, les deux lignes de précipitation ont montré une réaction d'identité complète. D'autre part, la purification par chromatographie d'affinité du sérum de lapin suivi par Battelli et ses collaborateurs (1999) était efficace d'éliminer les réactions croisées non spécifiques, comme démontré par l'analyse d'immuno-blot (pistes 2 - 4 et 6 - 8) (Figure 13 - B). De plus, l'apparition des immuno-précipitations dans les deux pistes 3 et 5 dans un intervalle de poids moléculaire inférieurs à 205 KDa et donc inférieurs au poids moléculaire de la XOR qui est 300 kDa indique qu'il y a une réactivité de l'antisérum de lapin purifié vers des molécules de XOR partiellement dégradées ce qui confirme que l'utilisation de ces ACs dans la méthode d'ELISA peut également détecter une protéine enzymatique inactive. Selon notre point de vue, les deux techniques nous permettent de tester la spécificité des ACs vis-à-vis plusieurs Ag au même temps, le western blot est une méthode plus sensible que l'Ouchterlony parce qu'elle est basée sur l'interaction primaire entre l'AC et l'Ag au contraire d'Ouchterlony qui est basée sur

l'interaction secondaire et influencé par la concentration de l'Ag et de l'AC utilisé (la zone d'équivalence).

2.3. Dosage de la XOR

Les niveaux de la XOR sont mesurés par différentes méthodes et dans une variété des situations cliniques, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau.8. Valeurs de la XO dans différentes situations pathologiques.

| Catégorie | | Valeur de la XO | | Auteurs |
|--|----------------------------------|---|----------------------------|-------------------------|
| Polyarthrite rhumatoïde | | 476.81 µg / ml | S : 7.94 µg / ml | (Hanachi et al., 2009) |
| Hydarthrose | | 65.43 µg / ml | | |
| Hémarthrose et autres inflammations | | 7.6 µg / ml | | |
| Maladie hépatique | Cholélithiase | M : 6.2 | S : < 1 µg / ml | (Battelli et al., 1999) |
| | Cirrhose biliaire primaire | M : 8.9 | | |
| | Cholestase (cancer du pancréas) | M : 2.8 | | |
| | Hépatite chronique active du VHB | M : 19.6 - 26.4 | | |
| | Hépatite chronique active du VHC | M : 3.8 - 29.6 | | |
| Jaunisse hémolytique | | S : 81.2 nmol / h / l M : 26.66 nmol / h / l | (Giler et al., 1975) | |
| Maladie rénale | | S : 1.38 nmol / h / g M : 28 nmol / h / g | (McHale et al., 1979) | |
| Syndrome d'immunodéficience acquise (AIDS) | | S : 0.5 µmol / min M : 7.9 µmol / min | (Miesel et Zuber, 1993) | |
| Goutte | | S : 12.8 pmol / ml / h M : 14 pmol / ml / h | (Yamamoto et al., 1996) | |
| Infarctus du myocarde | | S : 0.0096 U / mg M : 0.0479 U / mg | (Raghuvanshi et al., 2007) | |
| syndrome des ovaires polykystiques | | S : 0.49 mU / ml M : 1.1 mU / ml | (Isik et al., 2016) | |
| Sexe | Male | 20 µU / ml / h | | (Meijer et al., 2018) |
| | Femelle | 16 µU / ml / h | | |

M : malade ; S : sain ; VHB : virus de l'hépatite B ; VHC : virus de l'hépatite C.

Généralement, le niveau de XOR dans le sérum humain est très faible et peut être détecté uniquement avec des méthodes particulièrement sensibles telles que la radiométrie, la fluorimétrie, liquide haute performance chromatographie (HPLC) et ELISA. La plupart de ces procédures détectent la protéine à partir de son activité enzymatique, tandis que cette méthode immunoenzymatique mesure la XOR active et inactive.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une élévation de la XOR dans le sérum des personnes qui atteints des maladies inflammatoires (rhumatisme, goutte et infarctus du

myocarde), des maladies hépatiques et syndrome des ovaires polykystiques par rapport au sujet sains. D'autre coté, le taux de la XOR est inférieur au normes dans le sérum des personnes souffrant d'une jaunisse hémolytique et dans les sérums des femmes qu'avaient une activité XOR plasmatique inférieure à celle des hommes, ces résultats correspondent au celles obtenu par (Furuhashi et *al.*, 2019).

Nous avons calculé le pourcentage (%) d'augmentation de la XOR dans le sérum des malades par rapport au sain et les résultats sont représentées sous forme d'histogramme illustré dans la figure 13.

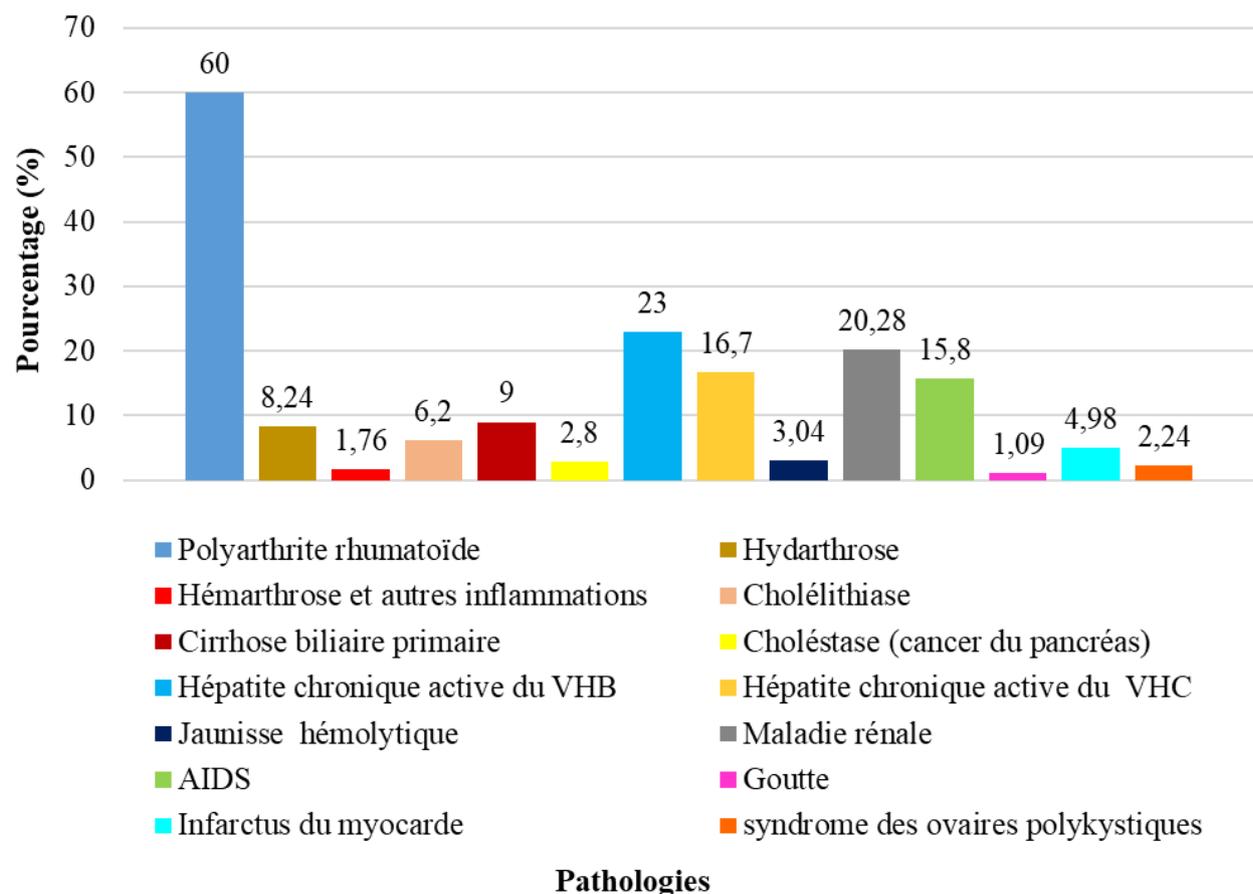


Figure.13. Niveau de la XOR dans différentes catégories pathologiques.

Selon la figure 14, les niveaux les plus élevés de la XOR ont été rapportés chez des patients souffrant de la maladie de polyarthrite rhumatoïde par rapport aux sujets normaux, peut-être qu'il y a une grande induction d'expression de la XOR dans le liquide synovial par les facteurs pro inflammatoires.

Un taux de l'enzyme a été enregistré chez les personnes qui atteint : AIDS, l'hépatite chronique active du VHC, maladie rénale et l'hépatite chronique active du VHB avec des valeurs approximativement adjacentes. Des petites proportions sont détectées dans l'infarctus du myocarde, cholélithiase, hydarthrose et cirrhose biliaire primaire. Les valeurs les plus bas

de cette enzyme sont remarqués dans la goutte, hémarthrose et autres inflammations, syndrome des ovaires polykystiques et la jaunisse hémolytique.

A partir de ces recherches, nous concluons que les résultats obtenus montrent la présence de la XOR dans différentes maladies de valeurs variables et que le niveau d'enzyme est élevé chez un large éventail de patients par rapport aux personnes saines, mais avec certaine différence des proportions, ces derniers sont peut-être dus à la méthode utilisée pour la mesure ou à l'état pathologique des malades. Par conséquent, nous suggérons qu'une étude soit menée qui comprend la mesure de l'enzyme dans le sérum des personnes souffrant de ces maladies. En suivant la même technique et en l'appliquant à toutes les méthodes de dosage pour trouver le moyen le plus efficace de mesurer et bien mettre en évidence la concentration d'enzyme dans un ces maladies.

Conclusion

Conclusion

De toute évidence, l'implication physiologique du XOR est potentiellement complexe, elle joue un rôle dans le catabolisme des purines (Martin et al., 2004), en plus, l'enzyme ayant une capacité multifonctionnelle à effectuer des réactions générales de désintoxication et aussi d'impliquer dans les pathologies en raison de la génération des ERO / ERN et de synthèse l'AU (Vorbach et al., 2003 ; Mandava et Batchu, 2016).

L'enzyme a fait l'objet d'études pendant des années, au cours desquelles le protocole de sa purification et s'étude ont été développé dans divers fluides biologiques et catégories cliniques.

Nous avons conclu que la source la plus utilisé pour la purification de la XOR est le lait maternel (généralement bovin ou bien humain) où elle est disponible en concentration élevé dans la MFGM qui représente le matériel départ dans la majorité des méthodes de purification qui sont moins difficile et nécessite que celles qui utilisent des organes ou des Bactéries et exposent l'enzyme à interagir avec les différents éléments vitaux qui y sont présents et peut être influence sur sa structure ou bien s'activité et malgré ça il est préférable d'utiliser des inhibiteur des protéases et appliquer une chromatographie d'affinité, afin d'obtenir une XO intacte et active.

D'après notre étude comparative, nous avons déduit que la production des ACs polyclonaux anti-XOR majoritairement est fait par l'immunisation des lapins de race *Albinos* par une préparation antigénique contenant la XOR avec l'ACF avec des doses proportionnelles au leurs poids et une chronologie des rappels avec un AIF bien déterminé pour obtenir la plus grande quantité des ACs, aussi il faut prendre en considération la méthode de la purification.

Notre étude comparative nous permet de conclure que la XOR s'implique dans diverses situations pathologiques y a compris les maladies inflammatoires qui présente une augmentation significative.

En ce qui concerne les prochaines études, nous suggérons que les recherches se concentrent sur les maladies inflammatoires et hépatiques, car l'enzyme y est présente à des niveaux élevés et pour la technique de mesure, nous proposons une étude comparative entre ELISA Double Sandwich et les autres méthodes. Nous suggérons également qu'une étude soit menée sur l'effet de la durée du tabagisme, du poids et du régime alimentaire sur la concentration d'enzyme.

Bibliographie

Bibliographie

- Adachi T., Fukushima T., Usami Y., and Hirano K. (1993). Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochemical Journal*, 289(2), pp. 523-527.
- Ahmane N., Atmani-Kilani D., Chaher N., Ayouni K., Rahmani M., Costa G. D., Debbache-Benaida N., Richard T., and Atmani D. (2019). Identification of bioactive compounds from *Fraxinus angustifolia* extracts with anti- NADH oxidase activity of bovine milk xanthine oxidoreductase. *Turk J Biol*, (43), pp. 133-147
- Allard B. (2012). Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers. Thèse De Doctorat, Université Paris-Sud 11. Paris, 258 p.
- Al-Muhtaseb N., Al-Kaissi E., Thawaini, A. J., Eldeen Z. M., Al-Muhtaseb S., and Al-Saleh B. (2012). The role of human xanthine oxidoreductase (HXOR), anti-HXOR antibodies, and microorganisms in synovial fluid of patients with joint inflammation. *Rheumatology International*, 32(8), pp. 2355-2362.
- Atmani D., Baghiani A., Harrison R., and Benboubetra M. (2005). NADH oxidation and superoxide production by caprine milk xanthine oxidoreductase. *International Dairy Journal*, 15(11), pp.1113-1121.
- Atmani D., Benboubetra M., and Harrison R. (2004). Goats' milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. *Journal of Dairy Research*, 71(1), pp.7-13.
- Baghiani A., Benboubetra M., and Harrison R. (2003). Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 111(5), pp. 407-414.
- Bardin T., and Cohen-Solal A. (2011). Goutte et pathologies cardiovasculaires. *Revue du Rhumatisme*, 78, pp.129-133.
- Basha M. (2020). Analytical techniques in biochemistry. *Humana press, Springer Protocols Handbooks*,132 p.
- Battelli M. G., Abbondanza A., Musiani S., Buonamici L., Strocchi P., Tazzari P. L., Gramantieri L., and Stirpe F. (1999). Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinica Chimica Acta*, 281(1-2), pp.147-158.
- Battelli M. G., Bolognesi A., and Polito L. (2014). Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842 (9), pp. 1502-1517.
- Battelli M. G., Bortolotti M., Polito L., and Bolognesi A. (2018). The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864 (8), pp. 2557-2565.
- Battelli M. G., Bortolotti M., Polito L., and Bolognesi A. (2019). Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. *Redox Biology*, 21, 101070.
- Battelli M. G., Musiani S., Valgimigli M., Gramantieri L., Tomassoni F., Bolondi L., and Stirpe F. (2001) Serum Xanthine Oxidase in Human Liver Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 96 (4), pp.1194 – 1199.
- Battelli M. G., Polito L., et Bolognesi A. (2014). Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis*, 237 (2), pp. 562-567.

- Benaziz L., Barroug A., Legrouri A., Rey C., and Lebuglez A. (2001). Adsorption of o-phospho-L-serine and L-serine onto poorly crystalline apatite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 238, pp.48-53.
- Benboubetra M., Gleeson A., Harris C. P. D., Khan J., Arrar L., Brennan D., and Reid J. (1997). Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults. *European Journal of Clinical Investigation*, (27), pp. 611- 619.
- Berry C. E., and Hare J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications: Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease. *The Journal of Physiology*, 555 (3), pp. 589-606.
- Borges, F., Fernandes, E., et Roleira, F. (2002). Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 9(2), 195-217.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, (72), pp. 248-254.
- Cantu-Medellin N., and Kelle E. E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*, 1 (1), pp. 353-358.
- Chen C., Lü J.M., and Yao Q. (2016). Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Medical Science Monitor*, 22, pp. 2501-2512.
- Christelle, M. (2014). Utilisation des adjuvants dans les vaccins : État des lieux et actualités. Thèse De Doctorat, Université Toulouse Iii Paul Sabatier.Toulouse, 117 p.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), pp. 156–60.
- Danthine S., Blecker C., Paquot M., Innocente N., and Deroanne C. (1999). Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : Synthèse bibliographique. *Le Lait*, 80 (2), pp. 209-222.
- Diamantstein T., Hilleman M. R., Humphrey J. H., Lagrange P., Mota I., Westphal O., and White R. G. (1976). Adjuvants de l'immunité. *Organisation mondiale de santé*, 46 p.
- Day R. O., Kamel B., Kannangara D. R. W., Williams K. M., and Graham G. G. (2016). Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: Relevance for gout. *Clinical Science*, 130 (23), pp. 2167-2180.
- Eichert D., Salomé M., Banub M., Susinia J., and Reyb C. (2005). Preliminary characterization of calcium chemical environment in apatitic and non-apatitic calcium phosphates of biological interest by X-ray absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, pp. 850 - 858.
- El Rhilassi A., Mourabet M., El Boujaady H., Bennani Ziatni M., El Hamri R., and Taitai A. (2014). Adsorption des acides aminés essentiels et leur mélange sur l'hydroxyapatite mal cristallisée (Adsorption of some essential amino acids and their mixture onto poorly crystalline hydroxyapatite). *J. Mater. Environ. Sci*, 5 (5) pp.1442-1453.
- Enroth C., Eger B. T., Okamoto K., Nishino T., Nishino T., et Pai E. F. (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (20), pp. 10723-10728.
- Erik B., L. (2000). Freund's adjuvants de vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols methods in molecular medicine.Vol. 42. *Humana Press*, Totowa, NJ. pp. 49 – 63.
- Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, pp.108-115.

- Fried, R., and Fried, L. W. (1974). Xanthine Oxidase (Xanthine Dehydrogenase). *In Methods of Enzymatic Analysis*, p. 644-649.
- Furuhashi M., Matsumoto M., Murase T., Nakamura T., Higashiura Y., Koyama M., Tanaka M., Moniwa N., Ohnishi H., Saitoh S., Shimamoto K., and Miura T. (2019). Independent links between plasma xanthine oxidoreductase activity and levels of adipokines. *Journal of Diabetes Investigation*, 10 (4), pp.1059 - 1067.
- Giler S. H., Sperling O., Brosh S., Urca I., and de Vries A. (1975). Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clinica Chimica Acta*, 63 (1), pp.37- 40.
- Godber B. L. J., Schwarz G., Mendel R. R., Lowe D. J., Bray R. C., Eisenthal R., and Harrison R. (2005). Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: The enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. *Biochemical Journal*, 388 (2), pp. 501-508.
- Grodzki A. C., and Berenstein E. (2010). Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. In C. Oliver & M. C. Jamur (Éds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 588, pp. 15-26.
- Guo W., Li Y., Liang W., Wong S., Apovian C., Kirkland J. L., and Corkey B. E. (2012). Beta-Mecaptoethanol Suppresses Inflammation and Induces Adipogenic Differentiation in 3T3-F442A Murine Preadipocytes. *Plos One*, 7 (7), p. 40958.
- Hanachi N., Charef N., Baghiani A., Khenouf S., Derradji Y., Boumerfeg S., Harzallah D., and Arrar, L. (2009). Comparison of xanthine oxidase levels in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. *Saudi Medical J*, 30 (11), pp.1422 - 1425.
- Harrison R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*, 33 (6), pp. 774-797.
- Harrison R., Abadah S., and Benboubetra M. (1991). Purification of xanthine oxidase from human milk. *Biochemical Society Transactions*, (19), p. 332.
- Hosseini S., Vázquez-Villegas P., Rito-Palomares M., and Martínez-Chapa S. O. (2018). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) from a to z. *Springer Briefs in Applied Sciences and Technology*, 124 p.
- Hornbeck P. (1991). Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies. *Current Protocols in Immunology*, 4 p.
- Hu Q., Zhou M., Zhu H., Lu G., Zheng D., Li H., and Hao, K. (2017). (E)-2-(4-bromophenyl)-1-(2, 4-dihydroxyphenyl) ethanone oxime is a potential therapeutic agent for treatment of hyperuricemia through its dual inhibitory effects on XOD and URAT1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, pp. 88-94.
- Isik H., Aynoglu O., Timur H., Sahbaz A., Harma M., Can M., Guven B., Alptekin H., and Kokturk F. (2016). Is Xanthine oxidase activity in polycystic ovary syndrome associated with inflammatory and cardiovascular risk factors? *Journal of Reproductive Immunology*, 116, pp. 98-103.
- Jarasch E-D., Christine G., Hans W., HeidT., Thomas W., Keenant and Werner W. F. (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Article*, 25, pp. 67- 82.
- Kohsari M., Ansari M. H. K., and Rasmi Y. (2020). Serum level of xanthine oxidase, uric acid, and nadph oxidase 1 in stage i of multiple myeloma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 21 (8), pp. 2237-2242.
- Kostić D. A., Dimitrijević D. S., Stojanović G. S., Palić I. R., Đorđević A. S., and Ickovski J. D. (2015). Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. *Journal of Chemistry*, pp. 1- 8.

- Krenitsky T. A., Spector T., and Hall W. W. (1986). Xanthine oxidase from human liver: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247 (1), pp. 108-119.
- Kurosaki M., Zanotta S., Calzi M. L., Garattini E., and Terao M. (1996). Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation: Regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin. *Biochemical Journal*, 319 (3), pp. 801-810.
- Kusano T., Ehirchiou D., Matsumura T., Chobaz V., Nasi S., Castelblanco M., So A., Lavanchy C., Acha-Orbea H., Nishino T., Okamoto K., and Busso N. (2019). Targeted knock-in mice expressing the oxidase-fixed form of xanthine oxidoreductase favor tumor growth. *Nature Communications*, 10 (1), 14 p.
- Lacroix, A.-S. (2013). Place des autovaccins dans la lutte contre les maladies chez les animaux de rente. Thèse De Doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire D'alfort. Paris, 122.
- Liu H., Zhu H., Shi W., Lin Y., Ma G., Tao G., Gong W., Zhao Q., Du M., Wang M., Chu, H., Zhang, Z. (2018). Genetic variants in XDH are associated with prognosis for gastric cancer in a Chinese population. *Gene*, 663, pp. 196-202.
- Luna G., Dolzhenko A. V., and Mancera R. L. (2019). Inhibitors of xanthine oxidase: scaffold diversity and structure-based drug design. *ChemMedChem*, 14 (7), pp.714-743.
- Lytvyn Y., Perkins B. A., and Cherney D. Z. I. (2015). Uric Acid as a Biomarker and a Therapeutic Target in Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, 39 (3), pp. 239-246.
- Maia L. B., and Moura J. J. G. (2018). Putting xanthine oxidoreductase and aldehyde oxidase on the NO metabolism map: Nitrite reduction by molybdoenzyme. *Redox Biology*, 19, pp. 274-289.
- Mandava K., and Batchu U. R. (2016). Biochemical role of xanthine oxidoreductase and its natural inhibitors: an overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8 (10), pp. 57 - 65.
- Mao Q., Dai X., Xu G., Su Y., Zhang B., Liu D., and Wang S. (2019). Design, synthesis and biological evaluation of 2-(4-alkoxy-3-cyano) phenyl-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid derivatives as novel xanthine oxidase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, (181), p.111558.
- Martin H. M., Moore K. P., Bosmans E., Davies S., Burroughs A. K., Dhillon A. P., Tosh D., and Harrison, R. (2004). Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (8), pp.1214-1223.
- Martinez-Hervas S., Real J.T., Ivorra C., Priego A., Chaves F. J., Pallardo F.V., Vin J.R., Redon J., Carmena R., and Ascaso J.F. (2010). Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 20, pp. 734 - 739.
- Masuda T., Fukuyama Y., Doi, S., Masuda A., Kurosawa S., et Fujii S. (2019). Effects of temperature on the composition and xanthine oxidase inhibitory activities of caffeic acid roasting products. *J. Agric. Food Chem*, 67, pp. 8977–8985.
- Masuoka N., and Kubo I. (2018). Characterization of the xanthine oxidase inhibitory activity of alk(en)yl phenols and related compounds. *Phytochemistry*, 155, pp.100-106.
- McHale A., Grimes H., and Coughlan M. P. (1979). Human serum xanthine oxidase: Fluorometric assay applicable to the investigation of liver disorders. *International Journal of Biochemistry*, 10 (4), pp. 317-319.
- McManaman J. L., and Bain D. L. (2002). Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (24), pp. 21261-21268.

- Meijer B., Seinen M. L., Hosman T., Linskens R. K., Kneppelhout J.-K., Peters G. J., Mulder C. J., van Bodegraven A. A., and de Boer N. K. (2018). High inter-individual variability of serum xanthine oxidoreductase activity in IBD patients. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 37(6), pp. 317-323.
- Merouane F. (2016). Extraction, purification et caractérisation des lectines produites par la souche *Micromonospora aurantiaca* GF44c, et tests biologiques. Thèse De Doctorat Université Des Frères Mentouri, Constantine, 170 p.
- Miesel R., and Zuber M. (1993). Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*, 17 (5), pp. 551-561.
- Migdal C., and Serres M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*, 27 (4), pp. 405-412.
- Mitomo S., Hirota M., and Fujita T. (2019). New xanthine oxidase inhibitors from the fruiting bodies of *Tyromyces fissilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83 (5), pp. 813-823.
- Moriwaki Y., Yamamoto T., Suda M., Nasako Y., Takahashi S., Agbedana O. E., Hada T., and Higashino K. (1993). Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1164 (3), pp. 327-330.
- Moriwaki Y., Yamamoto T., and Yamakita J.I. (1998). Comparative localization of aldehyde oxidase and xanthine oxidoreductase activity in rat tissues. *Histochemical Journal*, 30, 69 - 74.
- Muronetz V. I., and Korpela T. (2003). Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 790(1-2), pp.53-66.
- Nioi, C. (2013). Extraction et proteolyse de napines de tourteau de colza : influence de l'état structural de la protéine sur la cinétique de proteolyse, la composition et les fonctionnalités des hydrolysats. Thèse de doctorat. Université de lorraine (ul). 220 p.
- Nishino T., and Okamoto K. (2015). Mechanistic insights into xanthine oxidoreductase from development studies of candidate drugs to treat hyperuricemia and gout. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20 (2), pp. 195-207.
- Ó'Fágáin, C. (1996). Storage of Pure Proteins. *Methods in Molecular Biology*, 59, pp.339-356.
- Ó'Fágáin C. (2011). Storage and Lyophilisation of Pure Proteins. In D. Walls et S. T. Loughran (Éds.), *Protein Chromatography*, 681, pp. 179 - 202.
- Ó'Fágáin C., and Colliton K. (2017). Storage and Lyophilization of Pure Proteins. In D. Walls & S. T. Loughran (Éds.), *Protein Chromatography*, 1485, pp. 159-190.
- Okamoto K., Matsumoto K., Hille R., Eger B. T., Pai E. F., and Nishino T. (2004). The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (21), pp. 7931-7936.
- Okamoto K., Kusano T., and Nishino T. (2013). Chemical nature and reaction mechanisms of the molybdenum cofactor of xanthine oxidoreductase. *Current Pharmaceutical Design*, 19 (14), pp. 2606-2614.
- Ozturk G., Shah I. M., Mills D. A., German J. B., and de Moura Bell J. M. L. N. (2020). The antimicrobial activity of bovine milk xanthine oxidase. *International Dairy Journal*, 102, p.104581.
- Pacher P., Nivorozhkin A., and Szabó C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews*, 58 (1), pp. 87-114.
- Pauff J. M., and Hille R. (2009). Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. *Journal of Natural Products*, 72 (4), pp. 725-731.

- Pincemail J. (2001). Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones - Nutrition*, 4, pp.158 – 164.
- Polonovski M., Baudu L., and Neuzil, E. (1949). État physico-chimique de la xanthine-déhydrase dans le lait de vache. *Le Lait*, 29, pp.281-282.
- Poss W. B., Huecksteadt T. P., Panus P. C., Freeman B. A., and Hoidal J. R. (1996). Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 270 (6), pp. 941 - 946.
- Purwanto M. G. M. (2016). The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract. *Procedia Chemistry*, 18, pp.127-131.
- Qingyong L., Chuanchao S., Min W., Mao Z., Ming L., Ting Z., Erdong Y., Zhi W., Maojin Y., and Jiaoyan R. (2019). Tryptophan residue enhances in vitro walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities. *Journal of functional foods*, 53, pp. 276-285.
- Raghuvanshi R., Kaul A., Bhakuni P., Mishra A., and Misra M. K. (2007). Xanthine oxidase as a marker of myocardial infarction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (2), pp. 90-92.
- Russ H., and Takeshi N. (1995). Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *The FASEB Journal*, 9, pp. 995-1003.
- Sanders S. A., Eisenthal R., and Harrison R. (1997). NADH Oxidase Activity of Human Xanthine Oxidoreductase. Generation of Superoxide Anion. *European Journal of Biochemistry*, 245 (3), pp. 541-548.
- Sarrazin, S. (2007). Caractérisation des interactions glycosaminoglycanes/protéines dans le but de développer des molécules d'intérêt thérapeutique : Exemples de l'Endocan et de l'interféron gamma. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier Grenoble I. 413 p.
- Schmidt H. M., Kelley E. E., and Straub A. C. (2019). The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biology*, 21, p.101072.
- Se-Hyun O., Soon-Youn C., Hyo-Jung C., Hye-Myung R., You-Jin K., Hee-Yeon J., Jang-Hee C., Chan-Duck K., Sun-Hee P., Tae-Hwan K., and Yong-Lim K. (2019). The emerging role of xanthine oxidase inhibition for suppression of breast cancer cell migration and metastasis associated with hypercholesterolemia. *The FASEB Journal*, (33), pp.7301- 7314.
- Sergent O., Griffon B., Cillard P., and Cillard J. (2001). Alcool et stress oxydatif. *Pathologie Biologie*, 49 (9), pp. 689-695.
- Simonin G., Geny B., and Paraf A. (1979). Mécanisme d'action des adjuvants de l'immunité au niveau cellulaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 2, 259.
- Sullivan C. H., Mather I. H., Greenwalt D. E., and Madara P. J. (1982). Purification of xanthine oxidase from the fat-globule membrane of bovine milk by electrofocusing: Determination of isoelectric points and preparation of specific antibodies to the enzyme. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 44 (1), pp.13-22.
- Tu H.-P., Tung Y.-C., Tsai W.C., Lin G.T., Ko Y.C., and Lee S.S. (2017). Les maladies liées à l'alcool et le syndrome de dépendance à l'alcool associés à un risque de goutte accru : Étude de cohorte nationale taïwanaise. *Revue du Rhumatisme*, 84 (6), pp. 534 - 542.
- Tziomalos K., and Hare J-M. (2009). Role of xanthine oxidoreductase in cardiac nitroso-redox imbalance. *Frontiers In Bioscience (Landmark Ed)*. 14, pp. 237 262.
- Van Hoorn D. E. C., Nijveldt R. J., Van Leeuwen P. A. M., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D. B. A., and Van Norren K. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, 451(2), pp.111-118.

- Vanbergue E. (2017). Les facteurs de variations de la lipolyse spontanée du lait de vache et mécanismes biochimiques associés. Thèse de doctorat, l'Université Européenne De Bretagne Loire, 247 p.
- Vermout S., Denis M., Losson B., Mignon B. (2003). Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann. Méd. Vét.* 147, pp. 393 - 401.
- Vorbach C., Harrison R., and Capecchi M. R. (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*, 24 (9), pp. 512-517.
- Vella M., Hunter T., Farrugia C., Pearson A. R., and Hunter G. (2014). Purification and characterisation of xanthine oxidoreductases from local bovids in malta. *Advances in Enzyme Research*, 02 (01), pp. 54-63.
- Walls D., and Loughran, S. T. (2017). Protein chromatography: methods and protocols. 2ème édition. *Humana press. Springer protocols*, New York. 423 p.
- Washio K., Kusunoki Y., Murase T., Nakamura T., Osugi K., Ohigashi M., Sukenaga T., Ochi F., Matsuo T., Katsuno T., Moriwaki Y., Yamamoto T., Namba M., and Koyama H. (2017). Xanthine oxidoreductase activity is correlated with insulin resistance and subclinical inflammation in young humans. *Metabolism*, 70, pp. 51-56.
- Waud W. R., Brady F. O., Wiley R. D., and Rajagopalan K. V. (1975). A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: Effect of proteolysis on the subunit structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 169 (2), pp. 695-701.
- Xin Y., Yang H., Xia X., Zhang L., Zhang Y., Cheng C., and Wang W. (2012). Expression, purification and partial characterization of a xanthine oxidase (XOD) in *Arthrobacter sp.* *Process Biochemistry*, 47 (11), pp. 1539-1544.
- Xu H., Li C., Mozziconacci O., Zhu R., Xu Y., Tang Y., Chen R., Huang Y., Holzbeierlein J. M., Schöneich C., Huang J., and Li B. (2019). Xanthine oxidase-mediated oxidative stress promotes cancer cell-specific apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 139, pp.70-79.
- Xu P., Huecksteadt T. P., and Hoidal J. R. (1994). Molecular Cloning and Characterization of the Human Xanthine Dehydrogenase Gene (XDH). *Genomics*, 34 (2), pp. 173-180.
- Yamamoto T., Moriwaki Y., Takahashi S., Tsutsumi Z., Yamakita J., Nasako Y., Hiroishi K., and Higashino K. (1996). Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 681 (2), pp. 395-400.
- Zachariou, M. (2008). Affinity chromatography: Methods and protocols. 2^{ème} édition. *Humana Press. Springer*, 341p.
- Zhang J., Lv G., and Zhao Y. (2011). The significance of serum xanthine oxidase and oxidation markers in acute paraquat poisoning in humans. *Clinical Biochemistry*, 44 (2-3), pp. 221-225.

Annexes

Annexe.1. Articles analysés dans la partie expérimentale.

1. Adachi T., Fukushima T., Usami Y., and Hirano K. (1993). Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochemical Journal*, 289(2), pp. 523-527.
2. Al-Muhtaseb N., Al-Kaissi E., Thawaini A. J., Eldeen Z. M., Al-Muhtaseb S., and Al-Saleh B. (2012). The role of human xanthine oxidoreductase (HXOR), anti-HXOR antibodies, and microorganisms in synovial fluid of patients with joint inflammation. *Rheumatology International*, 32 (8), pp. 2355-2362.
3. Atmani D., Baghiani A., Harrison R., and Benboubetra M. (2005). NADH oxidation and superoxide production by caprine milk xanthine oxidoreductase. *International Dairy Journal*, 15(11), pp.1113-1121.
4. Atmani D., Benboubetra M., and Harrison R. (2004). Goats' milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. *Journal of Dairy Research*, 71(1), pp.7-13.
5. Baghiani A., Benboubetra M., and Harrison R. (2003). Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives Of Physiology And Biochemistry*, 111(5), pp. 407-414.
6. Battelli M. G., Abbondanza A., Musiani S., Buonamici L., Strocchi P., Tazzari P. L., Gramantieri L., and Stirpe F. (1999). Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinica Chimica Acta*, 281(1-2), pp.147-158.
7. Benaziz L., Barroug A., Legrouri A., Rey C., and Lebuglez A. (2001). Adsorption of o-phospho-L-serine and L-serine onto poorly crystalline apatite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 238, pp.48-53.
8. Benboubetra M., Gleeson A., Harris C. P. D., Khan J., Arrar L., Brennan D., and Reid J. (1997). Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults. *European Journal of Clinical Investigation*, (27), pp. 611- 619.
9. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, (72), pp. 248-254.
10. Cantu-Medellin N., and Kelle E. E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*, 1 (1), pp. 353-358.
11. Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), pp. 156-60.
12. Eicherta D., Salomé M., Banub M., Susinia J., and Reyb C. (2005). Preliminary characterization of calcium chemical environment in apatitic and non-apatitic calcium phosphates of biological interest by X-ray absorption spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, pp. 850 - 858.
13. El Rhilassi A., Mourabet M., El Boujaady H., Bennani Ziatni M., El Hamri R., and Taitai A. (2014). Adsorption des acides aminés essentiels et leur mélange sur l'hydroxyapatite mal cristallisée (Adsorption of some essential amino acids and their mixture onto poorly crystalline hydroxyapatite). *J. Mater. Environ. Sci*, 5 (5) pp.1442-1453.
14. Furuhashi M., Matsumoto M., Murase T., Nakamura T., Higashiura Y., Koyama M., Tanaka M., Moniwa N., Ohnishi H., Saitoh S., Shimamoto K., and Miura T. (2019). Independent links between plasma xanthine oxidoreductase activity and levels of adipokines. *Journal of Diabetes Investigation*, 10 (4), pp.1059 - 1067.
15. Giler S. H., Sperling O., Brosh S., Urca I., and de Vries A. (1975). Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clinica Chimica Acta*, 63 (1), pp.37- 40.
16. Godber B. L. J., Schwarz G., Mendel R. R., Lowe D. J., Bray R. C., Eisenthal R., and Harrison R. (2005). Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: The enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. *Biochemical Journal*, 388 (2), pp. 501-508.
17. Guo W., Li Y., Liang W., Wong S., Apovian C., Kirkland J. L., and Corkey B. E. (2012). Beta-Mecaptoethanol Suppresses Inflammation and Induces Adipogenic Differentiation in 3T3-F442A Murine Preadipocytes. *Plos One*, 7 (7), p. 40958.

18. Hanachi N., Charef N., Baghiani A., Khenouf S., Derradji Y., Boumerfeg S., Harzallah D., and Arrar, L. (2009). Comparison of xanthine oxidase levels in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. *Saudi Medical J*, 30 (11), pp.1422 - 1425.
19. Harrison R., Abadah S., and Benboubetra M. (1991). Purification of xanthine oxidase from human milk. *Biochemical Society Transactions*, (19), p. 332.
20. Isık H., Aynıoğlu O., Timur H., Sahbaz A., Harma M., Can M., Guven B., Alptekin H., and Kokturk F. (2016). Is Xanthine oxidase activity in polycystic ovary syndrome associated with inflammatory and cardiovascular risk factors? *Journal of Reproductive Immunology*, 116, pp. 98-103.
21. Kostić D. A., Dimitrijević D. S., Stojanović G. S., Palić I. R., Đorđević A. S., and Ickovski J. D. (2015). Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. *Journal of Chemistry*, pp. 1- 8.
22. Krenitsky T. A., Spector T., and Hall W. W. (1986). Xanthine oxidase from human liver: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247 (1), pp. 108-119.
23. Lytvyn Y., Perkins B. A., and Cherney D. Z. I. (2015). Uric Acid as a Biomarker and a Therapeutic Target in Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*, 39 (3), pp. 239-246.
24. Martin H. M., Moore K. P., Bosmans E., Davies S., Burroughs A. K., Dhillon A. P., Tosh D., and Harrison, R. (2004). Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (8), pp.1214-1223.
25. McHale A., Grimes H., and Coughlan M. P. (1979). Human serum xanthine oxidase: Fluorometric assay applicable to the investigation of liver disorders. *International Journal of Biochemistry*, 10 (4), pp. 317-319.
26. Meijer B., Seinen M. L., Hosman T., Linskens R. K., Kneppelhout J.-K., Peters G. J., Mulder C. J., van Bodegraven A. A., and de Boer N. K. (2018). High inter-individual variability of serum xanthine oxidoreductase activity in IBD patients. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 37(6), pp. 317-323.
27. Miesel R., and Zuber M. (1993). Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*, 17 (5), pp. 551-561.
28. Muronetz V. I., and Korpela T. (2003). Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 790(1-2), pp.53-66.
29. Ó'Fágáin, C. (1996). Storage of Pure Proteins. *Methods in Molecular Biology*, 59, pp.339-356.
30. Ó'Fágáin C. (2011). Storage and Lyophilisation of Pure Proteins. In D. Walls et S. T. Loughran (Éds.), *Protein Chromatography*, 681, pp. 179 - 202.
31. Ó'Fágáin C., and Colliton K. (2017). Storage and Lyophilization of Pure Proteins. In D. Walls & S. T. Loughran (Éds.), *Protein Chromatography*, 1485, pp. 159-190.
32. Polonovski M., Baudu L., and Neuzil, E. (1949). État physico-chimique de la xanthine-déhydrase dans le lait de vache. *Le Lait*, 29, pp.281-282.
33. Purwanto M. G. M. (2016). The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract. *Procedia Chemistry*, 18, pp.127-131.
34. Raghuvanshi R., Kaul A., Bhakuni P., Mishra A., and Misra M. K. (2007). Xanthine oxidase as a marker of myocardial infarction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (2), pp. 90-92.
35. Sanders S. A., Eisenthal R., and Harrison R. (1997). NADH Oxidase Activity of Human Xanthine Oxidoreductase. Generation of Superoxide Anion. *European Journal of Biochemistry*, 245 (3), pp. 541-548.
36. Schmidt H. M., Kelley E. E., and Straub A. C. (2019). The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biology*, 21, p.101072.
37. Sullivan C. H., Mather I. H., Greenwalt D. E., and Madara P. J. (1982). Purification of xanthine oxidase from the fat-globule membrane of bovine milk by electrofocusing: Determination of isoelectric points and preparation of specific antibodies to the enzyme. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 44 (1), pp.13-22.
38. Vermout S., Denis M., Losson B., Mignon B. (2003). Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann. Méd. Vét.* 147, pp. 393 - 401.
39. Vella M., Hunter T., Farrugia C., Pearson A. R., and Hunter G. (2014). Purification and characterisation of xanthine oxidoreductases from local bovids in Malta. *Advances in Enzyme*

40. Waud W. R., Brady F. O., Wiley R. D., and Rajagopalan K. V. (1975). A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: Effect of proteolysis on the subunit structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 169 (2), pp. 695-701.
41. Xin Y., Yang H., Xia X., Zhang L., Zhang Y., Cheng C., and Wang W. (2012). Expression, purification and partial characterization of a xanthine oxidase (XOD) in *Arthrobacter* sp. *Process Biochemistry*, 47 (11), pp. 1539-1544.
42. Yamamoto T., Moriwaki Y., Takahashi S., Tsutsumi Z., Yamakita J., Nasako Y., Hiroishi K., and Higashino K. (1996). Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 681 (2), pp. 395-400.

Annexe.2. Différent matériel utilisé dans les méthodes analysées.

| | | |
|--|---------------------|---|
| Purification de la XOR | Matériel biologique | Lait maternel humain |
| | Apareillage | Agitateur - centrifugeuse - Boudin de Dialyse - colonne (1 cm X 6 cm) d'héparine en solubilisé sur agarose perlé réticulé 4% (Sigma, type I) - colonne Hi-Trap mono-Q-ion-exchange (Pharmacia) - spectrophotomètre - colonne (30 x 32.6 cm) d'hydroxyapatite (Hypatite C, Clarkson, Williamsport, PA, USA) - CF11 cellulose (Whatman, Maidstone, Kent, UK) - colonne (36 x 2.6) de Sephadex G25 grossier (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suède) - Colonne DE52 (11x 6 cm) (Whatman) - Filtre seringue 0,22 µm - pH mètre. |
| | Produits chimiques | EDTA - PMSF - salicylate de sodium - K ₂ HPO ₄ - butanol - SA - NaCl - Na / Bicine - azote liquide - Xanthine - 2-mercaptoethanol - iso-butanol - Na ₂ HPO ₄ - NaH ₂ PO ₄ - NaOH - KOH - KH ₂ PO ₄ - BSA (tous les produits de Sigma, Poole, UK). |
| Purification des ACs polyclonaux anti XOR | Matériel biologique | Lapins blanc de New Zealand - XOB - ACs anti- MFGM - ACs secondaires biotinylés anti-lapin (Sigma). |
| | Apareillage | Colonne Sepharose-4B activé par le bromure de cyanogène 4B (Pharmacia, Inc). une colonne (16 × 1,5 cm) xanthine oxydase / Sépharose 4B - membrane de nitrocellulose. |
| | Produits chimiques | Glutaldéhyde - Tris / HCl - NaCl - thiocyanate de sodium - PMSF - Acide 6-amino-n-caproïque - la kallikréine de l'aprotinine - Agarose - AIF et ACF (Gibco, Grand Island, NY, USA)- SDS - PAGE - caséine - extravidine peroxydase conjuguée (Sigma) - 4-chloro-1-naphtol. |
| Dosage de la XOR | Matériel biologique | Antisérums de la XOH - liquide synovial (SF) -sérums - ACs anti-IgG du lapin marqué à la peroxydase de raifort (HRP) |
| | Apareillage | microplaque - lecteur de microplaques Biorad modèle 450 - Multimicropipette - chromatographie en couche mince sur cellulose microcristalline (Avicel ®) - compteur à scintillation liquide Packard Tricarb modèle 3380 - un spectrophotomètre à fluorescence Perkin-Elmer (modèle MPF-3) - un porte-cuve thermostaté - d'un enregistreur continu - un bain marie - chimiluminomètre Berthold LB 953 C - appareil HPLC LC-6A (Shimadzu, Kyoto, Japon), d'un moniteur à fluorescence (RF 530, Shimadzu) - enregistreur Chromatopac C-R3A (Shimadzu) - colonne Wakosil 5C18-200 (200x 4.6 mm I.D.) (Wako) - Tube à EDTA - colorimètre. |
| | Produits chimiques | Orthophénylènediamine (OPD) - acide sulfurique (H ₂ SO ₄) - carbonate de sodium - PBS Tween 20 - BSA - caséine - XOH - sérum de lapin anti-XOH -phosphatase alcaline conjugué (Sigma) anti-lapin - (4-nitrophényl phosphate - le tampon diéthanolamine - hydroxyde de sodium (NaOH) [8- ¹⁴ C] hypoxanthine - acide perchlorique - n-butanol - méthanol - H ₂ O - hydroxyde d'ammonium - lumière ultraviolette - solution de Bray - 2-amino-4-hydroxypteridine - EDTA - bleu de méthylène - quinine de sulfate - xanthine - lucigénine - acide diéthylènetriamine-penta-acétique - acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine ethane sulfonique - l'isoxanthoptérine - Tris-HCl - ptérine - carbonate de potassium - sulfate de cuivre - xanthine - un tampon glycine - le réactif de folin du phénol - BSA - Amplex® Red Xanthine / XO AssayKit (A22182, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) - H ₂ O ₂ - HRP. |

ملخص

ينصب اهتمام عملنا على فحص XOH في الحالة الفسيولوجية في مصل الأشخاص الأصحاء المصنفين حسب الجنس والعمر والتدخين بواسطة ELISA double sandwich. تم إجراء تنقية الإنزيم من حليب الأم عن طريق chromatographie d'affinité على هلام agarose – héparine ، بسبب وباء كورونا العالمي ، توقف عملنا ، لذلك كان علينا إجراء دراسة مقارنة بين مختلف طرق التنقية لإنتاج الاجسام المضادة وقياس ال XOR . قارنا بين طرق تنقية الإنزيم ، فيما يتعلق بالطريقة المحاليل المستخدمة والنتائج المتحصل عليها ، توصلنا إلى استنتاج مفاده أن تنقية ال XOR من الحليب تبدأ بعزل اغشية الكريات الدهنية ، تليها سلسلة من الترسيبات التفاضلية للحصول على مستخلص بروتيني نقي تتم تنقيته بواسطة chromatographie d'affinité ، مما يضمن أعلى نسبة نقاوة له . بالنسبة لإنتاج الاجسام المتعددة النسيلة المضادة لـ XOR ، قدمنا نظرة في التحصين مثل اختيار الحيوانات الجرعة والمعززات. فيما يتعلق بقياس الإنزيم، وجدنا أن ال XOR يقاس في سوائل بيولوجية مختلفة مثل المصل والسائل الزليلي بمجموعة متنوعة من الطرق بما في ذلك ELISA double sandwich والتي هي محل اهتمامنا، وأخيراً وجدنا أنه يتدخل في أمراض مختلفة، وبمستويات أعلى في الأمراض الالتهابية والكبد مقارنة بالأمراض الأخرى.

الكلمات المفتاحية: XOH، ELISA double sandwich، chromatographie d'affinité، الأمراض الالتهابية.

Résumé

L'intérêt de nos travaux est de doser le XOH à l'état physiologique dans les sérums de sujets sains regroupés selon le sexe, l'âge et le tabagisme par ELISA double sandwich. La purification de l'enzyme a été réalisée à partir du lait maternel par chromatographie d'affinité sur un gel d'agarose-héparine, en raison de la pandémie mondiale corona notre travail a été arrêté, nous avons donc dû faire une étude comparative entre les différentes méthodes de purification, production d'antisérum et de dosage de la XOR. Nous avons comparé entre les protocoles de purification d'enzyme, en ce qui concerne la méthode, les solutions utilisées et les résultats obtenus, nous sommes arrivés à la conclusion que la purification de la XOR à partir du lait commence par l'isolement des globules gras, suivie d'une série des précipitations différentielle pour obtenir l'extrait protéique pure qui va purifier par une chromatographie d'affinité, ce qui garantit le plus haut son rapport de pureté. Pour la purification des ACs polyclonaux anti-XOR nous avons donné un aperçu sur l'immunisation comme le choix d'animal, la dose, et les rappels. En terme du dosage, nous avons constaté que la XOR est mesuré dans différent liquide biologiques telles que le sérum et le liquide synovial et avec une variété des méthodes y'a compris l'ELISA double sandwich qui nous intéresse, enfin, nous avons trouvé qu'elle est impliquée dans diverses maladies, et à des niveaux plus élevés dans les maladies inflammatoires et hépatiques par rapport à d'autres maladies.

Mots clés : XOH, ELISA double-sandwich, chromatographie d'affinité, maladies inflammatoires.

Abstract

The interest of our work is to assay the XOH in the physiological state in the sera of healthy subjects grouped according to sex, age and smoking by double sandwich ELISA. The purification of the enzyme was carried out from breast milk by affinity chromatography on an agarose-heparin gel, due to the global corona pandemic our work was stopped, so we had to do a comparative study between the various methods of purification, production of antiserum and determination of XOR. We compared between the enzyme purification protocols, with regard to the method, the solutions used and the results obtained, we came to the conclusion that the purification of XOR from milk begins with the isolation of blood cells. fat, followed by a series of differential precipitations to obtain the pure protein extract which will purify by affinity chromatography, which guarantees the highest its ratio of purity. For the purification of anti-XOR polyclonal ACs we have provided insight into immunization such as animal choice, dose, and boosters. In terms of the assay, we found that the XOR is measured in different biological fluids such as serum and synovial fluid and with a variety of methods including the double sandwich ELISA which interests us, finally, we found that 'it is implicated in various diseases, and at higher levels in inflammatory and hepatic diseases compared to other diseases.

Key words: XOH, double-sandwich ELISA, affinity chromatography, inflammatory diseases.