



32-570-107-1

32-570-107-1 TS4/B4.66
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS
SETIF

M E M O I R E

présenté à

l'Institut de Biologie

pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Option: ETUDE ET APPLICATION DES MACROMOLECULES

par

Fadila LARGUET

Thème :

PURIFICATION, CARACTERISATION ET ETUDE CINETIQUE DE LA XANTHINE OXYDOREDUCTASE HUMAINE ET BOVINE

Date de soutenance : 23/03/1998

Devant le Jury :

<u>Président :</u>	Dr.R. MAHDADI	M.C. U.F.A. Sétif
<u>Rapporteur :</u>	Dr. M. BENBOUBETRA	M.C. U.F.A. Sétif
<u>Examineurs :</u>	Dr.D. ATHMANI	M.C. C.U. Béjaia
	Dr. M. CHIBANE	M.C. C.U. Béjaia
	Dr. L .SELLOUM	M.C. U. F. A. Sétif
	Dr. A. BAGHIANI	M.A.C.C. U.F.A. Sétif

UNIVERSITE FERHAT ABBAS
SETIF

MEMOIRE

présenté à

l'Institut de Biologie

pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Option: ETUDE ET APPLICATION DES MACROMOLECULES

par

Fadila LARGUET

Thème :

PURIFICATION, CARACTERISATION ET ETUDE CINETIQUE DE LA XANTHINE OXYDOREDUCTASE HUMAINE ET BOVINE

Date de soutenance : 23/03/1998

Devant le Jury :

<u>Président :</u>	Dr.R. MAHDADI	M.C. U.F.A. Sétif
<u>Rapporteur :</u>	Dr. M. BENBOUBETRA	M.C. U.F.A. Sétif
<u>Examineurs :</u>	Dr.D. ATHMANI	M.C. C.U. Béjaia
	Dr. M. CHIBANE	M.C. C.U. Béjaia
	Dr. L. SELLOUM	M.C. U. F. A. Sétif
	Dr. A. BAGHIANI	M.A.C.C. U.F.A. Sétif

A mes parents ...

REMERCIEMENTS

Je suis pleinement reconnaissante à mes parents à qui, après Dieu, je dois tout.

J'exprime ma profonde gratitude à mon encadreur Monsieur M.BENBOUBETRA de m'avoir facilité la réalisation de cette thèse en mettant à ma disposition tout dont j'avais besoin et pour les conseils qu'il m'a prodigués tout au long du travail.

Je suis particulièrement redevable à Monsieur A.BAGHIANI de m'avoir prêtée de plein gré main forte pour la réalisation des cinétiques enzymatiques et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Messieurs les Docteurs R.MAHDADI, D.ATHMANI, M.CHIBANE et L.SELLOUM de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur L.ARRAR qui m'a appris beaucoup de techniques de laboratoire.

Je tiens à remercier également Monsieur N.BELLATAR et Monsieur K.GHARZOULI.

Que toute ma famille trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour son généreux soutien. Je remercie ma soeur Akila et ma soeur Farida qui n'a rien épargné pour m'aider.

Je remercie sincèrement mon amie Malika B..Son aide m'a été très précieuse.

Je remercie également mes amies Thoraia G. et Nora A.

Je remercie chaleureusement toute les personnes qui ont aidé à la réalisation de ce travail.

RESUME

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une métalloflavoprotéine complexe dont le rôle principal est la catalyse de la dernière étape du catabolisme des purines.

La XOR existe sous deux formes: une forme oxydase (EC.1.1.3.22) utilisant l'oxygène moléculaire et une forme déshydrogénase (EC.1.1.1.204) fonctionnant avec le NAD^+ comme accepteurs d'électrons. La forme déshydrogénase, prédominante *in vivo*, peut être convertie en oxydase, réversiblement par oxydation des groupements sulfhydryls ou irréversiblement par protéolyse.

La xanthine oxydase est actuellement impliquée dans plusieurs pathologies humaines notamment l'ischémie-réperfusion et les inflammations vue sa capacité de produire le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, espèces oxygénées réactives.

Le présent travail décrit la purification de la XOR bovine et humaine à partir du lait. Les deux enzymes purifiées ont été ensuite caractérisées, par protéolyse et électrophorèse. Une étude cinétique comparative de la XOR bovine et la XOR humaine a été entreprise dans le but de caractériser la réactivité des deux enzymes avec les substrats: xanthine oxygène, NAD^+ et NADH , rencontrés *in vivo*. La XOR bovine est très active avec la xanthine qu'elle soit sous sa forme oxydase ou déshydrogénase. La XOR humaine en particulier sous sa forme déshydrogénase réagit plutôt avec le NADH . En réagissant avec la xanthine ou le NADH , la XOR bovine et humaine sont capables de produire le radical superoxyde, mesurée par la réduction du cytochrome c.

L'inhibition de l'activité xanthine oxydase de la XOR bovine ou humaine par l'allopurinol, l'oxypurinol et l'acide urique a été étudiée. L'inhibition de l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydase humaine par le NAD^+ a également été examinée.

Les résultats sont discutés dans le contexte de la théorie proposée pour expliquer le rôle de la XOR dans les lésions tissulaires associées à l'ischémie-réperfusion.

الملخص

الإنزيم المؤكسد للكراتين بروتين معقد يحتوى على الحديد و الفلافين ويعمل أساسا على حفز المرحلة الأخيرة من هدم البيورينات.

يوجد الإنزيم المؤكسد للكراتين على شكلين مؤكسد (لجنة الانزيمات 22.3.1.1) يتفاعل مع الأكسجين و مرجع (لجنة الانزيمات 204.1.1.1) يعمل مع جزئ NAD^+ . كمستقبلات للالكترونات. إمكان الشكل المرجع و هو الغالب في المتعضية الحية أن يتحول إلى الشكل المؤكسد كنتيجة للأوكسدة العكسية للجسور الكبريتية أو القطع غير العكسي بالإنزيمات .

يعتقد أن الإنزيم المؤكسد للكراتين متورط فى العديد من الحالات المرضية لاسيما حالة الإقفار و إعادة الإحتقان و الإلتهابات نظرا لقدرة هذا الإنزيم على إنتاج جذور الأكسجين الحرة (O_2^-) و H_2O_2 .

ورد فى هذا العمل كيفية تنقية الإنزيم المؤكسد للكراتين من حليب البقر و البشر ثم دراسة خصائص الإنزيم من كلا المصدرين بطريقة المهجرة الكهربائية و القطع بالإنزيمات. من جهة أخرى، أجريت دراسة حركية مقارنة لكل من الإنزيم البقري و البشري بهدف تمييز نشاط الإنزيمين مع مواد التفاعل الآتية: الكراتين، الأكسجين الجزيئى و جزيئى $NADH$ و NAD^+ المتواجدة فى المتعضية الحية. بينت هذه الدراسة أن إنزيم البقر شديد النشاط مع الكراتين بشكله المؤكسد و المرجع فى حين أن الإنزيم البشري خاصة بشكله المرجع يتفاعل بطريقة أفضل مع جزئ $NADH$. تبين أيضا أن كلا من الإنزيمين يمتلك القدرة على إنتاج شاردة فوق الأوكسيد (O_2^-) التي يمكن قياسها من خلال إرجاع جزئ cytochrome c. تمت دراسة تثبيط نشاط الإنزيم المؤكسد للكراتين البقري و البشري على الكراتين بالمركبات التالية Oxypurinol, Allopurinol و حمض اليوريا إضافة إلى تثبيط تفاعل الإنزيم البشري مع $NADH$ بواسطة جزئ NAD^+ .

نوقشت النتائج المتحصل عليها فى إطار النظرية التي تحاول شرح دور الإنزيم المؤكسد للكراتين فى الأضرار النسيجية الناجمة عن الإقفار و إعادة الإحتقان.

ABBREVIATIONS

ADP	: Adenosine diphosphate
AMP	: Adenosine monophosphate
ATP	: Adenosine triphosphate
BSA	: Bovine serum albumin
CD	: Circular dichroism
cDNA	: Complementary DNA
Cyt.c	: Cytochrome c
DTDP	: 4-4'dithiopyridine
DTE	: Dithioerythritol
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylène diamine tetraacetate
EPR	: Electron paramagnetic resonance
FAD	: Flavin adenine dinucleotide
FADH	: FAD, semiquinone
FADH ₂	: FAD réduit
HPLC	: High performance liquid chromatography
HSA	: Human serum albumin
IL	: Interleukine
INF	: Interferon
NAD ⁺	: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	: NAD ⁺ réduit
NF	: Necrosis factor
PAF	: Platelet-activating factor
PFR	: Protein flavin ratio
PM	: Poids moléculaire.
PMNs	: Polymorphonucleaires
PMSF	: Phenyl methyl sulfonyl fluoride
ROS	: Reactive oxygen species
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	: Superoxide dismutase
TEMED	: N,N,N',N'-tetramethyl éthylène diamine
TNF	: Tumor necrosis factor

UV : Ultraviolet
XDH : Xanthine déshydrogénase
XO : Xanthine oxydase
XOR : Xanthine oxydoréductase
XOR-b : XOR bovine
XOR-b B : XOR bovine commercialisée par Biozyme
XOR-h : XOR humaine

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	I
RESUME.....	II
ABREVIATIONS.....	III
SOMMAIRE.....	IV

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Mécanisme réactionnel de la xanthine oxydoréductase.....	6
1.3 Propriétés spectrales de la xanthine oxydoréductase.....	9
1.4 Formes inactives de la xanthine oxydoréductase.....	11
1.5 Interconversion xanthine déshydrogénase/oxydase.....	12
1.6 Inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase.....	18
1.6.1 Analogues de substrats.....	18
1.6.2 Autres inhibiteurs.....	21
1.7 Produits de la xanthine oxydoréductase.....	23
1.7.1 Le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène.....	23
1.7.2 L'acide urique.....	26
1.8 Distribution et localisation de la xanthine oxydoréductase.....	27
1.9 Rôle des radicaux libres dans certaines maladies humaines.....	28
1.9.1 Rôle de la xanthine oxydoréductase dans l'inflammation.....	29
1.9.2 Rôle de la xanthine oxydoréductase lors de l'ischémie-réperfusion.....	31
2. MATERIEL ET METHODES.....	35
2.1 MATERIEL.....	35
2.2 METHODES.....	36
2.2.1 Purification de la xanthine oxydoréductase bovine.....	36
2.2.1.1 Préparation de l'extrait brut.....	36
2.2.1.2 Chromatographie sur colonne d'héparine.....	37
2.2.2 Purification de la xanthine oxydoréductase humaine.....	37

2.2.3 Contrôle de la pureté des préparations enzymatiques.....	38
2.2.4 Estimation de la quantité des protéines.....	38
2.2.5 Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	41
2.2.6 Activités enzymatiques.....	43
2.2.6.1 Préparation des formes déshydrogénases et oxydases.....	43
2.2.7 Cinétiques enzymatiques.....	44
2.2.7.1 Détermination des paramètres cinétiques.....	44
2.2.7.2 Etude de la production du superoxyde.....	44
2.2.7.3 Etudes d'inhibition.....	45
2.2.8 Effets des protéases sur la xanthine oxydoréductase.....	46
2.2.8.1 Effet sur l'activité et la séparation électrophorétique.....	46
2.2.8.2 Gel-filtration en conditions non dissociantes.....	46
2.2.8.3 Gel-filtration en conditions dissociantes.....	46
3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	47
3.1 Purification de la xanthine oxydoréductase.....	47
3.1.1 Purification de la xanthine oxydoréductase bovine.....	47
3.1.1.1 Résultats.....	47
3.1.1.2 Discussion.....	54
3.1.2 Purification de la xanthine oxydoréductase humaine.....	55
3.1.2.1 Résultats.....	55
3.1.2.2 Discussion.....	59
3.2 Effets des protéases sur la xanthine oxydoréductase.....	60
3.2.1 Résultats.....	60
3.2.1.1 Effet des protéases sur l'activité enzymatique.....	60
3.2.1.2 Effet des protéases sur la séparation électrophorétique.....	61
3.2.1.3 Gel-filtration en conditions non dissociantes.....	65
3.2.1.4 Gel-filtration en conditions dissociantes.....	68
3.2.2 Discussion.....	71
3.3 Conversion de la xanthine oxydase en xanthine déshydrogénase.....	73
3.3.1 Résultats.....	73
3.3.2 Discussion.....	74
3.4 Etude cinétique de la xanthine oxydoréductase.....	76
3.4.1 Détermination des paramètres cinétiques.....	76

2.2.3 Contrôle de la pureté des préparations enzymatiques.....	38
2.2.4 Estimation de la quantité des protéines.....	38
2.2.5 Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	41
2.2.6 Activités enzymatiques.....	43
2.2.6.1 Préparation des formes déshydrogénases et oxydases.....	43
2.2.7 Cinétiques enzymatiques.....	44
2.2.7.1 Détermination des paramètres cinétiques.....	44
2.2.7.2 Etude de la production du superoxyde.....	44
2.2.7.3 Etudes d'inhibition.....	45
2.2.8 Effets des protéases sur la xanthine oxydoréductase.....	46
2.2.8.1 Effet sur l'activité et la séparation électrophorétique.....	46
2.2.8.2 Gel-filtration en conditions non dissociantes.....	46
2.2.8.3 Gel-filtration en conditions dissociantes.....	46
3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	47
3.1 Purification de la xanthine oxydoréductase.....	47
3.1.1 Purification de la xanthine oxydoréductase bovine.....	47
3.1.1.1 Résultats.....	47
3.1.1.2 Discussion.....	54
3.1.2 Purification de la xanthine oxydoréductase humaine.....	55
3.1.2.1 Résultats.....	55
3.1.2.2 Discussion.....	59
3.2 Effets des protéases sur la xanthine oxydoréductase.....	60
3.2.1 Résultats.....	60
3.2.1.1 Effet des protéases sur l'activité enzymatique.....	60
3.2.1.2 Effet des protéases sur la séparation électrophorétique.....	61
3.2.1.3 Gel-filtration en conditions non dissociantes.....	65
3.2.1.4 Gel-filtration en conditions dissociantes.....	68
3.2.2 Discussion.....	71
3.3 Conversion de la xanthine oxydase en xanthine déshydrogénase.....	73
3.3.1 Résultats.....	73
3.3.2 Discussion.....	74
3.4 Etude cinétique de la xanthine oxydoréductase.....	76
3.4.1 Détermination des paramètres cinétiques.....	76

3.4.2 Production du superoxyde.....	78
3.4.3 Etudes d'inhibition.....	82
3.5 Discussion générale.....	86

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	92
---	-----------

1. INTRODUCTION

1.1 Introduction

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une métalloflavoprotéine complexe constituée de deux sous-unités identiques de 150 KDa chacune. Chaque sous-unité contient une molybdoptérine, une molécule de flavine adenine dinucléotide (FAD) et deux centres fer-soufre (Fe/S) de type ferredoxine (Bray, 1975).

La XOR est peu spécifique pour les substrats réducteurs et oxydants ; elle catalyse l'oxydation d'une large variété d'hétérocycles aromatiques (purines, azapurines, ptéridines et pyrimidines) et d'aldehydes aliphatiques en leurs dérivés hydroxylés (Massey, 1973) en plus de l'oxydation du NADH en NAD⁺ (Coughlan *et al.*, 1969). De nombreuses molécules telles que l'oxygène moléculaire (O₂), le NAD⁺, les quinones, le ferricyanure et certains colorants artificiels (tels que le bleu de méthylène) peuvent servir d'accepteurs d'électrons pour la XOR (Nakamura et Yamazaki, 1973). A présent, le rôle principal attribué à la XOR est dans le catabolisme des purines où l'enzyme catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique (Bray, 1975; Figure 1). Chez certaines espèces, le catabolisme des purines se poursuit au delà de l'acide urique (Figure 1). Les mammifères, autres que les primates, excrètent l'allantoïne qui est formée par l'oxydation de l'urate. Des espèces de poissons excrètent l'allantoate, produit de l'hydratation de l'allantoïne. Chez les amphibiens et certains poissons, l'allantoate est hydrolysée davantage en deux molécules; urée et glyoxylate). Certains invertébrés marins hydrolysent l'urée en NH₄⁺ et CO₂ (Stryer, 1988)(Figure 1).

La XOR des mammifères est particulière du fait qu'elle existe sous deux formes : une forme déshydrogénase (XDH, EC.1.1.1.204) qui utilise le NAD⁺ et une forme oxydase (XO, EC 1.1.3.22) qui utilise l'oxygène moléculaire comme accepteurs d'électrons. C'est la capacité de la XOR de réduire l'oxygène diatomique en superoxyde (O₂⁻) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), espèces oxygénées réactives, qui a incité à l'étude de cette enzyme et la recherche de son rôle dans de nombreux cas pathologiques en particulier dans l'inflammation et l'ischémie (voir Sections 1.9.3 et 1.9.4).

1.INTRODUCTION

1.1 Introduction

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une métalloflavoprotéine complexe constituée de deux sous-unités identiques de 150 KDa chacune. Chaque sous-unité contient une molybdoptérine, une molécule de flavine adenine dinucléotide (FAD) et deux centres fer-soufre (Fe/S) de type ferredoxine (Bray, 1975).

La XOR est peu spécifique pour les substrats réducteurs et oxydants ; elle catalyse l'oxydation d'une large variété d'hétérocycles aromatiques (purines, azapurines, ptéridines et pyrimidines) et d'aldehydes aliphatiques en leurs dérivés hydroxylés (Massey, 1973) en plus de l'oxydation du NADH en NAD⁺ (Coughlan *et al.*, 1969). De nombreuses molécules telles que l'oxygène moléculaire (O₂), le NAD⁺, les quinones, le ferricyanure et certains colorants artificiels (tels que le bleu de méthylène) peuvent servir d'accepteurs d'électrons pour la XOR (Nakamura et Yamazaki, 1973). A présent, le rôle principal attribué à la XOR est dans le catabolisme des purines où l'enzyme catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, et la xanthine en acide urique (Bray., 1975; Figure 1). Chez certaines espèces, le catabolisme des purines se poursuit au delà de l'acide urique (Figure 1). Les mammifères, autres que les primates, excrètent l'allantoïne qui est formée par l'oxydation de l'urate. Des espèces de poissons excrètent l'allantoate, produit de l'hydratation de l'allantoïne. Chez les amphibiens et certains poissons, l'allantoate est hydrolysée davantage en deux molécules; urée et glyoxylate). Certains invertébrés marins hydrolysent l'urée en NH₄⁺ et CO₂ (Stryer, 1988)(Figure 1).

La XOR des mammifères est particulière du fait qu'elle existe sous deux formes : une forme déshydrogénase (XDH, EC.1.1.1.204) qui utilise le NAD⁺ et une forme oxydase (XO, EC 1.1.3.22) qui utilise l'oxygène moléculaire comme accepteurs d'électrons. C'est la capacité de la XOR de réduire l'oxygène diatomique en superoxyde (O₂⁻) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), espèces oxygénées réactives, qui a incité à l'étude de cette enzyme et la recherche de son rôle dans de nombreux cas pathologiques en particulier dans l'inflammation et l'ischémie (voir Sections 1.9.3 et 1.9.4).

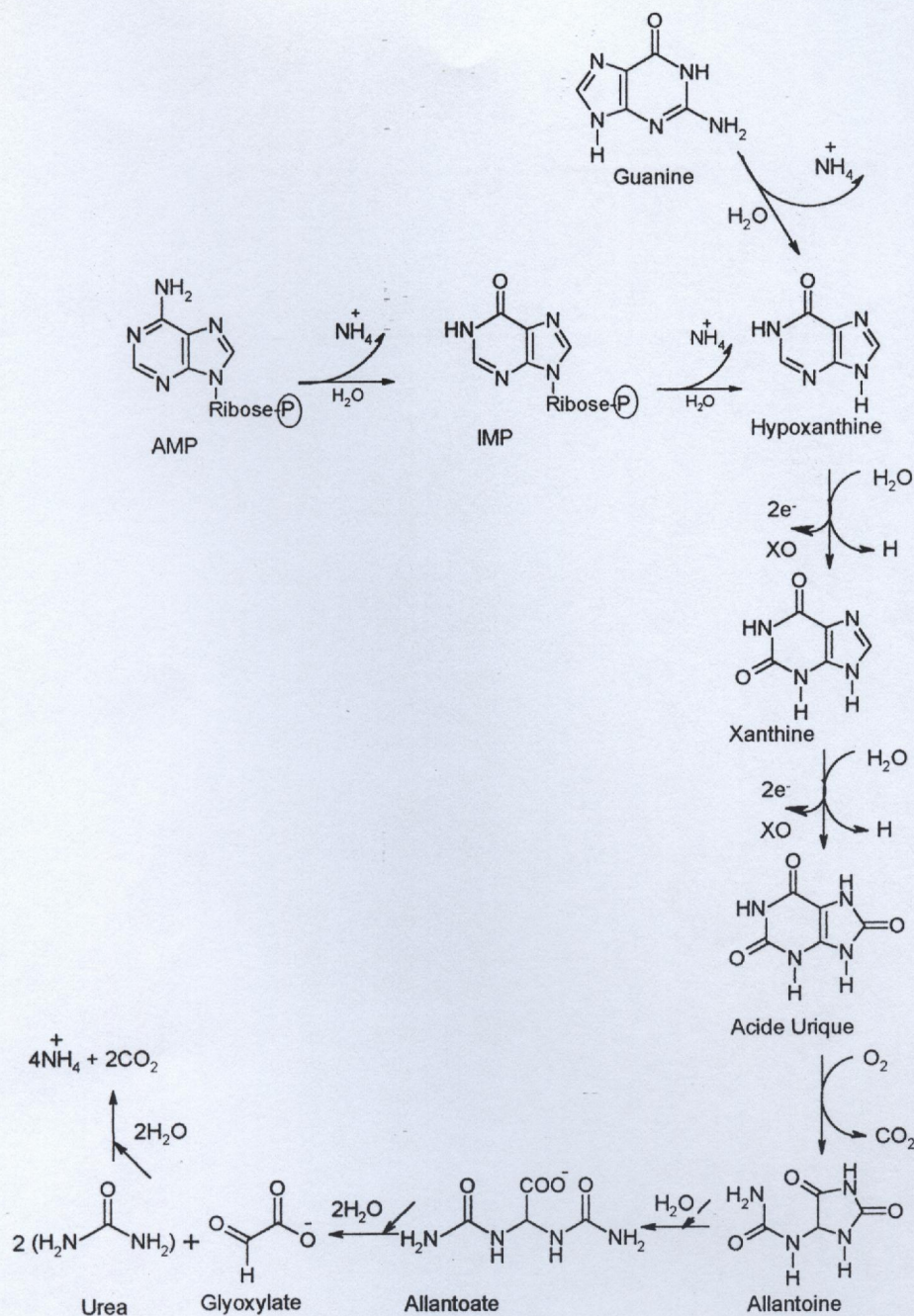


Figure 1: Rôle de la XOR dans le catabolisme des purines (d'après Stryer , 1988).

Le schéma général de la catalyse par la XOR implique l'oxydation du substrat réducteur au site molybdène. Les électrons ainsi introduits dans l'enzyme sont canalisés par les centres fer-soufre jusqu'au FAD où le substrat oxydant est réduit (Edmondson *et al.*, 1972; Kanda *et al.*, 1972; Swann et Bray, 1972). Cette voie de transfert des électrons n'est pas unique et d'autres voies sont proposées (Figure 2).

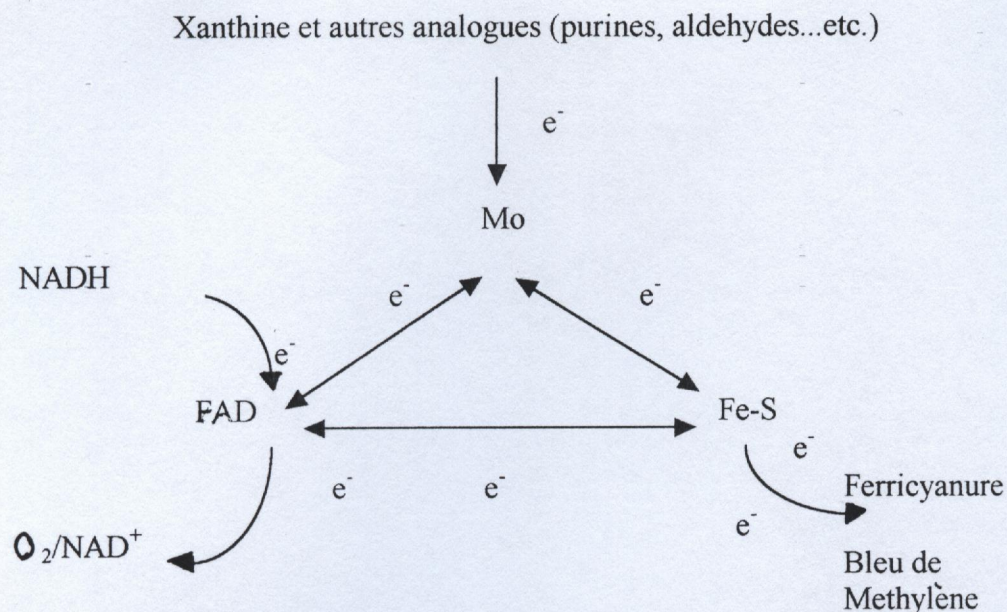


Figure 2 : Lieux d'interactions des différents substrats avec la XOR et le transfert des électrons entre les centres redox.

La XOR appartient à la classe des hydroxylases à oxomolybdène, appellation qui reflète la présence d'une unité Mo=O dans le site actif de ces enzymes. Sur la base du site actif renfermant soit un MoO₂ ou un MoOS, ces hydroxylases sont subdivisées en deux groupes. La XOR appartient au dernier groupe (MoOS) qui est sensible au cyanure (Hille., 1994). En plus de l'atome de molybdène, la XOR possède dans son site actif un cofacteur ptérinique qui établit des liaisons de coordinence avec le molybdène (Hawkes et Bray, 1984; Rajagopalan *et al.*, 1990) (Figure 3).

Le rôle du cofacteur ptérinique dans le mécanisme réactionnel de la XOR est incertain. Il paraît toutefois que ce facteur intervient indirectement dans la catalyse en modulant la réactivité et/ou le potentiel de réduction du centre à molybdène (Hille, 1994).

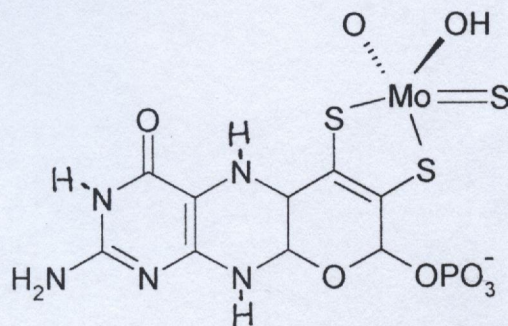


Figure 3 : le cofacteur ptérinique avec le molybdène logé dedans.

Les centres fer-soufre [2Fe-2S] de la XOR sont de type ferredoxine (Bray, 1975, Hille et Massey, 1985). Les deux centres notés (Fe/S)I et (Fe/S)II sont distincts en terme de potentiel d'oxydoréduction et fonctionnent comme transporteurs d'électrons au sein de l'enzyme (Hille et Anderson, 1991; Hunt *et al.*, 1993).

En 1992, Hughes et ses collaborateurs ont publié que malgré l'absence de centres fer-soufre de la XDH, chez une souche mutée de *Drosophila mélanogaster*, l'activité enzymatique persiste. Il est donc possible que ces centres même n'étant pas strictement requis pour le transfert des électrons au sein de l'enzyme y participent une fois présents (Hille, 1994). Les quatre centres redox doivent être intimement liés dans la structure tridimensionnelle pour assurer un transfert rapide des électrons au sein de l'enzyme (Amaya *et al.*, 1990). La molécule de la XOR serait organisée d'une façon modulaire où chaque domaine logerait une unité d'oxydoréduction.

Il a été montré que les réactions faisant intervenir des centres différents sont inactivées à des températures différentes soutenant l'organisation de la molécule de la XOR en trois domaines par sous-unités (Nichols et Low, 1986; Coughlan *et al.*, 1986). Les deux centres Fe/S constituent une unité redox et sont logés dans un seul domaine. Bien que l'analyse cristallographique de la structure tertiaire de l'enzyme est encore à l'étape d'investigation (Eger *et al.*, 1994), il a été démontré, par microscope électronique, que la sous-unité de la XOR du lait est constituée de trois sous-masses (Coughlan *et al.*, 1986). Une évidence supplémentaire, en faveur d'une telle organisation, est déduite par l'effet des enzymes protéolytiques. La trypsine clive la molécule monomérique de la XOR du foie de rat en trois fragments qui restent fortement liés et ne sont séparés que sous conditions dénaturantes. Par détermination de la séquence en -acides aminés H₂N-terminale des fragments protéolytiques (Amaya *et al.*, 1990) et les études de modifications chimiques (Nishino et Nishino, 1989), il a été suggéré que les deux centres Fe-S sont associés avec le fragment N-terminal (de 20KDa), le Mo avec le fragment C-terminal (de 85KDa) et le FAD avec le fragment intermédiaire (de 40 KDa). (Figure 4a).

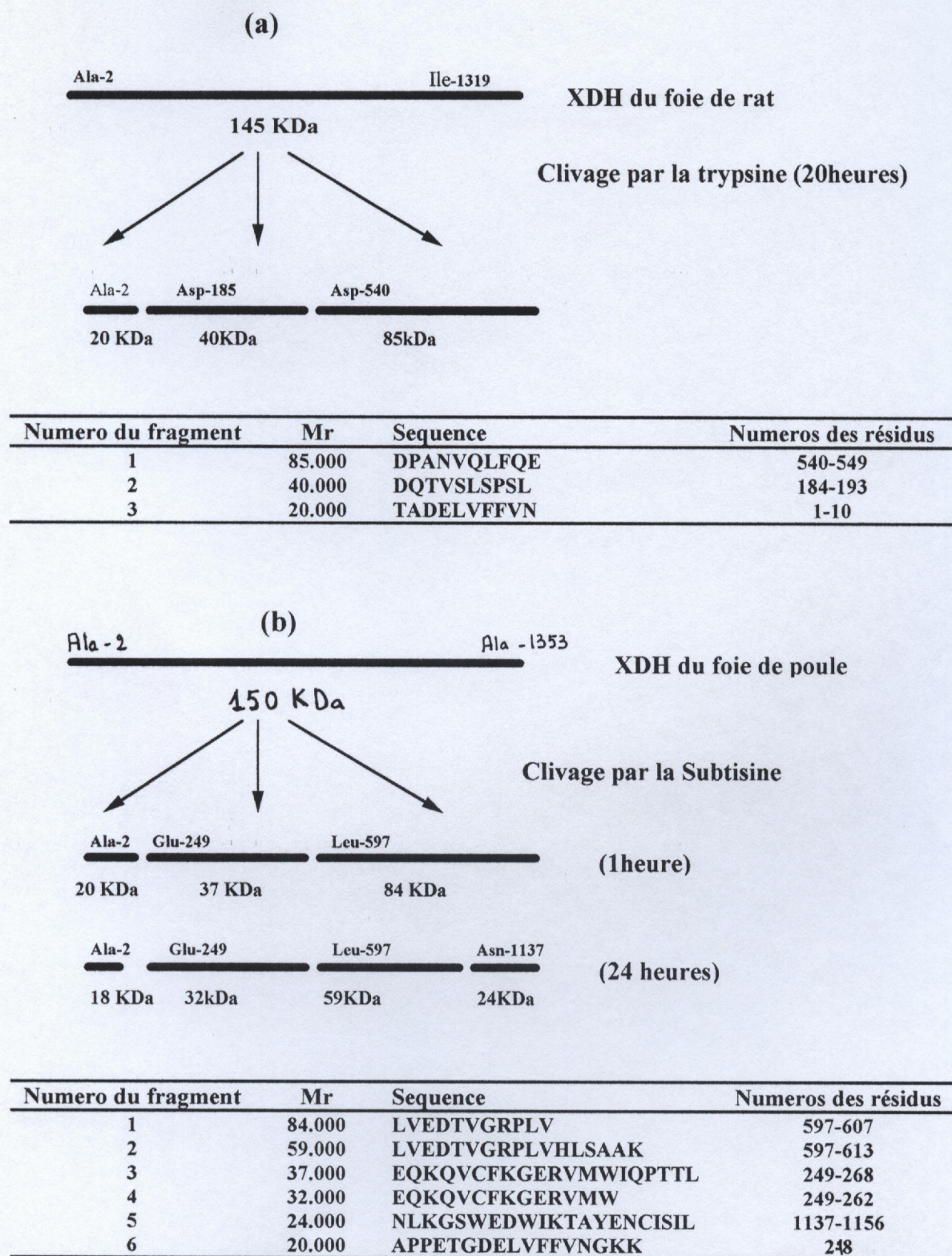


Figure 4 : Digestion enzymatique de la XDH du foie de rat (a) et de poule (b)
(d'après Amaya *et al.*, 1990 et Sato *et al.*, 1995)

Des résultats similaires ont été obtenus avec la XDH du foie de poule traitée par la subtilisine (protéase type VIII; EC 3.4.21.62, extraite du *Bacillus licheniformis*) à part que le fragment intermédiaire associé avec le FAD semble faiblement lié aux deux autres fragments (Sato *et al.*, 1995, Figure 4b). Seule l'étude cristallographique de la XOR, qui est un sujet d'étude dans plusieurs laboratoires (Pr. Bray et Dr. Harrison en Angleterre; Pr. Nishino au Japon, Pr. Massey et Dr. Wright au USA), est en mesure de donner une réponse précise quant à l'organisation des quatre centres redox. Il faut souligner également que des résultats préliminaires positifs de cristallisation de la XOR bovine ont été obtenus dans les laboratoires du Docteur R. Harrison et du Professeur T. Nishino; communications personnels) mais les cristaux obtenus étaient instables et ne diffractaient pas les rayons X à une bonne résolution.

1.2 Mécanisme réactionnel de la xanthine oxydoréductase

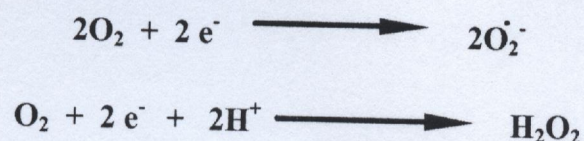
Le cycle catalytique de la XOR du lait bovin est de type ping-pong (Greenlee et Handler, 1964; Olson *et al.*, 1974). Ce type de catalyse consiste en deux demi-réactions indépendantes; réductive et oxydative. Le fait que les deux demi-réactions ont lieu à des sites physiquement séparées nécessite un transfert intramoléculaire des électrons qui doit représenter un aspect integral de la catalyse (Hille et Massey, 1985). La demi-réaction réductive, ayant lieu au site Mo, consiste en une hydroxylation oxydative du substrat avec réduction concomitante de l'enzyme :



La majorité des hydroxylases utilisent, comme source de l'atome d'oxygène incorporé dans le substrat, l'oxygène moléculaire. Par contre, la XOR ainsi que toutes les hydroxylases à oxomolybdène, incorporent dans leur substrat l'atome d'oxygène provenant d'un site catalytiquement labile de l'enzyme. Cet atome d'oxygène doit être régénéré à partir de l'eau au cours de chaque cycle catalytique (Hille, 1994). Le site donneur de l'oxygène est vraisemblablement le groupement Mo=O. L'oxydation du substrat par la XOR s'accompagne de la formation de complexes binaires : substrat-enzyme oxydée et produit-enzyme réduite où le molybdène passe d'un état de valence VI dans l'enzyme oxydée à un état IV par gain de deux électrons (Rajagopalan *et al.*, 1990; Kim et Hille., 1993; Hunt et Massey 1994) selon la réaction suivante :



Les électrons introduits dans l'enzyme sont rapidement distribués entre les différents centres redox selon leurs potentiels relatifs d'oxydoréduction, les centres aux potentiels plus élevés sont les premiers à être réduits (Olson *et al.*, 1974). Une sous-unité de la XOR passe à sa forme complètement réduite en acceptant six électrons (deux au centre à molybdène, du $\text{Mo}^{(\text{VI})}$ au $\text{Mo}^{(\text{IV})}$, deux au niveau du FAD en le réduisant en FADH_2 et un à chaque centre Fe-S, figure 5). Deux électrons en plus peuvent être acceptés par un disulfure réductible par les agents réducteurs puissants tels que le dithionite de sodium (Hunt *et al.*, 1993). L'enzyme réduite est réoxydée par passage des électrons au substrat oxydant. Cette demi-réaction oxydative fait généralement intervenir le FAD qui peut effectuer un transfert électronique univalent ($\text{FADH}^\cdot$) ou divalent (FADH_2) au substrat oxydant. Le transfert univalent ou divalent des électrons à l'oxygène moléculaire engendre respectivement le superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène :



Les proportions du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène produits dépendent largement des conditions expérimentales (pH, concentrations des substrats réducteurs et oxydants). D'une manière générale, les facteurs qui mènent à une réduction relativement faible de l'enzyme favorisent plutôt le flux univalent des électrons et par conséquent la production du superoxyde (McCord et Fridovich., 1968; Fridovich, 1970; Harris et Massey, 1997).

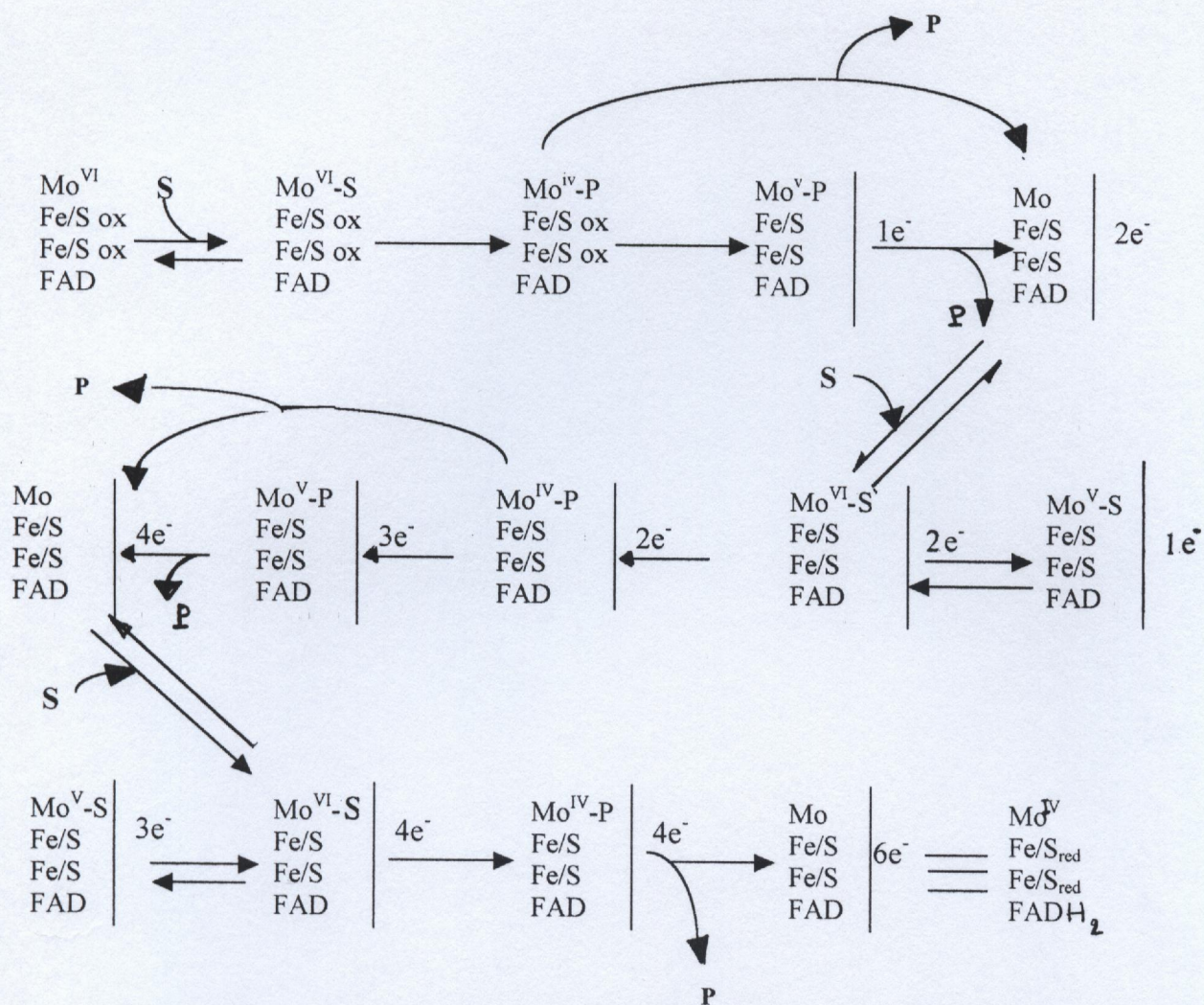


Figure 5 : Mécanisme cinétique général de la réduction de la XOR oxydée en présence d'un excès stoichiométrique de substrat (d'après Hille., 1994).

1.3 Propriétés spectrales de la xanthine oxydase

La molécule de XOR renferme plusieurs chromophores qui ont permis son étude par les méthodes spectroscopiques telles que l'absorption optique, le dichroïsme circulaire (CD) et la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (e.p.r) (Hille et Massey, 1985; Bray et George, 1985, Howes *et al*, 1990; Hunt et Massey, 1992; Hille, 1994). Les spectres d'absorption optiques de la XOR en ses formes oxydée et réduite (par le dithionite) sont représentées par la Figure 6. Le spectre de l'enzyme oxydée est caractérisé par des maxima d'absorption à 325 et 450 nm en plus d'un pic à 280 nm. Cette forme spectrale est attribuée en grande partie aux groupements FAD et Fe-S (Hille et Massey, 1985; Hunt and Massey, 1992; Hunt *et al.*, 1993; Hunt et Massey, 1994).

La flavine peut être enlevée par incubation de l'enzyme dans des solutions à fortes concentrations en sels (CaCl_2 pour l'enzyme oxydée ou KI pour l'enzyme réduite) et le spectre ainsi obtenu devient caractéristique des protéines à fer-soufre. La soustraction du spectre de l'enzyme déflavinique de celui de l'enzyme native donne la contribution spectrale du FAD. A la longueur d'onde 450 nm, l'absorption est pratiquement due au FAD et aux centres Fe-S (Hille et Massey, 1985; Hunt et Massey, 1992) et la réduction de l'enzyme avec la xanthine ou le dithionite de sodium conduit au blanchiment du spectre (Figure 6).

A cause de la prédominance des changements spectraux accompagnant la réduction du FAD et des centre Fe-S, les changements associés à la réduction du centre à Mo sont demeurés pour longtemps mal définis et n'ont été déterminés que récemment par Rayan et ses collaborateurs (1995). Avec la réduction de l'enzyme, le maximum d'absorption du centre à Mo passe de 420 nm, dans l'enzyme oxydée, à moins de 320 nm.

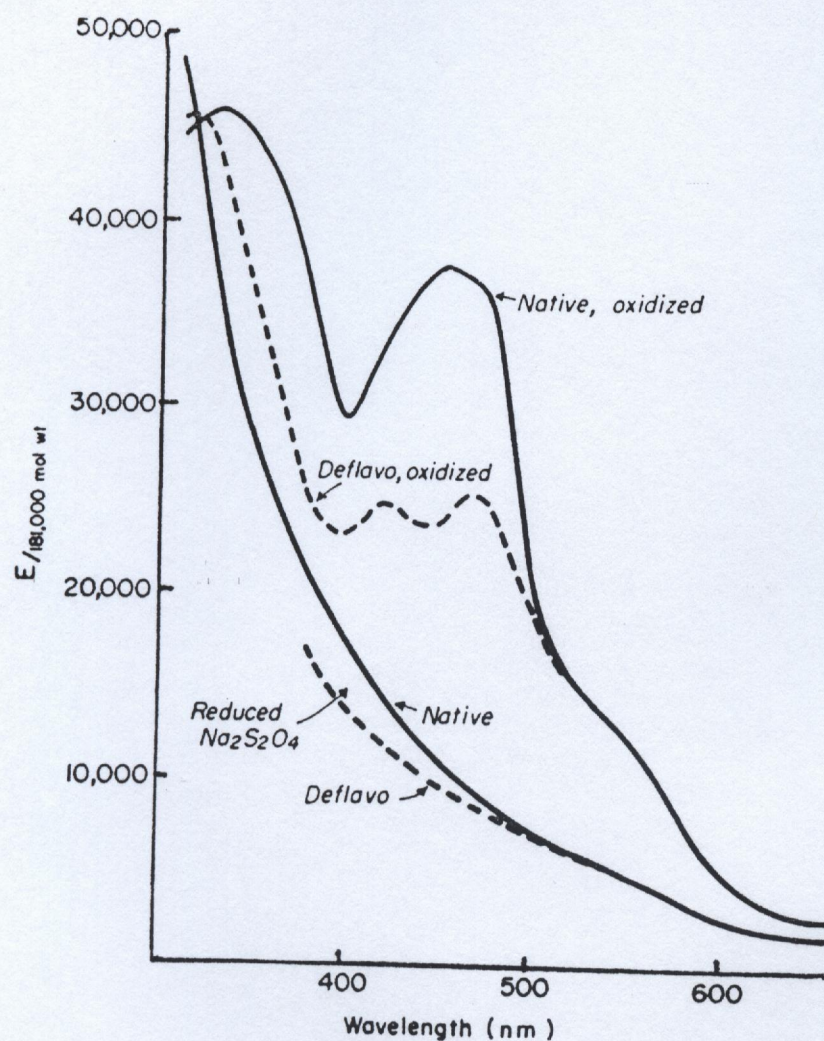


Figure 6: Les spectres de la XOR

Les propriétés d'absorption optique de la XOR bovine du lait. Les spectres montrés sont ceux des formes oxydée et réduite par le dithionite de l'enzyme native (—) et de l'enzyme déflavinique (-----). (D'après Hille et Massey, 1985).

1.4 Formes inactives de la xanthine oxydoréductase

La XOR existe naturellement sous des formes inactives. Une première indication de l'existence de telles formes provenait des résultats des expériences de titration de l'enzyme avec des inhibiteurs puissants tels que la 6-pteriladehyde (Kalckar et Klenow, 1948a) ou l'oxypurinol (Massey *et al.*, 1970b). Comme une molécule d'inhibiteur se lie à une molécule d'enzyme (monomérique), le rapport stoechiométrique de l'inhibiteur à l'enzyme entraînant une inhibition complète doit être égal à 1 mais les valeurs obtenues en pratique étaient en dessous de 1 (exp. 0.7 par Massey *et al.*, 1970b). Ces valeurs inférieures à 1 révèlent l'existence de formes inactives incapable de fixer l'inhibiteur.

Les inhibiteurs utilisés sont connus par leur fixation sur le centre à Mo de la XOR. Ceci indique que l'anomalie menant à l'inactivation de l'enzyme réside au niveau de ce centre. Actuellement, deux formes inactives sont retrouvées dans les préparations de routine de la XOR: une forme dite démolybdo ayant perdu l'atome Mo ou le cofacteur ptérinique et une forme desulfo dont un soufre essentiel à la catalyse, normalement lié au Mo (Mo=S), est remplacé par un oxygène. Cette dernière forme peut être obtenue *in vitro* par traitement de l'enzyme active par le cyanure (Massey et Edmondson, 1970).

Les formes inactives représentent généralement 50% de la XOR dans le foie de rat (Ikegami et Nishino, 1986), 60 % dans le lait bovin (Hart *et al.*, 1970; Bray, 1975; Ventom *et al.*, 1988) et jusqu' à 98% et même plus dans le lait humain (Abadeh *et al.*, 1992; 1993 Godber *et al.*, 1997). La forme desulfo peut être partiellement réactivée par incubation avec les composés souffrés. (Wahl et Rajagopalan, 1982., Nishino *et al.*, 1983). Les méthodes de resulfuration consistent en l'incubation de l'enzyme avec le sulfure de sodium, le méthyl de viologène et le dithionite de sodium sous des conditions anaérobies. Le sulfure de sodium agit comme source de soufre, le dithionite de sodium agit comme un agent réducteur et le méthyl de viologène possède un double rôle. Le mécanisme de la resulfuration reste encore obscure. Coughlan (1981) avait proposé que des systèmes de sulfuration/désulfuration, fonctionnant *in vivo*, sont responsables de la régulation de l'activité d'une variété d'enzyme y compris la XOR. De même, Nishino et ses collaborateurs (1983 et 1986) ont montré que des enzymes telles que la rhodanèse ou la mercapto-pyruvate-soufre transférase peuvent catalyser l'interconversion des formes sulfo et desulfo de la XOR en présence de réactifs thiols.

La proportion de l'enzyme démolybdo présente dans les préparations de la XOR est très variable et paraît refléter le statut alimentaire de l'animal (Nishino *et al.*, 1974; Itoh *et al.*, 1978). Cette forme de la XOR est très répandue dans le lait humain (95 %; Godber *et al.*, 1997). En utilisant la xanthine comme substrat, l'activité de la XOR du lait humain (XOR-h) est beaucoup plus faible que la XOR du lait bovin ou du foie (<1%). Par contre, les activités de ces enzymes avec le NADH, comme substrat reducteur, sont comparables (Abadeh *et al.*, 1992; Abadeh, 1993; Sanders *et al.*, 1997) ce qui n'est pas étonnant. En effet, les électrons cédés par le NADH ne passent pas par le site à Mo et sont directement transférés au substrat oxydant au niveau du centre FAD (Bray, 1975; Schopfer *et al.*, 1988; Hunt et Massey, 1994).

Comparé au lait, le colostrum humain contient moins de formes inactives de XOR comme en témoigne l'activité spécifique élevée (Brown *et al.*, 1995). L'activité de la XOR dans le lait humain serait soumise à un contrôle post-transcriptionnel probablement par des facteurs endogènes tels que les hormones (stéroïdes en particulier) à travers un système de sulfuration/désulfuration (Brown *et al.*, 1995). Un tel contrôle doit être lié à la fonction de la XOR dans le lait humain. La XOR, associée à la lactoperoxydase, est suggérée d'avoir un effet bactéricide par les radicaux libres oxygénés qu'elle produit. Cette action peut avoir un rôle dans la protection de l'intestin du nouveau-né ou de la glande mammaire elle-même (Bjork et Claesson, 1979; Moldoveanu *et al.*, 1982) mais jusqu'à présent le rôle de la XOR dans le lait humain n'est qu'hypothétique (Brown *et al.*, 1995).

1.5 Interconversions xanthine déshydrogénase/xanthine oxydase

L'activité oxydase de la XOR fut découverte depuis près d'un siècle (Spitzer, 1899). En revanche, la découverte de l'activité déshydrogénase est relativement récente (Bray, 1963) vue l'instabilité de cette forme d'enzyme chez les mammifères. En 1968, dans une étude sur des homogénats frais de foie de rat, Della Corte et Stirpe ont observé que l'oxydation de la xanthine augmente considérablement en présence du NAD^+ . Si le surnageant de ces homogénats est conservé -20°C ou traité aux protéases, la production du NADH diminue alors que la consommation de l'oxygène augmente (Della Corte et Stirpe, 1968a,b). Ces auteurs ont conclu que la XOR du rat se présente sous deux formes; oxydase (XO ou type O) qui utilise l' O_2 moléculaire et une forme déshydrogénase (XDH ou type D) qui utilise le NAD^+ comme substrat oxydant et que la forme D est convertie en forme O

par conservation à -20 °C, par protéolyses ou par d'autres traitements (par les solvants organiques ou par incubation anaérobie) (Stirpe et Della Corte, 1969).

Le dithioerythritol (DTE), un réducteur des ponts disulfures, peut prévenir et même inverser la conversion de la XDH en XO induite par différents traitements à part la protéolyse qui est irréversible (Figure 7). De même le 4,4' dithiodipyridine (DTDP) peut convertir, d'une manière réversible, l'enzyme de la forme D en forme O (Saito et Nishino, 1989) (figure 7a). A la lumière de ces observations, il a été conclu que la XDH peut être convertie en XO de manière réversible par oxydation des groupements sulfhydryls ou irréversible par protéolyse (Della Corte et Stirpe, 1972). Ceci a rendu possible la purification de la XOR sous forme déshydrogénase par addition du DTE, ou autre réducteur, à l'échantillon.

In vivo, dans les tissus du rat et d'autres mammifères, la XOR est présente principalement sous forme déshydrogénase et sa conversion en oxydase survient lors de la purification (Battelli *et al.*, 1972). Une fraction, généralement moins de 10 %, est toujours présente dans les préparations de la XOR des mammifères sous forme oxydase irréversible (Kaminski *et al.*, 1986; Hunt et Massey, 1992). Par contre, la XOR de poule est uniquement sous forme déshydrogénase non-convertible (Sato *et al.*, 1995). La XDH aviaire et celle des mammifères réagissent faiblement avec l'O₂ (3-4 % de l'activité avec le NAD⁺). Cette activité est presque totalement inhibée par le NAD⁺. D'autre part, l'activité déshydrogénase de la forme oxydase est négligeable (Nakamura et Yamazaki, 1982; Hunt *et al.*, 1993).

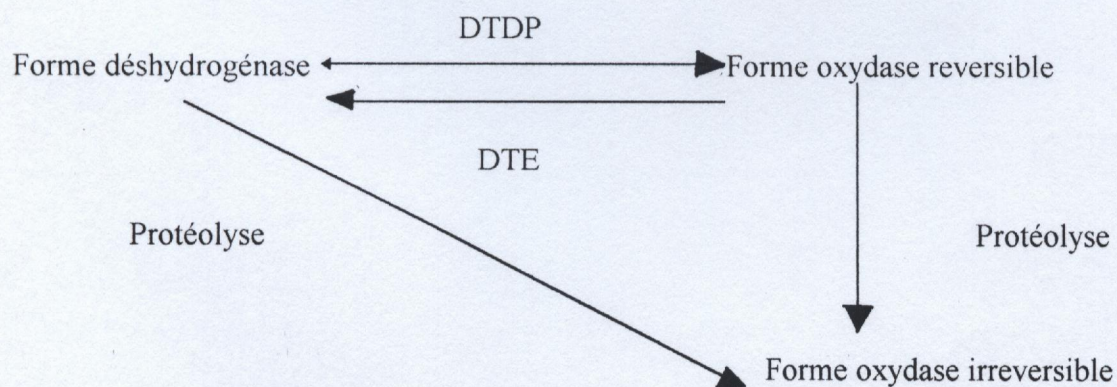


Figure 7a: Interconversion entre la XDH et la XO (Powell, 1995).

Une comparaison cinétique des deux formes de la XOR montre que les V_{max} (de l'activité déshydrogénase de la forme D et de l'activité oxydase de la forme O) sont très proches (Nishino et Tamura, 1991). Ceci indique que la vitesse des deux réactions est limitée par la même étape qui est la libération du produit d'oxydation de la xanthine, l'urate (Nishino et Tamura, 1991) et indique, encore, que l'environnement autour du centre à Mo est légèrement différent ou identique dans les deux formes (Hunt et al., 1993).

La XDH et la XO diffèrent par leurs spécificités vis-à-vis des substrats oxydants qui acceptent les électrons à partir du FAD. Des différences notables dans la structure protéique environant le FAD ont été révélées par les propriétés spectrales des enzymes contenant des analogues de FAD (Massey et al., 1989; Saito et al., 1989). Ces analogues, (6 ou 8 mercapto, 6 ou 8 OH) avec leurs groupements ionisables (SH ou OH) peuvent exister sous forme neutre ou anionique (Saito et al., 1989) et constituent, de ce fait, des sondes utiles pour l'étude du site FAD. La XO stabilise plutôt les formes anioniques des analogues de FAD. Par contre, la XDH préfère la liaison des formes neutres probablement à cause de l'apparition d'une charge négative dans le site de liaison du FAD (Saito et al., 1989). Une telle charge serait responsable de l'abaissement du potentiel redox du FAD qui approche alors le potentiel du couple $NAD^+/NADH$ et la réaction du FAD avec le NAD^+ et le NADH devient par conséquent possible (Hunt et al., 1993; Nishino, 1994).

La conversion reversible de la XDH (du rat) en XO s'accompagne de l'oxydation de huit groupement sulfhydryls (Saito, 1987) qui ne sont pas nécessairement tous essentiels à cette conversion. Seulement trois cysteines (Cys535, Cys992 et Cys1324) semblent en effet des candidats pour les résidus responsables de la conversion XDH/XO (Sato et al., 1995). La comparaison de la structure primaire de la XO du rat et celle de la XDH de poule révèle que le résidu Cys535 est conservé entre les deux enzymes alors que les résidus Cys992 et Cys1324 sont respectivement remplacés par l'arginine et la phenylalanine dans la XDH de la poule (Figure 8). Cette différence pourrait expliquer la non-convertibilité de la XDH en XO par les agents oxydants des groupements sulfhydryls (Sato et al., 1995).

Les activités de la XO reversible et la XO irreversible sont comparables (Nakamura et al., 1978). Les protéases entraînent apparemment les mêmes changements conformationnels autour du site de liaison du FAD que l'oxydation des groupements sulfhydryls (Massey et al., 1989; Saito et al., 1989; Amaya et al., 1990). La trypsine convertit irréversiblement la XDH en XO sans libérer de fragments peptidiques. La

trypsine produit des encoches au niveau de l'enzyme dont les fragments protéolytiques, au nombre de trois, restent fortement liés (Amaya *et al.*, 1990) comme représentés ci-dessous : (Figure 7b).

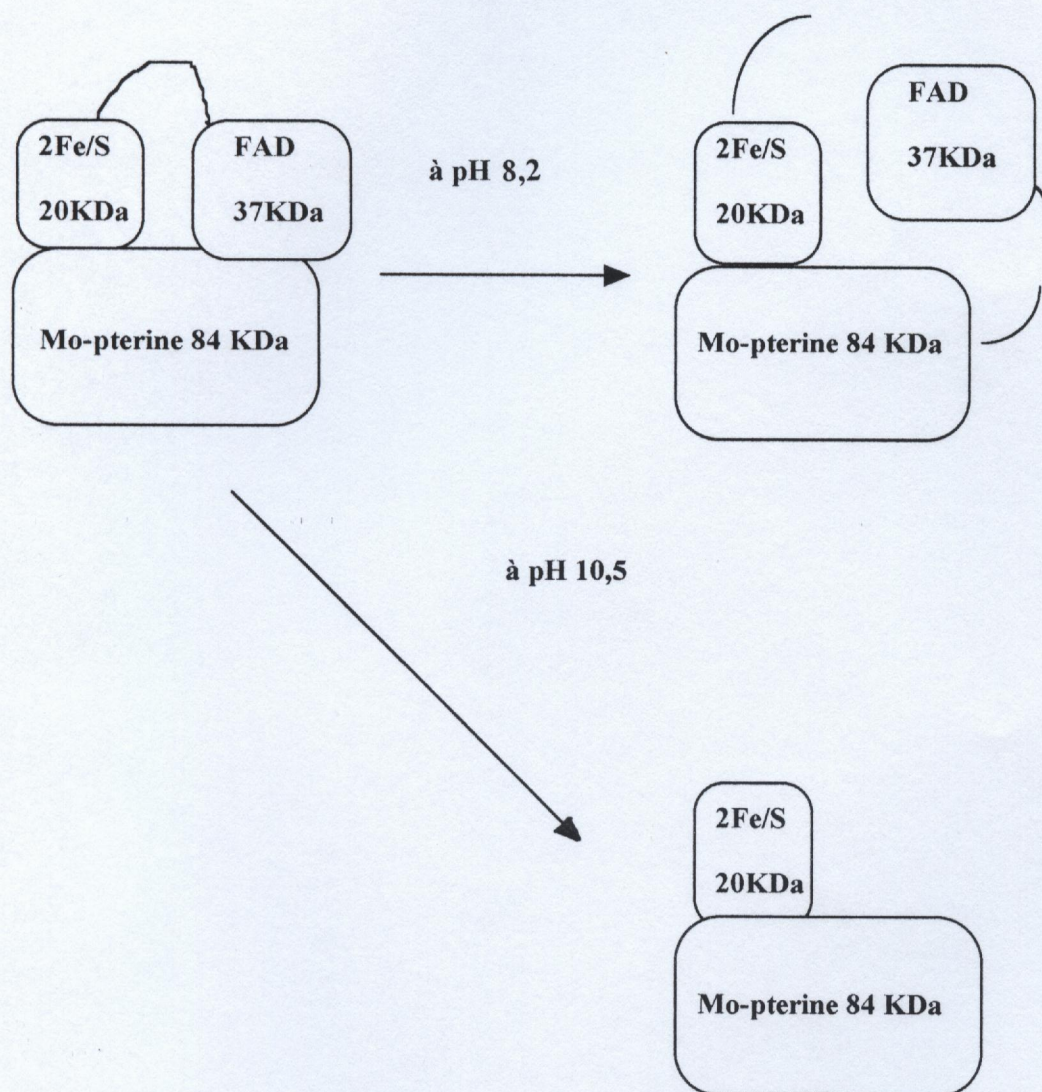


Figure 7b: Modèle de la structure en domaine de la XDH de poule après digestion enzymatique à des pH différents (D'après Sato *et al.*, 1995)

6	TGDELVFFVNGKKVVEKDVPETLLTYLRRKLGCGTKLGC GEGGCGAC	55	Poule XDH
2	TADLVFFVNGKKVVEKNADPETLLVYLRRKLGCGTKLGC GEGGCGAC	51	Rat XDH
56	TVMISKYDPFQKKILHHTANACLPICALHHVAVTTVEGIGNTKSRLHPA	105	
52	TVMISKYDRLQNKIVHFSVNACLAPICSLHHVAVTTVEGIGNTQ.KLHPV	100	
106	QERIAKSHGSQCGFCTPGIVMSMYTLLRNKPKPKMEDIEDAFQGNLCRCT	155	
101	QERJARSHGSQCGFCTPGIVMSMYTLLRNQPEPTVEEIEENAFQGNLCRCT	150	
156	GYRPILEGYRTFAVDSNCCGKAANGTGCCHSKGENSMNGGCCGGKANGPG	205	
151	GYRPILQGFRTFAKDGGCCGGSGNNPN	177	
206	CCMNEKENVTM.MSSSLFDSSEFQPLDPTQEPIFPPELMTQRNKEQKQVC	254	
178	CCMNQTKDQTVSLSPSLFNPEDFKPLDPTQEPIFPPELLRLKDTPQKKLR	227	
255	FKGERVMWQPTTLQELVALKSQYPNAKL VVGNTVEGIEMRLKNMLYPVI	304	
228	FEGERTWQASTMEELDLKAQHPDAKL VVGNTVEIGIEMKFKNMLFPLI	277	
305	LAPAWIPEMNAVQQTETGITFGAACTLSSVEEVLKAVAELPSYKTEIFQ	354	
278	VCPAWIPELNSVVHGPEGISFGASCP.LSVESVLAEEIAKLPEQKTEVFR	327	
355	AALEQLRWFAGPQIRNVAALGGNIMTASPISDLNPVLMASGSKLTLISME	404	
328	GVMEQLRWFAGKQVKSVASIGGNITASPISDLNPVFMASGAKLTLVSRG	377	
405	GKRTVMMDEKFFTGYRKTIVKPEEVLLSVEIPYSKEGEYFSAFKQAYRRE	454	
378	TRRTVRMDHTFFPGYRKTLLRPEEILLSIEIPYSKEGEFFSAFKQASRRE	427	
455	DDIAIVTCGMRVLFQHGTSRVQEVKLSYGGMAPTTILALKTCRELGRDW	504	
428	DDIAKVTSGMRVLFKPGTIEVQELSLCFGGMADRTISALKTTTPKQLSKSW	477	
505	NEKLLQDACRLLAGEMDLSPSAPGGMVEFRRTLTLSTFFKFYLTVLQKLS	554	
478	NEELLQSVCAELAEELQLAPDAPGGMVEFRRTLTLSTFFKFYLTVLQKLG	527	
555	KDQNGPNNLCEPVPNYISATELFHKDPIASTQLFQEVPRGQLVEDTVGR	604	
528	RA..DLEDMSGKLDPTFASATLLFQKDPPANVQLFQEVPKDQSEEDMVGR	575	
605	PLVHLSAAKQACGEAVYCDDIPHYENELYTLVTSTQAHAKILSIDASEA	654	
576	PLPHLAANMQASGEAVYCDDIPRYENELSLRLVTSTRAHAKITSIDTSEA	625	
655	QSVPGFVCVFSKDVPGSNITGIANDETVAEDVVTVCVGHII GAVIADTQ	704	
626	KKVPGFVCFLTAEDVPNSNATGLFNDETFAKDEVTCVGHII GAVVADTP	675	
705	EHSRAAKAVKIKYEELKPIVTIQEAIEQQSFIPKRIKGDVNKGFE	754	
676	EHAQRAARGVKITYEDLPAITIQDAINNNSFYGSEIKIEKGD LKKGFSE	725	
755	SDHILEGEMHIGGQEHFYLETHTLAVPKGEDGEMELFVSTQNL MKTQEF	804	
726	ADNVVSGELYIGGQEHFYLETNCTI AVPKGEAGEMELFVSTQNT MKTQSF	775	

805 TASALGVPSNRIVVRVKRMGGGFGGKETRNTILTTVVAVAAFKTGRPVRC 854
 776 VAKMLGVDPNRIIVVRVKRMGGGFGGKETRSTVVSTALALAAHKTGRPVRC 825

 855 MLDRDEDMLISGGRHPFLGRYKVGFMKNGKIKSLEVSYYSSNGGNSADLSH 904
 826 MLDRDEDMLITGGRHPFLAKYKVGFMKTGTVVVALEVAHFSNGGNTEDLSR 875

 905 GVMDRALLHLDNSYNIPNVSIMGFICKTNLSSNTAFRGFGGPQGMMAEC 954
 876 SIMERALFHMDNAYKIPNIRGTGRICKTNLPSNTAFRGFGGPQGMMLIAEY 925

 955 WMSDLARKCGLPPEEVRKINLYHEGDLTHFNQKLEGFTLRRCWDECLSSS 1004
 926 WMSEVAITCGLPAEEVRRKNMYKEGDLTHFNQKLEGFTLPRCWDECIASS 975

 1005 NYHARKKLIEEFNKQNRWKKRGMCIPTKFGISFTVPFLNQAGALVHVYT 1054
 976 QYLARKREVEKFNRENCWKKRGLCIPTKFGISFTLPFLNQGGALVHVYT 1025

 1055 DGSVLLTHGGTEMGQGLHTKMIQVASRSLGIPTSKIYISETSTNTVPNTS 1104
 1026 DGSVLLTHGGTEMGQGLHTKMOVASRALKIPTSKIHISSETSTNTVPNTS 1075

 1105 PTAASVSADINGMAVHNACQTILKRLEPIKQSNLKGSWEDWIKTAYENCI 1154
 1076 PTAASASADLNGQGVYEQQTILKRLEPFKKKKPTGPWEAWVMDAYTSV 1125

 1155 SLSATGFYRIPDVGYNFETNKGKPFIIYFSYGVACSEVEIDCLTGDHKNIR 1204
 1126 SLSATGFYKTPNLGYSFETNSGNPFHYFSYGVACSEVEIDCLTGDHKNLR 1175

 1205 TDIVMDVGTSLNPAIDIGQIEGAFVQIGLFTMEELRYSPEGNLYTRGPG 1254
 1176 TDIVMDVGSSSLNPAIDIGQVEGAFVQGLGLFTMEELHYSPEGLHTRGPS 1225

 1255 MYKIPAFGDIPTEFYVSLLRDCPNKAIYSSKAVGEPPLFLSASVFYAIK 1304
 1226 TYKIPAFGSIPIEFRVSLLRDCPNKRAIYASKAVGEPPLFLASSIFFAIK 1275

 1305 DAIYSAREDSG..VTEPFRLDSPATPERIRNACVDFTTKMCPSAEPGTFK 1352
 1276 DAIRAARAQHGDNAKQLFQLDSPA¹PEKIRNACVDQFTTLCVTGVPENCK 1325

 1326 SWSVR 1330

Figure 8 : Alignement des séquences, amino-acides, de la XDH du foie de rat et la XDH du foie de la poule (D'après Amaya *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1995).

1.6 Inhibiteurs de la xanthine oxydoréductase

Les inhibiteurs de la XOR furent initialement conçus pour le contrôle de l'hyperuricémie associée à la goutte (Elion *et al.*, 1963). L'étude *in vitro* des mécanismes d'action de ces inhibiteurs a permis, par ailleurs, d'éclaircir certaines propriétés de l'enzyme (Massey *et al.*, 1970 a,b). Selon Hille et Massey (1981), les inhibiteurs de la XOR sont regroupés en deux catégories :

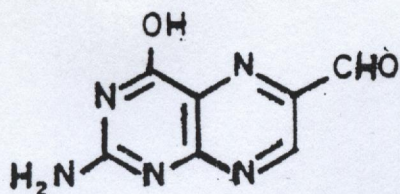
1) Des analogues de substrat : molécules présentant une structure plus ou moins proche de celle des substrats puriniques. Ce groupe renferme les pyrazolo [3,4-d] pyrimidine (dont le plus important est l'alloxanthine), les ptéidines et certains hétérocycles aromatiques (Hille et Massey, 1981, 1985).

2) Des molécules sans relation structurale particulière avec les substrats physiologiques de l'enzyme. Ce groupe renferme de petites molécules telles que le cyanure, l'arsénite, le méthanol et la formaldéhyde et (Hille et Massey, 1981, 1985). Bien que ces molécules n'inhibent pas exclusivement la XOR, elles interagissent de manière spécifique avec l'enzyme (Hille et Massey, 1981).

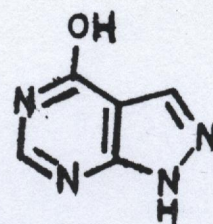
Tous les inhibiteurs de la XOR, cités, agissent au niveau ou près du site à molybdène en interférant dans la réaction de l'enzyme avec les substrats réducteurs. Le site à Mo est en fait assez ouvert pour accommoder une variété de molécules (Hille et Massey, 1981; Hille et Massey, 1985).

1.6.1 Analogues de substrats

Le premier inhibiteur puissant de la XOR à être découvert fut un produit de la dégradation photolytique de l'acide folique, le 2-amino-4-hydroxy-6 formyl ptéridine appelé également le 6-ptéridil aldéhyde (Kalckar *et al.*, 1948., Kalckar et Klenow, 1948a, b) (Figure 9). La liaison du 6-ptéridil aldéhyde au site Mo de la XOR active est si forte ($K_i \approx 10^{-9}$ M) que des quantités substoichiométriques de l'inhibiteur suffisent à inhiber complètement l'enzyme apportant ainsi une première preuve de l'existence de formes non fonctionnelles de l'enzyme (Lowry *et al.*, 1948). Le 6-ptéridil aldéhyde est lentement oxydé par la XOR en acide 6-ptéridil carboxylique qui forme un complexe particulièrement fort avec le $\text{Mo}^{(IV)}$ (Malthouse *et al.*, 1981; Hille et Massey, 1985).



6 - pteridyl aldehyde



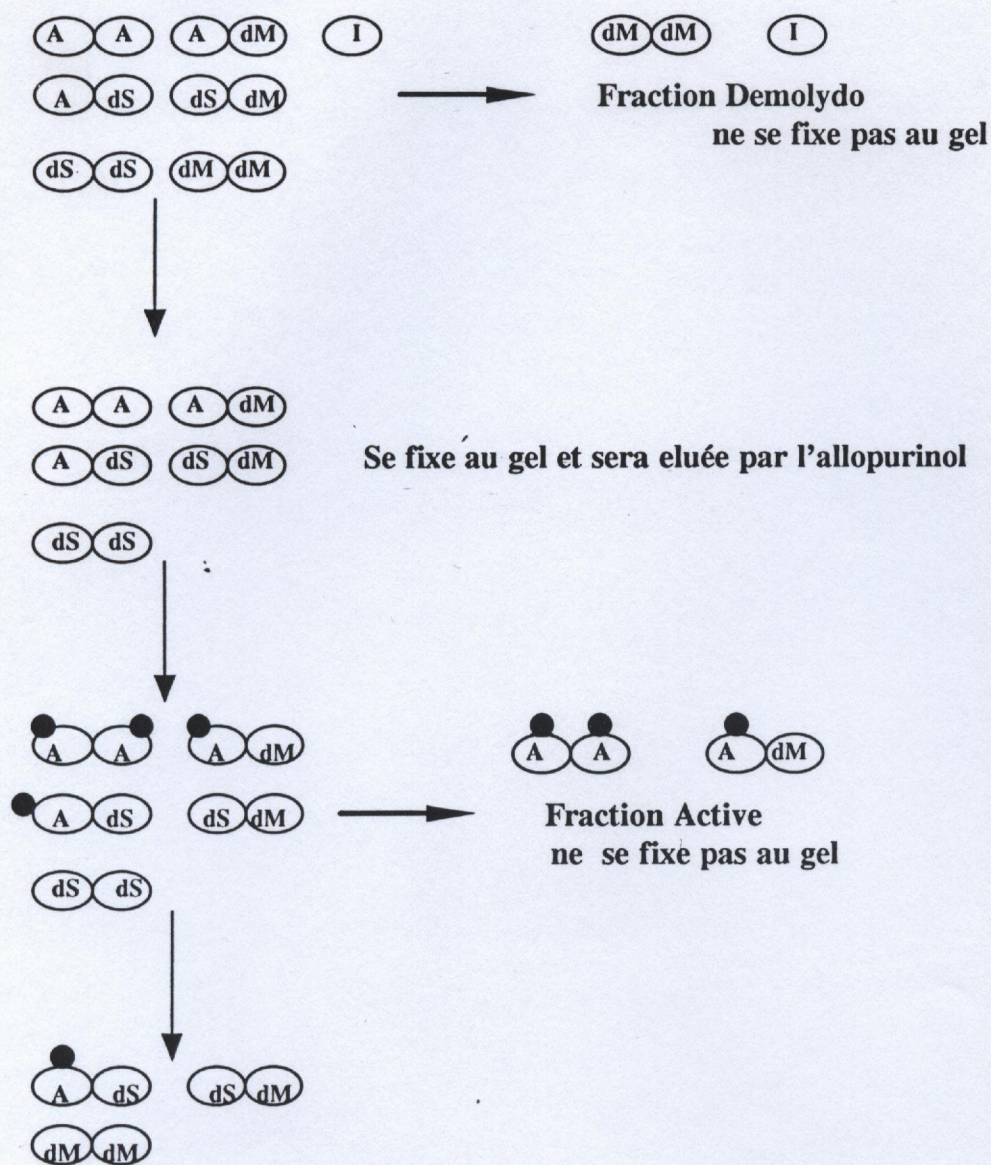
Allopurinol

Figure 9 : Structures de deux inhibiteurs puissants de la XOR

Parmi les pyrazolo [3,4-d] pyrimidines, analogues de purines, l'allopurinol est sans doute le plus important (Figure 9). Cet inhibiteur puissant a été largement utilisé en clinique et en recherche (Elion *et al.*, 1963, 1966; Rundles *et al.*, 1969, Kooij, 1994). L'allopurinol est un médicament cliniquement efficace, tolérable et avec des effets secondaires réduits. Ces propriétés ont rendu l'allopurinol un médicament de choix pour le traitement de la goutte et les lésions post-ischémiques (Kooij, 1994).

L'allopurinol, analogue de l'hypoxanthine est oxydée par la XOR en un dérivé 4,6-dihydroxyl, l'alloxanthine appelé encore l'oxypurinol (Elion *et al.*, 1966) qui se lie étroitement ($K_i \approx 3.10^{-8}$ M) au Mo réduit au niveau du site actif de l'enzyme (Massey *et al.*, 1970 a). Le complexe molybdène réduit-alloxanthine, ainsi obtenu, est stable à l'air pour des heures mais se réoxyde rapidement en présence du ferricyanure libérant l'alloxanthine et réactivant l'enzyme (Hille et Massey, 1985; Hille, 1992).

La liaison de l'alloxanthine au Mo réduit de la XOR active fut à la base de développement de procédés chromatographiques pour la séparation de la forme molybdo active de la forme démolybdo ou desulfo inactive (Edmondson *et al.*, 1972; Nishino *et al.*, 1981; 1986; Nishino et Tsushima, 1986; Ventom *et al.*, 1988) (Figure 10).



Fraction résiduelle.

Se fixe au gel et elle est éluée par l'allopurinol ou $P_2O_7^{4-}$

Figure 10 : Separation de la XOR molybdo active de la XOR demolybdo ou desulfo inactives. Schéma représentant les différentes formes dimériques dans la xanthine oxydoréductase et leur comportement lors d'une chromatographie d'affinité en gel de folate. (Les paires de cercles représentent les deux demis de l'enzyme dimer. A représente l'enzyme active, dS et dM représentent les formes inactives, desulfo et demolybdo, de l'enzyme. I représente les impuretés et ● représente les molécules d'allo xanthine fixées sur le site actif de l'enzyme). (D'après Ventom *et al.*, 1988).

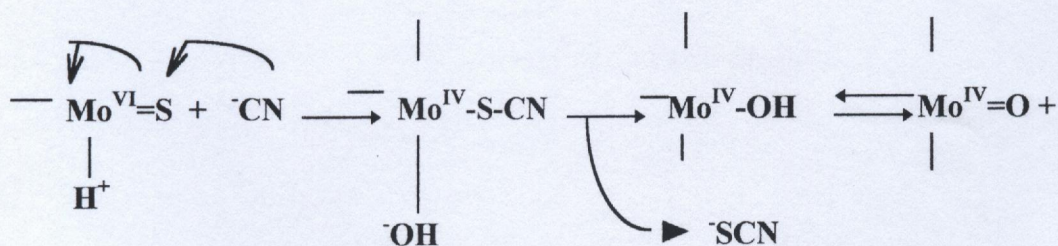
1.6.2 Autres inhibiteurs de la xanthine oxidoréductase

L'inhibition de la XOR par le cyanure fut initialement notée par Dixon et Keilin (1936). Cette inhibition résulte de la libération d'un atome de soufre, catalytiquement essentiel, du centre à Mo sous forme de thiocyanate (Massey et Edmondson, 1970) plutôt d'une modification covalente de l'enzyme (Fridovich et Handler, 1958). L'enzyme inactive obtenue par cyanolyse est identique à la forme desulfo trouvée dans les préparations standards de l'enzyme (Hille et Massey, 1981 et 1985).

En 1970, Massey et Edmondson ont émis l'hypothèse que le soufre cyanolabile serait présent comme un atome terminal d'un groupe persulfure lié à l'enzyme dans le voisinage du Mo. Ce persulfure serait cyanolysé par la réaction suivante :



Plutôt un autre modèle a été proposé (Gutteridge *et al.*, 1978; Bray *et al.*, 1979), où le soufre essentiel (cyanolabile) constitue un ligand sulfo terminal au Mo (-Mo=S) et réagit avec le cyanate selon la séquence suivante:



Selon ce modèle, le groupement Mo=S dans le site actif est remplacé par un Mo=O conduisant à la forme desulfo inactive. La forme desulfo non fonctionnelle de l'enzyme peut être réactivée par incubation avec des composés soufrés tels que le sulfure de sodium (Na_2S) sous des conditions réductrices (Massey et Edmondson, 1970; Wahl et Rajagopalan, 1982). Cependant, il a été noté que l'incubation de l'enzyme cyanolysée avec le Na_2S entraîne une restauration de seulement 50 % de l'activité enzymatique initiale. D'autre part, le traitement par le Na_2S de l'enzyme partiellement inactive telle que purifiée n'augmente pas significativement l'activité enzymatique (Massey et Edmondson, 1970). Il semble qu'une réactivation complète ne soit possible qu'en présence de médiateurs d'oxydoréduction tels que le viologène pour maintenir le Mo dans un état réduit (Hille, 1994).

Mackler et collaborateurs (1954) étaient les premiers à décrire l'inhibition de la XOR par l'arsenite. Plutard, Coughlan et ces collaborateurs (1969) ont observé que les effets inhibiteurs du cyanure et de l'arsenite étaient mutuellement exclusifs et ont conclu que l'arsenite, à l'instar du cyanure, interagit avec le molybdène. L'effet de l'arsenite sur le Mo se manifeste par une élévation du potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}$ (Stewart *et al.*, 1984) et par conséquent une perturbation de la distribution des électrons introduits par le substrat réducteur entre les différents centres redox. En effet, dans le complexe Mo-arsenite partiellement réduit, les électrons qui normalement devraient occuper l'un des deux centres Fe-S ou le FAD se trouvent préférentiellement dans le site à Mo le maintenant ainsi dans un état redox non réactif : incapable d'être réduit davantage, (Stewart *et al.*, 1984). Le site d'interaction de l'arsenite a été proposé comme étant le soufre essentiel avec une structure Mo-S-AsO_2^{2-} (George et Bray, 1983). Cependant, la capacité de l'arsenite de se lier aussi fortement à l'enzyme native qu'à l'enzyme desulfo écarte une telle hypothèse (Stewart *et al.*, 1984). Les études d'absorption des rayons X indiquent que l'atome d'arsenic est situé à 3 Å près de l'atome Mo et coordonné à l'enzyme via une liaison Mo-S-As et un ligand thiolate (Hille et Massey, 1985).

Un autre site de liaison de l'arsenite avec la XOR réduite est le disulfure réductible par les agents réducteurs puissant (Hille et Massey, 1985). La liaison de l'arsenite au centre à Mo lui confère la capacité de réagir avec l'O_2 et même $\text{l'O}_2^{\cdot -}$ comme accepteurs d'électrons (Stewart *et al.*, 1985).

Il est notable qu'il n'y'a pas d'inhibition sélective ni pour la XO ni pour la XDH car aucun des inhibiteurs actuellement connus n'agit au niveau des sites spécifiques du FAD par lesquels les deux formes diffèrent (Kooij, 1994).

En plus des inhibiteurs de synthèse conventionnellement utilisés en clinique et en recherche, une variété de substrats tels que les aldéhydes (Morpeth et Bray., 1984; Bounds et Winston, 1991) Le NAD(P)H (Perez-vincent *et al.*, 1992), l'hypoxanthine en excès (Dixon et Thurlow, 1924 ; Rubbo *et al.*, 1991), et de produits tels que l'urate (Radi *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1993 a), le H_2O_2 et le $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Betcher-Lange *et al.*, 1979; Lynch et Fridovich, 1979; Tan *et al.*, 1993 a) sont également des inhibiteurs de la XOR.

A de fortes concentrations de substrat (xanthine ou hypoxanthine), la XOR se trouve largement dans un état réduit. En se liant à l'enzyme partiellement réduite, la xanthine élève le potentiel de centre à Mo vers lequel il se produit, par conséquent, un flux

électronique à partir des autres centres redox. Avec l'augmentation de la concentration des molécules enzymatiques avec un centre à Mo réduit (Mo^{IV}), la formation de complexes abortifs Mo^{IV} -xanthine devient prédominante. De même, la présence de l'enzyme dans un état réduit à de fortes concentrations de xanthine conduit au ralentissement de la libération de l'urate, qui est l'étape limitante de la vitesse de catalyse (Olson *et al.*, 1974). Dans ces conditions réductrices, le complexe Mo^{IV} -urate a tendance à persister et la vitesse globale de la réaction diminue (Hille et Massey, 1985).

La susceptibilité de la XOR à l'inhibition par excès de substrat, bien que acceptée durant des décennies comme étant une propriété intrinsèque de l'enzyme, vient d'être reconsidérée. En effet, Hausladen et Fridovich (1993) ont trouvé que l'inhibition observée au cours des dosages spectrophotométriques de l'activité de la XOR est probablement due à un artefact car il était possible de faire disparaître cette inhibition en faisant varier les conditions de dosage.

La XOR est inhibée par l'acide urique, produit d'oxydation de la xanthine. L'inhibition est de type un compétitif (Radi *et al.*, 1992). L'acide urique, en se liant au centre à Mo réduit, forme un complexe abortif inhibant ainsi l'enzyme à participer dans la demi-réaction réductive. Alternativement, l'inhibition peut être le résultat de la réversibilité d'une étape dans le mécanisme ping-pong des réactions catalysées par la XOR. Selon ce mécanisme, l'étape réversible consiste en la conversion de la xanthine en acide urique. Ainsi, à des concentrations assez élevées en acide urique, l'équilibre de la réaction peut être déplacé en faveur de la formation de la xanthine (Radi *et al.*, 1992).

1.7 Les produits de la xanthine oxydoréductase

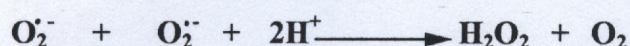
Les produits des réactions catalysées par la XOR sont aussi variés que les substrats. Cependant, seuls le O_2^- , H_2O_2 , l'acide urique le NAD^+/NADH formés *in vivo* sont d'une importance pathophysiologique.

1.7.1 Le superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

La XOR produit du O_2^- et du H_2O_2 par réduction univalente ou divalente de l'oxygène moléculaire. Il s'agit sans doute d'un aspect de haute importance du rôle de la XOR dans de nombreux cas pathologiques notamment dans les lésions associées à l'ischémie-réperfusion et l'inflammation. Le O_2^- et le H_2O_2 sont des espèces oxygénées

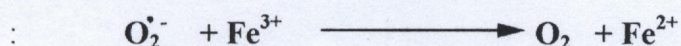
réactives (Reactive Oxygen Species) et contrairement au H_2O_2 , le $\text{O}_2^{\bullet -}$ est un radical libre. Un radical libre est une espèce chimique (molécule, atome ou ion) possédant un électron non apparié ou plus (Armstrong *et al.*, 1984). De ce fait, les radicaux libres sont très instables, donc très réactifs. La toxicité des radicaux libres réside dans leur capacité de déclencher des réactions radicalaires en chaînes qui s'étendent très rapidement à un grand nombre de molécules (Martinez-Cayuela, 1995; Morris *et al.*, 1995).

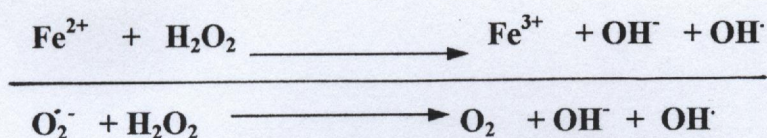
La demi-vie du $\text{O}_2^{\bullet -}$ dans l'eau est très brève, il est spontanément dismuté en H_2O_2 par une réaction qui est accélérée fortement par la superoxyde dismutase (SOD) (Fridovich, 1983) :



Bien que l'on s'accorde à penser que le $\text{O}_2^{\bullet -}$ exerce ses effets toxiques à travers des espèces secondaires radicalaires ou non, la toxicité du $\text{O}_2^{\bullet -}$ en lui même est certaine (Fridovich, 1983). En effet, le superoxyde est la base conjuguée d'un acide faible le perhydroxyl ($\text{HO}_2^{\bullet}$) dont le pKa est de 4,8 dans l'eau (Fridovich, 1983; Pelmont, 1988). Le perhydroxyl est capable de réagir avec une variété de composés comme oxydant ou réducteur (Fridovich, 1983; Pelmont, 1988). Bien que le perhydroxyl est un oxydant plus puissant que le superoxyde, aux pH physiologiques, la forme déprotonée ($\text{O}_2^{\bullet -}$) prédomine (Halliwell and Gutteridge, 1989). Le pKa du perhydroxyl est d'autant plus élevée que la constante diélectrique du milieu est faible. Ainsi, le passage du superoxyde dans un environnement à faible constante diélectrique, tels que les membranes, les micelles lipidiques ou l'intérieur des protéines globulaires s'accompagne de sa conversion en perhydroxyl (Fridovich, 1983). en outre, le pH adjacent des surfaces polyanioniques des membranes est largement plus faible que celui du milieu environant et au voisinage de ces surfaces, le superoxyde se trouve protoné en perhydroxyl (Fridovich, 1983).

Comparé au superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est moins réactif mais il est tout de même toxique pour les cellules vivantes. Le H_2O_2 passe facilement à travers les membranes biologiques et une fois dans le noyau il peut avoir des effets mutagènes (Pelmont, 1988; Martinez-Cayuela, 1995). La véritable menace par le $\text{O}_2^{\bullet -}$ et H_2O_2 aux cellules vivantes résulte de leur capacité d'engendrer le radical hydroxyl ($\text{OH}^{\bullet}$) hautement réactif par la réaction dite de Haber-Weiss





La réaction est catalysée par des métaux de transitions tels que le fer et le cuivre sous leurs formes réduites (Fridovich et Freeman, 1986; Martinez-Cayuela, 1995). A cet égard, le fer est plus redoutable vu son abondance dans les cellules et les liquides biologiques plus ou moins fortement lié aux protéines telles que la transferrine et la lactoferrine (Gutteridge *et al.*, 1983; Winterborn, 1988). Dans les conditions physiologiques, la concentration des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} à l'état libre est évidemment maintenue au niveau le plus bas possible, elle est nulle dans le plasma (Pelmont, 1988).

Le Radical hydroxyl ($\text{OH}^\bullet$) généré, par la réaction de Haber-Weiss, à partir du superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) est un oxydant extrêmement puissant. Il peut réagir pratiquement avec toutes les molécules, y compris les macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipides et carbohydrates), en les convertant en leurs radicaux correspondants par soustraction d'un atome d'hydrogène (Ross et Ross, 1977; Martinez-Cayuela, 1995). L'oxydation par le radical $\text{OH}^\bullet$ est particulièrement nocive pour les membranes cellulaires riches en acides gras polyinsaturés. L'oxydation d'un premier acide initie une réaction radicalaire en chaîne qui s'étend aux autres acides gras amplifiant ainsi la lésion primaire (Morris *et al.*, 1995).

Il a été rapporté que le radical $\text{OH}^\bullet$ peut être directement produit, par la XO, par réduction du H_2O_2 au niveau du site FAD (Kuppusamy et Zweir, 1989). Cependant, d'autres auteurs (Britgan *et al.*, 1990; Lloyd et Mason, 1990) insistent sur la nécessité d'ions métalliques, même en état de traces, et que le radical $\text{OH}^\bullet$ n'est produit que par la réaction de Haber-Weiss.

Dans les conditions physiologiques, le $\text{O}_2^{\bullet -}$ et le H_2O_2 sont constitutivement produits au cours du métabolisme cellulaire par des réactions d'oxydation diverses ou à travers des fuites dans le transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Fridovich, 1983; McCord, 1988). La concentration de ces espèces oxygénées réactives est maintenue à un niveau très bas et ils ont des rôles physiologiques (Remacle *et al.*, 1995).

La toxicité des espèces oxygénées réactives surgit quand ces dernières s'accumulent au delà de certaines concentrations. Pour y faire face, les cellules sont dotées de mécanismes de défenses antioxydants, principalement enzymatiques. Le système de

défense enzymatique renferme des superoxyde dismutases, des catalases et des peroxydases qui, en éliminant le O_2^- et le H_2O_2 empêchent surtout la formation du radical $OH^\bullet$ très toxique. De petites molécules telles que les vitamines C et E, l'urate et le glutathion peuvent également prendre part dans la protection contre les radicaux libres (Fridovich et Freeman, 1986; Kooij, 1994; Martinez-Cayuela, 1995). Ces systèmes sont, cependant, loin d'être parfaits et se trouvent rapidement dépassés dans certains cas pathologiques où les radicaux libres deviennent nettement toxiques (Fridovich, 1983; Fridovich et Freeman, 1986; McCord, 1988; Morris *et al.*, 1995).

1.7.2 L'acide urique

La XOR catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique. La dernière réaction constitue l'étape finale dans la voie de dégradation des purines chez les primates (Brown *et al.*, 1948). Chez les autres mammifères, l'acide urique est oxydé davantage en allantoin par l'urate oxydase (voir Fig.1, p.2). En plus de la réabsorption active au niveau des reins, l'absence de l'urate oxydase est probablement à l'origine des taux plasmatiques élevés (60-70 mg/l) en acide urique chez l'homme par rapport aux autres mammifères (Fanelli, 1977). La concentration de l'acide urique dans le plasma humain est très proche de la limite de solubilité et une augmentation conduit à la formation de cristaux d'acide urique qui se déposent, au niveau des articulations, sous forme d'urate de sodium provoquant une inflammation (Hyperuricémie associée à la goutte; Kelley *et al.*, 1989).

L'acide urique possède un pouvoir inhibiteur de la XOR. Sa concentration plasmatique est suffisante pour constituer un mécanisme de défense par lequel la production des espèces oxygénées réactives, par la XOR circulante, est atténuée (Tan *et al.*, 1993a). Par ailleurs, l'acide urique agit comme destructeur des radicaux O_2^- et $OH^\bullet$ produits par diverses enzymes, y compris la XOR, au cours de leurs cycles catalytiques (Ames *et al.*, 1981) ou par l'oxydation de nombreuses molécules biologiques notamment l'hémoglobine (Fridovich, 1983; Martinez-Cayuela, 1995).

L'action antioxydante de l'acide urique se manifeste par sa capacité de lier les métaux de transition, nécessaires à la réaction de Haber-Weiss, en formant des complexes (Davies *et al.*, 1986). De cette manière, l'acide urique peut empêcher la formation du radical $OH^\bullet$. L'acide urique constitue donc un mécanisme de défense antioxydant très

efficace chez l'homme en général et le fœtus en particulier dont les défenses enzymatiques n'accomplissent leur maturation que tardivement (Tan *et al.*, 1993a).

1.8 Distribution et localisation de la xanthine oxydoréductase

La XOR est largement distribuée entre les différentes espèces, des bactéries aux plantes et à l'être humain (Parks and Granger, 1986; Sandalio *et al.*, 1988; Kooij *et al.*, 1992 a, b). La XOR des mammifères est souvent associée avec le foie, les intestins grêles et les fluides tels que le lait (Della Corte et Stripe, 1972; Battelli *et al.*, 1972; Kooij *et al.*, 1992a; Bruder *et al.*, 1983; Zikakis *et al.*, 1983; Ichikawa *et al.*, 1992). Les études histobiochimiques de Kooij et coll. (1992a) ont montré que la XOR est présente uniquement dans les cellules sinusoidales hépatiques et dans les intestins grêles. Les études immunobiochimiques ont révélé par ailleurs l'association de cette enzyme avec les cellules épithéliales des glandes mammaires et les cellules endothéliales des capillaires de la plupart des tissus bovins (Jarash *et al.*, 1981, 1986; Bruder *et al.*, 1983) et humains (Bruder *et al.*, 1984; Hellsten-Westing, 1993; Moriwaki *et al.*, 1993). Ces résultats ne sont pas en concordance avec les études enzymologiques où l'activité de la XOR ne fut détectée que dans le foie et l'intestin grêle bien que quelques groupes de chercheurs ont rapporté la présence de faibles activités dans d'autres tissus humains (Bruder *et al.*, 1984; Grum *et al.*, 1989; Dejong *et al.*, 1990; Kooij *et al.*, 1992a; Abadeh *et al.*, 1992, 1993; Hellsten-Westing, 1993). Les travaux récents de Hellsten-Westing (1993) ont permis la localisation de la XOR dans les cellules vasculaires du muscle cardiaque et squelettique, dans les macrophages et les mastocytes. La présence et l'activité de la XOR dans les enterocytes du duodenum, dans les cellules sinusoidales du foie humain ont été publiés (Kooij *et al.*, 1992a; Moriwaki *et al.*, 1993). Par immunoprécipitation, Abadeh *et al.* (1993) ont purifié la XOR du cœur humain dont l'activité est 100 fois plus faible par rapport à celle purifiée du cœur de rat et ils ont suggéré que la majorité de la XOR-h est sous forme desulfo inactive.

La localisation intracellulaire de la XOR est principalement cytoplasmique (Jarash *et al.*, 1981; Bruder *et al.*, 1984; Ichikawa *et al.*, 1992; Moriwaki *et al.*, 1993) bien que son association à la membrane (Hellsten-Westing, 1993; Adachi *et al.*, 1993; Fukushima *et al.*, 1995) et au noyau cristallin des peroxysomes (Angermuller *et al.*, 1987) a été rapportée. Sa présence nucléaire n'a pas été confirmée (Ichikawa *et al.*, 1992).

Récemment, et par l'utilisation du northern blot, le gène codant pour la XOR fut détecté dans tous les tissus humains (Xu *et al.*, 1994).

1.9 Rôle des radicaux libres dans certaines maladies humaines

L'oxygène est essentiel pour les organismes aérobies du fait qu'il est l'accepteur terminal des électrons pendant la respiration, source principale d'énergie chez ces organismes. Cependant, l'oxygène est toxique à des concentrations supérieures que celle dans l'air. Certaines expériences ont montré l'effet nuisible de cet élément même à une concentration de 21 % (Armstrong *et al.*, 1984; Clark et Cowden, 1989; Halliwell *et al.*, 1989 et 1992). La question qui se posait était la cause de la toxicité de l'oxygène. On pensait que l'oxygène, à de fortes concentrations, inhibe les enzymes cellulaires mais l'inhibition était très lente pour causer une telle toxicité.

En 1954, Gershman and Gilbert ont proposé que les effets toxiques de l'oxygène sont en fait dus à la formation de radicaux libres (Gilbert, 1981). Une telle hypothèse n'était pas complètement acceptée jusqu'à la découverte de la superoxyde dismutase, enzyme qui catalyse la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Fridovich., 1975, 1978 et 1983; McCord et Fridovich, 1977; Halliwell et Gutteridge, 1989). Depuis, les travaux de McCord et Fridovich ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs qui jusqu'à présent étudient le rôle des radicaux libres oxygénés dans différents cas physiologiques et pathologiques.

Une production non-contrôlée de radicaux libres conduit à un large spectre de destruction tissulaire engendrant des maladies diverses (détresse respiratoire chez les adultes, vieillissement, vasculites autoimmunes, atherosclerose, cancer, goutte, dystrophie musculaire, lésions et emphysèmes pulmonaires, arthrite rhumatoïde). Pour revue voir Martinez-Cayuela (1995). Vue sa capacité de catalyser les réactions produisant des radicaux libres La XOR a été impliquée dans ces maladies.

1.9.1 Rôle de la xanthine oxydoréductase dans l'inflammation

Les espèces oxygénées réactives (ROS) peuvent interagir avec les composantes de la membrane, telles que l'acide arachidonique, pour produire des lipides chimotactiques qui vont attirer plus de neutrophiles au site de l'infection amplifiant la réponse inflammatoire (Perez *et al.*, 1990). La capacité de la XOR de produire de l'acide urique, antioxydant plasmatique majeur est un aspect très important (Pfeffer *et al.*, 1994) et peut expliquer la régulation de la XOR par les agents anti-inflammatoires tels que $\text{INF-}\gamma$ (Powell, 1995; Page *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1997) et le dexaméthasone (Pfeffer *et al.*, 1994).

Les ROS sont d'importants activateurs de la transcription des gènes précoces: c-fos, c-myc, c-jun et β -actin (Winrow *et al.*, 1993). Les ROS de même peuvent activer le facteur NF- κ B (Schreck Baeuerle, 1991) qui contrôle l'expression de plusieurs cytokines (e.g. $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 et IL-2) et certaines protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Schreck Baeuerle, 1991) (Figure 11).

Il a été rapporté que les radicaux libres oxygénés, produits par la XOR, peuvent inactiver l'enzyme qui catalyse le catabolisme du facteur activateur de plaquettes (PAF, un agent proinflammatoire puissant), la PAF acetylhydrolase (Ambrosio *et al.*, 1994). La XDH, présente dans les cellules endothéliales synoviales (Stevens *et al.*, 1991), est rapidement convertie en XO (Allen *et al.*, 1987) lors de l'inflammation. Les ROS ainsi produits contribuent à la destruction du cartilage au niveau des articulations. Au cours de l'arthrite rhumatoïde, le synovium inflammé est sujet à des microhémorragies répétées d'où le dépôt du fer. les ions de fer catalysent la réaction duradical $\text{OH}\cdot$ qui a un pouvoir destructif, en réagissant pratiquement avec toutes les macromolécules. L'allopurinol, inhibiteur de la XOR, réduit une telle destruction.

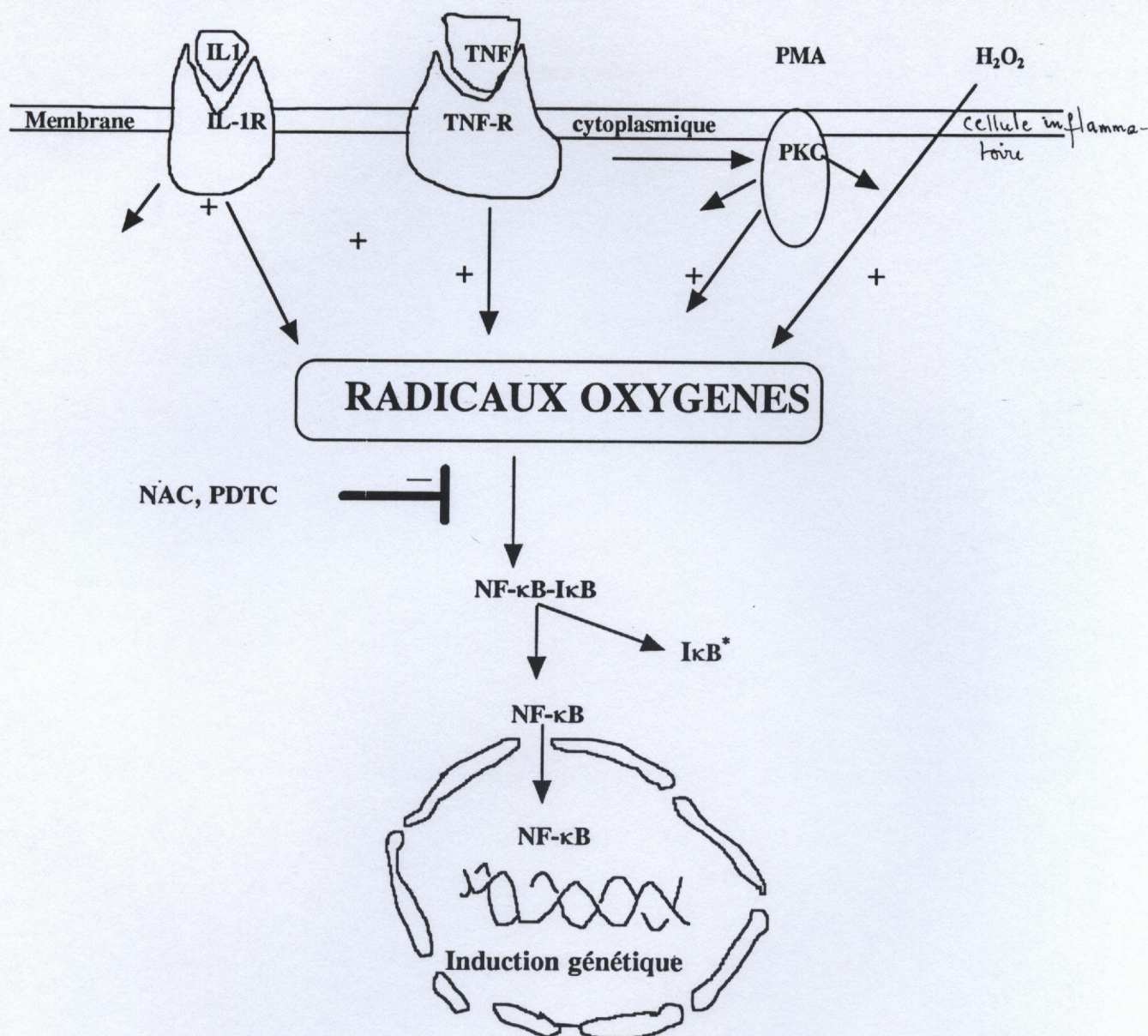


Figure 11 : Un modèle des radicaux libres oxygénés comme messagers secondaires pour l-interleukine 1 (IL-1), facteur nécrotique tumoral (TNF) et les esters phorbols PMA. Les petites flèches indiquent que les récepteurs membranaires peuvent avoir des effets pleiotropique. L'étoile sur IκB* représente une modification qui inactive IκB (Schreck et Baeuerle, 1991).

1.9.2 Rôle de la xanthine oxydoréductase lors de l'ischémie-réperfusion

Il a été proposé que la XOR intervient dans les lésions survenant lors de la réperfusion qui suit l'ischémie par les espèces oxygénées réactives qu'elle produit (Granger et al., 1981; McCord et Roy, 1982; McCord, 1985). Selon cette hypothèse, l'hypoxanthine, substrat de la XOR, s'accumule au cours de l'ischémie suite à la dégradation de l'ATP. Au même temps, la XDH est convertie en XO probablement par une protéinase calcium-dépendante (McCord et Roy, 1982). Avec la réoxygénation (réperfusion), la XO utilise l'hypoxanthine accumulée pour réduire l'oxygène en superoxyde et peroxyde d'hydrogène qui provoquent des lésions tissulaires (Figure 12).

Plusieurs données expérimentales semblent en faveur de cette hypothèse. Les radicaux oxygénés O_2^- et $OH^\cdot$ ont effectivement été détectés *in vivo* après réoxygénation des tissus ischémiques (Zweir et al., 1987). L'administration de l'allopurinol, un inhibiteur de la XOR, s'avère efficace quant à la prévention des lésions associées à l'ischémie-réperfusion (Alkizuki et al., 1985, Charlat et al., 1987). Lors de l'ischémie, la concentration plasmatique de l'hypoxanthine passe à 25 μM (Tan et al., 1995) contre 2 μM à l'état normal (Saito et Nishino, 1989). Cependant, la conversion de la XDH en XO reste controversée. Plusieurs auteurs ont souligné que la conversion de la XDH en XO lors de l'ischémie n'est pas importante (Wajner et Harkness, 1989; Gerber et al., 1989; Parks et al., 1988; Yokoyama et al., 1990). Il est possible que les niveaux élevés observés dans certaines expériences seraient dus à une contamination par les protéases lysosomiales, Nishino et Tamura, 1991).

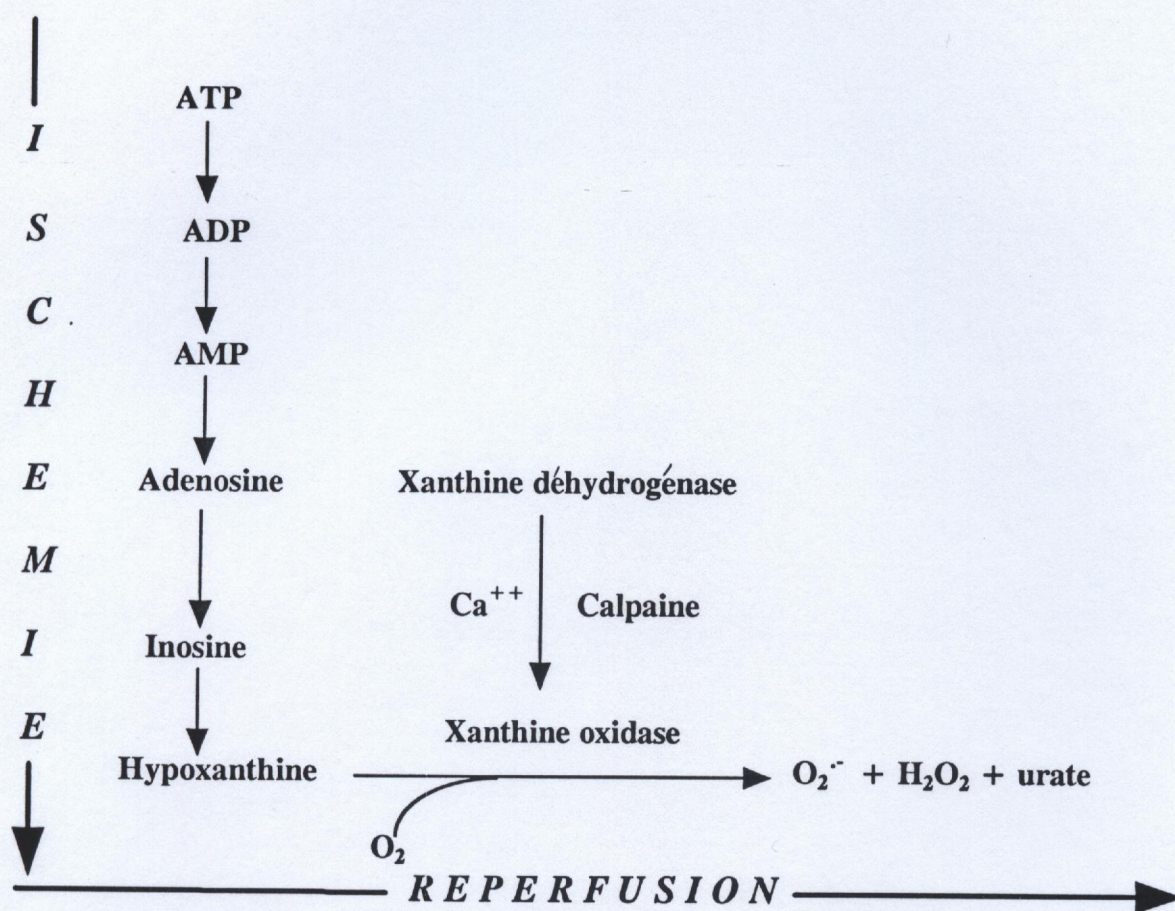


Figure 12 : Mécanisme de génération du superoxyde et de l'hydrogène peroxyde après l'ischémie et la réperfusion (D'après McCord., 1987).

On estime le pourcentage de la XO dans les cellules normales à 20 % de l'activité XOR totale. Ce pourcentage ne s'élève qu'à 30 % au maximum sous conditions ischémiques et ne saurait soutenir le rôle de la XOR dans les lésions survenant lors de la réperfusion. Un facteur important doit être souligné ici est le fait que la XDH est inhibée par le NADH qui s'accumule au cours de l'ischémie. Le NADH inhibe de manière compétitive la réduction du NAD^+ par la XDH. Ainsi, l'oxydation de l'hypoxanthine est assurée principalement par la XO, produisant les radicaux oxygénés (Kaminski *et al.*, 1986). Le O_2^- et le H_2O_2 sont également produits par oxydation du NADH (Nishino et Tamura, 1991; Sanders *et al.*, 1996; 1997). Cette réaction, bien que lente (Nishino et Tamura, 1991), est très importante car elle peut être catalysée même par certaines formes reconnues comme inactives (la forme démolybdo et desulfo) qui représentent jusqu'à 50 % de la XOR du foie de rat (Ikegami et Nishino, 1986), 60 % dans le lait bovin (Hart *et al.*, 1970; Bray, 1975; Ventom *et al.*, 1988) et 98 % dans le lait humain (Abadeh *et al.*, 1992, Abadeh, 1993, Godber *et al.*, 1997).

Dans les conditions physiologiques, les radicaux oxygénés, produits *in vivo* par la XOR et par d'autres systèmes, sont neutralisés mais malheureusement dans plusieurs cas pathologiques, tels que l'ischémie, leur production dépasse de loin la capacité de défense du tissu ischémique ce qui conduit à des lésions tissulaires (McCord, 1988).

En l'absence de données précises concernant le rapport NAD^+/NADH , la vitesse de production des radicaux oxygénés et la capacité des mécanismes de défenses anti- "radicaux libres" au cours de l'ischémie, l'évaluation du rôle de la XOR dans les lésions associées à l'ischémie-réperfusion reste difficile (Nishino et Tamura, 1991).

BUT DE CE TRAVAIL

Vue le pouvoir de la xanthine oxidoréductase de réduire l'oxygène moléculaire en radicaux libres oxygénés (le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène), un grand intérêt est actuellement accordé à l'étude de cette enzyme et son rôle physiopathologique chez les mammifères.

Le but de ce travail de recherche est :

- a) purification de la XOR du lait bovin et humain.
- b) étude physico-chimique comparative des deux types d'enzyme.
- c) étude comparative des activités NADH oxydase des deux types d'enzyme.
- d) étude du pouvoir de la XOR humaine, enzyme à faible activité vis-à-vis de la xanthine et des autres substrats qui nécessitent le centre molybdène, de produire des radicaux libres oxygénés en oxydant NADH.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 MATERIEL

Matériel biologique

Le lait bovin obtenu frais d'une ferme d'élevage à Ain Sfiha (Sétif) a été traité immédiatement. Le lait humain généreusement donné par des femmes volontaires est aussitôt congelé après lactation jusqu'au moment de son utilisation où il est rassemblé en batch. La collecte du lait humain a été faite sans égard aux facteurs pouvant influencer la constitution de ce dernier tels que le temps après la parturition, la prise de médicaments...

Réactifs chimiques

La xanthine, le NADH, le NAD⁺, l'allopurinol, l'oxypurinol, l'acide urique et le cytochrome c ont été acquis de la firme Sigma. Les sels et les autres réactifs ont été obtenus des firmes: Sigma, Merck, Fluka, Panreac et Prolabo.

Enzymes

La xanthine oxydase humaine faisant l'objet des études cinétiques a été procurée du Laboratoire de Biochimie du Dr. R. Harrison, Université de Bath (U.K.), par les soins du Dr. M. Benboubetra. La xanthine oxydase bovine utilisée comme standard est une préparation commercialisée par les laboratoires Biozyme (type XO-2) avec un rapport A_{280} / A_{450} de 5,3 à 5,6. La trypsine, la pepsine et la catalase sont des produits de Sigma. La chymotrypsine (A_4) est de Boehringer Mannheim GmbH.

Colonnes et matrices

Les colonnes utilisées sont de type Pharmacia. Le gel d'héparine ayant servi à purifier la xanthine oxydase bovine et humaine est constitué d'héparine insolubilisée sur des billes à 4% d'agarose (H6508, Sigma).

Le gel utilisé en chromatographie d'exclusion stérique (gel-filtration) est un ultrogel AcA34 (LKB) avec une gamme de fractionnement de 20.000 à 350.000. Les colonnes de Sephadex G25 (PD-10) utilisées pour le déssalage sont type Pharmacia.

Appareillage

Les centrifugations sont effectuées dans des centrifugeuses réfrigérées (3K30, Sigma pour les vitesses $> 3000 \times g$ et LU418 H pour les vitesses $< 3000 \times g$). Les activités, les cinétiques enzymatiques et les balayages sont menés en un spectrophotomètre UV-Visible (UV-1601 Shimadzu, Japon) à double faisceaux. Le dosage des protéines par la méthode de Macart et Gerbeaut (fixation du bleu de Coomassie en présence du SDS) à 595 nm est réalisé en un spectrophotomètre visible (Baush & Lomb, spectronic 70). L'électrophorèse est conduite en une unité verticale réfrigérée (LKB). Pour les chromatographies, un chromatographe (pompe péristaltique, détecteur, enregistreur, collecteur de fractions) de type LKB a été utilisé le long de l'étude.

2.2 METHODES

2.2.1 Purification de la xanthine oxydoréductase bovine

2.2.1.1 Préparation de l'extrait brut

L'extrait brut de la xanthine oxydoréductase (XOR) bovine est préparé à partir du lait frais selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982). Ces auteurs ont purifié la xanthine oxydoréductase bovine à partir de la crème au lieu du lait entier. Une modification à cette méthode a été apportée par Powell (1995) et consiste en un lavage préliminaire de la crème.

Tampon A : 0,2 M k_2HPO_4 , additionnée d'EDTA (1mM), Salicylate de Na (1,25mM) et du PMSF (0,1mM).

Tampon B : 25 mM MES, pH ajusté à 6,00 avec NaOH et additionné d'EDTA (1mM), de salicylate de Na (1,25mM) et de PMSF (0,1mM).

Le lait bovin frais est additionné de 1mM EDTA, 1,25 mM salicylate de Na et 0,1 mM PMSF et agité pendant 20 min. avant d'être centrifugé à 3.000g pour 30 min. à 6°C. Toutes les opérations ultérieures sont effectuées à 4°C. La crème obtenue

est resuspendue dans un volume égal de tampon A avec agitation durant 60 min. La suspension ainsi obtenue est centrifugée à $3.000 \times g$ (30 min.). La crème obtenue par cette dernière centrifugation est éliminée, la phase aqueuse est récupérée, filtrée sur laine de verre, mélangée progressivement avec 15% (V/V) de butanol froid (-20°C) et 15% (P/V) de sulfate d'ammonium sous agitation douce pendant 60min. Le mélange est ensuite centrifugé à $13.000 \times g$ pendant 20min. La phase lipidique flottante est éliminée et la xanthine oxydase est précipitée à partir de la phase aqueuse par addition encore de 20% (P/V) de sulfates d'ammonium et agitation douce pendant 60 min. Après centrifugation ($10.000 \times g$, 30min.), la couche supérieure d'une couleur brunâtre est collectée et resuspendue dans un petit volume de tampon B et dialysée pendant une nuit contre le même tampon. Les impurités insolubles sont éliminées par centrifugation à $26.700 \times g$ (60min). Le surnageant constituant l'extrait brut de la xanthine oxydase (bovine) est filtrée à travers une membrane de $0.22 \mu\text{m}$.

2.2.1.2 Chromatographie sur colonned'héparine

L'extrait brut de la XOR bovine dialysé contre le tampon B est appliqué avec un débit de 18ml/heure à une colonne d'héparine (1 cm x 6 cm) insolubilisée sur un gel d'agarose (CL) 4% préalablement équilibrée avec le même tampon. La colonne est lavée avec le tampon B jusqu'à ce qu'il ne reste plus de protéines ($A_{280} = 0$) dans le tampon de lavage. La xanthine oxydase bovine est éluée avec 0,1M NaCl dans le tampon B. La colonne est ensuite lavée avec 0,4M NaCl puis 1M NaCl pour éluer toutes les protéines. Les fractions contenant la xanthine oxydase pure sont combinées, concentrées en polyéthylène glycol (20.000), dialysées contre un tampon Na^+ -Bicine(50mM, p H 8,20)et conservées en aliquots à -20°C .

2.2.2 Purification de la xanthine oxydoréductase humaine

La XOR humaine est purifiée à partir de lait humain congelé. Le lait est laissé se décongeler à 4°C pendant une nuit. Les étapes de purification suivies sont les mêmes que celles décrites pour la xanthine oxydase bovine à part la chromatographie sur la colonne d'héparine. En effet, l'enzyme humaine se comporte d'une manière différente vis-à-vis de l'héparine. L'extrait brut de la XOR humaine est dialysé contre un tampon phosphate de sodium(25 mM, p H 7,4)contenant 1mM EDTA, 1,25mM salicylate de Na et 0,1mM PMSF (tampon héparine) et appliqué sur une colonne d'héparine équilibrée avec le même tampon. Les protéines non liées sont

éliminées lors des lavages avec le tampon héparine, celles faiblement liées avec le tampon héparine additionné de 0,1M NaCl. La XOR humaine est éluée avec le tampon héparine contenant 0,4 M NaCl.

2.2.3 Contrôle de la pureté des préparations enzymatiques

La pureté de la XOR préparée, bovine ou humaine, est évaluée par différents critères à savoir

a)- la forme du spectre d'absorption en UV/Visible. L'enzyme purifiée est bien dialysée contre un tampon Na^+ -Bicine (50mM, pH 8,20). Le spectre de l'enzyme en UV- Visible est enregistré entre 700 et 250 nm en un spectrophotomètre à double faisceaux où la cuvette de référence contient le tampon de dialyse.

b)- le rapport des absorbances à 280 et à 450 nm. Un rapport A_{280}/A_{450} (protein flavin ratio, PFR) proche de 5 est un bon indice de la pureté de l'enzyme.

c)- électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

d)- L'activité spécifique. L'activité xanthine oxydase de l'enzyme humaine et bovine est mesurée aux différentes étapes de la purification. L'activité spécifique est exprimée en unité internationale par mg de protéines (UI/mg). Une UI étant définie comme la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une micromole de substrat (xanthine) par minute.

2.2.4 Estimation de la quantité des protéines

La quantité des protéines est estimée par la méthode de fixation du bleu brillant de Coomassie (G250). La méthode suivie est celle développée par Bradford (1976) et modifiée par Macart et Gerbaut (1982) et Macart et *al.* (1986). Le bleu de Coomassie (G250) à 0,004% (P/V) est dissous dans un mélange à 4% d'éthanol (96%) et 10% d'acide phosphorique (85%). Le mélange est additionné de 0,003% (P/V) SDS. L'addition du SDS au réactif proposée par Macart a pour effet de diminuer l'intensité de coloration. Cet effet est particulièrement prononcé avec l'albumine

dont la forte réactivité avec le bleu de Coomassie pose des problèmes d'étalonnage avec cette protéine (BSA ou HSA).

Le réactif (2ml) est ajouté à l'échantillon (100 μ l) convenablement dilué et mélangés au vortex. L'absorbance est mesurée à 595 nm contre un blanc contenant 100 μ l H₂O et 2ml de réactif. Les lectures sont effectuées au bout de 30 min, délai de stabilité du réactif une fois additionné aux protéines. Une courbe étalon est constituée avec l'albumine sérique humaine (HSA) dissoute dans l'eau distillée à 1mg /ml. Des dilutions de l'étalon de 0,1 à 1,5mg /ml sont effectuées et traitées de la même façon que l'échantillon. Une courbe linéaire est obtenue entre 0,1 et 1,5mg /ml.(Fig. 1).

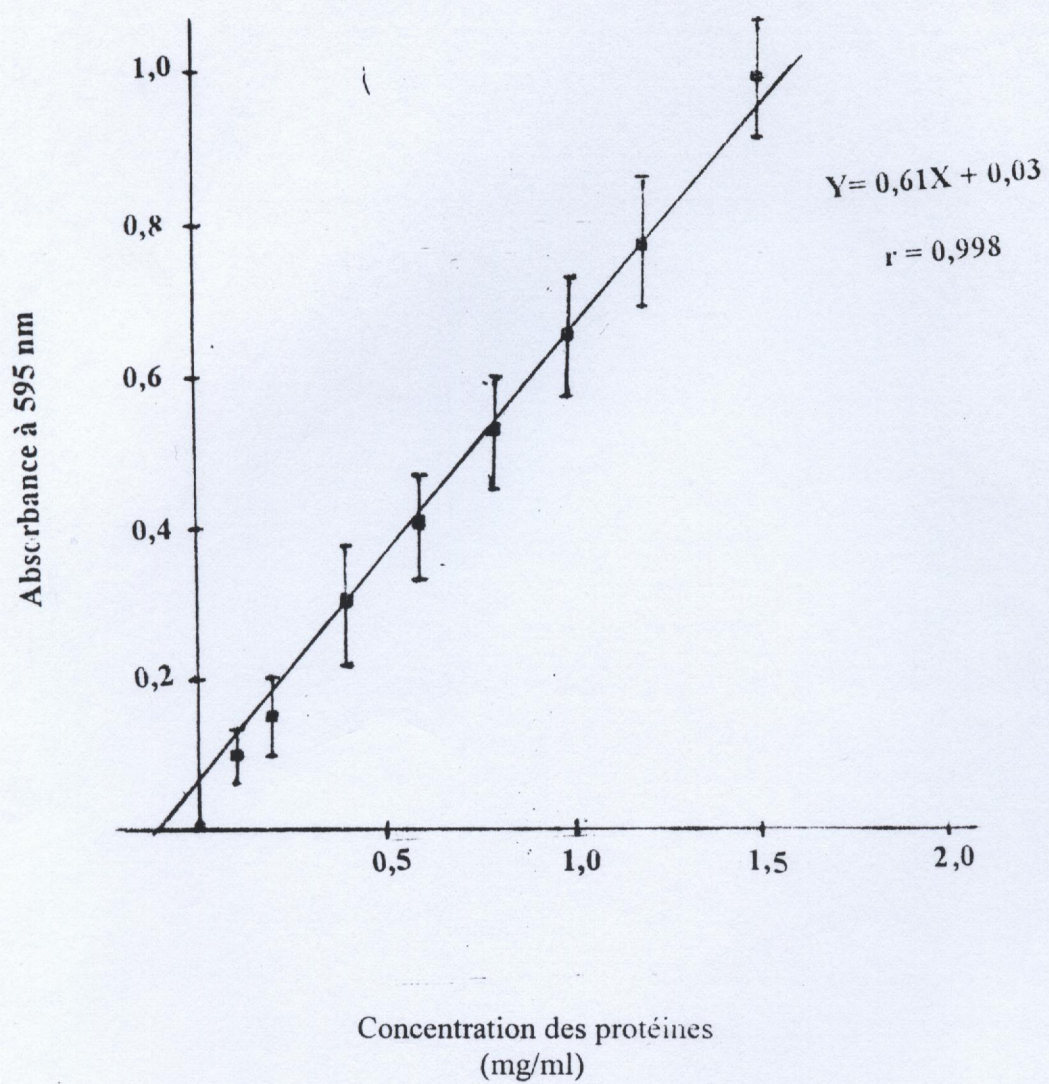


Figure1: Courbe étalon pour l'estimation de la quantité des protéines par la méthode de Macart et Gerbaut (1982), n=12 déterminations.

2.2.5 Électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels de séparation sont de 10% acrylamide et 0,25% de bis (acrylamide) et les gels de regroupement de 5 % acrylamide et 0,125 % de bis (acrylamide). Le gel de séparation est préparé dans un tampon Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 contenant 0,1% (P/V) SDS et polymérisé par addition de TEMED (0,4µl/ml) et de persulfate d'ammonium 0,1% (P/V). Le gel de regroupement préparé dans un tampon 0,125M Tris-HCl, pH 6,8 contenant 0,1% (P/V) SDS est additionné de TEMED (1µl/ ml) et de persulfate d'ammonium 0,1% (P/V).

Les échantillons et les standards de poids moléculaire sont dilués avec une solution d'échantillon constituée de 2 volumes de Tris-HCl 1 M, pH 6,8 contenant 4 % (P/V) SDS, 20 % (V/V) glycérol et 2 % (V/V) mercaptoethanol et 1 volume de bleu de bromophénol 0,1 % (P/V) dans Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. Le rapport en volumes des échantillons à la solution d'échantillon est de 1 à 3 suivant la concentration de l'échantillon en protéines. Les échantillons sont chauffés à 100 °C dans un bain-marie pendant 5 à 7 min. avant d'être déposés. La quantité de protéines à déposer est généralement de 10 à 20µg /puits pour une protéine pure jusqu'à 100µg/puits pour un mélange.

L'électrophorèse est conduite de la cathode à l'anode avec un tampon Tris-25 mM pH 8,3 contenant 0,192 M glycine et 0,1% (P/V) SDS à 10mA jusqu'à ce que les échantillons pénètrent dans le gel de séparation. L'empérage est ensuite augmenté à 35mA. L'électrophorèse est arrêtée quand l'indicateur (bleu de bromophénol) est à 1cm du bas du gel. Le gel est démoulée, fixé dans une solution d'acide trichloroacétique 12,5 % (P/V) pendant une nuit, coloré avec une solution contenant le bleu de Coomassie R250 [0,1% (P/V)] dissous dans un mélange de 45% (V/V) éthanol, 10% (V/V) acide acétique et 45% H₂O]. Une solution constituée de 5% (V/V) éthanol et 7,5% (V/V) acide acétique dans l'eau sert à décolorer le gel pour la mise en évidence des bandes protéiques. La coloration avec le bleu de Coomassie permet la détection de quantités de protéines de l'ordre de 1µg. Les poids moléculaires des échantillons sont déterminés à partir d'une courbe étalon (Fig.2) construite avec les standards SDS-SH (Sigma: 29; 45, 66, 97,4, 116 et 205 KDa).

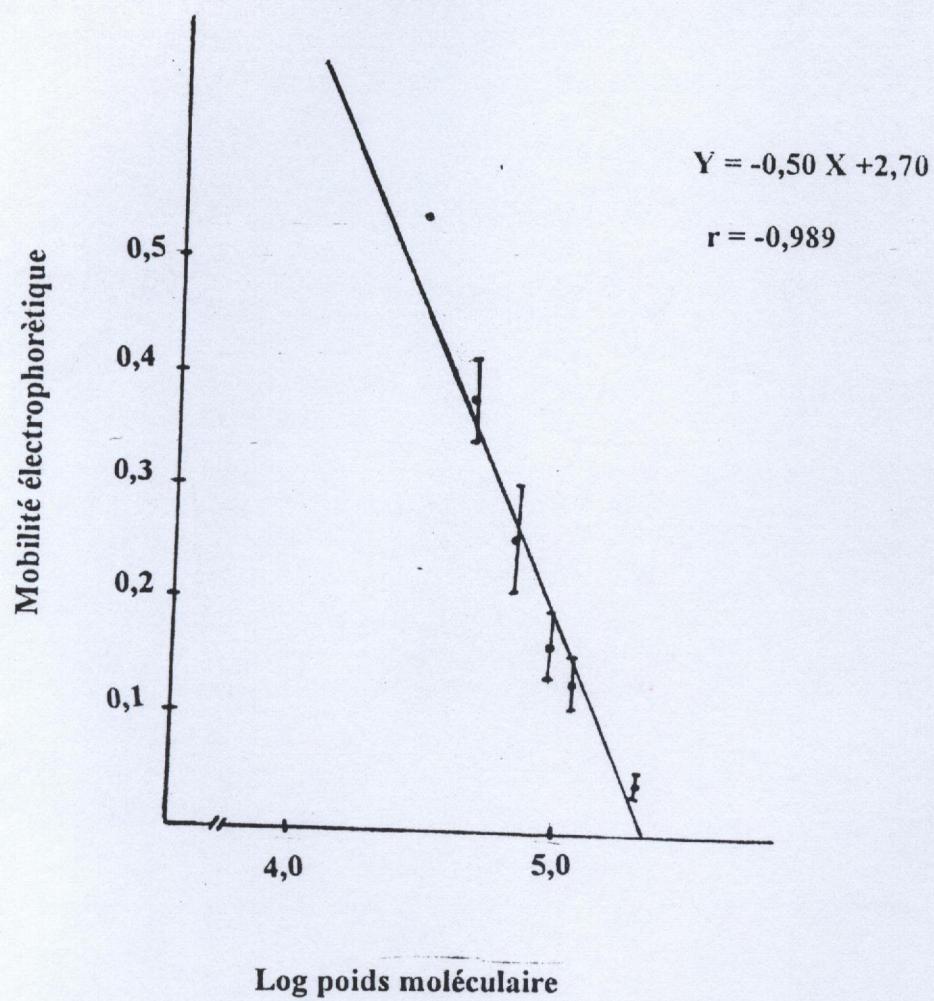


Figure 2: Courbe étalon pour l'estimation des poids moléculaire par SDS-PAGE, n=5 déterminations.

2.2.6 Activités enzymatiques

2.2.6.1 Préparation des formes oxydases et déshydrogénases

La xanthine oxydoréductase chez les mammifères existe sous 2 formes: une forme déshydrogénase utilisant le NAD^+ et une forme oxydase fonctionnant avec l'O_2 comme accepteurs d'électrons. La xanthine oxydoréductase purifiée en l'absence d'agents réducteurs des ponts disulfures est à 100 % sous forme oxydase. La forme déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase bovine ou humaine est obtenue par incubation de l'enzyme avec le DTT (10mM) à 37°C pendant (40-60 min) dans un tampon Na^+ -Bicine 50 mM, pH 8,20. Le DTT est éliminé par gel filtration sur colonne de Sephadex G-25 préalablement équilibrée avec le même tampon. Les activités xanthine oxydase et xanthine déshydrogénase sont mesurées à température ambiante dans un tampon 50 mM Na^+ Bicine, pH 8,20 aéré.

Solution A : Xanthine(1mM)dans le tampon Na^+ -Bicine

Solution B : NAD^+ (5 mM)dans le tampon Na^+ -Bicine

L'activité xanthine oxydase est suivie par mesure spectrophotométrique de la production de l'acide urique à 295 nm par oxydation de la xanthine en utilisant un coefficient d'extinction de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Avis *et al.*, 1956). 200 μl de Solution A (100 μM de xanthine) sont ajoutés à 1,7 ml de tampon Na^+ -Bicine. 100 μl d'une solution de xanthine oxydoréductase convenablement diluée sont ajoutés et mélangés par inversion et la lecture est aussitôt faite (Benboubetra,1989).

L'activité xanthine déshydrogénase est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) correspondant à la réduction du NAD^+ en NADH. Le mélange réactionnel contient 200 μl de solution A, (100 μM xanthine), 200 μl de solution B (500 μM NAD^+) complétés à 1,9 ml avec le tampon Na^+ -Bicine. 100 μl d'enzyme. sont ajoutés et mélangés par inversion et la mesure est effectuée comme décrit ci- dessus. L'activité totale (oxydase plus déshydrogénase) est mesurée à 295 nm en présence de 100 μM de xanthine et 500 μM de NAD^+ (Benboubetra, 1989).

Les activités sont exprimées en unité internationale par mg d'enzyme. Une unité est définie comme une micromole de substrat transformé par minute. La concentration de l'enzyme étant calculée à partir de l'absorbance du FAD lié à l'enzyme à 450nm (coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 37,8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Massey *et al.*, 1969).

2.2.7 Cinétiques enzymatiques

2.2.7.1 Détermination des paramètres cinétiques

Les études cinétiques ont été réalisées à température ambiante dans un tampon phosphate de sodium 50mM, pH 7,4 aéré et contenant 0,1mM EDTA. Les paramètres cinétiques relatifs au substrat réducteur (xanthine ou NADH) sont déterminés par mesure des vitesses initiales des réactions à des concentrations variables de substrat réducteur et une concentration fixe d'oxygène.

Avec la xanthine comme substrat réducteur, la production de l'acide urique à partir de la xanthine est suivie à 295nm en utilisant un coefficient d'extinction de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (Avis *et al.*, 1956). L'oxydation du NADH est mesuré par la diminution de l'absorbance à 340 nm avec un coefficient d'extinction de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Powell, 1995). Les concentrations finales de l'enzyme dans le mélange réactionnel sont généralement 40- 50 nM de XOR bovine et 120-130 nM de XOR humaine pour l'activité xanthine oxydase. Pour l'activité NADH oxydase, les concentrations sont : 200-300 nM de XOR bovine et 120 nM de XOR humaine. Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} sont déterminés par la méthode directe linéaire (Eisenthal et Cornish-Bowden, 1974) en utilisant le logiciel ENZPACK.

2.2.7.2 Etude de la production du superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

La production du superoxyde par la XOR est déterminée en terme de la réduction du cytochrome c à 550 nm ($\epsilon=21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Fridovich, 1985 a, b). L'essai est réalisé à T^0 ambiante dans un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,4) contenant 0,1mM EDTA et équilibré avec l'air, en présence de 25 μM de cytochrome c et de concentrations différentes de substrat réducteur (xanthine ou NADH). Les vitesses de réduction du cytochrome c sont normalement mesurées en l'absence et en la présence de la superoxyde dismutase (SOD). Les vitesses de

réduction spécifiques (par le $\dot{O}_2$) sont celles inhibées par la SOD (Fridovich, 1985b). La SOD étant indisponible, nous avons procédé de la manière suivante :

-Empêcher l'accumulation du $H_2 O_2$ simultanément produit avec le $\dot{O}_2$ par la xanthine oxydoréductase, par addition de la catalase à une concentration finale de 60 $\mu\text{g/ml}$ dans le mélange réactionnel .

-Vérifier par ailleurs la spécificité de réduction du cyt.c par le $\dot{O}_2$ en mesurant la vitesse de la réaction en l'absence du substrat réducteur. La vitesse était toujours nulle. Le pourcentage du flux électronique univalent passant à l'oxygène, le réduisant en superoxyde, en fonction de la concentration du substrat réducteur a été étudiée. Le pourcentage du flux univalent est donné par l'expression:

$$\% \text{ du flux univalent} = \frac{\text{vitesse de reduction du cyt. c}}{\text{vitesse d'oxydation du substrat réducteur}} \times 50$$

La vitesse d'oxydation du substrat réducteur (xanthine ou NADH) est mesurée en l'absence du cytochrome c dans un essai réalisé en parallèle.

2.2.7.3 Etudes d'inhibition

L'inhibition de l'activité xanthine oxydase de la XO bovine et humaine a été étudiée avec une variété d'inhibiteurs (allopurinol, oxypurinol et acide urique). Une concentration fixe de l'inhibiteur est ajoutée à des concentrations variables de substrat (xanthine) et les vitesses initiales sont mesurées à 295 nm. Les constantes d'inhibition de l'inhibiteur à l'étude sont calculées à différentes concentrations d'inhibiteur. L'inhibition de l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydase humaine par le NAD^+ a été également étudiée.

Les études d'inhibition sont réalisées dans un tampon phosphate de sodium 50mM, pH 7,4 contenant 0,1mM EDTA et équilibré avec l'air. Le type d'inhibition est déterminé par les représentations linéaires primaires de Hanes-Woolf, Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk (logiciel ENZPACK) et Dixon. Une fois le type d'inhibition déterminé, les constantes d'inhibitions sont calculées à partir des représentations linéaires secondaires (Palmer, 1985).

2.2.8 Effets des protéases sur la xanthine oxydoréductase

2.2.8.1 Effet sur l'activité et la séparation électrophorétique

L'effet des protéases sur la XOR bovine et humaine a été examiné. La XOR bovine ou humaine ont été incubées avec la trypsine ou la chymotrypsine à 37 °C dans un tampon Na^+ -Bicine 50 mM, pH 8,2. Le rapport protéase: xanthine oxydase était de 1:10 (P\|P). Des aliquots de faibles volumes ont été prélevés après 2; 4 et 21 heures d'incubation et aussitôt congelés pour électrophorèse en gel de polyacrylamide. Par ailleurs; l'activité totale des échantillons après 2 et 4 heures d'incubation a été mesurée dans un tampon Na^+ -Bicine(50 mM pH 8,2) aéré (comme décrit dans la section 2.2.6.1).

2.2.8.2 Gel-filtration en conditions non dissociantes

La XOR bovine (6ml à 1mg/ml) a été incubée avec la trypsine (1:10, P\|P) pendant 5 heures à 37 °C. La réaction a été arrêtée avec 2 mM PMSF. L'échantillon trypsinisé a été appliqué; avec un débit de 6 ml\heure, à une colonne de gel-filtration (Ultrogel AcA34, 3 cm X 28 cm) prééquilibrée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,4. La chromatographie a été menée avec le même tampon à 4 °C pendant 72 heures. Les fractions correspondant aux pics enregistrés ont été soumises à une électrophorèse. Leur activité et leur PFR ont été mesurés.

2.2.8.3 Gel filtration en conditions dissociantes (4M Urée)

La XOR bovine (5ml à 2,3 mg\ml) a été incubée avec la trypsine (1:10, P\|P) à 37 °C pendant 5 heures. La réaction a été arrêtée avec du PMSF à une concentration finale de 2mM. L'échantillon a été dialysé contre un tampon MES (25 mM, pH 6,0) contenant 2 mM PMSF et passé sur une colonne d'héparine pour éliminer la trypsine. La XOR a été éluée avec 0,1 M NaCl dans le tampon MES.

La XOR bovine éluée de la colonne d'héparine a été appliquée sur une colonne (Ultrogel AcA34) prééquilibrée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,4 contenant 4 M d'urée. La chromatographie a été menée avec un débit de 7,5 ml/heure à 4°C pendant 48 heures. Les fractions correspondant aux différents pics enregistrés ont été dialysées contre un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,4) et testées (électrophorèse, activités, PFR).

3 RESULTATS ET DISCUSSIONS:

3.1 Purification de la xanthine oxydoréductase

3.1.1 Purification de la xanthine oxydoréductase bovine

3.1.1.1 Résultats:

La xanthine oxydoréductase bovine a été extraite à partir de lait frais (4 l) selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée (Powell, 1995), puis purifiée par chromatographie sur colonne d'héparine (Adachi et *al.*, 1993). Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1: Résultats de la purification de la xanthine oxydoréductase bovine à partir de lait frais (4 l). Les valeurs présentées sont les moyennes de 4 purifications.

Fractions de purification	Activité totale (UI)	Quantité totale d'enzyme (mg)	Activité spécifique (UI/mg)	PFR*
Phase aqueuse de la 1 ^{ère} précipitation	135,03	108,75	0,64	10,13
Extrait brut	83,20	60,68	0,62	8,97
Extrait pure	70,16	32,97	2,24	5,42

PFR*: Protein Flavin Ratio.

Tableau 2: Résumé typique de la xanthine oxydoréductase bovine à partir de lait frais (4l)

Fractions de purification	Volume total (ml)	Quantité totale d'enzyme (mg)	Quant. totale de protéines (mg)	Activité totale (UI)	Rapport	Activité spéc. (UI/mg)	PFR
Phase aqueuse de la 1 ^{ère} Précipitation	373,00	138,01	298,40	218,40	0,46	0,73	nd*
Extrait brut	30,50	93,78	204,96	136,82	0,45	0,66	9,23
Extrait pure	18,00	45,00	49,50	168,96	0,90	3,41	5,90

nd*: non déterminé.

L'activité de la XOR dans le lait est relativement faible; elle est couramment mesurée par fluorescence, radiométrie (Abadeh *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995; Powell, 1995) ou polarographie (Zikakis *et al.*, 1983). Ces techniques ne pouvant être appliquées, la purification a été suivie à partir de la première précipitation aux sulfates d'ammonium. Il en résulte que ni le taux de purification ni le rendement (exprimé en %) de la méthode suivie ne peuvent être évalués. Le rendement varie de 6,5 à 11,25 mg d'enzyme pure par litre de lait frais. Le rendement, calculé par rapport à la quantité d'enzyme déjà présente dans la phase aqueuse de la première précipitation, est remarquablement faible (23-26%). Les pertes sont variablement partagées entre la deuxième précipitation et le passage sur la colonne d'héparine. L'efficacité de la colonne d'héparine peut dépendre, au moins en partie, du degré de pureté de l'extrait brut. En effet, il a été observé que l'enzyme dans les préparations fortement contaminées par les protéines, particulièrement les caséines, n'était pas retenue par la colonne.

L'augmentation de l'activité spécifique en parallèle avec la diminution du rapport A_{280}/A_{450} (PFR) au cours de la purification (Fig. 1) traduit une élimination progressive des protéines contaminantes.

Les valeurs de l'activité enzymatique et par conséquent l'activité spécifique dans la phase aqueuse de la première précipitation et l'extrait brut peuvent être entachées d'erreur car l'activité n'est pas dosée directement. Les sulfates d'ammonium et le salicylate de sodium interfèrent avec le dosage, leur élimination par dialyse conduit à des pertes de l'enzyme par adsorption au tube de dialyse et l'activité peut être sous estimée.

La purification est par ailleurs suivie par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). L'enzyme reconnue comme pure est présente sous forme d'une bande majeure de $143 \pm 7,0$ KDa avec des bandes très légères de plus faibles poids moléculaires traduisant une légère contamination et/ou dégradation (Fig. 2). Un deuxième passage de l'enzyme obtenue sur la colonne d'héparine révèle une seule bande en gel de polyacrylamide (Fig. 3). Une fraction de l'enzyme ayant probablement une plus grande affinité vis-à-vis de l'héparine n'est pas éluée avec 0.1M NaCl. Son élution avec 0.4 M NaCl donne une fraction non pure (PFR $8,63 \pm 0,36$; SDS-PAGE, Fig. 2).

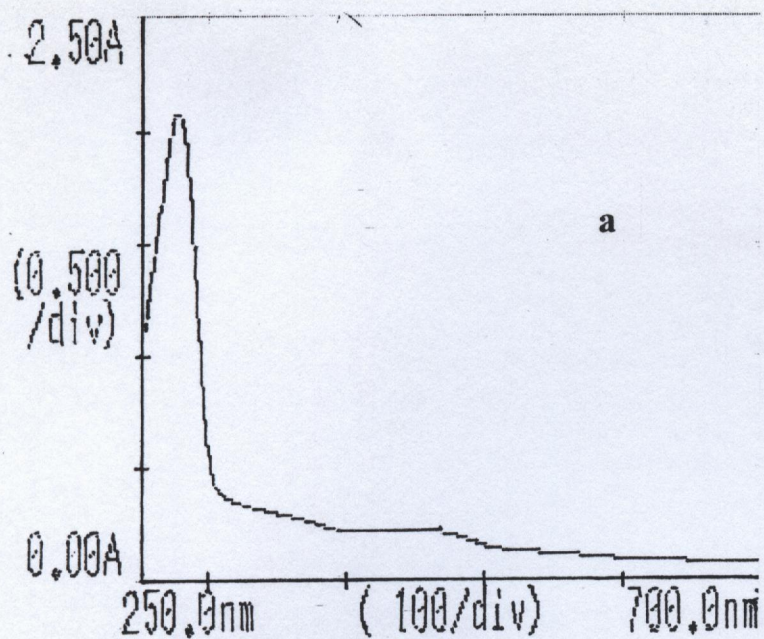
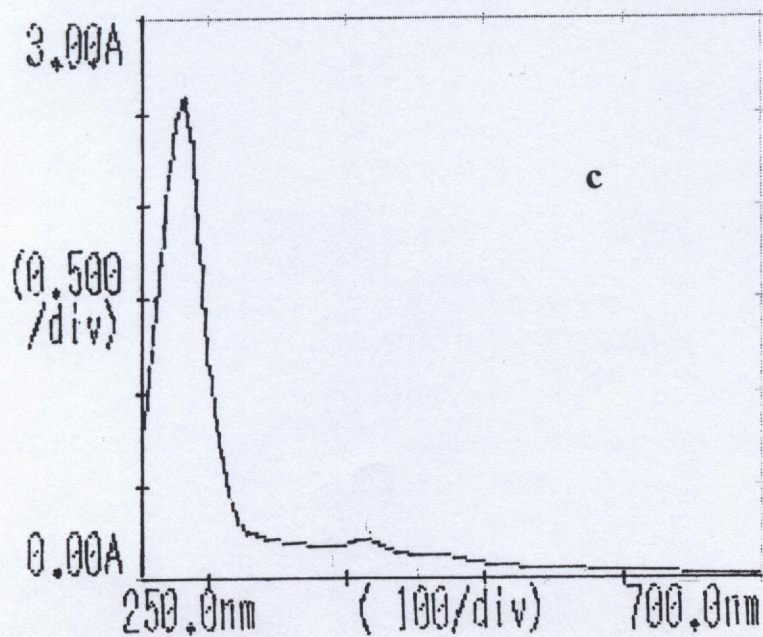
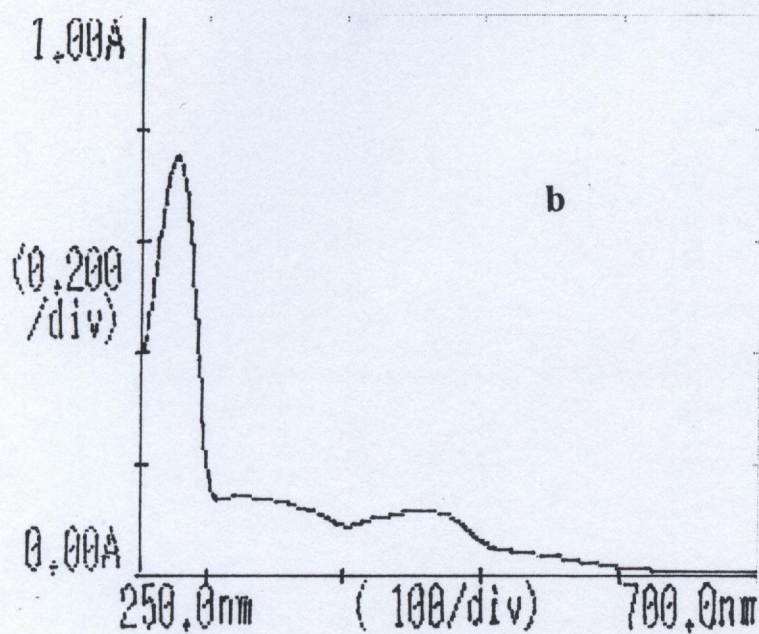


Figure 1 : Spectres en UV-visible (700-250 nm) des fractions éluées après passage de l'extrait brut de la XOR bovine (a) sur colonne d'héparine .
 b)- fraction éluee avec 0,1 M NaCl dans le tampon MES .
 c) - fraction éluee avec 0,4 M NaCl .



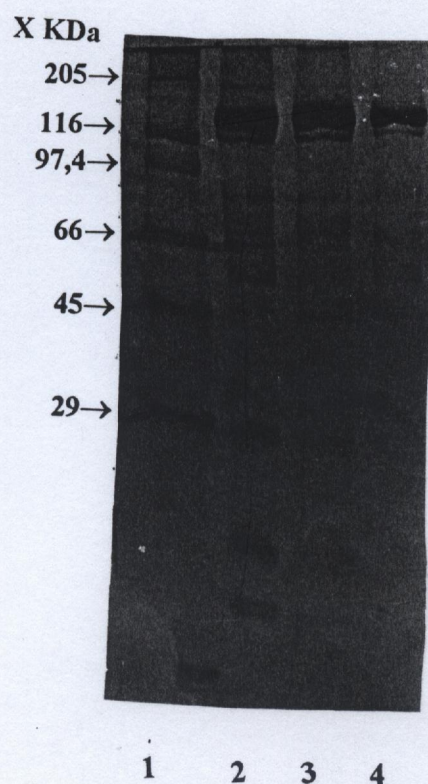


Figure 2: SDS-PAGE, 10 % de la XOR bovine purifiée à partir de lait frais par la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée et chromatographie sur colonne d'héparine.

1. Standards des poids moléculaires.
2. Extrait brut.
3. Fraction éluée avec 0,4 M NaCl dans le tampon MES.
4. Fraction pure, éluée avec 0,1 M NaCl dans le tampon MES.



Figure 3: SDS-PAGE, 10 % de la XOR bovine rechromatographiée sur la colonne d'héparine et éluée avec 0,1 M NaCl.

1. Standards des poids moléculaires.
2. XOR bovine rechromatographiée sur la colonne d'héparine, avec 0,1 M NaCl dans le tampon MES.
3. XOR bovine (Biozyme).

La XOR bovine présente un spectre d'absorption caractéristique en UV-visible avec des maxima à 280, 325 et 450 nm. Le rapport A_{280}/A_{450} , retenu comme critère de pureté, de la XOR bovine préparée varie de 4,32 à 6,25 avec une moyenne de 5,42 (n=4). Le PFR de la XOR bovine commercialisée par Biozyme est en moyenne de 5,52 (Fig. 4).

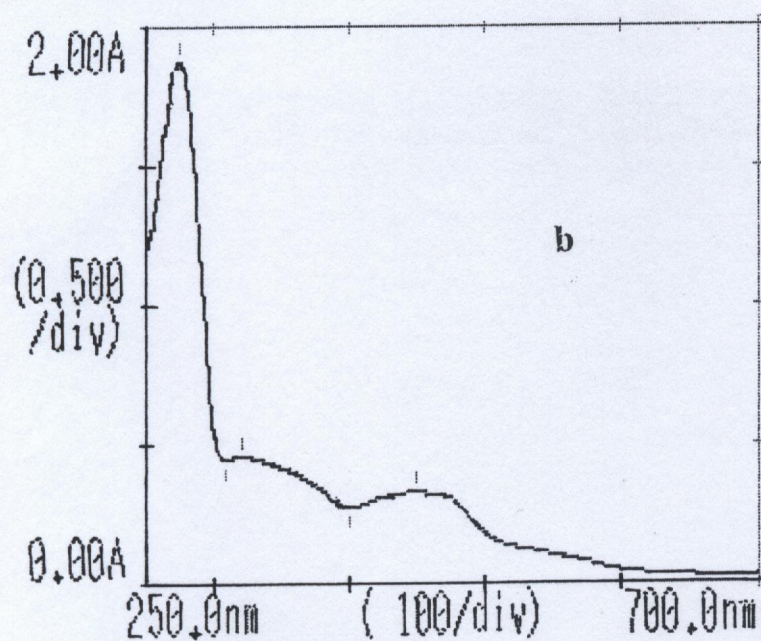
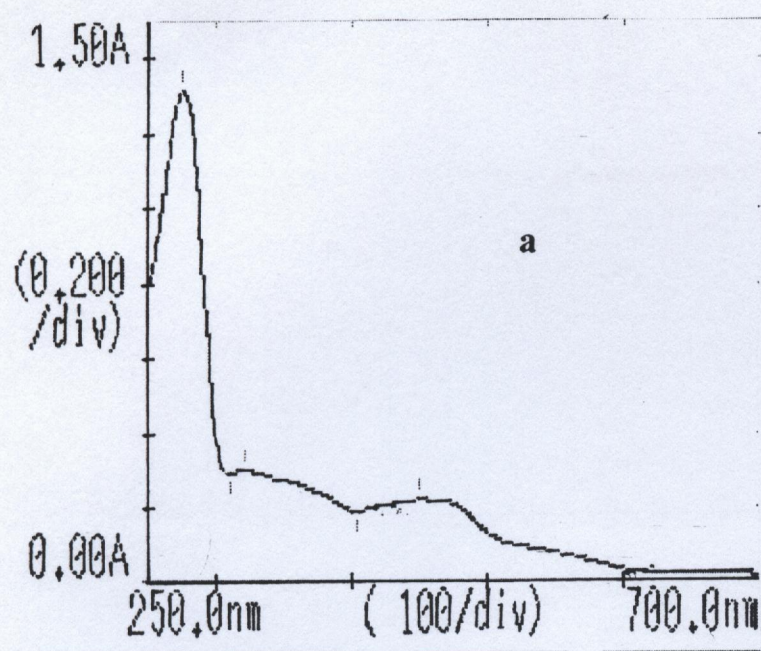


Figure 4: Spectres en UV-visible de la XOR bovine.

- a)-XOR bovine purifiée dans le laboratoire à partir de lait frais.
- b)-XOR bovine commercialisée (Biozyme).

3.1.1.2 Discussion

La purification de la XOR bovine a été effectuée selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée suivie d'une chromatographie sur colonne d'héparine. La méthode suivie a l'avantage d'éviter l'utilisation de la pancréatine, mélange de protéases, jusqu'à récemment très utilisée pour dégrader la caséine. La pancréatine ne dégrade pas cependant spécifiquement la caséine et agit sur toutes les protéines y compris la xanthine oxydase (Zikakis *et al.*, 1983, Zikakis et Silver, 1984). L'utilisation par Nakamura et Yamazaki de la crème au lieu du lait entier, comme matériel de départ, conduit à une perte de l'enzyme présente dans le lait écrémé. En contre partie, l'extrait brut obtenu est relativement clair (PFR=10,13) ce qui augmente l'efficacité des étapes ultérieures. Une modification à la méthode de Nakamura et Yamazaki, apportée par Powell (1995), consiste à éliminer la crème dans une étape précoce augmentant davantage la qualité de l'extrait brut.

La colonne d'héparine se comporte vraisemblablement comme échangeur d'ions puisque l'élution de l'enzyme s'effectue par augmentation de la force ionique. Les pertes d'enzyme observées au cours des purifications sont très importantes comme il vient d'être noté. Cependant, les quantités d'enzyme pure récupérées, exprimées en milligrammes de protéine enzymatique (6,5-11,25 mg/l de lait ou en terme d'activité (5,27-42 UI/l) sont comparables à celles obtenues par d'autres méthodes n'utilisant pas la pancréatine avec une pureté équivalente. (PFR=5,42 $\pm$ 0,73). Un rendement de 5.95 mg/l (46,69 UI/l) et un PFR de 4.1 ont été rapportés par Zikakis *et al.* (1983). Cependant, la méthode décrite par ces auteurs est longue et laborieuse. Plus récemment, Hunt et Massey (1992), par une chromatographie en batch de l'extrait brut en gel de phosphate de calcium suivie d'une chromatographie sur colonne de folate, ont obtenu un rendement de 19,2 mg d'enzyme/l, 33,06 UI/l et un PFR de 5,2. En suivant la méthode de Nakamura et Yamazaki modifiée plus une chromatographie sur colonne d'héparine, Sanders et coll. (1997) rapportent un rendement de 6,25 mg/l avec un PFR de 5,0-5,5.

La méthode de Nakamura et Yamazaki en combinaison avec la chromatographie sur colonne d'héparine est très convenable pour la purification de la XOR à partir du lait. En effet, cette combinaison donne de bons rendements avec une plus grande facilité d'application en comparaison avec les autres méthodes.

3.1.2 Purification de la XOR humaine

3.1.2.1 Résultats

Pour la purification de la XOR à partir de lait humain congelé, la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée a été suivie. La purification, tentée à plusieurs reprises, n'était pas satisfaisante. A chaque fois, la quantité d'enzyme pure récupérée était moins de 1 mg par litre de lait. La purification de la XOR humaine du lait congelé, par la même méthode, a déjà été rapportée avec des rendements de 4,6 mg/l (Sanders *et al.*, 1997) et 8,3 mg/l (Powell, 1995).

L'une des raisons probables de l'échec de la purification serait les conditions de conservation de lait. Une congélation-décongélation répétée peut conduire à la destruction des membranes des globules gras auxquelles est liée la XOR. Il en suit la libération de l'enzyme dans le lait écrémé. Ainsi, l'enzyme libre peut être perdue dès la première étape de purification. Cette explication est suggérée par la comparaison des rendements obtenus, par la méthode de Nakamura et Yamazaki modifiée, à partir de lait frais (25 mg/l) et de lait congelé (8,3 mg/l) (Powell, 1995). Il aurait donc été plus approprié d'adopter une méthode utilisant le lait entier. En fait, la plupart des méthodes développées pour la purification de la XOR utilisent, comme matériel de départ, le lait entier au lieu de la crème. Une méthode facile et modérée est celle proposée par Hunt et Massey (1992). Par cette méthode, la qualité de l'extrait brut n'est cependant pas aussi bonne que celle obtenue par la méthode de Nakamura et Yamazaki modifiée (Powell, 1995).

En utilisant du lait humain conservé dans des conditions meilleurs, la purification a donné les résultats résumés dans le tableau 3.

Tableau 3: Purification de la XOR à partir de lait humain congelé. les valeurs figurant dans le tableau sont les moyennes de deux purifications.

Quantité d'enz. pure (mg/l)	Activité totale (UI/l)	Activité spécifique (mUI/mg d'enz.)	PFR	% de forme oxydase
10,44	731,80	69,15	5,85	72

En gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), la XOR humaine purifiée apparaît comme une seule bande de 143,5 KDa ne révélant par conséquent aucun signe de contamination ou de dégradation (Fig. 5).

La XOR humaine possède les mêmes propriétés spectrales (absorbance à 280, 325 et 450 nm) que la XOR bovine avec une valeur moyenne de PFR de 5,96 (Fig. 6).

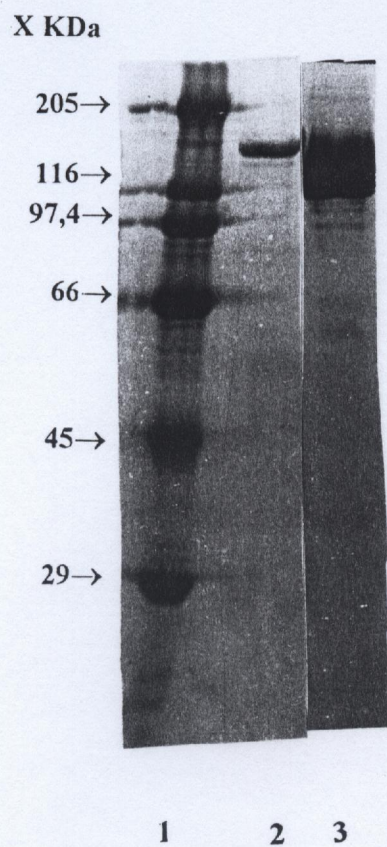


Figure 5: SDS-PAGE, 10 % de la XOR humaine purifiée à partir de lait congelée par la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) et chromatographie sur colonne d'héparine.

1. Standards des poids moléculaires.
2. Fraction pure, éluée avec 0,4 M NaCl dans le tampon héparine
3. Extrait brut.

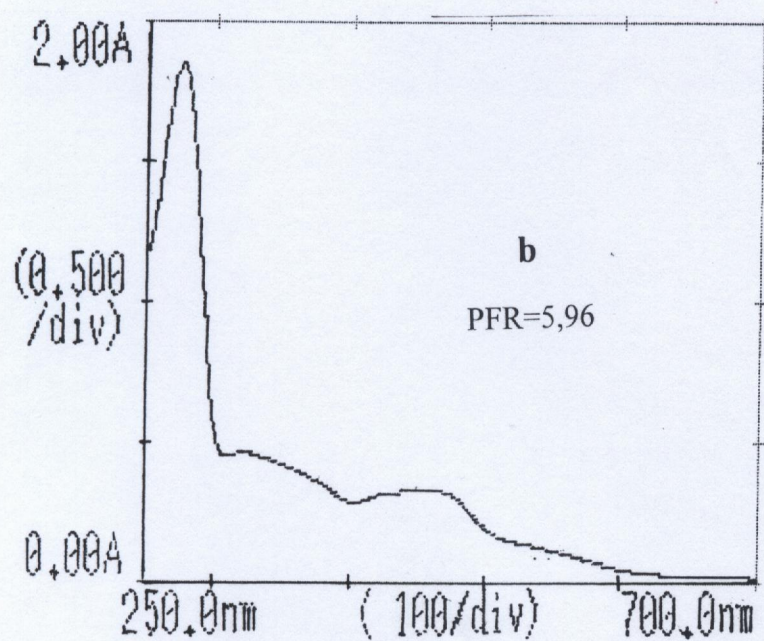
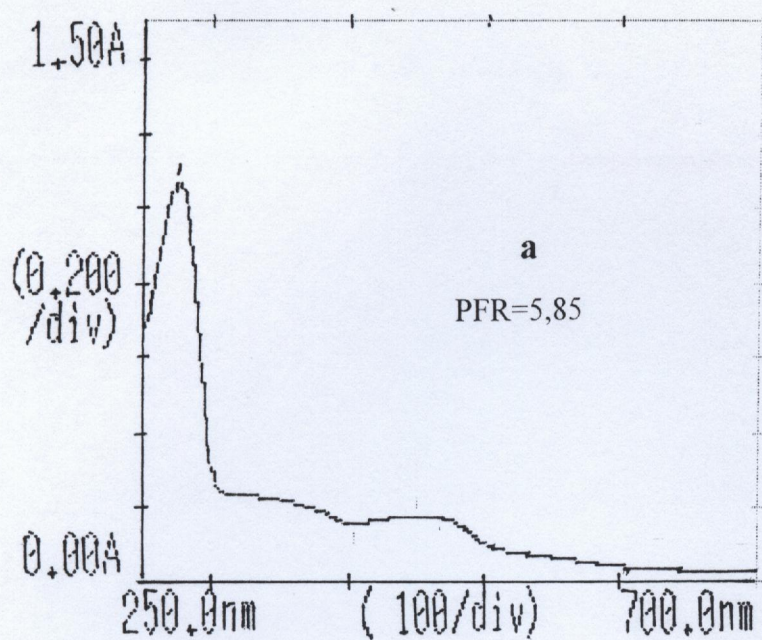


Figure 6: Spectre en UV-visible de la XOR humaine purifiée à partir de lait congelé (a) et de la XOR bovine commercialisée (Biozyme) (b).

3.1.2.2 Discussion

Le rendement de la purification de la XOR humaine, par la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée, résumée dans le tableau 3 est remarquable (10,44 mg/l). Powell (1995), en suivant la même méthode, a cité que le rendement le plus élevé qu'elle a pu obtenir de lait humain congelé était de 8,3 mg/l. Dans la purification mentionnée ci-dessus, le lait n'a pas été additonné d'EDTA ou de salicylate de sodium à la différence du protocole suivi par Powell. Le rendement de cette purification et des purifications réalisées par Powell (1995) de lait frais (25 mg/l) ou congelé (8,3 mg/l) sont comparables à ceux obtenus à partir de lait bovin frais. Ceci indique que le lait humain est aussi riche en XOR que le lait bovin contrairement à ce qu'on croyait (Rodkey et Ball, 1946; Zikakis *et al.*, 1983)

Zikakis *et al.* (1983) ont mentionné que le lait humain est pauvre en XOR et que le colostrum par contre en contient de grandes quantités. L'estimation de la quantité de XOR, par ces auteurs, dans le lait ou dans le colostrum était probablement basée sur le dosage de l'activité enzymatique. Le substrat généralement utilisé pour doser l'activité de la XOR est la xanthine. Or la XOR du lait humain réagit faiblement avec ce substrat (Abadeh *et al.*, 1992). La xanthine est oxydée au niveau du centre à Mo. La quasitotalité (~98%) de la XOR du lait humain possède un centre à molybdène inactif (Abadeh *et al.*, 1992; Abadeh, 1993). Récemment, Brown et ses collaborateurs (1995) ont montré que la quantité de XOR ne diffère pas dans le lait ou le colostrum humains. Cependant, dans le lait, l'enzyme est inactivée par substitution d'un atome de soufre par un atome d'oxygène ou par perte du molybdène, essentiels à la catalyse. Cette inactivation peut constituer un mécanisme par lequel l'activité de la XOR est régulée après la parturition. Une telle régulation doit être intimement liée à la fonction de la XOR dans le lait (Brown *et al.*, 1995).

3.2 Effets des protéases sur la XOR

3.2.1 Résultats

3.2.1.1 Effet des protéases sur l'activité enzymatique

L'effet des protéases (trypsine et chymotrypsine) sur la XOR bovine et humaine a été examiné. L'activité totale (XO + XDH) des deux enzymes mesurée après 2 et 4 heures d'incubation à 37°C, pH 8,2 avec la trypsine ou la chymotrypsine (1:10, P/P) est montrée dans le tableau 4.

Tableau 4: Les activités totales de la xanthine oxydoréductase bovine (UImg^{-1}) et de la xanthine oxydoréductase humaine (mUImg^{-1}) après incubation avec la trypsine ou la chymotrypsine.

Milieu réactionnel	Activité totale (oxydase plus déshydrogénase) après une incubation de:		
	0 heures	2 heures	4 heures
XOR-b + tampon	2,950	2,591	2,721
XOR-b* + trypsine	nd***	2,514	2,664
XOR-b + chymotrypsine	nd	2,361	2,437
XOR-h** + tampon	80,420	46,614	63,307
XOR-h + trypsine	nd	44,304	41,575
XOR-b + chymotrypsine	nd	52,283	45,354

XOR-b*: XOR bovine, XOR-h**: XOR humaine, nd***: non déterminé.

La trypsine ne semble pas affecter l'activité de la XOR bovine même après 4 h. d'incubation. L'effet de la chymotrypsine bien que faible est apparent. L'inhibition de l'activité exercée par la chymotrypsine après 2 ou 4 h. est pratiquement la même. Ceci montre que l'action de la chymotrypsine est achevée durant les deux premières heures.

La trypsine et la chymotrypsine n'ont apparemment pas d'effet sur l'activité de la XOR humaine après 2 h d'incubation. Après 4 h., l'effet des deux protéases est important. Contrairement à la XOR bovine, l'activité de la XOR humaine apparaît plus affectée par la trypsine que par la chymotrypsine. Cependant, les résultats obtenus avec la XORh doivent être considérés avec prudence car la faible activité de l'enzyme fait que les erreurs sur les mesures aient un poids exagéré. D'une manière générale, la trypsine et la chymotrypsine ont un effet très faible sur l'activité totale de la XOR bovine ou humaine.

3.2.1.2 Effet des protéases sur la séparation électrophorétique

Le type de fragmentation, achevé par la trypsine et la chymotrypsine, sur la XOR bovine, comme révélé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence du SDS, est montré dans la Fig. 7. La trypsine après 2, 4 et 21 h. d'incubation clive la XOR b en quatre fragments dont les PM sont estimés à 92, 84, 32 et 6KDa. Le fragment de 84 KDa provient probablement de celui de 92 KDa par détachement d'une petite portion car la somme 92 plus 84 est largement supérieure à la valeur du PM de l'enzyme native estimé à 140 Kda environ, dans les mêmes conditions. Des traces de l'enzyme native persistent après 4 h. d'incubation avec la trypsine. Le clivage par la chymotrypsine produit trois fragments de 92, 32 et 6 KDa. La trypsine et la chymotrypsine utilisées à (1:20,P/P) produisent un clivage (Fig. 8) similaire à celui montré dans la Fig. 7. La chymotrypsine donne trois fragments de 86, 46 et 20 KDa. Un fragment de 78 KDa est produit, en plus, par la trypsine probablement par clivage du fragment de 86 KDa. La somme des PM des fragments 92, 32 et 6 ou 86, 46 et 20 est très proche du PM estimé pour la sous-unité de la XOR (~140 KDa).

Un type de fragmentation pareil, par la trypsine et la chymotrypsine 10% (P/P), est obtenu avec la XOR humaine (Fig. 9). Cette dernière est clivée par la trypsine en trois fragments de 97, 91 et 30 KDa. La chymotrypsine donne des fragments de 97, 30 et 14 KDa. Le fragment de 91 KDa paraît résulter d'un clivage additionnel du fragment de 97 KDa à l'instar de ce qu'il a été observé avec la XOR bovine.

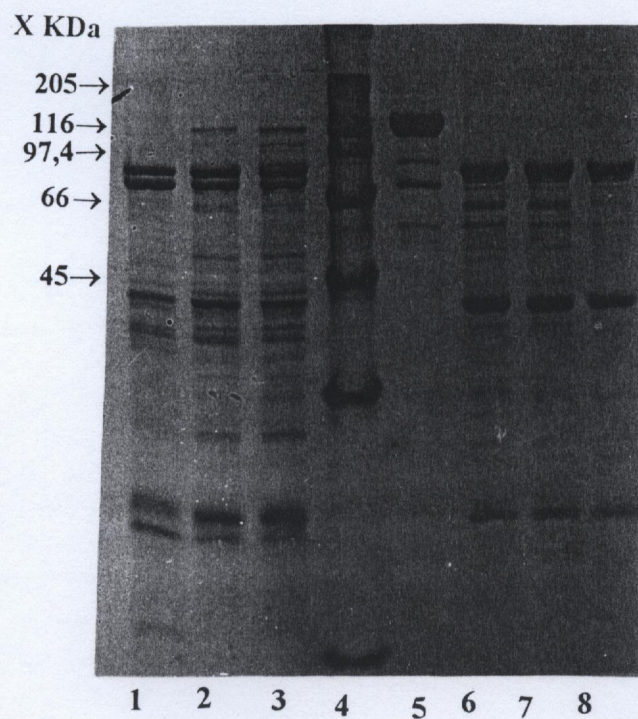


Figure 7: SDS-PAGE, 10 % de la XOR bovine clivée par la trypsine ou la chymotrypsine, (1:10P/P) à 37 °C.

- 1-3. Clivage par la trypsine après 21, 4 et 2 heures d'incubation.
- 4. Standards des poids moléculaires.
- 5. XOR bovine pure avant protéolyse.
- 6-8. Clivage par la chymotrypsine après 2, 4 et 21 heures d'incubation.

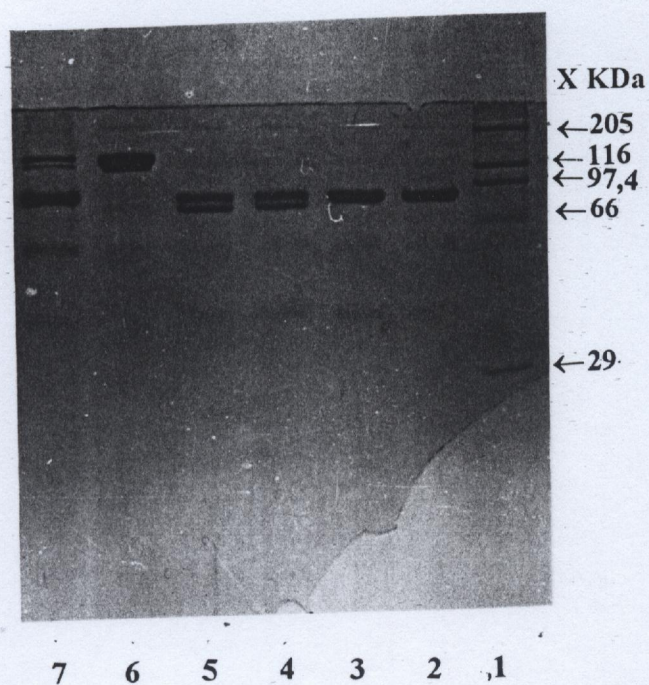


Figure 8: SDS-PAGE, 10 % de la XOR bovine clivée par la trypsine ou la chymotrypsine, (1:20 P/P) à 37 °C.

1. Standards des poids moléculaires.
- 2 et 3. Clivage par la chymotrypsine après 2 et 4 heures d'incubation.
- 4 et 5. Clivage par la trypsine après 2 et 4 heures d'incubation.
6. XOR bovine pure avant protéolyse.
7. XOR bovine (Biozyme).

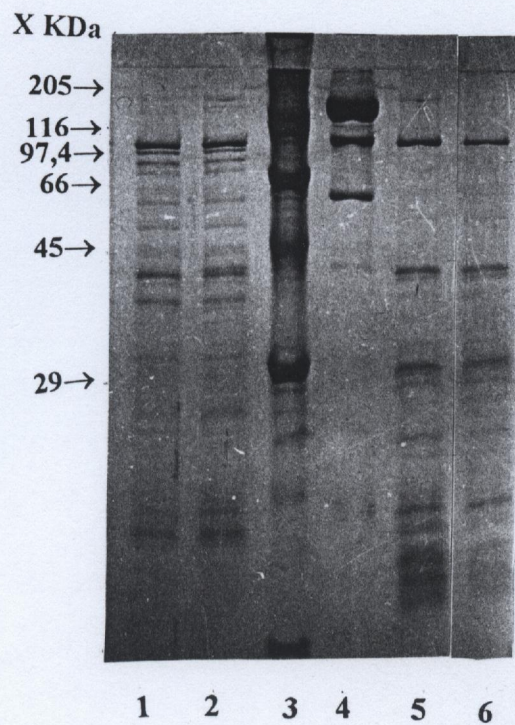


Figure 9: SDS-PAGE, 10 % de la XOR humaine clivée par la trypsine ou la chymotrypsine , (1:10P/P) à 37 ° C.

- 1 et 2. Clivage par la trypsine après 4 et 2 heures d'incubation.
- 3. Standards des poids moléculaires.
- 4. XOR humaine avant protéolyse.
- 5 et 6 Clivage par la chymotrypsine après 2 et 4 heures d'incubation.

3.2.1.3 Gel-filtration en conditions non dissociantes

La XOR bovine protéolysée par la trypsine, (1:10P/P) pendant 5 h. à 37 °C a été soumise à une gel-filtration. L'élution a été effectuée avec un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,4. Le profil chromatographique montre deux pics: pic 1 et pic 2. Le pic 1 important et asymétrique possède une activité enzymatique et un PFR de 8,77. Le pic 2, peu important et dépourvu d'activité, présente un PFR de 4,90 (Fig. 10). Les deux pics ont été soumis à une électrophorèse (Fig. 11). La fraction correspondant au pic 1 est constituée des mêmes fragments que l'enzyme protéolysée non chromatographiée (97, 88, 31 et 6 KDa). Ceci indique que les fragments n'étaient pas dissociés par gel-filtration. La fraction correspondant au pic 1 contient une certaine quantité d'enzyme native (Fig. 11). Le fait que l'enzyme native et l'enzyme protéolysée aient été éluées ensemble (en gel-filtration) suggère que les fragments étaient restés associés par différentes liaisons. Cependant, il est possible qu'un fragment (pic 2) contenant le FAD (absorbance à 450 nm) ait été détaché de l'enzyme et séparé par gel-filtration. S'il est vrai que le pic 2 correspond à un fragment contenant le FAD, ce fragment aurait un PM assez élevé pour avoir un PFR (A_{280}/A_{450}) de 4,9 étant donné que le PFR de l'enzyme intacte n'est pas loin de cette valeur (~5). Par ailleurs, ce fragment aurait été occasionnellement détachée de l'enzyme car il n'y est pas présent en rapport stoechiométrique (A_{280} très faible par rapport au pic 1). Il aurait été intéressant de caractériser ce fragment putatif par électrophorèse.

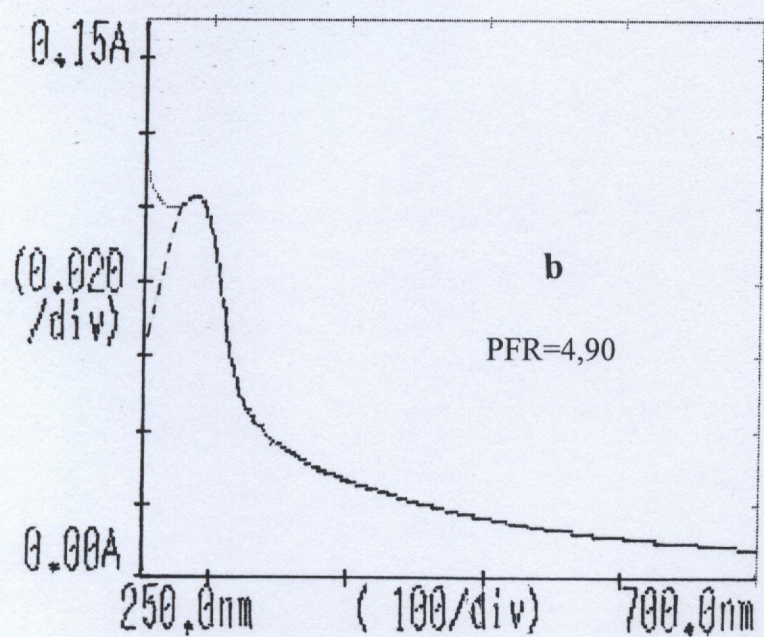
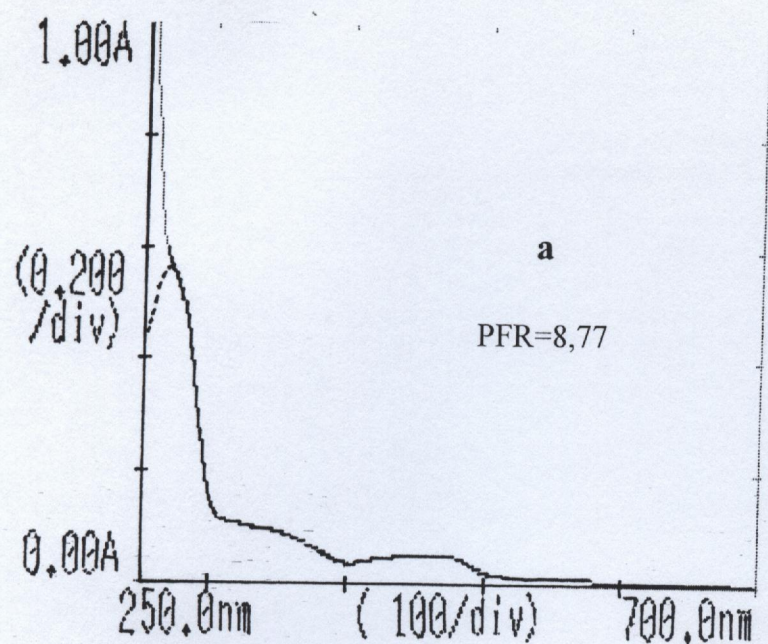


Figure 10: Spectre en UV-visible des fractions obtenues par gel-filtration (Ultrogel AcA34) de la XOR bovine trypsinisée. a)-pic 1, b)-pic 2.

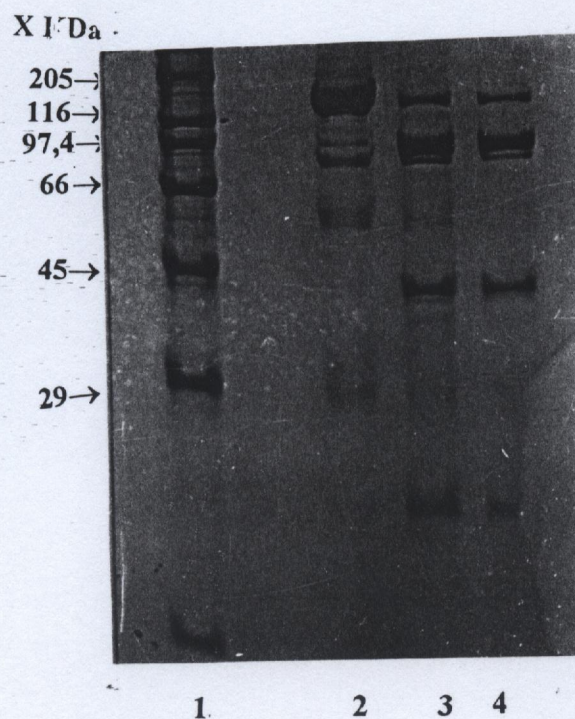


Figure 11: SDS-PAGE, 10 % des fractions obtenues par gel-filtration (Ultrogel AcA34) de la XOR bovine trypsinisée en conditions non dissociantes.

1. Standards des poids moléculaires.
2. XOR bovine pure avant protéolyse.
3. XOR bovine trypsinisée.
4. Pic 1 (gel-filtration).

3.2.1.4 Gel-filtration en conditions dissociantes (urée 4M)

La XOR bovine protéolysée, par la trypsine, a été appliquée à une colonne de gel-filtration et éluée avec un tampon phosphate contenant 4 M urée dans une tentative de dissocier les fragments protéolytiques.

Le profil chromatographique (Fig.12) révèle deux pics (pic 1 et pic 2) dont l'un (pic 1) présente une activité xanthine oxydase et un PFR de 6,8, l'autre (pic 2) étant dépourvu d'activité enzymatique et de FAD. Il est à remarquer que la fraction représentant le pic 2 ne réagissait pas avec le bleu de Coomassie (G250 ou R250) et sa nature protéique est mise en doute. La constitution en fragments de la XOR protéolysée et la fraction correspondant au pic 1, examinée par SDS-PAGE (Fig. 13), montre que seulement des fragments de faible PM auraient été dissociés par l'urée 4 M.

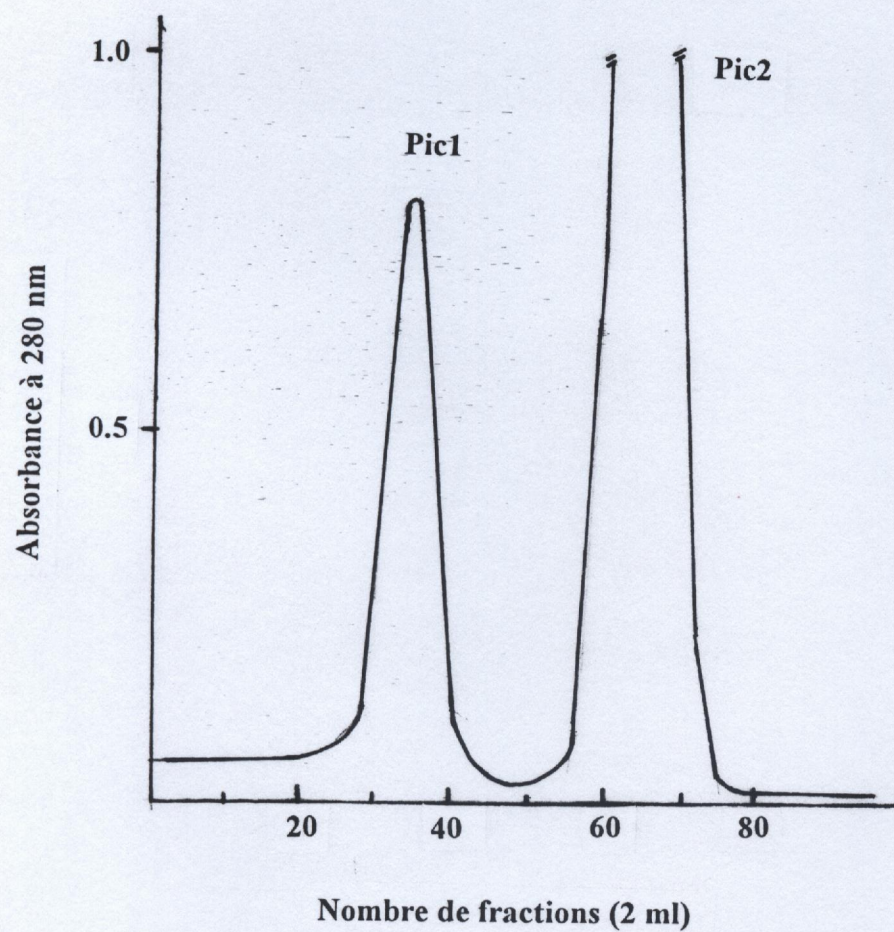


Figure 12: Profil chromatographique de la gel-filtration (Ultrogel AcA34) en conditions dissociantes (4M urée) de la XOR bovine trypsiniée.

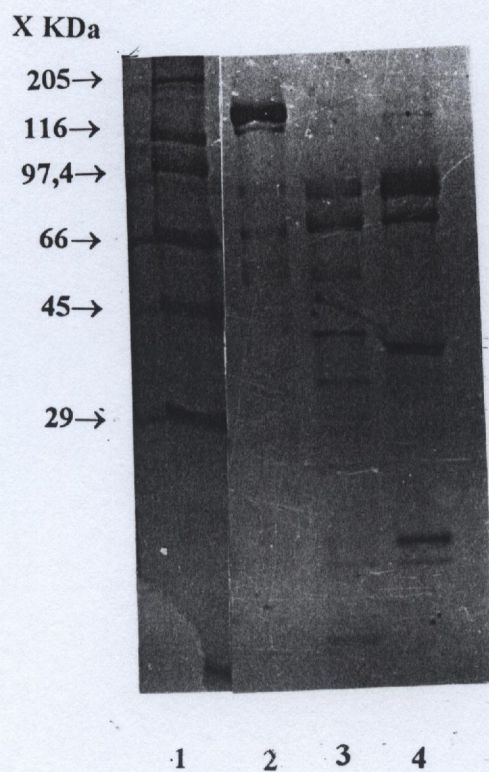


Figure 13: SDS-PAGE, 10 % des fractions obtenues par gel-filtration (Ultrogel AcA34) en conditions dissociantes (4 M urée) de la XOR bovine trypsinisée.

1. Standards des poids moléculaires.
2. XOR bovine pure avant protéolyse
3. XOR bovine trypsinisée.
4. Pic 1 de la gel-filtration.

3.2.2 Discussion

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les protéases, trypsine et chymotrypsine, n'affectent pas l'activité totale (XO plus XDH) de la XOR bovine ou humaine. Des résultats similaires ont été obtenus par Cheng *et al.* (1988) et Powell (1995) avec la XOR bovine ou humaine. Ces auteurs constatèrent que les protéases diminuent l'activité déshydrogénase, augmentent l'activité oxydase sans affecter la somme (XO plus XDH). Le fait que l'activité enzymatique de la XOR persiste après protéolyse témoigne que l'enzyme préserve son intégrité et que les fragments protéolytiques tendent à rester associés comme il sera montré plus loin.

La trypsine et la chymotrypsine, utilisées à (1:10P/P), présentent de petites différences quant au type de fragmentation. Les deux protéases clivent la XOR bovine en trois fragments principaux de PM estimés à 92, 32 et 6 KDa. Un fragment de 84 KDa provenant probablement de celui de 92 KDa est produit par la trypsine. Dans un autre essai, les PM des fragments ont été estimés à 86, 46 et 20 KDa avec un sous fragment de 78 KDa provenant du premier, obtenu avec la trypsine. Un type de clivage similaire par la trypsine et la chymotrypsine est obtenu avec la XOR humaine. Powell (1995) avait rapporté que par traitement de la XOR bovine ou humaine, la trypsine produit seulement un fragment majeur de 130 KDa et la chymotrypsine un fragment de 80 KDa en plus de plus petits fragments qui n'ont pas été caractérisés. Waud et Rajagopalan (1976) avaient fait la même observation avec la XOR du foie de rat traitée par la trypsine. Les résultats obtenus par le présent travail sont en accord avec ceux trouvés avec la XO du lait bovin (Nichols et Low, 1986; Cheng *et al.*, 1988), la XO du foie de rat (Amaya *et al.*, 1990) traitées par la trypsine ou la XDH du foie de la poule traitée par la subtilisine (Sato *et al.*, 1995). Amaya et coll. (1990) ont montré que la XO est constituée de trois fragments dont les PM ont été estimés, par gel-filtration en conditions dénaturantes, à 80, 41 et 20 Kda.

L'effet des protéases fournit des indications intéressantes sur la structure tridimensionnelle de la XOR. La XOR est proposée d'avoir une structure compacte avec des segments peptidiques relativement lâches où les protéases produisent des encoches (Nagler et Vartanyan, 1976). La XOR serait formée de trois sous-masses de 80, 41 et 20 KDa dont chacune correspond à un domaine fonctionnelle (Nichols et

Low, 1986). Des travaux récents (Amaya *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1995) proposent que le fragment de 80 KDa serait associé avec le centre à molybdène, celui de 40 KDa avec le FAD et le fragment de 20 KDa avec les deux centres fer-soufre. Après protéolyse, ces fragments restent cependant liés. Il ne sont pas séparés par gel-filtration même en présence de 4 M d'urée. Leur séparation ne semble possible que sous des conditions dissociantes. Amaya et ses collaborateurs (1990) ont réussi à séparer les fragments de la XOR du foie de rat par gel-filtration (HPLC) en présence de 6 M guanidine-HCl.

Les résultats obtenus avec la trypsine indiquent qu'un fragment de 78 KDa provient par détachement d'une petite portion du fragment de 86 KDa. Le fait que la trypsine puisse dégrader une partie du fragment de 86 KDa sans pour autant dissocier l'enzyme suggère que ce fragment est en position terminale. La comparaison de la séquence N-terminale des fragments protéolytiques de la XOR du foie de rat avec celle déduite du cDNA (Amaya *et al.*, 1990) révèle que le fragment de 80 KDa est en position C-terminale, celui de 20 KDa en position N-terminale et que le fragment de 40 KDa est intermédiaire.

3.3 Conversion de la xanthine oxydase en xanthine déshydrogénase

3.3.1 Résultats

La xanthine oxydase bovine ou humaine existent sous deux formes oxydase (forme O) ou déshydrogénase (forme D). L'enzyme purifiée en absence d'agents réducteurs des ponts disulfures est à 100% sous forme oxydase. La forme déshydrogénase partielle est obtenue par incubation avec le DTT (Dithiothreitol) 10 mM. Les activités oxydase, déshydrogénase et totale sont mesurées comme précédemment décrit (matériel et méthodes, section 2.2.6.1) Les pourcentages des activités oxydase et déshydrogénase calculés par rapport à l'activité totale ne permettent pas une bonne comparaison car la somme des activités oxydase plus déshydrogénase est toujours inférieure à l'activité totale (68,6-99,7%).

Les pourcentages de la forme O et de la forme D avec leurs valeurs corrigées, en prenant comme 100% la somme des activités, sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Taux des activités xanthine oxydase (O) et xanthine déshydrogénase (D) de la XOR bovine et humaine après incubation avec le DTT(10 mM).

Xanthine oxydoréductase	Temps d'incubation avec le DTT	% forme O	% corrigé	% forme D	% corrigé	% O + % D
Bovine	à T° ambiante 2h,n=1	40,42	58,88	28,22	41,11	68,64
	à 37° C 40min.,n=2	40,16	40,28	59,54	59,71	99,70
	à 37° C 60min.,n=4	29,58	30,97	65,93	69,02	95,51
	37° C 80 min., n=1	18,23	20,39	71,17	79,61	89,40
Bovine(Biozyme)	à 37°C 40 min.,n=1	56,29	57,75	41,18	42,24	97,47
Humaine	à 37°C 60 min.,n=2	22,51	22,27	78,67	77,72	101,18

3.3.2 Discussion

La conversion de la forme oxydase en forme déshydrogénase de la xanthine oxydase (XO) bovine et humaine purifiées dans le laboratoire, et celle de la XO bovine commercialisée par Biozyme (XObB) a été examinée.

Pour une même durée d'incubation, Le taux de conversion de la forme O en forme D observé avec la XO humaine est supérieur à celui de la XO bovine purifiée lui même supérieur au taux de conversion de la XO bovine commercialisée. Ces différences peuvent refléter des différences dans le degré de dégradation protéolytique ou non protéolytique survenant au cours de la purification ou durant la conservation (Abadeh *et al.*, 1992; Khan, 1995).

Les pourcentages de la forme D semblent positivement corrélés aux temps d'incubation avec le DTT. Cependant, on peut prévoir qu'un pourcentage de 100% ne peut être obtenu même par prolongation de l'incubation. En effet, un pourcentage de 100% de la forme D n'a guère été obtenu et une activité oxydase résiduelle généralement de 10% est invariablement observée (Kaminski, 1986; Hunt et Massey, 1992; Powell, 1995; Sanders *et al.*, 1997). Cette activité oxydase peut témoigner de la présence d'une fraction de l'enzyme sous forme d'oxydase irréversible probablement résultant d'un effet protéolytique (Powell, 1995). Alternativement, il est possible que la forme déshydrogénase soit dotée d'une activité oxydase intrinsèque. Une activité xanthine oxydase faible de la forme D a été observée avec la XOR bovine (Hunt et Massey, 1992; Harris et Massey, 1997). Cette activité est inhibée par le NAD^+ (Harris et Massey, 1997). Par conséquent, l'activité déshydrogénase, mesurée en terme de réduction du NAD^+ peut être égale à l'activité totale, mesurée comme l'oxydation de la xanthine en présence d'oxygène et de NAD^+ , au terme de la conversion. Cependant, comme ça n'a jamais été le cas, la présence d'une fraction oxydase irréversible dans les préparations enzymatiques apparait comme l'explication la plus vraisemblable de l'activité oxydase résiduelle après la conversion.

Le fait que la somme oxydase plus déshydrogénase soit inférieure à l'activité totale est un point intrigant bien que les différences soient légères. Le contraire se prête mieux à l'interprétation dans la mesure où la capacité de la forme D d'oxyder la

xanthine en présence d'oxygène et en absence de NAD^+ peut donner lieu à une surestimation de l'activité oxydase et par conséquent de la somme des deux activités.

La forme oxydase ne réagit pas avec le NAD^+ (Hunt et Massey, 1992). D'autre part, le NAD^+ inhibe l'activité oxydase de la forme D (Harris et Massey, 1997). Ensemble, ces deux observations impliquent que l'activité totale, mesurée comme l'oxydation de la xanthine en présence de NAD^+ et d'oxygène doit réellement correspondre à la somme des activités oxydase plus déshydrogénase. Ainsi, les pourcentages des activités oxydase et déshydrogénase calculés par rapport à l'activité totale peuvent servir à estimer les proportions relatives des deux formes.

3.4 Etude cinétique de la XOR

3.4.1 Détermination des paramètres cinétiques

Résultats et discussion

Les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) relatifs aux activités xanthine oxydase et NADH oxydase de la XOR bovine et humaine ont été déterminés par la méthode linéaire directe (Eisenthal et Cornish-Bowden, 1974) en utilisant le logiciel ENZPACK. Les résultats sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6: Paramètres cinétiques, K_m (μM) et V_{max} ($U \text{mg}^{-1}$), des formes oxydases et déshydrogénases de la XOR bovine et la XOR humaine. Les valeurs représentées sont les moyennes $\pm$ standard de déviation.

sub.oxydé/ sub.réduit	Paraètres	XOR bovine de forme:		XOR humaine de forme:	
		oxydase	déshydrogénase	oxydase	déshydrogénase
Xanthine/O ₂	K_m	$3,58 \pm 0,98$	$2,50 \pm 0,74$	$2,12 \pm 0,93$	Très faible
	V_{max}	$2,21 \pm 0,59$ n=8	$0,91 \pm 0,52$ n=3	$0,06 \pm 0,02$ n=6	
Xanthine/O ₂ +NAD ⁺	K_m	nd**	6,62	nd	3,54
	V_{max}	nd	3,39 n=1	nd	0,08 n=1
NADH/O ₂	K_m	Très faible	$2,69 \pm 0,15$	$2,16 \pm 0,51$	2,58
	V_{max}		$0,11 \pm 0,01$ n=1	$0,08 \pm 0,03$ n=3	0,15 n=1

nd**: non déterminé.

La comparaison des paramètres cinétiques de l'activité xanthine oxydase entre la XOR bovine et la XOR humaine permet quelques constatations:

-L'activité, traduite par V_{max} , de l'enzyme bovine est approximativement 40 fois plus élevée que l'activité de l'enzyme humaine. Ceci est aussi vrai pour les formes oxydases, réagissant avec l'O₂, que pour les formes déshydrogénases utilisant le NAD⁺. Cette différence implique que l'enzyme bovine et l'enzyme humaine diffèrent par leurs centres à molybdène où la xanthine est oxydée. La faible réactivité de l'enzyme humaine du lait avec la xanthine a été interprétée comme étant due à la présence de formes inactives de l'enzyme. Ces formes ayant un centre à molybdène

défectueux en soufre ou en molybdène (Harrison et al., 1991; Abadeh *et al.*, 1992, Abadeh, 1993).

-la valeur de K_m pour la xanthine de l'enzyme bovine est approximativement deux fois plus élevée que la valeur de K_m de l'enzyme humaine. La faible valeur de K_m de la XOR humaine pour la xanthine n'est pas nécessairement liée à l'affinité de l'enzyme envers ce substrat. Ceci peut simplement refléter la saturation de l'enzyme par de faibles concentrations de xanthine probablement à cause de la présence des formes inactives précédemment évoquées.

-La variation de l'activité spécifique de l'enzyme humaine. La variation de l'activité xanthine oxydase de la XOR humaine peut résulter de la variation de la proportion des formes inactives desulfo et démolybdo dans les échantillons enzymatiques (Powell, 1995).

L'activité NADH oxydase de l'enzyme humaine est comparable ou supérieure à celle de l'enzyme bovine pour les formes D ou les formes O, respectivement. Les valeurs de K_m par contre ne sont pas nettement différentes entre les deux enzymes. Le NADH est oxydé au niveau du centre FAD (Bray, 1975, Schopfer *et al.*, 1988; Hunt et Massey, 1994). La XOR humaine paraît avoir un centre FAD plus réactif comparée à l'enzyme bovine. Cependant des différences structurales au niveau de ce centre, entre les deux enzymes, n'ont pas été rapportées.

La comparaison des activités des formes oxydases (O) et des formes déshydrogénase (D) de l'enzyme bovine et l'enzyme humaine révèle la préférence de la forme D pour le NADH. La xanthine est un bon substrat pour les deux formes. Les centres FAD de la forme D et de la forme O sont différents de point de vue potentiel redox et conformation (Massey *et al.*, 1989, Saito *et al.*, 1989, Hunt et Massey, 1993). Ces différences peuvent expliquer la réactivité relativement élevée de la forme D avec le NADH. Ce dernier tend à être stabilisé par la forme D. Par ailleurs, L'oxygène moléculaire sert d'accepteur d'électrons pour la forme O mais non pour la forme D qui utilise plutôt le NAD^+ . En résumé, la XOR bovine est plus active avec la xanthine qu'elle soit sous sa forme O ou D, en présence d'un accepteur convenable des électrons, comparée à la XOR humaine. Cette dernière est par contre plus active avec le NADH, en particulier sous sa forme D.

3.4.2 Production du superoxyde

La xanthine oxydoréductase réduit l'oxygène moléculaire en superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le $\text{O}_2^{\bullet -}$ et le H_2O_2 sont produits dans la même réaction de la XOR avec son substrat réducteur. Les proportions relatives du $\text{O}_2^{\bullet -}$ et du H_2O_2 varient suivant les conditions expérimentales (pH, concentration des substrats réducteur et oxydant), par réduction univalente ou divalente de l'oxygène (McCord et Fridovich, 1968; Fridovich, 1970 et 1985a). La variation de la proportion du $\text{O}_2^{\bullet -}$ produit en fonction de la concentration du substrat réducteur, xanthine ou NADH, a été examinée. Les résultats sont montrés dans les figures 14 et 15.

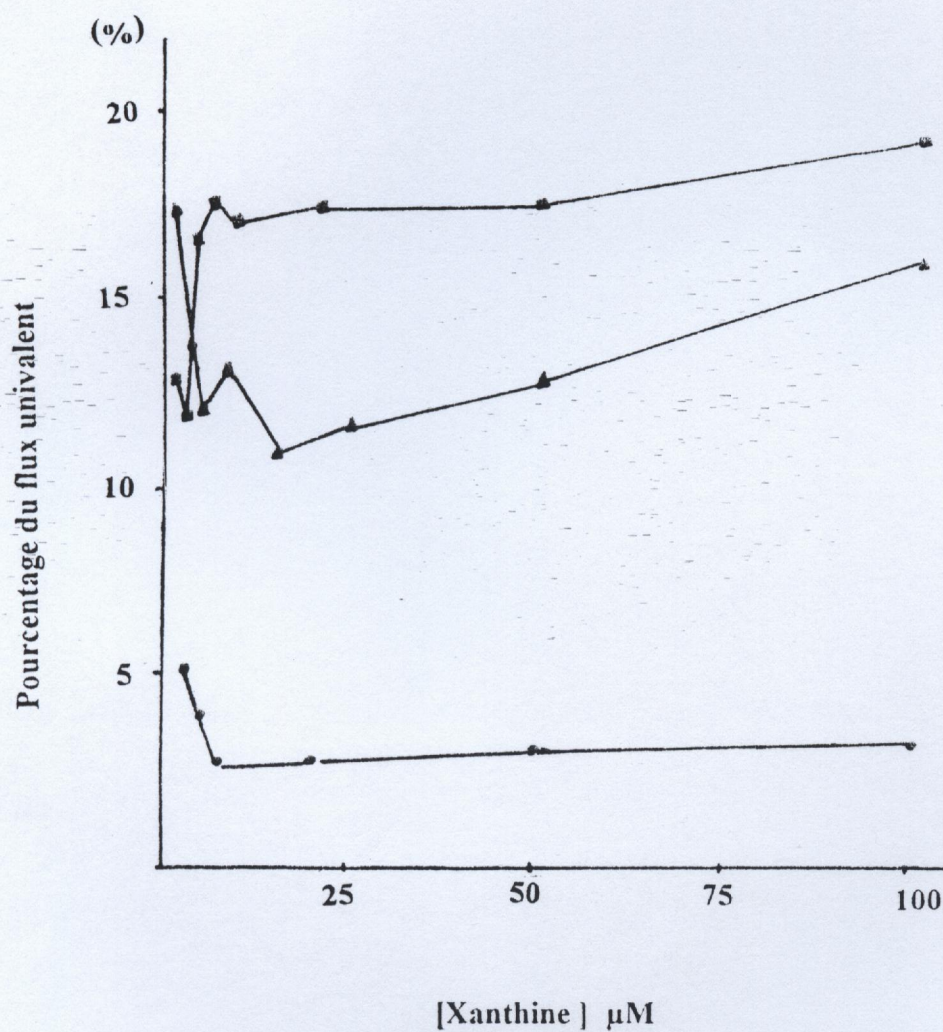


Figure 14: Variation du pourcentage du flux univalent produisant le superoxyde en fonction de la concentration du substrat réducteur (xanthine) par la XO humaine (■—■), la XO (●—●) et la XDH (▲—▲) bovines.

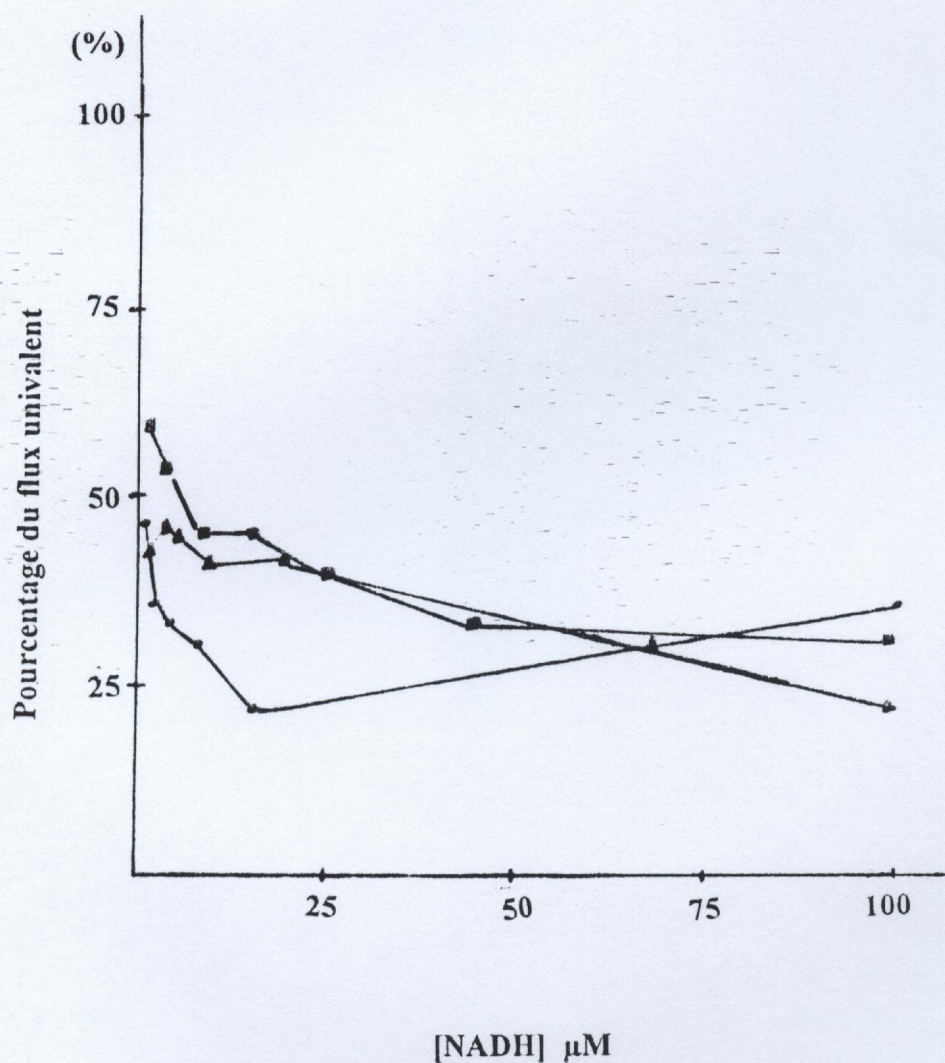


Figure 15: Variation du pourcentage du flux univalent produisant le superoxyde en fonction de la concentration du substrat réducteur (NADH) par la XDH bovine (●-●), la XO (■-■) et la XDH (▲-▲) humaines.

L'activité xanthine oxydase de la forme déshydrogénase (D) de l'enzyme humaine, en absence de NAD^+ , est très faible. L'activité NADH oxydase de la forme oxydase (O) de l'enzyme bovine est également très faible. En conséquence, la production du $\text{O}_2^{\cdot -}$ ne pouvait pas être mesurée dans ces cas et ce fait limite la comparaison entre les différentes activités productrices du radical superoxyde.

D'une manière générale, les pourcentages de $\text{O}_2^{\cdot -}$ les plus élevés sont observés avec les faibles concentrations de substrat réducteur (xanthine ou NADH). L'oxygène moléculaire est réduit au niveau du site FAD. Le transfert d'un électron, à l'oxygène du FADH $\cdot$, produit le $\text{O}_2^{\cdot -}$, le transfert de deux électrons à partir du FADH $_2$ génère le H_2O_2 . Les proportions relatives du FADH $\cdot$ et FADH $_2$ dépendent de l'état d'oxydation de l'enzyme (Fridovich, 1970 et 1985a; Harris et Massey, 1997). Dans les conditions faiblement réductrices: aux faibles concentrations de substrat réducteur, la fraction du FADH augmente favorisant la production du $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Powell, 1995).

En oxydant la xanthine, L'activité de la XDH bovine ou humaine avec l'oxygène est plus faible que celle de la XO. Cependant, la proportion du $\text{O}_2^{\cdot -}$ produit, mesuré pour la XDH bovine, est plus importante que celle produite par la XO. En revanche, la forme oxydase de l'enzyme humaine semble produire une plus grande proportion de $\text{O}_2^{\cdot -}$ que la forme déshydrogénase en oxydant le NADH. Le résultat obtenu avec l'enzyme bovine est prévisible. En effet, la forme déshydrogénase a tendance à stabiliser le FADH $\cdot$ comparée à la forme oxydase où le FADH $_2$ est plus stable (Nakamura et Yamazaki, 1982, Saito *et al.*, 1989, Hunt et Massey, 1992). Par conséquent, la forme D réduit l'oxygène plutôt par transfert univalent des électrons à partir du FADH et produit plus de $\text{O}_2^{\cdot -}$. En se basant sur cette donnée, le comportement de l'enzyme humaine se prête mal à l'interprétation. Enfin, il est à noter que la XOR bovine et la XOR humaine, produisent plus de $\text{O}_2^{\cdot -}$ par oxydation du NADH que par oxydation de la xanthine.

3.4.3 Etudes d'inhibition

L'inhibition de l'activité xanthine oxydase de la XO bovine et humaine par l'allopurinol, l'oxypurinol et l'acide urique a été étudiée. L'inhibition, par le NAD^+ , de l'activité NADH oxydase de la XO humaine a également été examinée. L'effet inhibiteur, exprimé en pourcentage d'inhibition, de l'allopurinol, oxypurinol et l'acide urique mesuré avec la XO bovine est montré dans la Figure 16.

L'effet de l'allopurinol, comparé à l'oxypurinol est plus prononcé aux fortes concentrations, au faibles concentrations les deux inhibiteurs possèdent des effets comparables. L'inhibition par les inhibiteurs cités (allopurinol, oxypurinol, acide urique et NADH) a été par ailleurs, caractérisée cinétiquement. Le type et les constantes d'inhibition ont été déterminés comme décrit en matériel et méthodes (section 2.2.7.3). Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7: Les paramètres cinétiques de l'oxydation de la xantine ou du NADH par la XO bovine et la XO humaine en présence d'inhibiteurs. Les constantes d'inhibition, K_i et K_I sont exprimées en μM .

Sub.oxydé/ sub. réduit	Inhibiteur	Types et constantes d'inhibition de	
		XO Bovine	XO humaine
Xanthine/ O_2	Allopurinol	Compétitif	Compétitif
		K_i 1,0 - 1,5	2,3 - 3,1
	Oxypurinol	nd**	Compétitif
		nd	0,2 - 0,9
	Acide urique	Type mixte	Type mixte
		(comp.* - non comp.)	(comp.- non comp)
		K_i 149,4	14,1
		K_I 436,7	255,9
NADH/ O_2	NAD^+	nd	Type mixte
			(comp.- non comp.)
		nd	K_i 3,4
		nd	K_I 42,1

Comp.*: Compétitif, nd**: non déterminé

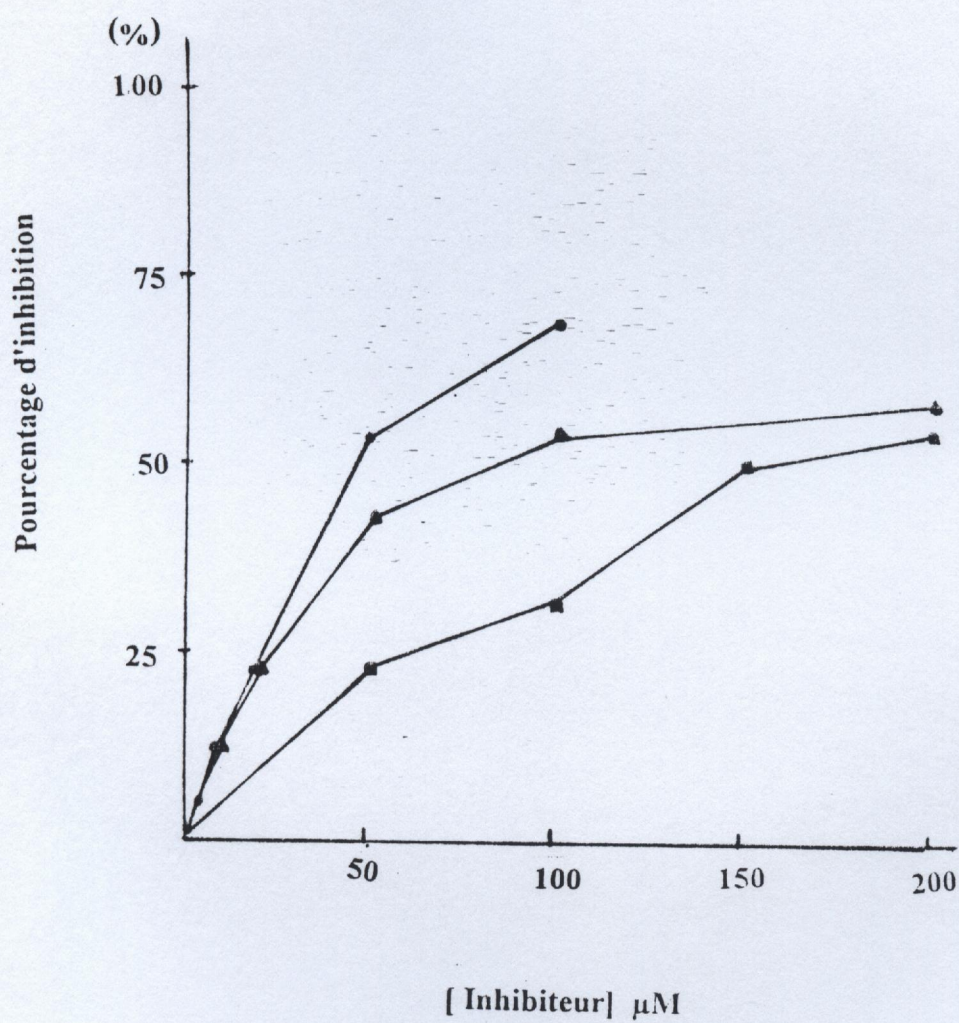


Figure 16: Inhibition de l'activité xanthine oxydase de la XO bovine par l'allopurinol ●●, l'oxypurinol ▲▲ et l'acide urique ■■, $n = 3$.

Les résultats montrés dans la figure 16 et dans le tableau 7 sont en accord. Ensemble, ces résultats montrent que l'effet inhibiteur de l'acide urique est très faible par comparaison à l'allopurinol et l'oxypurinol.

L'allopurinol et l'oxypurinol sont des inhibiteurs compétitifs. La constante d'inhibition (k_i) de l'allopurinol avec la XO bovine ou humaine est de l'ordre du μM pour la xanthine. Ceci implique que l'efficacité de cet inhibiteur dépend uniquement des concentrations relatives de l'inhibiteur et du substrat rencontrées par l'enzyme. Il semble que l'oxypurinol soit plus puissant que l'allopurinol, avec la XO humaine, (k_i plus faible). Ce résultat va à l'encontre de celui montré dans la figure 16. La raison en serait que dans les études cinétiques ont été utilisées les faibles concentrations d'inhibiteurs. Il est intéressant de remarquer ici que l'allopurinol est un inhibiteur "suicide". Il se fixe sur la XOR, au centre Mo, et subit une oxydation à 2 électrons créant l'oxypurinol. Celui-ci forme avec le Mo réduit (Mo^{IV}) un complexe abortif très solide dont la demi-vie dépasse 4 heures (Pelmont, 1988).

L'inhibition exercée par les produits, acide urique et NAD^+ , sur les activités xanthine oxydase et NADH oxydase respectivement est de type mixte (tableau 7). La réaction xanthine oxydase est régie par un mécanisme de type ping-pong (Grenlee et Handler, 1964; Olson *et al.*, 1974). Dans ce type de mécanisme, le produit de la réaction se comporte souvent comme inhibiteur non compétitif vis-à-vis du substrat dont il dérive. (Pelmont, 1988). L'inhibition non compétitif implique, en général, la fixation de l'inhibiteur sur un site distinct du site de fixation du substrat (Palmer, 1985, Pelmont, 1988a). Dans le cas particulier des réactions de type ping-pong, le produit se lie au même site que le substrat mais dans une forme différente (Pelmont, 1988).

Dans la réaction d'oxydation de la xanthine, cette dernière se lie au centre à Mo où le Mo est dans un état oxydé (Mo^{VI}). L'acide urique par contre se lie au Mo réduit (Mo^{IV}) (Radi *et al.*, 1992). l'enzyme contenant le centre à Mo réduit représente une forme cinétique différente de celle renfermant un centre oxydé avec lequel le substrat interagit de manière productive (Hille, 1992). L'acide urique maintient le centre à Mo dans état réduit, incapable de fixer le substrat (Radi *et al.*, 1992). L'inhibition exercée par l'acide urique n'est, cependant, que partiellement non compétitive. Elle est de type mixte, non compétitive- compétitive. Le caractère

compétitif de l'inhibition peut résulter de la possibilité de formation d'un complexe entre l'enzyme et l'acide urique puisque celui-ci, comme tout produit, peut occuper le site actif (Pelmont, 1988). Le rapport $K_I/K_i > 1$ (18 pour l'enzyme humaine, 3 pour l'enzyme bovine) reflète que la liaison de l'acide urique est moins efficace en présence de la xanthine. La comparaison des rapports K_I/K_i pour l'enzyme bovine et l'enzyme humaine suggère que l'acide urique inhibe plus efficacement l'activité xanthine oxydase de l'enzyme bovine que celle de l'enzyme humaine.

L'inhibition de l'activité NADH oxydase de l'enzyme humaine, par le NAD^+ , est également de type mixte (compétitif-non compétitif). Le NADH est oxydé au niveau du site FAD. Il a été montré que le NADH se fixe sur le FAD oxydé et le NAD^+ sur le FAD réduit (Schopfer *et al.*, 1988). Ainsi, le NAD^+ pourrait inhiber l'oxydation du NADH par l'enzyme humaine d'une manière similaire à celle décrite ci-dessus pour l'acide urique.

3.5 Discussion générale

La xanthine oxydoréductase est actuellement reconnue comme une source des espèces oxygénées réactives (ROS) *in vivo*. La possibilité d'obtenir l'enzyme sous forme pure, en grandes quantités, a contribué à l'étude approfondie de cette enzyme. En fait, le lait est une source très riche en XOR. Le lait bovin en contient environ 160 mg par litre de lait partagés entre la crème et le ^{lait}écrémé (Cheng *et al.*, 1988). La XOR du lait possède apparemment les mêmes propriétés que l'enzyme tissulaire. Chez l'homme, la XOR du foie et de l'intestin diffère du point de vue activité enzymatique de celle du lait (Parks et Granger, 1986). L'étude de l'enzyme purifiée du lait peut donner une idée sur les caractéristiques de celle des tissus.

La méthode développée par Nakamura et Yamazaki (1982) en combinaison avec la chromatographie sur colonne d'héparine (Adachi *et al.*, 1993) s'est révélée efficace pour la purification de la XOR bovine et humaine à partir de lait frais ou congelé. Cette combinaison associe facilité et rentabilité.

La XOR bovine et humaine obtenues sous forme pure ont été caractérisées de point de vue structure et activité enzymatique. L'effet des protéases sur la XOR est à l'origine de l'hypothèse proposant l'organisation de la molécule protéique de cette enzyme en domaines (Nagler et Vartanyan, 1976; Nichols et Low, 1986). La trypsine et la chymotrypsine clivent la molécule de la XOR en trois fragments dont les PM ont été estimés, par électrophorèse en gel de polyacrylamide, à 86, 46 et 20 KDa. Chaque fragment correspond à un centre d'oxydoréduction. En travaillant sur la XDH du foie de rat ou de la poule, Amaya, Sato et leurs collaborateurs (1990 et 1995) ont proposé que le fragment de 80 KDa est associé avec le centre à molybdène, celui de 40 KDa avec le FAD et le fragment de 20 KDa avec les deux centres fer-soufre. Après protéolyse, ces fragments restent fortement liés même en présence de dissociants tel que l'urée (4 M).

Les protéases provoquent, par ailleurs, la conversion irréversible de la XDH en XO. L'interconversion réversible entre la XDH et la XO est produite par oxydation ou réduction des ponts disulfures. La conversion de la XO en XDH par le DTT, agent réducteur des ponts disulfures, a été examinée. La conversion O/D n'est pas complète et une activité oxydase irréversible est observée. Cette activité oxydase résiduelle est

probablement dûe à une protéolyse survenant au cours des différentes étapes de la purification de l'enzyme.

Une étude cinétique comparative a été entreprise dans le but de caractériser le comportement de la XOR bovine et la XOR humaine, purifiées du lait, avec leurs substrats physiologiques: xanthine, O_2 , NAD^+ et NADH.

La XOR bovine est très active avec la xanthine. Cette dernière est oxydée en acide urique par la forme oxydase en présence d'oxygène et par la forme déshydrogénase en présence de NAD^+ comme accepteurs d'électrons. L'activité de la XOR humaine avec la xanthine est très faible. Cette propriété de l'enzyme humaine a été initialement rapportée par Harrison et ses collaborateurs (1991). Par la suite, de nombreux auteurs ont fait la même observation (Abadeh *et al.*, 1992, 1993; Brown *et al.*, 1995; Powell, 1995; Sanders *et al.*, 1997). Harrison *et al.* (1991) avaient suggéré que le comportement de l'enzyme humaine avec la xanthine résultait de la prédominance (jusqu'à 98%) de formes inactives dans les préparations enzymatiques. Deux formes ont été identifiées, l'une défectueuse en soufre (desulfo), l'autre en molybdène (demolybdo) (Abadeh *et al.*, 1992; Abadeh, 1993; Godber *et al.*, 1997). La forme desulfo de la XOR peut être réactivée *in vitro* par incorporation du soufre (Itoh *et al.*, 1978; Nishino *et al.*, 1983; Nishino, 1986)

Brown *et al.* (1995) ont montré que l'activité xanthine oxydase du lait varie avec le temps suivant la parturition. Ces auteurs ont proposé que l'activité de la XOR humaine dans le lait et probablement dans d'autres tissus serait soumise à une régulation post-transcriptionnelle, par interconversion entre les formes sulfo et desulfo, et que cette régulation est liée à la fonction de l'enzyme restée jusqu'à présent mal définie.

L'oxydation du NADH a lieu au niveau du site FAD (Schopfer *et al.*, 1988; Hunt et Massey, 1994) et n'est pas affectée par l'état du centre à Mo. Ceci explique que l'activité NADH oxydase de l'enzyme humaine est comparable à l'activité de l'enzyme bovine bien que cette dernière soit légèrement inférieure. Ce résultat rejoint ceux rapportés par d'autres auteurs (Abadeh *et al.*, 1992; Abadeh, 1993; Powell, 1995; Sanders *et al.*, 1997).

Le rôle principal attribué à la XOR, chez les primates, est la catalyse de l'étape finale du catabolisme des purines, par oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique (Kooij, 1994). Cette réaction peut intervenir dans le contrôle du pool de xanthine et d'hypoxanthine disponibles à la synthèse des purines par voie de sauvetage puisque l'oxydation de la xanthine est irréversible et l'acide urique ne participe pas à cette voie (Grum, 1993; Kooij, 1994). Cependant, la localisation préférentielle de la XOR dans certains tissus et dans certains types de cellules dans le même tissu suggère des rôles plus spécialisés pour cette enzyme dans l'organisme (Kooij *et al.*, 1992a; 1992b).

La propriété la plus remarquable de la XOR est sa capacité de produire le $O_2^{\bullet -}$ et le H_2O_2 , espèces oxygénées réactives, par réduction de l'oxygène moléculaire. Ces espèces interviennent dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Kooij *et al.*, 1992b; Martínez-Cayela, 1995; Remacle *et al.*, 1995). L'implication de la XOR dans l'ischémie et l'inflammation, comme source majeure des ROS responsables des lésions tissulaires est actuellement proposée. L'oxygène moléculaire est un substrat pour la forme oxydase produisant le $O_2^{\bullet -}$ et le H_2O_2 , la forme déshydrogénase utilise le NAD^+ comme accepteur d'électrons. Les résultats obtenus par le présent travail et par d'autres travaux (Abadeh *et al.*, 1992; Abadeh, 1993; Powell, 1995; Harris et Massey, 1997; Sanders *et al.*, 1997) montrent qu'en absence de NAD^+ , la XDH bovine et la XDH humaine sont capables de produire le $O_2^{\bullet -}$ et le H_2O_2 , par réduction de l'oxygène, en présence de xanthine ou de NADH. La réactivité de la forme D avec l'oxygène est plus faible que celle de la forme O. Cependant, les quantités de $O_2^{\bullet -}$ produites par la forme D sont tout de même importantes. Avec le NADH comme substrat, les formes D de l'enzyme humaine et bovine sont plus actives que les formes O. Il en suit que les quantités de $O_2^{\bullet -}$ produites par les formes D sont plus importantes que celles produites par les formes O.

La capacité de la XDH de produire les ROS s'avère d'une grande importance dans le contexte de la théorie proposée par Granger (1981) et McCord et Roy (1982) pour expliquer la contribution de la XOR aux lésions tissulaires associées à la réperfusion post-ischémique. Ces auteurs proposent que durant l'ischémie, la diminution de

l'apport en oxygène conduit à la dégradation de l'ATP en hypoxanthine et xanthine. Au cours de l'ischémie, l'augmentation de l'influx des ions Ca^{2+} résulte en l'activation des protéases calcium-dépendantes. Celles-ci provoquent une conversion irréversible de la XDH en XO. Avec la réoxygénation, la XO utilise l'hypoxanthine et la xanthine accumulées pour réduire l'oxygène moléculaire en O_2^- et H_2O_2 . Actuellement, la théorie est en somme acceptée. Cependant, la conversion de la XDH en XO et la contribution de chacune des deux formes aux lésions post-ischémiques restent fort controversées (Roy et McCord, 1983; Engerson *et al.*, 1987; Parks *et al.*, 1988; Yokoyama *et al.*, 1990; Kooij *et al.*, 1994).

De nombreuses recherches ont mis en évidence l'augmentation de la concentration de l'hypoxanthine et la xanthine dans la circulation et les tissus au cours de l'ischémie bien que les résultats soient divergents quant aux valeurs rapportées. Dans les conditions normales, la concentration de l'hypoxanthine-xanthine mesurée était de 20 à 40 μM dans les tissus (Granger, 1988, Parks *et al.*, 1988) et de 1 à 3 μM dans la circulation (Yokoyama *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 1995). En conditions ischémiques, la concentration de l'hypoxanthine s'élève à environ 25 μM dans la circulation (Tan *et al.*, 1995) et à 200 jusqu'à 400 μM dans les tissus (Granger, 1988; Parks *et al.*, 1988). Quoiqu'il en soit, les concentrations d'hypoxanthine atteintes durant l'ischémie ne limitent pas la réaction de la XO ou la XDH avec l'hypoxanthine car ces concentrations sont supérieures à la valeur de K_m pour ce substrat estimée à 11 μM (Granger, 1988; Parks *et al.*, 1988; Yokoyama *et al.*, 1990). Il serait de même pour la xanthine dont le K_m , encore plus faible, permettrait à la XOR d'agir même à de plus faibles concentrations de substrat.

La XOR existe *in vivo* principalement (~80%) sous forme D (Granger, 1988; Parks *et al.*, 1988; Nishino et Tamura, 1991). La conversion de la XDH en XO durant l'ischémie, en terme de temps et de taux, est encore sujette à la controverse. Il est possible que la divergence des résultats soit due à l'instabilité de la forme D pouvant être convertie en forme O durant la préparation des échantillons (Kooij, 1994). L'addition du DTT, en vue de stabiliser la forme D, peut de son côté fausser les résultats par surestimation du pourcentage de cette forme (Powell, 1995). Les résultats obtenus par la présente et par d'autres recherches (Powell, 1995; Sanders *et al.*, 1997) montrent que la conversion de la XDH en XO n'est pas indispensable à la production des ROS *in vitro*.

Le NADH s'accumulant en conditions ischémiques est un bon substrat pour la forme déshydrogénase. Ceci est particulièrement important pour l'enzyme humaine. L'activité de la XOR humaine dans le lait comme dans les tissus, autres que le foie et l'intestin, est faible avec la xanthine et l'hypoxanthine (Parks et Granger, 1986). Toutefois, la XDH humaine, dans ces tissus, pourrait produire le $O_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 à partir de l' O_2 en oxydant le NADH. Dans la mesure où les résultats obtenus *in vitro* avec la XOR humaine et bovine peuvent être extrapolés, à l'*in vivo*, la XOR qu'elle soit sous sa forme oxydase ou déshydrogénase constitue une source potentielle des ROS au cours de la réperfusion des tissus ischémiques.

Les études d'inhibition mettent en évidence l'effet inhibiteur du NAD^+ sur l'activité NADH oxydase de la XO humaine. L'effet du NAD^+ sur la XO et la XDH humaines a déjà été rapporté (Powell, 1995, Sanders *et al.*, 1997). Le rapport $NAD^+/NADH$ est estimé à 400 μM (Tishler, *et al.*, 1977) jusqu'à 700 μM (Nishino et Tamura, 1991) dans le cytoplasme des cellules normales. Dans les conditions ischémiques, ce rapport chute à 30 (Nishino et Tamura, 1991). Ainsi, on estime que, dans le cytoplasme des cellules ischémiques, la concentration du NAD^+ serait égale à environ 400 μM et celle du NADH à 15 μM (Powell, 1995). Bien que la concentration du NADH soit supérieure au K_m pour ce substrat, le rapport $NAD^+/NADH$ reste élevé. Le NAD^+ pourrait donc inhiber l'oxydation du NADH et par conséquent la production des ROS par la XOR humaine au cours de la réperfusion. Cependant, cette possibilité reste à examiner.

Le foie et l'intestin sont les organes les plus riches en XOR chez l'homme (Kooij *et al.*, 1992a). De plus, l'activité de l'enzyme provenant de ces organes avec la xanthine est comparable à celle de l'enzyme ^{lactique} bovine (Krenitsky *et al.*, 1986). Chez l'homme comme dans des modèles animaux, il a été montré que dans le cas d'ischémie hépatique, la XOR est libérée du foie dans la circulation où sa demi-vie est remarquablement longue (Tan *et al.*, 1993b; Nielsen *et al.*, 1994 et 1995). Il serait de même pour la XOR intestinale (Nielsen *et al.*, 1994 et 1995). La XOR libérée du foie et de l'intestin serait impliquée dans la génération de ROS responsables de lésions de tissus humains où l'activité de la XOR est très faible tels que le cœur et les poumons (Grum, 1993; Tan *et al.*, 1995).

L'activité de la XOR avec la xanthine est inhibée par l'allopurinol et l'oxypurinol, inhibiteurs de synthèse. Les études d'inhibition ont révélé que l'allopurinol et l'oxypurinol sont des inhibiteurs compétitifs puissants. La constante d'inhibition de l'allopurinol est de l'ordre du K_m avec la xanthine. L'allopurinol pourrait agir à des concentrations proches de celles de la xanthine. L'oxypurinol serait efficace à des concentrations plus faibles. L'oxypurinol est en fait le produit d'oxydation de l'allopurinol par la XOR.

L'administration d'allopurinol aux animaux s'est avérée efficace quant à l'atténuation des lésions post-ischémiques (Zimmerman *et al.*, 1988). Dans le plasma des animaux traités par l'allopurinol à la dose communément utilisée (50 mg/kg), la concentration de l'allopurinol-oxypurinol était de 10 à 20 μM (Zimmerman *et al.*, 1988; Tan *et al.*, 1995). A ces concentrations, l'allopurinol et l'oxypurinol peuvent inhiber efficacement la XOR circulante durant la réperfusion en tenant compte de la concentration de la xanthine-hypoxanthine estimée à 25 μM dans le plasma (Tan *et al.*, 1995). Cependant, de nombreux auteurs ont attribué l'effet protecteur de l'allopurinol à sa propriété de "scavenger" des radicaux libres; en particulier du radical HOCl, dérivant des neutrophiles activées (Das *et al.*, 1986, Granger *et al.*, 1986, Moorhouse *et al.*, 1987). La concentration minimale d'allopurinol requise pour exercer un effet antioxydant est évaluée à 500 μM (Zimmerman *et al.*, 1988, Parks *et al.*, 1988). Ainsi, l'allopurinol à la concentration plasmatique de 10-20 μM , ne semble pas pouvoir agir comme antioxydant et son effet protecteur contre les lésions serait principalement dû à l'inhibition de la production des ROS par la XOR.

L'acide urique bien qu'il soit un inhibiteur faible de la XOR bovine et humaine (K_i très élevé), sa concentration plasmatique élevée (60-70 mg/l) lui permettrait d'inhiber l'enzyme. De ce fait, l'acide urique peut contribuer à la défense de l'organisme contre les radicaux libres dans les conditions normales (Peden *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1993a) et probablement durant la réperfusion post-ischémiques.

Conclusion

La découverte de la xanthine oxydoréductase (XOR) date de 1899. La facilité et les quantités avec lesquelles la XOR est obtenue à partir du lait bovin en plus de sa stabilité ont poussé les chercheurs sur cette enzyme devenue un modèle pour l'étude des réactions d'oxydoréduction en général. La XOR se présente sous deux formes: déshydrogénase et oxydase. Cette dernière a la capacité de produire le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène et a largement servi comme système générateur de l'ion superoxyde dans les dosages *in vitro* de la superoxyde dismutase.

L'importance prêtée à la XOR s'est accrue avec l'émission par Granger et ses collaborateurs (1981) de leur hypothèse accusant les radicaux libres oxygénés dans les lésions post-ischémiques. Le cumul de données sur la XOR dont on dispose actuellement dérive, en grande partie de l'étude *in vitro* de la XOR bovine. Les études *in vivo* ont été menées chez les félins, le rat, le lapin et chez le chien.

Peu de connaissances concernant la XOR humaine sont disponibles vu la rareté du lait humain. Récemment, la purification de la XOR à partir du lait humain congelé s'est avérée possible et avec des rendements remarquables. L'obtention de l'enzyme humaine en grandes quantités a permis sa caractérisation. La XOR bovine et la XOR humaine ont des poids moléculaires et probablement des structures très proches. Cependant, les deux enzymes se comportent différemment vis-à-vis des substrats réducteurs xanthine et NADH. Ces substrats s'accumulent en cas d'ischémie et peuvent servir à produire les radicaux libres par la XOR bovine ou humaine. En outre, les mécanismes de défense "anti-radicaux libres" mis en oeuvre par les organismes aérobies sont diversifiés et varient largement entre les espèces. Ces différences font remarquer que les résultats obtenus chez une espèce ne peuvent être extrapolés, sans prudence, à une autre espèce.

Les résultats lesquels nous avons obtenus en ce qui concerne la capacité de la XOR humaine de produire les radicaux libres en présence du NADH au même titre que la XOR bovine sont d'une grande importance mais restent préliminaires. D'autres aspects de la question méritent d'être examinés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadeh, S., Killackey, J., Benboubetra, M. & Harrison, R. (1992). Purification and partial characterization of xanthine oxidase from human milk. *Biochim. Biophys. Acta*. **1117**: 25- 32.
- Abadeh, S. (1993) Human xanthine oxidoreductase and anti-xanthine oxidase antibodies. Ph. D. Thesis, University of Bath, U.K.
- Abadeh, S., Case, P.C. & Harrison, R. (1993) Purification of xanthine oxidase from human heart. *Biochem. Soc. Trans.*, **21**: 99S.
- Adachi, T., Fukushima, T., Usami, Y. & Hirano, K. (1993). Binding of human xanthine oxydase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial- cell surface. *Biochem. J.*, **289**: 523- 527.
- Akizuki, S., Yoshida, S., Chambers, D.E., Eddy, L.J., Parmley, L.F., Yellon, D.M. & Downey, J.M. (1985) Infarct size limitation by xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, in closed-chest dogs with small infarcts. *Cardiovas. Res.*, **19**: 686-92.
- Allen, R.E., Outhwaite, J.M., Morris, C.J. , Blake, D.R. (1987) xanthine xidoreductase is present in human synovium. *Ann. Rheum. Dis.* , **46**:843-845.
- Amaya, Y. , Yamazaki, K-I. , Sato, M., Noda, K., Nishino, T.& Nishino, T. (1990) Proteolytic Conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD- dependent type to the O-dependent type. *J. Biol. chem.*, **265**:1470 -75.
- Ambrosio, G., Oriente, A., Napoli, C., Palumbo, G., Chiariello, P., Marone, G., Condorelli, M., Chiariello, M. & Triggiani, M. (1994) Oxygene radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor. *J.Clin. Invest.* , **93**:2408-16.
- Ames, B.N, Catchart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:6858-62.
- Angermüller, S., Bruder, G., Völkl, A., Wesch, H. & Fahimi, H.D. (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisome. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell. Biol.*, **45**: 137- 44.
- Armstrong, R.S, Sohal, R. G., Cutler, R.G., Slater, T.F. (eds) (1984) Free radicals, molecular biology, aging and disease. Raven, New York.

- Avis, P.G., Bergel, F. & Bray, R.C.(1956) Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part III. Estimation of the cofactors and the catalytic activities of enzyme fractions from cow's milk. *J. Chem. Soc.*, 1219-25.
- Battelli,M.G., Della Corte, E.& Stirpe, F.(1972) Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs. *Biochem. J.*, **126**: 747- 49.
- Benboubetra, M. (1989) Characterization and significance of human anti- (BMFG) - Membrane antibodies. Ph.D. Thesis, University of Bath.U.K.
- Betcher-Lange, S.L., Coughlan, M.P. & Rajagopalan, K.V. (1979) Syncatalytic modification of chicken liver xanthine dehydrogenase by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* , **254**: 8125-29.
- Bjork,L.& claesson, O.(1979) Xanthine oxidase as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase system in milk. *J. Dairy Sci.*, **62**: 1211- 15.
- Bounds, P.L. & Winston, G.W. (1991) The reaction of xanthine oxidase with aldehydic products of lipidic peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, **11**: 447-53.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. *Anal. Biochem.* , **72**: 248- 54.
- Bray, R.C. (1963) Xanthine oxidase. In Boyer PD (ed): *The Enzymes* , ed 3, vol. 7. New York, Academic Press, pp. 533-56.
- Bray, R.C (1975) Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. *In the Enzymes* (ed. Boyer, P.D.) 3rd edn., Vol. **12**, pp.299-419.New York: Academic Press.
- Bray, R.C., Gutteridge, S., Stotter, D.A. & Tanner, S.J. (1979) The mechanism of action of xanthine oxidase. *Biochem.J.*, **177**:357-60.
- Bray, R.C. & George, G.N. (1985) Electron-paramagnetic-resonance studies using pre-steady-state kinetics and substitution with stable isotopes on the mechanism of action of molybdoenzymes. *Biochem. Soc. Trans.*, **13**: 560-67.
- Britigan, B.E, Pou, S., Rosen, G.M., Lilleg, D.M. & Buettner,G.M. (1990) Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. The confounding problem of adventitious iron bound to xanthine oxidase.*J. Biol. Chem.*, **265**: 17533- 38.
- Brown, G.B., Peterman, M.L. & Furst, S.S (1948). The incorporation of adenine into pentose and deoxy-pentose nucleic acids. *J.Biol.Chem.*, **174**: 1043-64.

- Brown, A.- M., Benboubetra, M., Ellison, M., Powell, D., Rekless, J.D. & Harrison, R. (1995) Molecular activation- deactivation of xanthine oxydase in human milk. *Biochim. Biophys. Acta*: **24221**: 1-7.
- Bruder, G., Heid, H.W., Jarash, E.D. & Mather, I.H. (1983) Immunological identification of xanthine oxidase in cells and tissues. *Differenciacion*, **23**: 218- 225.
- Bruder, G., Jarash, E.D.& Heid. H.W. (1984) High concentrations of antibodies to xanthine oxidase in human and animal sera. *J.Clin.Invest.*, **74**: 783-94 .
- Charlat, M.L., O'Neil, P.G., Egan, J.M., Abernethy, D.R., Michael, L.M., Meyers, M.L., Roberts, R.& Bolli, R. (1987) Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the « stunned myocardium » *Am.J.Physiol.*, **252**:H 566-77.
- Cheng, S.S., Koch, U. & Brunner, J.R. (1988) Charecteristics of purified cow's milk xanthine oxidase and its submolecular charecteristics. *J. Dairy Sci.*, **71**: 901-16.
- Clark, I.A. & Cowden, W.B. (1989) Free radical - induced pathology. *Med. Res. Rev.*, **5**: 297- 332.
- Coughlan, M.P., Rajagopalan, K.V. & Handler, P.(1969) The role of molybdenum in xantine oxidase and related enzymes. *J.Biol.Chem.*, **244**: 2658- 63.
- Coughlan, M.P.(1981) Is protein function regulated by the reversible incorporation of sulfur. *Biochem. Soc.Trans.*, **9**: 307- 08.
- Coughlan, M.P., Ljungdahl, L.G. & Mayer, F. (1986) *IRCS Med. Sci.*, **14**: 736-37.
- Das, D.K., Engelman, R.M., Clement, R., Otani, H., Prasad, M.R. & Rao, P.S. (1986) Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxipurinol in myocardial salvage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **148**: 314-19.
- Davies, K.J.A., Sevanian, A., Mukkasah- Kelley, S.F.& Hochstein, P. (1986) Uric acid- iron ion complexes.A new aspect of the antioxidant function of uric acid. *Biochem. J.*, **235**: 747- 54.
- De Jong,J. W., Van der Meer, P. ,Nieukoop, A.S., Huizer, T., Stroeve, R.J.& Bos, E. (1990) Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ. Res.* **67**: 770- 73.
- Della corte, E.& Stirpe, F. (1968a) Regulation of xanthine oxidase in rat liver: Modifications of the enzyme activity of rat liver supernatant on storage at- 20⁰ C. *Biochem. J.*, **108**: 349- 51.

- Della corte, E. & Stirpe, F. (1968b) The regulation of rat liver xanthine oxidase by proteolytic enzymes. *FEBS Lett.*, **2**: 83- 84.
- Della corte, E. & Stirpe, F. (1972) The regulation of rat liver xanthine oxidase . Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.*, **126**: 739- 45.
- Dixon, M. & Thurlow, S. (1924) Studies on xanthine oxidase II. The dynamics of the oxidase system. *Biochem.J.* , **18**: 976- 88.
- Dixon, M. & Keilin, D. (1936). *Proc. Roy. Soc. B*, **119**: 159.
- Edmondson, D., Massey, V., Palmer, G., Beacham III, L.M. & Elion, G.R. (1972) The resolution of active and in active xanthine oxidase by affinity chromatography. *J. Biol.Chem.*, **247**: 1597- 1604..
- Eger, B.F., Eikmans, U., Pai, E.F., Sato, M., Okamoto, K. & Nishino, T. (1994) Crystallization and preliminary X-ray diffraction of xanthine oxidase isolated from bovine milk. In *Flavins and Flavoproteins* (Yagi, K., Ed.) pp.727-29, DeGruyter, Berlin.
- Eisenthal, R. & Cornish-Bowden, A. (1974) The direct linear plot. *Biochem. J.*, **139**: 517-20.
- Elion, G.B., Callahan, S., Nathan, H., Bieber, S., Rundles, R.W. & Hitchings, G.H. (1963) Potentiation by inhibition of drug degradation: 6- substituted purines and xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, **12**: 85- 93.
- Elion, G.B. (1966) Enzymatic and metabolic studies with allopurinol. *Ann. Rheum. Dis.*, **25**: 608- 14.
- Engerson, T.D., McKelvey, T.G., Rhyne, D.B., Boggio, E.B., Snyder, S.J. & Jones, H.P. (1987) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J. Clin. Invest.*, **79**: 1564-70.
- Fanelli, G.M. (1977) Urate excretion. *Ann. Rev.*, **28**: 349- 54.
- Fridovich, I. & Handler, P. (1958) Xanthine oxidase. II. Studies of the active site. *J. Biol. Chem.*, **231**: 899-911.
- Fridovich, I. (1970) .Quantitative aspects of the production of superoxyde anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**: 4053- 57.
- Fridovich, I. (1975) Superoxyde dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 147- 59.
- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**: 875- 80.

- Fridovich, I. (1983) Superoxyde radical: An endogenous toxicant. *An . Rev. Pharmaol. Toxicol.* **23**:239-57.
- Fridovich, I. (1985a) Xanthine oxidase. In : Handbook of methods for oxygen radical research. Ed. by Greenwald, R.A. CRC Press. Boca Raton. Fla. pp. 51- 53.
- Fridovich, I. (1985b) Cytochrome c. In: Hand book of methods for oxygen radical research. Ed. by Greenwald, R.A. CRC Press. Boca Raton. Fla. pp.: 21- 122.
- Fridovich, I. & Freeman, B.A. (1986) Antioxidant defenses in the lung. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**: 643- 702.
- Fukushima, T., Adachi, T. & Hirano, K. (1995) The heparin- binding site of human xanthine oxidase. *Biol .Pharm. Ball*, **18**: 156- 58.
- George, G. N. & Bray, R.C. (1983) Reaction of arsenite ions with the molybdenum centre of milk xanthine oxidase. *Biochemistry*, **22**: 1013-21.
- Gerber, G., Siens, W., Werner, A., Stroesser, R., Foelds- Papp, Z., Kowalewski, J., Shneider, W. and Grune, T. (1989) In purine and pyrimidine metabolism in man VI, part B, 497- 504.
- Gershman, R., Gilbert, D.L , Nye, S.W., Dwyer, P. and Fenn, W. (1954) . Oxygen poisoning and X- ray irradiation : a mechanism in common. *Science* : **119**: 623- 26.
- Gilbert, D.L. (ed) (1981) Oxygen & living processes. An interdisciplinary approach. Springer- Verlag, New york.
- Godber, B.L.J., Sanders, S.A., Harrison, R., Eisenthal, R. & Bray, R.C. (1997) Greater than 95 % of xanthine oxidase in human milk is present as the de-molybdo form, lacking molybdopterin. *Biochem. Soc. Trans.*, **26**.
- Granger, D.N., Rutili, G. & McCord, J.M. (1981) Superoxide radicals in feline intestine ischemia. *Gastroenterology*, **81**: 22-29.
- Granger, D.N., Hollwarth, M.E. & Parks, D.A. (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **548**: 47-63.
- Granger, D.N. (1988) Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia- reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* **255** (Heart Circ. Physiol. 24): H1269-75.
- Greenlee, L. & Handler, P. (1964) Xanthine oxidase. VI. Influence of pH on substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **239**: 1090- 95.
- Grum, C.M., Gallagher, K. P., Kirsh, M.M. & Schlafer, M., (1989) Absence of detectable xanthine oxidase in human myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **21**: 263- 67.

- Grum, C.M. (1993) Tissue oxygenation in low states and during hypoxemia. *Critical Care Med.*, **21**: S44-49.
- Gutteridge, S., Tanner, S.J. & Bray, R.C. (1978) Comparison of the molybdenum centres of native and desulpho xanthine oxidase: The nature of the cyanide-labile sulphur atom and the nature of the proton-accepting group. *Biochem.J.*, **175**: 887-97.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., Treffry, A., Harrison, P.M. & Blake, D. (1983). *Biochem. J.*; **209**: 259-61.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (eds) (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine* 2nd edn. Oxford University Press, Clarendon, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. & Cross, C.E. (1992) Free radical antioxidants and human disease. where are we now. *Clin. Med.*, **119**: 598-620.
- Harris, C.M. & Massey, V. (1997) The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J. Biol. Chem.*, **272**: 8370-79.
- Harrison, R., Abadeh, S. & Benboubetra, M. (1991) Purification of xanthine oxidase from human milk. In *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII*, Part A (Ed. Harkness, R.A. et al.), Plenum Press, New York. 335-38.
- Hart, L.I., McGartoll, M.A., Chapman, H.R. & Bray, R.C. (1970) The composition of milk xanthine oxidase. *Biochem.J.*, **116**: 851-64.
- Hausladen, A., Fridovich, I. (1993) Excess substrate inhibition of xanthine oxidase: A reevaluation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **306**: 415-19.
- Hawkes, T.R. & Bray, R.C. (1984) *Biochem. J.*, **222**: 587-90.
- Hellsten - Westing, Y. (1993) Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. *Histochemistry* **100**: 215-22.
- Hille, R. & Massey, V. (1981) Tight binding inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmac. Ther.* **14**: 249-36.
- Hille, R. & Massey, V. (1985) Molybdenum containing hydroxylases: Xanthine oxidase, aldehyde oxidase and sulfite oxydase. In: *Molybdenum Enzymes* (Spiro, T.G. ed.) vol.7, pp. 443-518 Wiley Interscience Publishing. New York.
- Hille, R. & Anderson, R.F. (1991) Electron transfer in milk xanthine oxidase as studied by pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.*, **266**: 5608-15.

- Hille, R. (1992) Xanthine oxidase, xanthine dehydrogenase and sulfite oxidase. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme*. vol.III (Ed. Franz Müller) CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London. pp: 22-62.
- Hille, R.(1994) The reaction mechanism of oxomolybdenum enzymes. *Biochim.Biophys. Acta*, **1184**, : 143- 69.
- Howes, B.D., Pinhal, N.M., Turner, N.A., Bray, R.C., Anger, G., Ehrenberg, A., Raynor, J.B. & Lowe, D.J.(1990). *Biochemistry*, **29**: 6120-27.
- Hughes, R.K., Doyle, W.A., Choonick, A. , Whittle, J.R.S., Burke, J.F. & Bray, R.C. (1992) Use of *rosy* mutant strains of *drosophila melanogaster* to probe the structure and function of xanthine dehydrogenase. *Biochem. J.*, **285**: 507-13.
- Hunt, J. & Massey , V. (1992) Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **267**: 21479- 85.
- Hunt, J., Massey, V., Dunham, W.R. & Sands, R.H. (1993) Redox potentials of milk xanthine dehydrogenase. Room temperature measurement of the FAD and 2Fe/ 2S center potentials. *J. Biol. Chem.*, **268**: 18685- 91.
- Hunt, J. & Massey, V.(1994) Studies of the reductive half- reaction of milk xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18904- 14.
- Ichikawa, M., Nishino, T., Nishino, T. & Ichikawa, A.(1992) Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes: High resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis. *J. Histochem. Cytochem.*, **40**: 1097-11036.
- Ikegami, T. & Nishino, T. (1986) The presence of desulfo xanthine dehydrogenase in purified and crude enzyme preparations from liver . *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**: 254-60.
- Itoh, R., Nishino, T., Usami, C.& Tsushima, K.(1978) An immunochemical study of the changes in chicken liver xanthine dehydrogenase activity during dietary adaptation. *J. Biochem.*, **84**: 19-36.
- Jarash, E.D, Grund, C., Bruder,G., Heid, H.W., Keenan, T.W. & Frank, W.W. (1981) Localization of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*, **25**: 67- 82.
- Jarash, E-D., Bruder,G. & Heid, H.W. (1986) Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.* **548**: 39- 46.

- Kalckar, H. & Klenow, H. (1948a) Milk xanthopterin oxidase and pteroylglutamic acid. *J. Biol. Chem.*, **172**: 349-50.
- Kalckar, H. & Klenow, H. (1948b) Enzymatic transformation of pteroylglutamic acid. *J. Biol. Chem.*, **172**: 351- 52.
- Kalckar, H., Kielgaard, N.O. & Klenow, H. (1948). *J. Biol. Chem.*, **174**: 771
- Kaminski, Z.W., Pohorecki, R., Ballast, C.L. Damino, E.F. (1986) Three forms of xanthine:acceptor oxidoreductase in rat heart. *Circ. Res.*, **59**: 628- 32.
- Kanda, M., Brady, F.O, Rajagopalan, K.V. & Handler, P. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**: 765- 70.
- Khan, J. (1995) Purification and stability of bovine xanthine oxidase. Ph. D. thesis, University of Bath U.K..
- Kelley, W.N., Fox, I.H & Pallela, T.D. (1989) Gout and related disorders. *In Text Book of Rheumatology* (Ed. Kelley, W.N., Harris, E.D., Ruddy, S.) pp.1395-448. Philadelphia: WB Saunders company.
- Kim, J.H & Hille, R. (1993) Reductive half- reaction of xanthine oxidase with xanthine: Observation of a spectral intermediate attributable to the molybdenum center in the reaction of enzyme with xanthine. *J. Biol. Chem.*, **268**: 44- 51.
- Kooij, A., Schijns, M., Frederiks, W. M., Van Noorden, C.J.F. & James, J. (1992a) Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues. A Histochemical and biochemical study. *Virchows Arch. [B] Cell Path.*, **63**: 17- 23.
- Kooij, A., Bosch, K.S, Frederiks, W.M. & Van Noorden, C.J.F (1992b) High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Arch. [B] Cell Path.*, **62**: 143- 50.
- Kooij, A. (1994) A reevaluation of tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase. *Histochem. J.*, **26**: 889- 915.
- Krenitsky, T.A., Spector, T. & Hall, W.W. (1986) Xanthine oxidase from human liver: Purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**: 108-19.
- Kuppusamy, P. & Zweir, J.L. (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 9880- 84.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680- 85.
- Lloyd, R.V. & Mason, R.P.(1990) Evidence against transition metal- independent hydroxy radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **265**: 16733- 36.
- Lowry, O.H., Bessey, O.A. and Crawford, E.J. (1948) Pterin oxidase. *J. Biol. Chem.*, **180**: 399- 410.
- Lynch, R.E., Fridovich, I. (1979) Autoinactivation of xanthine oxidase. The role of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, **571**: 195-200.
- Macart, M., & Gerbaut, L.(1982) An improvement of the Coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins. Application to cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta*, **122**: 93- 101.
- Macart, M., Gerbaut, L., Koffi, A. & Henocque, G.(1986) Le dosage des proteines urinaires par le reactif au bleu de Coomassie, dodecyl sulfate de sodium adaptée au KONE Progress, COBAS BIO et ABA100 .*Rev. Franc. Lab.*, **152**: 77- 81.
- Mackler, B., Mahler, H.R. & Green, D.E. (1954) Studies on metaloflavoproteins. *J. Biol. Chem.*, **210**: 149-64.
- Malthouse, J.P.G., Williams, J.W.& Bray, R.C.(1981) Molybdenum (V) e.p.r. signals obtained from xanthine oxidase on reduction with aldehyde substrates and with 2- amino-4- hydroxy-6- formyl pteridine. *Biochem. J.*, **197**: 421.
- Martinez- Cayela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**: 147- 61.
- Massey, V., Brumby, P.E., Komai, H. Palmer, G. (1969) Studies on milk xanthine oxidase : Some spectral and kinetic properties. *J. Biol. Chem.*, **244**: 1682- 91.
- Massey, V. & Edmondson, D. (1970) On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.*, **245**: 6595- 98.
- Massey, V., Komai, H., Palmer, G. & Elion, G.B. (1970a). On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines . *J. Biol. Chem.*, **245**: 2837-44.
- Massey, V., Komai, H., Palmer, G. & Elion, G.B .(1970b) The existence of non functional sites in milk xanthine oxidase: Reaction with functional active site inhibitors. *Vit. Horm. (N.Y.)* **28**:505- 31.
- Massey, V. (1973) *In iron- sulfur proteins*, vol.1 (Ehrenberg ed.) Academic Press, New York, chap.10.

- Massey, V., Schopfer, L.M., Nishino, T. (1989) Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Revealed by reconstitution with flavin active site probes. *J. Biol. Chem.*, **264**: 10567- 73.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **243**: 5753-60.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1977) Superoxyde and superoxyde dismutases (Michelson AM., McCord JM, Fridovich I, eds) Academic Press, New York.
- McCord, J.M. & Roy, R.S. (1982) The pathophysiology of superoxyde: Roles in inflammation and ischemia. *Can. J. Phys.Pharm.*, **60**: 1346- 52.
- McCord, J.M. (1985) Oxygen- derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng. J. Med.*, **312**: 159-63.
- McCord, J.M. (1987) Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion-injury and inflammation. *Fed. Proc.*, **46**: 2402-06.
- McCord, J.M. (1988). Free radicals and myocardial ischemia: Overview and outlook. *Free Rad. Biol. Med.*, **4**: 9- 14.
- Moldoveanu, Z., Tenovuo, J., Mestecky, J. & Prull, K.M. (1982) . *Biochim. Biophys. Acta*, **718**: 103-208.
- Moorhouse, P.C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J.G. & Gutteridge, J.M.C. (1987) Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.*, **213**: 23-28.
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda, M., Nasako, Y., Takahashi, S., Abegdana, O., E, Hada, T. & Higashino, K. (1993) Purification and immunohistochemical localization of human xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1164**: 327- 330.
- Morpeth, F.F. & Bray, R.C. (1984) Inhibition of xanthine oxidase by various aldehydes. *Biochemistry*, **23**: 332- 38.
- Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., Blake, D.R. (1995) Reactive oxygen species and iron - a dangerous partnership in inflammation *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **27**: 109-22.
- Nagler, L.G. & Vartanyan, L.S. (1976) Subunit structure of bovine milk xanthine oxidase: Effect of limited cleavage by proteolytic enzymes on activity and structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **247**: 78-90.
- Nakamura, M. & Yamazaki, I. (1973). One-electron transfer reaction in biochemical systems. VII. Two types of electron outlets in milk xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **327**: 247-56.

- Nakamura, M., Kurebayashi, I. & Yamazaki, I. (1978) One-electron and two electron reductions of acceptors by Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *J. Biochem.*, **83**:9-17.
- Nakamura, M. & Yamazaki, I. (1982) Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *J. Biochem.*, **92**: 1279-86.
- Nichols, M.B. & Low, P.S. (1986) The redox centers of xanthine oxidase are on independent structural domains of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**: 488- 97.
- Nielsen, V.G., Weinbroum, A., Tan, S., Samuelson, P.N., Gelman, S. & Parks, D.A. (1994) Xanthine oxidoreductase release after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **107**: 1222-27.
- Nielsen, V.G., McCammon, A.T., Tan, S., Kirk, K.A., Samuelson, P.N. & Parks, D.A. (1995) Xanthine oxidase inactivation attenuates postocclusion shock after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **110**: 715-22.
- Nishino, T., Itoh, R. & Tsushima, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **403**: 17-22.
- Nishino, T., Nishino, T. & Tsushima, K. (1981) Purification of highly active milk xanthine oxidase by affinity chromatography on 4B/ folate gel. *FEBS Lett.*, **131**.
- Nishino, T., Usami, C., Tsushima, K. (1983) Reversible interconversion between sulfo and desulfo xanthine oxidase in a system containing rhodanese, thiosulfate and sulfhydryl reagent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **8**: 1826- 29.
- Nishino, T. (1986) Reversible interconversion between sulfo and desulfo xanthine dehydrogenase. In purine and pyrimidine metabolism in man V, (Ed. Nyham, W.L., Thompson, L.F., Watts, R.W.E.) Plenum Press.
- Nishino, T. & Tsushima, K. (1986) Interaction of milk xanthine oxidase with folic acid. Inhibition of milk xanthine oxidase by folic acid and separation of the enzyme into two fractions on sepharose 4B/ folate gel. *J. Biol. Chem.*, **261**: 11242- 46.
- Nishino, T. & Nishino, T. (1989) Reactivity of chicken liver xanthine dehydrogenase containing modified flavins. *J. Biol. chem.*, **264**: 6075- 85.
- Nishino, T. & Tamura, I. (1991) The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *Purine and pyrimidine metabolism in Man VII*, Part A. Ed. R.A. Hakkess et al., Plenum Press, New York.

- Nishino, T.(1994) The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J. Biochem.*, **116** : 1-6.
- Olson, J.S., Ballou, D.P., Palmer, G. & Massey, V. (1974) The mechanism of action of xanthine oxidase. *J. Biol. chem.* **249**: 4363-82.
- Page, S., Benboubetra, M., Blake, D.R., Powell, D. , Selase, F., Stevens, C.R., Wolstenholme, A. & Harrison, R. (1997) Cytokine- induced activation of xanthine oxidase in human mammary epithelial cells. *Biochem. Soc. Trans.*, **25**: 95S.
- Palmer, T. (1985) Enzyme inhibition. *In Understanding enzymes (2nd ed.)* Ellis Horwood England. pp.142-67.
- Parks, D.A. & Granger, D. N.(1986) Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution. and physiology. *Physiol. Scand Acta.*, **548**: 87- 99.
- Parks, D.A., Williams, T.K. & Beckman, J.S. (1988) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol.* **254** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **17**) G768-74.
- Peden, D.B. Hohman, R., Brown, M.E., Mason, R.T., Berkebile, C., Fales, H.M. & Kaliner, M.A. (1990) Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 7638-42.
- Pelmont, J. (1988) *In Enzymes*. Ed. Presses Universitaires de Grenoble, Reproduction de l'Office Nationale des Publications Universitaires Alger,pp. 231-52, 515-45.
- Perez, H.D., Weksler, B.B.,Goldstein, I.M. (1990) Generation of a chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxyde generating system. *Inflammation*, **4**: 313- 28.
- Pérez- Vincente, R., Allamillo, J.M., Cardenas, J. & Pineda, M. (1992) Purification and susbstrate inactivation of xanthine dehydrogenase from *chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**:159- 66.
- Pfeffer, K.D., Huecksteadt, T.P., & Hoidal, J.R. (1994) Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. *J. Immun.*, **153**: 1789-97.
- Powell., D. (1995) Purification, characterization and regulation of human xanthine oxidase. Ph.D. thesis, University of Bath. U.K.
- Powell, D., Page, S., Benboubetra, M., Blake,D.R., Selase, F., Stevens, C.R., Wolstenholme, A.J. & Harrison, R. (1997) Effects of inflammatory cytokines on xanthine oxidoreductase in human epithelial cells: post-translation activation by γ interferon. *J. Clin. Invest.* Submitted.

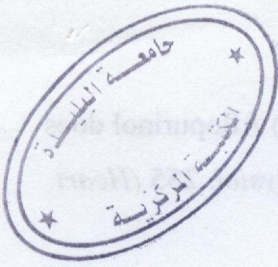
- Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R.A. & Parks, D.A. (1992) Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**: 178-82.
- Rajagopalan, K.V., Johnson, J.L., Johnson, M.E, Gardilk, S., Chaudury, M., Wubbens, M., Pitterle, D. (1990): Studies on the oxidation state and biosynthesis of molybdopterin. In: Chemistry and biology of pteridines. Ed. Walker de Gruyter, New York.
- Rayan, M.G., Ratman, K. & Hille, R. (1995) The molybdenum centers of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *J. Biol. chem.* **270**: 19209-12.
- Remacle, J., Raes, M., Toussaint, O., Renard, P., Rao, G. (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutation Res.*, **316**: 103-22.
- Rodkey, F.L. & Ball, E.G. (1946) *J. Lab. Clin. Med.*, **31**: 354-56.
- Ross, F. & Ross, A.B. (1977) Selected specific rates of reactions of transients from water in aqueous solution. III. Hydroxyl radical and perhydroxyl radical and their radical ions. US Natl Stand. Ref. Data Ser. Natl Bur. Stand. Pub. 59, Washington DC: GPO. 122 p.
- Roy, R.S. & McCord, J.M. (1983) Superoxide and ischemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: *Oxygen Radicals and their Scavenger Systems. Cellular and Medical Aspects*, ed. Greenwald, R.A. & Cohen, G.. New York: Elsevier, **2**: 145-53.
- Rubbo, H., Radi, R. & Prodanov, E. (1991) Substrate inhibition of xanthine oxidase and its influence on superoxide radical production. *Biochim. Biophys. Acta*, **1074**: 386-91.
- Rundles, R.W., Wyngaarden, J.B., Hitchings, G.H. & Elion, G.B. (1969) Drugs and uric acid. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **9**: 345-62.
- Saito, T. (1987) *Yokohama Med. Bull.*, **38**: 151-68.
- Saito, T. & Nishino, T. (1989) Differences in redox and kinetic properties between NAD⁺- Dependent and O₂ dependent type of rat liver xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **264**: 10015- 22.
- Saito, T., Nishino, T. & Massey, V. (1989) Differences in environment of FAD between NAD- dependent and O₂- dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase shown by active site probe study. *J. Biol. Chem.*, **264**: 15930- 35.
- Sandalio, L.M., Fernandez, V.M., Ruperez, F.L. & Del Rio, L.A. (1988) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol.*, **87**: 1-4.

- Sanders, S.A., Harrison, R., Eisenthal, R. (1996) Oxidation of NADH catalyzed by human xanthine oxidase. Generation of superoxide anion. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**: S13.
- Sanders, S.A., Eisenthal, R. & Harrison, R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxide anion. *Eur. J. Biochem.*, **245**: 541- 48.
- Sato, A., Nishino, T., Noda, K., Amaya, Y. & Nishino, T. (1995) The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **270**: 2818- 26.
- Schopfer, L.M., Massey, V. & Nishino, T. (1988) Rapid reaction studies on the reduction and oxidation of chicken liver xanthine dehydrogenase by xanthine/uric acid and NAD/NADH couples. *J. Biol. Chem.*, **263**: 13528-38.
- Schreck, R. & Baeuerle, P.A. (1991) A role for oxygen radical as second messengers. *Trends in Cell Biol.*, **1**: 39- 42.
- Spitzer, W. (1899) Die Ueberführung von Nucleinbasen in Harnsäure durch die sauerstoffübertragende Wirkung von Gewebsauszügen. *Arch. Ges. Physiol.*, **76**: 192-203.
- Stevens, C.R., Benboubetra, M., Harrison, R., Sahinoglu, T., Smith, E.C. & Blake, D.R. (1991) Localisation of xanthine oxidase to synovial endothelium. *Ann. Rheum. Dis.*, **50**: 760-62.
- Stewart, R.C., Hille, R. & Massey, V. (1984) Characterization of arsenite-complexed xanthine oxidase at room temperature. Spectral properties and p.H-dependent redox behavior of the molybdenum-arsenite center. *J. Biol. Chem.*, **259**: 14426- 36.
- Stewart, R.C. Hille, R., Massey, V. (1985) The reaction of aeseinite-complexed xanthine oxidase with oxygen . Evidence for an oxygen-reactive molybdenum center. *J. Biol. Chem.*, **260**: 8892- 904.
- Stirpe, F. & Della Corte, E. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxydase (typeO). *J. Biol. Chem.*, **244**: 3855- 63.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*. 3rd edn. New York: Freeman.
- Swann, J.C. & Bray, R.C. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**: 407-015.

- Tan, S., Radi, R., Gaudier, F., Evans, R.A., Rivera, A., Kirk, K.A. & Parks, D.A. (1993a) Physiologic levels of uric acid inhibits xanthine oxidase in human plasma. *Pediatr. Res.*, **34**: 303- 07.
- Tan, S., Yokoyama, Y., Dickens, E., Cash, T.C., Freeman, B.A. & Parks, D.A. (1993b) Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Rad. Biol. Med.*, **15**: 407-14.
- Tan, S., Gelman, S., Wheat, J.K. & Parks, D.A. (1995) Circulating xanthine oxidase in human ischemia reperfusion. *South Med. J.*, **88**: 479-82.
- Tishler, M.E., Friedrichs, O., Coll, K. & Williamson, J.R. (1977) Pyridine nucleotide distribution and enzyme mass action ratios in hepatocytes from fed and starved rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, **184**: 222-36.
- Ventom, A.M., Deistung, J. & Bray, R.C. (1988) The isolation of demolybo (xanthine) oxidase from bovine milk. *Biochem. J.*, **255**.
- Wahl, R.C. & Rajagopalan, K.V. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**: 1354-59.
- Wajner, M. & Harkness, R. (1989) Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **991**: 79- 84.
- Waud, W.R. & Rajagopalan, K.V. (1976) The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch. Biochem. Biophys.* **172**: 365-79.
- Winrow, V.R., Winyard, R.G., Morris, C.J., Blake, D.R. (1993) Free radical in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *Brit. Med. Bull.*, **49**: 506- 22.
- Winterbourn, C.C. & Molly, A.L. (1988) Susceptibilities of lactoferrin and transferrin to myeloperoxidase-dependent loss of iron-binding capacity. *Biochem. J.*, **250**: 613- 16.
- Xu, P., Huecksteadt, T.P., Harrison, R. & Hoidal, J. R. (1994) Molecular cloning, tissue expression of human xanthine dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **199**: 998-1004.
- Yokoyama, Y., Beckman, J.S., Beckman, T.K., Wheat, J.K., Cash, T.G., Freeman, B.A. & Parks, D.A. (1990) Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.* **258** (*Gastrointest. Liver Physiol.* 21): G564-70.
- Zikakis, J.P., Dressel, M.A. & Silver, M.R. (1983) Bovine, caprine and human milk xanthine oxidase: Isolation, purification and characterization. *Instrum. Analys. Foods* . **2**: 243- 303.

Zimmerman, B.J., Parks, D.A., Grisham, M.B. & Granger, D.N. (1988) Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid. *Am. J. Physiol.* **255** (*Heart Circ. Physiol.* 24): H202-06.

Zweir, J.L., Flaherty, J.T. & Weistfeldt, M.L. (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 1404 - 07.



رقم الجرد: 19395
رقم الفاتورة: 1
التاريخ: 08/01/2017
الأصل: Don✓