



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 :

Amel KASSIMI

Fatima Zahra MERABTI

Le : mardi 9 juillet 2019

Thème

Etude de l'influence de quelques facteurs (sexe, âge et tabagisme) sur la concentration de la xanthine oxydase humaine

Jury :

Dr.	Widad BOUGUENOUNE	MCB	Université de Biskra	Président
Dr.	Hayat TRABSA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mr.	Yacine DERRADJI	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Avant tout, louange à ALLAH le Tout Puissant de nous avoir aidé à réaliser ce travail.

*Nous remercions infiniment notre encadreur **Dr. TRABSA Hayat** enseignante dans la département de la biologie à l'université de MOHAMED KHEIDER BISKRA pour tout ce qui a fait afin que nous finissions ce travail dans le délai prévu, nous le remercions pour ses conseils, ses informations ainsi pour sa patience durant ce semestre de formation.*

*Nous remercions les membres du jury pour avoir accepté de juger notre travail Président **Dr. BOUGUENOUNE Widad** et spécialement Examineur **Mr. DERRADJI Yacine** pour sa disponibilité dans les moments où nous avons besoin et encouragements continus.*

*Nous voudrions remercier **Mm. ZAKRI Wissem** et tous les responsables de laboratoires de biologie «Université Mohamed Kheider-Biskra», surtout **Mm. Salîha, Mm. Moufida, Mr. Abdellah, Mr. Walid, Mr. Abdelkader** et tous qui nous aident pour réaliser ce travail, Les fonctionnaires du Bibliothèque de département de science de la nature et de la vie surtout **Mr. Walid** et **Mr. Mohamed** sans oublier le fonctionnaire de scolarité **Mr. Mohcen**, merci tous pour votre patience. Nous trions à remercier nous collègues **Romaïssa, Ibtissem, Kawther** et **Salah** pour ses collaborations et leur aide durant la période de pratique.*

*Nous remercie également nous frères **Djeribiai Amor** et **Gouttaya Abdel Hakim**, nous amies **Imane, Meriem** et **Houda** pour leur aident durant la période de notre étude.*

*Notre remerciement à tous ceux qui ont contribué à ce travail, en particulier à **Mr. BELOMRI Ali** et **Mr. ZERROUKHI Abdrazek**, pour les échantillons de lait, aussi à tous les donneurs pour les échantillons de sang*

...Merci beaucoup



Dédicace

À mes parents **Zahia** et **Salim** que Dieu les protège :

En témoignant de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissants. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour la meilleur récompense ;

À mes chers frères **Mebarek** et **Roudwane** ;

À ma chère sœur **Ferdous** ;

À mes chers grands-mères : **Fatma** et **Cherifa** ;

À ma chère tante **Rachida** ;

À toute mes chères tantes et leurs familles ;

À mes chers cousins et leurs familles ;

À mes chers oncles et leurs familles ;

À mon binôme **Fatima Zahra** et à sa famille ;

À tous mes proches : **Sameh M.** ; **Nesrine** et **Nabila k.** ; **Rima**, **Anis** et **Amir L.** ; **Riheb** et **Oussama Y.** ; **Soumia M.** ; **Farida S.** ; **Saliha A.** et **Hizia H.**

À tous mes collègues de la promotion de Biochimie Appliquée 2019.

Je leur dédie ce modeste travail

...Amel



Dédicace

À mes parents **Noura** et **Djemoui** que Dieu les protège :

En témoignant de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissants. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour la meilleur récompense ;

À mon chère frère **Ali** ;

À ma chère sœur **Bouthaina** ;

À ma chère grand-mère : **Djema** ;

À ma chère tante **Houria** et son marie **Ali** ;

À toute mes chères tantes et leurs familles ;

À mes chers cousins et leurs familles ;

À mes chers oncles et leurs familles ;

À mon binôme **Amel** et à sa famille ;

À tous mes proches : **Nadia B.** ; **Linda M.** ; **Fatima, Nissrin et Hanan M.** ;
Salifa A. ; **Farida S.** et **Hizia H.**

À tous mes collègues de la promotion de *Biochimie Appliquée 2019.*

Je leur dédie ce modeste travail.

...Fatima Zahra

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Table des matières I

Liste des tableaux III

Liste des Figures IV

Liste des abréviations V

Introduction 1

Chapitre 1 : Xanthine oxydoréductase 2

1.1. Définition..... 2

1.2. Distribution et localisation..... 2

1.3. Gène de la XOR 2

1.4. Structure de la XOR 3

1.5. Formes de la XOR..... 4

1.6. Implication de la XOR 5

1.6.1. Implications physiologiques..... 5

1.6.2. Implications pathologiques 6

1.7. Anticorps anti-XOR 8

Chapitre 2: Matériel et Méthodes..... 9

2.1. Matériel..... 9

2.1.1. Matériels biologiques..... 9

2.1.2. Produits chimique 9

2.1.3. Appareillage 9

2.2. Méthodes 10

2.2.1. Purification de la XOB..... 10

2.2.2. Production et purification des Acs anti-XOB.....	11
2.2.2.1. Immunisations des lapins.....	11
2.2.2.2. Précipitation et purification des Acs anti-XOB	11
2.2.3. Dosage de la XOH dans le sérum des personnes saines regroupées en fonction de sexe, âge et tabagisme par ELISA double sandwich.....	12
2.2.4. Etude statistique.....	14
Chapitre 3: Résultats et discussions.....	15
3.1. Purification de la XOB	15
3.2. Production et purification des Acs anti-XOB	17
3.3. Dosage de la XOH dans le sérum des personnes saines regroupées en fonction de sexe, âge et tabagisme par ELISA double sandwich	18
Conclusion	21
Références	22
Annexes	23
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1. Groupes des sujets sains utilisés pour le dosage de la XOH.9

Tableau 2. Concentration de la XOR sérique chez les sujets sains.20

Liste des Figures

Figure 1. Localisation de gène de la XOR.	3
Figure 2. Domaines constituant une sous unité de la XOR	3
Figure 3. Structure cristalline du XOR bovine.....	4
Figure 4. Modèle de structure de la XDH et XO.....	4
Figure 5. Réactions d'oxydoréduction catalysée par les 2 formes de la XOR	5
Figure 6. La réduction des nitrites en NO par le centre molybdoptérine de la XOR	6
Figure 7. Rôle du XO dans le stress oxydatif cellulaire	7
Figure 8. Relation entre la fumée de cigarette, les ERO et la XO.....	8
Figure 9. Protocole de chromatographie de la XOB.	11
Figure 10. Protocole de chromatographie des Acs anti-XOB.....	12
Figure 11. Protocole d'ELISA double sandwich utilisé pour le dosage de la XOH.....	13
Figure 12. Chromatogramme de purification de la XOB..	16
Figure 13. Spectre d'absorption UV. visible de la XOB purifiée.	16
Figure 14. Chromatogramme de purification des Acs anti-XOB.....	18
Figure 15. Courbe d'étalonnage utilisé pour déterminer la concentration de la XOH.....	19
Figure 16. Histogramme de concentration de la XOH déterminés par technique d'ELISA double sandwich.....	20

Liste des abréviations

ACF	Adjuvant Complet de Freund
Acs	Anticorps
Ag	Antigène
AIF	Adjuvant Incomplet de Freund
ATP	Adénosine Triphosphate
BSA	Albumine de Sérum Bovine
CNBr	Bromure de cyanogène
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERO	Espèces Réactives d'Oxygène
F.A	Femme Adulte
FAD	Flavine Adénine Di-nucléotide
F.J	Femme Jeune
H.A.fu	Homme Adulte fumeur
H.A.Nfu	Homme Adulte Non fumeur
H.J.fu	Homme Jeune fumeur
H.J.Nfu	Homme Jeune Non fumeur
Ig	Immunoglobulines
Mo-pt	Molybdène-Ptérine
NAD⁺	Nicotinamide Adénine Di-nucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Di-nucléotide réduit
NO	Oxyde Nitrique
OPD	O-Phénylènediamine Dichlorhydrate
PBS	Tampon Phosphate Sodium
PBS-Tw 20	Tampon Phosphate de Sodium contenant Tween
RPF	Rapport Protéines Flavine
S.A	Sulfate d'Ammonium
TNF-α	Facteur de Nécrose Tumorale α
XDH	Xanthine Déshydrogénase
XO	Xanthine Oxydase
XOB	Xanthine Oxydase Bovine

XOH	Xanthine Oxydase Humaine
XOR	Xanthine Oxydoréductase

Introduction

Introduction

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdoflavoenzyme à plusieurs implications physiologiques et pathologiques mais son rôle principal dans le catabolisme des purines en acide urique. La XOR existe sous deux formes inter-convertibles, la xanthine déshydrogénase (XDH), et la xanthine oxydase (XO) (Battelli *et al.*, 2018). Cette dernière est ubiquitaire mais la meilleure source qui caractérise la XO est sans aucun doute cela a purifié du lait bovine (XOB) (Harrison, 2002).

Des études ont montré que le taux de la XO est augmenté dans plusieurs maladies qui se caractérisent par un processus inflammatoire tel que les maladies rhumatismales, pulmonaires, cardio-vasculaire, hépatiques, et neuro-dégénérative (Miesel et Zuber, 1993).

Le manque total des recherches qui travaillés sur le dosage de XO à l'état physiologique nous pousse de réaliser cette étude qui base sur l'évaluation d'une méthode de dosage immunologique appelé Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) double sandwich de taux de la xanthine oxydase humain (XOH) dans les sérums des personnes sains. Ce test de dosage a une importance sur le plan scientifique. Il est intéressé à étudier l'influence des facteurs de sexe, âge (2 catégorie : jeune et adulte) et tabagisme sur le taux sérique de la XOH au temps que les autres études sont intéressées à étudier l'augmentation de la concentration d'enzyme à l'état pathologique (Heunks *et al.*, 1999 ; Smelcerovic *et al.*, 2015).

Afin de réaliser cette étude, nous avons collectés les échantillons de sérum puis en a purifié la XO à partir de lait bovin par une série de précipitation puis sa purification par la chromatographie d'affinité. L'enzyme pure est utilisée pour la production des anticorps (Acs) anti-XOB qui sont purifiés, après une précipitation différentielle par sulfate d'ammonium (S.A) sur une chromatographie immuno-affinité. L'enzyme et les Acs pures sont utilisés pour le dosage de la XOH dans le sérum des sujets sains par la technique d'ELISA double sandwich.

Donc notre travail fixé quatre objectives : (1) Collection des échantillons de sérum des personnes sains ; (2) Purification de XO à partir le lait bovine ; (3) Production des Acs anti-XOB ; (4) Dosage de la XOH dans les sérums humaines par ELISA double sandwich.

Partie 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Xanthine oxydoréductase

Chapitre 1 : Xanthine oxydoréductase

1.1. Définition

La XOR est un complexe molybdoflavoenzyme, qui a été identifié pour la première fois dans le lait bovine (Battelli *et al.*, 2018), son extraction facile à partir du lait (Harrison, 2002) où elle constitue une composante majeure de la membrane des globules gras du lait (McManaman et Bain, 2002).

Elle joue un rôle très important dans le catabolisme des purines, où elle catalyse la transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis de la xanthine en acide urique (antioxydant) (Vorbach *et al.*, 2003).

1.2. Distribution et localisation

La XOR est une enzyme présente chez la plus part des êtres vivants (Cantu *et al.*, 2013). Chez les mammifères, l'activité de cette enzyme est largement distribuée, avec des niveaux les plus élevés étant trouvés dans le foie et l'intestin (Pacher *et al.*, 2006) ainsi détectée dans l'épithélium et l'endothélium des glandes mammaires, et l'endothélium du cœur, poumons, et reins (Hancock *et al.*, 2002).

Chez l'homme la XOR a été détecté principalement dans : les cellules endothéliales des capillaires sanguins, le tissu pulmonaire, la glande mammaire, le foie et la muqueuse intestinale et en faibles activités dans muscle squelettique, cœur et cerveau. (Al-Khalidi et Chaglassian, 1965). Hellsten Westing aussi détecté la XOR dans les macrophages humains (Dejong *et al.*, 2000).

1.3. Gène de la XOR

Le gène codant pour la XOR humain est situé sur le bras court du chromosome 2 dans la bande p22 (Xu *et al.*, 1994) comme il est mentionné dans la figure 1. Il est de 60 Kb, comporte 36 exons et 35 introns (Xu *et al.*, 1996). L'ARN_m de XOR contient une armature ouverte de la lecture à 3999 Pb codant pour 1333 acide aminés (Xu *et al.*, 1994). L'augmentation de l'expression de gène de la XOR en fin de grossesse est maximale suivante à la parturition, les niveaux de la transcription sont élevés jusqu'au 7^{ème} jour de la période de lactation (Kurosaki *et al.*, 1996).

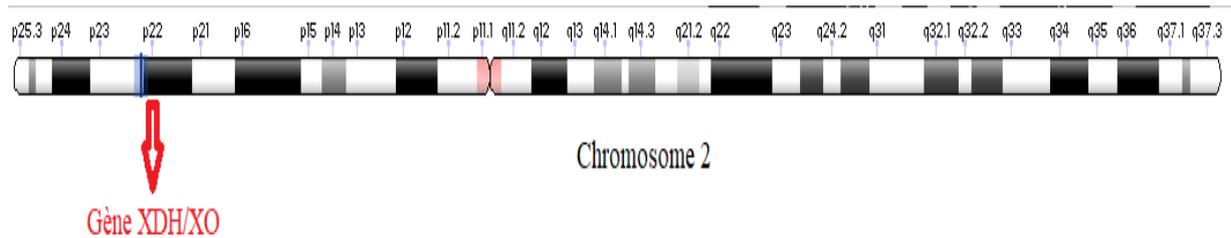


Figure 1. Localisation de gène de la XOR (NCBI, 2019).

1.4. Structure de la XOR

La forme active de cette enzyme se produit comme un homo-dimère de poids moléculaires de 300 KDa. Chaque sous-unité de l'enzyme contient un cofacteur molybdène-ptérique (Mo-pt), deux centres fer-soufre ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$) distincts et un cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) (Schmidt *et al.*, 2019), comme il est mentionné dans la figure 2. Les électrons sont donnés à partir de tels substrats au site de molybdène de XOR et sont rapidement équilibrés entre les centres redox avant d'être transmis au NAD^+ ou à l'oxygène moléculaire au site du FAD. Réduction de NAD^+ donne NADH, et celui de l'oxygène moléculaire donne du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et anion superoxyde (O_2^-) (Harrison, 2004). Le transport d'électrons est assuré par les deux centres $\text{Fe}_2\text{-S}_2$, puis par une molécule de FAD et enfin au NAD^+ ou O_2 (Okamoto *et al.*, 2013), comme il est présenté dans la figure 3.

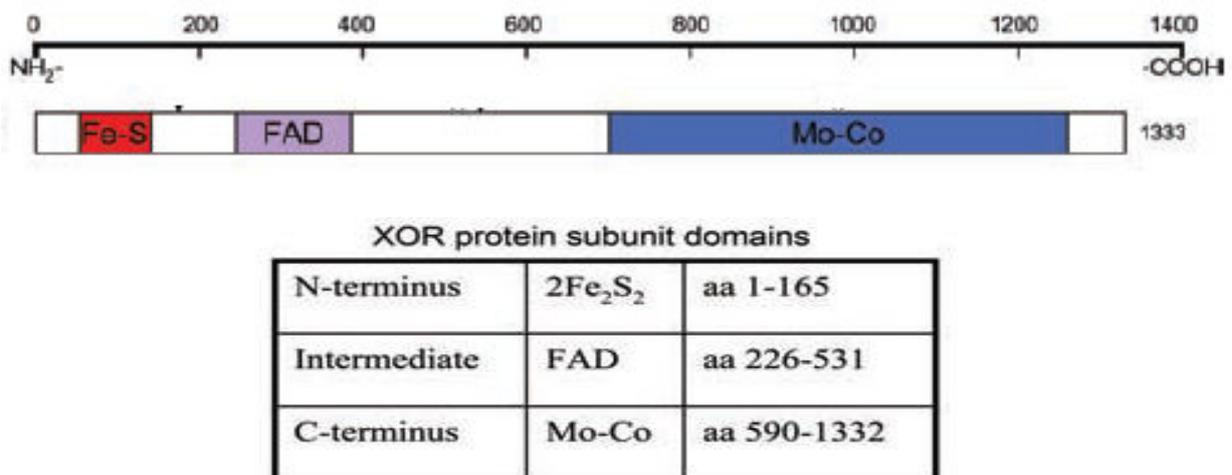


Figure 2. Domaines constituant une sous unité de la XOR (Berry et Hare, 2004). Le domaine N-terminal (1-165 acides aminés) est composé de deux sous domaines avec un centre fer-soufre ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$) pour chaque un. Le domaine intermédiaire (226-531 acides aminés) contient une molécule FAD. Le domaine C-terminal est le plus large (590-1332 acides aminés) et où siège le cofacteur du molybdène (Harrison, 2002).

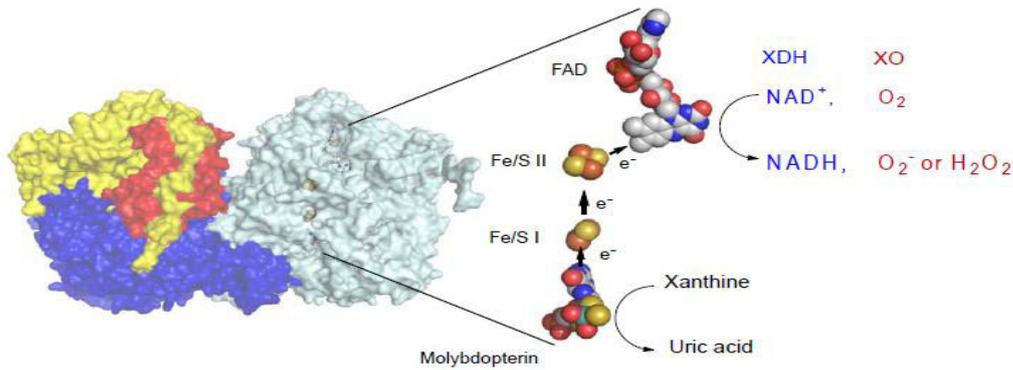


Figure 3. Structure cristalline du XOR bovin. La gauche; Structure homodimère du XOR bovin. Les domaines N-terminal (en rouge), C-terminal (en bleu) et intermédiaire (en jaune) contiennent les centres fer-soufre, la molybdoptérine et les centres FAD. Droite: arrangements cofacteurs de l'enzyme. Les flèches indiquent les directions du flux d'électrons pendant la catalyse. Le FAD réduit réagit avec le NAD^+ ou l'oxygène pour produire du NADH, du H_2O_2 ou de l' O_2^- . (Okamoto *et al.*, 2013).

1.5. Formes de la XOR

La XOR existe sous deux formes inter-convertibles : XDH (EC 1.17.1.4) et XO (EC 1.17.3.2) (Battelli *et al.*, 2018). La forme prédominante *in vivo* est la forme déshydrogénase à pour résultat la synthèse de l'acide urique, XDH est convertie en XO lors des conditions pathologiques ou au cours des procédés de purification (Martin *et al.*, 2004) Cette conversion se fait soit d'une manière réversible par oxydation des groupements sulfhydrile (SH) ou irréversible par protéolyse (Figure 4) (Day *et al.*, 2016). La XDH réduit préférentiellement le NAD^+ que l' O_2 , tandis que la XO ne peut pas réduire le NAD^+ , préférant l' O_2 (Figure 5). Donc la XDH, utilise NAD^+ comme accepteur des 2 électrons provenant de la purine oxydée, tandis que la XO transfère ces $2e^-$ à 2 molécules d' O_2 . La réduction de l' O_2 par l'une ou l'autre forme d'enzymes donne l' O_2^- et l' H_2O_2 (Tziomalos et Hare, 2009).

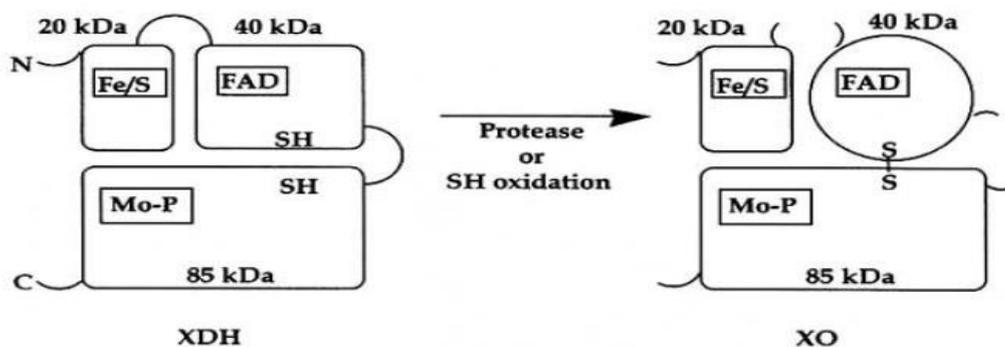


Figure 4. Modèle de structure de la XDH et XO (Borges *et al.*, 2002).

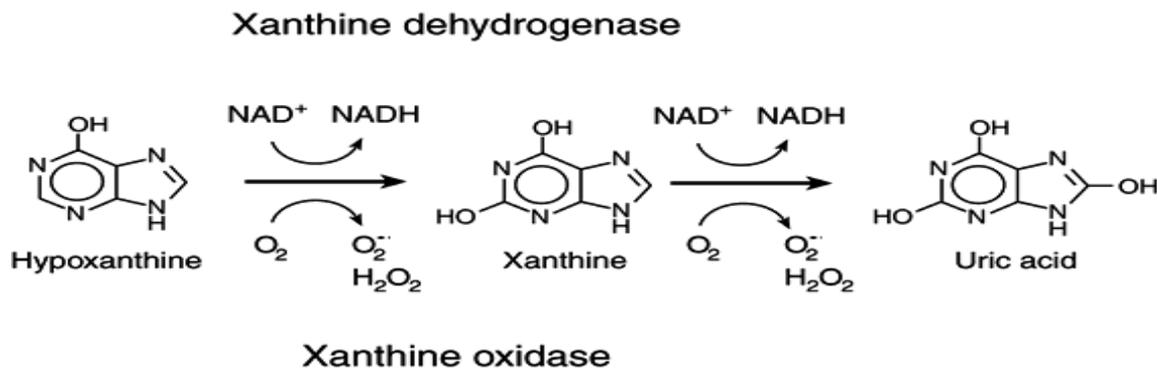


Figure 5. Réactions d'oxydoréduction catalysée par les 2 formes de la XOR (XDH et XO) (Day *et al.*, 2016).

1.6. Implication de la XOR

1.6.1. Implications physiologiques

La XOR joue un rôle principal dans le catabolisme des purines en acide urique, mais elle a aussi d'autres fonctions plus larges dans la physiologie de l'organisme tel que son rôle dans : l'absorption du Fer au niveau de l'intestin et du foie (Yoshimitsu *et al.*, 2003), production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui ayant un rôle essentiel dans la signalisation intra et intercellulaire, production de l'acide urique qui joue un rôle d'antioxydant dans le sérum (Harrison, 2004), fonction immunitaire via les produits de son action (l'acide urique et les radicaux libres) qui participer dans l'amplification de réaction inflammatoire (Vorbach *et al.*, 2003), fonction bactéricides dans des conditions hypoxiques, réduction de nitrite inorganique à l'oxyde nitrique (NO) une molécule de signalisation avec des propriétés bactéricides (Figure 6) (Muzychka *et al.*, 2017), activité antimicrobienne par le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène générés par la XOR de lait humain et bovine (Granger, 1988).

Aussi à un rôle important dans la protection cellulaire contre les composants toxiques par l'élimination d'azote (Hancock *et al.*, 2002).

Le métabolisme du NO chez l'homme, permet de créer aujourd'hui des nouvelles opportunités thérapeutiques pour la gestion des plusieurs conditions pathologiques, y compris l'ischémie, dysfonctionnements cardiovasculaire, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, hypertension pulmonaire, infection et également dans la transplantation d'organes solides (Maia et Moura, 2018).

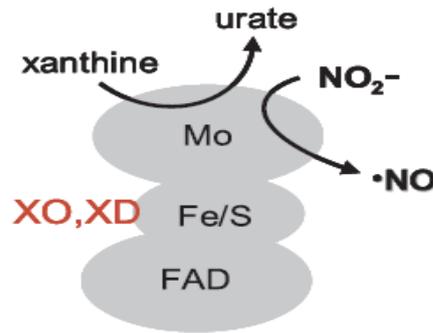


Figure 6. La réduction des nitrites en NO par le centre molybdoptérine de la XOR (Maia et Moura, 2018).

1.6.2. Implications pathologiques

La XOR favorise le processus d'oxydation hypoxanthine / xanthine et réduction des nitrates / nitrites pour générer des ERO qui seraient liées à environ 150 maladies humaines, qui peuvent causer des dommages à l'ADN et augmenter le risque de tumeurs malignes (Liu *et al.*, 2018). Les ERO qui généré par la XOR réagir avec les composés de la membrane cellulaire, tel l'acide arachidonique, pour produire des lipides chimioattractants des neutrophiles et amplifiant la réponse inflammatoire (Pacher *et al.*, 2006).

L'inflammation est une réaction physiologique de défense contre les invasions externes mais elle peut s'amplifier d'une manière incontrôlable conduisant à l'apparition de différents désordres et maladies inflammatoires (Washio *et al.*, 2017). Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents médiateurs inflammatoires, tels que le facteur de nécrose tumorale ($\text{TNF-}\alpha$), qui provoquent la conversion de la XDH en XO (Battelli *et al.*, 2018), Les neutrophiles activés causent également une conversion irréversible de la forme XDH en forme XO dans les cellules endothéliales (Bolognesi *et al.*, 2019).

Le système enzymatique XO joue aussi un rôle prépondérant dans le stress oxydatif cellulaire. Lors de la phase d'ischémie, il y a un phénomène d'accumulation des purines (hypoxanthine et xanthine) par catabolisme accru d'adénosine triphosphate (ATP). Durant la période de réperfusion, l'apport massif d'oxygène entraîne une accélération des réactions enzymatiques de la XO. Les métabolites, normalement transformés en acide urique, vont participer à la synthèse des radicaux libres type superoxyde. Ces derniers vont activer d'autres radicaux libres et les polynucléaires neutrophiles (PNN). Les PNN vont sécréter des protéases. Les protéases et les radicaux libres sont responsables de la lyse cellulaire (Mercier et Perrotin, 2003) Comme il est montré dans la figure 7.

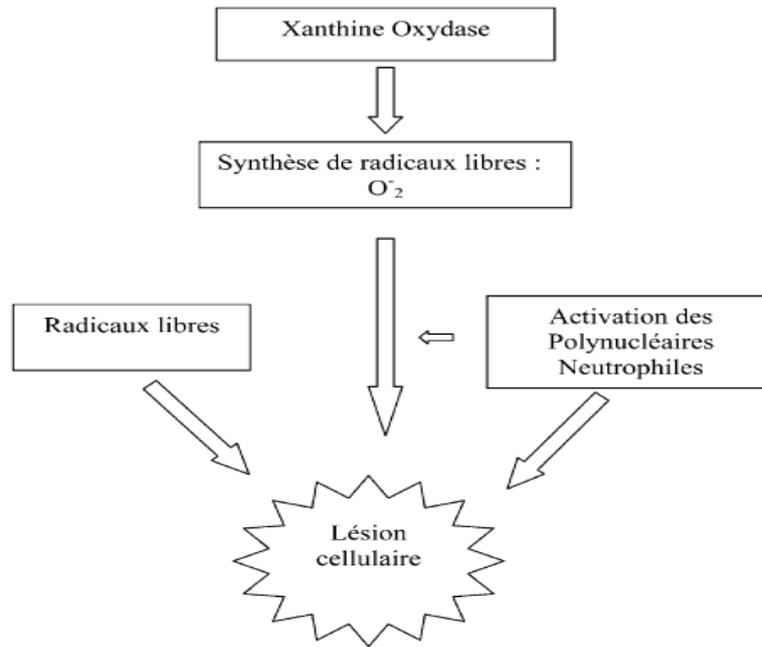


Figure 7. Rôle du XO dans le stress oxydatif cellulaire (Mercier et Perrotin, 2003).

Dans l'arthrite rhumatoïde, la XOR amplifie l'inflammation synoviale conduisant à l'érosion de l'os et la propagation de la maladie (Bradley *et al.*, 1997).

Cliniquement, la XO a été liée à la goutte, une affection dans laquelle l'acide urique s'accumule dans les reins et les articulations (Battelli *et al.*, 2018).

L'hyperuricémie est un état pathologique qui résulte de la surproduction (par la XOR) ou l'excrétion (par les troubles des tubules rénaux) d'acide urique qui forme des cristaux microscopiques insolubles dans les vaisseaux capillaires des articulations (Chen *et al.*, 2016). Ces cristaux provoquent une inflammation et une douleur aiguë ce qui donne une maladie s'appelle l'arthrite goutteuse aiguë (Day *et al.*, 2016).

Une étude montrée que la réduction de l'expression du gène de la XOR chez les souris augmente l'accumulation des lipides dans les adipocytes, accompagnée d'une augmentation du stress oxydatif, et induit l'obésité avec résistance à l'insuline à un âge avancé (Furuhashi *et al.*, 2019).

Ainsi une autre étude montrée une relation entre la fumée de cigarette et l'implication pathologique de la XO, où les ERO générées de fumée de cigarettes entraînent une inflammation, par le recrutement des macrophages et neutrophiles inflammatoires. Ces macrophages et neutrophiles produisent des ERO supplémentaires par le biais de l'action d'enzymes, y compris la XO, NADPH oxydase et Myélo-péroxydase (MPO), qui contribuent à l'oxydation d'ADN, le dysfonctionnement et l'inflammation des poumons (Figure 8), qui résulte en une maladie pulmonaire obstructive chronique (Thatcher *et al.*, 2013).

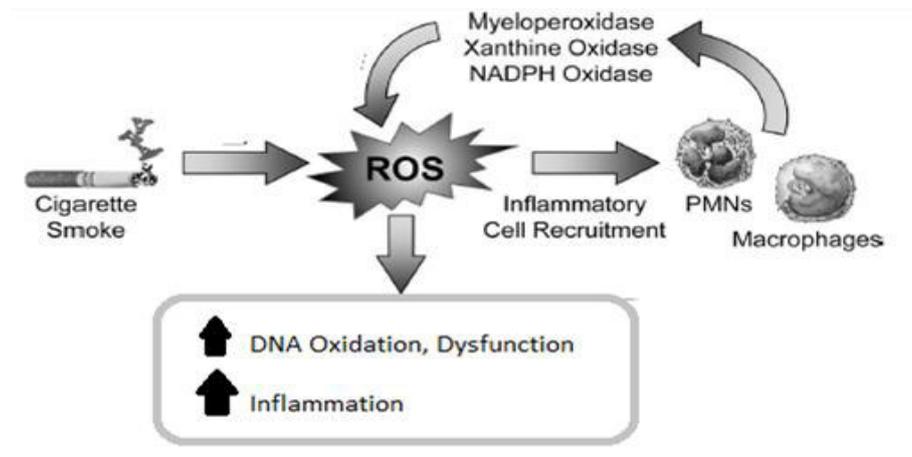


Figure 8. Relation entre la fumée de cigarette, des ERO et la XO (Thatcher *et al.*, 2013).

1.7. Anticorps anti-XOR

L'origine des Acs anti-XOR est largement discuté, deux hypothèses ont été proposées : la première hypothèse dit que les Acs anti-XOR produits chez l'homme sont des auto-Acs générés contre la XOR endogène libérée par les cellules endothéliales des capillaires endommagés (Harrison, 2006) ou les lésions du foie dans la circulation sanguine (Martin *et al.*, 2004). Alors que la deuxième hypothèse est basée sur la consommation du lait, la XOR du lait bovin consommée traverse la barrière intestinale sous forme liée à la membrane des globules gras de lait vers le sang, donc la XOR de lait de vache ingérée est immunogène (Harrison, 2006).

Partie 2

Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matériels biologiques

Lait : le lait bovin est fraîchement obtenu d'une vache d'une ferme locale à Sidi-Okba-Biskra, et traité directement à l'arrivée au laboratoire pour la purification de la XO.

Animaux : Deux lapins males de race *Albinos* pesant de 1.8 Kg et 2.8 Kg, sont mis en adaptation avant l'expérience durant une période de 10 jours, l'immunisation est réalisé par la XO purifié en 2018 stocké en -20 C° avec un RPF = 5.14.

Sérums humains : les sérums des sujets sains, regroupé selon le sexe, l'âge et tabagisme (Tableau 1), les prélèvement réalisé à la polyclinique HLM.

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

Groupe	Code	Age	Abréviation	Nombre
1	F.J	23-32	Femme jeune	10
2	F.A	43-53	Femme adulte	10
3	H.J.Nfu	20-25	Homme jeune non fumeur	8
4	H.J.fu	20-25	Homme jeune fumeur	8
5	H.A.Nfu	30-55	Homme adulte non fumeur	10
6	H.A.fu	30-55	Homme adulte fumeur	10

2.1.2. Produits chimique

Albumine bovine sérum fraction V, Bleu de Coomassie G250 (C₄₇H₄₈N₃NaO₇S₂), Ethylène Diamine Tetraacétique Acide di-sodium (E.D.T.A. di-sodium), Sodium azide (NaN₃), Sulfate d'ammonium (H₈N₂O₄S), Tris-(hydroxymethyl) amino méthane C₄H₁₁NO₃ (**BIOCHEM**), Acide phosphorique 85-88% , Acide sulfurique 95-97%, Chlorure de Sodium (NaCl) (**Fluka**), Di-sodium hydrogène phosphate anhydre (Na₂HPO₄) et Sodium dihydrogène phosphate anhydre (NaH₂PO₄) (**PROLABO**), Adjuvant complet de Freund, Adjuvant incomplet de Freund, Anticorps marqué (Anti IgG humain) et non marqué (Anti-XOH), 1-Butanol 99.9% , Ethanol 96%, Gel d'agarose-héparine, HCl 1N, Potassium phosphate dibasique (K₂HPO₄), Sépharose, Tween 20 (**SIGMA-ALDRICH**).

2.1.3. Appareillage

Agitateurs magnétique (HANNA), Centrifugeuse 4 °C (Hettich ZENTRIFUGEN MIKRO 200 R), Colonne de chromatographique, Balance normale (Scout SE-OHAUS),

Balance de précision (KERN-ABJ, Max 220g- Min 10mg), Incubateur de plaque HEIDOLPH, Lecteur de microplaque (ELx808, BioTeK), pH mètre (checker by HANNA), Plaque ELISA, Pompe (Masterflex L/S), Spectrophotomètre (UV-2005 J.P.SELECTA).

2.2. Méthodes

2.2.1. Purification de la XOB

La purification de la XO du lait bovine est réalisée selon la méthode de Baghiani *et al.* (2003) avec une légère modification. Toutes les étapes sont effectuées à 4 °C.

Le lait bovine frais est centrifugé à 14000 rpm pendant 5 min, la crème flottante est dissoute dans un volume double de tampon phosphate de potassium (K_2HPO_4 , 0,2 M) contenant 1 mM d'EDTA, Le mélange a été soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugée à 6000 rpm pendant 20 min. Addition progressive de 15 % (V/V) du butanol froid (4 °C) au surnageant récupéré puis 15 % (P/V) de S.A, laissé le mélange sous agitation douce pendant 1 heure et 30 min, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min. La XOB a été précipitée par l'ajout progressif de S.A 20 % (P/V), sous agitation douce pendant une nuit, puis une centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min. Le précipité (culot) a été récupéré doucement et dissoute dans un petit volume de tampon phosphate de sodium (PBS) (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 25 mM, pH 6,2) contenant 1 mM d'EDTA et dialysé (2 fois) contre le même tampon pendant une nuit sous agitation. Le dialysat a été centrifugé à 14000 rpm pendant 60 min. le produit final constitue l'extrait brut de la XOB.

L'extrait brut obtenu est déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'agarose-héparine, avec un débit de la phase mobile de 0,06 ml/min, la colonne est en suite lavée par le tampon PBS.

La XOB est récupérée de la colonne par le tampon PBS contenant 0,4 M de NaCl, La collection a été faite manuellement avec une vitesse de 1 tube (0,48 ml/8min) et la détection d'élution a été réalisée manuellement en utilisant un réactif de dosage des protéines (réactif de Bradford) (Annexe 1). Les étapes de chromatographie de la XOB sur gel d'agarose-héparine sont illustrées dans la figure 9. Ensuite, la XOB pure est dialysée deux fois contre le tampon PBS, pendant une nuit. Enfin, l'enzyme est répartie dans des eppendorf de 1,5 ml et conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation.

La pureté de l'enzyme purifiée est contrôlée par un balayage spectrophotométrique (UV-Visible).

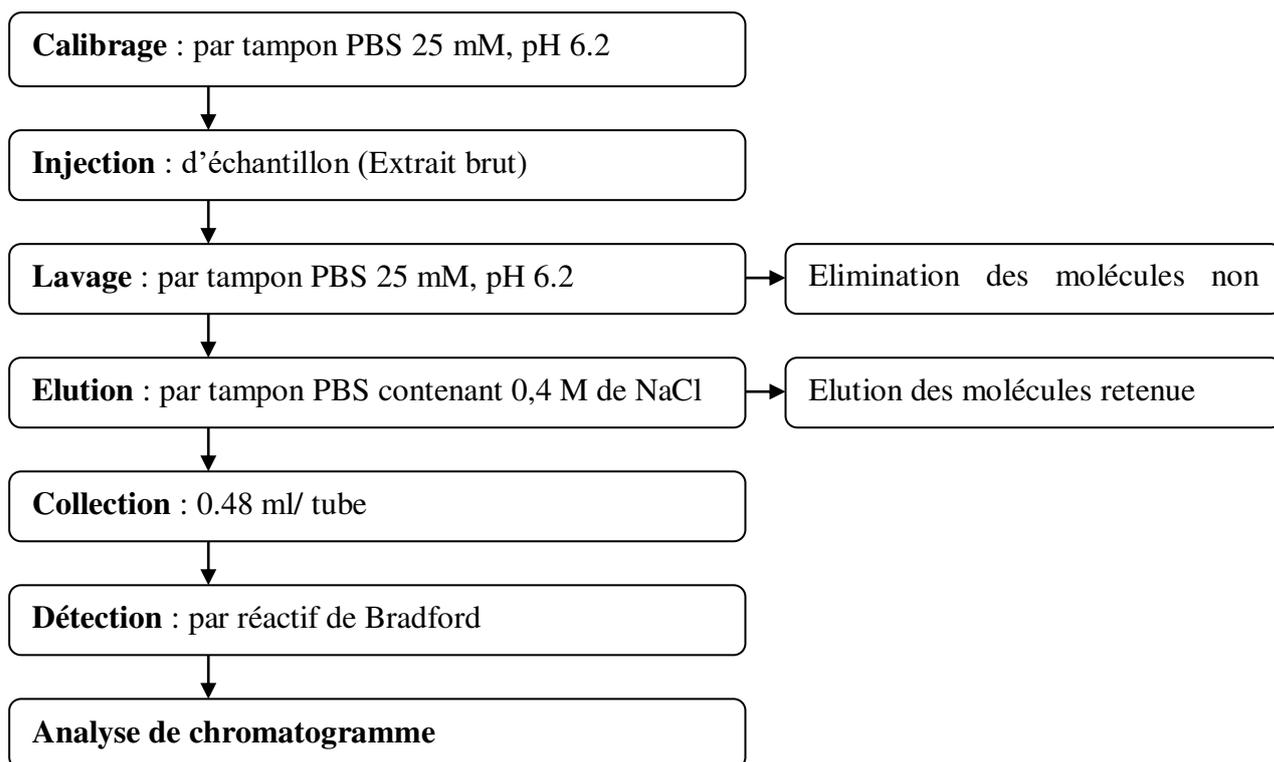


Figure 9. Protocole de chromatographie de la XOB. Le débit de la phase mobile est 0,06 ml/min et la vitesse de collection est 1 tube/8 min.

2.2.2. Production et purification des Acs anti-XOB

2.2.2.1. Immunisations des lapins

L'immunisation des lapins est réalisée par 200 μ l de la XOB et émulsifiée dans 200 μ l d'adjuvant complet de Freund (ACF), injecté par voie intra dermique à différents points (4 points) sur le dos du lapin. Des quantités égales d'enzyme émulsifiée dans l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) sont ensuite utilisées pour des différents rappels (3 rappels espacés de 7 jours). Après 10 jours du dernier rappel, les lapins sont égorgés pour récupérer la totalité de sang. Ce dernier est collecté et laisse coaguler à 4 °C pendant une nuit, l'antisérum est obtenu après une centrifugation à 4 °C avec une vitesse de 10000 rpm pendant 5 min (Stevens *et al.*, 1991).

2.2.2.2. Précipitation et purification des Acs anti-XOB

La précipitation des Acs anti-XOB par le S.A est réalisée selon la méthode décrite par Page et Thorpe (2009) avec une légère modification. 33% de S.A ajouter à l'antisérum récupéré à partir des lapins immunisés (P/V), sous une douce agitation pendant une nuit à 4 °C, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 30 min. Le précipité récupéré est resuspendu dans un petit volume de tampon PBS (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 10 mM, pH 7,8). Après il est dialysé deux

fois contre le même tampon PBS pendant une nuit à 4 °C a fin de obtienne les immunoglobulines totaux (Ig totaux).

Les Ig totaux obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium sont purifiées par la technique chromatographie d'immuno-affinité (Sullivan *et al.*, 1982), sur gel de sépharose activé par la XOB et les bras espaceur CNBr. Après l'injection de l'échantillon dans la colonne, un lavage est effectué par le tampon PBS. L'éluion des Acs anti-XOB a été réalisée par un tampon de Tris-HCl (0,1 M, pH 3). Les fractions sont collectées manuellement 1 tube (0,56 ml/6min). Après un dosage spectrophotométrique à 490 nm en utilisant réactif de Bradford pour dosage des protéines. Les étapes de chromatographie d'immuno-affinité des Acs anti-XOB sur gel de sépharose sont illustrées dans la figure 10. Les Acs anti-XOB élués seront dialysés immédiatement deux fois contre le PBS pendant une nuit à 4 °C et en suite stocké à -20 °C jusqu'à sont utilisation.

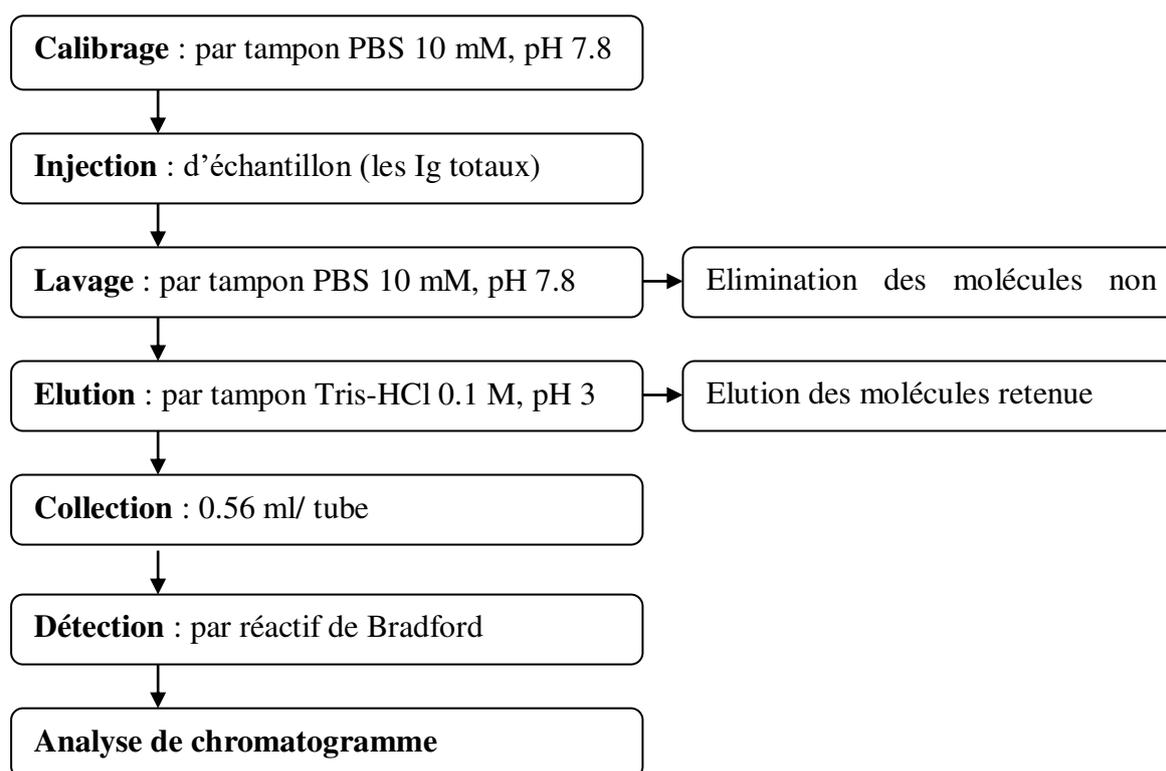


Figure 10. Protocole de chromatographie des Acs anti-XOB. Le débit de la phase mobile est 0,094 ml/ min et la vitesse de collection est 1 tube /6 min.

2.2.3. Dosage de la XOH dans le sérum des personnes saines regroupées en fonction de sexe, âge et tabagisme par ELISA double sandwich

La détermination de la dose de la XOH dans les sérums est effectuée par la technique d'ELISA double sandwich. Les étapes pratiquées sont illustrées dans la figure 11.

Les anticorps purifiés anti-XOB sont adsorbés dans des microplaques de 96 puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 2 h à 37 °C sous agitation. Un blocage des sites libres est réalisé par caséine 1 % pendant une nuit à 4 °C. Les échantillons (sérums), l'enzyme pure pour la courbe d'étalonnage et le tampon pour le blanc sont ajoutés puis incubés pendant 1 h et 10 min à 37 °C sous agitation. Les anticorps primaire non marqué anti-XOH sont ajoutés et incubés pendant 1 h et 10 min à 37 °C sous agitation, les Acs secondaire anti-IgG marquées à la peroxydase sont ajoutés et incubés pendant 1 h et 10 min à 37 °C sous agitation. Après chaque étape, une étape de lavage est réalisée (3 fois) par le tampon PBS contenant le Tween 20 (Tw 20) 0,05% (V/V).

La révélation de la réaction immunitaire a été faite par l'addition de 215 µl /puits de la solution de substrat (H_2O_2 + O-phénylènediamine dichlorhydrate (OPD)). Après une incubation de 15 min, la réaction est stoppée par l'ajoute de 30 µl /puits de l'acide sulfurique (H_2SO_4) 1N. Les absorbances sont alors évaluées à 495 nm dans le spectrophotomètre (UV.2005 J.P.SELECTA).

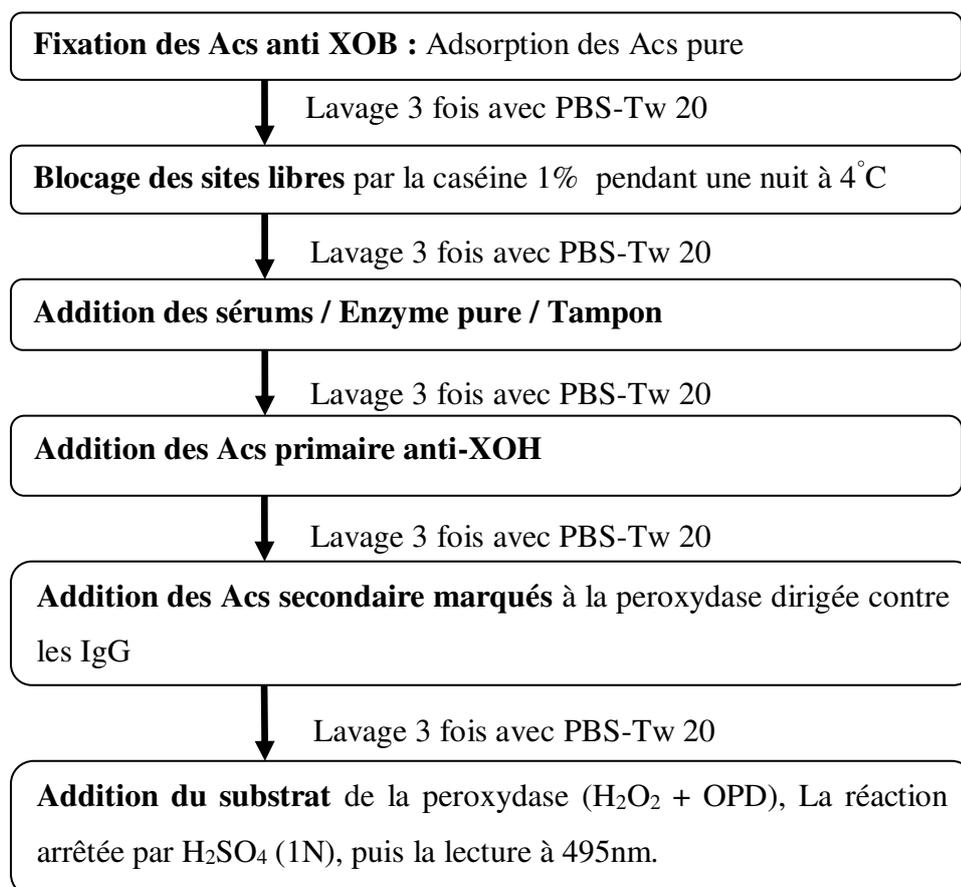


Figure 11. Protocole d'ELISA double sandwich utilisé pour le dosage de la XOH dans les sérums des personnes saines regroupées en fonction de sexe, âge et tabagisme.

2.2.4. Etude statistique

Les résultats obtenus après le dosage par la technique d'ELISA double sandwich sont traités par le teste d'analyse de la variance (ANOVA 1). La courbe d'étalonnage et la comparaison des moyennes ont été réalisées grâce au logiciel « Graphpad Prism » version 7.04.

Chapitre 3

Résultats et discussions

Chapitre 3: Résultats et discussions

3.1. Purification de la XOB

La purification de la XOB a été réalisée par la méthode décrite par Baghiani *et al.* (2003) avec légère modification à partir du lait bovine frais. La crème (contenant des globules gras du lait) est obtenu après l'étape de centrifugation est dissoute dans un volume double de tampon (K_2HPO_4 0,2 M contienne 1 mM EDTA). 15 % du butanol froid (4°C) est ajouté au surnageant récupéré avec une agitation manuelle pour rôle de dégraisser les globules gras (Vella *et al.*, 2014) et libère l'enzyme (XO), 2 phase non miscible sont formées, la phase supérieur (butanol) est éliminé, et l'ajoute immédiatement de 15 % de S.A puis centrifuger pour éliminer les protéines contaminent qui se précipitent dans ce pourcentage, 20 % de S.A est ajouté au surnageant récupéré (qui contient l'enzyme) afin de précipité la XOB (précipite à 35 % S.A). Le précipité brun est dissous dans un volume (3 ml) de tampon PBS pour détacher les liaisons protéine-S.A, ensuite il est dialysé deux fois conter le même tampon pendant une nuit pour réduire la concentration de S.A et des molécules diffusibles.

Le S.A est l'électrolyte le plus employé pour la précipitation différentielle. Ce sel est très hydrophile et rentre en compétition avec les protéines pour l'eau causant leur déshydratation. Les ions sulfates (SO_4^{2-}) et ammonium (NH_4^+) neutralisent certaines charges ioniques en surface des protéines et permet de maximiser l'obtention de protéines biologiquement actives (Scopes, 1987).

L'extrait brut obtenu est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur gel d'héparine-agarose. L'affinité observée entre la XO et l'héparine (Fukushima *et al.*, 1995) est utilisée pour obtenir une enzyme de grande pureté. La XOB est adsorbée au gel, avec une phase mobile du tampon PBS pH 6,2 pour le lavage et l'élution se fait avec le même tampon contienne 0,4 M NaCl. Après la collection et la détection manuelle. Les résultats obtenus sont présentées dans la figure 12.

Le balayage UV-Visible de la XOB purifiée montre un spectre d'absorbance qui représente trois pics majeurs à 280 nm, 325 nm et 450 nm (Figure 13). Le RPF correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm (A_{280nm} / A_{450nm}). Une valeur 5 ou proche de 5 est un bon signe de pureté (Waud *et al.*, 1975). Le PFR de l'enzyme purifiée est 5.23 Donc XOB purifiée présent une bonne pureté.

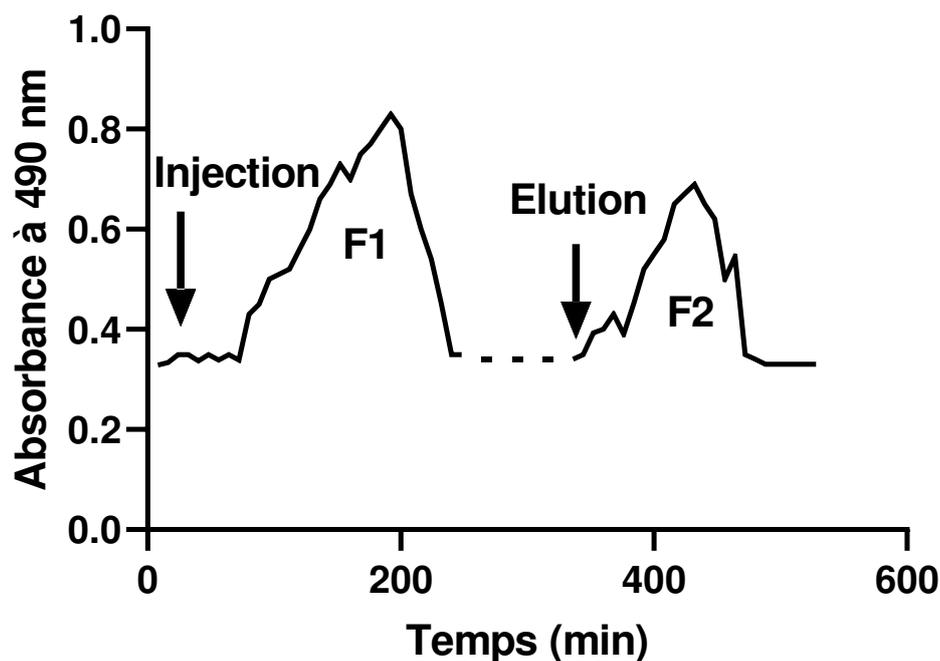


Figure 12. Chromatogramme de purification de la XOB. La phase mobile : tampon PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$) 25 mM, pH 6,2. Débit 0,06 ml/ min. Vitesse de collection 1 tube/8 min. Elution a été réalisée par le même tampon renferme 0,4 M NaCl. La détection a été effectuée par un réactif de Bradford. Les absorbance sont alors évaluées à 490 nm dans un lecteur des microplaques (ELX800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC).

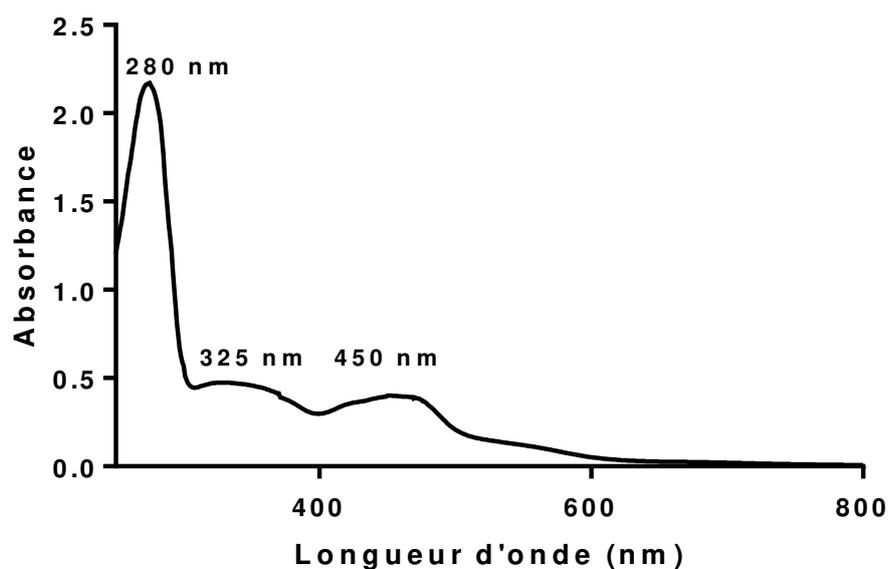


Figure 13. Spectre d'absorption UV. visible de la XOB purifiée.

3.2. Production et purification des Acs anti-XOB

L'injection intradermique de la XOB dans les lapins sert à produire des Acs polyclonaux anti-XOB. Ce vois permette à l'Ag de rester le plus long temps possible dans l'organisme et d'arriver petit à petit dans la circulation sanguine pour maximiser la production des Acs, et dans des points différents pour cibler les cellules immunitaire (les cellules dendritiques) présentatrices et transporteuse d'Ag vers les ganglions lymphatique (Revillard, 2001). L'Ag est émulsifié avec l'ACF (émulsion eau dans huile plus les membranes mycobactéries entières inactivées), qui le recouvre et ralentir son libération dans la circulation sanguine et par conséquent sa dégradation et son élimination favorise sa présentation et stimulation du système immunitaire. Donc l'ACF active à la fois la réponse humorale et la réponse cellulaire. La composante humorale de la réponse induite est liée à l'émulsion huile dans eau, tandis que sa composante cellulaire est attribuable aux extraits mycobactériens (Vermout *et al.*, 2003).

L'utilisation d'une dose minimale d'Ag (200 µl/ lapin) a l'avantage de diminuer la réponse vis-à-vis les contaminants et d'induire des Acs de plus haute affinité que ceux induits par une forte dose d'Ag (Stevens *et al.*, 1991).

Plusieurs rappelles séparés de 7 jours sont effectués par la même concentration d'enzyme émulsifiée avec l'AIF, pour un but d'augmenté la quantité des Acs dans l'antisérum. Après 10 jours de dernier rappel, les lapins sont décapités et le sang a été récupéré et laissé coaguler pendant une nuit à 4°C ensuite centrifugé pour obtenir la totalité de l'antisérum qui contient des Acs anti-XOB.

Les Ig totaux contenant dans le sérum sont précipités à 33 % S.A qui est considéré comme le sel le plus utilisé pour la précipitation sélective des protéines aux conditions non dénaturantes et permet de maximiser l'obtention des protéines biologiquement active, suivi par une centrifugation pour accélérer ce processus grâce à une vitesse élevé. Le culot a été récupéré et resuspendu dans un volume de tampon PBS pour détacher la liaison entre les protéines et le S.A, puis dialysé contre le même tampon pour réduire la concentration de S.A et des molécules diffusibles en se basant sur le phénomène de diffusion à travers un membrane semi-perméable.

La purification des Acs anti-XOB à partir de la solution protéique est effectuée par leur passage sur une colonne de sépharose activé par la XOB qu'il est fixé indirectement sur le gel par des liaisons covalentes à l'aide des bras espaceur CNBr. L'élution de la fraction qui contient les Acs anti-XOB a été faite par la modification des conditions d'interaction Acs-Ag en utilisant le tampon Tris-HCl. Les tubes sont collectés manuellement et la détection des Acs

a été faite par un réactif de dosage des protéines (réactif de Bradford). Les résultats sont présentés dans la figure 14.

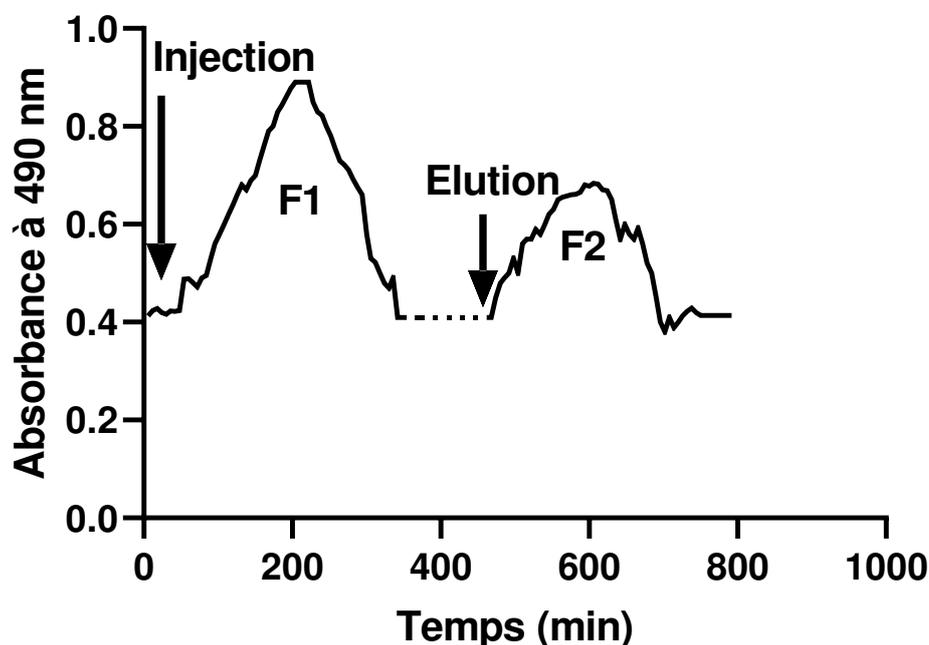


Figure 14. Chromatogramme de purification des Acs anti-XOB. La phase mobile : PBS (10 mM, pH 7,8). Débit 0,094 ml/ min. Vitesse de collection 1 tube /6 min. Elution a été réalisée par Tris-HCl (0,1 M pH 3), la détection a été effectuée par un réactif de Bradford. Les absorbance sont alors évaluées à 490 nm dans un lecteur des microplaques (ELX800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC).

3.3. Dosage de la XOH dans le sérum des personnes saines regroupées en fonction de sexe, âge et tabagisme par ELISA double sandwich

Dans cette étude on a réalisé un test ELISA double sandwich pour doser la concentration de la XO chez 56 sujets sains. Afin de confirmer est ce qu'il y a une influence des facteurs de sexe, âge et tabagisme sur le taux sérique de la XOH. Ce dosage consiste à (1) la fixation des Acs anti-XOB pure sur un fond adsorbant, (2) déposition de sérum à tester, l'enzyme pure pour la courbe d'étalonnage et tampon pour le blanc (3) la fixation des Acs primaires anti-XOH sur l'Ag (XOH) recherché, et finalement (4) la fixation des Acs secondaire de détection marqués à la peroxydase. La courbe d'étalonnage (Figure 15) tracé grâce à des concentrations connue de l'enzyme XOB pure (1,25 à 20 η g/ml), afin de calculée les concentrations à partir de l'équation de régression.

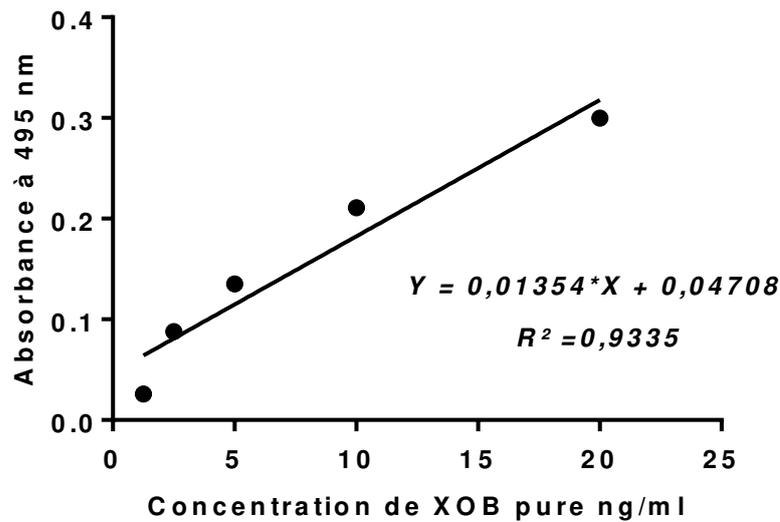


Figure 15. Courbe d'étalonnage utilisé pour déterminer la concentration de la XOH.

D'après les résultats de dosage de la concentration de XOH (Moyenne \pm SEM) par le teste d'ELISA double sandwich, une comparaison (Figure 16) entre les groupes est réalisée en 3 fonctions (sexe, âge et tabagisme) :

En fonction de sexe (les hommes par apport aux femmes) : les résultats de concentration de XOH sont statistiquement non significatifs pour les H.J.Nfu (9.169 ± 0.3452 ng/ml) et les H.A.Nfu (9.33 ± 0.5943 ng/ml) par rapport aux F.J (8.874 ± 0.1424 ng/ml) et F.A (9.348 ± 0.2008 ng/ml) respectivement.

En fonction d'âge (les jeunes par apport aux adultes) : les résultats de concentration de XOH sont statistiquement non significatifs pour les H.J.Nfu (9.169 ± 0.3452 ng/ml) et les F.J (8.874 ± 0.1424 ng/ml) par rapport aux H.A.Nfu (9.33 ± 0.5943 ng/ml) et F.A (9.348 ± 0.2008 ng/ml) respectivement.

En fonction de tabagisme (les fumeurs par apport aux non fumeurs) : les résultats de concentration de XOH sont faiblement significatifs pour les H.J.F (7.307 ± 0.3807 ng/ml) et les H.A.F (7.617 ± 0.4566 ng/ml) par rapport aux H.J.Nfu (9.169 ± 0.3452 ng/ml) et H.A.Nfu (9.33 ± 0.5943 ng/ml) respectivement.

Donc les résultats obtenus montrent la présence de la XO chez tous les sujets avec des valeurs de concentration statistiquement non significative pour les groupes en fonction de sexe et d'âge, c'est-à-dire ces facteurs n'ont aucune influence sur le taux sérique d'enzyme, au temps qu'une faible signification entre les groupes en fonction de tabagisme, montre que le tabac influence négativement sur le taux sérique de la XOH.

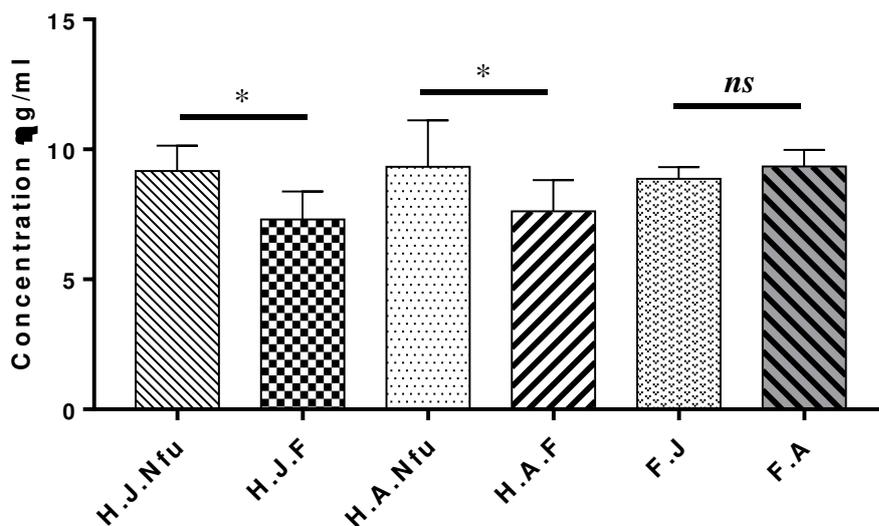


Figure 16. Histogramme de concentration de la XOH (chez 56 sujets sains regroupés en fonction de sexe, âge et tabagisme) déterminés par technique d'ELISA double sandwich (les taux en XOH sériques sont exprimés en ηg/ml).

Le développement d'un test d'ELISA sandwich pour la détermination de la distribution tissulaire de la XOH a été rapporté pour la première fois par Sarnesto et ses collaborateurs (1996), ils ont détecté l'enzyme dans vingt sérums des sujets normaux avec une concentration maximale de 5 ηg/ml (Battelli *et al.*, 1999). Le taux normal de cette enzyme dans les liquides biologiques variés, parmi ces liquides le sérum. Le tableau ci-dessous représente les valeurs de concentration de la XOR décrite par les chercheurs dans les sérums des sujets sains.

Tableau 2. Concentration de la XOR sérique chez les sujets sains.

Concentration de la XOR sérique	Références
<1 μg/ml	(Battelli <i>et al.</i> , 1999)
0 - 0,9 μg/ml	(Battelli <i>et al.</i> , 2001)
5.11 ± 3.23 ng /ml	(Kolli, 2018)

Les résultats de dosage de la concentration de la XOH chez tous les groupes est similaire à seul de Battelli *et al.*, 1999 et 2001.

Conclusion

Conclusion

La XO jouée un rôle très important dans le catabolisme des purines, où elle catalyse transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis de la xanthine en acide urique (antioxydant), aussi d'autres fonctions plus larges dans la physiologie de l'organisme tel que son rôle dans : l'absorption du Fer au niveau de l'intestin et du foie (Yoshimitsu *et al.*, 2003), production des ERO qui ayant un rôle essentiel dans la signalisation intra et intercellulaire (Harrison, 2004), fonction immunitaire et fonction bactéricides (Muzychka *et al.*, 2017), activité antimicrobienne (Granger, 1988) ...etc.

Les résultats obtenus ont permis de conclure que la déférence de la concentration de XOH dans les sérums des sujets sains est statistiquement non significative entre les groupes comparée en fonction de sexe et d'âge, c'est à dire ces facteur n'ont aucune influence sur la concentration sérique d'enzyme (XOH), au temps que la faible signification observée entre les groupes comparée en fonction de tabagisme, montre que le tabac influence négativement sur la concentration sérique de XOH.

Pour des études ultérieures, nous suggérons les points suivants : augmenter l'intervalle des années de tabagisme pour la catégorie des fumeurs (pour avoir l'influence de tabac a long temps sur le taux sérique d'enzyme) ; ajouter des catégories d'âge (groupe des enfants, âgées...etc.) ; changer l'échantillon biologique sérique par les organes qui représente une concentration élevé de la XOR telle que le fois ou d'autre liquide biologique telle que le lait humaine ; contrôler de pureté pour l'enzyme purifié (teste d'activité enzymatique spécifique).

Références

Références

- Al-Khalidi U. A. and Chaglassian T. H. 1965. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem Journal* (1), pp. 318-320.
- Battelli M. G., Abbondanza A., Musiani S. *and al.* 1999. Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chim Acta* 281, pp. 147-58.
- Battelli M. G., Musiani S., Valgimigli M., Gramantieri L., Tomassoni F., Bolondi L. and Stirpe F. 2001. Serum xanthine oxidase in human liver disease. *Am. Gastroenterol. J.*, 96, pp. 1194-1199.
- Battelli M. G., Bortolotti M., Polito L. and Bolognesi A. 2018. The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *BBA-Molecular Basis of Disease* , pp. 2557-2565.
- Bolognesi A., Polito L., Bortolotti M. and Battelli M. G. 2019. Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. *Redox Biology*, pp. 1-6.
- Borges F., Fernandes E. and Rolivera F. 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* ,V 9 (2), pp. 195-217.
- Bradley D. S., Cheng S., Zhou P., Griffiths M. M., Luthra H. S. and C.S., D. 1997. HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice, implications in human rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* (100), pp. 2227-2234.
- Cantu M., Medellin N. and Kelley E. 2013. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology* (1), pp. 353-358.
- Chen C., Lü J.-M. and Yao Q. 2016. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Med Sci Monit*, pp. 2501-2512.
- Day R. O., Bishoy K., Diluk R.W.K., Kenneth M.W. and Graham G. G. 2016. Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Clinical Science*, pp. 2167-2180.

- Dejong J., Schoemaker R., Jonge R., Bernocchi P., Keijzer E. and Harrison R. 2000. Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (32), pp. 2083-2089.
- Fukushima T., Adachi T. and Hirano K. 1995. The heparin-binding site of human xanthine oxidase. *Biol. Pharm. Bull.* ,V18 (1), pp. 156-158.
- Furuhashi M., Megumi M., Takayo M., Takashi N., Yukimura H., Masayuki K. 2019. Independent links between plasma xanthine oxidoreductase activity and levels of adipokines. *J Diabetes Investig*, pp. 1-9.
- Granger D. N. 1988. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *American Physiological Society*, pp. 1269-1275.
- Hancock J. T., Ovejero-Boglione M. C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R. and Harrison R. 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob. Agents Chemother* (46), pp. 3308-3310.
- Harrison R. 2006. Milk xanthine oxidase : Properties and physiological roles. *International Dairy Journal* , 16, pp. 546-554.
- Harrison R. 2004. Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Drug Metabolism Reviews* , 36, pp. 363-375.
- Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic. Biol. Med* (33), pp. 774-797.
- Heunks L.M., Jose Vin L., Van Herwaarden A., Hans T.M., Amparo G. and Richard Dekhuijzen P.N. 1999. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol*, pp.277.
- Kolli, A. 2018. Etude de corrélation entre les marqueurs biochimiques de l'hépatite et le taux sérique en xanthine oxydase et en anticorps anti-xanthine oxydase (*Doctoral dissertation*), université Ferhat Abbas-Setif, p. 32
- Kurosaki M., Zanotta S., Li C. M., Garattini E. and Terao M. 1996. Expression of xanthine oxidoreductase in mouse mammary epithelium during pregnancy and lactation: regulation of gene expression by glucocorticoids and prolactin. *Biochem. J.* , 319, pp. 801-810.

- Liu H., Zhu H., Lin Y., Gaoxiang M., Guoquan T., Weida A. 2018. Genetic variants in XDH are associated with prognosis for gastric cancer in a Chinese population. *Gene*, pp. 1-26.
- Maia L. B. and Moura J. J. 2018. Putting xanthine oxidoreductase and aldehyde oxidase on the NO metabolism map : Nitrite reduction by molybdoenzymes. *Redox Biology*, pp. 274-289.
- Martin H. M., Kevin P., M. Eugene B., Susane D. and Roger H. 2004. Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Elsevier* , Vol. 37 (8), pp. 1214-1223.
- McManaman J. L. and Bain D. 2002. Structural and Conformational Analysis of the Oxidase to Dehydrogenase Conversion of Xanthine Oxidoreductase. *JBC Papers in Press*, pp. 1-33.
- Mercier E. and Perrotin D. 2003. L'hépatite ischémique. *Réanimation* , pp. 449-454.
- Miesel R. and Zuber M. 1993. Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*;17, pp.551-61.
- Muzychka O. V., Oleksandr L. K., Antonina V. P., Mykhaylo S. F. and Andriy I. V. 2017. Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, pp. 3606-3613.
- NCBI. 31 janvier 2019. *NCBI*. Consulté le 02 Février 2019, sur Genome Data Viewer: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=gene&acc=7498>
- Okamoto K., Kusano T. and Nishino T. 2013. Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Bentham Science Publishers*, pp. 1873-4286.
- Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabo C. 2006. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors : Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev* , Vol. 58 (No. 1), pp. 87-114.
- Page M. and Thrope R. 2009. Purification of IgG by precipitation with sodium sulfate or ammonium sulfate. *The protein protocols handbook, Third Edition*, pp. 1749-1751

- Revillard J. P. 2001. Réponse immunitaire induite par l'introduction d'antigènes dans l'organisme. (D. B. Supérieur., Éd.) *Immunologie 4ème éd.* , pp. 203-204.
- Schmidt H. M., Kelley E. E. and Straub A. C. 2019. The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biology* , pp. 1-6.
- Scopes R. K. 1987. Protein Purification ; Principles and Practice. Second edition, *Springer New York*. pp. 1-218.
- Smelcerovic Z., Veljkovic A., Kocic G., Yancheva D., Petronijevic Z. and Anderluh M. 2015. Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidenethiazol-4-ones . *Chemico-Biological Interactions*. 229, pp. 73-81.
- Stevens C. R., Benboubetra M., Harrison R., Sahinoglu T., Smith E. C. and Blake D. R. 1991. Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium. *Annals of the Rheumatic Diseases* , 50, pp. 760-762.
- 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 electro focusing. *Molecular and Cellular Biochemistry* , 44, pp. 13-22.
- Thatcher T. H., Hsiao H. M., Pinner E., Moshe L., Stephen J. P. and Patricia J. S. 2013. Neu-164 and Neu-107, two novel antioxidant and anti-myeloperoxidase compounds, inhibit acute cigarette smoke-induced lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (305), L165-L174.
- Tziomalos K. and Hare J. M. 2009. Role of xanthine oxidoreductase in cardiac nitroso-redox imbalance. *Front Biosci (Landmark Ed)*. (14), pp. 237-262.
- 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*, 2(01), pp. 1-54.
- Vermout S., Denis M., Losson B. et 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. *Elsevier* , Vol.24 (No.9), pp. 1471-4906.

- Washio K., Yoshiki K., Takayo M., Takashi N. and Hidenori K. 2017. Xanthine oxidoreductase activity is correlated with insulin resistance and subclinical inflammation in young humans. *Metabolism*, pp. 1-29.
- Waud W., Frank B., Ralph W. 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*, pp. 695-701.
- Xu P., Huecksteadt T. and Hoidal J. 1996. Molecular Cloning and Characterization of The Human Xanthine Dehydrogenase Gene (XDH). *GENOMICS* , 34, pp. 173-180.
- Xu P., Huecksteadt T., Harrison R. and Hoidal J. 1994. Molecular cloning, tissue Expression of human xanthine dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical research Communications* , 199 (2), pp. 998-1004.
- Yoshimitsu K., Tomoko N., Ken O., Tomohiro M., Bryan T. E. and Takeshi N. 2003. Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *PNAS*, pp. 8170-8175.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Les étapes de préparation de réactif de Bradford

S.M 1 : 0.1 g bleu de Coomassie G-250 + 10 ml volume éthanol + 20 ml volume Acide phosphorique.

S.M 2 : 15 ml SM1 + 40 ml acide phosphorique + 20 ml éthanol, complété le volume jusqu'a 300 ml avec l'eau distillé.

Réactif de Bradford (dilution 1/2) : 100 ml S.M 2 + 100 ml eau distillé.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى قياس تركيز الإنزيم المؤكسد للاكزنثين البشري (XOH) في الحالة الفيزيولوجية للجسم في عينات من أمصال لأشخاص أصحاء تم تصنيفهم في مجموعات حسب الجنس، العمر والتدخين بواسطة تقنية sandwich double ELISA. تم استخلاص الإنزيم المؤكسد للاكزنثين البشري (XOB) من حليب البقر الطازج بواسطة تقنية affinité d Chromatographie héparine- oseagar على هلام affinité-immuno`d chromatographie. حيث ان نتيجة حساب RPF تساوي 5.23 التي تمثل افضل نسبة نقاء للإنزيم المستخلص ; حيث يعتبر المستضد الذي يتم حقه في الأرناب لإنتاج الاجسام المضادة ضد BOX. الجزء المناعي المتحصل عليه من مصل الأرناب عن طريق الترسيب بكبريتات الأمونيوم تمت تنقيته بواسطة تقنية affinité-immuno`d chromatographie على هلام XOB-CNBr Sépharose. استخدمت الأجسام المضادة النقية لتطوير تقنية sandwich double ELISA لقياس كمية الأنزيم HOX في أمصال الأشخاص الأصحاء. وقد أظهرت النتائج الإحصائية أن عامل الجنس و العمر لا يؤثر على متوسط تركيز الإنزيم المؤكسد للاكزنثين البشري ; في حين وجود فرق منخفض في التركيز بالنسبة لمجموعة المدخنين راجع لتأثير النخان . وعليه يمكن التأكد من الرابط بين الانزيم والتدخين من خلال إجراء دراسات مفصلة لفئة المدخنين في المستقبل.

الكلمات المفتاحية : الإنزيم المؤكسد للاكزنثين البشري، الإنزيم المؤكسد للاكزنثين البشري، sandwich double ELISA، المدخنين.

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer le taux de la XOH à l'état physiologique dans les sérums des sujets sains regroupé en fonction de sexe, âge et tabagisme par ELISA double sandwich. La purification de l'enzyme a été réalisée à partir du lait bovin grâce à une chromatographie d'affinité sur un gel d'agarose-héparine, avec un RPF de 5.23 qui présente une bonne pureté. La XOB purifié a été servi comme un antigène pour la production des Acs anti-XOB chez les lapins. La fraction des Ig obtenues à partir de l'antisérum par une précipitation au S.A, est purifiée par une chromatographie d'immuno-affinité sur un gel sépharose CNBr-XOB. Les Acs purs ont été utilisés pour le développement du teste d'ELISA double sandwich pour la quantification de la XOH dans les sérums. Les résultats d'étude montrent que le sexe et l'âge n'ont aucune influence sur la concentration de XOH au temps que la faible signification statistique chez les fumeurs, du a l'influence négative de tabac. Donc le lien entre la XO et le tabac peut être confirmée par étude détaillée sur la catégorie des fumeurs.

Mots clés: xanthine oxydase humaine, xanthine oxydase bovine, ELISA double sandwich, fumeurs.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the level of XOH in the physiological state in the serum of healthy subjects grouped according to sex, age and smoking by double sandwich ELISA. Purification of the enzyme was carried out from bovin milk by agarose-heparin gel affinity chromatography, with an RPF of 5.23 which shows better purity. The purified XOB was served as an antigen for the production of anti-XOB Abs in rabbits. The Ig fraction obtained from the antiserum by ammonium sulfate precipitation is purified by immuno-affinity chromatography on a CNBr-XOB sepharose gel. Pure Abs were used for the development of the double sandwich ELISA for quantification of XOH in serum. Study results prove that sex and age have no influence statistically significant on XOH concentration while smoking has an influence negativ on serum enzyme levels. So the link between the enzyme and smoking can be confirmed by a detailed study of the category of smokers.

Key words: human xanthine oxidase, bovine xanthine oxidase, double sandwich ELISA, smokers.