

*République Algérienne Démocratique République*  
*Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*

**UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF**

**FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**DEPARTEMENT : BIOCHIMIE**

**MEMOIRE DE MASTER**

*Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie*

*Filière : Biochimie*

*Option : Immunologie*

**Thème**

*Etude de corrélation entre les marqueurs biochimiques de  
l'hépatite et le taux sérique en xanthine oxydase et en  
anticorps anti-xanthine oxydase.*

**Présenté par :**  
**KOLLI Ameer**

**Encadré par :**  
**BENBOUBETRA Mustapha**

Jury de soutenance :

Président : BELLATAR Nouredine  
Encadreur : BENBOUBETRA Mustapha  
Examinatrice : BENBAZZA DJEDJIGA

Professeur UFA Sétif  
Professeur UFA Sétif  
M.A.1 UFA Sétif

Promotion : juin 2012

## **SOMMAIRE**

	Page
Remerciements	i
Résumé	ii
Summary	iii
Introduction	iv
<b>CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>1</b>
I.1. Epidémiologie	2
I.2. L'hépatite B	3
I.2.1. Cycle de vie de l'hépatite B	4
I.2.2. Transmission	5
I.2.3. Evolution	5
I.2.4. Le vaccin HB	6
I.2.5. Problème des mutations	7
I.2.6. Traitements	7
I.2.6.1. Le traitement interféron	7
I.2.6.2. Les analogues des nucléosides	8
I.2.7. L'HBV et le système immunitaire	9
I.2.8. Sérologie de l'Hépatite B	9
I.2.8.1. Antigène et anticorps HBs	9
I.2.8.2. Anticorps anti-HBc	9
I.2.8.3. Système antigène-anticorps HBe	10
I.2.8.4. ADN viral sérique	10
I.2.9. Comment on peut détecter l'HBV	10
I.2.9.1. Méthode ELISA	11
I.2.9.2. Tests moléculaires	11
I.3. La xanthine oxydoréductase	11
I.3.1. Distribution et localisation de la XOR	11
I.3.2. Rôles physiologiques de la XOR	11
I.3.3. Rôle de la XOR dans l'inflammation	11

I.3.4. Les anticorps anti-XOR	12
-------------------------------	----

## ***CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES***

II.1. Matériel biologique	13
II.1.1. Sérums humains	13
II.1.2. La xanthine oxydoréductase	13
II.2. Méthodes :	13
II.2.1. Tests de pureté de la XORh	13
II. 2.2. Dosage des anticorps anti- XOR sérique humains	16
II.2.2.1. ELISA directe	16
II.2.3. Dosage de la xanthine oxydoréductase sérique	16
II.2.3.1. ELISA Sandwich	16

## ***III. RESULTATS ET DISCUSSION***

III.1. Control de la pureté et activité oxydase de la XORh purifiée	18
III. 2. Dosage des taux de XOR sériques et anticorps anti- XOR sérique humains	18
III.3. Corrélation en le taux de la XORh sérique et les paramètres biochimiques	20
III.4. Corrélation des taux des anticorps anti-XORh et les paramètres biochimiques	21
III.5. Discussion	23

## ***IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

25
----

***Liste des figures:***

<b>Figure 1:</b> Distribution de l'HBV chronique à travers le monde	02
<b>Figure 2:</b> Structure du virus de l'hépatite B	03
<b>Figure 3:</b> Cycle de vie de l'hépatite B	04
<b>Figure 4:</b> Protocole de la méthode d'ELISA utilisé dans notre étude	16
<b>Figure 5:</b> Protocole de la méthode d'ELISA utilisé dans notre étude	18
<b>Figure 6:</b> Comparaison des concentrations de la XORH déterminées par ELISA sandwich chez les sujets normaux et les sujets malades.	19
<b>Figure 7:</b> Taux de la XORH et anticorps anti-XOR chez des sujets malades déterminés par ELISA sandwich et ELISA directe.	20
<b>Figure 9:</b> Comparaison des concentrations de XOR sérique et taux sériques en enzymes ALAT, ASAT et ALP chez les sujets malades.	21
<b>Figure 8:</b> Comparaison des concentrations en anticorps anti-XOR et les taux sériques en enzymes ALAT, ASAT et ALP chez les sujets malades.	22

## Résumé

Au cours du développement de l'hépatite B et pour confirmer l'infection, plusieurs tests sérologiques sont utilisés. Dans le diagnostic viral on recherche soit des antigènes viraux ou les anticorps antiviraux. Les transaminases sont les marqueurs biochimiques de routine dosés dans les atteintes hépatiques.

Dans ce travail préliminaire on a essayé de voir la corrélation entre les marqueurs biochimiques et le taux sériques en xanthine oxydoréductase d'une part et les anticorps anti-xanthine oxydoréductase sériques d'autre part.

Alors on a lancé deux types d'ELISA; un test direct pour doser le taux des anticorps anti-XOR et un test ELISA sandwich pour doser l'enzyme XOR sérique chez vingt trois sujets atteints d'hépatite avec l'enzyme XOR purifié du lait humain (PFR de 4,81 et une seule bande de 150.000 Da en SDS-PAGE, l'activité oxydase de l'enzyme est de 0.044  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ).

Les taux sériques en XORh ( $79,83 \pm 67,52$  ng /ml) et en anticorps anti-XOR ( $83,69 \pm 67,52$   $\mu\text{g}$  /ml) sont significativement supérieurs aux taux des sujets sains ( $5,11 \pm 3,23$  ng /ml et de  $26,52 \pm 16,322$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivement). On n'a pas trouvé une bonne corrélation entre les taux sériques en hXOR et en anticorps anti-hXOR d'une part et les transaminases (ALAT et ASAT) et la phosphatase alcaline d'autre part.

Mots clés : Hépatite, Xanthine oxydoréductase, Transaminases, Anticorps anti-XOR

## Summary

En the hepatitis B process and to confirm the infection a number of serological tests have been used either to detect viral antigens or the antibodies rose against the virus. Transaminases are routinely determined to assess liver damage.

In this small preliminary study, we tried to set-up to types of ELISA (direct and sandwich) to assess serum levels of human xanthine oxidoreductase (hXOR) as well as anti-bodies raised against the enzyme (anti-XOR antibodies) of twenty three patients with hepatitis.

The used human milk enzyme was pure as it had a PFR 4, 81 and with a single major band of 150 KDa on SDS-PAGE. The oxidase activity of the purified human enzyme was 0.044  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

Sera levels of hXOR ( $79,83 \pm 67,52$  ng /ml) and anti-hXOR antibodies ( $83,69 \pm 67,52$   $\mu\text{g}$  /ml) were significantly higher than healthy normal subjects ( $5.11 \pm 3.23$  ng /ml and  $26,52 \pm 16,322$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively). We did not find a good correlation between levels of hXOR and anti-hXOR antibodies in one hand and transaminases (ALAT and ASAT) and alkaline phosphatase in the other hand.

Key words: Hepatitis, Xanthine oxidoreductase, Transaminases, Anti-XOR antibodies

## ملخص :

خلال الإصابة بالتهاب الكبد الفيروسي و لتأكيد الإصابة عدة فحوصات مصلية تجرى سواء للكشف عن مولدات الضد الفيروسيّة أو الأجسام المضادة ضد الفيروس وتستعمل الترونسامينات عادة للكشف عن لإصابات الكبدية.

فيذا العمل التمهيدي حاولنا قياس العلاقة بين الإشارات البيوكيميائية المستعملة عادة وكمية الكزانتين مؤكسد مرجع من جهة و الأجسام المضادة ضد الكزانتين مؤكسد مرجع من جهة أخرى.

لذلك قمنا بإجراء تجربتين من نوع ELISA الاولى من نوع ELISA مباشرة من اجل معايرة الأجسام المضادة ضد الكزانتين مؤكسد مرجع و الثانية ELISA sandwich من اجل معايرة الإنزيم الكزانتين مؤكسد مرجع المصلي عند ثلاثة و عشرين موضوع اختبار يعانون من التهاب كبدي مع الكزانتين مؤكسد مرجع المنقى من الحليب البشري PFR de 4,81 وشريط واحد عند DA 150.000 على صفحة SDS-PAGE نشاط الاوكسيداز للانزيم تقدر ب 0.044 .  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

التقديرات المصلية للانزيم (79,83  $\pm$  67,52 ng /ml) و الاجسام المضادة ضد الكزانتين مؤكسد مرجع  $83,69 \pm$  67,52  $\mu\text{g}/\text{ml}$  وهي تفوق المستوى العادي 5.11  $\pm$  3.23 ng /ml و 26,52  $\pm$  16,322  $\mu\text{g}/\text{ml}$  على التوالي. لم نستطع ايجاد علاقة جيدة بين المقادير المصلية للكزانتين مؤكسد مرجع و الاجسام المضادة ضد الكزانتين مؤكسد مرجع من جهة و الترونسامينات من جهة اخرى. (ALAT et ASAT) و الفوسفاتاز الكالين من جهة ثانية.

الكلمات المفاتيح: التهاب الكبد B، الكزانتين مؤكسد مرجع ، الترونسامينات ، أضرار XOR

# **Remerciements**

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*J'exprime ma profonde gratitude à Mr le professeur M. BENBOUBETRA (Université Ferhat Abbas, Sétif), qui ma fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Ses conseils pertinents m'ont permis de mener à terme ce travail.*

*Je remercie les membres de jury (Pr. N. BELATTAR et Dr. R. BELHATAB) d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.*

*En fin, je ne remercierai jamais assez Melle Mosbah Asma pour les nombreux services qu'elle m'a rendus durant la réalisation de ce travail, qu'elle trouve ici le témoignage de mes remerciements les plus amicaux.*



*En guise de reconnaissance, je dédie ce travail à mes chers parents, à  
ma famille ainsi qu'à tous mes amis.*

## **Introduction**

L'infection avec le virus de l'hépatite B est devenue un problème majeur de santé publique. Approximativement deux milliards de personnes ont été infectées dans le monde et plus de 350 millions souffrent de la forme chronique de l'hépatite B (HBV). Le dépistage du sérum des donneurs, le dépistage du sérum des femmes enceintes et les bonnes pratiques de contrôle de l'infection peuvent réduire considérablement le risque potentiel de transmission du virus (Akbar *et al.*, 2007).

Le VHB est détectable dans le sang. La protéine de surface du VHB, antigène HBs (L'antigène de la surface de l'Hépatite B), est un marqueur sérologique important de l'hépatite B. Actuellement, le diagnostic de l'infection par le VHB repose essentiellement sur la mise en évidence de la présence de l'AgHBs et éventuellement des anticorps dirigés contre la capsid du virus (anticorps anti-HBc) (Roque-Afonso, 2007).

Dans ce travail on a dosé l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR), enzyme intracellulaire génératrice des espèces réactive de l'oxygène, ainsi que les anticorps anti-XOR sériques des sujets atteints d'infections hépatiques en comparaison aux paramètres biochimiques de routine (transaminase et phosphatase alcaline). Les cellules hépatiques sont riches en XOR et lors des infections hépatiques virales par l'HBV ou d'autres atteintes hépatiques, l'enzyme est libérée dans la circulation sanguine et une réponse immunitaire se développe en produisant les anticorps anti-XOR.

La xanthine oxydoréductase est une enzyme à plusieurs rôles physiologiques et pathologiques mais son rôle principal est dans le catabolisme des purines en acide urique, la XOR joue un rôle primordiale lors de l'inflammation ou son taux dans les tissus malades est significativement plus élevé par rapport aux tissus sains ce qui laisse suggérer son utilisation comme marqueur d'inflammation comme dans le cas de l'hépatite B.

## ***CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

## I.1. Épidémiologie

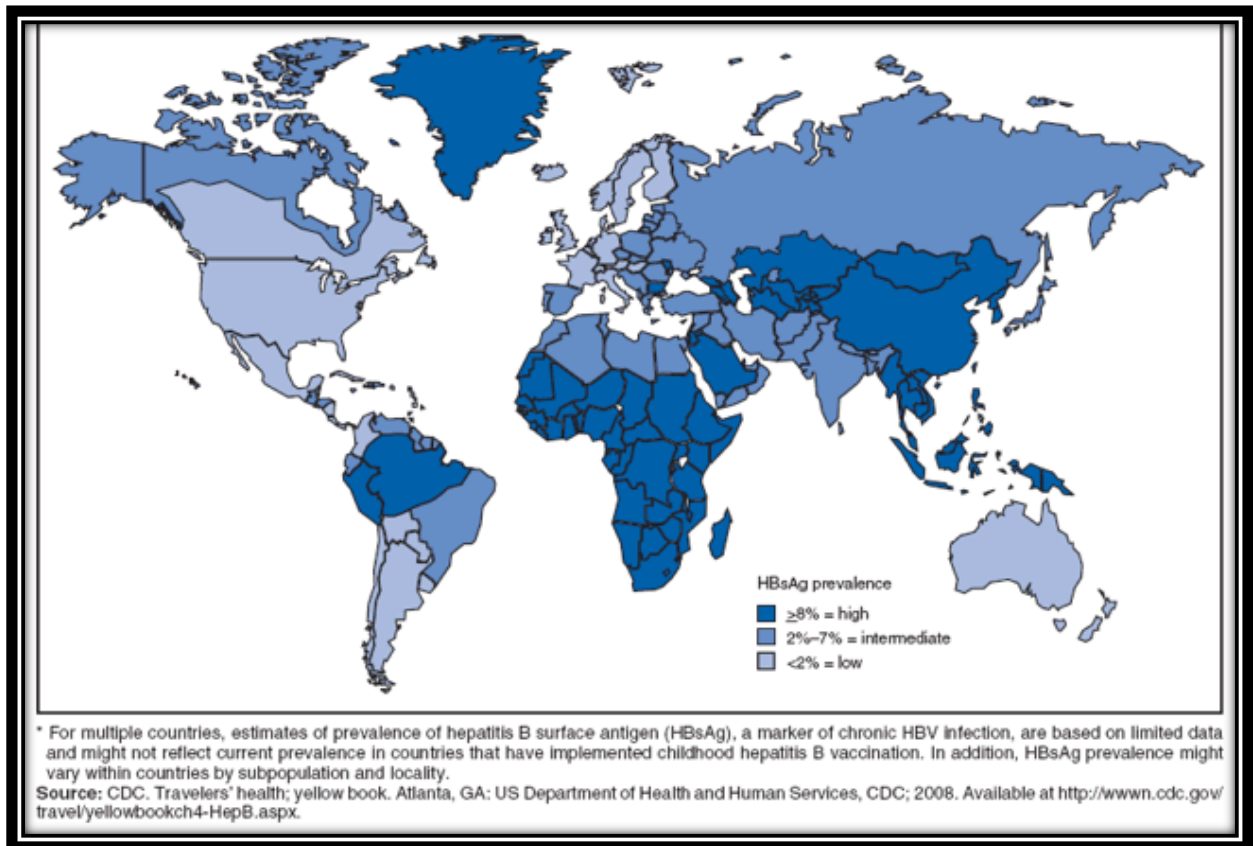
Il est devenu maintenant clair que l'infection par l'HBV est un problème sanitaire mondiale (Blum et *al.*, 2010). Dans le monde, deux milliards d'individus ont déjà rencontré le virus de l'hépatite B (HBV) et environ 350 millions en sont porteurs chroniques. Parmi eux, 13% des femmes et 40% des hommes meurent d'une maladie hépatique liée au virus de l'hépatite B, soit plus d'un million de décès par an. L'infection du virus de l'hépatite B arrive au deuxième rang, après le tabac, des agents cancérigènes connus pour l'homme. En Afrique, l'hépatite B, associée à l'hépatocarcinome, est la première cause de tumeurs cancérigènes.

Sa distribution géographique est hétérogène, avec des zones de haute incidence (vingt nouveaux cas/100 000 habitants par an) et des zones de faible incidence (cinq nouveaux cas/100 000 habitants par an) (**Figure 1**).

Les prévalences sont estimées à partir de plusieurs marqueurs sérologiques. Parmi ces marqueurs, on cherche la présence d'antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ag-HBs).

Dans les zones de forte endémie, où la prévalence de l'Ag-HBs est supérieure à 8% (soit environ 45% de la population mondiale), le risque de contracter l'infection au cours d'une vie entière est supérieur à 60% et la majorité des sujets (cas) contaminés sont des nouveaux nés ou au cours des premières années de vie. Quarante trois pour cent de la population vit dans des zones de prévalence intermédiaire comprise entre 2 et 7%. Dans ces zones de prévalence intermédiaire, le risque d'être infecté au cours d'une vie entière est compris entre 20 et 60%, et la contamination survient à tous les âges de la vie. Douze pour cent de la population vit en zone de faible endémie avec une prévalence inférieure à 2%, zone incluant essentiellement les pays industrialisés où le risque d'être infecté au cours de la vie est inférieur à 20%, et la contamination survient surtout à l'âge adulte (Beretta et Capasso, 1986).

En général, dans les pays où la prévalence est la plus élevée, la source de l'infection est principalement à travers la transmission des mères porteuses d'une HBV chronique vers leurs fœtus. Alors que dans les pays à plus basse prévalence la transmission se fait principalement par voie sexuelle et surtout à travers les ouvertures dans les couches cutanées, par exemple avec le partage des aiguilles entre les consommateurs des drogues. Le risque d'avoir une infection chronique est très grand chez les nouveaux nés qui sont infectés avant la naissance (approximativement 90%). Par contre, chez les adultes, à peu près 90% des personnes infectées peuvent spontanément avoir une clairance de l'HBV (Blum et *al.*, 2010).

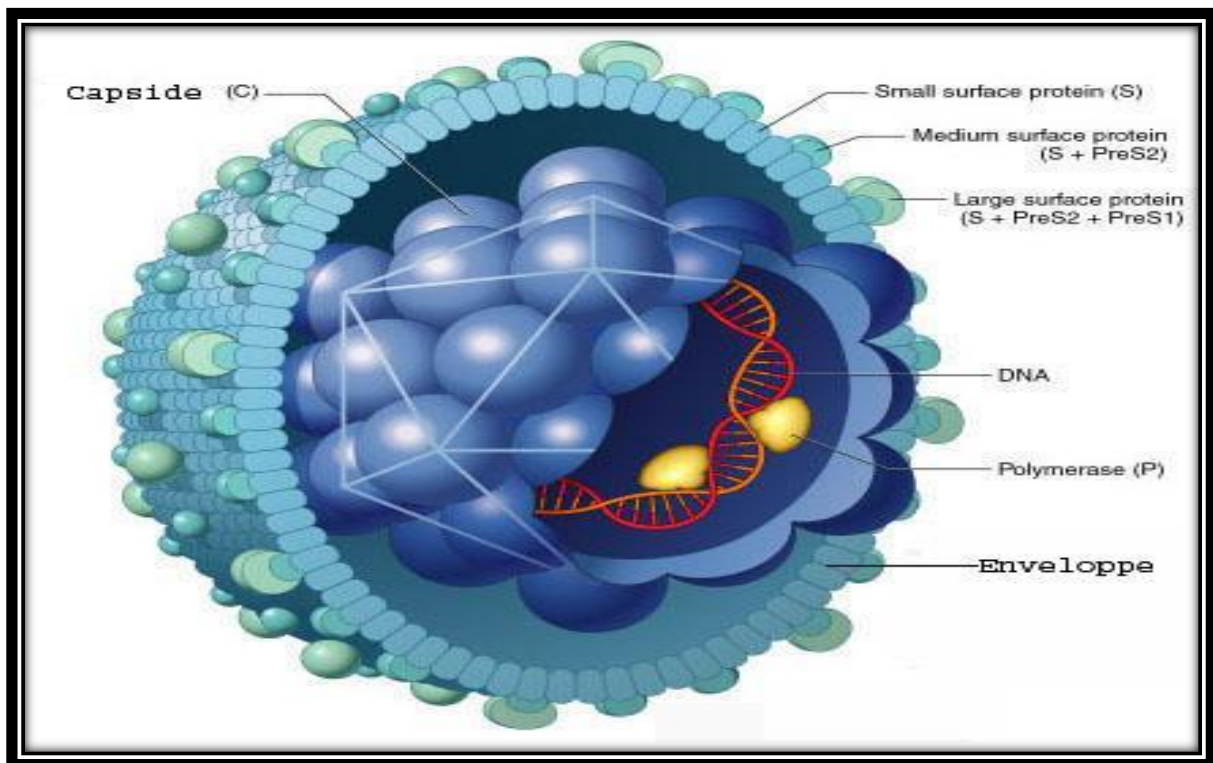


**Figure 1** : Distribution de l'HBV chronique à travers le monde  
(d'après Cindy *et al.*, 2009).

## I.2. L'hépatite B

Le virus de l'hépatite B (VHB) est le prototype d'une famille de virus à acide désoxyribonucléique (ADN) hépatotrope, les hepadnavirus. Il est responsable d'hépatites aiguës et peut induire, dans 5 % à 10 % des cas, une infection virale persistante chez l'adulte, susceptible d'aboutir à une cirrhose et à un carcinome hépatocellulaire.

Le virus de l'hépatite B est un petit virus enveloppé à ADN qui appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Le génome virale et son organisation génétique à été bien étudiée (**Figure 2**). Actuellement, on trouve huit génotypes différents (A-H) avec une distribution géographique différente. Le génotype du virus de l'hépatite a un certain impact, au cours de l'infection, sur le développement du carcinome hépatocellulaire sur la réponse aux traitements antiviraux. (Blum et *al.*, 2011).

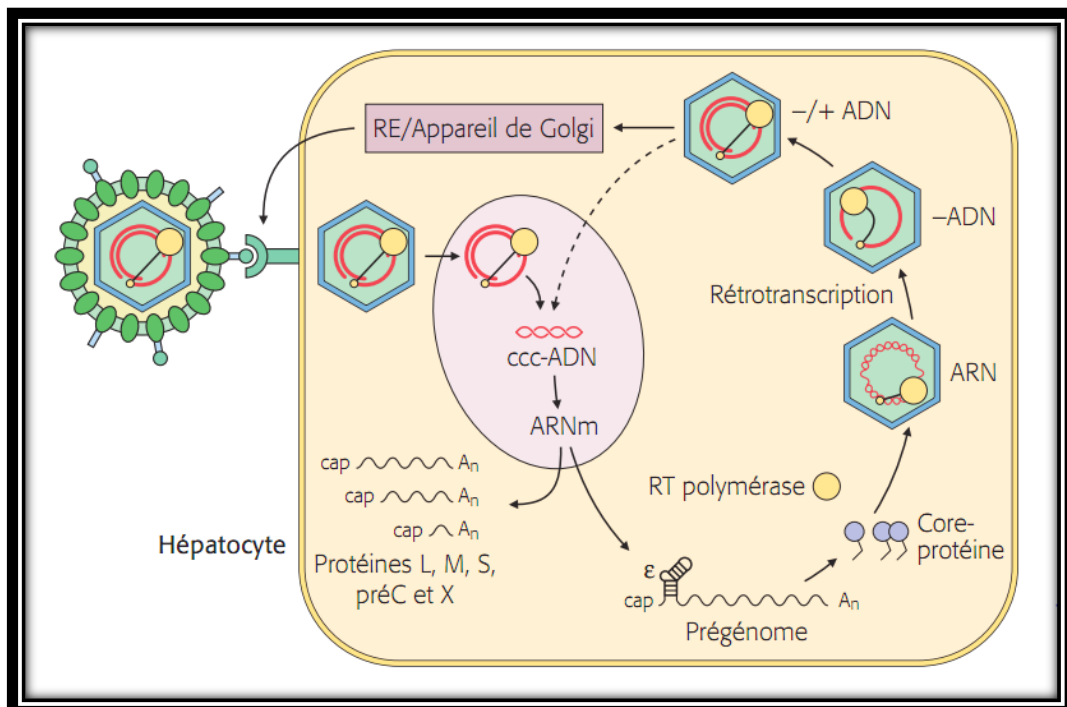


**Figure 2:** Structure du virus de l'hépatite B.

(James A. perkins, 2002)

### I.2.1. Cycle de vie de l'hépatite B

Le VHB est un virus strictement humain, il se multiplie dans les hépatocytes, il ne se réplique pas *in vitro* dans les cultures cellulaires. Le virus de l'hépatite B cible les hépatocytes et certaines cellules extrahépatiques comme les cellules mononuclées du sang. Après pénétration de la capside dans le cytoplasme de l'hépatocyte, l'ADN génomique bicaténaire et circulaire migre sous forme super enroulée dans le noyau, on parle alors d'ADNccc (covalent closed circular DNA). L'ADN viral est transcrit en ARN pré-génomique par une ARN polymérase II cellulaire, cet ARN pré-génomique synthétisé migre dans le cytoplasme et sert de matrice pour la synthèse de l'antigène HBc (Antigène de la capside du virus de l'hépatite B) par la polymérase virale. En parallèle, les différents ARNm viraux sont traduits en protéines virales. Dans la capside néoformée (HBc), l'ARN pré-génomique est transcrit en ADN par la polymérase virale qui possède une activité transcriptase inverse, cette enzyme permet la synthèse du brin complémentaire de l'ADN. Plus tard, les nucléocapsides sont enveloppées par des membranes intracellulaires et excrétées à l'extérieur par la voie de sécrétion du Réticulum endoplasmique/ Appareil de Golgi. Les particules virales infectieuses sont sécrétées à leur tour. (Blum et *al.*, 2010). (Figure 3).



**Figure 3** : Cycle de vie de l'hépatite

(D'après Zoulim et Trépo, 1998)

## **I.2.2. Transmission**

L'hépatite B est due à un virus transmissible pouvant causer des ulcérations au foie, des insuffisances hépatiques, et des maladies hépatiques comme la cirrhose ou le cancer du foie. Il se transmet par voie sexuelle mais aussi par des contacts des liquides biologiques dans les petites communautés. Par exemple dans le milieu familial, le virus est hautement contagieux.

Le réservoir du virus de l'hépatite B semble strictement humain et le virus peut résister dans le milieu extérieur pendant plus de 7 jours.

L'hépatite B est difficilement soignable. La plupart des gens infectés sans asymptomatiques. On les appelle porteurs asymptomatiques, ils jouent un rôle important dans la transmission de cette maladie. Il s'agit d'individus qui sont porteurs du virus, et ne manifestent pas de symptômes cliniques. Un dépistage sérologique coûteux est nécessaire. C'est pourquoi, bon nombre de personnes infectées par l'hépatite B pourraient ne jamais le savoir et le transmettre (Beasley *et al.*, 2009).

L'infection par l'HBV est préjudiciable si la mère est porteuse chronique de l'AgHBs. Le risque réside en une contamination de l'enfant au moment de l'accouchement, l'enfant contaminé devenant à son tour porteur chronique dans 80 à 90 % des cas. (Ranger-Rogez *et al.*, 2002).

## **I.2.3. Evolution**

L'infection initial par le virus de l'hépatite B (VHB) est souvent asymptomatique (60% des cas). La forme aigüe de la maladie (40% des cas) peut évoluer dans 0,1% à 1% des cas vers une hépatite fulminante souvent mortelle en l'absence de greffe du foie (Fazle Akbar *et al.*, 2007). En l'absence de prévention efficace, la réinfection du greffon est observée dans 70 % des cas. L'incidence est maximale chez les patients transplantés pour une cirrhose due au VHB, chez lesquels elle atteint 80 % avec un recul de 3 ans après la greffe dans la plupart des séries (Duvoux, 1998).

Cinq à dix pour cent des formes asymptomatiques et aigües peuvent également évoluer vers la chronicité. Cette forme de la maladie pouvant conduire à une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (Fazle Akbar *et al.*, 2007).



## **I.2.4. Le vaccin HB**

Le seul moyen de prévention effective jusqu'à maintenant est l'immunisation des porteurs par des antigènes libres du virus de l'hépatite B, qui peut généralement induire une réponse humorale accompagné par la production des anticorps, mais, plusieurs études précédentes ont montrées que 5-10% des personnes qui semblent sains ne produisent pas des niveaux adéquats des anticorps protectifs après une immunisation standard avec le vaccin HB qui contient l'antigène de surface de l'hépatite B libre (HB-s Ag). En plus le niveau des anticorps pour HB-s Ag (Anti-HBs) chez plusieurs personnes vaccinées, diminue considérablement au cours du temps ce que leur confère un risque potentiel de l'infection au futur. Le mécanisme derrière cette diminution n'est pas encore connu (Fazle Akbar *et al.*, 2007).

## **I.2.5. Problème des mutations**

Depuis une dizaine d'années, on assiste à une augmentation de la fréquence de virus dont les déterminants antigéniques de l'AgHBs ont subi une ou plusieurs mutations qui s'observent pour les virus soumis à une pression immunitaire naturelle ou induite par la vaccination ou la thérapie.

Une des mutations la plus fréquemment retrouvée chez les personnes infectées par le virus de l'hépatite B correspond à la substitution d'une acide aminée glycine par une arginine en position 145 de la protéine s (mutant G145R) (Pawlotsky, 2005). Selon les études relativement récentes, la prévalence des mutants de l'AgHBs pourrait atteindre près de 30% (Roque-Afonso, 2007).

## **I.2.6. Traitements**

Le traitement classique repose sur l'utilisation des antiviraux pour empêcher le virus de se multiplier mais de nos jours d'autres traitements sont proposés et testés pour leurs efficacités. (Blum *et al.*, 2010) tels que :

### **I.2.6.1. Le traitement interféron**

L'interféron (INF) a été disponible depuis une vingtaine d'années, mais plusieurs limitations empêchent leur utilisation, les thérapies basées sur les injections sont inopportunes, la réponse est très faible, ses effets secondaires sont plusieurs et quelques uns sont dangereux, en

plus son prix est très chers pour la plus part des patients. Cependant, pour les patients qui ne sont pas en stade de cirrhose avec une infection légère ou modérée, l'INF reste une bonne option, car le traitement est plus court, les mutations semblent être les dernières des problèmes et la plus parts des réponses sont permanentes et réduire ou abolir des complications tardifs (Blum *et al.*, 2010).

### **I.2.6.2. Les analogues des nucléosides**

Lamivudine est le premier analogue de nucléoside accepté dans les essais cliniques. Cette molécule a une capacité importante d'inhiber la réplication de l'HBV et ainsi retarder l'apparence des complications liées au virus d'HBV. Cependant le traitement à longue durée avec lamivudine est limité par l'émergence des mutations.

Adéfovir dipivoxil est un analogue du nucléoside d'adénosine monophosphate, qui est converti en métabolite active intracellulaire, l'adéfovir diphosphate, qui peut inhiber l'ADN polymérase des deux type, le type sauvage et le type d'HBV mutant résistant à lamivudine. (Jiang *et al.*, 2010).

### **I.2.7. L'HBV et le système immunitaire**

L'hépatite B se présente sous deux formes, aigue ou chronique .Dans 0,1% à 1% des cas l'infection peut évoluer vers une hépatite fulminante caractérisée par des destructions hépatocellulaires massives dont le mécanisme ou les mécanismes contrôlant cette transformation sont inconnues actuellement (Moraes dos Santos *et al.*, 2009).

Schématiquement, l'hépatite chronique B est caractérisée par trois phases :

1. une première phase dite de tolérance immunitaire avec une forte réplication virale;
2. une deuxième phase dite de < réaction immunitaire > avec une réplication virale modérée;
3. une troisième phase dite < non réplivative > avec une faible réplication virale (Cindy *et al.*, 2009).

Les deux premières phases ont une durée très variable (de quelques mois à des dizaines d'années) selon le statut immunitaire. Dans le parcours normal de l'infection par l'HBV, la

clairance du virus résulte le plus souvent d'une coopération entre l'immunité cellulaire et humorale. Plusieurs rapports ont décrits la persistance de l'antigène HBs et les anticorps anti-HBs dans 10 à 25 % des patients de l'hépatite B chronique (Vincent Thibault *et al.*, 2006).

Les cellules T cytotoxique CD8 et les T helper CD4 sont activées et participent dans la clairance de l'HBV des hépatocytes. Cependant, dans une infection chronique les cellules T CD8 et T CD4 deviendront hyper-répondeurs *vis à vis* de la grande charge en particules virales de l'HBV. Ce qui signifie que la grande charge du virus dans le sérum des patients peut être à l'origine d'une faiblesse de la réponse immunitaire cellulaire. L'étude de Jiang et ses collaborateurs a confirmée que même les cellules Th1estTh2 sont affaiblies dans l'infection par l'HBV chronique.

## **I.2.8. Sérologie de l'Hépatite B**

### **I.2.8.1. Antigène et anticorps HBs**

L'antigène HBs est détecté dans le sérum environ 1 à 3 mois après la contamination. Il s'agit en général du premier marqueur d'infection virale retrouvé dans le sang. L'antigène HBs est produit en quantité très importante par les hépatocytes, l'apparition d'anticorps anti-HBs rend compte de l'élimination virale et la guérison biologique. L'anticorps anti-HBs pourra persister pendant plusieurs années avant de disparaître (Trépo *et al.*, 1993).

### **2.8.2. Anticorps anti-HBc**

L'antigène central du VHB (HBc), est très difficilement détectable dans le sérum. Lors de la phase aiguë de l'hépatite B, l'anticorps anti-HBc est de classe IgM. En revanche, une hépatite chronique active se traduit généralement par une augmentation exclusive des anti-HBc de type gamma (IgG anti-HBc) (Trépo *et al.*, 1993).

### **2.8.3. Système antigène-anticorps HBe**

La détection de l'antigène HBe (l'antigène de l'enveloppe du virus de l'hépatite B) sérique demeure un marqueur direct de l'existence d'une réplication du VHB, ensuite l'anticorps anti-HBe vient remplacer l'antigène HBe. Ce passage de l'état de porteur d'antigène à celui de porteur d'anticorps signe la séroconversion. Classiquement, la séroconversion se traduit par la

diminution de l'ADN viral sérique et ne permet pas d'affirmer la négativation complète de la réplication virale puisque des variantes d'antigène HBe négatifs peuvent se présenter au moment de la séroconversion (Trépo *et al.*, 1993)..

#### **I.2.8.4. ADN viral sérique**

La détection de l'ADN viral dans le sérum permet le diagnostic d'une réplication virale. L'ADN viral est détecté de façon classique par des techniques d'hybridation moléculaire ou technique de spot test (Trépo *et al.*, 1993)..

### **I.2.9. Comment peut-on détecter l'HBV**

Le diagnostic de HVB est fait par évaluation des paramètres biochimiques des fonctions hépatiques. L'évaluation de laboratoire devrait inclure, le dosage de bilirubine totale, la protéine totale, l'albumine et des transaminases (ALAT, ASAT), phosphatase alcaline et le temps de prothrombine. Mais le diagnostic précis reste sérologique. Dans le sang, on distingue deux types de marqueurs viraux; (i) les antigènes (Ag) qui constituent un signe direct de la présence du virus et (ii) les anticorps (Ac) ou immunoglobulines, reflétant la réaction immunitaire de l'organisme. Les différents marqueurs de l'hépatite B n'apparaissent pas au même stade de la maladie et ne sont pas faciles à interpréter (Yusuf Önlén *et al.*, 2008).

#### **I.2.9.1. Méthode ELISA**

Elles reposent sur l'utilisation d'un support solide (puits de microplaques, billes, microparticules) celui-ci est recouvert soit d'antigènes viraux pour la détection des anticorps, soit d'anticorps monoclonaux pour la détection des antigènes.

Le sérum du patient est mis au contact du support ainsi revêtu. Un complexe antigène anticorps se forme alors. La révélation de ce complexe est effectuée par la fixation d'une enzyme transformant un substrat spécifique en composé coloré ou émettant un signal.

La détection de signal est ensuite assurée par un spectrophotomètre, un fluorimètre ou un chimioluminomètre, selon le type de signal émis.

Les résultats sont habituellement exprimés par un ratio qui correspond au signal de l'échantillon sur le signal du seuil établi pour chaque trousse utilisée. Le ratio est

proportionnel ou inversement proportionnel à la quantité de marqueurs présente dans le sérum, selon qu'il s'agisse de techniques dites directes ou de techniques par compétition.

De nombreux réactifs aux performances sensiblement équivalentes, pouvant être utilisés sur des automates ou de façon manuelle sont aujourd'hui disponibles pour la détection des marqueurs du VHB (Japhet *et al.*, 2011)

### **I.2.9.2. Tests moléculaires**

La détection /quantification de l'ADN du virus de l'hépatite est le meilleur marqueur de réplication virale. Il peut être réalisé par hybridation de l'ADN virale à des sondes spécifiques, éventuellement associée à une amplification du signal, ou par amplification génique de type *polymerase chaine reaction*(PCR).

Ces techniques se classent de la façon suivante par ordre de sensibilité croissante : hybridation, amplification du signal, amplification génique.

La mise en évidence d'une réplication virale est utilisée pour poser l'indication thérapeutique au cours de l'hépatite chronique B. La quantification de l'ADN virale est également indispensable au suivi du traitement par l'interféron alpha. (Vincent Thibault *et al.*, 2006).

## **I.3. La xanthine oxydoréductase**

### **I.3.1. Distribution et localisation de la XOR**

La XOR est une enzyme distribuée dans la plus part des êtres vivants, comme les bactéries (Woolfolk and Downard, 1977), les végétaux et l'homme. Le gène de la XOR est hautement exprimé dans le foie et l'intestin grêle où il a une forte activité (Parks and Granger, 1986).

Les études ont montré que l'enzyme est localisée dans les différents tissus des mammifères, en particulier les cellules hépatiques et les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Moriwaki *et al.*, 1993). Dans les tissus humains, la XOR se trouve dans le foie, l'intestin grêle et la glande mammaire (Linder *et al.*, 1999).

Les méthodes de localisation intracellulaire montrent que la XOR se trouve à fortes concentrations dans le cytoplasme (Jarasch *et al.*, 1981) et au niveau de la membrane cellulaire (Rouquette *et al.*, 1998) et elle est très abondante dans le lait

### **I.3.2. Rôles physiologiques de la XOR**

La XOR joue un rôle principal dans le catabolisme des purines en acide urique (Bray, 1975), mais elle a aussi d'autres fonctions plus larges dans la physiologie de l'organisme tels que son rôle dans l'absorption du Fer au niveau de l'intestin et du foie (Topham et al., 1982). Plusieurs études ont pu montrer une activité antimicrobienne de la XOR du lait humain et bovin qui inhibe la croissance bactérienne *in vitro* d'une manière nitrite-dépendante. *In vivo*, les nourrissons ayant reçu du lait maternel riche en XOR ont moins de risques de développer des gastroentérites que ceux ayant reçu la formule infantile (Stevens et al., 2000). Une étude a pu détecter des bactéries partiellement détruites entourées par la XOR dans les cellules épithéliales de l'intestin du rat. Ils ont supposé que ces bactéries ont été attaquées par le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène générés par la XOR.

La XO a une action antivirale en catalysant la conversion du retinaldéhyde en acide rétinoïque. Les dérivés de cet acide peuvent inhiber la réplication virale empêchant ainsi la propagation de l'infection (Taibi et al., 2001).

### **I.3.3. Rôle de la XOR dans l'inflammation**

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents interférons, tels que TNF-alpha et le fragment C5a du complément, qui provoquent la conversion de la XDH (Xanthine déshydrogénase) en XO (xanthine oxydase) (Friedl et al., 1989). A lors, la production de ROS est élevée. Ce qui provoque l'activation de NF-kB (facteur nucléaire de transcription) régulateur de la production des cytokines (TNF- $\alpha$ , Interleukines : IL-1, IL-2 et IL-6) (Burdon and Gill, 1993).

Les ROS (espèce réactive oxygène) produites par la XOR peuvent également réagir avec les composés de la membrane cellulaire, tel l'acide arachidonique, pour produire des lipides chimioattractants des neutrophiles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire (Perez et al., 1990).

L'inflammation est une réaction 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. La XOR, impliquée dans le déroulement de la réaction physiologique de l'inflammation, participe également dans son amplification par sa capacité

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

### **I.3.4. Les anticorps anti-XOR**

La xanthine oxydoréductase est présente aussi avec une grande concentration dans le foie, d'où il peut être libéré pendant les lésions du foie dans la circulation sanguine, et provoque une dysfonction vasculaire. (Martin *et al.*, 2004).

L'origine des anticorps anti-XOR est largement discuté, deux hypothèses ont été proposées :

- 1) Les anticorps anti XOR produits chez l'homme et les animaux sont des auto-anticorps générés contre la XOR endogène libéré des cellules endothéliales des capillaires endommagés (Lewis et Ng, 1991).
- 2) 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 lipidiques avec une proportion significative qui est absorbée dans un état intact (Oster, 1974).

## ***CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES***



## **II.1. Matériel biologique**

### **II.1.1. Sérums humains**

Vingt trois sérums de sujets humains présentant des hépatites hospitalisés au niveau du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Sétif nous ont été donnés gracieusement par le Professeur A. Touabti du laboratoire central du CHU de Sétif. Les sérums collectés ont été conservés à – 20 °C jusqu'à utilisation

### **II.1.2. La xanthine oxydoréductase**

La xanthine oxydoréductase a été purifiée du lait maternel humain au niveau de l'Université de Bath en Angleterre. Les Anticorps anti-XOR utilisés sont produits par A. MOSBAH (2010) lors de la réalisation de son magistère et les anticorps anti-IgG ou IgM humaines marqués à la peroxydase proviennent de Sigma Aldrich.

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Tests de pureté de la XORh**

La pureté de l'enzyme xanthine oxydoréductase humaine (XORh) préparée est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et spectrophotométriquement par le rapport protéine flavine (PFR).

### **II. 2.2. Dosage des anticorps anti- XOR sérique humains**

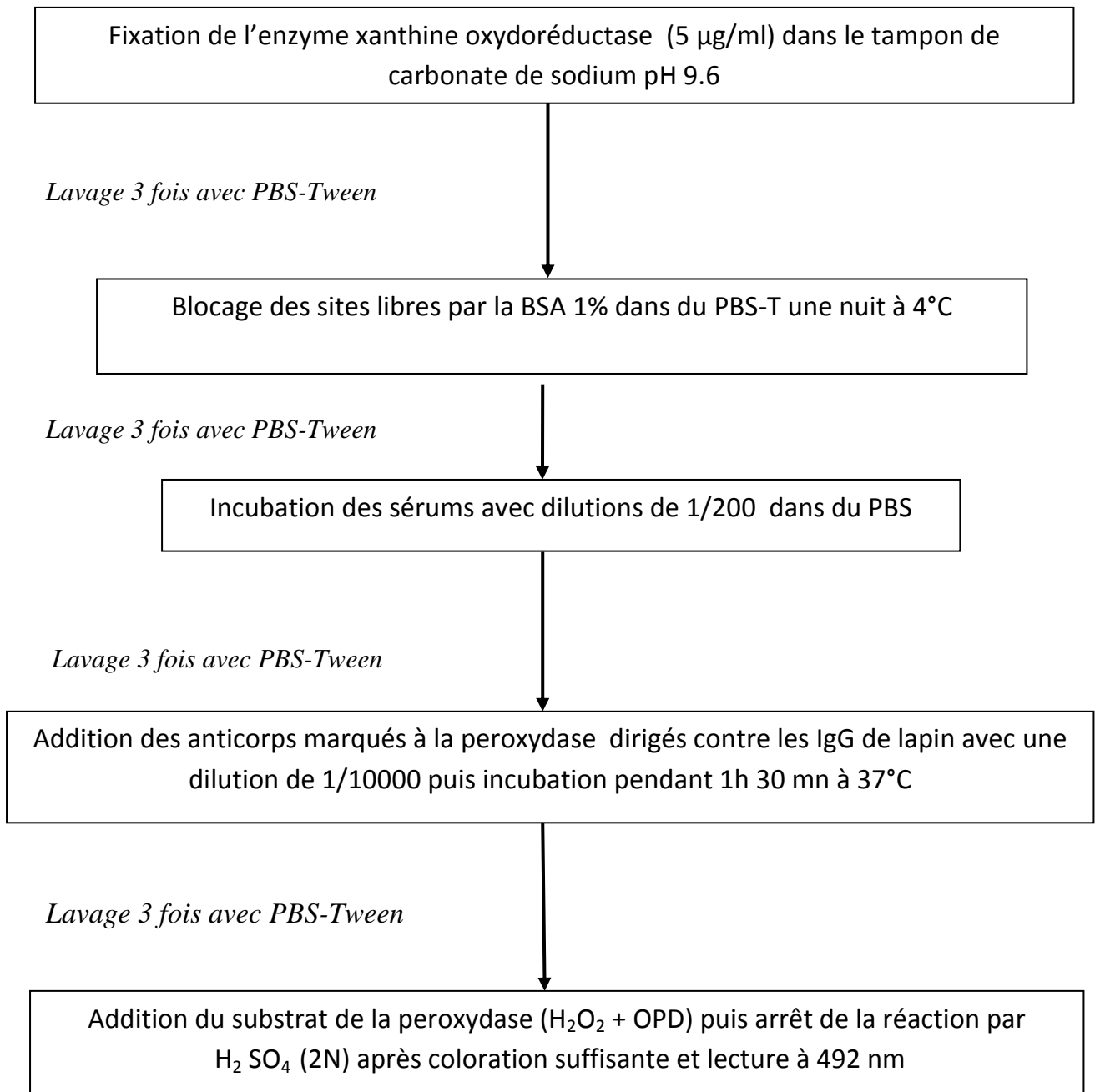
#### **II.2.2.1. ELISA directe**

Le dosage des anticorps dans les sérums est déterminé comme suit. Les XOR humains purifiés sont adsorbés (5µg/ ml) dans Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 Mm renfermant 0.01 d'azide de sodium (100µl) dans chaque puits des plaques de microtitration pendant 4 heures à température de laboratoire. Les puits sont ensuite lavés trois fois pendant 5 min (200 µl/puits) avec du PBS contenant 0.1% de Tween 20 (PBS-T). Après un blocage des sites libres pendant une nuit à 4°C avec de la BSA 1% dans le PBS et lavage trois fois avec PBS-Tween, les 23 sérums à dilution de 1/200 sont ajoutés individuellement en triplets puis la plaque est incubée pendant 1h 30 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-Tween, puis les anti-Immunoglobulines de

lapin marquées à la peroxydase (Sigma, dilué 1/10000 fois dans du PBS) sont ajoutés et incubée pendant 90 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-T, le tampon substrat est ajouté (100µl/puits) et la coloration jaune est laissée développer pendant 20 mn puis la réaction est arrêtée par 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et l'absorbance est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque (EL<sub>X</sub>800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) à 492 nm. Le tampon de substrat est du citrate de sodium 0,1 M pH 5,0 renfermant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 v/v) et l'orthophénylène diamine (OPD) à 0,04% (p/v).

Les taux sériques en anticorps anti-XOR ont été déterminés en se basant sur une courbe standard de l'absorbance en fonction de logarithme de la concentration, la courbe est tracée pour chaque plaque et la partie linéaire est utilisée pour calculer les concentrations.

Le protocole de la méthode d'ELISA utilisé dans nos études est résumé dans la **figure 4**.



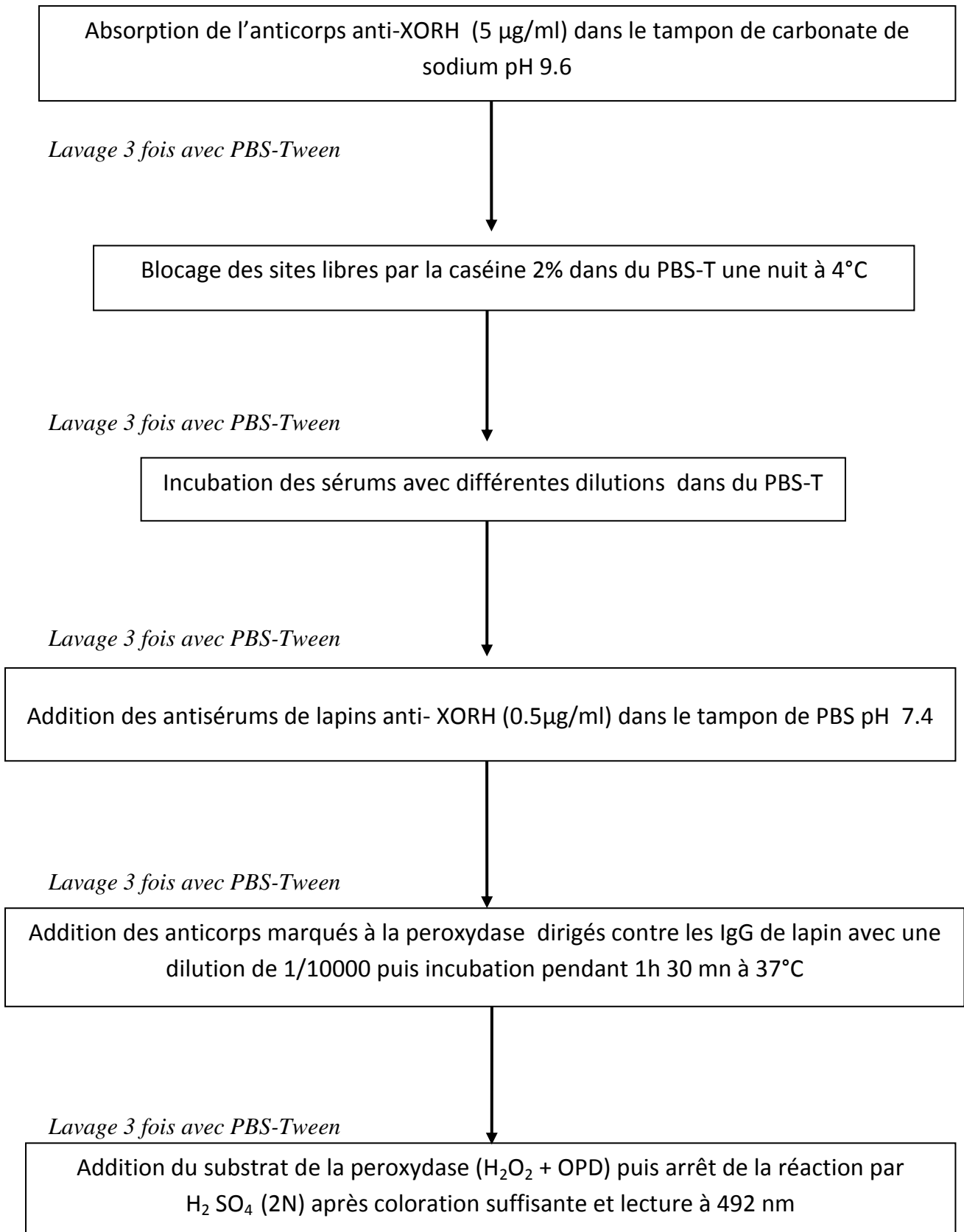
**Figure 4:** Protocole de la méthode d'ELISA directe utilisé dans notre étude

## II.2.3. Dosage de la xanthine oxydoréductase sérique

### II.2.3.1. ELISA Sandwich

Le dosage de la XORH dans les sérums est déterminé comme suit. Les anticorps humains anti-XOR purifiés sont absorbés (5µg/ ml) dans Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 Mm renfermant 0.01 d'azide de sodium (100µl) dans chaque puits des plaques de microtitration pendant 4 heures à température de laboratoire. Les puits sont ensuite lavés trois fois pendant 5 min (200µl/puits) avec du PBS contenant 0.1% de Tween 20 (PBS-T). Après un blocage des sites libres pendant une nuit à 4°C avec de la caséine 2% dans le PBS et lavage trois fois avec PBS-Tween, les sérums à dilution de 1/200 sont ajoutés en triplets puis la plaque est incubée pendant 1h 30 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-Tween, un sérum de lapin anti-XORH est ajouté avec une concentration de (0.5 µg/ ml) et incubé pendant 1h 30 mn à 37°C. La plaque est lavée trois fois par le PBS-Tween, puis les anti-IgG de lapin marquées à la peroxydase (Sigma, dilué 1/10000 fois dans du PBS) sont ajoutés et incubée pendant 90 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-T, le tampon substrat est ajouté (100µl/puits) et la coloration jaune est laissée développer pendant 20 mn puis la réaction est arrêtée par 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et l'absorbance est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque(EL<sub>X</sub>800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) à 492 nm. Le tampon de substrat est du citrate de sodium 0,1 M pH 5,0 renfermant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 v/v) et l'orthophenylène diamine (OPD) à 0,04% (p/v).

La concentration de la XORH contenue dans chaque sérum est déterminée en se basant sur une courbe standard de l'absorbance en fonction de logarithme de la concentration, la courbe est tracée pour chaque plaque et la partie linéaire est utilisée pour calculer les concentrations. Le protocole de la méthode d'ELISA utilisé dans nos études est résumé dans la **figure 5**



**Figure 5:** Protocole de la méthode d'ELISA Sandwich utilisé dans notre étude

### ***III. RESULTATS ET DISCUSSION***

### III.1. Control de la pureté et activité oxydase de la XORh purifiée

La pureté de l'enzyme est confirmée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE 10%) (**Figure 6**). Le chemin électrophorétique présente une bande majeure de poids moléculaire d'environ 150 KDa. Le rapport protéine/flavine, déterminé spectrophotométriquement par lecture des densités optiques de l'enzyme à 280 nm et 450 nm et par le scan entre 200 nm et 700 nm, était très proche de 5 (4,81, n=3) est un critère de pureté (Bray, 1975). Ces deux paramètres montrent que notre enzyme est pure. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Atmani et ses collaborateurs (2004).

Par manque du NADH on a pu calculer l'activité totale (XOR + XDH) et on a calculé simplement l'activité oxydase ou la xanthine est utilisée comme substrat et l'O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons. L'activité oxydase obtenue est de 0.044 µmol/min/mg de protéine.

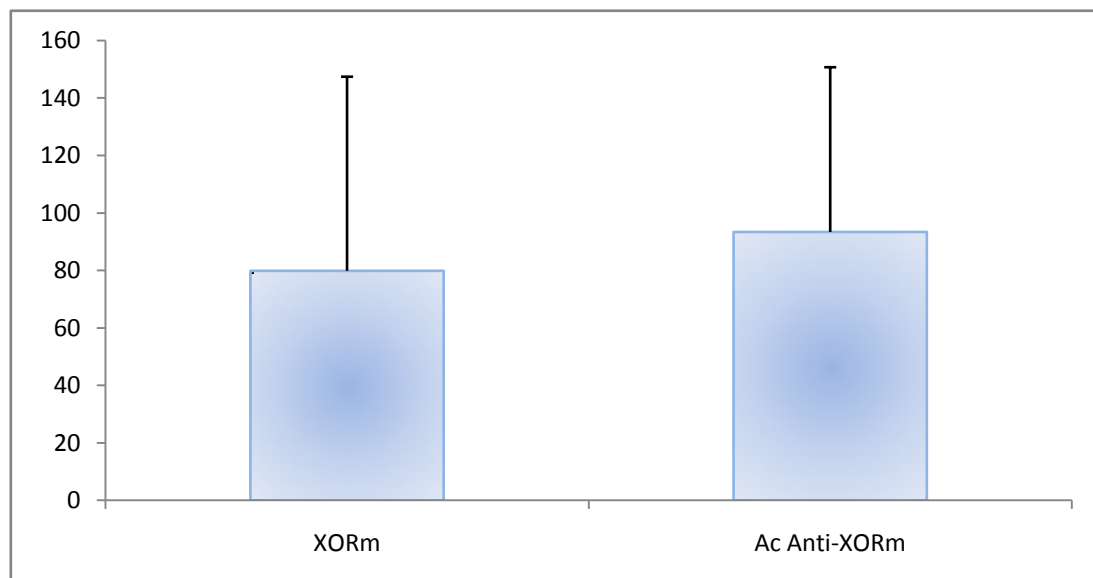


**Figure 6:** Electrophorèse (SDS-PAGE) de la xanthine oxydoréductase humaine purifiée à partir du lait humain donnant principalement une majeure de 150 KDa et une bande mineur de 145 KDa.

### III. 2. Dosage des taux de XOR sériques et anticorps anti- XOR sérique humains

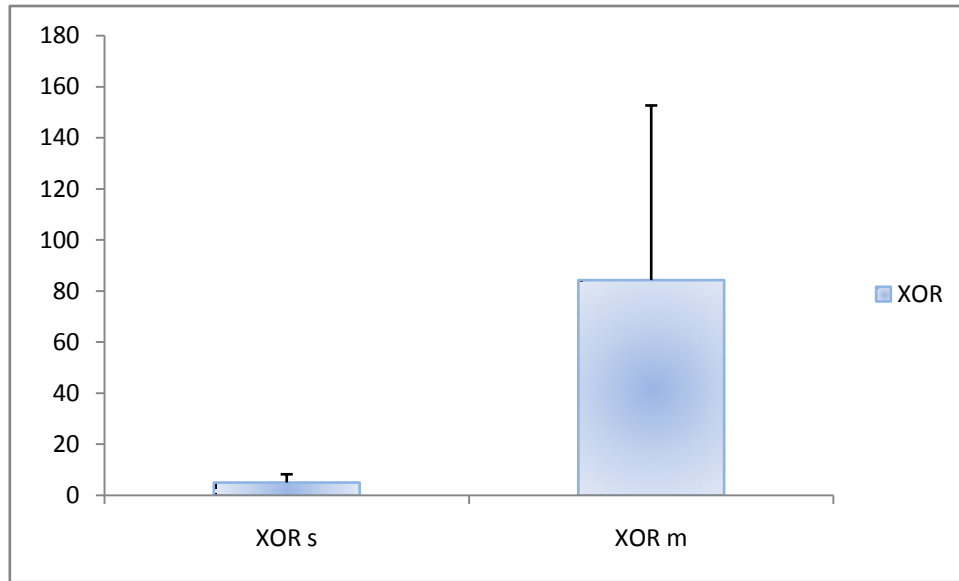
Différentes dilutions de la XORh ont été utilisées dans chaque plaque de microtitration et on trace une courbe d'étalonnage pour chaque plaque. Seules les valeurs des DO rentrant dans la partie linéaire de cette courbe sont considérées. Les dilutions (1/200) des sérums à doser ont été utilisées en triplicata.

Par le test ELISA direct décrit en matériels et méthodes, le taux des anticorps anti-XORh ont été déterminés ainsi que les taux sériques en XOR (**Figure 7**). Les taux sériques en XORh ( $79,83 \pm 67,52$  ng /ml) et en anticorps ati-XOR ( $83,69 \pm 67,52$   $\mu$ g /ml) sont significativement supérieurs aux taux des sujets sains ( $5,11 \pm 3,23$  ng /ml et de  $26,52 \pm 16,322$   $\mu$ g/ml respectivement) (**Figure 8**).



**Figure 7:** Concentrations de la XORH et des anticorps Anti-XOR chez les 23 sujets malades (atteintes hépatiques) déterminés par ELISA sandwich et ELISA directe. Les taux en XOR sériques sont exprimés en ng/ml et les taux en anticorps anti-XOR sont exprimés en  $\mu$ g/ml, n=3).





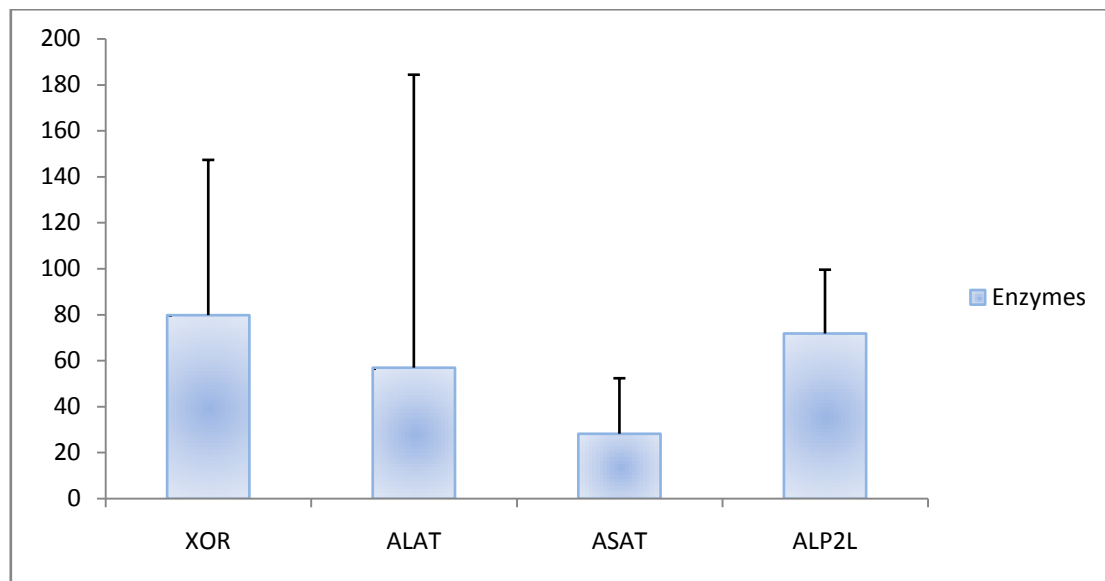
**Figure 8:** Taux sériques en XOR chez les sujets sains (XORs) et les sujets malades (XORm) ayant des atteintes hépatiques (Les taux en XOR sériques sont exprimés en ng/ml, n=3).

Il ya eu des études controverses sur le dosage de la XOR sérique. Des études de développement d'un test d'ELISA sandwich pour la détermination de la distribution tissulaire de XORh à été rapporté pour la première fois par Saneto et ses collaborateurs (1996) mais ils ont échoué de détecter dans vingt sérums de sujets normaux et leur test avait une limite de détection de 5 ng/ml. Par contre Batteli et ses collaborateurs (1999 et 2001) ont décrit un test ELISA compétitif conçu spécifiquement pour la détermination de XORh sérique avec une limite inférieure de détection de 32 ng/ml.

L'élévation des taux de la XOR sérique chez les patients atteints d'hépatites est due à la présence de la XOR en grande quantité dans le foie, dont le taux est augmenté dans plusieurs pathologies humaines, en particulier dans celles mettant en jeu les lésions hépatiques. Il à été démontré que l'activité de la XOR sérique est significativement élevée (50 fois par rapport à la limite supérieure normale) chez les patients avec des pathologies hépatiques diverses (Giller *et al.*, 2008), mais en réalité la plupart des test de dosage de l'activité XOR sérique sont très complexe et inappropriés pour les test de routine et souffrent du fait que d'une part, l'activité de la XOR sérique humaine est intrinsèquement faible (Harisson, 1997 ; Bray *et al.*, 1999) et d'autre part variable (Brown *et al.*, 1995 ; Godber *et al.*, 1998) vu les différents formes (actives et inactives) de l'enzyme XOR humaine.

### III.3. Corrélation entre le taux de la XORh sérique et les paramètres biochimiques

On a essayé de comparer les taux sériques en transaminases (ALAT et ASAT) et en phosphatase alcaline (PA) avec les taux de la XORh sérique (**Figure 9**) et il ressort que le dosage de la XORh sérique que la XORh peut être utilisé comme un paramètre clinique aussi efficace que le dosage des transaminases pour un diagnostic précoce des lésions hépatiques pour un suivi thérapeutique approprié, en se basant sur le test d'ELISA sandwich pour le dosage de la XORh sérique.

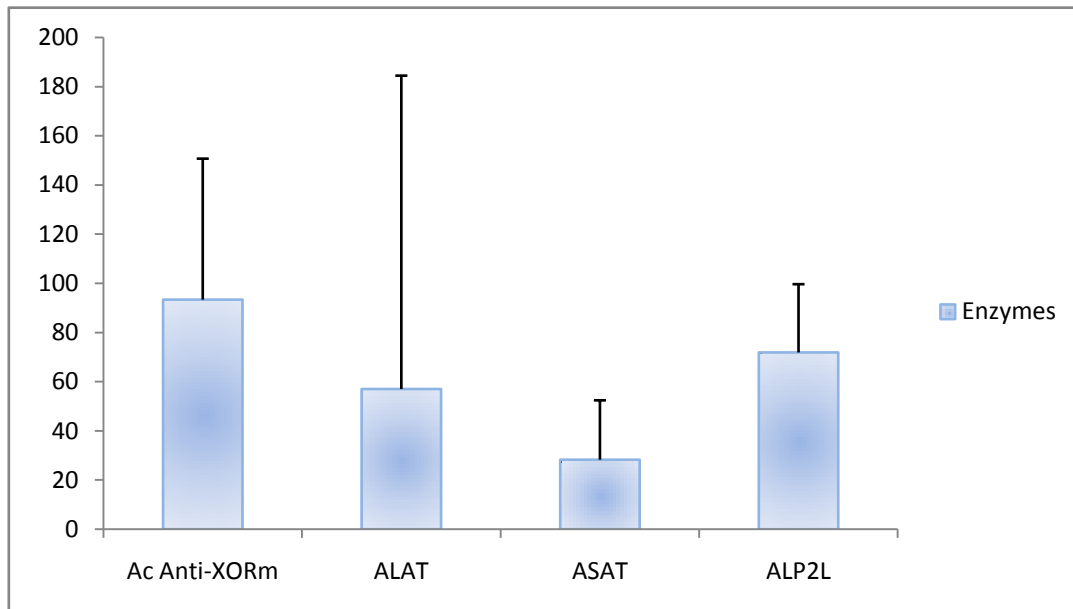


**Figure 9 :** Comparaison des concentrations de la XOR chez les sujets malades et des concentrations des ALAT et ASAT et PA chez les mêmes sujets (Les taux en XOR sériques sont exprimés en ng/ml, et les enzymes ALAT, ASAT et PA en terme d'activités spécifiques, n=3).

### III.4. Corrélation des taux des anticorps anti-XORh et les paramètres biochimiques

On a essayé de comparer les taux sériques en transaminases (ALAT et ASAT) et en phosphatase alcaline (PA) avec les taux en anticorps anti-XORh (**Figure 10**) et il ressort que le dosage des anticorps anti XORh peut également servir comme indicateur d'atteinte hépatiques aussi efficace que le dosage des transaminases pour un diagnostic précoce des lésions hépatiques pour un suivi thérapeutique approprié. Les anticorps sont généralement produits suite à la libération de la XOR hépatique dans la circulation stimulant ainsi le

système immunitaire à produire des anticorps. Il est à noter que l'élévation des transaminases n'est pas spécifique à l'atteinte hépatique car elles sont également trop élevées lors des atteintes cardiovasculaires.



**Figure 10 :** Comparaison des concentrations des anticorps anti-XORh des 23 sujets malades et avec les enzymes (ALAT et l'ASAT et l'PA) chez les mêmes sujets. (Les taux en XOR sériques sont exprimés en ng/ml, et les enzymes ALAT, ASAT et PA en terme d'activités spécifiques, n=3).

Afin d'évaluer nos résultats préliminaires en terme du taux en XORh et anticorps anti-XORh sériques nous les avons comparés aux paramètres enzymatiques cliniques utilisés en routine dans les laboratoires des analyses médicales (transaminases ; alanine amino transférase, ALAT, et aspartate amino transferase, ASAT, ainsi que la PA.) chez les 23 sujets atteintes hépatiques.

L'étude des taux des paramètres sérique de routine ALAT et ASAT et PA ainsi que taux en XORh et anticorps anti-XORh sériques des 23 sujets ayant des atteintes hépatiques a montré des différences significatives. Bien qu'il n'ya pas eu une bonne corrélation entre les du taux en XORh et anticorps anti-XORh sériques, il est évident que les taux sériques en XORh ainsi que les anticorps anti-XORh sont des paramètres aussi efficaces que les paramètres biochimiques utilisés.

### III.5. Discussion

Dans cette étude on a réalisé un test d'ELISA direct pour doser les anticorps anti-xanthine oxydoréductase chez 23 sujets avec atteinte hépatique et un ELISA sandwich pour doser le taux sérique en xanthine oxydoréductase chez les mêmes sujets.

Les résultats obtenus montrent la présence de la Xanthine oxydoréductase chez tous les patients avec des concentrations plus élevées  $79,83 \pm 67,52$  ng /ml par rapport aux concentrations de la xanthine oxydoréductase présente chez des sujets sains ( $5,11 \pm 3,23$  ng /ml) (Mosbah, 2010). Battelli et al. (2001) ont également rapporté on taux de la XORh sérique dans divers pathologies hépatiques (plus de  $1\mu\text{g/ml}$ ).

L'élévation des taux de la XORh sérique chez les patients atteints d'hépatites est due à la richesse du foie en XORh. Le taux de l'enzyme sérique est augmenté dans plusieurs pathologies humaines, en particulier dans celles mettant en jeu les lésions hépatiques (Battelli et al., 2001). Il a été démontré que l'activité de la XORH sérique est significativement élevée chez les patients avec des pathologies hépatiques diverses (Martin et al., 2004) mais en réalité la plupart des tests de dosage de l'activité XORh sérique sont très complexes et inappropriés pour les tests de routine et souffrent du fait que d'une part, l'activité de la XORh sérique est intrinsèquement faible (Harisson, 1997 ; Bray et al., 1999) et d'autre part variable vu les différents formes (actives et inactives) de l'enzyme XORH (Brown *et al.*, 1995; Godber *et al.*, 1998).

Le dosage des anticorps anti-xanthine oxydoréductase chez les sujets malades montre la présence des taux élevés en anticorps anti-XOR chez tous les sujets étudiés. La comparaison des taux sériques en XORh des sujets malades avec les taux des transaminases (ALAT et ASAT, ALP2L) sériques montre que l'augmentation des taux de la XORh sérique est plus significative que celle des transaminases.

D'après nos résultats, l'augmentation significative des taux des anticorps anti-XORH chez les sujets ayant des lésions hépatiques permet de considérer l'enzyme et les anticorps comme des paramètres biologiques aussi sensibles que le dosage des transaminases.

La détermination du taux des anticorps anti-XOR est par l'ELISA directe est facile à réaliser. De même, le développement d'un tel kit de dosage de la XORh (ELISA sandwich) et des anticorps anti-XOR est d'une importance certaine à tous les niveaux. Ceci souligne l'importance diagnostique et pronostique du taux sérique de la XORh et les anticorps serique

anti-XORH, qui a été reconnue depuis des années mais son utilisation comme paramètre biologique n'a pas vu le jour par manque d'un test simple et fiable adéquat aux applications de routine. Sur le plan clinique, il sera d'une importance capitale pour une détection précoce des lésions hépatiques et pour le suivi thérapeutique et sur le plan économique, ce test aura un intérêt dans l'industrie pharmaceutique.

***CHAPITRE IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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: 1194-1199.
- Beasley, R.P., Hwang, L Y., Lin, C.C., Leu, ML., Stevens, C.E., Szmuness, W. and Chen, K.P.** (1982). Incidence of hepatitis b virus infections in preschool children in Taiwan. *J. Infect. Dis.*; 146:198-204.
- Beretta, E. and Capasso, V.** (1986). On the general structure of epidemic systems. Global asymptotic stability. *Comput. Math. Appl.*, 12, 677-694.
- Blake, D.R., Stevens, C.R., Sahinogla, T.M., Ellis, G., Gaffney, K., Edmonds, S., Benboubetra, M., Harrison, R., Jawed, S., Kanezler, J., Miller, T.M., Winyord, P.G. and Zhang Z.** (1997). Xanthine oxidase; four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. *Biochem. Soc. Trans.*, 25, 812-816.
- Blum, H.E., Grimm, D. Thimme, R.** (2010). HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol. Int.*, 5: 644–653.
- Bray, R. C., Lowe, D., Godber, B., Harrison, R., Eisenthal, R.** (1999). Properties of xanthine oxidase from human milk: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulfur centres. In *Flavins and Flavoproteins, Proceedings of the 13th International Symposium, Konstanz, Germany* (Ghisla, S., Kroneck, P. M. H., Macheroux, P. and Sund, H., eds.). *Agency for Scientific Publications, Berlin*, pp:775–778.
- Bray, R.C.** (1975). Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In "Boyer P.D (Eds.), *The enzymes*" 3rd Ed. *Academic Press*, New York. pp: 299-419.
- Brown, A. M., Benboubetra, M., Ellison, M., Powell, D., Reckless, J. D., Harrison, R.** (1995). Molecular activation-deactivation of xanthine oxidase in human milk. *Biochim. Biophys. Acta* . 1245: 248-254.
- Burdon R.H. and Gill V.** (1993). Cellular generated active oxygen species and Hella Cell proliferation. *Free Rad. Res. Comm.* 19, 203-213.-*Christophe Duvoux.s, (1998). Virus de l'hépatite B et transplantation hépatique. Medecine thérapeutique, 4, 37-43.*

**Cindy, M. Weinbaum; Ian Williams; Eric E.; Susan A. Wang; Lyn Finelli, Annemarie Wasley; Stephanie M. Neitzel; and John W. Ward.** (2009). Recommendations for Identification and Public Health Management of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *CDC*, 57:1-20.

**Damião Carlos Moraes dos Santos; José Manoel da Silva Gomes Martinho; Lucio Filgueiras Pacheco-Moreira; Cristina Carvalho Viana de Araújo; Barbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira; Barbara Vieira Lago; Marcelo Alves Pinto and Vanessa Salete de Paula.** (2009). Fulminant hepatitis failure in adults and children from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13: 1413-8670.

**Fazle Akbar, S.K., Furukawa, S., Yoshida, O., Hiasa, H., Horiike, N. and Onji, M.** (2007). Induction of anti-HBs in HB vaccine nonresponders in vivo by hepatitis B surface antigen-pulsed blood dendritic cells. *Journal of Hepatology*, 47: 60–66.

**Friedl H.P., Till G.O., Ryan U.S. and Ward P.A.** (1989). Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 3, 2512-2518.

**Harrison, R.** (1997). Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. *Biochem Soc Trans Rev.* 25: 786-791.

**Jarasch E.D., Grund C., Bruder G., Heid H.W., Keenan T.W. and Franke W.W.** (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*. 25, 67-82.

**Lewis, W. H. P., Ng, Y. L. E.** (1991) Human xanthine oxidase antibody levels: variation between males and females in Chinese and Europeans. *Med. Lab. Sci. J.*, 48: 84 -88.

**Linder N., Rapola J. and Raivio K.O.** (1999). Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory Invest.*, 79, 967-974.

**Margaret Oluwatoyin Japhet; Olufisayo Adeyemi Adesina; Emmanuel Donbraye and Moses Olubusuyi Adewumi** (2011). Hepatitis B Core IgM antibody (anti-HBcIgM) among hepatitis B Surface antigen (HBsAg) negative blood donors in Nigeria, *Virol. J.*, 8: 513-518.



**Martin, H. M., Moore, K. P., Bosmans, E., Davies, S., Burroughs, A. K., Dhillon, A. P., Tosh, D., Harrison, R.** (2004). Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Free Radic Biol Med.*, 37: 1214-1223.

**Moriwaki Y., Yamamoto T., Suda M., Takahashi S., Agbedana O.E., Hada T. and Higashino K.** (1993). Purification and immunohistochemical localization of human xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1164, 327-330.

**Oster, K. A., Oster, J. B., Ross, D. J.** (1974) Immune response to bovine xanthine oxidase in atherosclerotic patients. *Am. Lab. J.* 6: 41-47.

**Parks D.A. and Granger D.N.** (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and pathology. *Acta. Physiol. Scand. [Suppl]*, 548: 87-99.

**Pawlotsky, J.M.** (2005). The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J. Clin Virol*, 34 Suppl.1:, S125-S129.

**Perez, H.D., Weksler, B.B. and Goldstein I.M.** (1990). Generation of a chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generating system. *Inflammation.* 4, 313-328.

**Ranger-Rogez, S., Alain, S. and Denis, F.** (2002) Virus des hépatites : transmission mère-enfant. *Pathologie Biologie*, 50:568-575.

**Roque-Afonso A.; Férey MP; Ly TD; Graube A; Costa-Faria L.**( 2007),. Viral and clinical factors associated with surface gene variants among hepatitis B virus carriers. *Antivir. J. Clin. Microbiol.*, 12: 1255-1263.

**Rouquette M., Page S., Bryant R., Benboubetra M., Stevens C.R., Blake D.R., Whish W.D., Harrison R. and Tosh D.** (1998). Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localized on the outer surface of human endothelial cells in culture. *FEBS Lett.*, 426: 397-401.

**Soussen P. and Le Pendeven, C.** (2010). Virus de l'hépatite B. *Biologie médicale*, 90:55-60.

**Stevens, C.R., Miller, T.M., Clinch, J.G., Kanczler, J.M., Bodamyali, T. and Blake, D.R.** (2000). Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet.* 356, 829-830.

**Taibi, G., Paganini, A., Gueli, M.C., Ampola, F. and Nicotra, C.M.** (2001). Xanthine oxidase catalyzes the synthesis of retinoic acid. *J. Enz. Inh.*, 16, 275-285.

**Thibault, V., Lada, O., Benhamou, Y. and Poynard.** (2006) .Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen (HBs Ag) and Anti-HBs Antibodies in Chronic Hepatitis B Virus Carriers: Influence of “a” Determinant Variants, *J. Virol.*, 80: 2968–2975.

**Topham, R.W., Walker, M.C. and Calish, M.P.** (1982). Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109: 1240-1246.

**Trépo, C., Zoulim, F., Alonso, C., Petit, M. A., Pichoud, C., Vitvitski, L.** (1993) Diagnostic markers of viral hepatitis B and C. *Hepatol. J.*, 34: 20-25.

**Woolfolk C.A. and Dawnard J.S.** (1977). Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity among bacteria. *Journal of Bacteriology*, 130: 1175-1191.

**Yanfang, J., Zhenhua; M., Guijie, X., Xin, H., Wanyu, L. Huining, X., Chunhai, H., Junqi, N. and Pingwei, Z.** (2010) Th1 and Th2 Immune Response in Chronic Hepatitis B Patients during a Long-Term Treatment with Adefovir Dipivoxil, *Mediators of Inflammation*, ID 143026, 10 pages.

**Yusuf, O., Esin, A., Lutfu, S., Figen, D.** (2008). Inducible nitric oxide synthase and histopathological correlation in chronic viral hepatitis. *Infec. Dis. Inter. J.*, 12: 12-15.

## Résumé

Au cours du développement de l'hépatite B et pour confirmer l'infection, plusieurs tests sérologiques sont utilisés. Dans le diagnostic viral on recherche soit des antigènes viraux ou les anticorps antiviraux. Les transaminases sont les marqueurs biochimiques de routine dosés dans les atteintes hépatiques.

Dans ce travail préliminaire on a essayé de voir la corrélation entre les marqueurs biochimiques et le taux sériques en xanthine oxydoréductase d'une part et les anticorps anti-xanthine oxydoréductase sériques d'autre part.

Alors on a lancé deux types d'ELISA; un test direct pour doser le taux des anticorps anti-XOR et un test ELISA sandwich pour doser l'enzyme XOR sérique chez vingt trois sujets atteints d'hépatite avec l'enzyme XOR purifié du lait humain (PFR de 4,81 et une seule bande de 150.000 Da en SDS-PAGE, l'activité oxydase de l'enzyme est de 0.044  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ).

Les taux sériques en XORh ( $79,83 \pm 67,52 \text{ ng /ml}$ ) et en anticorps anti-XOR ( $83,69 \pm 67,52 \mu\text{g /ml}$ ) sont significativement supérieurs aux taux des sujets sains ( $5.11 \pm 3.23 \text{ ng /ml}$  et de  $26,52 \pm 16,322 \mu\text{g/ml}$  respectivement). On n'a pas trouvé une bonne corrélation entre les taux sériques en hXOR et en anticorps anti-hXOR d'une part et les transaminases (ALAT et ASAT) et la phosphatase alcaline d'autre part.

Mots clés : Hépatite, Xanthine oxydoréductase, Transaminases, Anticorps anti-XOR

## Summary

En the hepatitis B process and to confirm the infection a number of serological tests have been used either to detect viral antigens or the antibodies rose against the virus. Transaminases are routinely determined to assess liver damage.

In this small preliminary study, we tried to set-up to types of ELISA (direct and sandwich) to assess serum levels of human xanthine oxidoreductase (hXOR) as well as anti-bodies raised against the enzyme (anti-XOR antibodies) of twenty three patients with hepatitis.

The used human milk enzyme was pure as it had a PFR 4, 81 and with a single major band of 150 KDa on SDS-PAGE. The oxidase activity of the purified human enzyme was 0.044  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

Sera levels of hXOR ( $79,83 \pm 67,52 \text{ ng /ml}$ ) and anti-hXOR antibodies ( $83,69 \pm 67,52 \mu\text{g /ml}$ ) were significantly higher than healthy normal subjects ( $5.11 \pm 3.23 \text{ ng /ml}$  and  $26,52 \pm 16,322 \mu\text{g/ml}$  respectively). We did not find a good correlation between levels of hXOR and anti-hXOR antibodies in one hand and transaminases (ALAT and ASAT) and alkaline phosphatase in the other hand.

Key words: Hepatitis, Xanthine oxidoreductase, Transaminases, Anti-XOR antibodies

## ملخص :

خلال الإصابة بالتهاب الكبد الفيروسي و لتأكيد الإصابة عدة فحوصات مصلية تجرى سواء للكشف عن مولدات الضد الفيروسية أو الأجسام المضادة ضد الفيروس وتستعمل التروانسامينات عادة للكشف عن لإصابات الكبدية.

فيذا العمل التمهيدي حاولنا قياس العلاقة بين الإشارات البيوكيميائية المستعملة عادة وكمية الكزانئين مؤكسد مرجع من جهة و الأجسام المضادة ضد الكزانئين مؤكسد مرجع من جهة أخرى.

لذلك قمنا بإجراء تجربتين من نوع ELISA الأولى من نوع ELISA مباشرة من اجل معايرة الأجسام المضادة ضد الكزانئين مؤكسد مرجع و الثانية ELISA sandwich من اجل معايرة الإنزيم الكزانئين مؤكسد مرجع المصلي عند ثلاثة و عشرين موضوع اختبار يعانون من التهاب كبدى مع الكزانئين مؤكسد مرجع المنقى من الحليب البشرى PFR de 4,81 وشريط واحد عند DA 150.000 على صفحة SDS-PAGE نشاط الاوكسيداز للانزيم تقدر ب 0.044  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

التقديرات المصلية للانزيم ( $79,83 \pm 67,52 \text{ ng /ml}$ ) و الاجسام المضادة ضد الكزانئين مؤكسد مرجع ( $83,69 \pm 67,52 \mu\text{g /ml}$ ) وهي تفوق المستوى العادي  $5.11 \pm 3.23 \text{ ng /ml}$  و  $26,52 \pm 16,322 \mu\text{g/ml}$  على التوالي. لم نستطع ايجاد علاقة جيدة بين المقادير المصلية للكزانئين مؤكسد مرجع و الاجسام المضادة ضد الكزانئين مؤكسد مرجع من جهة و التروانسامينات من جهة أخرى. (ALAT et ASAT) و الفوسفاتاز الكالين من جهة ثانية.

الكلمات المفاتيح: التهاب الكبد B، الكزانئين مؤكسد مرجع، التروانسامينات، أضداد XOR

