



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université frères Mentouri Constantine  
Faculté des sciences de la nature et de la vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية العلوم الطبيعية و الحياة

Département de biochimie et BMC

قسم الكيمياء الحيوية

# Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de master en biochimie*

*Option: biochimie appliquée*

*Thème :*

**Effet scavenger des polyphenols sur l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ )  
produit par un système enzymatique (XOR)**

Présenté et soutenu par :

le : 17 /07/2019

- AOUATI Rayene
- KERIKA Karima

Membres de Jury :

Président du jury : Mme Madi .A      MCB      Université Mentouri Constantine 1

Promoteur : Mme Mosbah.A      MCA      Université Mentouri Constantine 1

Examinatrice :Mme Cherfia.R      MAA      Université Mentouri Constantine 1

**Année universitaire : 2018/2019**

# Remerciements

*Qu'il nous soit permis avant tout de remercier dieu le tout puissant qui nous a aidé à réaliser ce travail*

Nos remerciements et toute notre gratitude vont vers **Mme Mosbah Asma** pour avoir accepté de nous encadrer et prodiguer tous conseils, pour son temps et son attention qui nous ont permis d'appréhender le sujet de notre modeste travail.

Nos remerciements vont également vers les membres de jury :Mme Cherfia .R MAA ,université frères Mentouri Constantine 1et Mme Madi .A MCB , université frères Mentouri, Constantine 1 ;d'avoir acceptés d'évaluer et de juger ce travail.

On tient à remercier aussi **Mr Kacem Chaouech**, ainsi que tous les membres du laboratoire de mycologie, de micro-biotechnologie et de l'activité microbienne, biopôle-Chaab Eressas université frères Mentouri ; Constantine plus particulièrement les doctorantes : **Hadjer, Wiam et Maroua** .

Sans oublier nos collègues de paillasses : **Ferhane, Khaoula, Flora, Kenza et Sara**.

Nous remercions aussi **Mme Leila** de nous avoir accueillis au sein du laboratoire de BMC ainsi que **Mr Nabil** pour son accueil au niveau du laboratoire de Biochimie RDC de l'université frères Mentouri Constantine 1.

Une attention particulière à tous nos enseignants qui nous ont suivis tout au long de notre cursus.

On ne laissera pas cette occasion passer sans remercier tous les gens qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce modeste travail.

*Rayene et Karima ;*

# ***Dédicace***

Avant tout, mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

*Je dédie ce modeste travail ;*

*À mon père ;*

Ô mon soutien tout au long de ma carrière et la bougie qui allume ma voie, je t'offre le fruit de mon succès que tu as arrosé avec amour et sincérité .Merci à tes sacrifices pour que je puisse réaliser mes rêves .Que dieu te garde mon cher papa.

*À ma chère maman ;*

La cause de toutes mes réalisations, mon sourire, mon souffle et la plus belle rose dans le jardin de ma vie. je t'offre cette réussite. Que dieu te garde pour nous.

*À ma chère tante Fatiha ;*

Merci pour ton amour, ton soin, ta gentillesse et tes conseils .Je t'envoie la où tu es, cette réalisation comme titre de reconnaissance .Que dieu nous rassemble dans son paradis.

*À mes chers frères : Hamza et Zaki*

Mon support et la source de mon courage .Que dieu vous protège.

*À mes chères belles sœurs ;*

Qui me sont entourées avec leurs amour et leurs attentions. Que dieu vous protège.

*À mes adorables neveux et nièces ;*

Le plus beau cadeau que la vie me a offert .Ceux qui nous apportent la joie et le bonheur.

*À mes chères cousines Naila, Afaf et Rania ;*

*À mes chers oncles Abd el Kader et Abd el Hamide ;*

*À mes chères grandes mamans et mes chers grands pères ;*

*À mes chers oncles et chères tantes ;*

*À mes cousins et cousines ;*

*À ma chère, meilleure et adorable amie, et mon binôme :Karima ; et toute sa famille.*

*À toutes mes chères amies : Chaïma, Linda Abid Charef, Wahiba Boussaoui, Kaouther Boutiti et Rania Zamouri avec qui j'ai passé des moments inoubliables.*

*À tous mes collègues de la promotion biochimie appliquée 2019*

*À toutes les personnes que j'aime ;*

**RAYENE ;**

# **Dédicace**

*Tous d'abord je remercie notre DIEU tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*Je dédie ce travail à ma famille, **mes parent**, source de tendresse et de courage, à mon oncle **Kamel**, mes tentes et à la mémoire de mon grand-père **Ahmed** que Dieu le tout puissant vous accorde son paradis éternel (Amin).*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que je ressens envers toi, ma petite sœur **Ilhem** qui nous as apporté un bonheur depuis ta naissance. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*À mes petits anges : **Mohamed, Ali, Abd El Rahmen** et **Rahma***

*À mon adorable amie et binôme **Rayene** source de tendresse, de joie et de courage.*

*À mes amies **Linda, Wahiba, Rania, et Kaouther**, vous êtes ma deuxième famille qui a su m'apporter un soutien inestimable.*

*Merci à mes proches notamment **Hassem** pour le support, et l'encouragement.*

*Et je n'oublie pas mon jumeau **Ihab**, merci beaucoup pour ton encouragement.*

*À tous mes collègues de la promotion biochimie appliquée*

*2019*

*Karima ;*

# SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

## *Partie I: Synthèse bibliographique*

I. Xanthine oxydoréductase (XOR).....	3
I.1. Définition de la XOR .....	3
I.2. Conversion entre la XDH et la XO .....	4
I.3. Origine et structure.....	4
I.4. Distribution et localisation de la XOR .....	5
I.5. Fonctions physiologiques et physiopathologiques de la XOR.....	6
I.5.1. Rôle physiologique de la XOR.....	6
I.5.2. Rôle physiopathologique de la XOR.....	7
I.6. Inhibiteurs de la XOR .....	7
I.6.1. Inhibiteurs analogues aux substrats .....	8
I.6.1.1. Allopurinol.....	8
I.6.1.2. Febuxostat.....	8
I.6.1.3. Topiroxostat.....	9
I.6.2. Autres inhibiteurs de la XOR .....	9
I.7. Relation entre la XOR et le stress oxydant .....	9
II. Stress oxydant.....	11
II.1. Radicaux libres.....	11
II.2. Types des espèces oxydantes .....	11
II.2.1. Espèces réactives d'oxygène .....	12
II.2.1.1. Radical superoxyde $O_2^{\circ -}$ .....	12
II.2.1.2. Peroxyde d'hydrogène.....	13
II.2.1.3. Acide hypochloreux HOCl.....	13
II.2.1.4. Radical hydroxyle $HO^{\circ}$ .....	13
II.2.1.5. Radicaux peroxytes.....	13
III. Polyphénols .....	15
III. 1. Généralité.....	15

III. 2. Rôle des polyphénols.....	15
III. 3. Biosynthèse.....	16
III. 4. Familles des polyphénols.....	17
III. 4.1. Flavonoïdes .....	17
III. 4.2. Tannins.....	18
III. 4.3. Acides phénoliques .....	19
III. 4.3.a. Acides phénols dérivés de l'acide benzoïque .....	19
III. 4.3.b. Acides phénols dérivés de l'acide cinnamique .....	19
III. 5. Propriétés biologiques des polyphénols .....	19
I. Purification de la XOR bovine.....	22
I.1. Matériel et produits .....	22
I.1. 1.Réactifs .....	22
I.1.2. Appareils.....	22
I.1.3. Lait de vache.....	22
I.1.4. Solutions tampons.....	22
I.2.Méthode de purification de la XOR .....	22
I.3. Chromatographie d'affinité .....	25
I.4. Tests de pureté de la XOR.....	25
II. Dosage de l'inhibition par les polyphenols .....	26
II.1.Inhibition de la XOR avec des polyphénols .....	26
II.2. Etude de l'effet scavenger des polyphénols.....	27
<i>RESULTAS §DISCUSSION</i> .....	28
<i>CONCLUSION § PERSPECTIVES</i> .....	37
<i>ANNEXE</i> .....	39
<i>Références Bibliographiques</i> .....	44
<i>Résumés</i>	

## *Liste des Abréviations*

XOR : Xanthine Oxydoréductase  
XO : Xanthine Oxydase  
XDH : Xanthine Déshydrogénase  
HXOR : Xanthine Oxydoréductase Humaine  
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide  
Mo : Molybdène  
Mo-Co : Complexe Molybdoptérique  
AU : Acide urique  
 $O_2^{\circ-}$  : Anion superoxyde  
 $H_2O_2$  : Peroxyde d'Hydrogène  
 $OH^\circ$  : Radical Hydroxyle  
 $NO^\circ$  : Monoxyde d'azote  
ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite  
ROS / ERO : Espèces réactives d'oxygène  
RNS : Espèces réactives d'azote  
SOD : Superoxyde Dismutase  
MFGM : Milk Fat Globules Membranes  
DTT : Dithiothreitol  
BAD : Bcl2 associated death promoter  
TNF : Facteur de nécrose tumorale

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Production et métabolisme de l'acide urique.....	3
<b>Figure 2</b> : Mécanisme d'inter conversion entre la XDH et la XO.....	4
<b>Figure 3</b> : Structure de la XOR bovine.....	5
<b>Figure 4</b> : Voies de la production des espèces réactives et leurs effets pathologiques.....	10
<b>Figure 5</b> : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie De Shikimate.....	16
<b>Figure 6</b> : Squelette de base des flavonoïdes.....	17
<b>Figure 7</b> : Structures des squelettes de base des flavonoïdes.....	18
<b>Figure 8</b> : Structure de l'acide gallique et Acide p-coumarique.....	19
<b>Figure 9</b> : Centrifugation dans la présence du sodium salicylate et l'EDTA et l'obtention d'une crème en surface.....	23
<b>Figure 10</b> : Agitation de la phase aqueuse avec le butanol et le sulfate d'ammonium.....	23
<b>Figure 11</b> : Seconde agitation après l'ajout de 20% du sulfate d'ammonium.....	24
<b>Figure 12</b> : Concentration de la solution enzymatique par le PEG.....	24
<b>Figure 13</b> : Purification de la XOR par chromatographie d'affinité (0.1M et 0.4 M de NaCl).....	25
<b>Figure 14</b> : Spectre de l'absorption de la XOR-b purifiée UV visible (250-700 nm).....	29
<b>Figure 15</b> : Effet inhibiteur de l'extrait de la Quercetine sur l'activité enzymatique de la XO bovine.....	30
<b>Figure 16</b> : Effet inhibiteur de l'extrait de la Rutine sur l'activité enzymatique de la XO bovine.....	30
<b>Figure 17</b> : Effet inhibiteur de l'extrait de l'Acide gallique sur l'activité enzymatique de la XO bovine.....	30
<b>Figure 18</b> : Effet scavenger de la Rutine sur la réduction du cyt c par l'O <sub>2</sub> <sup>°-</sup> produit par la XO.....	32
<b>Figure 19</b> : Effet scavenger de l'acide gallique sur la réduction du cyt c par l'O <sub>2</sub> <sup>°-</sup> produit par la XO.....	32
<b>Figure 20</b> : Effet scavenger de la Quercetine sur la réduction du cyt c par l'O <sub>2</sub> <sup>°-</sup> produit par la XO.....	32
<b>Figure 21</b> : préparation du K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	39
<b>Figure 22</b> : Préparation du tampon Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> et sa saturation en O <sub>2</sub> .....	40
<b>Figure 23</b> : Préparation de la colonne à base du gel d'héparine.....	41
<b>Figure 24</b> : Préparation de la solution polyphénolique avec différentes concentrations.....	42

## *Liste des tableaux*

**Tableau I :** Principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques.....12

**Tableau II :** Concentrations des extraits polyphénoliques qui inhibent 50 % de l'activité de la XO.....33

**Tableau III:** Concentrations des extraits polyphénoliques qui inhibent la réduction de 50 % du cytochrome c par l' $O_2^{\circ-}$  produit par la XO.....35

# *INTRODUCTION*

# *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

La Xanthine Oxydoréductase (XOR) est une enzyme responsable du catabolisme des purines à travers le passage en hypoxanthine, xanthine en finissant par la formation de l'acide urique (Battelli *et al.*, 2014). Il a été démontré que cette enzyme peut être à l'origine de certaines maladies invalidantes et parfois incurables telles que : la goutte, problèmes rénaux et autres (Day *et al.*, 2016).

Cette enzyme est localisée principalement dans le lait et le foie (Battelli *et al.*, 2018). La présence de la XOR a été constaté dans les globules gras du lait (MFGM) présentes dans le lait de vache sous forme Oxydase (Danthine *et al.*, 1999), dont la XO est la cause majeure de cet excès via la création du stress oxydant (Nagao *et al.*, 1999). Les EROs produits au cours du fonctionnement de la XO provoquent des endommagements au niveau de l'organisme. La prise des antioxydants équilibre la balance du stress oxydatif sauf que cela peut devenir difficile dans le cas des concentrations élevées en Xanthine Oxydase (Sechi *et al.*, 2017).

Les traitements antiXOR comme l'Allopurinol et ses dérivés sont utilisés pour le blocage de l'activité enzymatique de la XOR mais ces dernières années des études ont montré leurs effets indésirables à titre d'exemple l'hypersensibilité, maladies rénales.....etc. ; lors des prises de ces médicaments à long terme (Changyi Chen *et al.*, 2016).

Aujourd'hui l'objectif recherché par tout scientifique reste la découverte de traitements moins toxiques et avec moins d'effets secondaires (l'Allopurinol ayant révélé ses limites) (Sheena N. Ramasamy *et al.*, 2013). Les recherches s'orientant désormais vers la découverte des molécules naturelles ayant un effet biologique tel que les polyphenols par l'étude de leurs taux et mode d'inhibition.

Le but de notre étude est la recherche d'une meilleure connaissance de la XOR déjà étudié par nos aînés et qui semble n'avoir pas révélé tous ses secrets.

Ce travail a été organisé en chapitres essentiels :

Le premier chapitre, consacré à l'étude bibliographique de la XOR, renferme une brève présentation de cette enzyme.

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons le stress oxydant, sa définition ainsi qu'une mise au point sur les radicaux libres.

Le troisième chapitre comporte les polyphenols.

Ensuite, un chapitre où nous exposerons les matériels et les méthodes relatives à nos travaux,

Enfin, le dernier chapitre, sera réservé aux résultats obtenus, aux discussions et interprétations concernant la teneur en composés ciblés et l'activité étudiée. Suivis par une conclusion générale.

## *Partie I : Synthèse bibliographique*

## I. Xanthine oxydoréductase (XOR)

### I.1. Définition de la XOR

La XOR est une enzyme de nature flavoenzymatique intégrant le Mo dans sa structure (Rouquette *et al.*, 1998 ; Battelli *et al.*, 2016), ce qui l'apparente au groupe des molybdènes fer-soufre flavinhydroxylases (George, 2009). L'enzyme a été identifiée la première fois par Schardinger en 1902 (Schardinger, 1902).

Il s'agit d'une enzyme qui catalyse la réaction des bases puriques (provenant des acides nucléiques dégradés) en acide urique. Cette enzyme joue un rôle dans plusieurs autres réactions comme l'oxydation des ptéridines et des pyrimidines ainsi que celle de l'hypoxanthine en xanthine (Jean Pelmont, 1997) (Figure 1).

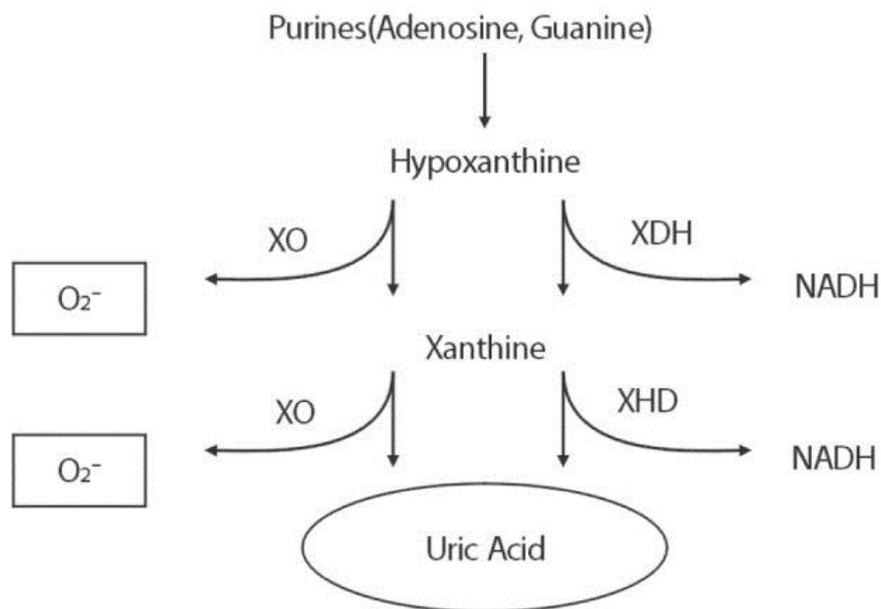


Figure 1 : Production et métabolisme de l'acide urique

( Duk-Hee Kang et Sung-Kyu Ha , 2014)

La XOR possède deux formes :

- La Xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) a un rôle réducteur du NAD et de l'O<sub>2</sub> (Berry *et al.*, 2004).
- La Xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22) dont l'O<sub>2</sub> est le capteur des électrons (Pelmont, 1997).

Généralement la XDH est la plus présente, mais dans certaines conditions qui peuvent atteindre l'organisme (ischémie ou l'hypoxie), la XDH est convertie en XO (James et Hille, 2009).

## I.2. Conversion entre la XDH et la XO

La conversion se déroule soit par protéolyse partielle (étape irréversible) ou par oxydation du groupe sulfhydrile ou enzymatique des groupes thiol (étape réversible) (Pelmont, 1997, Battelli *et al.*, 2018) (Figure 2)..

Deux étapes sont mises au point :

- Apparition rapide d'un pont disulfure initial (la forme XOR intermédiaire capable de changer les électrons avec le  $\text{NAD}^+$  et l' $\text{O}_2$ ).
- Apparition lente d'un pont disulfure secondaire.

La liaison se fait au niveau des domaines à Mo et FAD par les résidus cystéines du peptide de liaison (Pelmont, 1997)

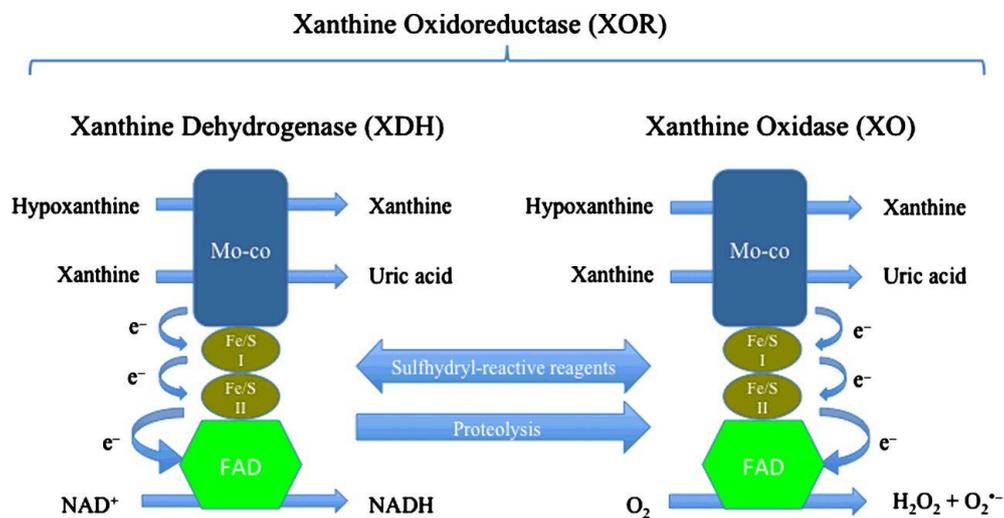


Figure 2 : le mécanisme d'inter conversion entre la XDH et la XO (Day *et al.*, 2016).

## I.3. Origine et structure

La XOR est une protéine produite au niveau cellulaire et dans le lait où elle permet la production du  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette enzyme donne au lait la propriété antibactérienne selon Reinhardt et Lippolis, 2006.

La XOR est un homodimère (300 kDa) contenant deux sous unités dont chacune contient 3 domaines reliés à un cofacteur déterminé ; le domaine extracellulaire (1-165AA) a deux centres  $\text{Fe}_2\text{-S}_2$  dont chaque sous domaine, un domaine inter membranaire (226-531AA) renfermant un centre flavinique (FAD), et un peptide C-terminale (590-1332 AA) qui contient un cofacteur Mo qui est la Molybdoptérine (Pelmont, 1997 ; Berry et Hare, 2004).

La séquence en AA du complexe molybdoptérique (MoCo) est la partie la plus réservée chez l'homme, les rats et les souris (Berry et Hare ,2004). La régulation de la sécrétion de la XO est pré et post transcriptionnelle sous l'effet de l' $H_2O_2$  et le  $Ca^{2+}$  (Hamlaoui, 2014) ( Figure 3).

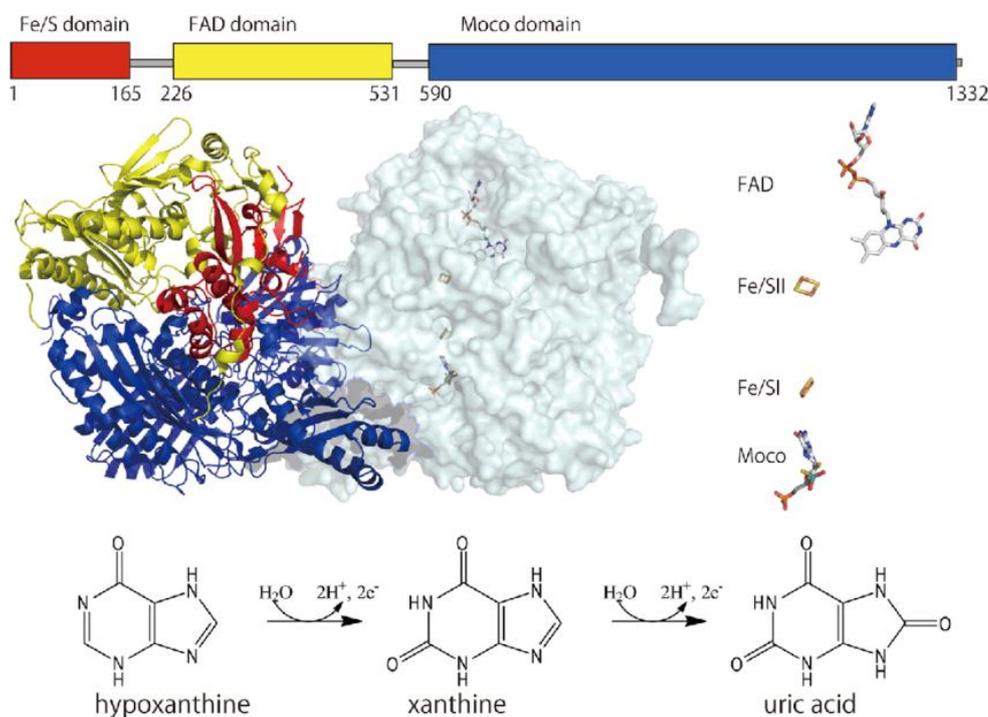


Figure 3 : Structure de la XOR bovine (Takeshi Nishino et Ken Okamoto, 2014)

#### I.4. Distribution et localisation de la XOR

La production de la XOR se fait chez les espèces procaryotes et eucaryotes d'origine animale ou végétale mais l'activité catalytique de cette enzyme est plus fréquente chez les mammifères. L'ARNm de la XOR a été identifié dans les différents types de cellules de l'organisme sauf que la transcription est élevée dans le foie et l'intestin.

L'activité enzymatique de l'enzyme est plus importante dans le sang, le lait surtout celui des bovins et dans les cellules endothéliales humaines (Maria Battelli *et al* ,2014).

Des études réalisées sur le lait ont montré la présence de la XOR au niveau des membranes cellulaires des surfaces internes sous forme de XO et de XDH qui montre une quantité considérable. La XO libre est localisé sur les surfaces externes des membranes jouant un rôle dans l'immunité innée, par contre la XOR interne exerce un effet sur les lipides (Silanikove et Shapiro, 2007).

Les recherches histochimiques post-mortem sur les tissus humains ont révélé la présence d'une haute activité enzymatique exceptionnellement au niveau de cellules sinusoidales, périportales et péricentrales hépatocytaires, ainsi qu'au jéjunum : les entérocytes, les cellules caliciformes et la lamina propria sous la membrane basale (Arnold kooij *et al.*, 1993). Dans les conditions physiologiques, les cellules hépatocytaires mortes libèrent la XOR au niveau du plasma avec des quantités infimes (Battelli *et al.*, 2018)

## **I.5.Fonctions physiologiques et physiopathologiques de la XOR**

### **I.5.1. rôle physiologique de la XOR**

La XOR a de multiples rôles au niveau de l'organisme, parmi ces derniers les réactions d'hydroxylation des purines, ptérines, azopurines, rétinol et des aldéhydes. Ainsi que la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (George et Sruthers, 2009 ; Battelli *et al.*, 2014)

L'enzyme est un agent antimicrobien contre les bactéries NO (Monoxyde d'azote) dépendantes *in vitro*, mais son rôle comme agents antimicrobien est limité *in vivo* vu l'apparition de la gastroentérite chez les enfants qui sont nourris avec le lait maternel (Berry et Hare, 2004) .Ces propriétés bactéricides font de cette enzyme une troisième ligne de défense au niveau du tube digestif (Harrison, 2002).

La XOR rentre dans la détoxification hépatique en agissant sur les xénobiotiques et elle permet la réduction de l'O<sub>2</sub>, le bleu de méthylène, NAD<sup>+</sup> et le ferricyanure (Battelli *et al.*, 2014). Parmi les fonctions de la XOR il y a la libération du fer à partir des réserves hépatiques (Topham *et al.*, 1982) ainsi que sa participation dans l'absorption intestinale sous forme de ferro-oxydase (Pelmont, 1997).

Les espèces réactives de l'O<sub>2</sub> produites par l'enzyme possèdent un rôle très important dans le déclenchement de la réaction immunitaire lors des infections et des lésions (Battelli *et al.*, 2014) autrement dit un rôle dans la traduction du signal (Finkel, 1998). La XO permet la conversion de rétinaldéhyde en acide rétinoïque jouant un rôle dans l'inhibition de l'infection virale par le contrôle de la prolifération, de la carcinogénèse et autres (Taïbi *et al.*, 2001).

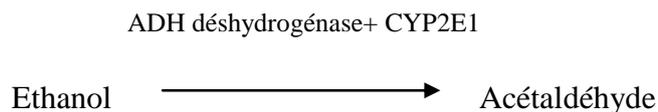
### I.5.2. rôle physiopathologique de la XOR

Les espèces réactives générées par la XOR induisent à la sortie du contenu lysosomal comme conséquence de la peroxydation lipidique par ces ERO ; ainsi que l'altération du matériel génétique et/ou proteomique. (Berry et Hare, 2004).

Toute élévation de la concentration de XOR est due à des modifications à l'échelle métabolique. Une telle augmentation peut accumuler l'acide urique provoquant par la suite des problèmes cardiovasculaires, hypertension, dérèglement du métabolisme lipidique induisant une obésité, une insulino-résistance et la déstabilisation du système immunitaire via l'activation des macrophages et des plaquettes. Ces changements amèneront à la production d'adiponectine, leptine et activation des cellules T qui activent l'IL-6, TNF (facteur de nécrose tumorale) et le NF-KB agissant à leur tour sur la voie d'IGF qui inhibe le BAD (Bcl2 associated death promoter) ce qui fait le risque d'apparition des cancers (Battelli *et al.*, 2018).

Les études réalisées sur la XDH des rats ont démontré que la diminution de cette enzyme empêche l'élimination du fer non-héminique du foie (Topham *et al.*, 1982).

L'abus de l'alcool soulève le taux des radicaux libres au niveau du foie, sous l'effet de l'éthanol qui donne le radical hydroxy-éthyl et la CYP2E1 (protéine membranaire de la famille du cytochrome). L'ADH a un rôle dans la production du NADH ce qui fait des radicaux libres sous l'influence de la XOR (Conde De La Rosa *et al.*, 2008)



Les tissus blessés tel que les maladies pulmonaires chroniques sont en exposition aux stress oxydatif relié à la haute activité de la XO vue les conditions de l'hypoxie (Heunks *et al.*, 2019).

### I.6. Inhibiteurs de la XOR

Le traitement par les inhibiteurs de la XOR est prescrit pour les patients atteints de goutte et de syndromes reliés tel que l'hypertension, atteintes rénale et autres (Day Ro *et al.*, 2016). Mais la survenue des effets indésirables des inhibiteurs analogues au substrat comme l'hypersensibilité, hépatotoxicité, toxicité nécrolyse ...etc., a poussé la société scientifique à chercher d'autres inhibiteurs avec moins de danger (Chen *et al.*, 2016).

## **I.6.1. Inhibiteurs analogues aux substrats**

### **I.6.1.1. Allopurinol**

Allopurinol, ou [1,5-dihydro-4h-pyrazolo [3,4-d] pyrimidine-4-one] (Pacher ,2006 ) est un analogue d'hypoxanthine, dirigé contre : l'arthrite gouteuse aigue, calculs néphrétiques, hyperuricémie induite par la chimiothérapie et les maladies cardiovasculaires ( Chen *et al.*, 2016). Il faut noter que l'utilisation de ce produit remonte à une quarantaine d'années (Sruthers et Shearer ,2012 ) sauf que ces dernières années des études ont démontré que cette molécule peut engendrer des dommages au niveau des reins (Nihon Rinsho,2008).

L'effet pharmacologique est établi par l'Oxypurinol (Alloxanthine) (produit de l'hydrolyse de l'Allopurinol par la XO) où l'inhibition de la XOR s'effectue lors de la liaison avec le Mo (Chen *et al.*, 2016) et non pas le site FAD (Battelli *et al.*, 2018). Il s'agit d'une inhibition compétitive lors des concentrations faibles, et non compétitive dans le cas inverse (Pacher *et al.*, 2006). La demi-vie de l'Allopurinol est moins que celle de l'Oxypurinol qui subit une réabsorption intestinale. Une autre activité de l'Allopurinol et l'Oxypurinol est détectée, il s'agit de l'effet scavenger des radicaux libres où les deux agissent comme des agents transporteurs d'électrons. Cet effet peut induire la déstabilisation des fonctions lymphocytaires (Augustin *et al.*, 1994).

En plus de l'hypersensibilité déclenchée chez certains patients sous traitement d'Allopurinol, d'autres maladies à titre d'exemple : les hépatites et l'éosinophilie peuvent créer une résistance envers ce dernier (Nguyen Thuy Duang *et al.*, 2017) vue l'activité antivirale excessive des leucocytes T. La prise d'Allopurinol en association avec les anticoagulants ainsi que la Théophylline est déconseillée en raison de leurs modifications métaboliques négatives, tel est le cas de l'azothioprine (Sylvain Saderine, 2013).

### **I.6.1.2. Febuxostat**

Un nouveau alternatif de l'Allopurinol (Day Ro *et al.*, 2016) Febuxostat ou [ 2-[3-cyano-4-(2-methylpropoxy)phenyl]-4-methylthiazole-5-carboxylic acid] (Pacher *et al.* ,2006) est un inhibiteur non purinique agissant sur le Mo des deux formes de la XOR ( Chen *et al.* ,2016). En comparaison avec l'Allopurinol, le Febuxostat agit beaucoup plus sur la XOR que sur les enzymes du métabolisme purique et pyrimidique (Becker *et al.*, 2005). La molécule a présenté une bonne biodisponibilité, moins d'effet toxicologique et une meilleure action anti-hyperuricémique (Pacher *et al.*, 2006).

Parmi tous les effets indésirables recensés, il y a lieu de souligner plus particulièrement l'hypersensibilité et l'augmentation des transaminases. Comme l'Allopurinol, la prise simultanée de la Théophylline, l'azothioprine est à éviter (Sylvain Saderine, 2013).

### **I.6.1.3. Topiroxostat**

Topiroxostat ou [4-[5-(4-pyridinyl)-1H-1, 2,4-triazol-3-yl]-2-pyridinecarbonitrile], est un nouveau inhibiteur non puranique de la XOR avec une excellente biodisponibilité mais il reste au cours des essais cliniques au Japon (Chen *et al.*, 2016).

### **I.6.2. Autres inhibiteurs de la XOR**

La XOR peut être inhibée par certains flavonoïdes provenant des plantes, ainsi que ces flavonoïdes possèdent une propriété antioxydante contre les espèces réactives dérivantes de l'activité enzymatique de la XOR (Nagao *et al.*, 1999).

La Quercetine et la Lutéoline sont des inhibiteurs compétitifs naturels (ainsi que la Silibinine qui peut jouer un rôle compétitif ou non) de la XO bovine. À l'inverse le curcuma ne possède pas cette propriété inhibitrice vue l'absence de complémentarité avec le site actif mais il reste une possibilité qu'il l'inhibe indirectement et cela nécessite d'autres études (Pauff et Hill ,2009).

L'acide folique, les dérivés du Folate et la Ptérine aldéhyde intestinale ont révélé un effet inhibiteur compétitif semblable à celui de l'Allopurinol (Granger *et al.*, 1986)

Les uricosuriques, le probénicide (inhibiteurs compétitif de l'OAT-4 bloquant la réabsorption de l'acide urique), la Benzbromarone (agit par inhibition du SLC2A9, enlevée du marché en raison de son hépatotoxicité) et le Fénofibrate et le Losartan (hypolipémiants) sont des médicaments prescrits lors de l'intolérance vers les inhibiteurs de la XO agissant comme des agents régulateurs de l'uricémie (Sylvain Saderine ,2013).

## **I.7. Relation entre la XOR et le stress oxydant**

L'activité oxydase de la XO stimule la production de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ces deux espèces réactives partagent avec les métaux de transition les électrons célibataires induisant à la réaction de Haber Weiss et celle de Fenton (Battelli *et al.*, 2018). Le produit de ces deux réactions est le radical hydroxyle OH<sup>•</sup> ayant un pouvoir perturbant et toxique (Figure 4)..

Le NADH, produit de la réduction de la XOR peut participer à la production des espèces réactives à travers la réduction mono électrique de l'O<sub>2</sub> (Migdal et Serres, 2011).

En plus l'activité du nitrite réductase de la XOR donne naissance aux espèces réactives du nitrate (RNS) et d'oxygène (ROS) (Battelli *et al.*, 2018). Les sous-produits de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (OH<sup>•</sup>, peroxynitrite...etc.) ont un effet radical sur toute cible rencontrée (Berry et Hare, 2004).

Le blocage de l'activité de la XO par l'allopurinol diminue d'une manière intéressante la peroxydation lipidique et l'oxydation du glutathion, ainsi l'augmentation des produits de dégradation de l'ATP comme l'hypoxanthine et l'O<sub>2</sub> (Heunks *et al.*, 2019).

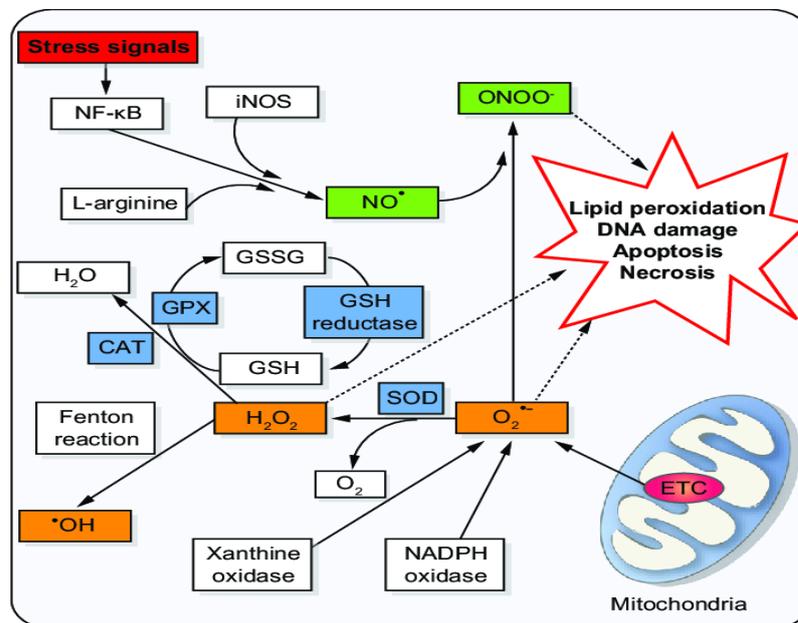


Figure 4 : Voies de la production des espèces réactives et leurs effets pathologiques (Claudio Tiribelli, 2012)

## II. Stress oxydant

Généralement les réactions d'oxydoréduction font intervenir des intermédiaires radicalaires. Ces réactions se retrouvent au sein du milieu vivant et peuvent contrôler des processus importants tels que le vieillissement, la mutagenèse, la défense contre les maladies et dans certaines pathologies (Bouguerne, 2012).

### II.1.Radicaux libres

Pour bien expliquer le processus de vieillissement, les chercheurs Gerschman et Hartman avaient évoqué la toxicité de l'oxygène et la "Free radical theory"(Haleng *et al*, 2007). En 1960, les deux chercheurs Américains, McCord et Fridovich, donnent naissance à la biochimie des radicaux libres, par la découverte de la sécrétion de l'anion superoxyde en milieu vivant. Ces même chercheurs en 1969, découvrent un système antioxydant, à partir de globules rouges humains, c'est le superoxyde dismutase (SOD), qui a la capacité d'éliminer l'anion superoxyde (Haleng *et al.*, 2007 ; Houee *et al.*, 2005).

Par définition, un radical libre est un composé chimique qui se caractérise par la présence d'un électron célibataire sur leur couche périphérique. Il est instable et a une très courte durée de vie (de l'ordre d'un micro à nano-seconde)(Bouguerne, 2012) (Tableau 1).

Les radicaux libres possèdent un fort degré de réactivité, donc ils sont nuisibles et peuvent causer des potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Harman et Agning, 1956).

### II.2.Types des espèces oxydantes

Les espèces réactives de l'oxygène(EROs) sont des molécules impliquées dans les processus pathologiques tels que les cancers et les maladies neuroaux-dégénératives(Halliwell, 1994).

Des études récentes montrent que les EROs agissent comme des molécules de signalisation à l'échelle cellulaire. Ils ont la capacité des facteurs de transcription pour la régulation des fonctions cellulaires dans des conditions physiologiques(Abat *et al.*,1990 ; Dalton *et al*, 1999; Morel et Barouki, 1999). Il n'y a pas une corrélation stricte entre la toxicité des espèces réactives de l'oxygène EROs et leurs réactivités; dans plusieurs cas, des espèces peu réactives peuvent causer une grande toxicité en raison de leur longue demi-vie

qui leur permet de diffuser et causer des dégâts et des dommages à longue distance de leurs lieux de production (Kohen et Nyska, 2002)

Tableau 1. Les principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003)

Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	$OH\bullet$
Monoxyde d'azote	$NO\bullet$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulet	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO$
Radical alcoxy	$RO^-$
Radical peroxy	$ROO$

## II.2.1. Espèces réactives d'oxygène

### II.2.1.1. Radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$

L'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  est un radical de type primaire, formé par l'acquisition d'un électron et de l'oxygène moléculaire. Il est le radical le moins réactif par rapport aux autres radicaux libres, il est régénéré par plusieurs sources différentes selon les conditions physiologiques dont la mitochondrie est sa source principale (Gardes-Albert *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2009)

L'anion superoxyde ainsi a une forte réactivité avec les métaux de transition tels que le fer, le cuivre et le manganèse (Abreu *et al.*, 2010).



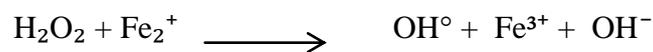
Au cours de l'inflammation, l'anion superoxyde neutralise le peroxyde d'hydrogène ou l'acide hypochloreux (Ames *et al.*, 1993), nécessitant l'activation de l'enzyme NADPH oxydase induisant le relargage de grandes quantités d'EROs. La production continue de l' $O_2^{\bullet-}$

au cours du processus inflammatoire peut conduire à des atteintes tissulaires (Kruidenier *et al.*,2002).

### II.2.1.2. Peroxyde d'hydrogène

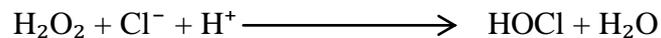
Le peroxyde d'hydrogène peut traverser facilement les membranes cellulaires car il n'est pas une espèce radicalaire ou chargée. Il fonctionne dans plusieurs et différents compartiments et notamment le noyau, ce qui le rend un ERO toxique.(Barouki, 2006)

Grace à son pouvoir réducteur, il peut réduire le radical hydroxyle HO° par la réaction de Fenton, donc il peut causer des dommages cellulaires(Wardman *et al.*,1996).



### II.2.1.3.Acide hypochloreux HOCl

L'acide hypochloreux, comme le peroxyde d'hydrogène, n'est pas une espèce radicalaire chargée. Au cours du processus inflammatoire, la transformation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux sous l'influence de l'enzyme myeloperoxydase est élevée (Deby-Dupont *et al.*, 1999). L'acide hypochloreux est considéré comme un oxydant fort:



### II.2.1.4. Radical hydroxyle HO°

Le radical hydroxyle se produit, soit par l'interaction entre l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux , soit entre l'acide hypochloreux et les ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>), ou entre le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote (Kruidenier *et al.*,2002), selon différentes réactions :

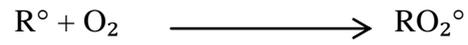
- A partir du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton
- A partir de l'anion superoxyde selon la réaction d'Haber-Weiss



Le radical hydroxyle c'est le radical le plus réactif qui peut causer des atteintes oxydatives de l'ADN (Lubec, 1996).

### II.2.1.5. Radicaux peroxydes

Ces radicaux sont des EROs de type secondaires, issus de l'addition de l'oxygène sur un des carbones des radicaux centres (R°).



Ils possèdent plusieurs et différentes caractéristiques tels que : le transfert de charge (arrachement d'un électron) ou d'un atome d'hydrogène(arrachement d'un atome H), l'addition sur les doubles liaisons (réactions intramoléculaires ou intermoléculaires) et formation d'endoperoxydes radicalaires ROOR°(Gardes-Albert *et al.*,2005).

### III. Polyphénols

#### III. 1. Généralité

La plante doit s'adapter et faire face à plusieurs agressions environnementales pour assurer sa survie. En parallèle, la plante développe un système de défense : les métabolites secondaires (Zerargui, 2015).

Les polyphénols végétaux sont des métabolites secondaires qui attirent l'attention en raison de leurs propriétés antioxydants (Babar *et al.*, 2007 ; Li *et al.* 2014 ). Actuellement, il y a plus de 8000 composés phénoliques qui ont été isolés et identifiés (Monpon *et al.*, 1998). Ces espèces peuvent être des monomères, des polymères ou des complexes avec une masse moléculaire qui peut atteindre 9000 (Harbone, 1993).

Les polyphénols se trouvent généralement partout: dans les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les légumes, les fruits, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits) ; sachant que la moitié de notre apport en polyphénols est apportée par les fruits et les légumes, le reste par les boissons surtout le café (Middleton *et al.*, 2000). Ces composés se divisent en une dizaine de classes qui présentent toutes dans leurs structures d'au moins un cycle aromatique(6 carbones) porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hannebelle *et al.*, 2004).

#### III. 2. Rôle des polyphénols

Les études des dernières années démontrent que le rôle des composés phénoliques n'est pas seulement un rôle métabolique, ils ont constatées qu'il y a une accumulation des composés phénoliques dans les tissus des végétaux infectés suite à une blessure par les facteurs environnementaux (Brzozowska *et al.*, 1973) et en cas d'une carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre (Loche, 1996). Alors que les anciennes recherches (Nitsch et Nitsch, 1961 ; Alibert *et al.*, 1977) ont montré que les polyphénols ont un rôle dans les processus physiologiques des végétaux tels que : la croissance cellulaire, la différenciation organogène, fluorisation... et aussi sont connus comme des facteurs de protection contre les rayonnements UV. Ils ont des propriétés antifongiques et antibactériennes (Heimeur *et al.*, 2004) ; et interviennent dans la qualité alimentaire des fruits comme la couleur (anthocyanes) ; la saveur sucrée(flavonones) ; la sensation d'astringence(tannins) ...etc.(Dubois *et al.*, 1997).

Les polyphénols agissent avec différentes façons dans la régulation du stress oxydant: soit par la capture des radicaux hydroxyles, superoxydes et nitrites(Li *et al.*, 2014) ; soit par la chélation des métaux(le fer, le cuivre)(Yang *et al.*, 2012) ; soit par l'inhibition de l'activité de la XO (Li *et al.*, 2014).

### III. 3. Biosynthèse

La biosynthèse des composés phénoliques est réalisée par la voie de Shikimate qui conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques(Phénylalanine et Tyrosine) ; puis la désamination de ces derniers aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, et coumarines (Bruneton, 1993) (Figure 5)..

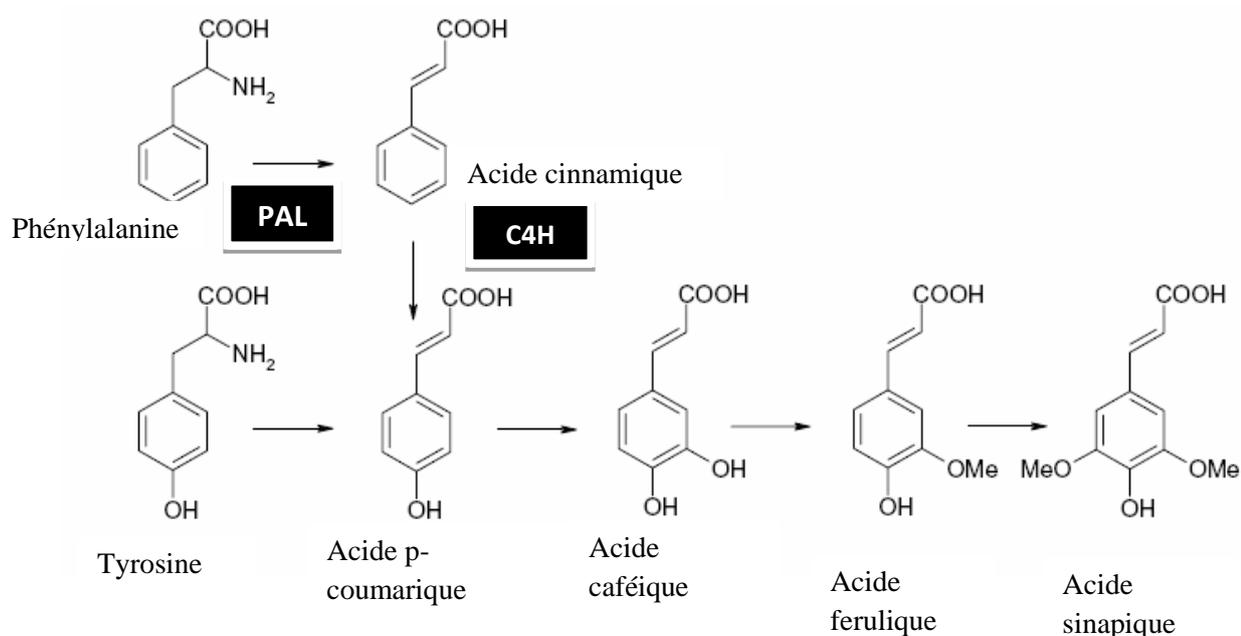


Figure 5 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de Shikimate (Crozier *et al.*, 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate4-hydroxylase

### III. 4. Familles des polyphénols

#### III. 4.1. Flavonoïdes

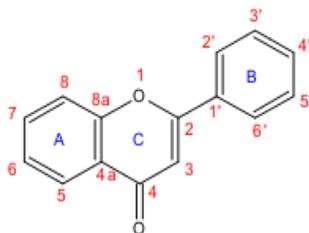


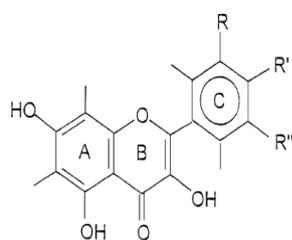
Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes  
(Belyagoubi Née Benhammou, 2011)

Les fl:

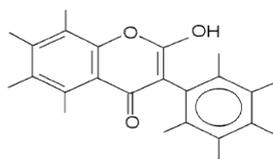
responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Mukohata *et al.*, 1978 ; Egert et Rimbach, 2011). Elles se trouvent dans les légumes, les fruits, les graines, les boissons et le thé...etc. (Tsimogionnins et oreopoulou, 2006).

Les flavonoïdes participent dans la photosynthèse (Mukohata *et al.*, 1978) ; dans la régulation de gènes et dans la croissance cellulaire (Havsteen, 2002).

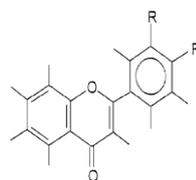
À l'heure actuelle, plus de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grunhage, 2003), avec une structure de base à 15 atomes de carbones sous la forme C6-C3-C6 (Yao *et al.*, 2004) ; arrangés en 3 cycles – à l'exception des chalcones (ouverture du cycle B): 2 cycles benzoïques A et B et un hétérocycle C (Shankari *et al.*, 2014) (Figure 6). En basant sur leurs structures, les flavonoïdes se divisent en plusieurs classes: anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes, isoflavanes ; flavanoles ; isoflavanoles ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes (Cani *et al.*, 2007) (Figure 7).



Flavonoles



Isoflavonoles



Flavones

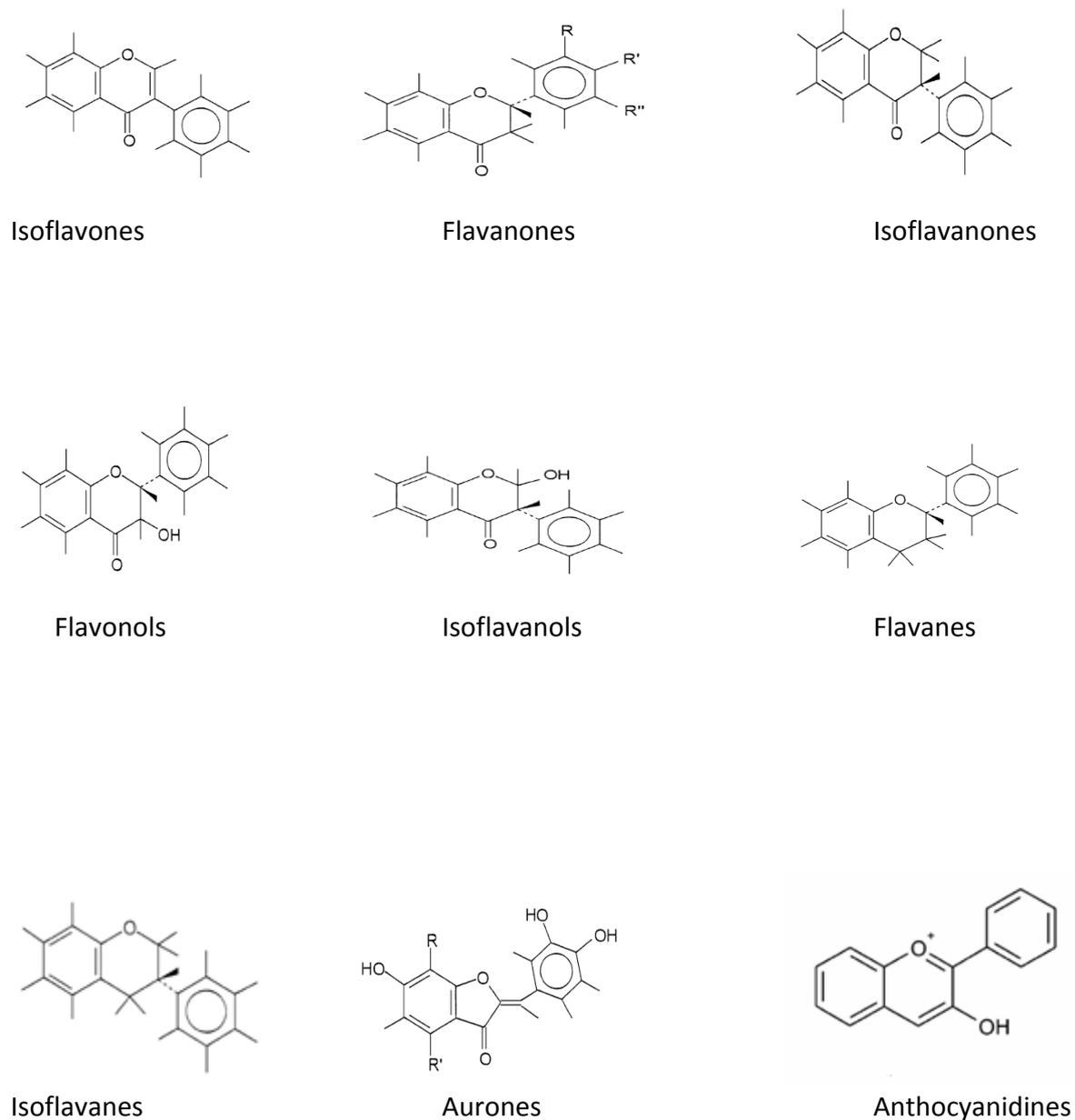


Figure 7 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002)

### III. 4.2. Tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires qui se trouvent dans presque toutes les parties de la plante (Redondo *et al.*, 2014). Ce sont des polymères phénoliques, peuvent formés des complexes avec les polysaccharides et les protéines par des liaisons hydrogènes et hydrophobes (Okuda et Ito, 2011).

Les tannins se caractérisent par une saveur astringente (Scalbert, 1991), et par plusieurs activités biologiques telles l'activité antioxydante, anti-tumorale, antivirales et antifongique (Lamy *et al.*, 2014).

### III. 4.3. Les acides phénoliques

Ce genre de polyphénols se trouve dans certaines plantes agricoles et médicinales (Psotova *et al.*, 2003). Ces composés peuvent être divisés en 2 classes principales:

#### III. 4.3.a. Acides phénols dérivés de l'acide benzoïque

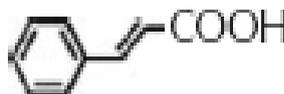
Sous la forme C6-C1, sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque tel l'acide gallique qui est l'élément constitutif des tannins hydrolysables ; et l'acide vanillique qui est très utilisé dans le domaine pharmaceutique (Bruneton, 1993).

#### III. 4.3.b. Acides phénols dérivés de l'acide cinnamique

Sous la forme C6-C3 tels l'acides  $\rho$ -coumarique, caféique, ferulique et sinapique (Bruneton, 1993) (Figure 8).



Acide gallique



Acide  $\rho$ -coumarique

Figure 8 : Structure de l'acide gallique et Acide  $\rho$ -coumarique (Bruneton, 1993)

### III. 5. Les propriétés biologiques des polyphénols

Les études montrent que les polyphénols et notamment les flavonoïdes présentent des divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-thermogéniques, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales, antibactériennes, anti carcinogènes, anti-thrombiques, hépatoprotectives, cardioprotectives et vasodilatoires (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007).

Les polyphénols intéressent particulièrement deux domaines: la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). Les industriels maintenant commercialisent des suppléments alimentaires enrichis en polyphénols pour assurer une meilleure conservation des denrées alimentaires et aussi pour empêcher la peroxydation lipidique et la formation des LDL oxydés grâce à leurs propriétés antioxydants (Hannebelle *et al.*, 2004 ; Oskatabe *et al.*, 2001 ; Schroeter *et al.*, 2002 ; Valko *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2009 ; Yoshihara *et al.*, 2010).

Dans le domaine de cosmétique, les polyphénols sont utilisés pour lutter contre la formation des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, chaque classe est utilisée pour leurs propres bénéfices spécifiques (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres) (Hannebelle *et al.*, 2004).

Les flavonoïdes jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxigénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (Quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Anderson *et al.*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004).

Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire ; aussi comme diurétiques, et même antiseptiques urinaires (Hennebelle *et al.*, 2004).

Les tanins sont des substances vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (Hennebelle *et al.*, 2004).

Les acides phénoliques tel l'acide caféique qui est très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999). Alors, l'acide gallique a le pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuses du poumon (Kawada *et al.*, 2001 ; Rangkadilok *et al.*, 2007). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire (Lee *et al.*, 2005).

## *Partie II : Partie pratique*

## **I. Purification de la XOR bovine**

### **I.1. Matériel et produits**

#### **I.1.1. Réactifs**

Les produits : Xanthine, NAD, NADH, Quercetine, Rutine et l'Acide gallique proviennent de la firme Sigma.

#### **I.1.2. Appareils**

- La centrifugeuse utilisée est de la marque Sigma K-15
- Le spectrophotomètre UV-1280, Shimadzu.
- L'ultracentrifugeuse sigma 3k30

#### **I.1.3. Lait de vache**

Le lait de vache provient de la collecte de 3 fermes situées dans la commune de Hamma Bouziane, la vente au détail est assurée par la laiterie El-Feth , Bellevue. L'achat du lait se fait quotidiennement afin de s'assurer de la qualité du produit .La conservation du lait au froid est systématique.

#### **I.1.4. Solutions tampons**

La méthode de préparation des solutions d'extraction de l'enzyme a été décrite d'une manière détaillée au niveau de l'Annexe.

### **I.2. Méthode de purification de la XOR**

La purification de l'enzyme est faite à partir du lait de vache durant la période allant du 23 avril au 31 mai 2019. Nous avons opté pour ce produit vu sa richesse en globules gras du lait (MFGM) qui, selon Reinhardt et Lippolis (2006), constituent un pool de protéines soit intra globulaires ou couplées à ces membranes, parmi lesquelles la xanthine oxydoréductase ayant des fonctions métaboliques.

La première étape consiste à obtenir une crème à partir du lait, celle-ci est destinée à être utilisée en deuxième étape. Pour ce faire, le lait (1L) est versé dans un bécher auquel on ajoute le sodium salicylate (0.299g) et l'EDTA (0.292g). La préparation est centrifugée par une centrifugation (3000 g/30min) (Figure 9).

Après la récupération de la crème qui se forme à la surface des tubes, un agent tampon  $K_2HPO_4$  est ajouté (0.2M) selon le volume de la crème (V/V). Une agitation douce (30-60min,  $4^\circ C$ ) suivi d'une centrifugation (6000g/30min) ont été effectuées.

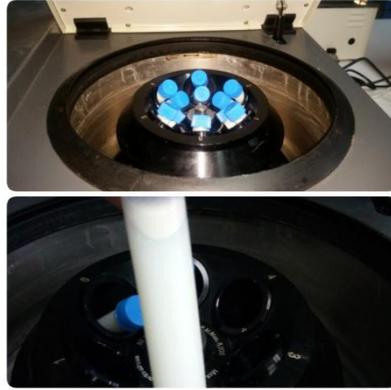


Figure 9 : Centrifugation dans la présence du sodium salicylate et l'EDTA et l'obtention d'une crème en surface

Ensuite, le butanol frais (15% V/V) et le sulfate d'ammonium 15% (P/V) sont ajoutés à la phase aqueuse filtrée à travers la laine de verre et le mélange soumet à une agitation douce 60 min puis centrifuger à 10000g/20min (Figure 10)

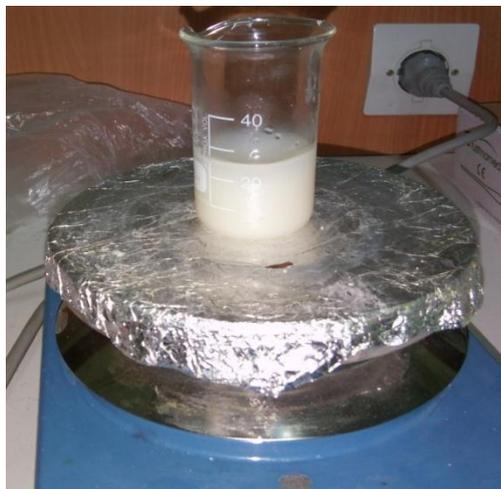


Figure 10: Agitation de la phase aqueuse avec le butanol et le sulfate d'ammonium

La phase qui se forme en premier au-dessus du surnageant représente l'excès en butanol et, doit être éliminée délicatement par une micropipette. Une seconde filtration à travers la laine de verre a eu lieu à laquelle on ajoute du sulfate d'ammonium (20% P/V) puis on

soumet le mélange à une agitation douce (1h) suivi d'une centrifugation (11000g/1h) (Figure 11).



Figure11 : Seconde agitation après l'ajout de 20% du sulfate d'ammonium

Après la centrifugation, un culot brunâtre est observé au fond du tube, récupéré et dissout dans 2-3 ml du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH= 6.53), puis versé dans une membrane de dialyse et trempée dans 1.5 L du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  avec agitation douce durant une nuit dans un endroit froid. Une ultracentrifugation (15000 g/30 mn) est effectuée le lendemain (au moyen de l'ultracentrifugeuse sigma 3k30) pour l'obtention de la solution enzymatique brute. L'excès de l'eau est éliminé par la mise du boudin de dialyse contenant la solution de la XOR en contact avec le polyéthylène glycol (PEG) pendant quelques minutes (Figure 12).



Figure12: Concentration de la solution enzymatique par le PEG

La XOR est récupérée dans des Eppendorf et est conservée à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation.

### I.3. Chromatographie d'affinité

Le but de cette étape est l'élimination des débris restants. L'extrait brut obtenu est déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'héparine équilibré et lavé par le tampon héparine. La colonne est ensuite lavée par le même tampon renfermant 0.1 M de NaCl. L'obtention d'une phase avec une coloration jaune signifie que l'enzyme est retenue par la phase stationnaire. La XOR est récupérée de la colonne par le tampon héparine contenant 0.2 M de NaCl et dialysée contre un tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, pH 8.3, pendant une nuit. Enfin, l'enzyme est répartie en aliquotes de 0.5 ml et conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation. On rééquilibre la colonne par l'ajout du tampon eu égard aux conditions du milieu (0.4 M de NaCl) qui peuvent conduire à l'élimination rapide de l'enzyme rajoutée à nouveau (Figure 13).

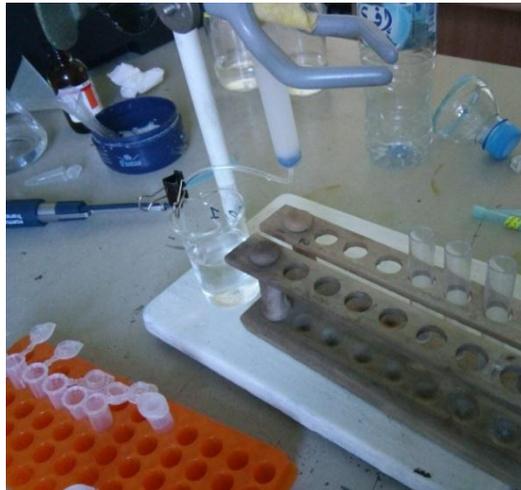


Figure 13: Purification de la XOR par chromatographie d'affinité (0.1M et 0.4 M de NaCl)

### I.4. Tests de pureté de la XOR

La pureté de l'enzyme purifiée est estimée par le rapport protéine /flavine (RPF), correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm ( $A_{280\text{nm}} / A_{450\text{nm}}$ ) (Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau, Techcomp). Une valeur proche de 5 est un bon signe de pureté (Bray, 1975).

## II. Dosage de l'inhibition par les polyphénols

### II.1. Inhibition de la XOR avec des polyphénols

Le dosage du taux de l'inhibition de la XOR par les différents polyphénols préparés : Quercétine, Rutine, Acide gallique, a été exécutée selon la méthode de Boumerfeg *et al.*, 2009, adaptée aux besoins de nos tests.

L'activité inhibitrice de la XOR a été réalisée par la méthode spectrophotométrique, à la suite de production de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  à 295 nm (Boumerfeg *et al.*, 2009). Le milieu réactionnel constitue de 400  $\mu$ l de 50mM tampon phosphate saturé en air ( $Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4$ , pH 7,4 et contenant 0,1 mM EDTA), 50  $\mu$ l de xanthine 0,1 mM (pH 7,4), 25  $\mu$ l de concentration correspondante de chaque extrait dilué dans du tampon de phosphate, et 20  $\mu$ l de solution d'enzyme. La réaction est initiée par l'addition d'enzyme et l'inhibition a été évaluée après 1 min de réaction. Le produit de cette réaction est mesuré à 295 nm avec un spectrophotomètre SHIMADZU UV-1280.

Pour chaque concentration, l'absorbance est mesurée 3 fois afin de s'assurer de l'exactitude des résultats. À cet effet une moyenne d'absorbance est calculée pour tracer le graphe.

L'inhibition de XOR a été calculée comme suit:

$$\% \text{ d'inhibition} = (Ac - Ae / Ac) \times 100$$

Ac: activité de la XOR sans extraits, et Ae: activité de la XOR en présence de l'extrait. Les résultats ont été exprimés en concentration d'extrait inhibant 50% de l'activité enzymatique ( $IC_{50}$ ).

## II.2. Etude de l'effet scavenger des polyphénols

Le protocole de travail a été inspiré de Fridovich 1986, Les différents tests sont réalisés dans un même volume final de 0.5 ml. Pour chaque substance différentes concentrations ont été utilisées. Les tubes sont conservés dans la glace. Le mélange réactionnel contient 50  $\mu\text{L}$  d'une solution 1 mM de la xanthine, 50 $\mu\text{L}$  d'une solution de 0,25 mM de Cytochrome C, et 300  $\mu\text{L}$  d'une solution 50mM de tampon phosphate. Bien homogénéiser avant d'ajouter le polyphenol à étudier. Finalement on ajoute 50 $\mu\text{L}$  de la solution de XOR et on suit le changement d'absorbance à 550 nm. Le pourcentage des radicaux  $\text{O}_2^{\bullet-}$  captés est déterminé par la relation suivante :

$$\% \text{O}_2^{\bullet-} \text{ capté} = ((A^\circ - A) / A^\circ) \times 100$$

$A^\circ$  = absorbance obtenue pour le témoin.

$A$  = absorbance obtenue pour une concentration donnée de substance à tester.

# *RESULTAS §DISCUSSION*

## I. Purification de la XO

Obtention de la XO purifiée à partir des MFGM contenu dans le lait bovin qui présentent une diversité protéique avec des fonctions multiples telles : l'immunité, transport, métabolisme...etc. (Reinhardt et Lippolis ,2006) est réalisée par Une succession des étapes d'agitations et de centrifugations dans la présence des produits (Sodium Salicylate, butanol, sulfate d'ammonium ...etc. ) ont permis la sortie de la XO à partir des globules du lait, sa condensation et sa précipitation. ;ainsi que l'élimination des molécules indésirables comme les sels minéraux et les métaux par la dialyse, suivi d'une chromatographie d'affinité sur colonne contenant du gel héparine dont la XO forme des liaisons avec l'héparine plus spécifiquement au niveau des résidus Lysine et Arginine selon une étude réalisée par Fukushima *et al.* ,1995.

Le rendement obtenu de la purification de la XO à partir de lait bovin est de 15 mg de XO purifiée à partir de 1L du lait (n= 4). Ce rendement est comparable à ceux rapportés par d'autres auteurs pour l'enzyme bovine (Hunt et Massey, 1992). De ce fait l'addition de DTT ( Dithiothreitol) (5mM) a un effet sur la libération de l'enzyme des globules gras et elle a été utilisé lors de la purification.

## II .Test de la pureté de la XO

Le spectre d'absorption caractéristique de la XO (UV-Vis) a présenté trois pics majeurs à 280, 325 et 450 nm (Figure 14) 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 bovin varie entre 4.95 et 5.26 ( $5.10 \pm 0.22$ ). Un RPF proche de 5 est utilisé comme critère de pureté de l'enzyme (Bray, 1975).

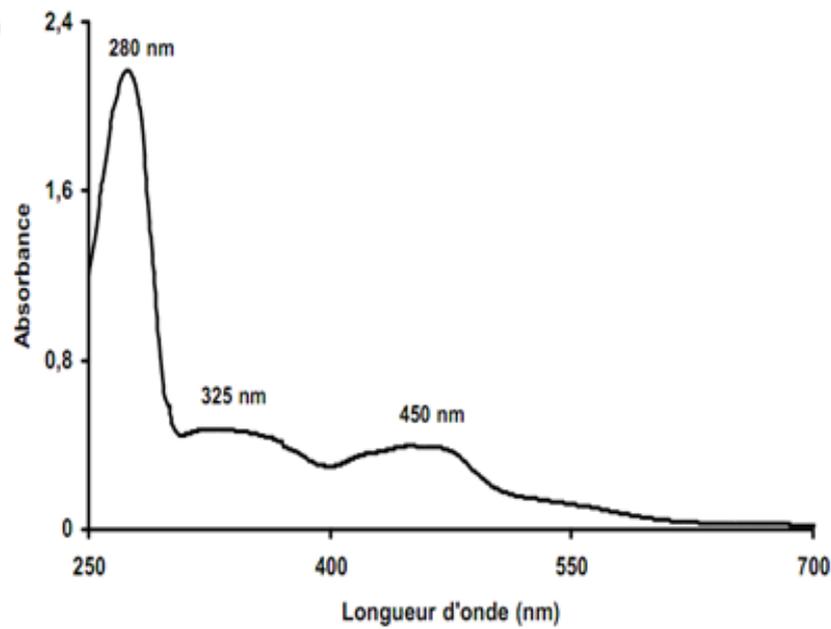


Figure 14 : Spectre d'absorption de la XOR-b purifiée UV-Visible (250-700nm)

### III. Effet inhibiteur de l'activité enzymatique de la XO par les polyphénols :

L'étude de l'effet inhibiteur des solutions polyphénoliques contre l'activité de la XO bovine a été calculée par spectrophotométrie à 295nm. D'après les résultats obtenus, les extraits testés inhibent l'activité de la xanthine oxydase significativement d'une manière dose dépendante comme le montre les figures (15,16,17)

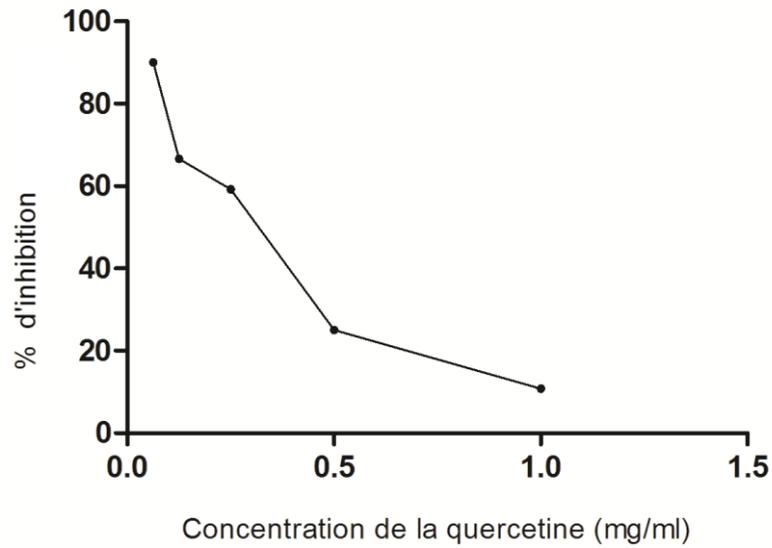


Figure 15 : Effet inhibiteur de la Quercetine sur l'activité enzymatique de la XO bovine

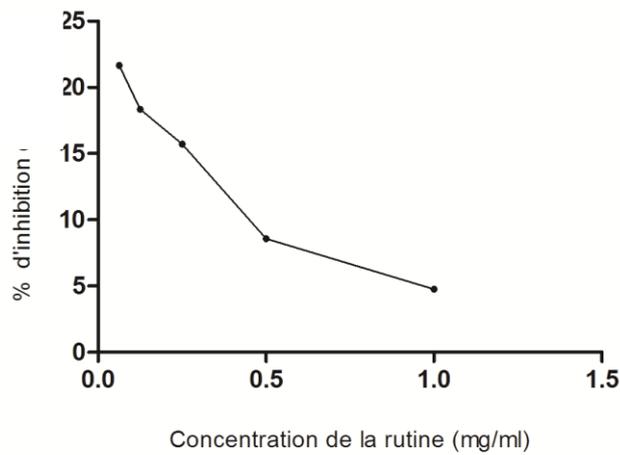


Figure 16 : Effet inhibiteur de la Rutine sur l'activité enzymatique de la XO bovine.

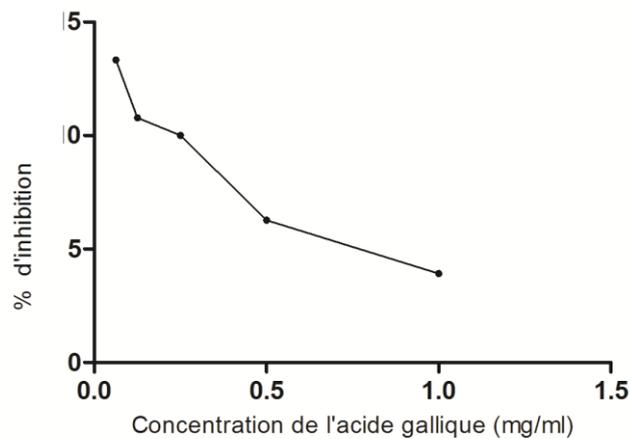


Figure 17: Effet inhibiteur de l'Acide gallique sur l'activité enzymatique de la XO bovine.

La comparaison des  $IC_{50}$  des composés d'intérêt montre que la rutine possède une activité inhibitrice très importante avec un  $IC_{50}$  de (0.79  $\mu\text{g/ml}$ ) suivi de l'acide gallique qui a représenté un  $IC_{50}$  de (1.23  $\mu\text{g/ml}$ ), et enfin arrivera la Quercetine avec un  $IC_{50}$  de (245  $\mu\text{g/ml}$ ).comme le représente le Tableau 2.

Tableau 2 : Les concentrations des solutions polyphénoliques qui inhibent 50 % de l'activité de la XO

	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	QUERCETINE	RUTINE	A. GALLIQUE
XOR inhibition	245 $\pm$ 12	0,79 $\pm$ 0.07	1,23 $\pm$ 0.09

### III .Effet Scavenger des extraits polyphénoliques sur l' $O_2^\circ$ - produit par la XO

La mesure de l'effet scavenger des quatre extraits polyphénoliques sur l'anion superoxyde produit par la XO a été établie par le suivi de la réduction du cytochrome C par l' $O_2^\circ$ - à 550 nm. D'après les résultats obtenues ; les extraits en question présentent une inhibition envers la réduction du Cyt C en  $O_2^\circ$ - très significativement, d'une manière dose-dépendante comme le représentent les figures (18, 19,20).

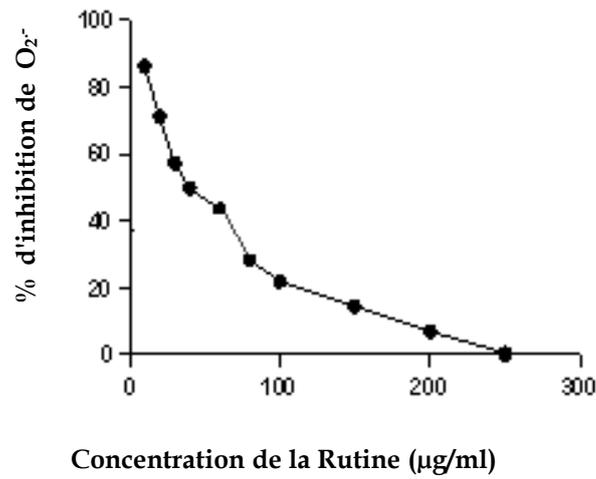


Figure 18: effet scavenger de la Rutine sur la réduction du cyt c par l'O<sub>2</sub><sup>o-</sup> produit par la XO.

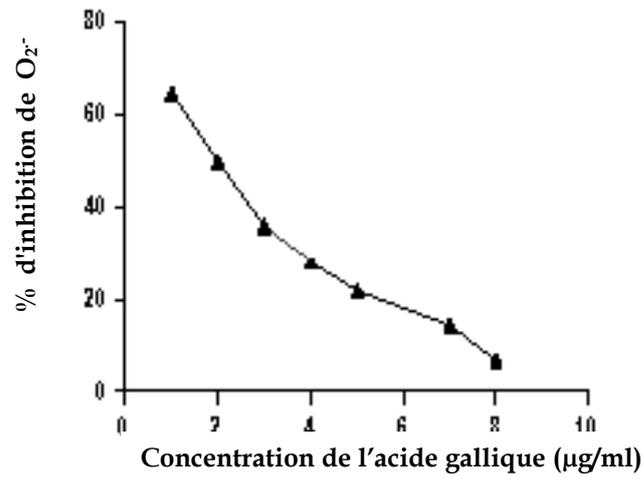


Figure 20: Effet scavenger de l'extrait de l'acide gallique sur la réduction du Cyt c par l'O<sub>2</sub><sup>o-</sup> produit par la XO.

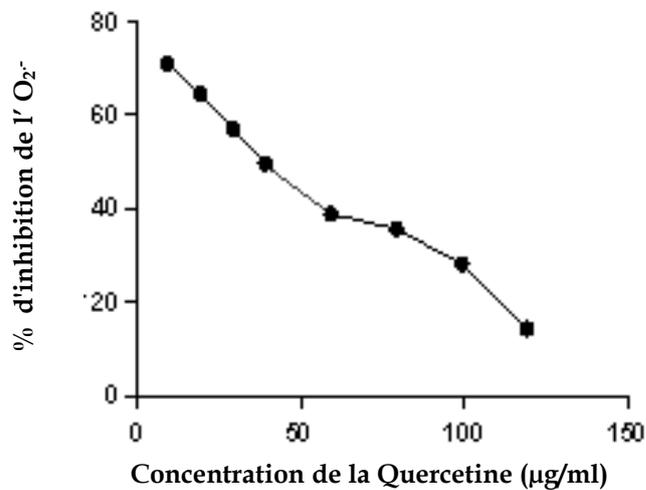


Figure 20 : Effet scavenger de la Quercetine sur la réduction du Cyt c par l'O<sub>2</sub><sup>o-</sup> produit par la XO.

Selon les IC<sub>50</sub> calculées pour chaque extrait ;la Quercetine a présenté un effet inhibiteur de la réduction du Cyt C le plus fort (IC<sub>50</sub> = 4.44 µg/ml) (p <0.001). Par contre l'Acide gallique (IC<sub>50</sub> = 60.66 µg/ml) et la Rutine (IC<sub>50</sub> = 62.5 µg/ml) avec l'effet scavenger le plus bas comme le représente le Tableau7

Tableau 7: Les concentrations des extraits polyphénoliques qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt c par l'O<sub>2</sub><sup>°</sup>- produit par la XO.

	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	QUERCETINE	RUTINE	A. GALLIQUE
O <sub>2</sub> <sup>°</sup> inhibition	4,44±0.13	60.5±1.25	62,5±3.55

L'Acide urique provient du catabolisme des purines ensuite il est éliminé par voie urinaire. Lors d'un déséquilibre de concentration dû à la mauvaise excrétion, maladie génétique ou excès de biosynthèse cela créera une hyperuricémie avec un risque d'apparition de goutte (Hang Kang ,2011) .L'augmentation de l'activité de la XO dans l'organisme est une des premières raisons de ce problème à côté d'autres syndromes : hépatiques, rénaux...etc. Par la production des ROS (Changyi Chen *et al.* ,2016).

L'utilisation des inhibiteurs synthétiques de la XO comme l'Allopurinol et ses dérivés afin de freiner le dérèglement de l'activité enzymatique de la XO à crée des effets néfastes comme l'hypersensibilité au cours des années (Okamoto, 2008).c'est pour cela l'étude des composés naturels contenus dans les plantes (tels les polyphénols) est devenue un des points les plus intéressants durant ses derniers temps (Tristan *et al.*, 2005).

Dans notre étude, la purification de la XO c'est établie à partir des MFGM du lait bovin qui sont des corps gras entourés avec des membranes contenant une variété enzymatique, protéique et des lipides polaires. La masse obtenue de l'enzyme (XO) ainsi que son activité (résultats du test de pureté) ont été satisfaisantes et similaire à celle qui ont été réalisées par Battelli *et al.*, 1973 ; Waud *et al.* ,1975.

Les résultats de l'IC<sub>50</sub> de l'activité antiXOR des polyphénols ont montré que la Rutine (IC<sub>50</sub>=0.79µg/ml) ainsi que l'acide gallique (IC<sub>50</sub>=1.23µg/ml) sont de très bons inhibiteurs directes de la XO avec une possibilité d'inhibition non compétitive via l'effet scavenger des EROs qui restera faible pour la Rutine (IC<sub>50</sub>=60.66µg/ml) et l'acide gallique (IC<sub>50</sub>=62.5µg/ml). ; Un résultat semblable à celui de Hanasaki *et al.*, 1994 ; Nagao *et al.* ,1999. Ce flavonol (Rutine) est présent dans les plantes possédant des activités

pharmacologiques multiples parmi lesquelles le pouvoir antioxydant ; et ceci reviendra à la structure chimique de ce dernier dont elle contient des cycles A et B comportant des substitutions polyhydroxylées, une double liaison 2,3, une substitution 3-hydroxyle libre et un fragment 4-cétone comme il a été expliqué par Garneshpurkar et Saluja, 2016.

Dans le même concept que la rutine, l'inhibition de la XOR l'acide gallique est dû à l'addition d'un second groupement OH au cycle aromatique (surtout s'il s'agit des positions : ortho et para avec le premier OH) de l'acide gallique (Nikhil, 2009).

D'une autre part, la Quercetine a présenté un effet scavenger envers l'anion superoxyde beaucoup plus élevé ( $IC_{50}=245\mu\text{g/ml}$ ) par rapport à l'inhibition directe de la XO par le même composé ( $IC_{50}=4.44\mu\text{g/ml}$ ) ; est cela est semblable aux études réalisées par Pauff et Hille, 2009 ; Nagao *et al.*, 1999.

Ce type d'inhibition reviendra à la relation entre la structure de la Quercetine et sa capacité de piégeage vu la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) attribuant la Stabilité au radical flavonoxy ainsi que son aide à la délocalisation des électrons, la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo ainsi que la formation du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 comme il a été décrit par Rice-Evans, 1996; Pietta, 2000. Le blocage de l'activité du NADH oxydase induit à l'inactivation de la protéine vu la formation de liaison entre la structure de Quercetine et les groupements hydroxyles libre (en position 3',4',7') de la cette dernière se qui empêchera le passage finale des électrons (Procházková *et al.*, 2011).



## *CONCLUSION & PERSPECTIVES*

L'Apparition des maladies inflammatoires tel que les arthrites rhumatoïdale, goutte et hyperuricémie sont le résultat de l'augmentation du taux de l'acide urique dans le sang qui dans la durée se précipite au niveau des articulations sous forme de cristaux provoquant des douleurs intolérables et des œdèmes réduisant le rayon d'action des personnes atteintes pouvant aller jusqu'au blocage totale des mouvements.

Le lait bovin est riche en XO, source des radicaux libres et l'enzyme clé de la production de l'acide urique. Le monde végétal est riche en substances naturelles ayant une activité anti xanthine oxydoréductase : ce sont les polyphénols. L'étude réalisée a pour objectif de démontrer l'effet et l'utilité des extraits polyphénoliques commercialisés, préparés avec des concentrations différentes (2mg/2ml jusqu'à 0.03 mg/ml) et testés sur la XO bovine purifiée.

Les résultats obtenus montrent que l'inhibition de la XO peut s'effectuer d'une manière compétitive bloquant l'activité oxydase ou bien par le piégeage de l'anion superoxyde tout dépend de la relation entre la structure des extraits et les radicaux libres.

Nous concluons que la Quercetine est un très bon inhibiteur directe de la XO ; ainsi que la Rutine et l'Acide gallique par leur effet scavenger des EROs. Ces substances peuvent se substituer à l'allopurinol eu égard à leur puissant effet antioxydant.

Mais il reste que beaucoup d'effort en matière de recherche restent à faire parmi lesquels :

- L'étude de l'effet antioxydant d'autres extraits phénoliques
- Etude de la corrélation entre les structures des polyphénols et les EROs
- Essais des résultats sur les sérums atteints de maladies reliées à la XOR.

# *ANNEXE*

## 1. Tampon $K_2HPO_4$

Cette solution de l'hydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ ) permet la conservation du pH du milieu dans le but de préservation des conditions physiologique nécessaire à l'activité de notre enzyme (XOR). Pour cela l'ajout du sodium salicylate joue le rôle d'un acide ainsi que l'EDTA qui est un agent chélateur aidant à éviter la formation des précipitations insoluble.

La préparation du tampon  $K_2HPO_4$  (0.2M) se fait par le mélange de  $K_2HPO_4$  (34.8g) avec l'EDTA (0.292g), du sodium salicylate (0.299g), et le DTT (0.771g) dans 1000ml d'eau distillée. la solution est agitée jusqu'à dissolution complète. Le tampon est conservé au frais jusqu'à son utilisation (Figure 21).



Figure 21: préparation du  $K_2HPO_4$

## 2. Tampon $Na_2HPO_4$ (pH=6.53)

Il s'agit d'un liquide de contre dialyse. À côté de son rôle tampon, son contenu en phosphate permet la régulation du taux de  $Ca^{2+}$  et aussi l'élimination de certaines molécules restantes.

Pour avoir cette solution, on verse 0.1175g de  $Na_2HPO_4$  dans 1000ml d'eau distillée, à laquelle on rajoute 0.1725g de  $NaH_2PO_4$  et 0.438g de l'EDTA, on mélange jusqu'à dissolution totale puis on mesure son pH. S'il arrive à  $Ph=6.53$ . il est donc prêt à l'emploi si non, on l'équilibre avec du NaOH ou avec une solution ne contenant que du  $Na_2HPO_4$  (cas acide) ou avec du  $NaH_2PO_4$  (cas basique).

### 3. Tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH=7.4)

Dans ce cas le tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  est destiné vers le dosage de l'absorbance. On mélange le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3.549g) dans 500ml d'eau distillée, on règle le pH à 7.4 par l'ajout d'un autre tampon contenant du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1.797g), 300ml d'eau distillée et de l'EDTA (0.087g).

Pour la saturation du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , elle est réalisée à l'aide d'un ballon gonflé en  $\text{CO}_2$  (Figure 22).

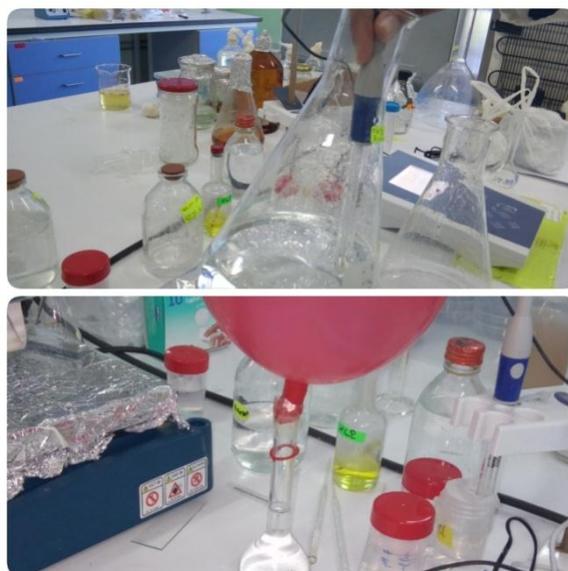


Figure 22 : Préparation du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et sa saturation en  $\text{O}_2$

### 4. Solution NaOH

Cette solution est préparée pour calibrer le pH des tampons acides en bases et aussi pour la préparation du substrat (Xanthine)

On met dans un bécher 16g de pastilles de NaOH puis on rajoute 200ml d'eau distillée et on mélange. La solution NaOH (2M) est prête à l'emploi.

### 5. Solution NaCl

Cette solution est destinée pour la purification de la XOR par chromatographie d'affinité. Deux concentrations sont préparées 0.4M et 0.1 M.

Pour obtenir la solution NaCl 0.4 M, on met 1.17g de NaCl dans 200ml du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH=6.53). On agite le tout, et la solution est prête à l'emploi.

## 6. Solution Xanthine

La préparation du substrat pour le dosage du taux d'inhibition s'effectue selon la méthode suivante : dans un Eppendorf, on pèse 0.0038mg de xanthine et on ajoute 1ml de NaOH , le mélange doit être bien agité par le vortex .Ensuite on y rajoute la préparation à 25 ml du tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH=7.4).

## 7. Préparation de la colonne

La colonne contient de l'héparine mélangée avec le tampon de dialyse  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Ph = 6.53) jusqu'à obtention d'une solution à verser dans une colonne ( $\frac{3}{4}$  de la colonne). On dépose la colonne sur le support et on verse la solution d'héparine, le gel coule dans la colonne et l'excès du tampon est éliminé .L'ajout se déroule petit à petit pour éviter les bulles d'air et, ce, pour avoir une bonne homogénéisation. On rajoute une autre quantité du tampon  $\text{NA}_2\text{HPO}_4$ (pH=6.53) afin de s'assurer que le gel est du même pH que ce dernier. Il s'agit d'une colonne destinée vers une chromatographie d'affinité (Figure 23).

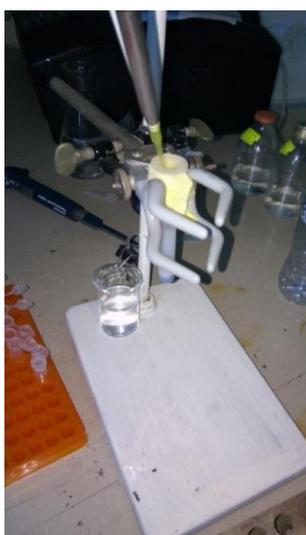


Figure 23 : Préparation de la colonne à base du gel d'héparine

## 8. Préparations des solutions polyphénolique

L'extrait en poudre (2mg) est dissout dans le tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (2 ml, pH=7.4) puis agité par le vortex jusqu'à homogénéisation totale. Afin d'obtenir des concentrations variantes de cette solution, on prend 1ml de la solution mère (2mg/2ml) et on le dépose dans un autre tube à essai contenant déjà 1ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH=7,4). À chaque fois cette étape est répétée à

partir de la dernière concentration vers le tube qui suit. (2mg/2ml jusqu'à 0.03mg/ml) ( Figure 24)

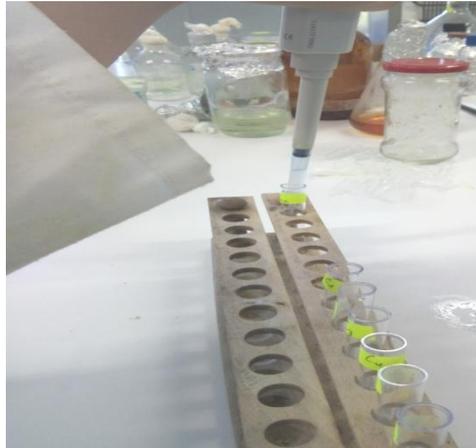


Figure 24 : Préparation de l'extrait polyphénolique avec différentes concentrations

*Références*  
*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.
- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J.3 Curran, T (1990) Redox regulation of fos and jun DNA binding activity in vitro. *Science* .249:1157-1161.
- Abreu I.A. and Cabelli D.E. (2010) Superoxide dismutases-a review of the etalassociated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1804: 263-274.
- Aditya Garneshpurker ;Ajay K, Saluja. (2016). The pharmacological potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal.*25 : 149–164.
- Alibert, G., Ranjeva, R., Boudet, M.A. (1977). Organisation subcellulaire des voies desynthèse des composés phénoliques. *Physiol Veg*, 15 : 279-301.
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. (1996).Advances in development ofpharmaceutical antioxidant.Adv. Drug. Res, 28 : 65-180.
- Augustin, A. J., Boker, T., Blumenroder, S. H.-H., Lutz, J., & Spitznas', M. (1994). Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Allopurinol and Oxypurinol in Experimental Lens-Induced Uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* , 35:3897-3904.
- Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007) Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures.*Molecules.* 12: 607-621.
- Barouki R. (2006) Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences*, 22, 266-72.
- Barry, H., John, G. (1999). *Free. Radic. Biol. Med.* Oxford University Press, USA.
- Battelli, M. G., Bolognes, A., & Polito, L. (2014). Pathophysiology of circulating Xanthine oxydoreductase:New emerging rols for a multi-tasking enzyme. *Elsevier* , 1842:1502-1517.
- Battelli, M. G., Bortolotti, M., Polito, L., & Bolognesi, A. (2018). The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *Molecular Basis of Disease* , 1864:2557-2565.
- Berry, C. E., & Hare, J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Physiology* , 555:589-606.
- 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.
- Booth, & Vernon, H. (1935). The identity of Xanthine Oxydoreductase and Schradinger enzyme. *Biochemical journal* , 29:1732-1748.
- Bray and R.C. Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In P.D. Boyer (Ed.). *New York: Academic Press. The Enzymes* pp. 299–419, 1975.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales.* 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Brzozowska, J., Hanower, P., Tanguy, J. (1973). Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12:2353-2357.
- Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gutmicroflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia.*10: 2374-2383.

- Catherine Zyzdorzcyk..(2011) .Rôle du stress oxydant en période néonatale dans l'hypertension artérielle et la dysfonction vasculaire et métabolique de l'adulte. Médecine humaine et pathologie. Université' Auvergne - Clermont-Ferrand I : France.
- Chaudière,J; Al L.Tappel.(1983). Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver.Arch. Biochem. Biophys, 226, 448-457.
- Chen, C., Lü, J. M., & Yao, Q. (2016). Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Journal of Medical Science* , 22:2501-2512.
- Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents.*Clin.Microbiol Rev.*12 (4): 564-582.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* Edt Blackwell Publishing Ltd.
- D,Prochàzková ; L , Boušová ; N ,Wilhelmová. (2011).Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids .*Fitotérapie.*82 :513-523.
- Deby-Dupont G., Deby C., Lamy M. (1999) .Neutrophil myeloperoxidase : its role in health and disease.*Intensiv med.* 36 :500-13
- Dubois, G.E., Grosbay, G.A., Saffron, P. (1977). Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science*, 195: 397-399.
- Edenharder, R., Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumenehydroperoxide in *Salmonella typhimurium*TA102. *Mutat. Res*, 540: 1–18.
- Egert S. and Rimbach G. (2011) Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements.*Advances in nutrition*, 2; 8-14.
- Ez-zohra NKHILI (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad ,faculté des science Semlalia , Marrakech et l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse ecole doctorale 306 – SPSA, Montpellier.38-39.
- Finkel, T. (1999). Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *Journal of Leucocyte Biology* , 65:337-340.
- Fonc–Rev Med Liege 2007; 62 : 10 : 628-638
- Fridovich. I. Cytochrome C. In “Handbook of methods for oxygen radical research” Ed. Greenwald R.A. CRO Press, Florida 121-122, 1986.
- Gardès-Albert M. and Jore D. (2005).Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. *Radicaux libres et stress oxydant.* Paris, Lavoisier. 1-23.
- George, J., & Alan, D. ., (2009). Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vascular Health and Risk Management* , 5:265–272.
- Granger, D., M.McCord, J., DaleA.Parks, & F.Hollwarth, M. (1986). Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Journal of Gastroenterology* , 90:80-84.
- Hamlaoui Ikram (2014).Etude théorique des réactions enzymatiques : cas de l'inhibition de la xanthine oxydase par de nouvelles chalcones.thèse de doctorat .Université Constantine 1.113.
- Harbone, J.B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry*, 4th Ed; Academic Press:London.

- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* .11:298-300.
- Harrison, R. (2004). Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Dug metabolism reviews* , 36:363-375.
- Hartman A, Neiss AM. (1999). Oxidative DNA damage in exercise. *Pathophysiology* . .5 : 1001 -112
- Sanders, S., Eisenthal, R., Harrison, R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxyde anion. *Biochem Eurp J*. 245: 541-548.
- Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Hand book of oxidants amdantioxydants in exercise*. Amesterda Elsevier; .195-217.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67– 202.
- Heid, G. B., Ernst Dieter, J., & Hans, W. (1984). High Concentrations of Antibodies to Xanthine Oxidase in Human and Animal Sera Molecular Characterizatio. *Clinical investigation* , 74:783-794.
- Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M., Amine Serghini, M. (2004). Les polyphénols de *Pyrus mamorensis*(Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1): 37-42.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- HEUNKS, M, A. L., A, J. V., HERWAARDEN, C. L., FOLGERING, H. T., GIMENO, A., et al. (2019). Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *The American Journal of Physiology* , 277(6):1697-704.
- Houée Levin C, Sicard Roselli C and Bergès J, *Chimie et Biochimie Radicalaires*, Belin edition, 2005.
- Hulbert AJ (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J TheorBiol*234, 277-288.
- J. Haleng (1), J. Pincemail (2), J.O. Defraigne (3), C. Charlier (4), J.P. Chapelle (5) *fonc→Rev Med Liege* 2007. 62 : 10 : 628-638
- Kohen R. and Nyska A (2002) Oxidation of biological systems □ oxidative stress phenomena, antioxidant redox reactions and methods for their quatification. *Toxicologic Phatology*. 30, 620-650.
- Kooij, A., Schijns, M., M, W., Frederiks, Noorden, C. J., & James, J. (1993). Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues — a histochemical and biochemical study. *Springer link* , 63:17.
- Kruidenier L. and Verspaget H.W. (2002) Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Alimentatry Pharmacology and Therapeutics*.16 :1997-2015
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. PhysiolBioch*. 45: 244-249.
- Laliberte, J. and Labbe, S. (2008). "[The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast]." *Med Sci (Paris)* 24(3): 277-283
- Lambert J., Heath S., Even G., Campion D., Slegers K., Hiltunen M., Combarros O., et al (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*.41: 1094–1099

- Lamy E., Rawel H., Schweigert F.J., Silva F.C., Ferreira A., Costa A.R., Antunes C., Almeida A.M., Coelho A.V. and Sales-Baptista E. (2014) The effect of tannins on Mediterranean ruminant ingestive behavior: the role of the oral cavity. *Molecules*.16: 2766-2784.
- Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y. (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.*. 53 : 1990-1995.
- Leong, LP., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76: 69-75.
- Lewis, W., & YL, N. (1991). Humain Xanthine oxidase antibody levels: variation between males and females in chinese and europeans. *Medical laboratory Sciences* , 48:84-88.
- Li A.N., Li S., Zhang Y.J., Xu X.R., Chen Y.M. and Li H.B. (2014) Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6: 6020-6047.
- Loche, J. (1966). Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). *Ann de la direction des études et de l'équipement, France*, 3 : 15.
- Lubec G. (1996) The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *Journal of investigative medicine*, 44, 324-346
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 424:83-95.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* , 27: 405 - 412.
- Morel, Y. Barouki, R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*.342 Pt 3:481-496.
- Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218..
- NAGAO, A., SEKI, M., & KOBAYASHI, H. (1999). Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* , 63:1787-1790 .
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1961). Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bull Soc.Fr*, 26: 2237-2240.
- Okuda T. and Ito H. (2011) Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16:2191-2217.
- Osakabe, N., Baba, S., Yasuda, A., Iwamoto, T., Kamiyama, M., Takizawa, T., Itakura, H. and Kondo, K. (2001). "Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers." *Free Radicles*. 34(1): 93-99.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., & Szabô, C. (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews* , 58: 87– 114. .
- Pauff, J. M., & Hille, R. (2009). Inhibition Studies of Bovine Xanthine Oxidase by Luteolin, Silibinin, Quercetin, and Curcumin. *Journal of Natural Products* , 72:725-731.
- Pelmont, J. (1997). *Enzymes : Catalyseurs du monde vivant*. Grenoble: Presses Universitaires de Grenoble.

- Peng J, Jones GL and Watson K (2000) Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med.* 28:1598-1606.
- Psotová J., Lasovsky J. and Vicar J. (2003) Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 147(2); 147-153.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol.*45: 328-336.
- Redondo L.M., Chacana P.A., Dominguez J.E. and Miyakawa M.E.F. (2014) Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Frontiers in microbiology*. 5( 118): 1-7.
- Richter C, Park JW and Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA.*85:6465-6467.
- Rinsho, N. (2008). Inhibitors of xanthine oxidoreductase. *Japanese journal of Clinical Medicine* , 66:748-753.
- RO, D., B, K., Kannagara, D., Williams K, M., & Graham, G. (2016). Xanthine oxidoreductase and its inhibitors: relevance for gout. *Journal of Clinical Science* , 130:2167-2180.
- Rosa, L. d., H.Moshage, & N.Nieto. (2008). Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease. *Revista Espanola de enfermedades digestivas* , 100:156-63.
- Rouquette, M., Page, S., Bryant, R., Benboubetra, M., Stevens, C. R., Blake, D. R., et al. (1998). Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Letters* , 426:397-401.
- Sankari S.L., Babu N.A., Rani V. and Priyadharsini C. (2014) Flavonoids: clinical effects and applications in dentistry: a review. *Journal of Pharmacy AndBioallied Sciences*, 6(1): 26-29
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P., Williams, R. J., Cadenas, E. and Rice-Evans, C. (2002).MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* .23(5): 861-880.
- Sen CK, Packer L, Hanninen O,(2000) .Hand book of oxidants and antioxydants in exercise .Amesterda Elsevier.195-217.
- Silanikove, N., & Shapiro, F. (2007). Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity in bovine milk: Physiological and technological implications. *International Dairy Journal* , 17:1188-1194.
- Sylvain Saderine (2013). L'acide urique : une molécule physiologique pouvant être pathologique.Thèse de doctorat. Université de Limoges.153-155.
- Taibi, G., Paganini, A., Gueli, M. C., Ampola, F., & Nicotra, C. M. (2001). Xanthine Oxidase Catalyzes the Synthesis of Retinoic Acid. *Journal of Enzyme Inhibition* , 16:275-285.
- Takahiro Fukushima ; Tetsuo Adachi ; Kazuyuki HIRANO .(1995). The Heparin-Binding Site of Human Xanthine Oxidase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18(1):156-8.
- ThuyDuong, N., DucVinh, P., ThienThuong, P., ThiHoai, N., NguyenThanh, L., TheBach, T., et al. (2017). Xanthine oxidase inhibitors from *Archidendron clypearia* (Jack.) I.C. Nielsen: Results from systematic screening of Vietnamese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* , 10:549-556.

- Timothy A Reinhardt ; John D Lippolis (2006).Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteome. *Journal of Dairy Research*. 73 : 406–416.
- Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food SciEmerg Tech*, 7: 140-146.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006)."Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *ChemBiol Interact*. 160(1): 1-40.
- W.Topham, R., C.Walker, M., & P.Calisch, M. (1982). Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 109:1240-1246.
- Wang S, Roebuck SJ and Brand MD (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 22, 4103-4110.
- WardmanP, and Candeias. Fenton centennial symposium. *Radiation research*.145:523-531, 1996.
- Wu, C. H., Lin, J. A., Hsieh, W. C. and Yen, G. C. (2009). "Low-density-lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro." *J Agric Food Chem* .57(11):5058-5064.
- Yang H. M., Ham Y. M., Yoon W. J., Roh S. W., Jeon Y. J. Oda T. et al. (2012) Quercitrin protects against ultraviolet B-induced cell death in vitro in an in vivo zebrafish model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 114,126–131.
- Yao N., Eisefelder B., Marvin J., and Greenberg J.T. (2004) The mitochondrion—An organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *PlantJournal*.40: 596–610.
- Yoshihara, D., Fujiwara, N. and Suzuki, K. (2010). "Antioxidants: benefits and risks for longterm health." *Maturitas* .67(2): 103-107.



*Résumés*

**Résumé :**

La XOR est l'enzyme clé de la production de l'acide urique, responsable des maladies articulaires: goutte, rhumatisme articulaire, problèmes rénaux et autres. Au fil des ans le traitement de base qui est l'Allopurinol a révélé des effets indésirables comme l'hypersensibilité..

Le travail effectué s'articule autour de la purification de la XO bovine à partir des globules gras du lait(MFGM) productif de  $5.7 \pm 1.8$  mg /L (n=4).la pureté de l'enzyme est assurée par spectrophotomètre UV-Visible qui présente les 3 pic caractéristiques et la ration protéine / flavine ( $5.5 \pm 0.22$ ) qui confirme la pureté le l'enzyme. Dans l'étape suivante, on traite l'enzyme par les extraits polyphénoliques (Quercetine, Rutine et l'acide gallique) pour déterminer leur mode d'inhibition antiXOR et/ou leur mode de piégeage des ERO produits par la même enzyme.

Nos résultats montrent que la Rutine a présenté une inhibition importante de la XO ( $IC_{50} = 0.79 \pm 0.07$   $\mu$ g / ml), tandis que l'acide gallique ( $IC_{50} = 1.23 \pm 0.09$   $\mu$ g / ml). Par contre la Quercetine ( $IC_{50} = 4.44 \pm 0.13$   $\mu$ g / ml ) a révélé un effet scavenger sur l'anion superoxyde que sur la XO. Les résultats de ces travaux nous ont permis d'avancer que la Quercetine, la Rutine et l'Acide gallique pouvant être utilisé et recommandé dans la phytothérapie et en biotechnologie.

**Mots clés :** XOR, Stress Oxydant, Polyphenols, MFGM, Effet Scavenger

## Abstract

Xanthine oxidoreductase (XOR), the key enzyme in production of superoxide anion and uric acid, responsible of different diseases: gout, rheumatoid arthritis, kidney problems and others. Over years, the basic treatment for all these pathologies is Allopurinol, but it has showed undesirable side effects like hypersensitivity. The work carried out revolves around the purification of bovine XO from fat globules of milk (MFGM). The enzyme was purified from bovine milk, yielding  $5.7 \pm 1.8$  mg /L (n=4). The purity of the enzyme was assessed by the UV-visible spectrum showing the three characteristic peaks and protein / flavin ratio ( $5.5 \pm 0.22$ ) which confirm the purity of our enzyme. In the next step we have treated our enzyme with polyphenolic extracts (Quercetin, Rutin and Gallic acid) to determine their inhibition capacity against XO enzyme and / or their trapping mode of ROS produced by the same enzyme.

Our results indicated that Rutin ( $IC_{50} = 0.79 \pm 0.07 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) and gallic acid ( $IC_{50} = 1.23 \pm 0.09 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) exhibited significant inhibition of XO, whereas Quercetin have revealed a scavenger effect on the superoxide anion only ( $IC_{50} = 4.44 \pm 0.13 \mu\text{g} / \text{ml}$ ).

The results of this work allowed us to argue that Quercetin, Rutin and Gallic Acid can be used and recommended in herbal medicine and biotechnology.

**Key words :** XOR, Oxidative stress, Polyphenols, MFGM, Scavenger effect

## خلاصة

الكزننتين اكسيدوريدوكتاز هو إنزيم أساسي لإنتاج حمض اليوريك المسؤول عن عدة أمراض مفصلية كداء النقرس ، الحمى الروماتيزمية و بعض الأمراض الكلوية . هذا الإنزيم أصبحت الأدوية الموصوفة لتقليل إنتاجيته منها الالوبيرينول تظهر أضرار جانبية كالحساسية المفرطة، الدراسات العلمية أظهرت أن النباتات تحتوي على مخزون غير منتهي من الجزيئات ذات تأثير بيولوجي كبير منها ما هو مضاد للأكسدة و أخرى مثبطة باستطاعتها إعطاء نفس نتائج الالوبيرينول .

هذا العمل يعتمد على استخراج و تنقية الإنزيم على هيئته المؤكسدة من حليب البقر و بالضبط من الأغشية الكروية الدهنية، و يتم بعد ذلك علاجه بخلصات البوليفينولية من أجل تحديد طريقة التنشيط للإنزيم المذكور ، أو من خلال محاصرة الجذور الحرة المنتجة من طرف هذا الأخير

الروتين (معامل تثبيط 0.79 ميكروغرام/مل) و حمض الغاليك (معامل تثبيط 1.23 ميكروغرام/مل) أظهرتا تثبيطا مباشرا مهما للكزننتين المؤكسد. بعكس الكرسيتين التي قامت بمحاصرة الانيون فائق الأكسيد (معامل تثبيط 4.44 ميكروغرام/مل). من نتائج هذه التطبيقات بإمكاننا القول أن الكرسيتين،الروتين و حمض الغاليك هم مضادات أكسدة فعالة يمكن استغلالها في العلاجات بالأعشاب أو من خلال البيوتكنولوجية.

**الكلمات المفتاحية:** الكزننتين اكسيدوريدوكتاز، التوتر المؤكسد، البوليفينولات، الأغشية الكروية الدهنية للحليب، التأثير المحاصر.



**AOUATI RAYENE**

**DATE DE SOUTENANCE**

**KERIKA KARIMA**

**17 /07/2019**

**Titre : Effet scavenger de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) produit par un système enzymatique (XOR) par des extraits polyphénoliques**

**Nature du diplôme : Master**

**Domaine : Science de la nature et de la vie**

**Option : Biochimie Appliquée**

**Résumé :**

La XOR est l'enzyme clé de la production de l'acide urique, responsable des maladies articulaires: goutte, rhumatisme articulaire, problèmes rénaux et autres. Au fil des ans le traitement de base qui est l'Allopurinol a révélé des effets indésirables comme l'hypersensibilité..

Le travail effectué s'articule autour de la purification de la XO bovine à partir des globules gras du lait(MFGM) productif de  $5.7 \pm 1.8$  mg /L (n=4).la pureté de l'enzyme est assurée par spectrophotomètre UV-Visible qui présente les 3 pic caractéristiques et la ration protéine / flavine ( $5.5 \pm 0.22$ ) qui confirme la pureté le l'enzyme. Dans l'étape suivante, on traite l'enzyme par les extraits polyphénoliques (Quercetine, Rutine et l'acide gallique) pour déterminer leur mode d'inhibition antiXOR et/ou leur mode de piégeage des ERO produits par la même enzyme.

Nos résultats montrent que la Rutine a présenté une inhibition importante de la XO ( $IC_{50} = 0.79 \pm 0.07$   $\mu$ g / ml), tandis que l'acide gallique ( $IC_{50} = 1.23 \pm 0.09$   $\mu$ g / ml). Par contre la Quercetine ( $IC_{50} = 4.44 \pm 0.13$   $\mu$ g / ml ) a révélé un effet scavenger sur l'anion superoxyde que sur la XO. Les résultats de ces travaux nous ont permis d'avancer que la Quercetine, la Rutine et l'Acide gallique pouvant être utilisé et recommandé dans la phytothérapie et en biotechnologie.

**Mots clés :** XOR, Stress Oxydant, Polyphenols, MFGM, Effet Scavenger

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de mycologie, microbiotechnologie et de l'activité microbienne, Biopôle, Chaab Eressas ; Université des frères Mentouri, Constantine.

**Président du jury :** Mme Madi .A                      MCB                      Université Mentouri Constantine 1

**Promoteur :** Mme Mosbah.A                      MCA                      Université Mentouri Constantine 1

**Examinatrice :** Mme Cherfia.R                      MAA                      Université Mentouri Constantine 1

