

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FARHAT ABBAS – SETIF

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biochimie

Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN BIOCHIMIE

Option : Biochimie appliquée

Par : Mlle MOSBAH ASMA

THEME

**Développement d'un test ELISA sensible pour la détection de la
xanthine oxydoréductase sérique: Application aux hépatites et
corrélation avec les marqueurs biochimiques**

Devant le jury :

Abderrahmane SENATOR (*Professeur*)

Mustapha BENBOUBETRA (*Professeur*)

Rachid BELHATAB (*MC*)

Farida DJABI (*Professeur*)

Université Ferhat Abbas de Sétif

Université Ferhat Abbas de Sétif

Université Ferhat Abbas de Sétif

CHU de Sétif

Président

Rapporteur

Examineur

Examineur

2010 - 2011



Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mon promoteur Mr le professeur **M. BENBOUBETRA** 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 Madame le **Pr. A. SENATOR** d'avoir acceptée d'assurer la présidence du jury de ma thèse de magister.*

*Je remercie également **Pr. F. DJABI** et **Dr. R. BELHATAB** d'avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à **Pr. N. Belatar** pour son aide.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à **Pr. L. ARRAR**, **Dr. A. Baghiani** et **Dr. N. CHEREF** pour leurs conseils pratiques, techniques et scientifiques.*

*J'adresse également mes remerciements à **Mme. HANOUCHA** pour ses conseils les plus importants.*

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

*Je dédie ce travail à mes parents,
qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et
tout mon amour pour leur soutien tout au long de
ma vie.*

Je t'aime papa, Je t'aime maman.

*A Mon frère unique "Youssef"
A Mes sœurs Sarah et Chayma.*

A mon amie Hanan Khither

A toute ma famille,

Mes amis et mes collègues



SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction général

Chapitre I	Revue bibliographique	1
I.1 Xanthine Oxydoréductase (XOR)		2
I.1.1. Structure de l'enzyme Xanthine Oxidoreductase (XOR)		2
I.1.2. Conversion entre les deux formes		7
I.1.3. Distribution tissulaire et localisation subcellulaire de la XOR		9
I.1.4. Les inhibiteurs de la XOR		10
I.1.5. Les formes inactives de la XOR		11
I.1.6. Rôle physiologique de la XOR		12
I.1.6.1. La production des ROS par XOR		13
I.1.6.2. Rôle dans la production de l'oxyde nitrique		13
I.1.7. Implication de la XOR dans les états pathologiques		15
I.1.7.1. L'Ischemie réperfusion		15
I.1.7.2. XOR et inflammation		16
I.1.7.3. XOR et maladies de foie		16
I.1.8. Les anticorps anti-XOR		18
I.2. Hépatite virale B		19
I.2.1. Structure et fonctions de foie		19
I.2.1.1. Structure		19
I.2.1.2. Rôles du foie		20
I.2.2. Hépatite B		22
I.2.2.1. Épidémiologie		22
I.2.2.2. Age et Sexe		23
I.2.3. Virus de l'hépatite B		24
I.2.3.1. Génome		24
I.2.3.2. Protéines		24



I.2.3.2.1. Protéines d'enveloppe	24
I.2.3.2.2. Protéines du core	25
I.2.3.2.3. ADN polymérase	25
I.2.3.2.4. Protéine X	25
I.2.4. Cycle de réplication du virus de l'hépatite B	27
I.2.5. Pathogénie du VHB	28
I.2.6. La transmission du VHB	28
I.2.7. Diagnostique positif	29
I.2.7.1. <i>Les signes cliniques</i>	29
I.2.7.1.1. Hépatite B aiguë	29
I.2.7.1.2. Le portage chronique	29
I.2.7.2. <i>Signes biologiques</i>	30
I.2.7.2.1. Antigène et anticorps HBs	31
I.2.7.2.2. Anticorps anti-HBc	31
I.2.7.2.3. Système antigène-anticorps HBe	31
I.2.7.2.4. ADN viral sérique	31
I.2.7.2.5. L'antigène Pré-S1	32
I.2.8. Évolution naturelle de l'hépatite B	32
I.2.9. Traitement de HBV	33
I.2.9.1. <i>Les analogues nucléosidiques ou nucléosidiques</i>	33
I.2.9.2. <i>L'interféron-α</i>	34
I.2.9.3. <i>Associations d'antiviraux</i>	34
I.2.10. Prévention de VHB	35
I.2.10.1. <i>Les Immunoglobulines</i>	35
I.2.10. 2. <i>La vaccination</i>	35

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériels biologiques

II.1.1.1. *Lait humain*

II.1.1.2. *Sérum humain*

II.2. Méthodes

II.2.1. Purification de la xanthine oxydoréductase humain



II.2.2. Tests de pureté de la XORH	38
II. 2.2.1. <i>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS</i>	38
II.2.3. Préparation des antisérums de lapin	39
II.2.3.1. <i>Immunisations des lapins</i>	39
II.2.3.2. <i>Purification des anticorps anti-xanthine oxydoréductase</i>	39
II.2.3.2.1. Précipitation au sulfate de sodium	39
II.2.3.2.2. chromatographie d'immunoaffinité sur gel de protéine A sépharose	40
II.2.4. Dosage de la XOR sérique humaine	40
II.2.5. Test d'activité enzymatique	42
II.2.6. Tests de la production de l'anion superoxyde	42
II.2.7. Analyses statistiques	42
<i>Chapitre III</i> <i>Résultats et discussion</i>	34
III.1. Purification de la XORH du lait humain	44
III.1.2. Control de pureté	44
III.1.1. Rendement de la purification	44
III.1.3. Activité de l'enzyme humaine purifiée	45
III.2. Purification des anticorps	45
III.3. Dosage du taux de la protéine xanthine oxydoréductase	47
III.3.1. Chez les sujets normaux	47
III.3.2. Chez les sujets ayants des lésions hépatiques	49
III.4. Discussion générale	58
<i>Chapitre IV</i> <i>Références bibliographiques</i>	60



Liste des abréviations

AHA	Affection Hépatique Alcoolique
ALAT	Alanine Aminotransferase
ASAT	Aspartate Aminotransferase
CBP	Cirrhose Biliaire Primaire
Cyt c	Cytochrome c
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HVB	Hépatite Viral B
HVC	Hépatite Viral C
IL	Interleukine
IR	Ischemie Reperfusion
Mo	Molybdène
NO°	Radical nitroxy
NO₂	Nitrite
NOS	NO synthase
O₂°	Radical superoxide
OH°	Radical hydroxyl
OMS	Organisation Mondiale de Santé



ONOO-	Peroxynitrite
OPD	Orthophenylène Diamine
PBS	Tampon Phosphate Salin
CSP	Cholangite Sclérotique Primaire
ROS	Reactive Oxygene Species
RPF	Rapport Protéine Flavine
rpm	Rotations par minute
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamid gel electrophoresis
SOD	Superoxyde Dismutase
SRIDA	Single Radial Immunodiffusion Assay
TEMED	N,N,N'N' Tetramethylenediamine
TNF	Tumour Necrosis Factor
VHB	Virus de l'Hépatite B
VIH	Virus d'Immunodéficience Humain
XDH	Xanthine Déshydrogénase
XO	Xanthine Oxydase
XOR	Xanthine Oxydoréductase
XORH	Xanthine Oxydoréductase Humaine



Liste des figures

- fig 01:* Structure de la XOR des mammifères. 4
- fig 02:* Transfert des électrons dans la XOR. 5
- fig 03:* Voie du catabolisme des purines dans laquelle la XOR est impliquée dans les deux étapes finales. 6
- fig 04:* Changement de conformation autour du site FAD. 8
- fig 05:* Mécanisme de conversion de XDH en XO. 8
- fig 06:* Structure chimique de quelque inhibiteur de la XOR. 14
- fig 07:* Rôle de la XOR dans l'oxydation du NADH et la génération du radical nitroxyde (NO°) et du peroxynitrite (ONOO^-). 14
- fig 08:* Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion. 15
- fig 09:* Détection de la XOR par Immunoperoxydase dans le foie humain. 17



<i>fig 10:</i> Coupe transversale de foie humain.	21
<i>fig 11:</i> Rôles essentiels de foie.	21
<i>fig 12:</i> Distribution mondiale de la prévalence du portage de l'AgHBs.	23
<i>fig 13:</i> Structure de virus de l'hépatite b (HBV).	26
<i>fig 14:</i> Organisation génomique de HBV.	26
<i>fig 15:</i> Cycle de réplication du virus de l'hépatite.	27
<i>fig 16:</i> Evolution des infections aiguës par le VHB selon l'âge à la contamination.	33
<i>fig 17:</i> Le protocole de la méthode d'ELISA.	41
<i>fig 18:</i> Spectre d'absorption en UV- Vis (250 – 700) de la XORH et SDS-PAGE (10%) de la XORH purifiée ;	46
<i>fig 19:</i> Taux de la XORH dans les sérums des sujets sains (30 sujets).	48
<i>fig 20:</i> Taux de la XORH dans les sérums des sujets malades (30 sujets).	50
<i>fig 21:</i> Comparaison des concentrations de la XORH déterminés par ELISA sandwich chez les sujets normaux et les sujets malades.	51
<i>fig 22:</i> Taux la XORH dans les sérums de quatre groupes des malades.	52
<i>fig 23:</i> Comparaison des concentrations de la XORH chez les sujets normaux et les quatre groupes des sujets malades.	53
<i>fig 24:</i> Comparaison du taux de l'ASAT chez les sujets normaux et les sujets malades.	5
<i>fig 25:</i> Comparaison du taux de l'ALAT chez les sujets normaux et les sujets malades.	5

Liste des tableaux



<i>Tableau I:</i>	Nombre des résidus des acides aminés et le pourcentage d'homologie des XOR des différentes espèces comparées à la XOR humaine.	3
<i>Tableau II:</i>	L'activité spécifique de XOR des foies malades des êtres humains.	17
<i>Tableau III:</i>	Comparaison de volume des foies des adultes de quelque espèce.	19
<i>Tableau IV:</i>	Caractérisation de la XOR humaine.	45
<i>Tableau V:</i>	Concentrations de XORH dans les sérums de 30 donneurs sains et malades.	51
<i>Tableau VI:</i>	Taux de la XORH sérique dans les sérums des trente sujets représentent quatre types de lésions hépatiques.	54
<i>Tableau VII:</i>	Comparaison du taux de la XORH sérique et les transaminases chez trente sujets représentent quatre types de lésions hépatiques.	55



Introduction générale



La xanthine oxydoréductase est un complexe molybdoflavoenzyme catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique tout en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Sa complexité, son large spectre d'activité et distribution préférentielle suggèrent des fonctions plus larges à cette enzyme. Dans le foie, la XORH joue un rôle dans la libération réductive du fer de la ferritine et dans sa libération hépatique dans le plasma suite à une hémorragie ou à une administration intraveineuse de purines.

Il ya un intérêt croissant des rôles pathologiques potentiels que joue la XORH sérique où les taux sont élevés dans plusieurs maladies. Il a été démontré que l'activité XORH sérique est significativement élevée (50 fois par rapport à la limite supérieure normale) chez les patients avec des pathologies hépatique diverses. L'équipe de professeur Al-khalidi a rapportée une élévation du taux de la XORH sérique dans divers pathologies hépatiques, en particulier dans les hépatites virales.

L'hépatite est une inflammation du foie. Elle peut être provoquée par l'alcool, des drogues et médicaments mais elle est le plus souvent causée par un virus. Il existe différentes hépatites virales; hépatite A, B, C, D et E. L'hépatite B (HBV) est la plus répandue dans le monde, surtout en Asie, en Amérique centrale et du sud et en Afrique. Dans quelques cas, la maladie peut devenir chronique et provoquer la cirrhose et cancer du foie.

Le diagnostic biologique de l'HVB sera réalisé lors de l'exploration des modifications biochimiques du sang et des différents marqueurs virologiques. Les paramètres biochimiques permettent d'évaluer le retentissement sur le foie par la mesure d'enzymes, normalement absentes dans le sang, les transaminases sériques (aspartate aminotransférase ou ASAT et alanine aminotransférase ou ALAT), phosphatase alcaline sérique et le taux de prothrombine, réalisables dans les laboratoires de routine, qui permet d'évaluer la gravité de l'atteinte hépatique et la notion d'urgence dans les cas d'hépatites sévères.

Les marqueurs virologiques renseignent sur l'agent responsable de la maladie et sur l'évolution de celle-ci. L'exploration sera réalisé soit par des méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA, réalisable dans des laboratoires non spécifique, soit par de techniques moléculaires détectant, quantifiant ou caractérisant la séquence de l'ADN du virus de l'hépatite, et qui sont pratiquées pour le moment que dans les laboratoires spécialisés.

L'importance diagnostique et pronostique des taux sériques de la XORH 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. A travers ce projet, nous envisageons de déterminer la protéine XORH sérique ou lieu de l'activité sérique de la XORH par un test ELISA (ELISA sandwich) qui va permettre de répondre positivement à ses préoccupations, ce kit de dosage aura une importance certaine sur le plan scientifique ou même économique.

Dans ce présent travail, nous avons fixant les objectifs suivants

- ❖ Purification et caractérisation de la xanthine oxydoréductase humaine.
- ❖ Immunisation de lapins par la XOR humaine.
- ❖ Préparation des immuns sérums et de la fraction IgG.
- ❖ Purification par immunoaffinité des anticorps anti XOR humaine et bovine.
- ❖ Développement d'un test ELISA sandwich sensible pour la quantification de la protéine XOR humaine.
- ❖ Etude de la reproductibilité et la fiabilité du test ELISA.
- ❖ Application du test ELISA développé pour le dosage de la XOR sérique humaine chez des sujets normaux et des sujets souffrants de l'hépatite.
- ❖ Etude de corrélation des résultats obtenus avec les autres paramètres sériques de routine surtout les transaminases.



Chapitre I

Revue bibliographique



I.1. La xanthine oxydoréductase humaine

I.1.1. Structure de l'enzyme Xanthine Oxydoréductase (XOR)

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdoflavoprotéine homodimérique d'un poids moléculaire de 290-300 KDa, composé de deux sous unités identiques de 150 KDa (Angermuller *et al.*, 1987; Pacher *et al.*, 2006). Chaque sous unité contient trois domaines majeurs portant chacun un des trois centres actifs, deux centres Fe-S non identiques de 20KDa, un FAD de 40KDa et un molybdoptérine de 85 KDa (Harrison, 2002 ; Berry et Hare, 2004; Pacher *et al.*, 2006) (**Figure 1a**).

L'enzyme existe sous deux formes; la forme déshydrogénase (XDH, EC.1.1.1.204) et la forme oxydase (XO, EC.1.1.3.22). Les deux formes de l'enzyme peuvent réduire l'oxygène moléculaire, en utilisant différents accepteurs d'électrons (NAD^+ pour XDH et l'oxygène moléculaire pour XO) (Page *et al.*, 1998; Masuoka et Kubo, 2004; Pacher *et al.*, 2006).

Chaque monomère est divisé en trois domaines, le domaine du coté N-terminale (1- 165 résidus) contient les deux centres de $\text{Fe}_2 - \text{S}_2$ riches en résidus cystéine qui servent de ligands au fer, le deuxième domaine (226-531 résidus) contient le centre FAD et le troisième domaine C- terminale contient le centre molybdène (1310-1331 résidus) (Berry et Hare, 2004; Pacher *et al.*, 2006) (**Figure 1b-c**). Les sous-unités sont reliées entre elles avec des liens peptidiques (Enroth *et al.*, 2000).

Physiologiquement, l'enzyme catalyse la réduction de l'hypoxanthine et de la xanthine, mais également il réduit un large spectre de N-heterocycles et aldéhydes (Pacher *et al.*, 2006; Ferrari *et al.*, 2007) (**Figure 3**). Au cours de la réaction, il y a un transfert d'électron du site d'entrée molybdène à travers les centres Fe-S vers le FAD pour la réduction de NAD^+ ou de l'oxygène (Harrison, 2002) (**Figure 2**) et seul le NADH donne ses électrons au centre FAD (Hunt et Massey, 1992). La réaction réductrice se produit au niveau du centre Mo-ptérine où la XOR accepte deux électrons de la xanthine, ramenant le Mo^{VI} au Mo^{IV} et la réaction oxydante a lieu au niveau du centre FAD (Hille et Nishino, 1995; Enroth *et al.*, 2000).

Les séquences en acides aminés entre espèces varient avec un degré d'identité de 90% et 53% de l'enzyme humaine (XORH) en comparaison aux enzymes des mammifères et de la drosophile respectivement (**Tableau 1**).

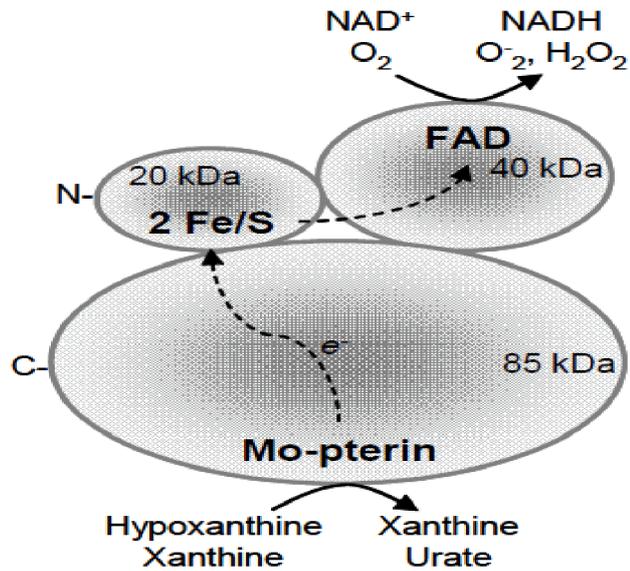


Tableau I: Nombre de résidus des acides aminés et le pourcentage d'homologie des XOR des différentes espèces comparées à la XOR humaine.

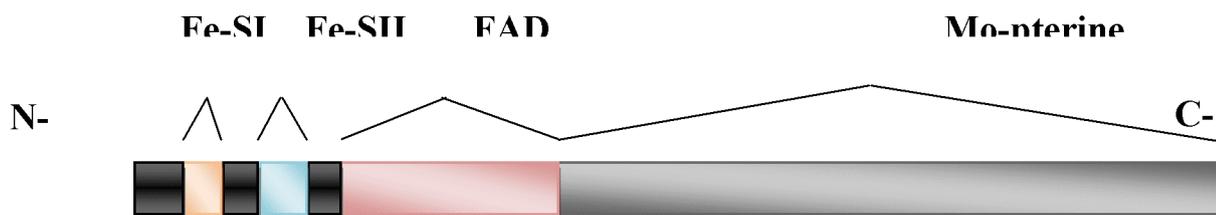
<i>Espèces</i>	<i>Source</i>	<i>Acides Aminés</i>	<i>% Homologie avec XORH</i>	<i>Références</i>
<i>Homme</i>	Foie	1333	/	Ichida <i>et al.</i>,1993
	Intestin	1333	/	Saksela et Raivio.,1996
<i>Bovins</i>	Glandes mammaires	1331	89%	Berglund <i>et al.</i>,1996
<i>Souris</i>	Foie et la Rate	1335	89%	Cazzaniaga <i>et al.</i>,1994
<i>Rat</i>	Foie	1330	90%	Amaya <i>et al.</i>,1990
<i>Poulet</i>	Foie	1358	74%	Sato <i>et al.</i>,1995
<i>Drosophila melanogaster</i>		1335	53%	Keith <i>et al.</i>,1987
<i>Drosophila pseudoobscura</i>		1342	53%	Riley, 1989



(A)



(B)



(C)

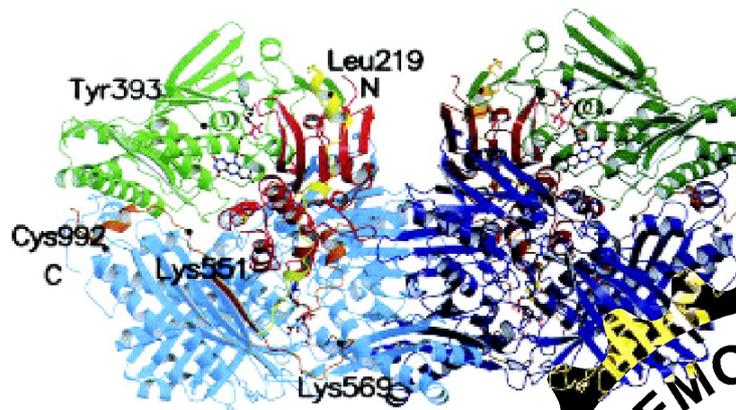


Figure 1: Structure de la XOR des mammifères: (A) structure en domaines (d'après Sato et al., 1995), (B) arrangement linéaire de la structure primaire des domaines (D'après Hill et Nishino, 1995), (C) structure cristalline de l'homodimère de la XOR bovine; les domaines identiques des deux sous unités sont représentés par les mêmes couleurs (claire pour le monomère à gauche, et plus foncées pour celui à



droite): en rouge le domaine du Fe_2 / S_2 , en vert le domaine du FAD et en bleu le domaine Mo (D'après Enroth *et al.*, 2000).

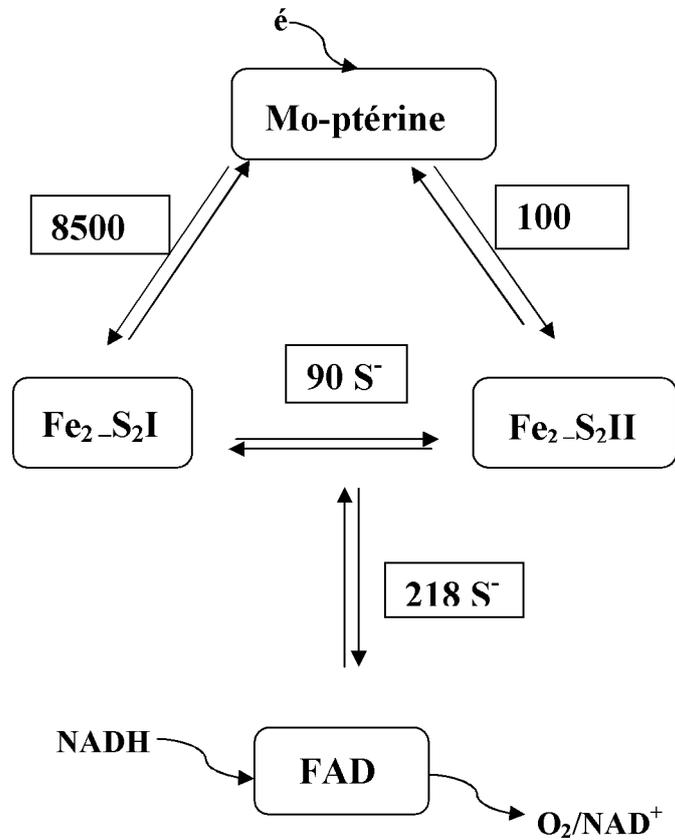


Figure 2: Transfert des électrons dans la XOR, les valeurs sur les flèches montrent les constantes de vitesses estimées pour ces transferts (D'après Hille, 1996).



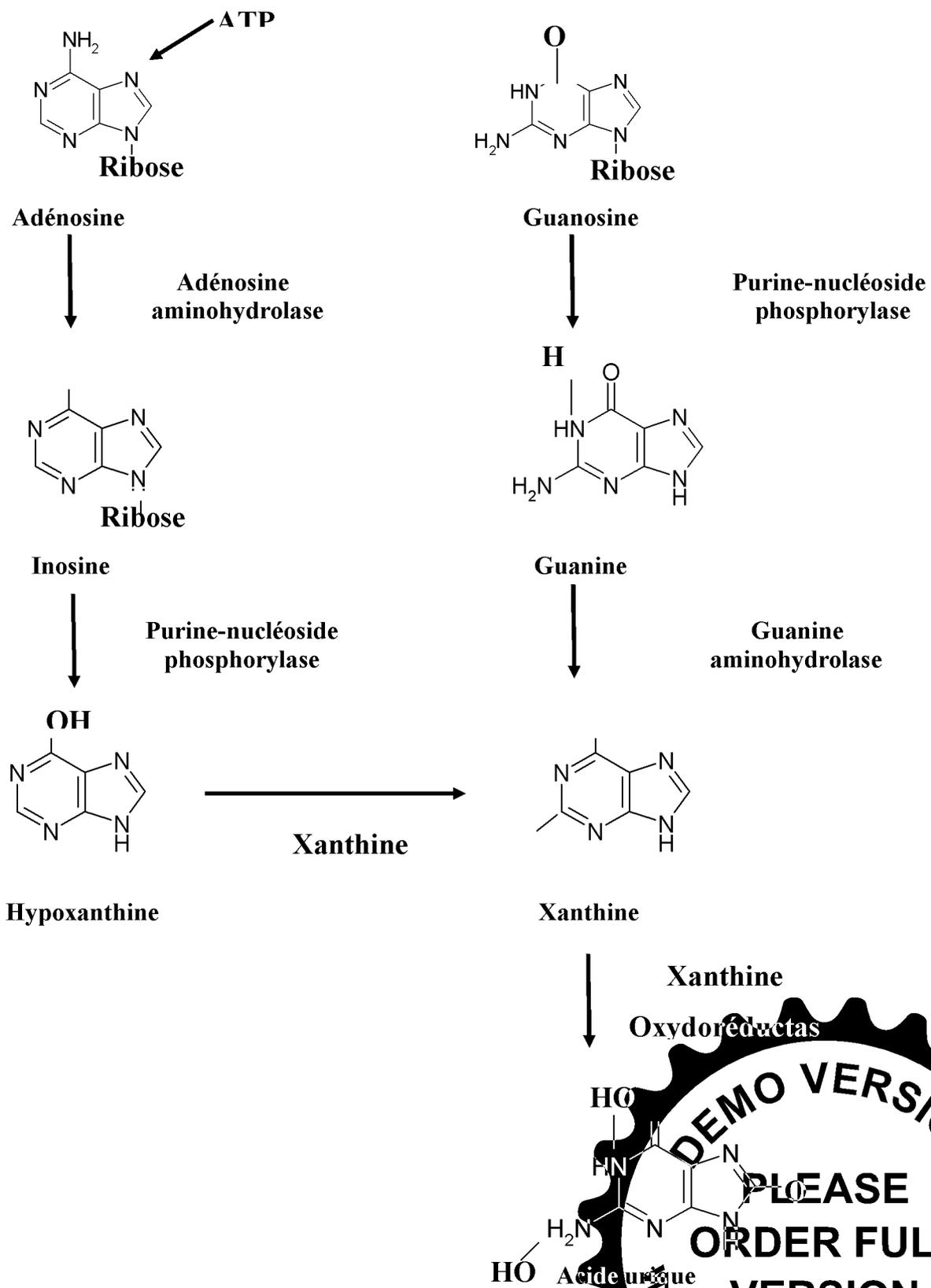
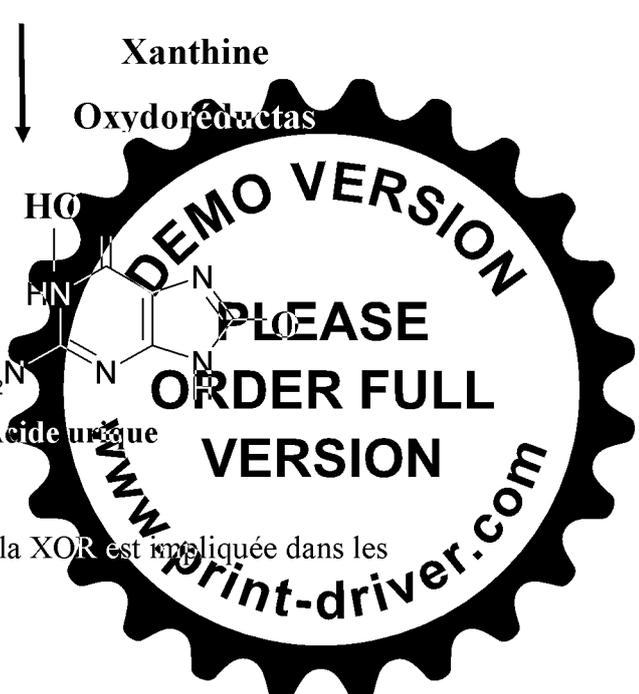


Figure 3 : Voie du catabolisme des purines où la XOR est impliquée dans les



deux étapes finales (*D'après Page et al., 1998*).

I.1.2. Conversion entre les deux formes

Il a été démontré que la XOR de différentes espèces, *in vivo*, est sous la forme XDH (Nishino, 2005). Cependant, l'enzyme est souvent purifiée sous la forme oxydase XO suite à la conversion XDH en XO (Bray, 1975).

La conversion entre les deux formes se produit par deux voies différentes; la conversion irréversible résulte par le clivage protéolytique de la forme XDH avec la trypsine après (lys184), la chymotrypsine après (met181) (McManaman et Bain, 2002) ou avec la pancréatine après (leu 219 et lys 569) (Enroth *et al.*, 2000).

La conversion réversible de la forme XDH en forme XO est due à l'oxydation des groupements thiols des résidus cystéines; cys535 et cys992 en particulier (Nishino et Nishino, 1997; Nishino *et al.*, 2005, Figure 4) par exposition aux agents sulphydriques ou aux conditions anaérobiques (Waud et Rajagopalan, 1976b) ou par incubation à 37°C (Della Corte et Stirpe, 1972). Ceci conduit à la formation de ponts disulfure entraînant des changements conformationnels (**Figure 5**).



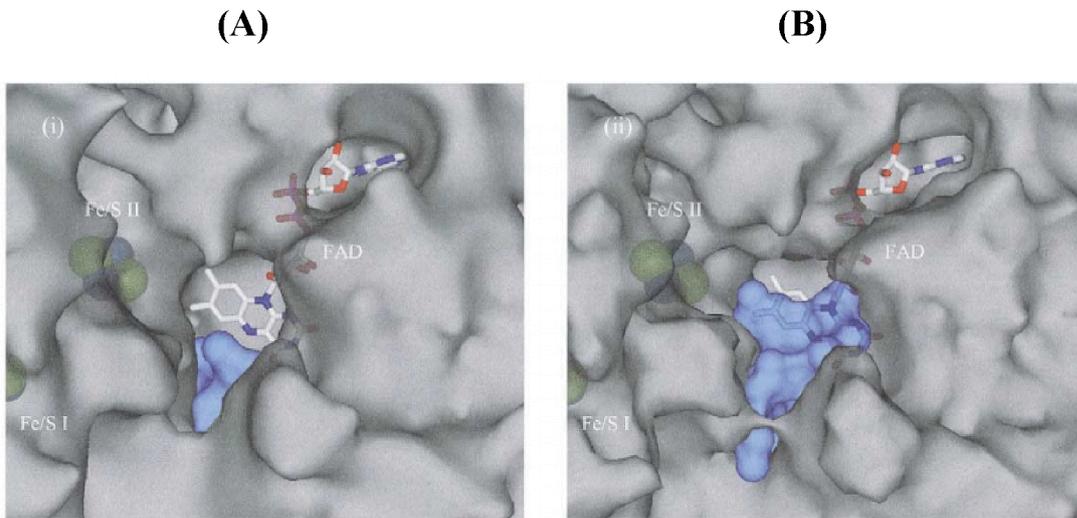


Figure 4 : Changement de conformation autour du site FAD; (A) XDH, (B) XO.
(D'après Enroth et al., 2000)

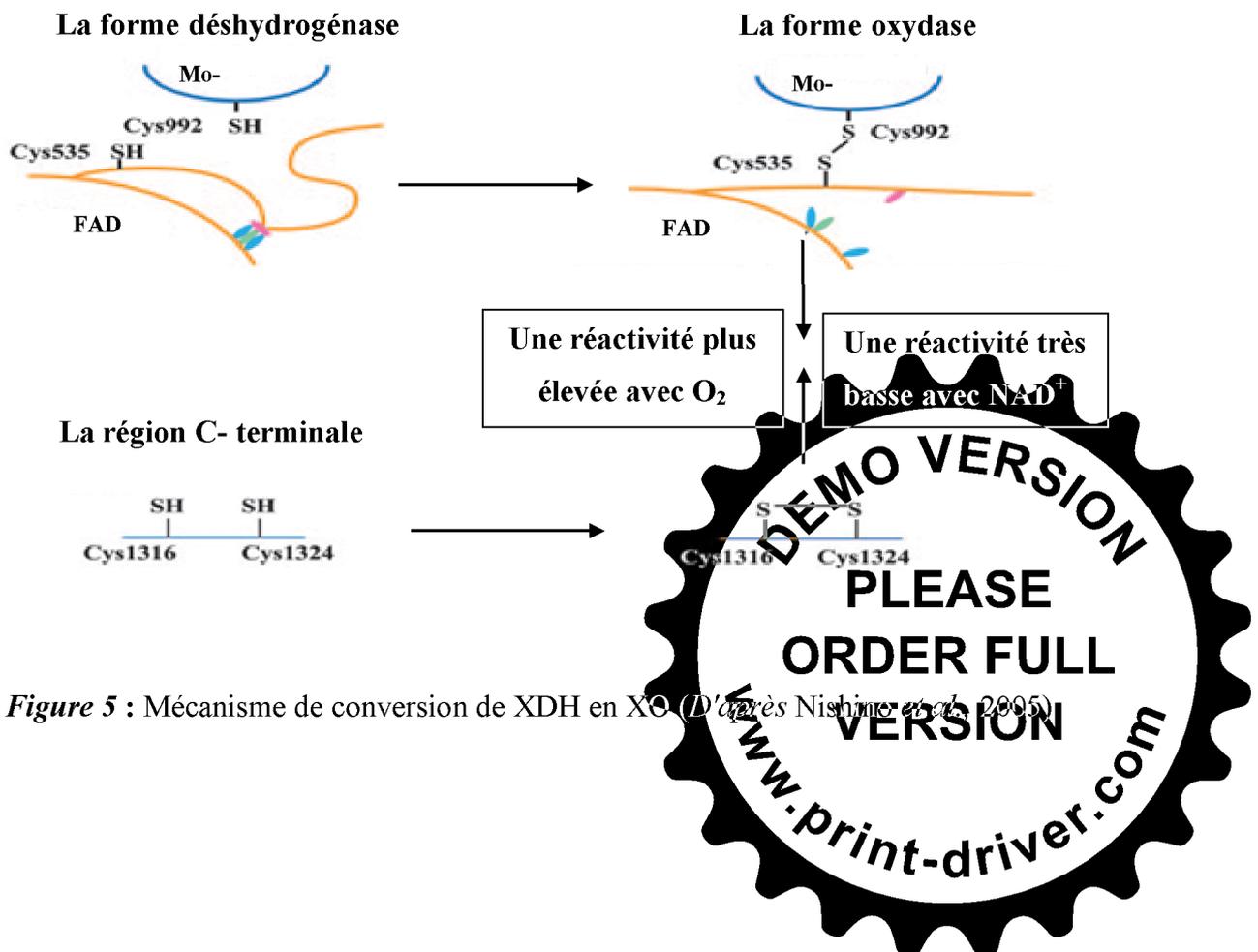


Figure 5 : Mécanisme de conversion de XDH en XO *(D'après Nishino et al., 2005)*

I.1.3. Distribution tissulaire et localisation subcellulaire de la XOR

L'activité de la XOR a été détectée dans la plus part des êtres vivants, y compris les bactéries (Granger *et al.*, 1986) et les végétaux (Kooij *et al.*, 1992). L'activité est largement distribuée dans les tissus, avec des niveaux plus élevés dans le foie et l'intestin (Krenitisky *et al.*, 1986). Chez l'homme, indépendamment du foie et de l'intestin, la plupart des tissus montrent peu d'activité de la XOR (Saksela *et al.*, 1998).

Chez les mammifères étudiés, la XOR est présentée dans les cellules épithéliales des glandes mammaires et les cellules endothéliales des capillaires de tissus comprenant les glandes mammaires, le foie, le poumon, le muscle squelettique, le cœur et l'intestin (Ichikawa *et al.*, 1992). Les données sur l'activité de la XOR dans le tissu cardiaque sont variables; montrant une activité enzymatique élevée dans le myocarde du chien et du rat (Chambres *et al.*, 1985; de Jong *et al.*, 1990) mais faible chez le lapin (Downey *et al.*, 1988) et chez l'homme (Batteli *et al.*, 2001).

La localisation intracellulaire de la XOR est réalisée par microscopie confocale sur des hépatocytes de rats montrant une localisation cytosolique (Ichikawa *et al.*, 1992). Cependant une localisation dans les peroxysomes, le réticulum endoplasmique, les lysosomes et les vésicules endocytiques a été mise en évidence par microscopie électronique (Hoare, 2002).

Chez l'homme, généralement l'activité de la XOR est de 10 à 100 fois inférieure à celle des rongeurs (Wajner et Harkness, 1989). Chez l'homme, les activités relativement élevées de la XOR sont clairement présentes dans le foie, l'intestin, les glandes mammaires et le lait (Linder *et al.*, 1999). D'autre part Abadah et ses collaborateurs ont montré que l'enzyme du cœur humain est présente à 98% sous forme inactive (26% de forme démolysée et le reste sous forme désulfo) (Abadah *et al.*, 1992).



I.1.4. Les inhibiteurs de la XOR

Les inhibiteurs de la XOR peuvent être divisés en deux catégories, des analogues structuraux de substrats et des molécules indépendantes de substrats physiologiques. Les deux types d'inhibiteurs réagissent au niveau ou aux alentours du site Mo (Hille et Massey, 1981).

Les inhibiteurs analogues de substrats renferment le groupe des pyrazol[3,4-d]pyrimidine, en particulier allopurinol, (1,5-dihydro-4-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one), qui est oxydé rapidement par la XO *in-vivo* pour former son métabolite actif, oxypurinol (alloxanthine). À concentrations élevées, l'allopurinol est un inhibiteur non-compétitif mais à faibles concentrations il inhibe l'enzyme compétitivement (Pacher *et al.*, 2006) (**Figure 6**). L'allopurinol est utilisé pour la thérapie de la goutte (Bieber et Terkeltaub, 2004; Wortmann, 2005).

Les deux inhibiteurs (allopurinol et oxypurinol) peuvent aussi réagir comme des scavengers de radicaux libres produits par la XOR (Augustin *et al.*, 1994). De ce fait, on ne peut pas confirmer que l'allopurinol et l'oxypurinol ont un effet inhibiteur ou un effet scavenger (Moorhouse *et al.*, 1987).

Les autres inhibiteurs sont structurellement différents de substrats physiologiques, tel que les dérivés d'imidazole et de thiazole (Borges *et al.*, 2002), les cyanides, l'arsenite, le formaldéhyde et le méthanol (Park et Granger, 1986). Le cyanure inhibe la XOR en libérant le soufre du site Mo, donnant naissance à la forme désulfo inactive de la XOR (Hille et Massey, 1981). Alors que l'arsenite interagit avec le molybdène de l'enzyme XOR et bloque le transfert d'électrons du centre molybdène vers les centres 2Fe/2S et FAD (Stewart *et al.*, 1984).

La XOR peut également être inhibée par son produit, l'acide urique, de manière non compétitive (Radi *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1993a) et la concentration élevée de ROS diminue l'activité de la XOR (Terada *et al.*, 1991).

Deux nouveaux composés sont sur le marché médicamenteux; le febuxostat (Yasuhiro *et al.*, 2005) et Y-700 (Hashimoto, 2004) possédant une action hypo-uricémique plus efficace et plus durable que l'allopurinol (**Figure 6**).



Les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels de la XOR (Lin *et al.*, 2002) ils inhibent la XOR de manière compétitive (Van Hoorn *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004). Des études menées sur l'inhibition de la XO par les flavonoïdes montrent l'existence des similarités structurales entre le cycle A des flavonoïdes et le noyau purinique de l'hypoxanthine et la xanthine (Rastelli *et al.*, 1997).

L'oxyde nitrique sous des conditions anaérobique peut inhiber la XOR (Godber *et al.*, 2000b; Kinugawa *et al.*, 2005). D'autres résultats montrent que le Cu^{+2} forme un complexe avec la XOR et par conséquent peut conduire à l'inhibition de l'activité enzymatique (Sau *et al.*, 2001).

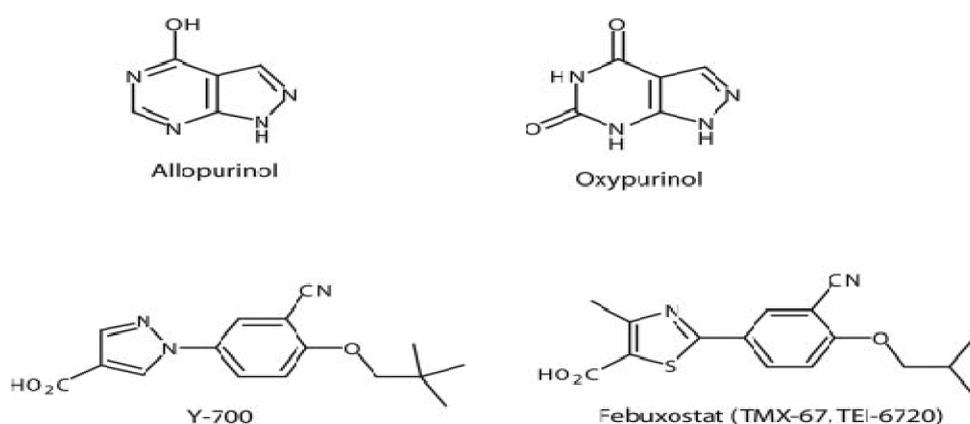


Figure 6 : Structure chimique de quelques inhibiteurs de la XOR.

I.1.5. Les formes inactives de la XOR

La XOR a deux formes inactives, l'une est démolymo-XOR et l'autre est désulfo-XOR. Ces formes représentent environ 60 % de l'enzyme du lait bovin (Bray, 1975) et plus de 97 % du lait humain (Sanders *et al.*, 1997).

Les formes inactives de la XOR peuvent être produites avec la perte d'un atome de soufre où le groupement $\text{Mo}=\text{S}$ essentiel pour l'activité, est remplacé par le $\text{Mo}=\text{O}$ ou par la perte d'un atome de molybdène. La forme desulfo-XOR peut être réactivée après une résulfuration en l'incubant avec des composés sulfurés tel que Na_2S . Cette réaction est catalysée par une sulfurase présente dans les tissus humains (Ichida *et al.*, 2001).

Ces deux formes ne peuvent pas oxyder les composés qui réagissent au niveau du centre Mo, comme la xanthine et l'hypoxanthine, cependant elles réagissent avec le NADH au niveau du centre FAD (Bray, 1975).



I.1.6. Rôle physiologique de la XOR

Pour plusieurs décennies, le seul rôle présumé de la XOR était dans le catabolisme des purines (Bray, 1975 ; Harrison *et al.*, 2002), mais sa complexité, son large spectre d'activité et sa distribution préférentielle dans les organes suggèrent des fonctions plus larges à cette enzyme dans la physiologie de l'organisme.

Il y a un intérêt croissant aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) non seulement dans la pathologie mais également en physiologie. La XOR a la capacité de produire les ROS qui participent dans la signalisation, en particulier l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Behrend *et al.*, 2003). Ces ROS jouent un rôle dans l'inflammation (attirants des neutrophiles au site) et dans les lésions de type d'ischémie-réperfusions (IR) (Cadenas et Davies, 2000).

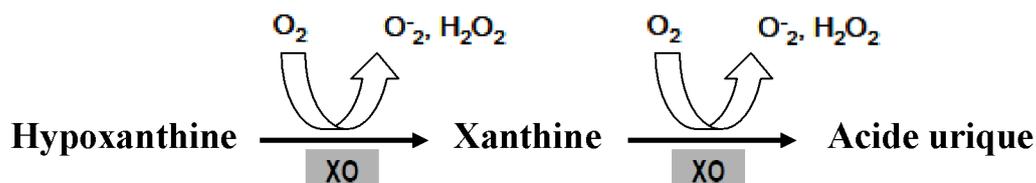
La capacité destructive des ROS est bien établie dans la défense antimicrobienne du lait humain et bovin qui inhibe la croissance des bactéries *in vitro* d'une façon NO-dépendante (Hancock *et al.*, 2002). Au niveau de l'appareil gastro-intestinal, la XOR est fortement exprimée sur les cellules épithéliales, jouant le rôle de barrière antimicrobienne (Van den Munckhof *et al.*, 1995). Ainsi, dans des conditions anaérobies, la XOR catalyse la réduction de nitrite inorganique en oxyde nitrique (NO), qui a des propriétés bactéricides (Godber *et al.*, 2000a). La présence de la XOR dans la bile a été rapportée (Martin *et al.*, 2004) et il a été suggéré qu'elle servira de source additionnelle au tube digestif en cette enzyme, amplifiant ainsi la défense antibactérienne.

Par microscopie électronique, il a été noté que la XOR est nécessaire à la sécrétion du lait et la formation de la membrane contenant la graisse (Vorbach *et al.*, 2002).

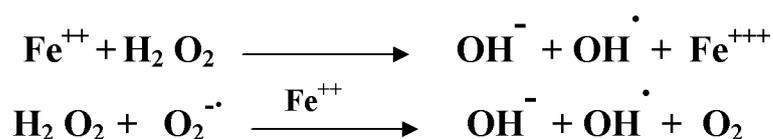


I.1.6.1. La production des ROS par la XOR

Pendant les dernières années, Il ya un intérêt croissant des rôles pathologiques potentiels que joue la XOR par sa capacité de produire des (ROS) (Behrend *et al.*, 2003) :



Ces ROS peuvent agir entre eux, en présence du fer, réaction de Haber et Weiss, pour produire des agents cytotoxiques, tel que les radicaux hydroxyles fortement réactifs (Kehrer, 2000).



Classiquement, les ROS peuvent induire la peroxydation lipidique, l'oxydation d'ADN et d'acide aminé, causant des mutations et le dysfonctionnement d'enzymes (Favier, 2003). Mais à des faibles concentrations, les ROS jouent un rôle physiologique dans la signalisation cellulaire (Behrend *et al.*, 2003).

I.1.6.2. Rôle dans la production de l'oxyde nitrique

Il a été démontré que la XOR catalyse la réduction de l'acide nitrique en l'oxyde nitrique (NO) sous conditions hypoxiques en présence soit du NADH (Mittal *et al.*, 1997) ou de la xanthine comme substrat réducteur (Godber *et al.*, 2000a; Harisson *et al.*, 2004). Godber et ses collègues ont confirmé que le NO produit par la XOR réagit avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ et génère du peroxydinitrite (ONOO^\cdot), un oxydant puissant qui peut attaquer une large variété de molécules biologiques (Godber *et al.*, 2000b; Harisson *et al.*, 2002) (Figure 7).



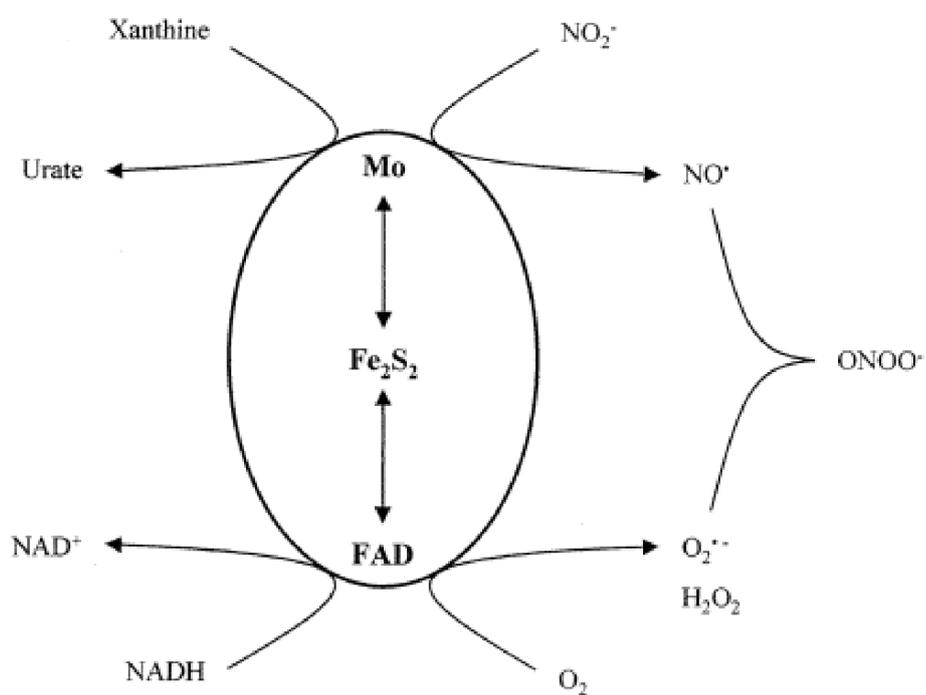


Figure 7 : Rôle de la XOR dans l'oxydation du NADH et la génération du radical nitroxyle (NO^\bullet) et du peroxynitrite (ONOO^-) (D'après Harrison, 2002).



I.1.7. Implication de la XOR dans les états pathologiques

I.1.7.1. L'Ischemie reperfusion

La XOR est liée à la pathophysiologie de la réoxygénation après hypoxie. C'est le processus l'ischemie reperfusion (I/R). L'hypoxanthine est libérée pendant l'ischémie suite à la dégradation d'adénosine triphosphate (ATP). Concurrément, le calcium pénètre dans les cellules favorisant ainsi l'activation des protéases qui convertissent la XDH en XO (forme productrice du radical $O_2^{\cdot-}$). Lors de reperfusion, la XO oxyde l'hypoxanthine accumulée pour produire les ROS qui entraînent des dommages tissulaires (Mc Cord, 1985) (**Figure 8**).

La reperfusion n'est pas un événement naturel et les endommagements d'IR sont, probablement, une réponse anormale au processus physiologique normal d'inflammation (Meneshian et Bulkley, 2002). D'où une hypothèse fut proposée; après infection, des cytokines ou d'autres médiateurs pro-inflammatoires entraînent la conversion de la XDH en XO dans les cellules endothéliales vasculaires, cela mène à la production des ROS conduisant à l'infiltration des neutrophiles et par conséquent une réponse antimicrobienne (Carden et Granger, 2000).

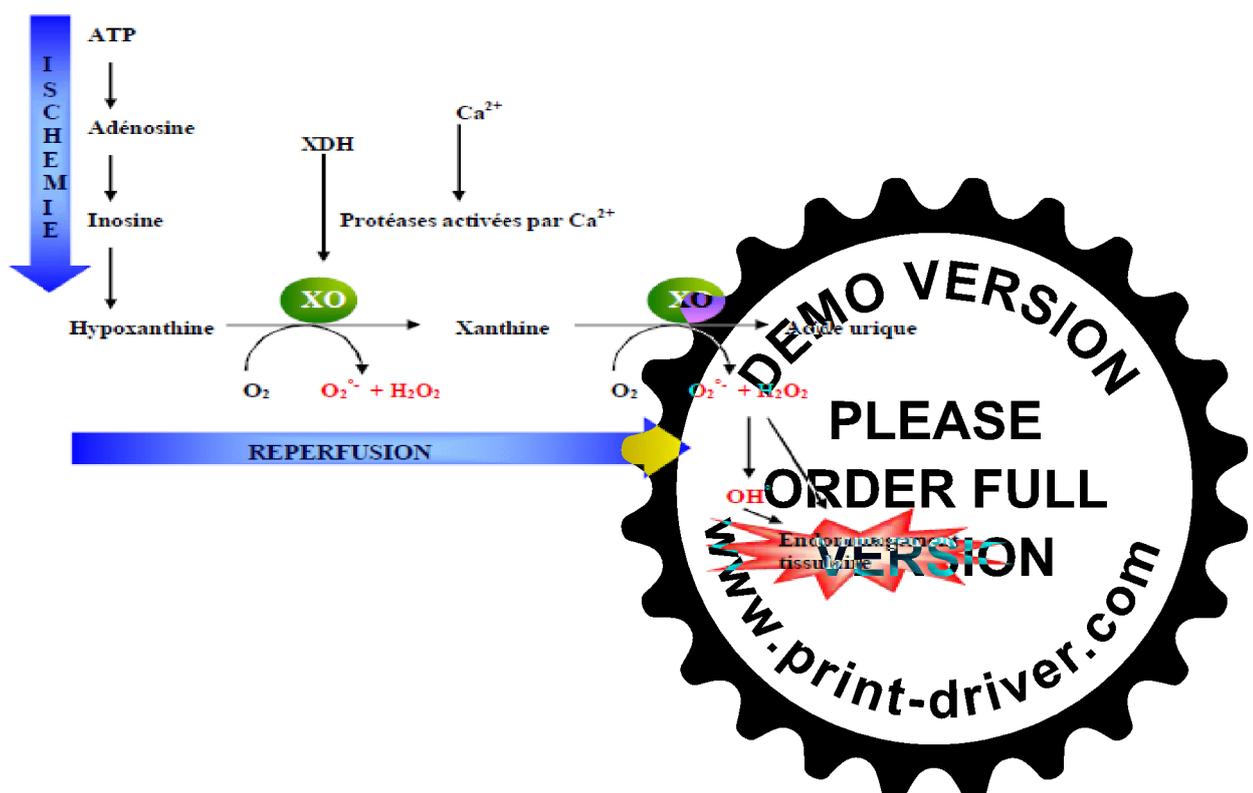


Figure 8: Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion (D'après Granger *et al.*, 1981).

I.1.7.2. XOR et inflammation

L'inflammation est une réaction de défense contre les invasions externes, mais elle peut s'amplifier d'une manière incontrôlable conduisant à des désordres et maladies inflammatoires (Govindarajan *et al.*, 2004). La XOR est impliquée dans le déroulement de la réaction physiologique de l'inflammation et elle participe également dans l'amplification par sa capacité de produire les ROS (Meneshian et Bulkley, 2002).

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents médiateurs inflammatoires, tels que TNF- α et C5a, qui provoquent la conversion de la XDH en XO (Dupont *et al.*, 1992), les neutrophiles activés causent également une conversion irréversible de la forme XDH en forme XO dans les cellules endothéliales. A lors, la production de ROS est élevée, ce qui provoque l'activation de NF-kB régulateur de la production des cytokines (TNF- ∞ , IL-1, IL-2 et IL-6) (Burdon et Gill, 1993).

Les neutrophiles possèdent à leur surface, une NADPH oxydase qui génère les ROS pendant leur défense naturelle. Le superoxyde formé par la NADPH oxydase dimute par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase (SOD) en H₂ O₂ qui peut diffuser dans les cellules endothéliales et réagir avec l'O₂⁻ endogène, probablement produit par les cellules endothéliales (Huang *et al.*, 2001), pour donner le radical hydroxyle hautement toxique et endommageant pour les tissus.

I.1.7.3. XOR et maladies du foie

Le taux de la XOR augmente dans plusieurs pathologies humaines, en particulier dans celles mettant en jeu les lésions hépatiques et de type ischémie-réperfusion (Harrison, 2002). Des études ont montré une élévation du taux de la XO sérique dans divers pathologies hépatiques (Battelli *et al.*, 1999) (**Figure 9**).

L'activité oxydase de la XOR est élevée dans les foyes des patients avec cirrhose biliaire primaire (CBP), cholangite sclérotique primaire (CSP), affection hépatique alcoolique (AIIA) et hépatite virale C (HVC) (Martin *et al.*, 2004) (Tableau II). Cette augmentation reflète les niveaux élevés de cette enzyme dans les hépatocytes et les voies biliaires, ce qui explique l'activité accrue de la XOR dans le foie malade pour la génération de ROS/RNS et aussi pour



l'up-régulation d'une gamme des cytokines (Meneshian et Bulkley, 2002). Des études expérimentales et cliniques de l'affection hépatique montrent que la peroxydation de lipides est souvent associée à la fibrose hépatique (Poli *et al.*, 1993).

Tableau II: Activité spécifique de la XOR du foie chez les sujets malades et sains.
(D'après Martin *et al.*, 2004)

<i>La maladie</i>	<i>L'activité spécifique de la XOR (pmol/min/mg de protéine totale)</i>
Contrôle normale	0.15 ± 0.02
Cirrhose biliaire primaire	1.79 ± 0.69
Affection hépatique alcoolique	2.1 ± 0.88
Hépatite C	3.13 ± 0.71
Cholangite sclérotique primaire	2.81 ± 0.69

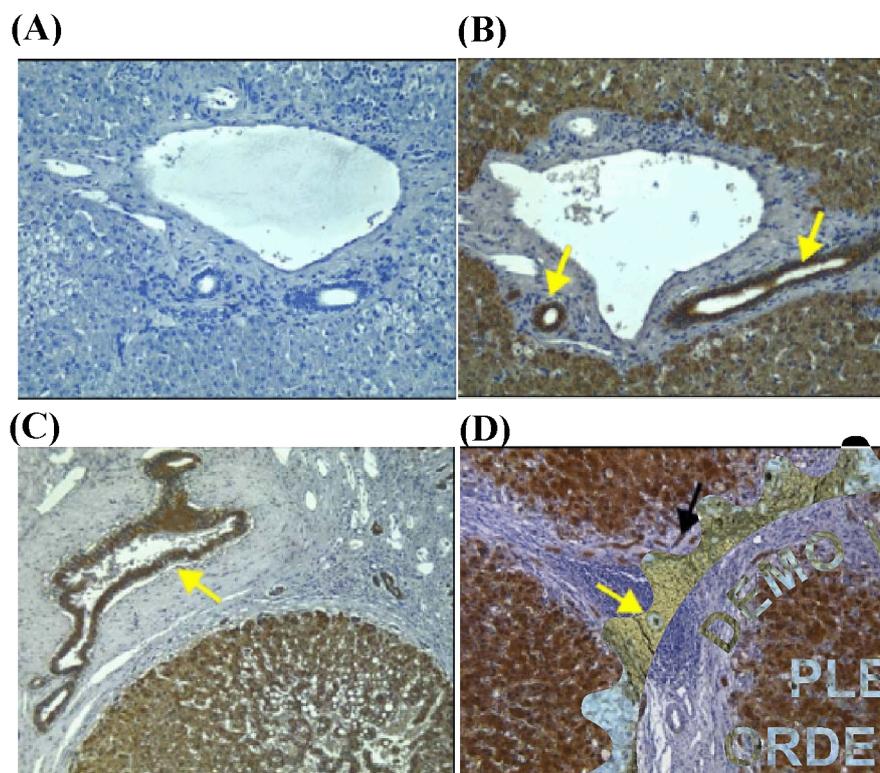


Figure 9 : Détection de la XOR, par immunoperoxydase, dans le foie humain: (A) contrôle négatif, (B) foie humain sain en présence des anticorps anti-XOR, (C -D) foie

humain malade. Les flèches montrent la présence de la XOR dans le canal biliaire (D'après Martin *et al.*, 2004).

I.1.8. Les anticorps anti-XOR

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

Les anticorps anti XOR produits chez les humains et les animaux sont des auto-anticorps générés contre la XOR endogène libéré des cellules endothéliales des capillaires endommagés. Cette hypothèse est basée sur des études qui montrent une différence dans les taux des IgM anti-BXOR entre les femmes et les hommes, cette différence est liée au processus d'auto-immunisation lors des menstruations (Lewis et Ng, 1991).

La deuxième hypothèse est basée sur la consommation du lait, Oster a proposé que la XOR du lait bovin consommée traverse la barrière intestinale sous forme liée à la membrane des globules lipidiques et qu'une proportion significative est absorbée dans un état intact (Oster, 1974; Rzucidlo et Zikakis, 1979).

Les travaux de l'équipe du Pr. Harrison à Bath (Benboubetra *et al.*, 1997) supportent la première possibilité, où par deux méthodes de dosage (SRIDA et ELISA), un taux élevé d'anticorps anti-XOR (de type IgM) contre la XOR de lait humain et bovin est détecté. Ces résultats diffèrent de ceux rapportés antérieurement par Bruder et ses collaborateurs (1984) qui montrent que ces anticorps sont des IgG.



I.2. Hépatite virale B

I.2.1. Structure et fonctions du foie

I.2.1.1. Structure

A la naissance, le foie des êtres humains est partiellement développé en contraste à celui des rongeurs et des chiens (Pelkonen, 1994). Dans toutes les espèces, le foie se compose de deux lobes principaux, le lobe droit et le lobe gauche, séparés par un ligament rond et falciforme, et deux petits lobes; le lobe caudé (médián), situé à la face postérieure et le lobe carré situé à la face inférieure (**Figure 10**).

Le foie est l'un des organes les plus volumineux du corps humain, le poids corporel relatif du foie (LBR; liver body ratio) diffère d'une espèce à l'autre (Tableau III). Les hépatocytes des mammifères sont organisés en cordes unicellulaires avec deux domaines basolatéraux. Des jonctions serrées sont formées entre les hépatocytes adjacents et la communication entre les hépatocytes se produit par des jonctions d'espace. La moitié du volume de hépatocytes est occupée par des organelles. Le parenchyme hépatique représente 60% de population totale de cellules et 80% de tout le volume de l'organe (Mc Cuskey et Sipes, 1997).

	<i>Poids du foie (g)</i>	<i>LBR (%)</i>	<i>Volume du foie (ml)</i>
--	--------------------------	----------------	----------------------------

Tableau III: Comparaison de volume des foies des adultes de quelque espèce.

(D'après Iatropoulos, 1994)



<i>Souris</i>	0.96	4.4	1.3
<i>Rats</i>	19.2	4.8	16.0
<i>Chiens</i>	840.0	4.2	800.0
<i>Humains</i>	1980.0	2.8	1350.0

I.2.I.2. Rôles physiologiques du foie

A la différence des autres cellules, les hépatocytes produisent l'énergie pour leurs propres besoins et pour d'autres tissus (Desmet *et al.*, 1999). Le foie est l'organe principal pour le métabolisme des produits chimiques et des aliments, il régule la production, le stockage et la libération des sucres, des graisses et du cholestérol (Desmeules *et al.*, 1999; Plaa et Charbonneau, 2001) (**figure 11**).

Les cellules du foie produisent la bile; un liquide jaune verdâtre qui aide à la digestion des matières grasses et à l'absorption des nutriments liposolubles. Les composés organiques majeurs sécrétés dans la bile par des hépatocytes sont des acides biliaires, des phospholipides, cholestérol, des pigments biliaires et des protéines. Les cellules du foie transforment également l'hème en bilirubine, si le foie est endommagé, la bilirubine peut s'accumuler dans le sang et ainsi causer un ictère (Yamasaki, 1990). Par suite des activités métaboliques intenses, les hépatocytes sont exposés aux divers stress cellulaires mais ils sont bien protégés contre les dommages par les niveaux élevés d'agents cytoprotecteurs tels que le glutathion et les enzymes antioxydantes (Green et Reed, 1998).

Avec le vieillissement, le foie humain se caractérise par la diminution de la taille et la réduction de niveau de sang hépatique, ceci est accompagné par des possibilités de réduction du métabolisme (Plaa et Charbonneau, 2001).



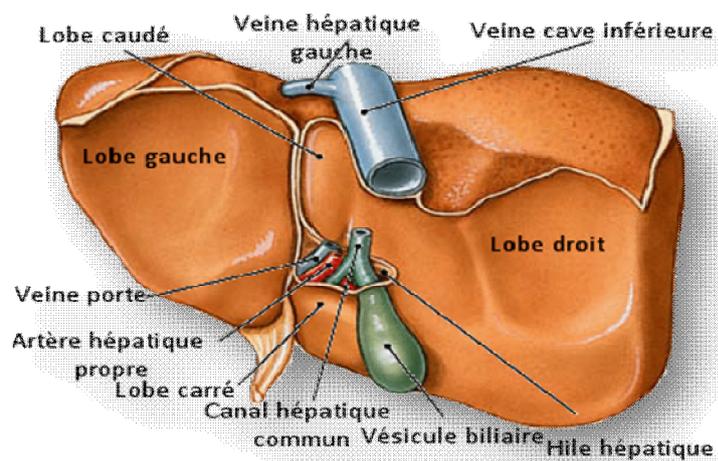


Figure 10 : Coupe transversale de foie humain.

(D'après McCuskey *et al.*, 1997)



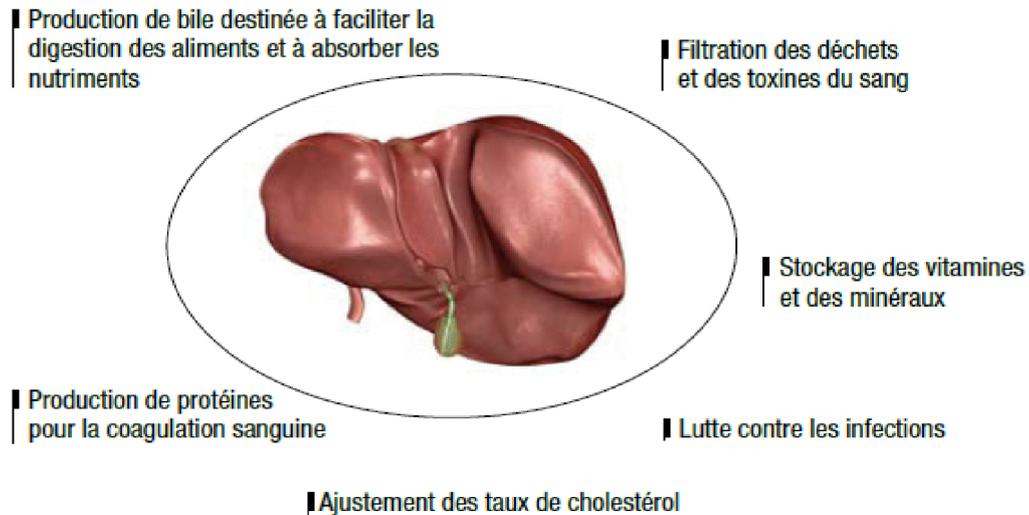


Figure11: Rôles essentiels du foie.

I.2.2- Hépatite B

L'hépatite est un terme général qui signifie l'inflammation du foie qui peut devenir enflammé en raison d'une infection virale, d'un désordre du système immunitaire ou de l'exposition à certaines substances tels que les médicaments, l'alcool, les toxines ou les poisons.

L'hépatite est le plus souvent virale, suite aux infections par virus d'hépatite A, B, C, D, et E ou un virus différent de la mononucléose infectieuse, la maladie de cytomégalovirus, ou la fièvre jaune. Le virus de l'hépatite B est la cause principale de l'hépatite humaine de plus grande importance (Hollinger et Liang, 2001).

L'hépatite B constitue un problème majeur de santé publique. Environ 30 % de la population mondiale (soit près de 2 milliards de personnes) présente des signes sérologiques d'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) et on estime que 350 millions de personnes dans le monde sont atteintes d'une forme chronique de HVB. L'infection au VHB arrive au deuxième rang, après le tabac, des agents cancérogènes connus pour l'homme, en plus cette maladie est la 10^{ème} cause de mortalité dans le monde (Lavanchy, 2004).

I.2.2.1. Épidémiologie



1.2.2.1.1. Zones de prévalence

La distribution de la prévalence du portage de l'AgHBs permet de diviser la planète en 3 zones de prévalences différentes, correspondant à des modes de transmission et des niveaux de risques différents (OMS, 2006) (**Figure 12**).

a. Faible (< 2 %) : Dans la population générale en Europe du Nord et de l'Ouest, l'Amérique du Nord, Australie, Nouvelle-Zélande, Mexique et l'Amérique du Sud. Aux États-Unis et dans beaucoup d'autres pays développés, le risque d'infection à HVB au cours de l'existence est inférieur à 20 % ce sont les pluparts des infections rencontrées à l'adolescence et l'âge adulte.

b. Intermédiaire (2 % à 7 %) : Dans la partie centrale de l'Asie du Sud, en Israël, au Japon, en Europe de l'Est et du Sud, en Russie, dans la plupart des régions entourant le bassin de l'Amazonie. Le risque d'infections à HVB est de 20 à 60 % et les infections se produisent dans toutes les classes d'âge.

c. Élevée (> 8 %) : Dans toute l'Afrique, l'Asie du Sud-Est, le Moyen-Orient (à l'exception d'Israël), le bassin intérieur de l'Amazonie et certaines régions des Caraïbes. Le risque d'infection à HVB est supérieur à 60 % et la plupart des infections résultent d'une transmission périnatale ou d'un enfant à un autre, intervenant donc à l'âge où le risque de faire une infection chronique est le plus élevé (**Figure 12**).

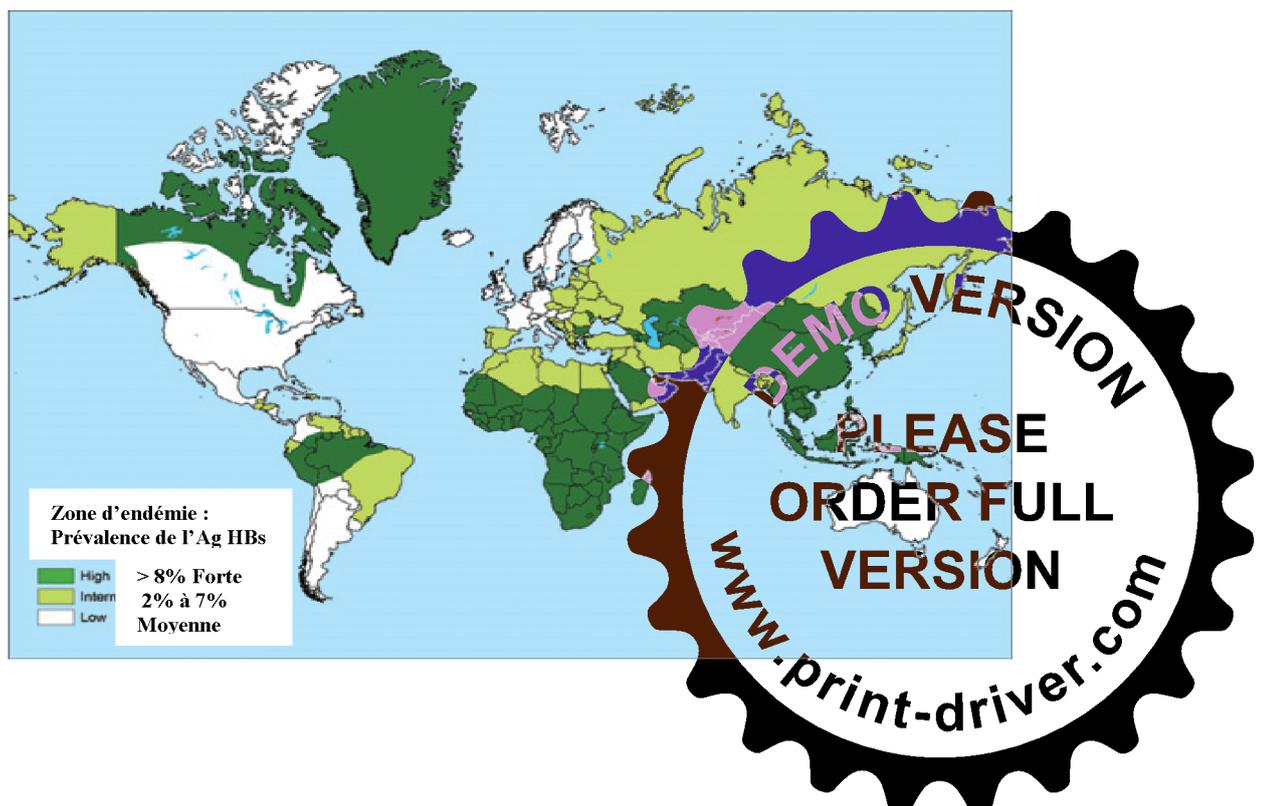


Figure 12 : Distribution mondiale de la prévalence du portage de l'AgHBs.

(D'après OMS, 2006)

1.2.2.1.2. Age et sexe

Malgré que l'hépatite B survienne à tout âge, la plupart des patients sont des adultes âgés entre 18 et 80 ans appartenant à des groupes à risque bien définis. Généralement, la fréquence de la maladie aiguë est augmentée avec l'âge mais il peut y avoir une forte proportion d'infections chroniques résultant d'une transmission périnatale ou d'un enfant à un autre (Mahoney et Kane, 1999). Les personnes porteuses chroniques du VHB étaient majoritairement de sexe masculin, les hommes sont 7 fois plus touchés que les femmes (Meffre et Le Strat, 2007).

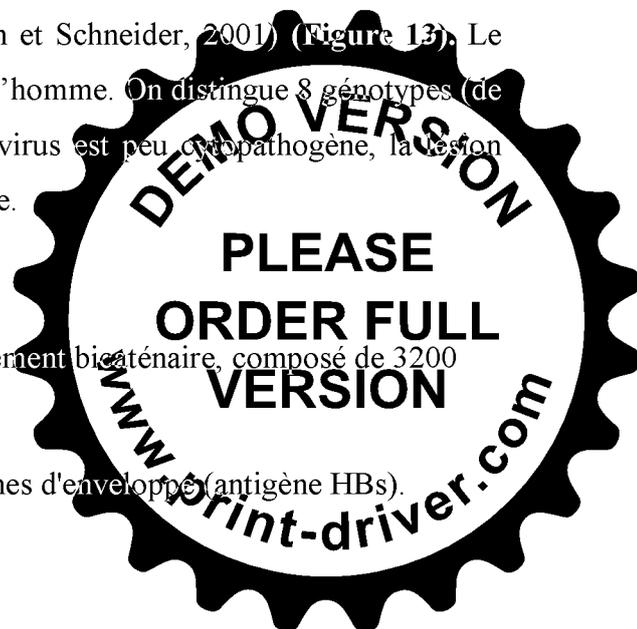
1.2.3. Virus de l'hépatite B

Le VHB est un virus appartenant à la famille des *Hepadnaviridae*, genre *Orthohepadnavirus*, et son réservoir est le foie humain. C'est un virus à ADN bicaténaire, circulaire de 42 nm, composé de 27 nm de nucléocapside, c'est le cœur (HBcAg), entouré par un manteau de lipoprotéine extérieur, appelé l'enveloppe, contenant l'antigène superficiel (HBsAg). Les hépatocytes infectés sécrètent des protéines d'enveloppe en excès (antigène HBs) sous forme de particules sphériques de 20 nm ou de particules filamenteuses (23-200 nm). L'antigène HBe est une autre protéine virale sécrétée par les hépatocytes au cours de la multiplication virale (Mahoney et Kane, 1999; Gamen et Schneider, 2001) (Figure 13). Le VHB est génétiquement stable et ne survient que chez l'homme. On distingue 8 génotypes (de A à H) (Norder *et al.*, 2004; Zekri *et al.*, 2007). Le virus est peu cytopathogène, la lésion hépatique est souvent causée par la réponse immunitaire.

1.2.3.1. Génome

Le génome de VHB est un ADN circulaire partiellement bicaténaire, composé de 3200 paires de base, code pour quatre gènes (Figure 13) :

- S (régions préS1, préS2, S): Code pour les protéines d'enveloppe (antigène HBs).



- C (régions pré-C et C): Code pour les protéines du core (antigènes HBc et HBe).
- P: Code pour l'ADN polymérase.
- X: Code pour le protéine X (transactivateur) (Gamen et Schneider, 2001; Bartholomeusz *et al.*, 2004).

I.2.3.2. Protéines

I.2.3.2.1. Protéines d'enveloppe

Ces protéines sont présentes sous forme glycosylée ou non glycosylée. La partie codée par la région préS1 est impliquée dans la fixation et la pénétration du virion au niveau de l'hépatocyte (Hollinger et Liang, 2001).

I.2.3.2.2. Protéines du core

- **Protéine HBc:** Sous forme polymérisée, elle constitue la capsid virale.
- **Protéine HBe:** Non polymérisée, cette protéine n'est pas constitutive de la particule virale mais elle est excrétée sous forme soluble dans la cellule au cours de la réplication virale.

I.2.3.2.3. ADN polymérase

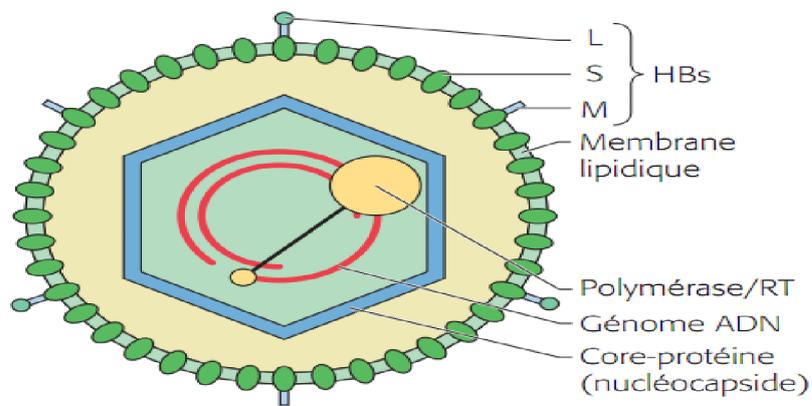
Permet la réplication de L'ADN viral et possède également une activité reverse transcriptase; qui permet la transcription d'ARN prégénomique en ADN.

I.2.3.2.4. Protéine X

Protéine non constitutive, elle joue un rôle de régulation dans la réplication virale. Elle exerce une activité transactivatrice sur des gènes viraux et des gènes cellulaires

(Figure 14).





a Particule de Dane (42 nm)

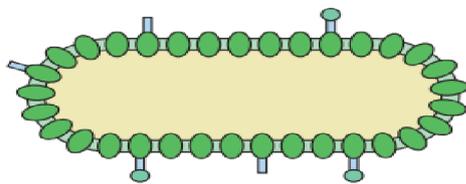


Figure 13 : Structure du virus de l'hépatite B (VHB)

(D'après Mahoney et Kane, 1999)



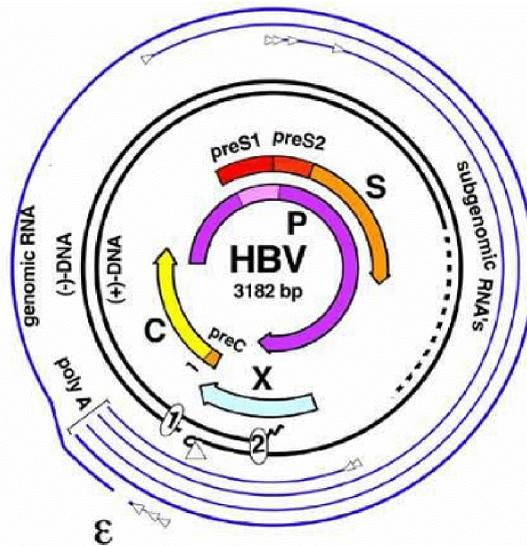


Figure 14 : Organisation génomique de VHB

(D'après Mahoney et Kane, 1999)

I.2.4. Cycle de réplication du virus de l'hépatite B (VHB)

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 et de la polymérase, 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 (Gamer et Schneider, 2001) (Figure 15).



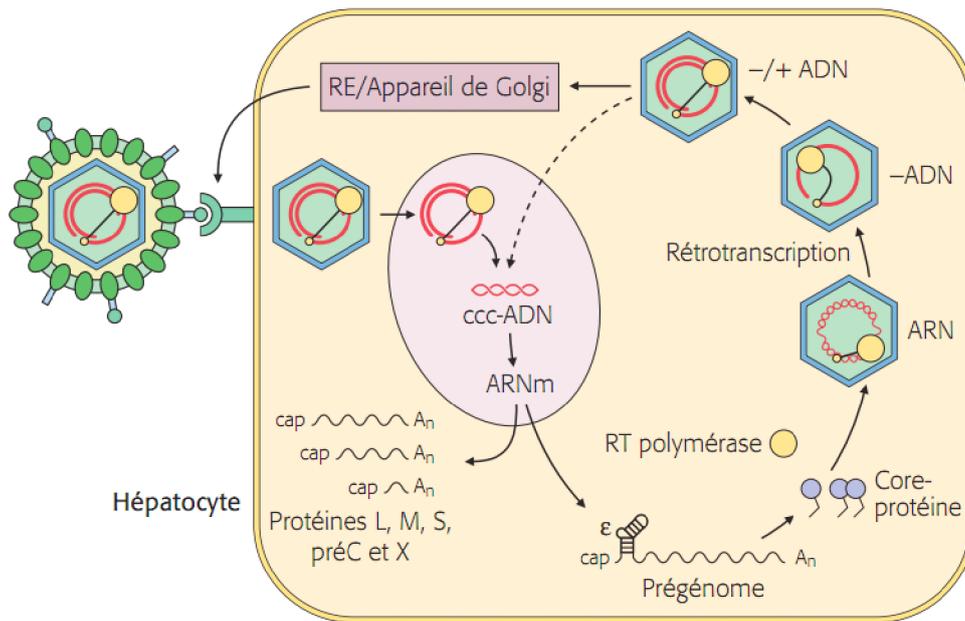


Figure 15 : Cycle de réplication du virus de l'hépatite B
(D'après Zoulim et Trépo, 1998)

I.2.5. Pathogénie du VHB

Le VHB n'est pas considéré comme directement cytopathique, chez le sujet immuno-compétent, il est probable que la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle majeur dans la pathogénie des lésions hépatiques viro-induites, donc la maladie est due à la réaction immunitaire du sujet plus qu'à l'action du virus lui-même.

Bien que la réaction immunitaire innée ne joue pas un rôle significatif dans ces processus, la réaction immunitaire adaptative, contribue à la majeure partie du dommage du foie lié à l'infection de VHB. La pénétration virale provoque, dans un premier temps, une réaction immunitaire avec la formation de complexes immuns responsables de la phase prodromique. Les hépatocytes infectés se comportent comme des néo-antigènes suscitent une réaction immunitaire à médiation cellulaire, les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus (LTCs) sont formés, ces lymphocytes reconnaissent les épitopes du core ou des antigènes d'enveloppe à la surface des hépatocytes infectés. La libération intra-hépatique de concentrations élevées de cytokines solubles est capable de purger le VHB des hépatocytes viables et peut également participer à la majoration des lésions hépatiques (Iannaccone *et al.*, 2005; 2007).



L'ADN de virus de l'hépatite B persiste dans le corps après infection et dans certains cas, bien que, rare la maladie se reproduit (Vierling, 2007). La réactivation est observée le plus souvent chez les personnes avec une immunité altérée (Katz *et al.*, 2008).

I.2.6. La transmission du VHB

Il existait quatre principaux modes de contamination:

- **les relations sexuelles non protégées:** L'infection par le VHB fait partie des infections sexuellement transmissibles (IST).
- **Le contact direct ou indirect avec du sang infecté:** Les contacts avec du sang ou des dérivés du sang, lors d'actes médicaux (actes invasifs, transfusion sanguine, chirurgie, hémodialyse, acupuncture, etc.) ou liés à la toxicomanie intraveineuse.
- **La transmission de la mère à l'enfant (périnatale):** Essentiellement au moment de l'accouchement si la mère est porteuse chronique du VHB.
- **Les contacts étroits avec l'entourage :** Pour des personnes vivant avec un sujet infecté, le plus souvent par excoriations cutanées ou par l'intermédiaire d'objets de toilette piquants ou coupants (rasoir, brosse à dents, coupe-ongles, etc.) (Hollinger et Liang, 2001; Redd *et al.*, 2007).

I.2.7. Diagnostique positif

I.2.7.1. Les signes cliniques

L'hépatite B est une maladie silencieuse, car elle ne se manifeste souvent par aucun symptôme. De nombreuses personnes mettent plusieurs années pour que la maladie se manifeste malgré des lésions de foie est déjà existantes. Seules 30% des personnes présentent des symptômes de l'hépatite B.

I.2.7.1.1. Hépatite B aiguë

La période d'incubation du virus dure habituellement de 3 à 4 mois. Dans 90% des cas, l'hépatite B aiguë guérira et entre 1 à 2% des adultes atteints d'hépatite B aiguë développent une hépatite fulminante dont le risque de mortalité est de 60 à 90% en absence de transplantation hépatique. L'hépatite B aiguë est asymptomatique dans la majorité des cas mais elle peut se manifester par des signes non spécifiques tels que la perte d'appétit.



faiblesse, nausées, asthénie, anorexie, vomissements, douleurs abdominales, ictère, urines foncées, éruptions et douleurs articulaires (Hollinger et Liang, 2001).

1.2.7.1.2. Le portage chronique

C'est une atteinte hépatique nécrotique et inflammatoire évoluant depuis 6 mois. Il est souvent asymptomatique, certains des patients infectés ne présentent aucun signe clinique ou biochimique, mais d'autres peuvent montrer les signes de la fatigue, l'anxiété et l'anorexie (Hollinger et Liang, 2001). Deux types de situation doivent être distingués:

- * Le simple portage chronique inactif de l'AgHBs, généralement sans gravité.
- * L'hépatite chronique, susceptible d'induire des complications graves (Mahoney et Kane, 1999).

➤ L'hépatite B chronique est caractérisée par trois phases après la phase aiguë, dont la durée est très variable en fonction des individus :

- a. La phase répllicative** qui correspond à une forte multiplication du VHB dans le foie, confirmée par la persistance de l'antigène HBe et la présence d'une grande quantité d'ADN viral dans le sang. Cette phase de tolérance immunitaire dure plusieurs années. L'activité de l'hépatite chronique demeure faible, comme témoigne l'élévation modérée des transaminases. Les lésions hépatiques sont minimales. En cas de contamination à la naissance, la phase de tolérance immunitaire peut être très longue (plusieurs dizaines d'années).
- b. La phase de séroconversion HBe** est brève et correspond à la destruction d'hépatocytes infectés. Les transaminases augmentent à nouveau, signe de la réaction immunitaire, alors que la multiplication virale diminue. Paradoxalement, c'est au cours de cette phase que les lésions du foie sont les plus graves.
- c. La phase non répllicative** où le virus ne se multiplie plus. L'absence d'activité de l'hépatite chronique est attestée par des transaminases normales ou peu élevées. Il s'accompagne de la disparition de l'antigène HBe au profit de l'anticorps anti-HBe c'est



la séroconversion HBe, qui signe la fin de la réplication virale. La menace diminue au cours de cette dernière phase de l'hépatite chronique.

I.2.7.2. Signes biologiques

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 (Yusuf Önlén *et al.*, 2008). 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 (Trépo *et al.*, 1993; Yusuf Önlén *et al.*, 2008).

I.2.7.2.1. 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'anti-HBs pourra demeurer plusieurs années avant de disparaître.

I.2.7.2.2. Anticorps anti-HBc

Le premier à apparaître, moins d'un mois après la contamination, de 2 à 3 semaines après l'antigène HBs en cas d'infection aiguë, il est dirigé contre l'antigène HBc, l'antigène central du VHB, que l'on ne recherche jamais car il n'est pas détectable dans le sang. 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).

I.2.7.2.3. Système antigène-anticorps HBe



La détection de l'antigène HBe 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.

1.2.7.2.4. 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.

1.2.7.2.5. L'antigène Pré-S1

L'antigène Pré-S1 est retrouvé sur l'enveloppe des particules virales infectieuses et pourrait donc représenter un marqueur de réplication virale (Zoulim *et al.*, 1992b). Ce test a permis de montrer que l'expression de cet antigène est corrélée de façon significative avec l'intensité de la réplication virale chez les patients présentant VHB chronique active.

1.2.8. Évolution naturelle de l'hépatite B

Chez le sujet immunocompétent, le VHB est responsable d'une hépatite aiguë qui peut se compliquer d'une évolution fulminante dans 1 % des cas. Le risque de passage à la chronicité est inversement proportionnel à l'âge ; la plupart des patients adultes présentent la forme aiguë dont le risque de passage à la chronicité est de 5 à 10 %, ce chiffre est beaucoup plus élevé chez les enfants en bas âge, on signe que 70% à 90% des nouveau-né deviennent de porteurs chroniques de VHB (Mahoney et Kane, 1999) (**Figure 16**).

Pour l'hépatite chronique, le risque de développer une cirrhose varie de 0,1 à 2 % par an en fonction de la sévérité de l'hépatopathie, la durée de la réplication virale, la présence d'infections concomitantes et d'une exposition parallèle à l'alcool (Wu *et al.*, 2003). L'évolution ultime peut être une insuffisance hépatocellulaire décompensée, éventuellement fatale. L'évolution de HVB est aggravée en cas de coïnfection par le VIH et co-infection avec le virus de l'hépatite C (VHC) (Brook *et al.*, 2005).



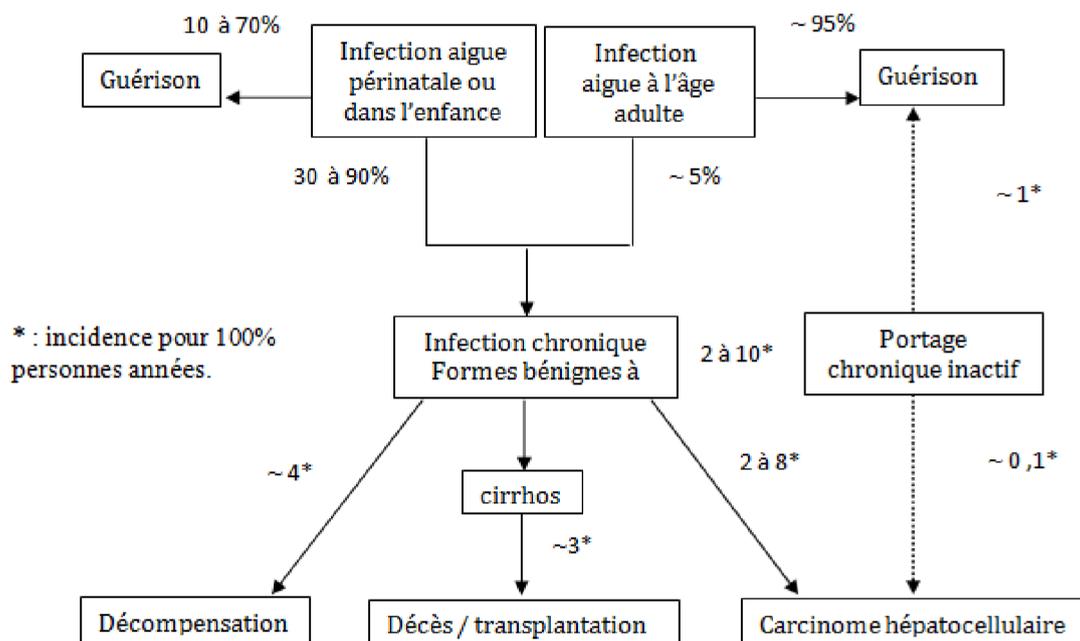


Figure 16 : Evolution des infections aiguës par le VHB selon l'âge à la contamination.
(International Consensus Conference on Hepatitis B, ICCHB, 2002)

I.2.9. Traitement de HBV

Le traitement des hépatites virales B est basé principalement sur l'introduction et la diffusion de l'Interféron- α et les analogues nucléosidiques puis nucléotidiques. Le concept principal de ces traitements antiviraux est d'obtenir une viro-suppression efficace, cette activité est confirmée par la négativation de l'ADN du VHB dans le sérum et par la disparition d'une synthèse protéique virale (Ag HBs, Ag HBs) accompagnées d'une normalisation des transaminases et d'une amélioration histologique (Lok *et al.*, 2001).

I.2.9.1. Les analogues nucléosidiques ou nucléotidiques

Certaines molécules, des nucléosides, entravent la multiplication du virus en inhibant la transcriptase inverse du VHB, mais elles n'ont qu'une action suspensive de la multiplication virale. Tant qu'elles sont administrées, ces molécules empêchent la multiplication du virus, mais si on arrête le traitement, la multiplication virale reprend. Le traitement par nucléosides est donc, a priori, d'une durée indéfinie. L'inconvénient est le risque d'émergence d'un VHB



mutant résistant au nucléoside employé, ce risque croît avec la durée d'utilisation des nucléosides.

Deux analogues; la lamivudine ou 3TC (Zeffix®, Epivir®) et l'adéfovir (Hepsera) (Leung *et al.*, 2001) sont actuellement les principaux traitements. En 10 ans, le traitement du VHB s'est enrichi de 5 nucléosi/tides (lamivudine, adefovir, tenofovir, entecavir, telbivudine),

I.2.9.2. L'interféron- α

L'interféron- α (IFN α), molécule physiologique naturellement produite par certains globules blancs, est un immunostimulant qui n'entraîne pas de résistance virale, il trouve une place de choix dans le traitement des hépatites chroniques B puisqu'il associe des propriétés antivirales, immunomodulatrices et antiprolifératives (Niederau *et al.*, 1996). L'efficacité est évaluée au bout de trois mois; si la charge virale a baissé et que les transaminases diminuent, il est recommandé de poursuivre le traitement un à deux ans. L'interféron a été l'un des premiers traitements du HVB et a récemment été remis à l'honneur comme traitement de première ligne de l'infection chronique par le VHB au cours de la conférence européenne de consensus sur le VHB (De Franchis *et al.*, 2003).

I.2.9.3. Associations d'antiviraux

Vu l'apparition de résistance aux antiviraux, les combinaisons thérapeutiques devraient limiter le risque de résistance, mais il n'est pas évident qu'elles renforcent l'efficacité antivirale proprement dite. Toutes les combinaisons peuvent donc s'imaginer entre les nouveaux analogues nucléos(t)idiques et l' α -Interféron voire les immunothérapies. Ceci n'est pas une idée nouvelle puisque l'association d'antiviraux avait montré un effet supérieur à la monothérapie traditionnelle en termes d'arrêt la multiplication virale B (Hollinger et Liang, 2001). La décision sur le type de traitement à utiliser en première intention pour un patient infecté par le VHB repose sur; le stade de la maladie hépatique, la charge virale VHB et l'augmentation des transaminases.



I.2.10. Prévention de VHB

I.2.10.1. Les Immunoglobulines

Les immunoglobulines sont utilisées comme prophylaxie post-exposition. En cas de rapport sexuel à risque (Brook *et al.*, 2005), on peut administrer des immunoglobulines dans les 48 h à 7 jours après l'exposition.

I.2.10. 2. La vaccination

Le vaccin contre l'hépatite B prévient la survenue de maladies graves; hépatites aiguës fulminantes, cirrhoses et cancers. A ce titre, c'est le premier vaccin disponible contre un cancer ce qui diminué le taux de cancer primitif du foie (Mast *et al.*, 2004; van der Eijk *et al.*, 2004).

Il existe deux types de vaccin contre l'hépatite B:

- * des vaccins recombinés ou issus du génie génétique, fabriqués en utilisant du HBsAg synthétisé dans des levures ou des cellules mammaliennes dans lesquelles le gène du HBsAg a été inséré.
- * des vaccins préparés à partir d'un HBsAg purifié tiré du plasma de porteurs chroniques du VHB (Aggarwal et Ranjan, 2004).

Ces deux types de vaccins ont une immunogénicité et une efficacité comparable (Zuckerman, 2006). Le calendrier de primo-vaccination habituel consiste en l'injection de trois doses de vaccin par voie intramusculaire (à zéro, un et six mois). Cependant, la protection optimale n'est atteinte qu'après l'injection de la dernière dose de vaccin de la série. Les stratégies étendues de vaccination contre l'hépatite B préviennent l'infection chronique, et incluent la vaccination systématique des nourrissons, la prévention de la transmission périnatale du VHB et la vaccination de rattrapage pour les sujets plus âgés (Mast *et al.*, 2004).





Chapitre II

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Lait humain

Le lait humain provient de personnes saines à travers les services de maternité des hôpitaux de l'Ouest d'Angleterre (Bristol Royal Infirmary, Southmead Hospital à Bristol, Princess Margaret Hospital à Swindon et l'Hôpital Royal de Bath).

II.1.1.2. Sérum humain

Les sérums sont de deux catégories; des sérums de patients avec des hépatites et des sérums de sujets normaux sans aucune atteinte hépatique.



Les sérums de donneurs sains nous ont été gracieusement fournis par Pr. Touabti du laboratoire central. Les sérums collectés sont répartis en aliquotes puis conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leur utilisation. Les sérums de patients nous ont été gracieusement fournis par Pr. Harrison, Université de Bath, Angleterre.

II.2. Méthodes

II.2.1. Purification de la xanthine oxydoréductase humain

La purification de la xanthine oxydase du lait humain (XORH) est réalisée selon la méthode décrite par les membres de l'équipe du professeur Harrison (Sanders *et al.*, 1997; Benboubetra *et al.*, 1997), la XORH est préparée à partir du lait maternel congelé.

Le lait humain est centrifugé à 5000 rpm pendant 20 minutes (centrifugeuse 3-K30, Sigma), la crème flottante est dissoute dans un volume double de phosphate de potassium (K_2HPO_4 , 0.2 M) contenant 1 mM d'EDTA et 5 mM de DTT. Le mélange est soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugé à 6000 rpm pendant 20min. Le surnageant récupéré est filtré sur laine de verre et additionné progressivement de 15 % (V/V) du butanol froid ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) et de sulfate d'ammonium 15 % (P/V) sous agitation douce pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min. Après filtration du surnageant sur laine de verre, la XORH est précipitée par ajout progressif de sulfate d'ammonium 20 % (P/V) sous agitation douce pendant 1 heure et 30 min, puis centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min. Le précipité (couche supérieure brunâtre) est récupéré doucement et resuspendu dans un petit volume de tampon héparine ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 25 mM, contenant 1 mM d'EDTA, pH 6.2) et dialysé contre ce même tampon pendant une nuit sous agitation. Afin d'éliminer les impuretés insolubles, le dialysat est centrifugé à 18000 rpm pendant 60 min. Après filtration à travers un filtre de $45\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre, le produit final constitue l'extrait brut de la XORH.

L'extrait brut obtenu est déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'héparine-agarose équilibré et lavé par le tampon héparine. La colonne est ensuite lavée par le même tampon renfermant 0.1 M de NaCl. La XORH est récupérée de la colonne par le tampon héparine contenant 0.2 M de NaCl et dialysée contre un tampon Bicine 50 mM, pH 8.3, pendant une nuit. Enfin, l'enzyme est répartie en aliquotes de 0.5 ml et conservée à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à son utilisation. La colonne est régénérée par lavage avec une solution de NaCl 1 M puis avec le tampon d'héparine pour une nouvelle utilisation.

II.2.2. Tests de pureté de la XORH



La pureté de l'enzyme purifiée est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et par le rapport protéine /flavine (RPF), correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm (A280nm / A450nm) (Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau, Techcomp). Une valeur proche de 5 est un bon signe de pureté (Bray, 1975).

II. 2.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970); le gel de séparation (10 % d'acrylamide et 2.74 % de bis-acrylamide) est préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.042 % de N,N,N'N' Tetramethylene diamine (TEMED) (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration est préparé dans le même tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.1% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Les échantillons (XORH, environ 1 mg / ml) ainsi que les standards des poids moléculaires (1 mg / ml) sont préparés dans une solution échantillon, 2 % de SDS (P/V), 20 % de glycérol (V/V) et 0.005 % de bleu de bromophénol (P/V). Ensuite, ils sont chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Les standards des poids moléculaires (Sigma) utilisés sont de 29000 Da à 205000 Da.

La migration électrophorétique est réalisée dans un tampon Tris-HCl (25 mM) contenant 0.192 M de glycine et 0.1 % de SDS (P/V) par application d'un courant électrique de 10 mA jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel de séparation, l'ampérage est ensuite augmenté jusqu'à 37- 45 mA. Les protéines séparées sont colorées pendant au moins une heure dans une solution de bleu de Coomassie 0.2 % (P/V) contenant 10 % d'acide acétique (V/V), 45 % de méthanol (V/V) dans de l'eau distillée. Le gel est ensuite décoloré par une solution d'acide acétique 5-10 % (V/V).

II.2.3. Préparation des antisérums de lapin

II.2.3.1. Immunisations des lapins

Les immunisations des lapins blanc sont réalisées à l'Institut Pasteur d'Alger, une primo-immunisation est réalisée par l'inoculation par voie sous cutanée de 100 µg de la XORH purifiée diluée dans 500 µl de tampon PBS et 500 µl d'adjuvant complet de Freund. Des quantités égales d'enzyme diluée dans du PBS et l'adjuvant incomplet de Freund sont ensuite utilisées pour les différents rappels. Des saignées sont effectuées, en général, une semaine



après chaque rappel par des piqûres au niveau de la veine périphérique de l'oreille. Une semaine après le dernier rappel, les lapins sont égorgés pour récupérer la totalité possible du sang. Après une centrifugation de 20 mn à 3000 rpm, le sérum est congelé à 20 °C jusqu'à son utilisation.

II.2.3.2. Purification des anticorps anti-xanthine oxydoréductase

II.2.3.2.1. Précipitation au sulfate de sodium

A 10 ml de sérum de lapin immunisé sont ajoutés 18g de sulfate de sodium. Après une agitation durant 1h 30 mn à la température du laboratoire, le mélange est laissé se reposer pendant 1h 30 mn avant d'être centrifugé pendant 30 mn à 3000 rpm. Deux lavages au sulfate de sodium 18% (p/v) sont effectués puis le précipité obtenu est dissout dans un tampon approprié (selon l'utilisation des IgG purifiées) et dialysé contre le même tampon pendant une nuit à 4°C (Benboubetra, 1989).

II.2.3.2.2. chromatographie d'affinité sur gel de protéine A sépharose

La fraction d'IgG obtenue par précipitation au sulfate de sodium est purifiée d'avantage par passage sur une colonne de protéine A sépharose. Suite à un passage et un recyclage d'environ 4h avec un débit de 6-8 ml / h et un lavage suffisant, l'élution des IgG est effectuée avec un tampon de citrate de sodium 0,2 M pH 3,0 (ou avec un tampon de glycine-HCl 0,2 M pH 2,7). Les IgG sont collectées en fractions de 2.5 ml dans des tubes renfermant 0.5 ml de Tris-HCl 1M pH 8.0 afin d'éviter une éventuelle dégradation des anticorps à pH acide. Les fractions ainsi obtenues sont dialysées contre du PBS pendant une nuit puis concentrées au PEG et conservés à - 20 °C jusqu'à leur utilisation.

II.2.4. Dosage de la XOR sérique humaine

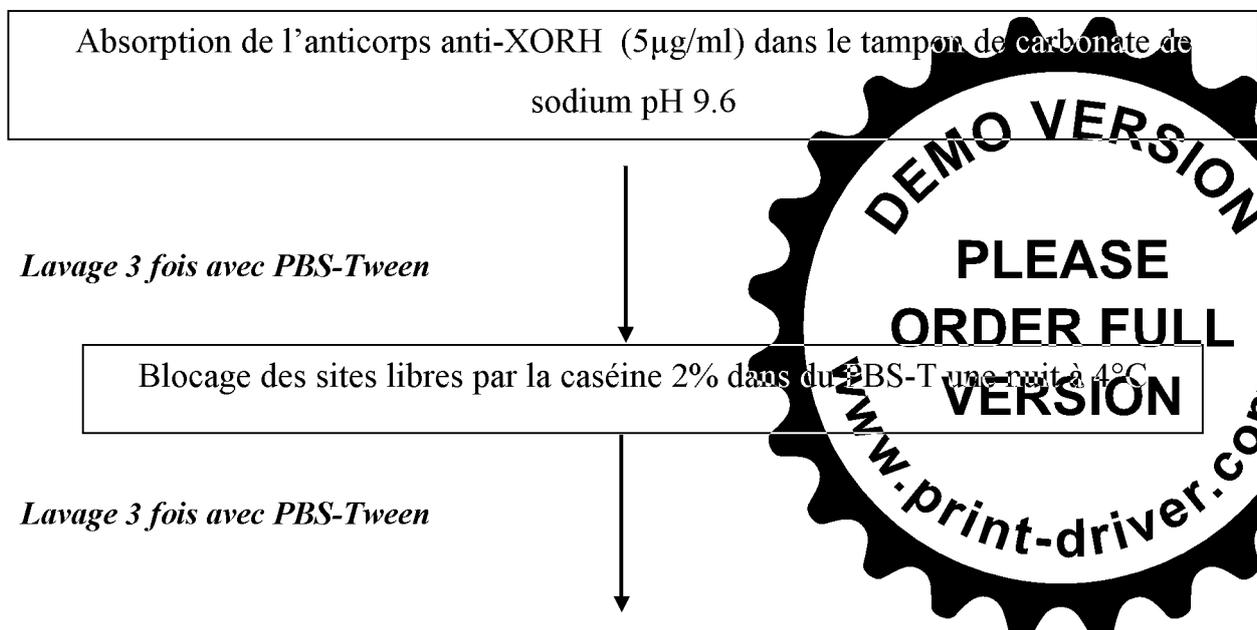
Le dosage de la XORH dans les sérums est déterminé comme suit. Les anticorps humains anti-XOR purifiés sont absorbés (5µg/ ml) dans Na₂CO₃ 50 Mm renfermant 0.01 d'azide de sodium (100µl) dans chaque puits des plaques de microtitration pendant 4 heures à température de laboratoire. Les puits sont ensuite 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 différentes dilutions (1/10⁶, 1/10⁹, 1/10¹², 1/10¹⁵) 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

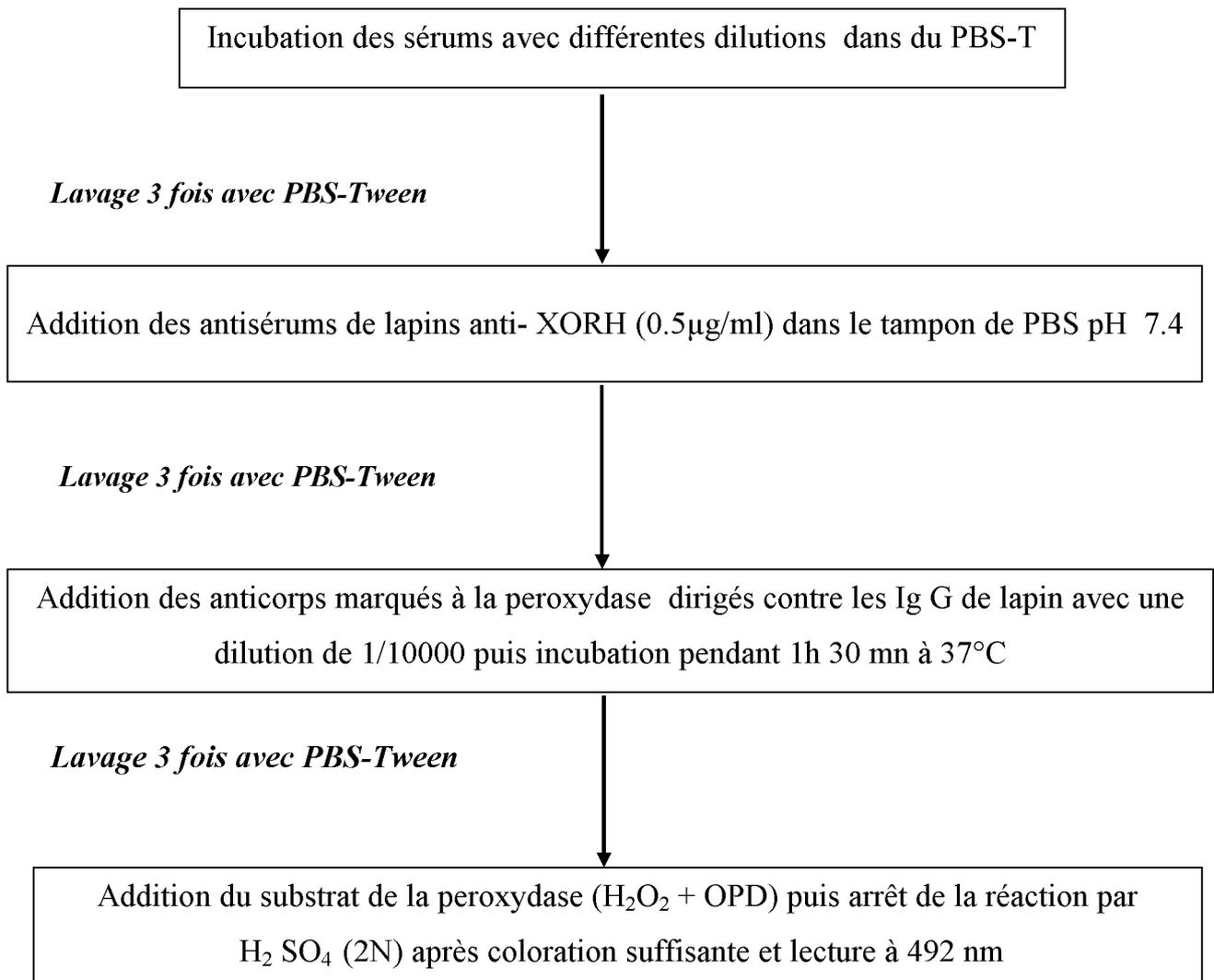


37°C. La plaque est lavée trois fois par le PBS-Tween, puis les anti-IgG de lapin marquées à la peroxydase (Sigma, dilué 1/10000 fois dans du PBS) sont ajoutés et incubée pendant 90 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-T, le tampon substrat est ajouté (100µl/puits) et la coloration jaune est laissée développer pendant 20 mn puis la réaction est arrêtée par 50 µl de H₂SO₄ (2N) et l'absorbance est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque (EL_X800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) à 492 nm. Le tampon de substrat est du citrate de sodium 0,1 M pH 5,0 renfermant H₂O₂ (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 contre le 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 17**.





II.2.5. Test d'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la XORH est déterminée par l'oxydation de la xanthine (100µM) dans un tampon de phosphate de potassium 50Mm pH 8,3 (ou tampon Bicine-NaOH 50Mm pH 8,2) saturé en air, à température du laboratoire. L'activité xanthine oxydase (XO) est déterminée en terme de production de l'acide urique à 295 nm en se basant sur le coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{\text{acide urique}}=9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Avis *et al.*, 1956) suite à l'oxydation de la xanthine. L'activité enzymatique déshydrogénase (XDH) est exprimée comme étant l'augmentation de l'absorbance $A_{340 \text{ nm}}$ obtenue en présence de 0,5 mM de NAD^+ correspondant à sa réduction en NADH. L'activité NADH oxydoréductase est mesurée en arrivant à la diminution de l'absorbance à 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dans un



tampon de phosphate de potassium 50 Mm pH 6,8 saturé en air en présence de 28,2 μM de NADH (Benboubetra, 1989).

L'activité totale (XO+XDH) est mesurée à 295 nm dans un milieu réactionnel renfermant de la xanthine (100 μM) et du NAD^+ (500 μM) dans un tampon bicine-NaOH aéré (Benboubetra, 1989).

II.2.6. Tests de la production de l'anion supéroxyde

La production des ions supéroxyde est déterminée en terme de la réduction du cytochrome c à 550 nm ($\epsilon = 2100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Fridovich, 1970). Le dosage est réalisé à température du laboratoire dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,4 renfermant 0,1 mM EDTA aéré, en présence du cytochrome c à 25 μM . La réduction du cytochrome c est mesurée en présence et en absence de la supéroxyde dismutase (SOD). L'activité spécifique pour l'anion supéroxyde est celle inhibées par la SOD (Fridovich, 1970).

II.2.7. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (déviation standard). L'analyse est effectuée par le test **t** de Student pour les comparaisons simples des résultats des sujets normaux et malades. La différence est considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est inférieure à 0.05 ($P < 0.05$). La comparaison des moyennes et des variances est déterminée grâce au logiciel Graphpad Prism version 5.0.

Chapitre III



Résultats et discussion



III.1. Purification de la XORH du lait humain

La purification de la XORH est réalisée à partir du lait humain congelé selon la méthode décrite par Benboubetra et ses collaborateurs (Benboubetra *et al.*, 1997). La purification consiste en une série de centrifugations et de précipitations au sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie d'affinité sur colonne de gel d'héparine basée sur l'affinité de l'enzyme aux glycosaminoglycanes sulfatés (Adachi *et al.*, 1993).

III.1.1. Rendement de la purification

Le rendement obtenu de la purification de la XORH à partir de lait humain est de 5.7 ± 1.8 mg/l ($n= 4$) selon les différentes préparations. Ce rendement est faible par rapport au rendement obtenu à partir du lait bovin (14 mg/l lait bovin). Ces rendements sont comparables à ceux rapportés par d'autres auteurs soit pour l'enzyme humaine (Benboubetra *et al.*, 1997; Godber, 1998) ou pour l'enzyme bovine (Hunt et Massey, 1992). Pour expliquer le rendement relativement faible de l'enzyme humaine, purifiée toujours du lait congelé, il a été rapporté que la répétition de la congélation-décongélation conduit à la destruction des globules gras et la libération de la XORH et donc l'élimination de la XORH dès la première centrifugation (Powell *et al.*, 1995). Par contre, en présence de dithiothreitol (DTT), oxydation des groupements thiols, le rendement de l'enzyme est comparable à celui du lait bovin. De ce fait l'addition de DTT (5mM) a un effet sur la libération de l'enzyme des globules gras et elle a été utilisée lors de la purification.

III.1.2. Control de la pureté

Le spectre d'absorption caractéristique de la XORH par un balayage spectrophotométrique (UV-Vis) a présenté trois pics majeurs à 280, 325 et 450 nm (**Figure 18 a**) compatibles aux résultats rapportés par d'autres auteurs (Abadeh *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1997; Benboubetra *et al.*, 2004). Le rapport protéine / flavine ($RPF = A_{280} / A_{450}$) de l'enzyme purifiée du lait humain varie entre 4.95 et 5.26 (5.10 ± 0.22). Un RPF proche de 5 est utilisé comme critère de pureté de l'enzyme (Bray, 1975).

La pureté de l'enzyme est confirmée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE 10%)



(Laemmli, 1970). Le chemin électrophorétique présente une bande majeure de poids moléculaire d'approximativement 150 KDa (**Figure 18 b**).

III.1.3. Activité de l'enzyme humaine purifiée

L'activité totale XORH et l'activité de la forme déshydrogénase XDH de l'enzyme humaine purifiée est estimée en présence de xanthine comme substrat réducteur et de NAD⁺ comme substrat oxydant mais la lecture est effectuée à différentes longueurs d'ondes; 295 nm pour XORH et 340 pour la forme XDH. L'activité total (XO+XDH) spécifique de l'enzyme purifiée est de 78.64 ± 17.81 nmole / mn/ mg de protéine (n=4) dont 98.4 % est sous la forme XDH (**Tableau IV**).

III.2. Purification des anticorps

La préparation des anticorps anti-XORH de lapin est réalisée en deux étapes : (i) immunisation des lapins blancs par l'enzyme purifié XORH; une primo-immunisation est réalisée suivie par des injections de rappels, le sang prélevé est centrifugé a fin de récupérer le sérum, (ii) purification des anticorps présentent dans les immun-sérums anti-XORH par une précipitation au sulfate de sodium suivi d'une chromatographie d'immunoaffinité sur gel de protéine A.

La fraction des IgG obtenue par précipitation au sulfate de sodium purifiée par le passage sur une colonne de protéine A sépharose, l'élution des IgG est effectuée avec un tampon de citrate de sodium 0.2M pH 3.0. La concentration des anticorps anti-XORH (IgG) purifié est vérifiée par la méthode de Bradford (1972), la comparaison de certains protéiques sériques expérimentaux avec des lots commercialisés montrent une concentration protéique de 2.1 mg/ml pour les IgG purifié alors qu'ils sont de 1mg/ml pour les IgG issus de lots commercialisés.

Tableau IV: Caractérisation de la XORH purifiée à partir du lait humain congelé (n = 4).

	Quantité d'enzyme (mg / litre)	RPF	Activité spécifique (nmole / mn/ mg)
XORH	5.7 ± 1.8	5.10 ± 0.22	78.64 ± 17.81



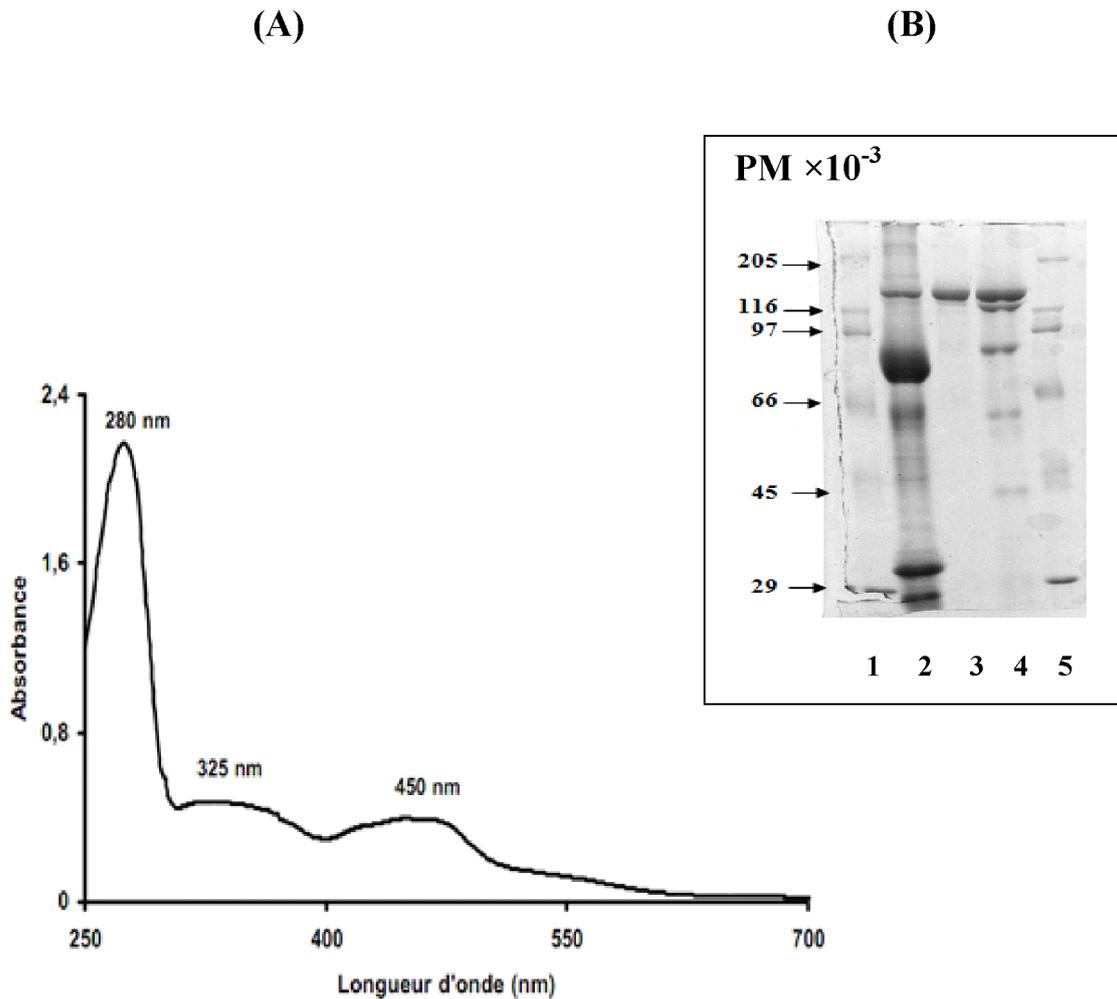


Figure 18: (A) Spectre d'absorption en UV-Vis (250 – 700) de la XORH purifiées par chromatographie d'affinité sur héparine-agarose, XORH humaine est éluée avec 0.4M de NaCl dans le tampon héparine.

(B) SDS-PAGE (10%) de la XORH purifiée par chromatographie d'affinité sur le Gel d'héparine: 2- fractions brute de la XORH, 3- XORH après la chromatographie, 4- XORH avant la chromatographie, 1et 5- protéines standards de poids moléculaires (Myosinne: 205 KDa, B- galactosidase: 116 KDa, phosphorylase: 97 KDa, BSA: 66 KDa, albumine d'œuf: 45 KDa et anydrase carbonique: 29 KDa).



III.3. Dosage du taux de la protéine xanthine oxydoréductase

III.3.1. Chez les sujets normaux

Pour réaliser cette étude, nous avons essayé de développer un test d'ELISA sandwich où l'antigène (XORH) se trouve entre deux anticorps spécifiques (anti-XORH), cette technique consiste en; (i) la fixation des anticorps anti-XORH de capture sur le support, (ii) la déposition des différentes dilutions des sérums à tester en triplicata (iii) la fixation des anticorps anti-XORH de capture sur l'antigène XORH recherché et finalement la fixation des anticorps de détection marqués à la peroxydase. Dans chaque plaque, des concentrations connues de l'enzyme XORH sont appliquées pour tracer une courbe d'étalonnage et celle la partie linéaire est utilisée pour calculer les concentrations.

Les taux de la xanthine oxydoréductase ont été déterminés dans les sérums de 30 sujets normaux qui nous ont été gracieusement fourni par Pr. Touabti du laboratoire central de CHU de Setif. Les résultats obtenus montrent la présence de la XORH sérique avec des taux de 91.89 ± 93.06 ng/ml. La majorité des échantillons (17 sujets) contiennent des taux compris entre 12 et 99 ng/ml représentant 56.66% des sujets étudiés (**Figure 19**).

Il y'a 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 la XORH à été rapporté pour la première fois par Sarnesto et ses collaborateurs (1996), ils ont détectés l'enzyme dans vingt sérums de sujets normaux avec une concentration maximale de 5 ng/ml. En revanche, Batteli et ses collaborateurs (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. Les concentrations de XORH que nous avons trouvées par ELISA sandwich dans les sérums des sujets normaux (30 sujets de la région de Setif) sont comprises entre 4.82 et 363 ng/ml.



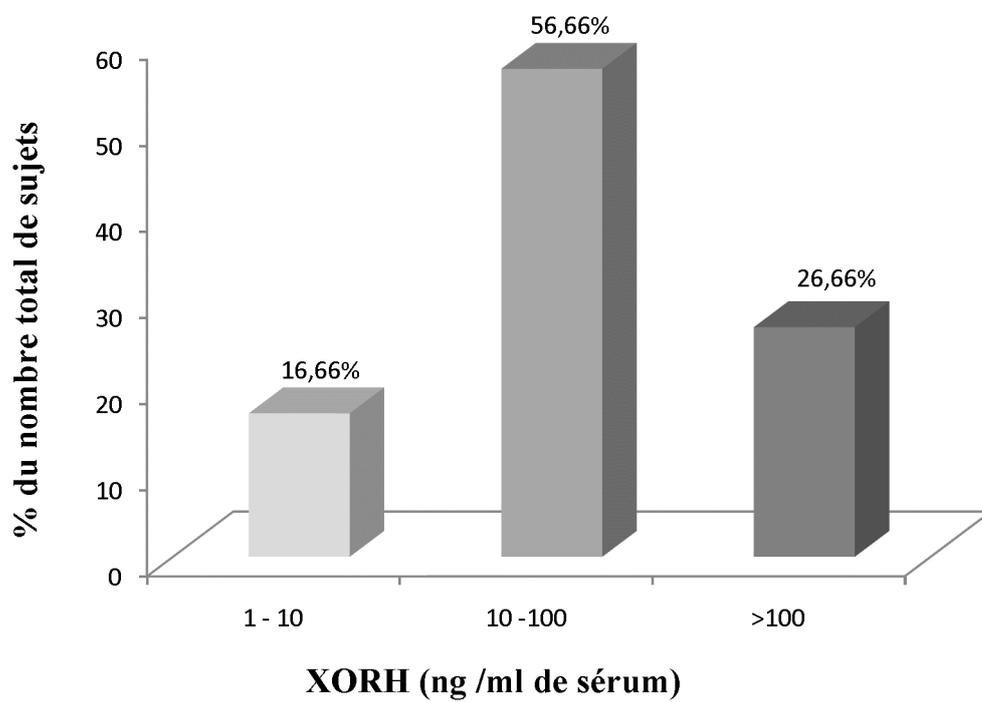


Figure 19 : Taux de la XORH dans les sérums des sujets sains (30 sujets).



III.3.2. Chez les sujets ayants des lésions hépatiques

Notre étude est faite sur les sérums de trente patients ayants des lésions hépatiques (30 sujets), les résultats de cette étude montrent des taux très élevés en XORH sérique dont la moyenne est de $(5587 \pm 5687 \text{ ng/ml})$ ce qui est très significatif ($p < 0.05$). La majorité des échantillons (16 sujets) contiennent des taux compris entre 1000 et 8680 ng/ml représentant 53.33% des sujets étudiés (**Figure 20**).

Les concentrations en XORH chez les patients étudiés concordent bien avec celles rapportés par Battelli et ses collaborateurs qui ont observés une élévation du taux de la XORH sérique dans divers pathologies hépatiques (plus de $1\mu\text{g/ml}$) (Battelli *et al.*, 2001).

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 à 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).

Les résultats préliminaires réalisés avec le Professeur Roger Harisson à l'université de Bath en Angleterre ont montrés que la XORH sérique est un paramètre meilleur pour suivre la fonction hépatique, clairement, un test convainquant pour le dosage de la XORH sérique aura plusieurs applications potentielles en clinique.



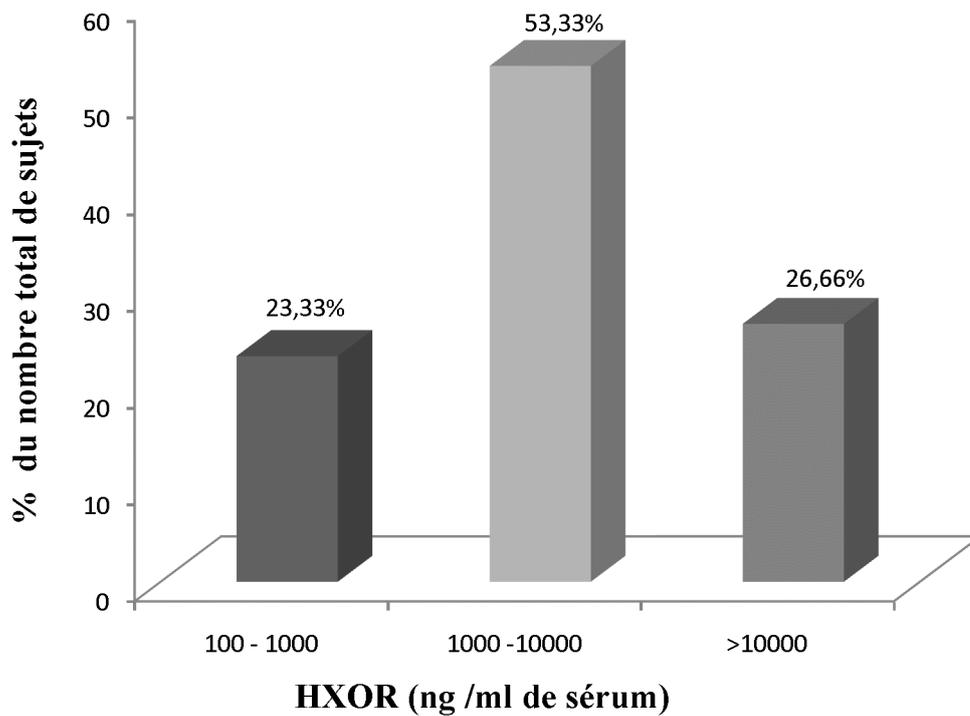


Figure 20 : Taux de la XORH dans les sérums des sujets malades (30 sujets).



Tableau V: Concentrations de XORH dans les sérums de 30 donneurs sains et atteints d'hépatites.

	<i>Sujets normaux</i>	<i>Sujets malades</i>
<i>Nombre du sujets</i>	30	30
<i>XORH (ng/ml)</i> <i>(Moyenne ± SD)</i>	91.89 ± 93.06	5587 ± 5687

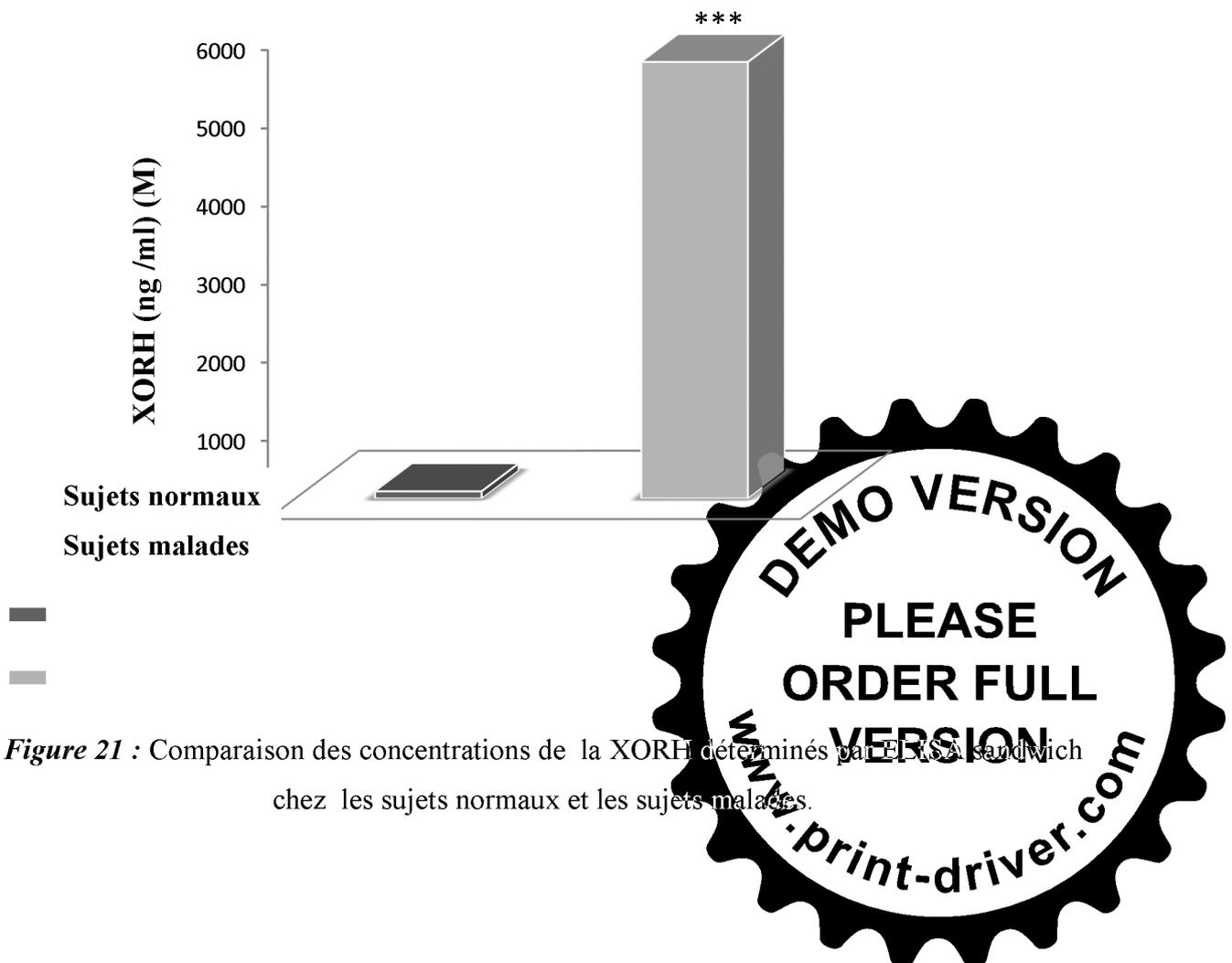


Figure 21 : Comparaison des concentrations de la XORH déterminés par ELISA sandwich chez les sujets normaux et les sujets malades.

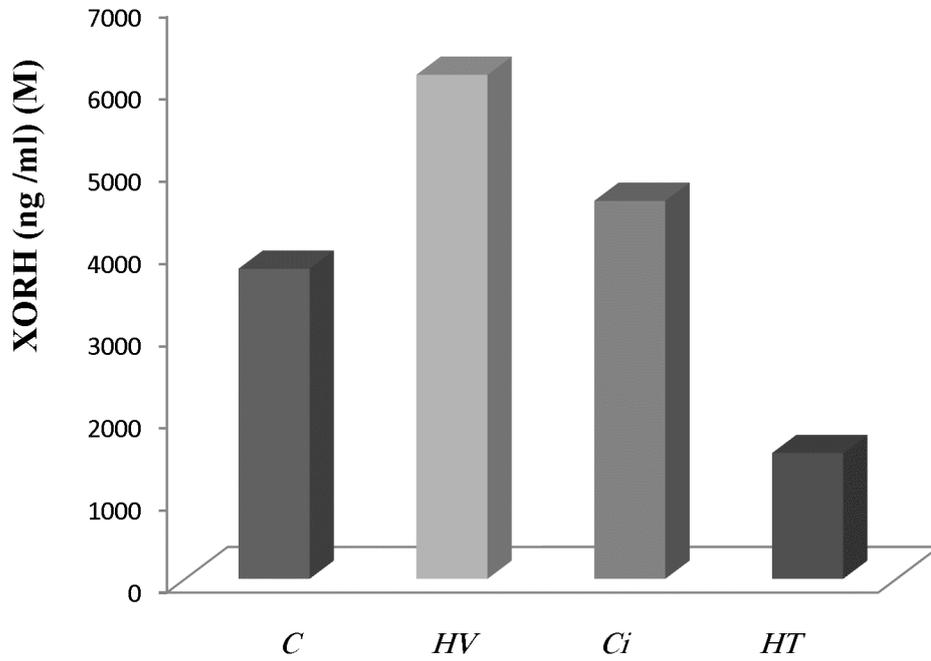


Figure 22: Taux la XORH dans les sérums des sujets malades; les cancers (C) n=6, les hépatites virales (HV) n=14, les cirrhoses (Ci) n= 6, les hépatites toxiques (HT) n= 4.



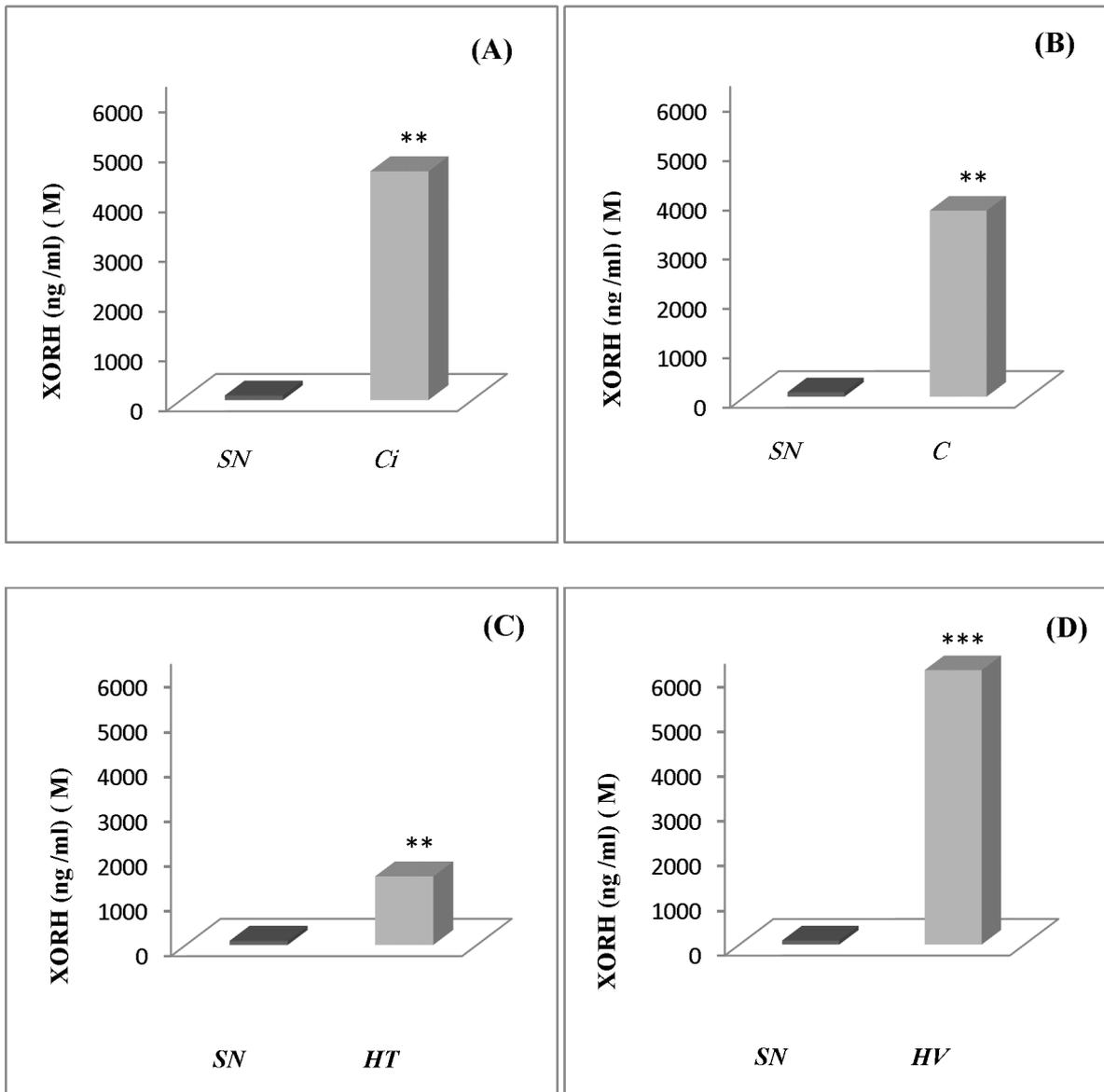


Figure 23: Comparaison des concentrations de la XORH chez les sujets normaux SN, n=30 et, (A) les cirrhoses Ci, n= 6, (B) les cancers C, n=6, (C) les hépatites toxiques HT, n= 4, (D) les hépatites virales HV (HVB ou HVC), n= 14.



Les sérums des trente sujets malades représentent quatre types de lésions hépatiques et contiennent des taux différents en XORH; pour les cirrhoses 4595 ± 4376 ng/ml (groupe 1, n=6), les cancers 3771 ± 4262 ng/ml (groupe 2, n=6), les hépatites toxiques HT 1529 ± 1713 ng/ml (groupe 3, n=4), et les hépatites virales (HVB et HVC) 6128 ± 6913 ng/ml (groupe 4, n=14) (**Figure 22, Tableau V**)

La comparaison des taux de la XORH sérique des différents groupes montrent une élévation significative ($p < 0.05$) des taux de l'enzyme pour les quatre groupes par rapport aux sérums des sujets sains (**Figure 23**). De même les taux les plus élevés ont été détectés dans les sérums des sujets ayant des hépatites virales (groupe 4, n=14).

Tableau VI: Taux de la XORH sérique dans les sérums des trente sujets représentant quatre types de lésions hépatiques.

	Sujets normaux	Groupes des malades			
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
		<i>Cirrhose</i>	<i>Cancer</i>	<i>Hépatites toxiques</i>	<i>Hépatites viral</i>
<i>Nombre</i>	30	6	6	4	14
<i>XORH (ng/ml) (M ± SD)</i>	91.89±93.06	4595 ± 4376	3771 ± 4262	1529 ± 1713	6128 ± 6913



Afin de comparer nos résultats avec les paramètres sériques de routine nous avons étudié les taux des transaminases (alanine aminotransferase, ALAT et aspartate aminotransferase, ASAT) chez les sujets ayant des lésions hépatiques.

L'étude des taux des paramètres sérique de routine ALAT et ASAT chez les trente sujets ayant des lésions hépatique montre une différence des taux entre les quatre groupe par rapport aux sujets normaux (**Tableau VI**). Cette différence est moins significative par rapport à celle présente par la XORH sérique. De même les taux les plus élevés des transaminases ont été détecté pour l'ASAT chez les sujets ayant des cirrhoses (**Figure 23**) et pour l'ALAT chez les sujets ayant des cancers (**Figure 24**) ce qui différent a ceux de la XORH sérique qui détecte les taux les plus élevés chez les hépatites virales.

D'après ces résultats, nous avons constaté que la XORH sérique est plus sensible que les paramètres sériques de routine, donc cette enzyme peut être utilisée comme un paramètre clinique pour le diagnostique des sujets ayant des différentes lésions hépatiques.

Tableau VII: Comparaison du taux de la XORH sérique et les transaminases chez trente sujets représentant quatre types de lésions hépatiques.

	<i>Normaux</i>	<i>Cirrhose</i>	<i>Cancer</i>	<i>Hépatites toxiques</i>	<i>Hépatites Virales</i>
<i>XORH sérique (ng/ml)</i>	91.89 ± 93.06	4595 ± 4376	3771 ± 4262	1529 ± 1713	6128 ± 6913
<i>ALAT (UI/l)</i>	< 35	132.4 ± 34.01	155.1 ± 71.4	105.5 ± 13.9	136.8 ± 51.06
<i>ASAT (UI/l)</i>	< 35	150 ± 34.99	114.4 ± 26.77	93.88 ± 4.22	130.0 ± 37.95



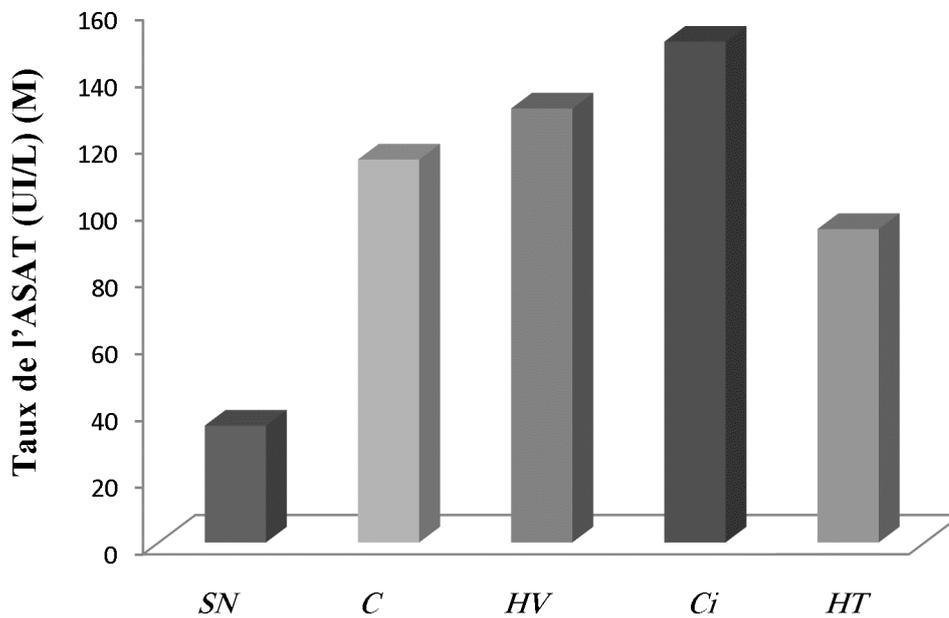


Figure 24: Comparaison du taux de l'ASAT chez les sujets normaux SN, n=30 et les cirrhoses Ci, n= 6, les cancers C, n=6, les hépatites toxiques HT, n= 4 et les hépatites virales HV (HVB ou HVC), n= 14.



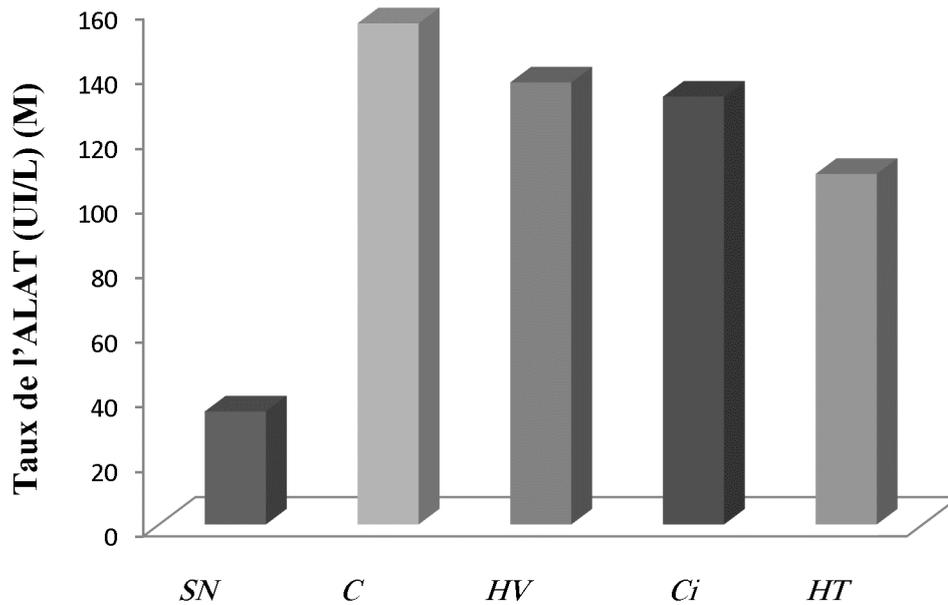


Figure 25: Comparaison du taux de l'ALAT chez les sujets normaux SN, n=30 et les cirrhoses Ci, n= 6, les cancers C, n=6, les hépatites toxiques HT, n= 4 et les hépatites virales HV (HVB ou HVC), n= 14.



III.4. Discussion générale

Dans cette étude, un test d'ELISA sandwich a été développé pour doser les taux faibles de l'enzyme xanthine oxydoréductase humaine (XORH), dans les sérums de trente sujets normaux et trente sujets ayants des lésions hépatiques. Les résultats obtenus pour les sujets sains montrent la présence de la XORH à des taux faibles (91.89 ± 93.06 ng/ml), ce qui concorde bien avec les résultats de Batteli et ses collaborateurs (2001).

Pour les sujets ayants des lésions hépatiques, notre étude est réalisée sur quatre groupes des patients qui présentent différentes lésions hépatiques; des cancers, des cirrhoses, d'hépatites toxiques et d'hépatites virales (HVB et HVC). Les concentrations de la XORH sont très élevées pour les quatre groupes par rapport aux sujets contrôles. De même les taux les plus élevés ont été détectés dans les sérums des sujets ayants des hépatites virales.

La comparaison des taux obtenus de la XORH sériques des sujets malades avec les taux des transaminases (ALAT et ASAT), sériques qui sont les paramètres de routine les plus utilisés dans les atteintes hépatiques, montre que l'augmentation des taux de la XORH sérique est plus significative que celle des transaminases chez toutes les groupes étudiés. Ceci souligne l'importance diagnostique et pronostique du taux sérique de la 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. Vu l'activité faible de cette enzyme et l'interférence des protéines sériques, l'activité de l'enzyme est difficile à détecter et nécessite des équipements de recherche.

D'après nos résultats, l'augmentation significative des taux de la XORH chez les sujets ayants des lésions hépatiques permet de considérer cette enzyme comme un paramètre biologique plus sensible que les paramètres de routine; les transaminases (ALAT, ASAT), les plus utilisés. Ces résultats concordent bien avec les résultats préliminaires réalisés avec Professeur Roger Harrison à l'université de Bath en Angleterre qui ont montré que la XORH sérique est un paramètre meilleur pour le suivi de la fonction hépatique.



La détermination de la protéine XORH sérique au lieu d'activité sérique par un test d'ELISA sandwich permettra de répondre positivement à ses préoccupations. De même, le développement d'un tel kit de dosage de la XORH est d'une importance certaine à tous les niveaux. 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 VI

Référence bibliographiques



- Abadeh, S., Killacky, J., Benboubetra, M., Harrison, R. (1992) Purification and partial characterization of xanthine oxidase from human milk. *Biochem Biophys J.* 1117: 25-32.
- Adachi, T., Fukushima, T., Usami, Y., Hirano, K. (1993) Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem J.* 289: 523-527.
- Aggarwal, R., Ranjan, P. (2004) Preventing and treating hepatitis B infection. *Bio Mol J.* 293: 1080- 1086.
- Amaya, Y., Yamazaki, K., Sato, M., Noda, K., Nishino, T., Nishino, T. (1990) Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. *Biol Chem J.* 265: 14170-14175.
- Angermuller, S., Bruder, G., Volkl, A., Wesch, H., Fahimi, H. D. (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Cell Biol Eur J.* 45: 137-144.
- Augustin, A. J., Boker, T., Blumenroder, S.H., Lutz, J., Spitznas, M. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis. *Investig. Ophthalmol. Vis Sci J.* 35: 3897-3904.
- Baghiani, A., Harrison, R., Benboubetra, M. (2003) Purification and partial characterization of camel milk xanthine oxidoreductase. *Phys Biochem Archi J.* 111: 407-414.
- Bartholomeusz, A., Schaefer, S. (2004) Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Med Virol Rev.* 14: 3-16.
- Battelli, M. G., Musiani, S., Valgimigli, M., Gramantieri, L., Tomassoni, F., Bolondi, L., Stirpe, F. (2001) Serum xanthine oxidase in human liver disease. *Am Gastroenterol J.* 96: 1194-1199.
- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R. M. (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans.* 31: 1441-1444. Review.
- Benboubetra, M. (1989) Characterization and significance of human antibodies to bovine milk fat globule membrane. Ph. D. Thesis. University of Bath. Uk.
- Benboubetra, M., Baghiani, A., Atmani, D., Harrison, R. (2004) Physicochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *Dairy Sci J.* 8: 1580-1584.
- Benboubetra, M., Gleeson, A., Harris, C. P. D., Khan, J., Arrar, L., Brennan, D., Reid, J., Reckless, J. D., Harrison, R. (1997) Circulating anti-xanthine oxidoreductase antibodies in healthy human adults. *Clin Invest Eur J.* 27: 611-619.



- Berglund, L., Rasmussen, J. T., Anderson, M. D., Rasmussen, M. S., Petersen, T. E. (1996) Purification of bovine xanthine oxidoreductase from milk fat globule membranes and cloning of complementary deoxyribonucleic acid. *Dairy Sci J.* 79: 196-204.
- Berry, C. E., Hare, J. M. (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Physiol J.* 555: 589-606.
- Bieber, J. D., Terkeltaub, R. A. (2004) Gout: on the brink of novel therapeutic options for an ancient disease. *Arthrit Rheum J.* 50: 2400-2414.
- Borges, F., Fernandes, E., Roleira, F. (2002) Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Med Chem Curr J.* 9: 195-217.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem J.* 72: 248-254.
- 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.
- 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.
- Brook, G., Clinical Effectiveness Group (2005) United Kingdom National Guideline on the Management of Viral Hepatitis A, B and C. *British Association for Sexual Health and HIV.*
- 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.
- Bruder, G., Jarasch, E. D., Heid, H. W.(1984) High concentrations of antibodies to xanthine oxidase in human and animal sera. Molecular characterization. *Clin Invest J.* 74: 783-794.
- Burdon, R. H., Gill, V. (1993) Cellular generated active oxygen species and Hella Cell proliferation. *Free Rad Res Comm.* 19: 203-213.
- Cadenas, E., Davies, J. A. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med.* 29: 222-230.



- Carden, D. L., Granger, D. N. (2000) Pathology of ischemia-reperfusion injury. *Pathol J.* 190: 255-266.
- Cazzaniga, G., Terao, M., Schiavo, P. L., Galbiati, F., Segalla, F., Seldin, M. F., Garattini, E. (1994) Chromosomal mapping, isolation, and characterization of the mouse xanthine dehydrogenase gene. *Genomics J.* 23: 390-402.
- Chambers, D. E., Parks, D. A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J. M., Yoshida, S., Parmley, L. F., Downey, J. M. (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *Mol Cell Cardiol J.* 17: 145-152.
- Da Silva, S. L., Da Silva, A., Honório, K. M., Marangoni, S., Toyama, M. H., Da Silva, A. B. F. (2004) The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Mol Structure J.* 684: 1-7.
- De Franchis, R., Hadengue, A., Lau, G., Lavanchy, D., Lok, A., Mc Intyre, N., Mele, A., Paumgartner, G., Pietrangelo, A., Rodés, J., Rosenberg, W., Valla, D. (2003) EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002 Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). *Hepatol J.* 39: 3-25.
- Della Corte, E., Stirpe, F. (1972) The regulation of rat liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J.* 126: 739 -745.
- De Jong, J. W., Vander Meer, P., Nieukoop, A. S., Huizer, T., Stroeve, R. J., Bos, E. (1990) Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ Res J.* 67: 770-773.
- Desmet, V. J., Van Eyken, P., Roskams, T. (1999) Embryology of the liver and intra hepatic biliary tract. *Clinic Hepat J.* 1: 51- 64.
- Desmeules, J., Bonnabry, P., Dayer, P. (1999) Hepatic metabolism of drugs. *Clinic Hepat J.* 1: 145-164.
- Downey, J. M., Hearse, D. J., Yellon, D. M. (1988) The role of xanthine oxidase during myocardial ischemia in several species including man. *Mol Cell Cardiol J.* 2: 55- 63.
- Dupont, G. P., Huecksteadt, T. P., Marshall, B. C., Ryan, U. S., Michael, J. R., Hoidal, J. R. (1992) Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Clin Invest J.* 89: 197- 202.



- Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T., Pai, E. F. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Pro Natl Acad Sci USA*. 97: 10723-10728.
- Favier, A. (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- Ferrari, A. M., Sgobba, M., Gamberina, M. C., Rastelli, G. (2007) Relationship between quantum-chemical descriptors of proton dissociation and experimental acidity constants of various hydroxylated coumarins. Identification of the biologically active species for xanthine oxidase inhibition. *Med Chem Euro J*. 42: 1028-1031.
- Frederiks, W. M., Vreeling-Sindelárová, H. (2002) Ultrastructural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells. *Acta Histochem*. 104: 29-37.
- Fridovich, I. (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *Biol Chem J*. 245: 4053- 4057.
- Ganem, D., Schneider, R. J. (2001) Hepadnaviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*, 4th ed., (D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds). pp: 2923-2969.
- Godber, B., Sanders, S., Harrison, R., Eisenthal, R., Bray, R. C. (1998) > or = 95% of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin. *Biochem Soc Trans J*. 25: 519.
- Godber, B. L. J., Doel, J. J., Sapkota, G. P., Blake, D. R., Stevens, C. R., Eisenthal, R., Harrison, R. (2000a) Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Biol Chem J*. 275: 7757-7763.
- Godber, B. L. J., Doel, J. J., Durgan, J., Eisenthal, R., Harrison, R. A. (2000b) new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett J*. 475: 93-96.
- Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Rao, C. V., Kumar, V., Rawat, A. K., Pushpangadan, S. (2004) Action of *Asparagus racemosus* against streptozotocin- induced oxidative stress. *Natur Prod Sci*. 10: 177-181.
- Granger, D. N., Rutili, G., McCord, J. M. (1981) Role of superoxide radical in jejunal intestinal ischemia. *Gastroenterology J*. 81: 22-29.
- Granger, D. N., Hollwarth, M. E., Parks, D. A. (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand*. 548: 47-63.



- Green, D. R., Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science J.* 281: 1309-1312.
- Harrison, R. (1997) Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. *Biochem Soc Trans Rev.* 25: 786-791.
- Harrison, R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Biol Med Free Rad.* 33: 774-797.
- Harrison, R. (2004) Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev.* 36: 363-375.
- Hashimoto, T., Fukunari, A., Yamada, I., Yanaka, N., Chen, D., Kato, N. (2005) Y-700, a novel inhibitor of xanthine oxidase, suppresses the development of colon aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69: 209-211.
- Heymann, D. L. (2004) Control of communicable diseases manual. *APHA, Washington DC.* pp: 253-261.
- Hille, R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev.* 96: 2757-2816.
- Hille, R., Massey, V. (1981a) Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *Boil Chem J.* 256: 9090-9095.
- Hille, R., Nishino, T. (1995) Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.* 9: 995-1003.
- Hoare, C. (2002) Xanthine oxidoreductase: cellular distribution and role in NO production. Ph. D. Thesis. University of Bath, UK.
- Hollinger, F.B., Liang, T. J. (2001) Hepatitis B Virus. In: *Fields Virology*, 4th ed., (D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds). *Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia.* pp: 2971-3036.
- Huang, Y. T., Ghio, A. J., Nozik-Grayck, E., Piantadosi, C. A. (2001) Vascular release of non heme iron in perfused rabbit lungs. *Am Physiol J.* 280: 474-481.
- Hunt, J., Massey, V. (1992) Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase. *Biol Chem J.* 267: 21479-21485.
- Iannacone, M., Sitia, G., Isogawa, M., Marchese, P., Castro, M., Lowenstein, P., Chisari, F., Ruggeri, Z., Guidotti, L. (2005) Les plaquettes négocient des dommages cytotoxiques de foie lymphocyte-induits par T. *Nature Med J.* 11: 1167-1169.
- Iannacone, M., Sitia, G., Ruggeri, Z. M. (2007) Pathogénie de HBV chez les modèles animaux : avancées récentes sur le rôle des plaquettes. *Hepatol J.* 46: 719-726.



- Iatropoulos, M. J. (1994) Endocrine considerations in toxicologic pathology. *Exp Toxicol Pathol J.* 45: 391- 410.
- Ichida, K., Amaya, Y., Noda, K., Minoshima, S., Hosoya, T., Sakai, O., Shimizu, N., Nishino, T. (1993) Cloning of the cDNA-encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): Structural analysis of the protein and chromosomal localization of the gene. *Gene J.* 133: 279-284.
- Ichida, K., Matsumura, T., Sakuma, R., Hosoya, T., Nishino, T. (2001) Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem Biophys Res Commun.* 282: 1194-1200.
- Ichikawa, M., Nishino, T., Nishino, T., Ichikawa, A. (1992) Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes. High resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis. *Histochem Cytochem J.* 40: 1097-1103.
- International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, (2002) Geneva, Switzerland.
- Katz, L. H., Fraser, A., Gafter-Gvili, A., Leibovici, L., Tur-Kaspa, R. (2008) Lamivudine prevents reactivation of hepatitis B and reduces mortality in immunosuppressed patients: systematic review and meta-analysis. *Viral Hepat J.* 15: 89-102.
- Kehrer, J. P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology J.* 149: 43- 50.
- Keith, T. P., Riley, M. A., Kreitman, M., Lewontin, R. C., Curtis, D., Chambers, G. (1987) Sequence of the structural gene for xanthine dehydrogenase (rosy locus) in *Drosophila melanogaster*. *Genetics J.* 116: 67-73.
- Kinugawa, S., Huang, H., Wang, Z., Kaminski, P. M., Wolin, M. S., Hintze, T. H. (2005) defect of neuronal nitric oxide synthase increases xanthine oxidase-derived superoxide anion and attenuates the control of myocardial oxygen consumption by nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res J.* 96: 355-362.
- Kooij, A., Bosch, K.S., Frederiks, W. M., Van Noorden, C. J. F. (1992) High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Archiv [B] Cell Pathology.* 62: 143-150.
- Krenitsky, T. A., Spector, T., Hall, W. W. (1986) Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys.* 247: 108-119.



- Laemmeli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature J.* 227: 680-685.
- Lavanchy, D. (2004) Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Viral Hep J.* 11: 97-107.
- Lee, C. S. D., Curtis, D., McCarron, M., Love, C., Gray, M., Bender, W., Chovnick, A. (1987) Mutations affecting expression of the rosy locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics J.* 116: 55-66.
- Leung, W. C., Chua, H., Lo, W. (2001) Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge. *Appl Biochem Biotech J.* 91: 171-184.
- 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.
- Lin, C. M., Chen, C. S., Chen, C. T., Liang, Y. C., Lin, J. K. (2002) Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 294: 167-172.
- Linder, N., Rapola, J., Raivio, K. O. (1999) Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory Invest J.* 79: 967-974.
- Lok, A. S., Heathcote, E. J., Hoofnagle, J. H. (2001) Management of hepatitis B: 2000 summary of a workshop. *Gastroenterology J.* 120: 1828-1853.
- Mahoney, F. J., Kane, M. (1999) Hepatitis B vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. Vaccines, 3rd ed. *Saunders Company, Philadelphia.* pp: 158-182.
- Main-Gauché, K., Fraser, A., Gaftner-Gvili, A., Leibovici, L., Tur-Kaspa, R. (2008) Lamivudine empêche la réactivation de l'hépatite B et réduit la mortalité immunosuppressée dans des patients : revue et méta-analyse systématiques. *Hepat viral J.* 15: 89-102.
- 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.
- Mast, E., Mahoney, F., Kane, M. A., Margolis, H. S. (2004) Hepatitis B Vaccine Plotkin S. A., Orenstein W. A., editors. *VACCINES 4th ed.* pp: 299-337.
- Masuoka, N., Kubo, I. (2004) Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochim Biophys Acta.* 1688: 245-249.
- Meffre, C., Le Strat, Y., Delarocque-Astagneau, E., Lemasson, J. M., Coste, D., Steinmetz, J., Steinmetz, D., Antona, F., Dubois, J., Warszawski, J. F., Meyer, S., Leiser, J. P., Giordanella, R.,



Gueguen, A., Landau, J. C. (2003-2004) Prevalence of hepatitis B in France, *41th EASL annual meeting*, April 26-30, 2007, Vienne, Austria.

- Meneshian, A., Bulkley, G. B. (2002) The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation J.* 9: 161-175.

- Mc Cord, J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *New Eng Med J.* 312: 159-163.

- Mc Cuskey, R. S., Sipes, I. G. (1997) Introduction to the liver and its response to toxicants. *Compreh Toxic J.* 9: 1-10.

- Mc Manaman, J. L., Palmer, C. A., Wright, R. M., Neville, M. C. (2002) Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: Evidence of a role in lipid secretion. *Physiol J.* 545: 557-569.

- Millar, T. M., Stevens, C. R., Blake, D. R. (1997) Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia. *Biochem Soc Trans J.* 25: 528.

- Moorhouse, P. C., Grootvelt, M., Halliwell, B., Quinlan, J. G., Gutteridge, M. C. J. (1987) Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *Biochem Lett Europ J.* 213: 23-28.

- Ng, Y. L. E., Lewis, W. H. P. (1994) Circulating immune complexes of xanthine oxidase in normal subjects. *Br Biomed Sci J.* 51: 124-127.

- Niederau, K., Heintges, T., Lange, S., Goldmann, G., Niederau, C. M., Mohr, L., Häussinger, G. (1996) Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Eng Med J.* 334: 1422-1427.

- Nishino, T., Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Hori, H., Matsumura, T., Eger, B. T., Pai, E. F., Nishino, T. (2005) Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *Biol Chem J.* 280: 24888-24894.

- Nishino, T., Nishino, T. (1997) The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *Biol Chem J.* 272: 29859-29864.

- Norder, H., Courouce, A. M., Coursaget, P., Echevarria, J. M., Lee, S. D., Musialwar, I. K. (2004) Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBeAg subtypes. *Intervirol J.* 47: 289-309.



- 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.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabó, C. (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev.* 58: 87-114.
- Page, S., Powell, D., Benboubetra, M., Stevens, C. R., Blake, D. R., Selase, F., Wolstenholme, A. J., Harrison, R. (1998) Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1381: 191-202.
- Parks, D. A., Granger, D. N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 548: 87-99.
- Pelkonen, O. (1994) The role of toxicokinetics in developmental toxicity testing: Lessons from comparative developmental drug metabolism. *Drug Infor J.* 28: 225-234.
- Plaa, G. L., Charbonneau, M. (2001) Detection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury. *Prin Meth Toxic J.* 4: 1145-1187.
- Poli, G., Parola, M., Leonarduzzi, G., Pinzani, M. (1993) Modulation of hepatic fibrogenesis by antioxidants. *Mol Aspects Med J.* 14: 259-264.
- Powell, D., Benboubetra, M., Newey, S., Harrison, R. (1995) Xanthine oxidase activity and subcellular localisation in human mammary epithelial cells. *Biochem Soc Trans J.* 23: 616.
- Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R. A., Parks, D. A. (1992) Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochim Biophys Acta.* 1122: 178-182.
- Rastelli, G., Costantino, L., Albasini, A. (1997) A model of the interaction of substrates and inhibitors with xanthine oxidase. *Am Chem Soc J.* 119: 3007-3016.
- Redd, J. T., Baumbach, J., Kohn, W., Omana, N., Marina, K., Ian, W. (2007) la transmission de Patient-à-patient du virus de l'hépatite B s'est associée à la chirurgie orale. *Infectent Dis J.* 195: 1311-1314.
- Riley, M. A. (1989) Nucleotide sequence of the Xdh region in *Drosophila pseudoobscura* and an analysis of the evolution of synonymous codons. *Mol Biol Evol J.* 6: 33-52.
- Rott, K. T., Agudelo, C. A. (2003) Gout. *Am Med Assoc J.* 289: 2857-2860.
- Rzucidlo, S. J., Zikakis, J. P. (1979) Correlation of dairy food intake with human antibody to bovine milk xanthine oxidase. *Proc Soc Exp Biol Med J.* 160: 477-482.



- Sanders, S., Eisenthal, R., Harrison, R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxyde anion. *Biochem Eurp J.* 245: 541-548.
- Saksela, M., Raivio, K. O. (1996) Cloning and expression *in vitro* of human xanthine deshydrogenase/oxidase. *Biochem J.* 315: 235-239.
- Saksela, M., Lapatto, R., Raivio, K. O. (1998) Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues. *Biol Neonate J.* 74: 274 -280.
- Sato, A., Nishino, T., Noda, K., Amaya, Y., Nishino, T. (1995) The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase. *Biol Chem J.* 270: 2818-2826.
- Sau, A. K., Mondal, M. S., Mitra, S. (2001) Interaction of Cu²⁺ ion with milk xanthine oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1544: 89-95.
- Stewart, R. C., Hille, R., Massey, V. (1984) Characterization of arsenite-complexed xanthine oxidase at room temperature. Spectral properties and pH-dependent redox behaviour of the molybdenum-arsenite center. *Biol Chem J.* 259: 14426-14436.
- Tan, S., Radi, R., Gaudier, F., Evans, R. A., Rivera, A., Kirk, K. A., Parks, D. A. (1993) Physiologic levels of uric acid inhibit xanthine oxidase in human plasma. *Pediatr Res J.* 34: 303-307.
- Terada, L. S., Dormish, J. J., Shanley, P. F., Leff, J. A., Anderson, B. O., Repine, J. E. (1992) Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am Physiol J.* 263: 394-401.
- 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.
- Van der Eijk, A. A., Niesters, H. G., Gotz, H. M., Janssen, H. L., Schalm, S. W., Osterhaus, A. D. (2004) Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitis B patients: implications for saliva as infectious agent. *Clin Virol J.* 2: 92-94.
- Van den Munckhof, R. J. M., Vreeling-Sindelarova, H., Schellens, J. P. M., Van Noorden, C. J. F., Frederiks, W. M. (1995) Ultrastructural localization of xanthine oxidase activity in the digestive tract of the rat. *Histochem J.* 27: 897-905.
- Vierling, J. M. (2007). "L'immunologie de l'hépatite B". *Foie Clin Dis J.* 11: 727-759.
- Vorbach, C., Scriven, A., Capecchi, M. R. (2002) The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes Dev J.* 16: 3223-3235.



- Wajner, M., Harkness, R. A. (1989) Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues. *Biochim Biophys Acta*. 991: 79-84.
- Waud, W. R., Rajagopalan, K. V. (1976b) The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch Biochem Biophys*. 172: 365-379.
- Wortmann, R. L. (2005) Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol J*. 17: 319-324.
- Wu, G. C., Zhou, W. P., Zhao, Y. R., Guo, S. H., Wang, Z. Y., Zou, S. B. (2003) The natural history of chronic hepatitis B: A retrospective study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2: 566-570.
- Yamasaki, H. (1990). Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis J*. 11: 1051-1058.
- Yasuhiro, T., Kumiko, H. A., Hideki, H., Lin, Z., Yoshinori, K., Shiro, K., Michael, A. B. (2005) Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sci J*. 76: 1835-1847.
- 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.
- Zoulim, F., Mimms, L., Floreani, M., Pichoud, C., Chemin, I., Kay, A., Vitvitski, L., Trépo, C. (1992b) New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol J*. 30: 1111-1119.
- Zuckerman, J. N. (2006) Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Curr Opin Infec Dis J*. 19: 456-459.



