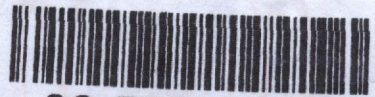


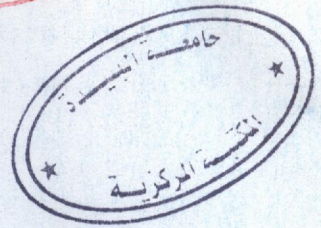
32-570-115-



32-570-115-1

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS
SÉTIF



MÉMOIRE
Présenté par
HANIFA DJELILI

Pour obtenir le titre de **Magister**
de l'Institut de Biologie

Option

ETUDE ET APPLICATION DES MACROMOLÉCULES

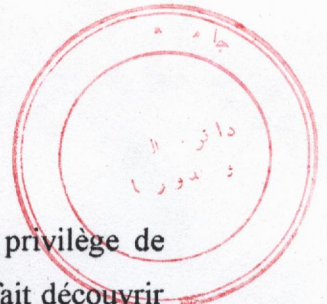
ETUDE DE LA XANTHINE OXYDOREDUCTASE ET DES
ANTICORPS ANTI-XANTHINE OXYDOREDUCTASE

Date de soutenance : 27/06/1998

Devant le jury composé de :

Président :	Mr. A. TOUABTI	Prof.	CHU de Sétif
Rapporteur :	Mr. M. BENBOUBETRA	M.C.	Université de Sétif
Examineurs :	Mr. N. BOUZERNA	M.C.	Université de Annaba
	Mr. L. SELLOUM	M.C.	Université de Sétif
	Mr. L. ARRAR	C.C.	Université de Sétif

Année 1997/98



Remerciements

Monsieur le Docteur M.Benboubetra, c'est vous qui m'avez accordé le privilège de diriger ma thèse. Vous m'avez guidé constamment dans ma tâche. Vous m'avez fait découvrir le sens profond de la recherche . Vos connaissances, votre expérience, et vos conseils furent toujours les plus précieux pour l'accomplissement de ce travail. Je suis heureuse de vous témoigner ici ma profonde gratitude et mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur A.Touabti, je suis très sensible à l'insigne d'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ma thèse. Qu'il me soit permis de joindre à mes sentiments une respectueuse admiration, ma profonde et sincère reconnaissance.

Messieurs les Docteurs : N.Bouzerna ; L.Selloum et D. Athmani, je suis reconnaissante à l'honneur que vous me faites en acceptant avec beaucoup de sympathie de juger mon travail. Je vous prie de croire à ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Monsieur le Docteur L. Arrar, vos conseils et votre aide constante m'étaient d'une grande utilité pour l'accomplissement de ce travail. Je vous prie de trouver ici le témoignage de mon profond respect et sincères reconnaissances.

Enfin je remercie chaleureusement tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur R.Harrison et toute l'équipe de recherche de laboratoire de Biochimie de l'Université de Bath en Angleterre pour les extraits bruts et la XOR pure du lait humain utilisés dans une partie de notre étude.

Toute l'équipe de laboratoire centrale CHU de Sétif.

Abréviations

ADP:	Adénosine diphosphate.
AMP:	Adénosine monophosphate.
ATP:	Adénosine triphosphate.
Bicine:	N, N, bis 2 hydroxyethylglycine.
DMSO:	Dimethyl sulfoxyde.
DTT:	Dithiothreitol.
EDTA:	Ethylène diamine tetra acétique.
ELISA:	"Enzyme- Linked Immunosorbent Assay."
EOR:	Espèce Oxygénée réactive.
FAD:	Flavine adénine dinucléotide.
HSA:	Serum albumine humaine (Human serum albumin).
KDa:	Kilo daltons.
Ig:	Immunoglobuline.
IgG:	Immunoglobuline de la classe gamma.
IgM:	Immunoglobuline de la classe mu.
Mes:	Acide, 2- (N- morphilino) ethane sulfonique.
NAD ⁺ :	Nicotinamide adénine dinucléotide (oxydé).
NADH:	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduit).
ng:	Nanogramme.
OPD:	Orthophenyldiamine.
PBS:	Tampon phosphate salin "Phosphate - buffered Salin".
PBS- T:	PBS- tween 20.
PBS- TC:	PBS- tween 20 -caseine.
PM:	Poids moléculaire.
PMSF:	Fluorure de phenyl methyl sulfonyl (Phenyl methyl sulfonyl fluoride).
RLO:	Radicaux libres Oxygénés.
RPF:	Rapport Proteine: Flavine.
SD:	Standard "deviation".
SDS:	Dodecyl sulfate de sodium "Sodium dodecyl sulfate".
SDS- PAGE:	Electrophorese en gel de polyacrylamide en presence de SDS "SDS- polyacrylamide gel electrophoresis".
SOD:	Superoxyde dismutase.

Temed:	N, N, N', N'- tetra methyl ethylène diamine.
Tris:	Tris (hydroxymethyl) aminométhane.
Tween 20:	Poly- oxyéthylène Sorbitane- monolaurate.
UI:	Unité Internationale.
XDH:	Xanthine deshydrogénase.
XO:	Xanthine Oxydase.
XOR:	Xanthine Oxydoreductase.
XOR-b:	Xanthine Oxydoreductase bovine.
XOR-h:	Xanthine Oxydoreductase humaine.

Résumé

La quantité de la xanthine oxydoréductase obtenue par la méthode de purification décrite dans notre étude varie de 7 à 10,25 mg par litre du lait bovin frais et de 4,7 à 14,84 mg par litre du lait humain congelé. Le contrôle de pureté de l'enzyme purifiée a été effectué par la détermination du Rapport Protéine: Flavine (RPF) et par l'analyse sur SDS-PAGE. Le RPF de la XOR-b est d'environ $5,56 \pm 0,24$ et celui de XOR-h est de $5,17 \pm 0,27$. Leur analyse sur SDS-PAGE a montré principalement une seule bande majeure de PM d'environ 150 KDa. L'activité spécifique xanthine oxydase de la XOR-b est 20 fois plus élevée ($1,59 \pm 0,657$ UI/mg) de celle de la XOR-h ($0,080 \pm 0,01$ UI/mg). Contrairement l'activité spécifique NADH oxydase de l'enzyme bovine et humaine est presque identique ($0,099 \pm 0,006$ UI/mg et $0,107 \pm 0,015$ UI/mg respectivement). En absence de tout agent réducteur, l'enzyme obtenue soit du lait humain ou bovin est en majorité (>80%) sous forme oxydase.

Même en absence d'adjuvant, la XOR a induit une réponse immunitaire importante chez les lapins dont les titres sérique sont de 32000 et 64000 pour l'enzyme humaine et bovine respectivement. La relation antigénique entre les deux enzymes a été déterminée par ELISA d'inhibition en utilisant la fraction d'IgG du sérum de lapin anti-XOR-h et anti-XOR-b. Les résultats montrent des réactions préférentielles des IgG de l'antisérum de lapin avec l'enzyme qui a induit leurs production.

Les IgG de l'antisérum de lapin anti-XOR-h et anti-XOR-b ont inhibé l'activité NADH oxydase de XOR-h et la XOR-b mais sans aucun effet sur l'activité xanthine oxydase des deux enzymes.

La protéolyse de la XOR-h et la XOR-b par la trypsine et chymotrypsine a donné des fragments de PM ont majorité identique. Même en présence de l'urée (6 M), le fractionnement de ces fragments par chromatographie de filtration sur gel n'est pas possible.

II.2.4.4- Activité totale (deshydrogénase+oxydase) en absence de DTT.	26
II.2.4.5- Activité NADH oxydase.	27
II.2.5- Préparation des colonnes d'affinité.	27
II.2.5.1- Préparation du gel.	27
II.2.5.2- Couplage du ligand au sepharose 4 B activé par le Bromure de cyanogène.	27
II.2.6- Préparation des anticorps	28
II.2.6.1- Immunisation de lapins.	28
II.2.6.2- Préparation du sérum.	28
II.2.6.3- Préparation des immunoglobulines.....	28
II.2.6.4- Purification des anticorps par affinité.....	29
II.2.6.4.1- Isolement des IgG sur proteine A-Sepaharose 4 B.	29
II.2.6.4.2- Purification des anticorps polyclonaux anti-XOR-b.....	29
II.2.7- ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	29
II.2.7.1- Titration du sérum de lapin anti-XOR.....	29
II.2.7.2- Optimisation de la concentration de XOR et des IgG du lapin.....	30
II.2.7.3- ELISA d'inhibition	30
II.2.8- Effet des IgG de lapins sur les activités xanthine et NADH oxydase de la XOR	31
II.2.9- Digestion protéolytique de la XOR.	31
II.2.10- Fractionnement des polypeptides issus de la protéolyse de la XOR par gel-filtration.	32

III. Résultats.

III.1- Purification de la XOR du lait bovin et humain.....	33
III.1.1- Purification de la XOR du lait bovin.	33
III.1.2- Purification de la XOR du lait humain.	39
III.2- Immunisation de lapin.	44
III.2.1- Titration du serum.	44
III.2.2- Purification de la fraction d'IgG du sérum de lapin.	44

III.2.3- Préparation des anticorps polyclonaux anti-XOR-b.....	49
III.3- Etude immunochimique de la XOR.....	51
III.3.1- Optimisation de la concentration de XOR et des IgG de L'antisérum de lapins.	51
III.3.2- ELISA d'inhibition	51
III.4- Effet des IgG de lapins sur l'activité de XOR	54
III.4.1- Activité xantine oxydase (xantine/O ₂)	54
III.4.2- Activité NADH oxydase (NADH/O ₂).	54
III.5- Digestion protéolytique de la XOR.	57
III.6- Fractionnement des polypeptides issus de la protéolyse de la XOR par gel-filtration.....	57

IV- Discussion.

IV.1- Purification de la XOR du lait bovin et humain.	62
IV.1.1- Purification de la XOR du lait bovin.	62
IV.1.2- Purification de la XOR du lait humain	63
IV.2- Etude immunochimique de la XOR	66
IV.2.1- Immunogénicité de la XOR-h et de la XOR-b.	66
IV.2.2- Relation antigénique entre la XOR-h et la XOR-b.	67
IV.3- Effet des IgG de lapin sur l'activité de la XOR.	68
IV.4- Digestion protéolytique de la XOR.	72
IV.5- Fractionnement des polypeptides issus de la protéolyse de la XOR par gel-filtration.....	73

V- Conclusion.....

Bibliographie.....

Chapitre I

Introduction

I- Introduction

La xanthine oxydoréductase (XOR) est parmi les premières enzymes isolée et étudiée dans sa forme relativement pure (Dixon et Thurlow, 1924; Avis *et al.*, 1956). Vu son abondance relative et la simplicité de purification, à partir du lait bovin, la XOR est devenue l'une des enzymes largement étudiée. La XOR, enzyme de poids moléculaire approximative de 300 KDa, est formée de deux sous-unités identiques (PM 150 KDa) et chaque sous-unité fonctionnelle possède une molécule de flavine adénine dinucléotide (FAD), deux centres Fer-Soufre (Fe/S) et un atome de molybdène (Mo) (Bray, 1975; Hille et Massey, 1981; Rajagopalan et Johnson, 1992). Bien que l'étude de la stabilité thermique suggère que ces centres redox sont localisés dans des domaines structuraux indépendants conférant à l'enzyme une structure modulaire (Nichols et Low, 1986), leur arrangement à l'intérieur de chaque sous-unité reste encore indéterminé. Les propriétés physico-chimiques et enzymatiques dérivent principalement des études sur la xanthine oxydoréductase purifiée à partir du lait bovin et du foie de rat.

I.1. Généralités

I.1.1. Propriétés physiques et biologiques de la xanthine oxydoréductase

La XOR est peu spécifique et peut catalyser l'oxydation d'une variété de cycles aromatiques, y compris les purines, les pyrimidines et les ptérines (Bray, 1975; Hille et Massey, 1985) et la réduction de plusieurs substrats tels que l'oxygène moléculaire (O_2) et certains substrats artificiels comme le bleu de méthylène et le ferricyanure (Bray., 1975; Krenitsky *et al.*, 1974, Nichols et Low, 1986). Les inhibiteurs de la XOR sont généralement des analogues de substrats tels que l'allopurinol, oxypurinol et certains ptérines et pyrimidines qui inactivent l'enzyme en s'attachant au voisinage du site Mo actif. D'autres substances tels que les cyanures, l'arsénic, le formaldéhyde et le méthanol agissent également comme inhibiteurs de la XOR (Parks et Granger, 1986 a).

La propriété catalytique principale connue pour l'enzyme est le catabolisme des purines ou elle catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Fig. 1).

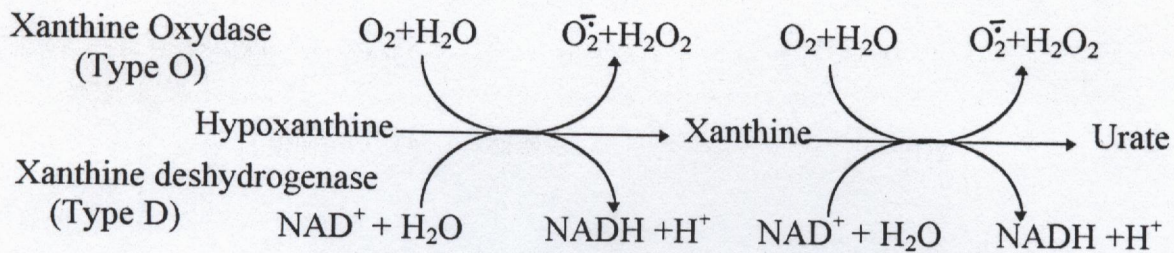


Figure 1 : Résumé des réactions catalysées, *in vivo*, par XOR
(D'après Abadeh, 1993)

Les études par résonance électro-para-magnétique et par spectrophotométrie ont montré qu'à l'exception du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) qui réagit avec le centre FAD, les autres substrats réducteurs interagissent avec le centre Mo (Komai *et al.*, 1969; Olson *et al.*, 1974; Bray, 1975; Nichols et Low, 1986). *In vitro*, les électrons sont transmis aux accepteurs physiologiques [oxygène moléculaire (O_2) ou nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+)] *via* le centre FAD, par contre le transfert des électrons aux accepteurs artificiels, le bleu de méthylène ou ferricyanure, se fait *via* les centres Fe/S. Les trois centres redox sont capables de transférer les électrons non seulement entre les substrats réducteurs et oxydants mais aussi entre eux. (Komai *et al.*, 1969, Massey et Edmonson, 1970). Cependant, les accepteurs artificiels d'électrons prennent leurs électrons des centres Fe/S (Fig. 2).

la XOR peut accepter six électrons par sous-unité; un électron pour chaque centre Fe/S et deux électrons pour chacun des centres FAD et Mo (Olson *et al.*, 1974, Hille et Massey, 1991). Bien que dans les conditions extrêmement réductrices, telle que réduction de la XOR par dithionite de sodium, la XOR peut accepter jusqu'à 8 électrons sachant que les deux électrons en plus sont retenus par un groupe disulfure (Hunt *et al.*, 1993). Ainsi le transfert d'électron se fait du centre Mo au centre FAD à travers les centres Fe/S (Hille et Anderson, 1991).

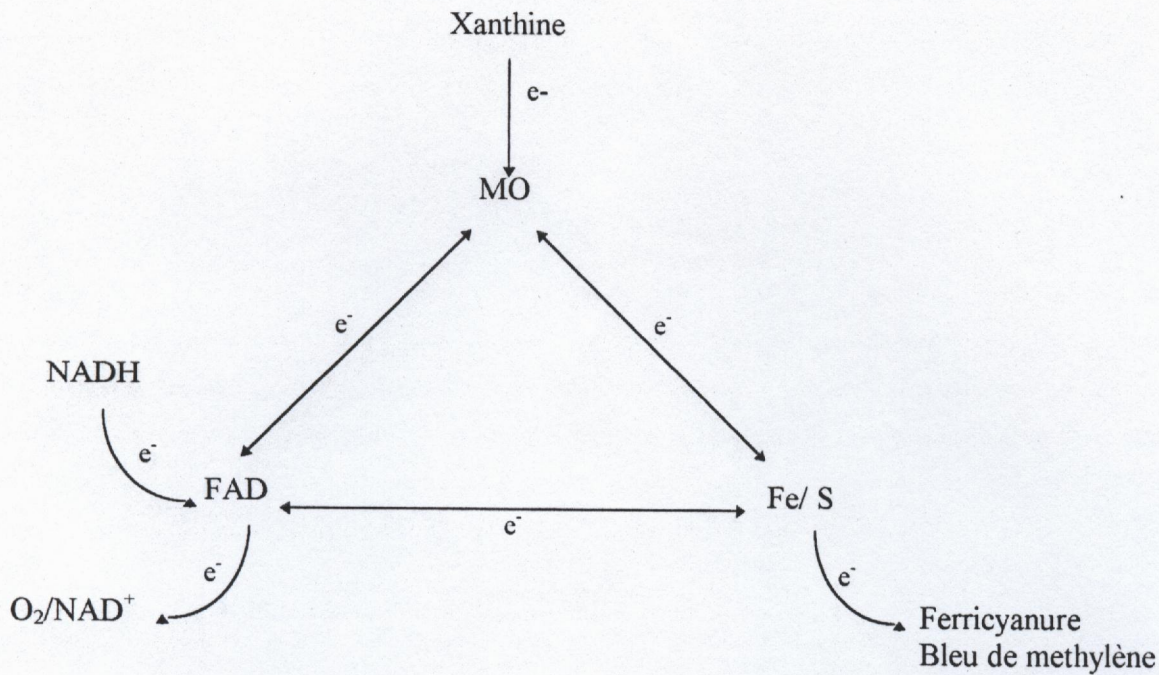


Figure 2 : Sites d'interaction de différents substrats de la XOR et le transfert d'électrons entre les centres redox (D'après Powell, 1995)

Les études comparatives de séquences (Amaya *et al.*, 1990) et de modifications chimiques (Nishino et Nishino, 1989) des fragments dérivés de la protéolyse de la XOR, suggèrent que les centres redox: les deux centres Fe/S, FAD et le Mo, sont associés avec les fragments 20 kDa, 40 kDa, et 85 kDa respectivement. Ces trois fragments correspondent à la portion N-terminale, à la région centrale, et à la portion C-terminale respectivement (Fig. 3) (Amaya *et al.*, 1990; Nishino, 1994; Sato *et al.*, 1995). Le transfert rapide d'électrons entre les centres redox suggèrent qu'ils sont étroitement associés ce qui facilite le passage d'électrons du substrat à l'accepteur (Olson *et al.*, 1974; Hille *et al.*, 1981; Nichols et Low, 1986; Amaya *et al.*, 1990; Nishino et Tamura, 1991).

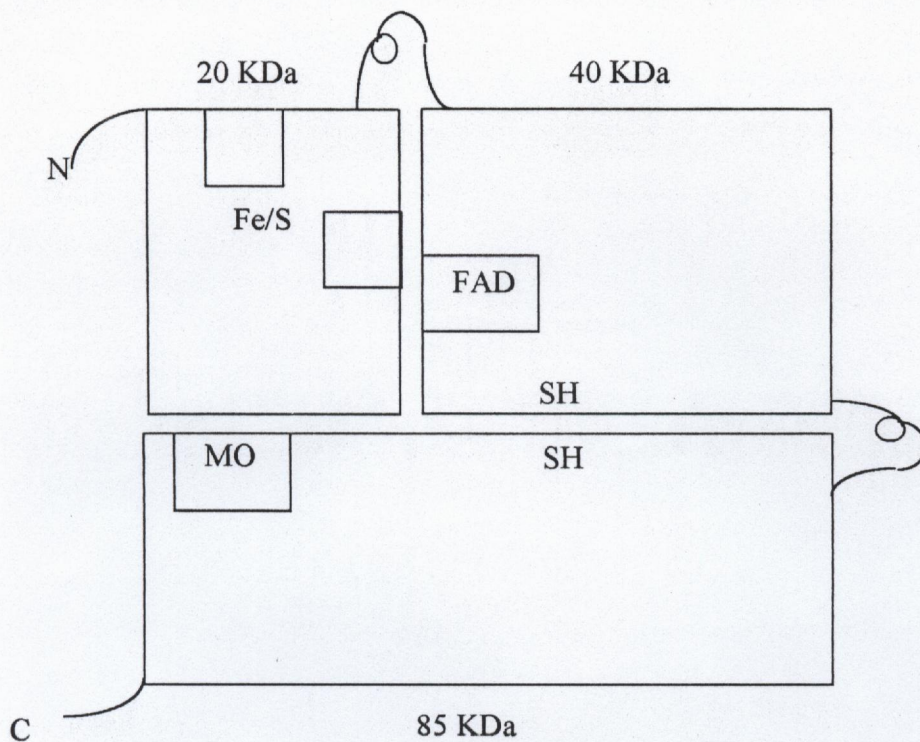


Figure 3 : Modèle de la structure en domaine d'une sous - unité de la XOR
(D'après Nishino ,1994)

I-1.2 Les formes interconvertibles de la xanthine oxydoreductase

La XOR existe dans la plupart des tissus des mammifères, dont l'activité est beaucoup plus élevée dans le foie et les intestins, sous forme deshydrogénase (forme D, EC. 1.1.1.204). Lors de la purification, la majorité de l'enzyme est convertie en xanthine oxydase (forme O, EC. 1.1.3.22). La forme D réduit préférentiellement NAD, par contre la forme O ne réduit pas le NAD, préférant l'oxygène moléculaire. La réduction de l'oxygène conduit à la formation des ions superoxydes (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La conversion de la forme D (XDH) à la forme O (XO) de l'enzyme se fait soit d'une manière réversible, par blocage ou oxydation des groupements sulfhydryls (SH), ou irréversiblement par protéolyse (Della Corte et Stripe, 1968, 1972; Waud et Rajagopalan, 1976a,b; Nakamura et Yamazaki, 1982; Zikakis *et al.*, 1983; Kimm et Juhn, 1983; Zikakis et Silver, 1984; Saito, 1987) comme représentée dans la figure 4. Cette conversion à la forme oxydase, qui réduit l'oxygène moléculaire, peut être pathologiquement induite. Cette réduction de l'oxygène conduit à la formation des radicaux superoxydes (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui rentrent dans le processus destructif de plusieurs pathologies conduisant à une inflammation non contrôlée, telles que les lésions ischémiques sévères après réperfusion (Granger *et al.*, 1986), le syndrome de détresse

respiratoire (Grum *et al.*; 1987 a), l'endotoxémie, l'arthrite rhumatoïde (Winrow *et al.*, 1993; Zweier *et al.*, 1994; Burton *et al.*, 1995) et l'athérosclérose (Ohara *et al.*, 1993).

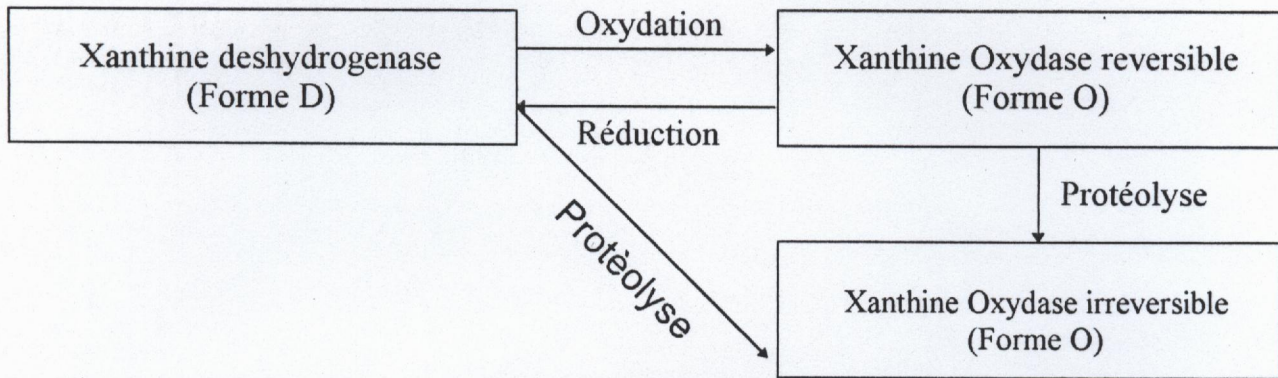


Figure 4 : Les interconversions entre la forme D et la forme O de la XOR
(D'après Granger *et al.*, 1986)

Les différences dans la fonction catalytique des deux formes de la XOR sont liées aux différences dans l'environnement du centre redox FAD de l'enzyme qui résultent de l'oxydation et de la réduction des groupements thiols (-SH) en positions appropriées provoquant ainsi des changements conformationnels considérables au sein de la XOR (Massey *et al.*, 1989; Saito *et al.*, 1989). Il a été rapporté que la XDH possède 14 groupements thiols par sous-unité qui lors de la conversion réversible sont oxydés en ponts disulfures avec perte concomitante de l'activité déshydrogénase (Waud et Rajagopalan, 1976b; Massey *et al.*, 1989; Saito *et al.*, 1989). De même il a été démontré qu'un nombre important de ces groupements sulfhydryls font partie du petit fragment N-terminal (20 kDa) et que la conversion protéolytique irréversible est due au clivage de ce peptide qui semble indispensable à la stabilisation de la conformation de la XOR nécessaire à l'activité déshydrogénase (Waud et Rajagopalan, 1976b). Contrairement à l'observation précédente, il a été trouvé que la digestion par la trypsine provoque des ruptures au sein de l'enzyme (XOR) mais sans la dissocier en petits fragments (Fig. 5) et que de telles ruptures sont suffisantes pour déstabiliser le site de liaison NAD^+ au niveau du FAD conduisant ainsi à une forme oxydase irréversible (Amaya *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1989; Nishino et Tamura, 1991).

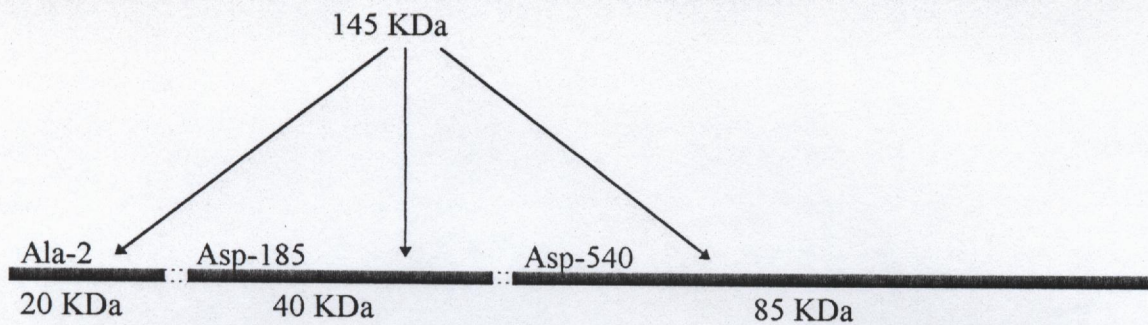


Figure 5 : Digestion enzymatique de la XDH du foie de rat par la trypsine pendant 20 heures. (D'après Amaya *et al.*, 1990)

Pour mieux définir les différences structurales entre les deux formes de l'enzyme (XDH et XO), le FAD fut remplacé par une série de flavines synthétiques contenant des substituants ionisants (-OH ou -SH) en position 6 ou 8 de la flavine (Massey *et al.*, 1989; Saito *et al.*, 1989) montrant une charge fortement négative au niveau du site de liaison du FAD qui est neutralisée après la conversion de la XDH en XO. L'existence de l'activité oxydase dans les préparations de la XDH est en accord avec les résultats de Della Corte et Stripe (1972) montrant que l'enzyme existe dans une forme qui peut utiliser simultanément l'O₂ et le NAD⁺ comme accepteurs d'électrons. Durant la purification et même en présence des agents réducteurs tel que le dithiothreitol (DTT) et des inhibiteurs de protéase, 10 à 20 % de l'activité de la XOR est sous forme oxydase (Parks *et al.*, 1988; Saito *et al.*, 1989; Nishino et Tamura, 1991; Hunt et Massey, 1992; Kooij *et al.*, 1992 a). De plus, Saito et Nishino (1989) ont rapporté que la forme déshydrogénase peut oxyder la xanthine en présence uniquement d'oxygène à une vitesse quatre fois moins que celle de la forme oxydase. Une autre évidence de l'existence naturelle de la forme oxydase irréversible est fournie par les données immunologiques montrant l'existence de deux formes oxydases distinctes, une oxydase dérivée de la forme déshydrogénase par les processus de conversions déjà mentionnés et une oxydase associée avec la déshydrogénase (Waud et Rajagopalan, 1976a; Krenitsky et Tuttle, 1978)

I.1.3 Les formes inactives de la Xanthine Oxydoréductase

En plus de la forme active, la XOR existe sous des formes inactives résultant soit de la perte de l'atome Mo (la forme inactive démolymbo) soit de la substitution de l'atome de soufre, lié à l'atome Mo, par un atome d'oxygène (la forme inactive désulfo) (Bray, 1975). Ces deux formes sont incapables d'oxyder les substrats qui passent leurs électrons au Mo (Hart *et al.*,

1970; Ventom *et al.*, 1988). Il a été établi qu'environ 20 à 40 % des molécules de la XOR du lait bovin (XOR-b) sont désulfo inactives dont la cause a été attribuée aux procédures de purifications (Massey *et al.*, 1969; Bray, 1975).

I.1.4 La xanthine oxydoréductase humaine (XOR-h)

La XOR-h est apparemment similaire à la XOR-b mais elle présente une très faible activité vis-à-vis des substrats, qui passent leurs électrons à l'atome du Mo, tels que la xanthine, l'hypoxanthine, les ptérines mais une activité semblable à la XOR-b pour le substrat NADH (Abadeh *et al.*, 1992; Abadeh, 1993; Powell, 1995). Dans le lait humain plus de 98 % de la XOR est sous forme inactive (Abadeh *et al.*, 1992). En absence de toute évidence de la présence des inhibiteurs endogènes de la XOR dans le lait humain, Brown *et al.* (1995) ont suggéré que de telles formes inactives peuvent bien être dérivées de cycles d'activation et d'inactivation post-traductionnels de la XOR-h. Ce mécanisme a été démontré, au niveau moléculaire, chez d'autres espèces (Itoh *et al.*, 1978; Furth-Walker et Amy, 1987). Les facteurs qui initient de tels changements dans l'activité moléculaire de la XOR sont encore inconnus bien que Brown *et al.* (1995) proposent un rôle hormonal. D'autre part il a été démontré que l'activité de la XOR peut être régulée, au niveau moléculaire, par un changement dans le régime alimentaire de l'animal (Kelley et Amy, 1984; Cherry et Amy, 1987). Bien que le taux de l'ARNm spécifique à la XOR et la quantité de la XOR en protéine restent constants, suite au changement alimentaire, une augmentation de l'activité enzymatique fut reportée (Itoh *et al.*, 1978; Furth-Walker et Amy, 1987) ce qui supporte une activation post-traductionnelle.

Le clonage et le séquençage du cDNA de la XOR-h ont montré que l'enzyme est formée de 1333 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 146,6 kDa par sous unité (Ichida *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994) ayant une homologie de 87 % avec la XOR du rat (Amaya *et al.*, 1990) et de la souris (Terao *et al.*, 1992).

Les analyses de séquences peptidiques montrent que les résidus Lys¹⁸⁵ et Lys⁵⁵² de la XOR-h correspondent aux sites de clivage de la XOR du rat par la trypsine (Ichida *et al.*, 1993). Trois résidus cystéines dans la XOR du rat ont été proposés être impliqués dans la conversion de la XDH en XO (Nishino *et al.*, 1991). Ces résidus cystéines correspondent dans la XOR-h sont en position 536, 993 et 1326 (Ichida *et al.*, 1993).

I.2. Distribution et localisation de la Xanthine Oxydoreductase

Largement distribuée parmi les différentes espèces, des bactéries aux plantes et à l'être humain (Parks et Granger, 1986b; Sandalio *et al.*, 1988; Kooij *et al.*, 1992a,b), la XOR des mammifères se trouve principalement dans le foie, les intestins grêles et dans les fluides tels que le lait (Della Corte et Stripe, 1982; Battelli *et al.*, 1972; Bruder *et al.*, 1982, 1983; Zikakis *et al.*, 1983; Ichikawa *et al.*, 1992; Sarnesto *et al.*, 1996). Les études histo-enzymatiques de Bruder *et al.* (1982) ont montré que la XOR est présente uniquement dans les cellules sinusoidales hépatiques et dans les intestins grêles par contre les études immunohistochimiques ont montré l'association de cette enzyme avec les cellules épithéliales des glandes mammaires et les cellules endothéliales des capillaires de la plupart des tissus bovins (Jarasch *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 ou l'activité de la XOR ne fut détectée que dans le foie et l'intestin grêle bien que quelques groupes de chercheurs ont rapportés 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.*, 1992b; Abadeh *et al.*, 1992, 1993; Hellsten-Westing, 1993). Les travaux récents ont permis la localisation de la XOR dans les cellules vasculaires du muscle cardiaque et squelettique dans les macrophages et les mastocytes (Hellsten-westing, 1993; Moriwaki *et al.*, 1996). Sa présence dans les entérocytes du duodénum, les hépatocytes et dans les cellules sinusoidales du foie humain ainsi que l'activité ont été publiés par Kooij *et al.* (1992) et Moriwaki *et al.* (1993). Par immunoprécipitation, Abadeh *et al.* (1993) ont purifié la XOR du coeur humain dont l'activité est 100 fois plus faible que celle purifiée du coeur de rat et ils ont suggéré que la majorité de la XOR-h est sous forme inactive désulfo.

La localisation intracellulaire est principalement cytoplasmique (Jarasch *et al.*, 1981; Bruder *et al.*, 1984; Ichikawa, *et al.*, 1992; Moriwaki *et al.*, 1993) bien que son association membranaire (Hellsten-Westing, 1993; Adachi *et al.*, 1993; Fukushima *et al.*, 1995) et nucléaire au noyau cristallin des peroxyosomes (Angermuller *et al.*, 1987) aient rapportées. 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).

I.3. Rôles physiologiques et pathologiques de la Xanthine Oxydoreductase

La localisation et la distribution de la XOR n'est pas compatible avec son rôle exclusif dans la dégradation des purines en urate. D'autres fonctions physiologiques ont été attribuées à l'enzyme, telles que: une activité antimicrobienne, par le biais des radicaux libres, dans le lait (Björck et Claesson, 1979), le sang (Tubaro *et al.*, 1980a) et dans le foie (Tubaro *et al.*, 1980b), une activité antioxydante, par production d'urate (Tan *et al.*, 1993) la mobilisation et l'absorption du fer (Topham *et al.*, 1982a,b Biemond *et al.*, 1986).

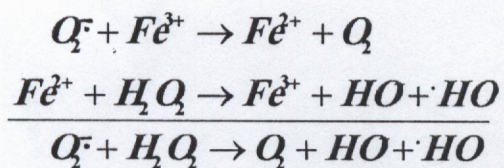
La participation de XOR dans différentes pathologies humaines telles que la xanthinurie (Yamamoto *et al.*, 1991a,b), la goutte (Kelly *et al.*, 1989) et dans l'athérosclérose (Rzucidlo et Zikakis, 1990; Ohara *et al.*, 1993) a été rapportée. Au cours de cette dernière décennie, une grande attention est focalisée sur le rôle des radicaux libres oxygénés (RLO), produits par la XOR, dans la pathogénèse des lésions post-ischémiques (Saugstad, 1996), des troubles inflammatoires et l'apoptose (Martinez-Cayuella, 1995) le syndrome de l'immunodéficience acquise (Schreck *et al.*, 1991)

I-3.1 Implication de la XOR dans l'ischémie-réperfusion

Il a été bien établi que c'est lors de la réperfusion après ischémie que la plupart des endommagements post-ischémiques surviennent (Sussman et Bulkley, 1990; Bulkley, 1987; Granger, 1988). L'infarctus du myocarde en est l'exemple typique (Werns et Lucchesi, 1990). Le rôle des radicaux libres dans ces lésions a été souligné (McCord, 1985; Adkison *et al.*, 1986; Bulkley, 1987; Zweier *et al.*, 1987, 1989; Thompson-Gorman et Zweier, 1990) et la XOR a été proposée comme source biologique de ces radicaux (McCord, 1985; Granger *et al.*, 1986; Parks *et al.*, 1988 ; Saugstad, 1996). Ceci dérive du fait que l'allopurinol ou son métabolite oxypurinol, des inhibiteurs de la XOR, réduisent sensiblement les lésions post-ischémiques (Granger *et al.*, 1986; Adkison *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1987; Grum *et al.*, 1987 b; Parks *et al.*, 1988; Terada *et al.*, 1992) bien que d'autres chercheurs attribuent l'efficacité de l'allopurinol à sa propriété antioxydante (Peterson *et al.*, 1986; Das *et al.*, 1987; Moorhouse *et al.*, 1987; Zimmerman *et al.*, 1988, Thompson-Gorman et Zweier, 1990; Chambers *et al.*, 1992).

Le traitement d'animaux par un régime riche en tungstène et pauvre en molybdène conduit à l'incorporation du tungstène plutôt que le molybdène dans la XOR et inhibe son activité entraînant une réduction des lésions tissulaires post-ischémiques (Granger, 1988; Green

et Paller, 1992; Terada *et al.*, 1992; Nielson *et al.*, 1995). De même l'utilisation des aldéhydes ptérines montre une diminution significative de la perméabilité vasculaire suite à la réperfusion de l'intestin grêle post-ischémique (Granger *et al.*, 1986). En 1981, Granger et collaborateurs ont proposé un mécanisme de l'implication de la XOR dans le processus ischémie-réperfusion comme illustré par la figure 6. Durant l'ischémie l'ATP intracellulaire est épuisé suite à l'arrêt de la phosphorylation oxydative de la mitochondrie. Suite à une diminution importante en réserve énergétique, la cellule devient incapable de maintenir le gradient ionique membranaire. Ce déséquilibre ionique participe à l'augmentation du flux calcique intracellulaire et déclenche une conversion irréversible de la XDH en XO par l'activation des protéases Ca^{2+} -dépendantes (McCord, 1985). L'épuisement en ATP est accompagné par l'élévation des taux tissulaires en AMP (Granger, 1988) qui se métabolise en adénosine, inosine puis en hypoxanthine. L'accumulation d'hypoxanthine et de xanthine dans les tissus post-ischémiques a été rapportée (Parks *et al.*, 1985, 1988; Granger 1988; Zhong *et al.*, 1989; Grum, 1993). A la réintroduction de l'oxygène moléculaire, lors de la réperfusion, et en présence des substrats de la XOR (hypoxanthine et xanthine) ainsi accumulés durant l'ischémie, la XOR réduit l' O_2 en O_2^- et/ou H_2O_2 . Ces espèces oxygénées réactives (EOR) peuvent s'interagir, en présence des ions ferreux (Fe^{2+}), pour donner, par la réaction de Haber-Weiss ci-dessous, le radical hydroxyl ($\cdot OH$) hautement réactif (Smith *et al.*, 1987).



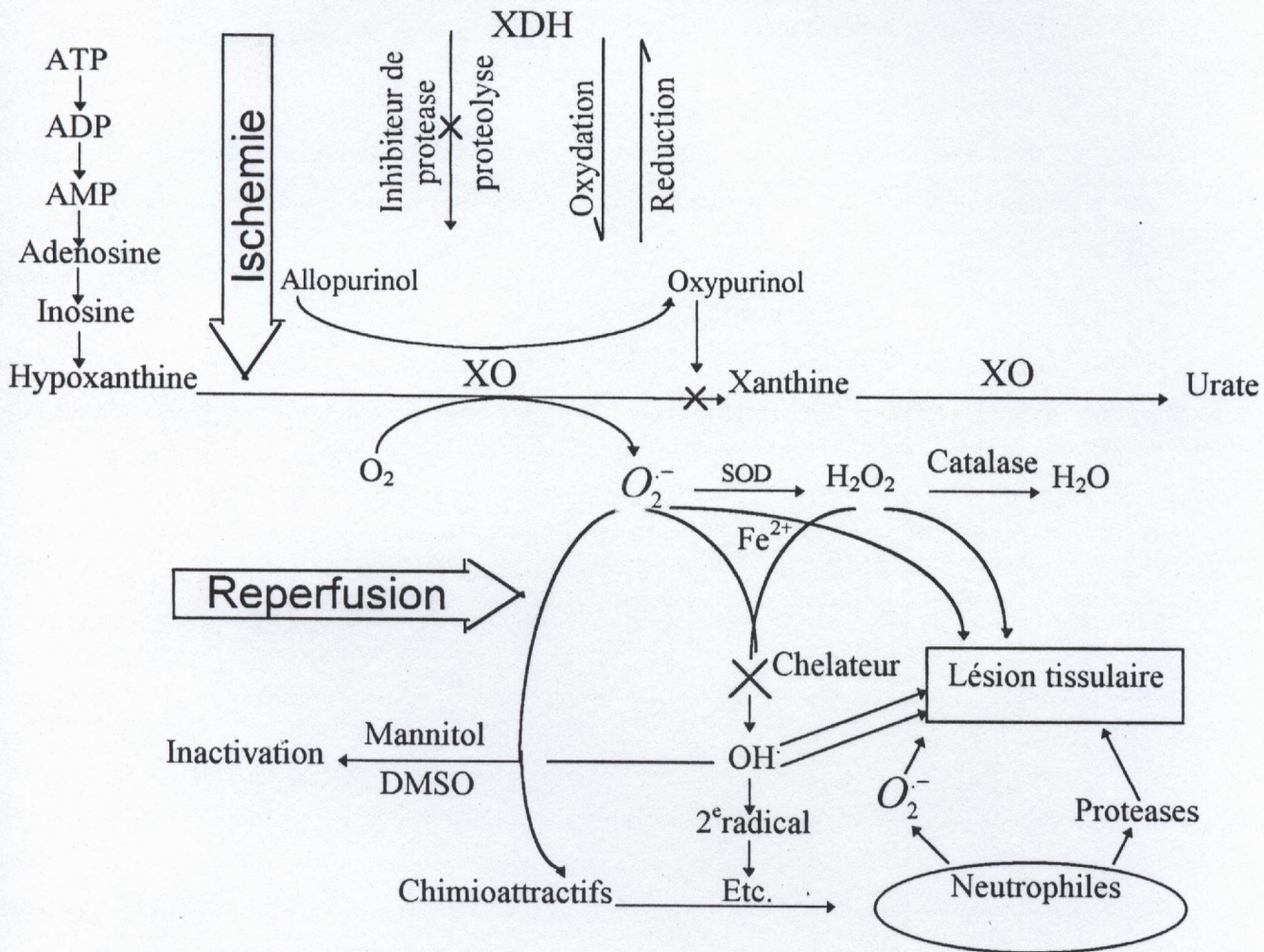


Figure 6 : Mécanisme de lésion tissulaire post-ischémique induit par la XOR
(D'après Granger *et al*, 1981)

A l'état normal, la XO représente 10-20 % de l'activité totale de la XOR dans les tissus (Parks *et al.*, 1988; Nishino et Tamura., 1991). Cette activité oxydase atteint 34 %, 46 % et 61 % après 1, 2 et 3 heures d'ischémie des intestins grêles de rat respectivement (Parks *et al.*, 1988). La conversion de l'enzyme, initialement représentant 20 % de XO, dans le foie est plus lente et atteint 50 % après 3 heures d'ischémie (Engerson *et al.*, 1987; Yokoyama *et al.*, 1990). Ces résultats sont différents de ceux de McCord (1985) où une conversion totale après une min d'ischémie était rapportée et de ceux de Stripe et Della Corte (1969) qui ont noté une conversion presque complète de la XDH en XO en 10 min dans les homogénats hépatiques. Les altérations structurales et fonctionnelles sévères ne sont observées qu'après 30 min. d'ischémie des entérocytes du rat et du chat (Parks *et al.*, 1988; Granger, 1988).

Récemment, il a été rapporté que l'ischémie n'a aucun effet prononcé sur l'activité oxydase (Frederiks *et al.*, 1993; Kooij *et al.*, 1994; Frederiks et Bosch, 1995). Ces auteurs ont essayé d'expliquer qu'une telle conversion pourrait bien être le résultat de l'homogénéisation lors de la préparation des échantillons. Les travaux de Yokoyama *et al.* (1990) d'une part et de Kooij *et al.* (1994) d'autre part montrent que l'ischémie induit plutôt la libération de la XDH dans la circulation suivie de sa conversion rapide en XO après la réperfusion. Le changement de la localisation de la XOR dans les entérocytes du rat d'une distribution cytoplasmique à une localisation limitée à la partie basale des cellules lors de l'ischémie (Frederiks *et al.*, 1993) supporte l'idée précédente.

Dans le muscle du jéjunum humain l'activité XO augmente significativement en fonction de la durée d'ischémie (Wilkins *et al.*, 1993) ce qui est en concordance avec les résultats de Brass *et al.*, (1991) sur la réperfusion des foies de rats. En travaillant sur les cellules endothéliales, Terada *et al.* (1992) et Poss *et al.*(1996) ont montré qu'une exposition hypoxique prolongée entraîne une augmentation des deux activités (XO et XDH) de la XOR sans altération du rapport XDH/XO.

Bien que la détection de l'activité XOR dans le myocardium humain soit sans succès (Downey *et al.*, 1988; Grum *et al.*, 1989; Dejong *et al.*, 1990) sa détection par immunoprécipitation (Abadeh *et al.*.,1993; Abadeh.,1993) et sa localisation immunohistochimique était possible (Tavenier *et al.*, 1997 sous presse). Cette forme inactive *vis-à-vis* de la xanthine et l'hypoxanthine est capable de produire des radicaux libres oxygénés *via* son centre FAD en utilisant le NADH comme substrat.

1991). Alternativement, ces EOR peuvent interagir avec la membrane des cellules cibles et activer la phospholipase A₂ conduisant ainsi à la formation des chimioattractifs leucocytaires comme le leucotriène B₄ (LTB₄) et le facteur d'activation des plaquettes (PAF) (Grishman et Granger, 1988; Wu *et al.*, 1992; Kurose et Granger, 1994).

Les neutrophiles activés libèrent des enzymes oxydatives (myeloperoxydase) et des hydrolases (elastase, collagenase, cathepsine, hyaluronidase etc.) qui peuvent causer directement la lésion membranaire des cellules cibles et conduisent, dans certains cas, à la mort cellulaire (McCord, 1987; Zimmerman et Granger, 1990; Kurose et Granger, 1994). Une autre réponse des neutrophiles activées est la réduction de l'oxygène moléculaire en superoxyde (O₂⁻) par une enzyme membranaire NADPH oxydase. (Varani et Ward, 1994; Martinez - Caryuela, 1995). Ce radical est dismuté soit spontanément ou *via* la SOD en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui peut diffuser à l'intérieur des cellules. Dans les cellules endothéliales, le H₂O₂ avec O₂⁻ endogène produit probablement par la XO endothéliale peuvent produire en présence des ions de fer le radical hydroxyl (OH[•]) hautement toxique (Fig. 7) (Varani et Ward, 1994).

Bien que les enzymes responsables de la production de l'O₂⁻ au cours de l'inflammation et de l'ischémie-reperfusion soient entièrement distinctes et activées par des événements différents, il se produit des effets réciproques entre les deux mécanismes (Fig. 8) (McCord, 1987, 1988). Ainsi, le O₂⁻ produit par les neutrophiles activés augmente la perméabilité capillaire et par conséquent provoque l'œdème tissulaire conduisant à l'arrêt de la circulation sanguine. En effet, l'occlusion physique de la microcirculation par les neutrophiles activés bloque le flux sanguin favorisant ainsi l'ischémie (McCord, 1987, 1988). Donc, la synergie entre l'ischémie-reperfusion et l'inflammation augmente le flux des oxydants et par conséquent la lésion tissulaire conduit à des états pathologiques chroniques telles que: les maladies auto-immunes, la goutte, l'athérosclérose, les maladies rhumatoïdes, le cancer (Martinez- Cayuela, 1995).

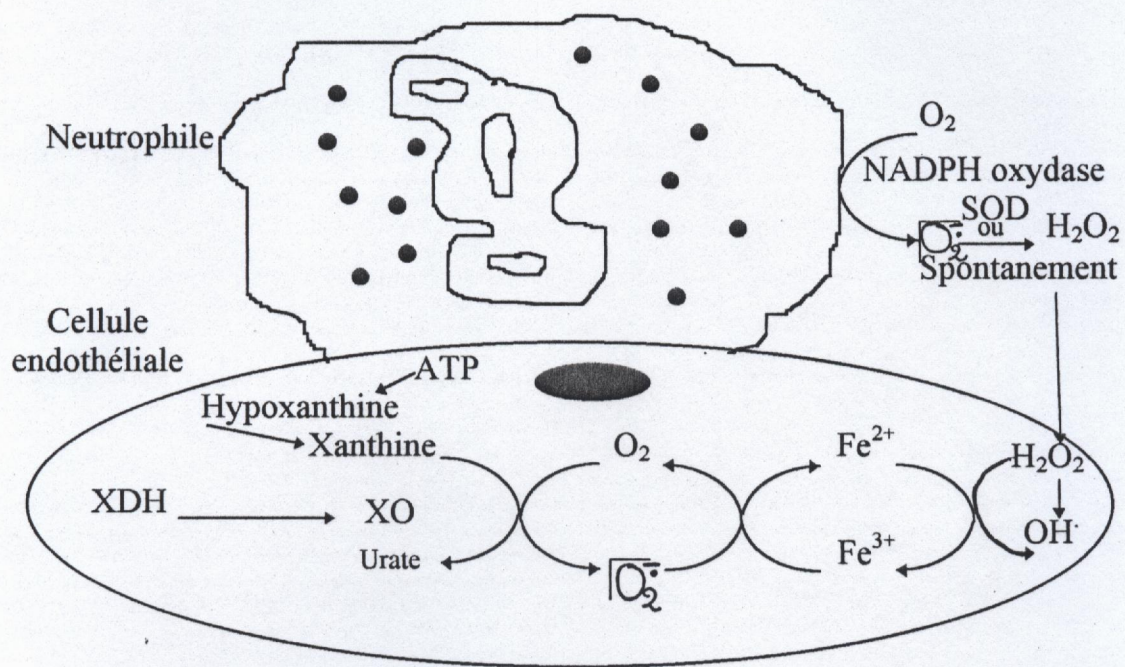


Figure 7 : Mécanisme de la destruction de la cellule endothéliale induite par les neutrophiles (D'après Varani et Ward, 1994)

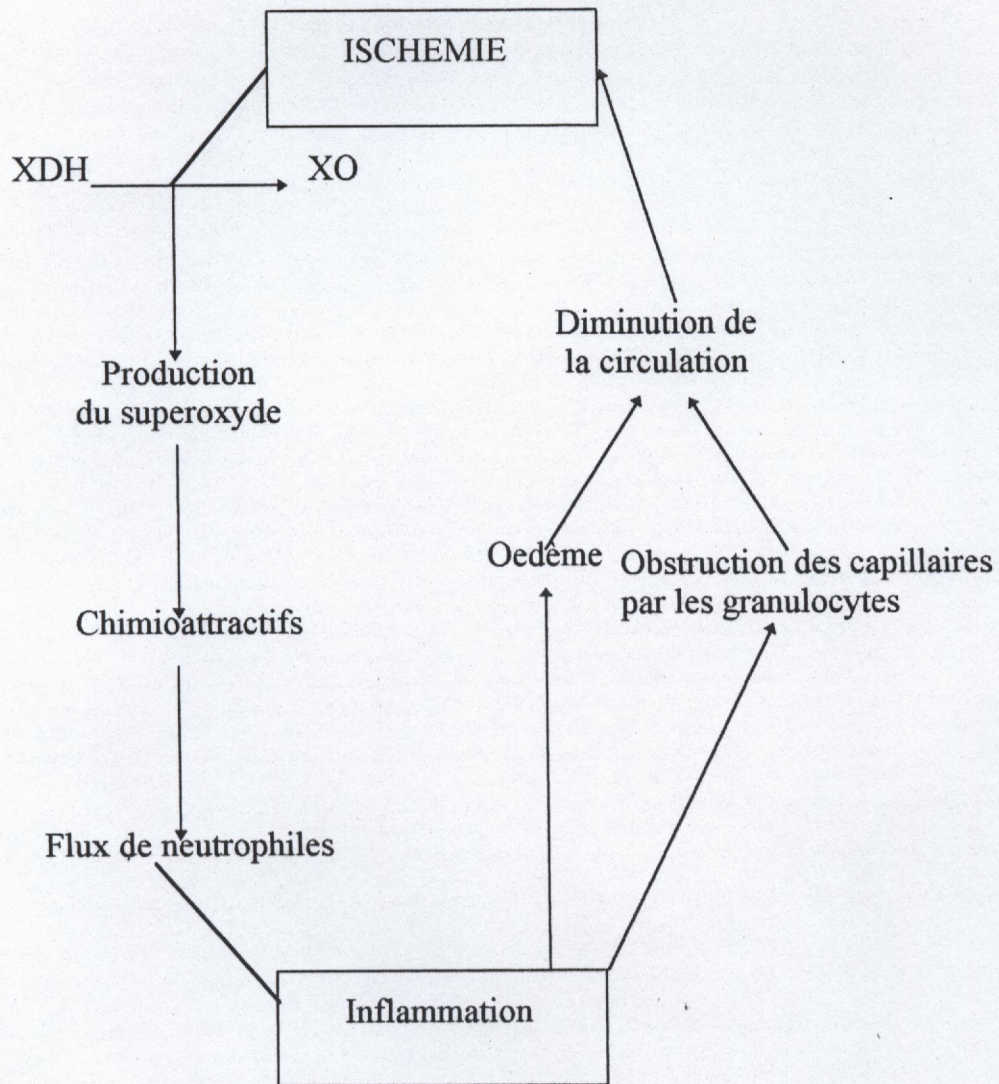


Figure 8 : Relation entre l'ischémie et l'inflammation
(D'après McCord, 1987)

I-4. La xanthite oxydoreductase circulante

L'activité de la XOR dans le sang humain est très faible voire indétectable (Parks et Granger, 1986b; Yamamoto *et al.*, 1996). Cette activité augmente dans certaines pathologies telles que les affections hépatiques et les ictères (Ramboer *et al.*, 1972; Giler *et al.*, 1975; Mcttale *et al.*, 1979; Granger *et al.*, 1986) les défaillances rénales chroniques (Giler *et al.*, 1975; Mcttale *et al.*, 1979), le syndrome de détresse respiratoire (Grum *et al.*, 1987a) les maladies rhumatoïdes inflammatoires et auto-immunes (Miesel et Zuber, 1993) et dans les oedèmes de brûlures (Friedl *et al.*, 1989). Récemment il a été rapporté que les lésions tissulaires post-ischémiques contribuent de façon significative à l'élévation de la XOR circulante (Kooij, *et al.*, 1994; Novak, *et al.*, 1996). Chez l'homme, le foie et les intestins grêles sont à l'origine d'une telle augmentation (Nielsen *et al.*, 1994, 1995, Saugstad, 1996). Le concept que le foie post-ischémique est la source principale de la XOR circulante dérive des observations que l'activité de la XOR est liée à la libération concomitante des enzymes hépatocytaires durant l'ischémie (Adkison *et al.*, 1986; Yokoyama *et al.*, 1990; Friedl *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 1994, 1996). De même, il a été montré que l'ischémie de l'intestin peut libérer la XOR dans la circulation et être impliquée dans les lésions pulmonaires (Caty *et al.*, 1990; Terada *et al.*, 1992). L'occlusion de l'artère mésentérique supérieure chez le rat augmente dramatiquement l'activité XOR dans la veine porte (Caty *et al.*, 1990).

L'endothélium vasculaire est une source importante de XOR circulante. Suite à une hypoxie, les cellules endothéliales en culture libèrent la XOR (Partridge *et al.*, 1992). L'interruption du flux sanguin des membres supérieurs, chez les patients ayant subi des procédures orthopédiques, entraîne une augmentation de la XOR circulante (Friedl *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1995).

L'apport exogène est également une source considérable. Le lait bovin qui est très riche en XOR pourrait contribuer à l'augmentation du taux plasmatique en XOR chez l'homme (Carr *et al.*, 1975; Clifford *et al.*, 1983; Deeth, 1983; Schoutsen et Dejong, 1984). En utilisant la XOR marquée à l'iode radioactif, Rzucidlo et Zikakis (1990) ont montré que la XOR, présente dans le lait bovin, peut traverser sous forme catalytiquement active la paroi intestinale des lapins.

Le lait humain est également une bonne source de XOR (Zikakis *et al.*, 1983; Abadeh *et al.*, 1992). Le taux de XOR plasmatique est plus élevé chez les nouveau-nés, dont l'aliment de base est le lait maternel (Tan *et al.*, 1995).

Dans le plasma, la XOR est rapidement convertie, d'une manière réversible, en XO (Yokoyama *et al.*, 1990; Kooij *et al.*, 1994). Les travaux de Kooij *et al.* (1994) montrent qu'après cinq minutes d'ischémie la XOR est libérée sous forme XDH puis convertie en XO sans aucun changement de l'activité déshydrogénase. Ces études et celles de Friedl *et al.* (1990) suggèrent que l'augmentation précoce dans l'activité oxydase est indépendante de la conversion de la XDH en XO mais elle est temporairement liée à l'élévation du taux d'histamine sanguine durant l'ischémie-réperfusion dont le mécanisme est encore inconnu.

La présence de la XOR circulante sous forme O peut potentiellement produire des radicaux libres après réperfusion en présence des purines qui s'accumulent, lors de l'ischémie, dans le plasma en concentration beaucoup supérieures au Km de la XOR. Comme ces molécules oxygènes réactives sont facilement transportées par le sang, elles peuvent induire des lésions tissulaires distantes du point de génération. L'accumulation des purines, hypoxanthine et xanthine, dans les tissus post-ischémiques est bien documentée (McCord, 1985; Parks *et al.*, 1988; Zhong *et al.*, 1989; Grum, 1993). Du fait que les nucléosides purines et les bases sont moins polaires que les nucléotides adénine, ils peuvent traverser la membrane cellulaire et s'accumuler dans les liquides extracellulaire (Ketai *et al.*, 1987; Grum, 1993).

La liaison de la XOR circulante, par des chaînes de glycosaminoglycanes, à la paroi endothéliale vasculaire (Adachi *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1993, Radi *et al.*, 1997) permet de concentrer dramatiquement l'enzyme sur les surfaces cellulaires et augmente sa demi-vie circulante (Tan *et al.*, 1993) et permet l'induction des lésions massives (Yokoyama *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1993).

I-5. Présence des anticorps anti-xanthine oxydoréductase

En utilisant les techniques de "western blot" et d'ELISA, Harrison *et al.* (1990) ont démontré que les anticorps présents dans le sérum humain contre le lait bovin (Davies *et al.*, 1969, 1974) ou contre la membrane des globules gras du lait bovin (Benboubetra, 1989) sont en fait dirigés contre un constituant de la membrane, la XOR. La corrélation entre ces anticorps et les maladies cardiovasculaires a été rapportée (Davies *et al.*, 1969, 1974, 1980; Oster *et al.*,

1974; Harrison *et al.*, 1990). Ces anticorps contre la XOR sont en majorité IgM (Harrison *et al.*, 1990). Récemment, Lewis et Ng (1991) ont publié l'élévation significative du taux d'IgM contre la XOR-b chez les femmes âgées de moins de 49 ans en comparaison aux hommes de même catégorie d'âge et suggèrent une auto-immunisation durant la menstruation. Des taux considérables d'anticorps polyclonaux, de classe IgG, anti-XOR-b ont été détecté dans le sérum des sujets humains indépendamment de leur état pathologique (Bruder *et al.*, 1984). L'élévation significative du taux d'IgM chez les sujets après l'infarctus du myocarde ne reflète ni l'élévation du taux total d'IgM ni un résultat de l'infarctus (Harrison *et al.*, 1990; Benboubetra *et al.*, 1997).

L'implication de la XOR dans les troubles inflammatoires tels que l'arthrite rhumatoïde (Woodruff *et al.*, 1986; Allen *et al.*, 1987) et la goutte (Kelly *et al.*, 1989) est bien documentée et que le taux sérique de XOR est 50 fois plus élevés chez les patients atteints des maladies rhumatoïdes (Miesel et Zuber, 1993) mais aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le taux d'anticorps anti-XOR et l'arthrite rhumatoïde (Abadeh, 1993).

L'existence naturelle de tels anticorps est probablement due à une auto-immunisation contre la XOR endogène libérée par les cellules endothéliales des capillaires suite à un renouvellement normal ou traumatique des cellules (Bruder *et al.*, 1984; Ng *et al.*, 1990; Lewis et Ng, 1991) ou à une immunisation contre la XOR exogène du lait bovin (Oster *et al.*, 1974; Rzucidlo et Zikakis, 1990; Schoutsen et Dejong, 1984). La présence des anticorps anti-proteines, présentes dans l'alimentation, a été déjà signalée dans le sérum humain et animal (Grabar, 1983). De même dans certains sérums humains testés, Bruder *et al.* (1984) ont montré la présence d'anticorps anti-XOR avec une grande affinité pour la XOR-b et d'autres anticorps contre d'autres protéines présentées exclusivement dans le lait bovin. Finalement l'existence de tels anticorps anti-XOR peut bien être une réponse aux deux stimulus (endogène et exogène).

L'absence d'une évidence solide sur l'origine de ces anticorps a soulevé plusieurs questions sur leur rôle. La capacité de l'antigène à produire des RLO, laisse spéculer un rôle immunologique protecteur de ces anticorps qui élimine l'antigène sous forme de complexes immuns (Bruder *et al.* 1984 ;Ng et Lewis, 1994) ou ayant un rôle enzymatique en inhibant l'activité de la XOR (Ullmann *et al.* , 1962; Bruder *et al.*, 1984).

I.6. But de travail

La présence des anticorps anti-XOR dans le sérum humain normal et avec des taux relativement élevés dans les pathologies cardiovasculaires soulève plusieurs questions concernant l'origine et le rôle de ces anticorps. De ce fait, l'objectif de notre étude est de :

- 1- Purifier la XOR du lait bovin et humain ;
- 2- Préparer les anticorps du sérum de lapin immunisés avec la XOR-h et la XOR-b pures ;
- 3- Comparer l'antigenicité des deux types d'enzymes (XOR-h et XOR-b) ;
- 4- Etudier l'effet des IgG de l'antisérum de lapin immunisé par la XOR sur l'activité de la XOR-h et la XOR-b vis-à-vis de leurs substrats physiologiques (Xanthine et NADH).

Chapitre **II**

Matériel et méthodes

II.1-MATERIEL

II. 1.1- Réactifs

La plupart des produits utilisés dans notre étude proviennent de Sigma: fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) , xanthine, NAD⁺, NADH, protéines standards de PM pour l'électrophorèse, bleu brillant R250, bleu brillant G250, les immunoglobulines de chèvre anti-IgG de lapin conjuguées à la peroxydase, sérum albumine humaine, trypsine, chymotrypsine. Le N,N' méthylène bisacrylamide, caséine et Temed (Merck) et d'autres réactifs proviennent de Fluka, Panreac, Prolabo.

II.1.2- Les gels pour chromatographie

Sépharose 4B-CNBr activé et séphadex PD-10 (Pharmacia), héparine-agarose CL (4%) (Sigma) et Ultrogel AcA 34 (LKB) .

II.1.3- Milieux biologiques

Le lait bovin est obtenu fraîchement d'une ferme à Ain Sfiha ville de Sétif et traité juste à l'arrivée au laboratoire.

Le lait humain est obtenu des femmes volontaires de la ville de Sétif et ses environs et conservé à -5°C jusqu'à l'utilisation .

Les extraits bruts et la XOR-h pure sont un don du Dr. Harrison (laboratoire biochimie, Université Bath, UK).

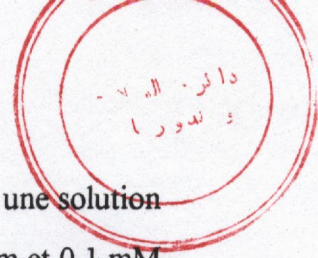
II.2- METHODES

II.2.1- Purification de la XOR du lait bovin et humain

La XOR est préparée du lait bovin et humain selon le protocole utilisé dans le laboratoire du Dr. Harrison (Sanders *et al.*, 1997 ; Benboubetra *et al.*, 1997). Toutes les étapes de purification sont effectuées à 4°C.

II-2-1-1- Préparation de l'extrait brut

Le lait bovin frais et le lait humain congelé et décongelé à température ambiante sont ajoutés à 1 mM de l'acide éthylène diamine tetra acétique (EDTA), 1,25 mM de salicylate de sodium et 0,1 mM de PMSF. Le mélange est agité pendant 20 min et centrifugé à 3.000 g



(centrifugeuse LU- 418H) pour 30 min. La crème collectée est dissoute dans une solution de $K_2 HPO_4$ (0,2 M) contenant 1 mM EDTA , 1,25 mM de salicylate de sodium et 0,1 mM de PMSF et agitée pendant une heure puis centrifugée dans les mêmes conditions précédentes. Le surnageant récupéré est filtré sur laine de verre puis le butanol (15% V/V) préalablement refroidi à $-20^{\circ}C$ et le sulfate d'ammonium (15% P/V) sont ajoutés progressivement et agités pendant une heure avant d'être centrifugés à 13.000g (Ultracentrifugeuse Sigma 3K30) pendant 20 min. Le surnageant obtenu est additionné, après filtration sur la laine de verre, de sulfate d'ammonium (20% P/V) et agité une heure. Le précipité est récupéré après centrifugation à 10.000 g pendant 30 min., dissout dans un petit volume de tampon approprié et dialysé contre le même tampon. Les impuretés insolubles sont éliminées par une centrifugation à 26700 g pendant une heure et le surnageant est filtré sur une membrane de 0,22 μm .

II.2.1.2- Préparation de la XOR pure

La XOR pure est obtenue de l'extrait brut après purification sur une colonne d'héparine-agarose CL (4 %). L'affinité de l'héparine *vis-à-vis* de la XOR-h et de la XOR-b est différente par conséquent les conditions de liaison et d'élution sont différentes (Sanders *et al*, 1997).

L'extrait brut de la XOR-h dialysé contre le tampon phosphate de sodium ($Na_2 HPO_4 / NaH_2 PO_4$, 25 mM, pH 7,4) contenant 1 mM EDTA, 1,25 mM de salicylate de sodium et 0,1 mM de PMSF est appliqué avec un débit constant de 18 ml /h sur la colonne préalablement équilibrée avec le même tampon. La colonne est lavée avec le tampon phosphate de sodium puis avec le même tampon contenant du NaCl (0,1M). La XOR-h est éluee avec le tampon phosphate de sodium contenant du NaCl (0,4 M).

L'extrait brut de la XOR-b dialysé contre le tampon Mes-NaOH (25 mM, pH 6) contenant 1 mM EDTA, 1,25 mM de salicylate de sodium et 0,1 mM de PMSF, est appliqué sur la colonne comme décrit pour la XOR-h. La colonne est lavée avec le même tampon puis la XOR -b est éluee avec le tampon Mes-NaOH contenant du NaCl (0,1 M).

Les fractions contenant la XOR sont mélangées et dialysées contre le tampon Bicine-NaOH (50 mM; pH 8,2) puis réparties en petites aliquotes et conservées à $-20^{\circ}C$.

II.2.2- Dosage des protéines

L'estimation de la quantité de protéine est faite selon la méthode de Macart et Gerbaut (1982). Cette technique a amélioré la linéarité de la méthode originale de Bradford (1976), en ajoutant le dodécyl sulfate de sodium (SDS) au réactif qui lui donne une égale sensibilité *vis-à-vis* de diverses protéines. Ce réactif est constitué de 0,004% (P/V) de bleu brillant de Coomassie G250; 4% (V/V) d'éthanol (96%) ; 0,003% (P/V) SDS et 10% (V/V) d'acide phosphorique (85%). Il est stable pendant plus de 3 mois (Macart *et al.*, 1986).

L'étalonnage (0,1-1,2 mg / ml) est effectué en utilisant le sérum albumine humaine (HSA) comme standard. 100 µl des solutions étalons et des échantillons aux dilutions appropriées sont ajoutés à 2 ml de réactif et mélangés par inversion. Après 10 min la densité optique (DO) du mélange est mesurée à 595 nm par spectrophotomètre visible (Spectronic 70S) et une droite d'étalonnage est établie (Fig. 1)

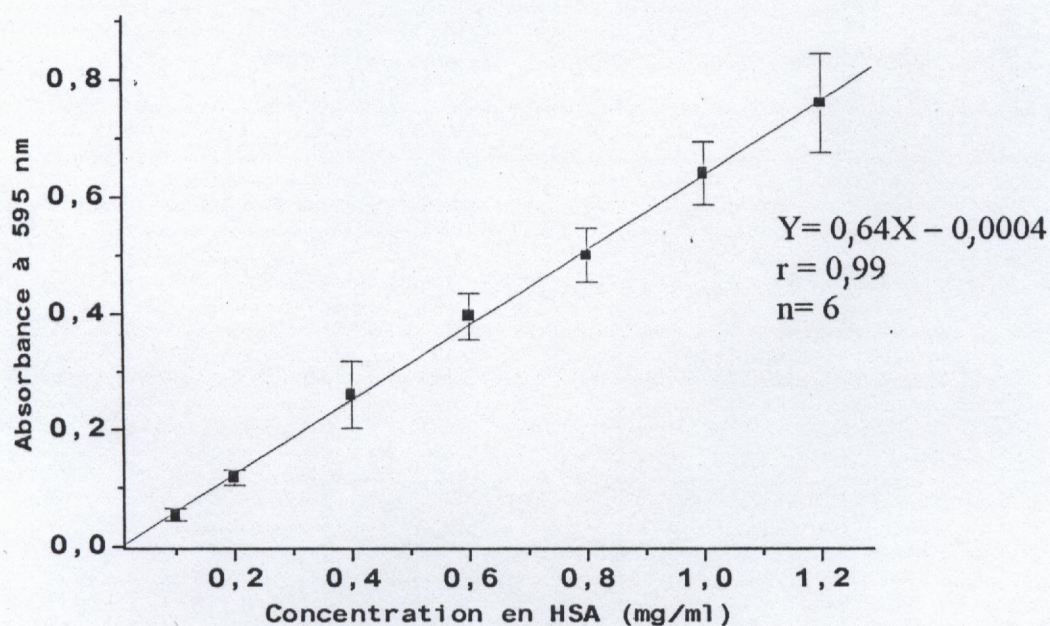


Figure 1 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines

II. 2.3- Contrôle de pureté de XOR

II.2.3-1- Spectre d'absorption UV- visible de la XOR pure

Le balayage de la XOR pure est effectué en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1601). Le Rapport Protéine : Flavine (RPF) de l'enzyme est utilisé comme un indice de pureté. Ce RPF est obtenu par mesure de l'absorbance à 280 nm (des protéines) et à 450 nm du FAD en majorité ($A_{280} : A_{450}$). Plus ce RPF est faible, plus la pureté de la XOR est élevée (Bray, 1975).

II-2-3-2- Électrophorèse sur Gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS - PAGE)

La pureté et le poids moléculaire des échantillons sont déterminés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS préparé selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel de séparation de 10% d'acrylamide est composé de 9,75% (P/V) d'acrylamide et 0,25% (P/V) de N-N' méthylène bis-acrylamide dans un tampon Tris-HCl (0,375 M) pH 8,8 additionné de 0,1% (P/V) SDS, 0,042% (V/V) N,N,N',N', Tetramethylethylènediamine (Temed) et 0,033 (P/V) persulfate d'ammonium. Le gel de concentration de 5% d'acrylamide est constitué de 4,876% (P/V) d'acrylamide et de 0,124 % (P/V) de N,N' méthylène bis-acrylamide dans un tampon Tris-HCl (0,125 M) pH 6,8 additionné de 0,1% (P/V) SDS, 0,01% (V/V) Temed et 0,012 (P/V) persulfate d'ammonium.

Les échantillons (5-40 μ g) et les protéines standards (100 μ g) sont dissociés par chauffage à 100°C pendant 5 min dans 30-60 μ l du tampon Tris-HCl (62,5 mM) pH 6,8 contenant 2% (P/V) SDS, 20% (V/V) glycérol , 0,005% de bleu de bromophénol qui servira à l'identification du front de migration. Il est important de noter que le β -mercaptoéthanol est ajouté immédiatement aux échantillons avant leur chauffage.

La migration électrophorétique des échantillons est effectuée dans le tampon Tris (25 mM)-glycine (0,192 M) contenant 0,1% (P/V) SDS sous un voltage de 75 V à 4°C jusqu'à la pénétration des échantillons dans le gel de séparation puis le voltage est augmenté à 250 V. Les protéines séparées sont ensuite fixées et colorées pendant deux heures avec une solution constituée de 0,1% (P/V) de bleu brillant R250 dans 45% (V/V) d'éthanol et 10% (V/V) d'acide acétique puis , le gel est décoloré dans une solution contenant 5% (V/V) d'éthanol et 7,5% (V/V) d'acide acétique. La décoloration, pour la mise en évidence des

protéines, est réalisée sous agitation lente en changeant plusieurs fois de solution jusqu'à décoloration complète du gel (environ 24 h).

II.2.3.2.1- Détermination du poids moléculaire (PM)

Les poids moléculaires des protéines sont déterminés à partir d'une droite d'étalonnage exprimant la mobilité relative en fonction du Log PM des protéines standards (Fig. 2). La mobilité relative est calculée par la formule suivante:

$$\text{Mobilité relative} = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance du front de migration}}$$

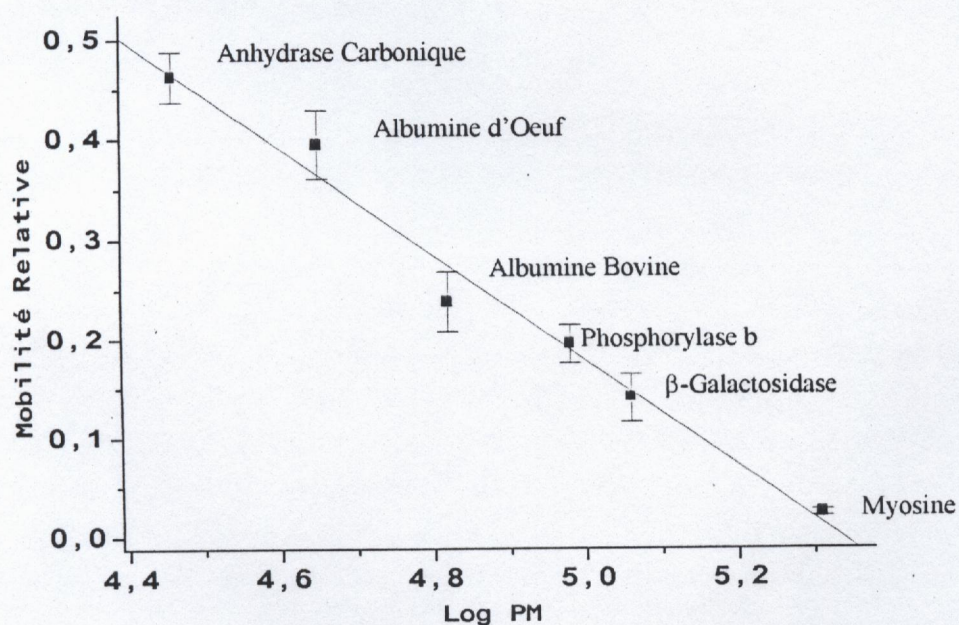
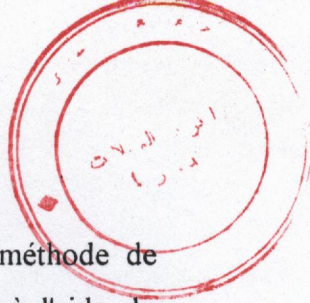


Figure 2 : Droite d'étalonnage pour la détermination du PM des protéines ($n = 4$)



II.2.4- Activité enzymatique de la XOR

Les activités oxydase et déshydrogénase sont mesurées selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) en aérobie, à température ambiante et à l'aide du spectrophotomètre UV-visible.

II.2.4.1- Activité oxydase

L'activité oxydase est déterminée spectrophotométriquement par mesure de "l'oxydation" de la xanthine en urate à 295 nm ($\epsilon_{\text{urate}} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Massey *et al.*, 1969). Une quantité appropriée de XOR est additionnée au mélange réactionnel contenant de la xanthine (1 mM) dans le tampon Bicine-NaOH (50 mM; pH 8,2) saturé avec l'air et mélangée par inversion et l'absorbance est mesurée à 295 nm.

II.2.4.2- Activité déshydrogénase en absence de dithiothreitol (DTT)

L'activité déshydrogénase est mesurée après l'addition de la XOR au milieu réactionnel contenant la xanthine (100 μM) et de NAD^+ (500 μM) dans le tampon Bicine-NaOH (50 mM; pH 8,2) et mélanger par inversion de la cuvette. L'absorbance est mesurée à 340 nm correspondant à la réduction de NAD^+ en NADH. ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Hunt et Massey, 1992).

II.2.4.3- Activité déshydrogénase en présence de DTT

La XOR est incubée en présence de DTT (10 mM) dans le tampon Bicine-NaOH (50 mM; pH 8,2) à 37°C au bain-marie pendant 1 h. L'activité déshydrogénase est déterminé comme précédemment décrit après l'élimination du DTT par passage de milieu d'incubation sur une colonne de séphadex PD- 10.

II.2.4.4- Activité totale (déshydrogénase + oxydase) en absence de DTT

L'activité totale (Oxydase + déshydrogénase) est mesurée à 295 nm dans un milieu réactionnel contenant 100 μM de xanthine et 500 μM de NAD^+ dans un tampon Bicine-NaOH aéré.

I.2.4.5- Activité NADH oxydase

L'activité NADH oxydase est mesurée à 340 nm correspondant à l'utilisation de NADH dans le milieu. Le mélange réactionnel contient de NADH (100 μ M) dans le tampon Bicine-NaOH (50 mM; pH 8,2) saturé avec l'air et une quantité appropriée de XOR est ajoutée. L'absorbance est mesurée à 340 nm. L'activité = Nombre de μ mole de substrat transformé / min. (Unité Internationale, UI).

II.2. 5-Préparation des colonnes d'affinité

les ligands XOR ou protéine A sont couplés au sépharose 4B activé par le bromure de cyanogène (CNBr) selon le protocole de Pharmacia (Affinity chromatography, principles and methods, 1993).

II.2. 5.1- Préparation du gel

La quantité désirée en sépharose 4B activé par le CNBr (Pharmacia) est gonflée pendant 15 min dans HCl (1 mM) puis lavée par filtration sur verre fritté (porosité G3) avec la même solution. Au total, approximativement 200 ml de HCl (1 mM) par gramme de gel sont additionnés en plusieurs aliquotes, ainsi un gramme de gel est gonflé à environ 3,5 ml. L'utilisation de HCl préserve l'activité des groupements réactifs qui s'hydrolysent à pH alcalin. Finalement le gel est équilibré avec le tampon de couplage NaHCO₃ (0,1 M; pH 8,3) contenant du NaCl (0,5 M) . Cette étape est réalisée le plus rapidement possible afin d'éviter l'hydrolyse des groupements réactifs de gel. Puis le gel est immédiatement transféré dans la solution du ligand.

II.2.2. 5- Couplage du ligand au sépharose 4B activé par le CNBr

La protéine A dissoute dans le tampon de couplage ou la XOR pure dialysée pendant 18 h à 4°C contre le tampon de couplage sont mélangés à la suspension de gel activé (dans un rapport de 3 mg de protéine A ou de XOR /ml de gel) par rotation une nuit à 4°C. Après couplage, le gel est lavé 3 fois par dispersion avec le tampon de couplage. L'efficacité de couplage est estimée par dosage de la quantité de protéine dans le surnageant et dans les lavages. Les sites restant libres sur le gel sont saturés par 0,2 M de glycine pH 8 pendant 2 h à 4°C avec rotation. Le gel est ainsi lavé alternativement 3 à 4 fois avec le tampon acétate de sodium (0,1 M; pH 4) contenant du NaCl (0,5 M) puis avec le tampon de couplage. Le gel est entassé dans la colonne et lavé avec du tampon Phosphate Salin (PBS) à 10 mM

pH 7,4 puis, le gel est conservé dans du PBS contenant 0,02% (P/V) d'azide de sodium (NaN_3).

II.2.6- Préparation des anticorps

II.2.6.1- Immunisation de lapins

Les lapins sont immunisés par voie sous-cutanée à différents endroits avec 400 μl du PBS (10 mM; pH 7,4) contenant 200 μg de la XOR -h ou XOR-b pure. Les injections de rappel de même dose (200 μg de la XOR dans 400 μl du PBS) sont administrées après 15, 30 et 45 jours de la première injection. Avant l'immunisation et après une semaine de chaque injection, les lapins sont saignés par une piqûre au niveau de la veine périphérique de l'oreille. Le sang prélevé est utilisé pour la titration du sérum par "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) indirect (le sérum de lapin avant immunisation est utilisé comme témoin). Une semaine après la dernière immunisation, les lapins sont sacrifiés et environ 60 ml du sang / lapin sont collectés.

II.2.6.2- Préparation du sérum

Le sang de lapins collecté est laissé coaguler pendant 4 h à température ambiante puis centrifugés à 3000 rpm pour 30 mn après rétraction du caillot une nuit à 4°C. Le sérum récupéré et réparti en petites aliquotes et conservé à -20°C jusqu'à usage.

II.2.6.3- Préparation des immunoglobulines (Ig)

La fraction d'IgG est isolée du sérum, par précipitation au sulfate de sodium (Na_2SO_4) (Benboubetra, 1989). La fraction d'IgG est précipitée du sérum par l'addition de façon progressive de 18% (P/V) Na_2SO_4 sous agitation pendant 30 min. Le sérum est agité pendant 1 h, puis laissé reposer une heure avant d'être centrifugé à 3000 g pendant 30 min. Le précipité récupéré est lavé 2 fois par centrifugation, dans les mêmes conditions avec 18% (P/V) Na_2SO_4 dans 0,1 M de NaHCO_3 (5 ml/ ml de sérum). Le précipité final est dissout dans du PBS (1 ml/ ml de sérum), et dialysé contre le même tampon une nuit à 4°C.



II.2.6.4- Purification des anticorps par affinité

II.2.6.4.1- Isolement des IgG sur protéine A-sépharose 4 B

La fraction d'IgG précipitée du sérum, est purifiée sur la protéine A- sépharose 4 B à 4°C. La protéine A, un polypeptide isolé de *Staphylococcus aureus*, possède une affinité élevée pour la fraction Fc des Ig (Goding, 1978) particulièrement des IgG et à moindre degré les IgM. La fraction d'IgG isolée du sérum (témoin, anti-XOR-b et anti-XOR-h) est appliquée sur la colonne de la protéine A-sépharose avec un débit constant de 12 ml /h et recyclée pendant 4 h afin d'assurer une liaison maximale. La colonne est lavée avec du PBS et les IgG liées sont éluées avec un tampon glycine-HCl (0,2 M; pH 2,7) . Les fractions contenant les IgG sont collectées dans des tubes contenant du Tris-HCl (1 M; pH 8) (1/5 du volume de la fraction). Ces fractions sont mélangées et dialysées contre du PBS contenant 0,01 % (P/V) de NaN₃ et conservées à 4°C.

La colonne est régénérée par lavage avec PBS puis du tampon acétate de sodium (0,1M; pH 4) contenant du NaCl (0,5 M) et finalement avec du PBS contenant 0,01% (P/V) NaN₃. La pureté et l'immunoréactivité des IgG purifiées sont testées par SDS-PAGE et par ELISA indirect respectivement

II.2.6.4.2- Purification des IgG spécifiques à la XOR -b

La même procédure décrite dans la section II.2.6.4.1 est suivie pour la purification des IgG polyclonaux spécifiques sur une colonne de XOR-b-sépharose 4 B.

II.2.7- ELISA

Tout au long de notre étude, nous avons utilisé le test ELISA simple indirect réalisé selon le protocole décrit par Engvall (1980) dans des plaques de microtitration (cel. cult). Le volume réactionnel est de 100 µl/ puits et 3 à 4 lavages avec PBS-Tween 20 (PBS-T) (0,1%; V/V) sont effectués après chaque étape.

II.2.7.1- Titration du sérum de lapin anti-XOR

Pour déterminer le titre du sérum des lapins après chaque injection de la XOR-b ou la XOR-h, les plaques de microtitration sont adsorbées avec 10 µg/ml de XOR-h ou XOR-b dans le tampon carbonate-bicarbonate (50 mM; pH 9,6) pendant 4 h à température ambiante. Les sites libres sont saturés avec la caséine à 1,5% (P/V) dans du PBS-T une nuit

à 4°C. Puis, le sérum témoin et l'antisérum (anti-XOR-h ou anti-XOR-b) sont incubés avec la XOR-b ou la XOR-h pendant 2 h à température ambiante. Les immunoglobulines de chèvre anti-IgG de lapin conjuguées à la peroxydase diluées au 1/2000 dans PBS-T sont additionnées aux puits et incubées 1h à température ambiante. La fixation du deuxième anticorps est révélée par l'addition de 100 µl /puits d'une solution de substrat contenant l'orthophenyldiamine (Diagnostics Pasteur, France) et 0,07% (V/V) de peroxyde d'hydrogène (30%) dans le tampon citrate (0,1M)- phosphate disodique (0,2 M) pH 6. La coloration est développée après 10 à 15 min. Finalement, la réaction est arrêtée avec 50 µl de HCl (2N) /puits et l'absorbance est mesurée à 492 nm avec un lecteur d'ELISA (Diagnostics Pasteur LP 200) au laboratoire central du Centre Hospitalo-Universitaire, Sétif.

II.2.7.2- Optimisation des concentrations de XOR et des IgG de lapins

L'optimisation de la concentration de XOR et d'IgG de l'antisérum de lapin pour l'essai d'inhibition (Section II.2.7.3) est déterminée par adsorption de différentes concentrations de XOR-h ou de XOR-b (1, 5, 10 et 15 µg/ml) préparées dans du tampon carbonate-bicarbonate (50 mM; pH 9,6) dans les cupules de plaque microtitration pendant 4 h à température ambiante. Les sites libres sont saturés avec la caséine à 1,5% (P/V) dans du tampon PBS-T pendant une nuit à 4°C. La XOR-h et la XOR-b adsorbées sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante avec différentes concentrations d'IgG de l'antisérum anti-XOR-h (15,625 - 1000 ng/ml) et anti-XOR-b (7,8125 - 500 ng/ml) respectivement, préparées par dilution demi en demi dans du PSB-T. Les étapes ultérieures sont les mêmes que celles décrites dans la section précédente (II.2.7.1).

II.2.7.3- ELISA d'inhibition

Les plaques de microtitration sont adsorbées avec de la XOR-b (10 µg/ml) ou de la XOR-h (10 µg/ml) préparée dans le tampon carbonate-bicarbonate (50 mM; pH 9,6) pendant 4 h à température ambiante. Les sites libres sont saturés comme précédemment décrit. Différentes concentrations de XOR-h ou de XOR-b (0,2-15 µg/ml), comme des antigènes solubles (inhibiteurs) sont préparées dans le tampon PBS séparément dans des tubes. Pour chaque tube les IgG de l'antisérum anti-XOR-h et anti-XOR-b sont ajoutés pour donner une concentration finale de 500 ng/ml et de 250 ng/ml respectivement. Après 2 h d'incubation à température ambiante, 100 µl de chaque tube sont transférés dans des puits

appropriés et incubés 2 h à température ambiante. Les étapes ultérieures sont les mêmes que celles décrites dans la section (II.2.7.1).

Les pourcentages d'inhibition sont déterminés en se basant sur des courbes d'étalonnage obtenues sur les mêmes plaques avec des concentrations d'IgG de l'antisérum anti-XOR-h (10-500 ng/ml) ou anti-XOR-b (5-250 ng/ml) en absence d'inhibiteur. L'incubation de l'antisérum avec différentes concentrations de caséine (0,2 -15 µg/ml) est utilisée comme témoin.

II.2.8- Effet des IgG de lapins sur les activités xanthine et NADH oxydases de la XOR

In vivo, la xanthine et le NADH sont des substrats physiologiques oxydés par la XOR. Ainsi l'effet d'anticorps sur l'activité xanthine et NADH oxydases est testé en présence de la fraction totale d'IgG de sérum témoin et de l'antisérum anti-XOR-h et anti-XOR-b obtenus par la méthode décrite dans la section (II.2.6.4.1).

Différentes concentrations d'IgG de sérum témoin de l'antisérum anti-XOR-h et anti-XOR-b sont incubées une heure en présence de 0,4 mg/ml de XOR-b ou de 0,5 mg/ml de XOR-h à 37°C au bain marie. Une quantité appropriée de milieu d'incubation (XOR- IgG) est ajoutée au milieu réactionnel contenant soit 100 µM de xanthine ou 100 µM de NADH dans le tampon phosphate de sodium (50 mM; pH 7,4) aère et l'absorbance est mesurée à température ambiante soit à 295 nm correspondant à l'oxydation de la xanthine en urate soit à 340 nm correspondant à l'absorption du NADH. Les incubations de la XOR en présence des IgG de sérum témoin et en absence d'IgG sont utilisées comme témoins.

II.2.9- Digestion protéolytique de la XOR

La XOR-b et la XOR-h purifiée sont incubées avec la trypsine ou la chymotrypsine dans le tampon phosphate de sodium (50 mM; pH 7,4) à 37°C au bain marie pendant 2, 4 et 20 h. Le rapport protéase: XOR est de 1:10 (P/P). Après chaque période d'incubation, des aliquotes sont transférées dans des tubes contenant du PMSF à une concentration finale de 2 mM puis conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation.

II.2.10- Fractionnement des polypeptides issus de la protéolyse de la XOR par gel -filtration

La chromatographie de filtration sur gel est la technique la plus adaptée pour le fractionnement de différentes molécules de différentes tailles. Afin de séparer les différents polypeptides dérivés de la digestion de la XOR- h par les protéases, l'Ultrogel AcA34 est utilisé. La XOR protéolysée est appliquée sur colonne d'Ultrogel AcA34 (3 x 28 cm) préalablement équilibrée avec l'urée 6 M. L'application et l'élution de l'échantillon sont effectuées dans les mêmes conditions dénaturantes avec un débit de 6 ml/h. Les fractions correspondant à chaque pic sont mélangées et dialysées contre le tampon phosphate de sodium (50 mM; pH 7,5) puis équilibrées, après concentration par le poly éthylène glycol 20.000, avec le tampon Bicine-NaOH (50 mM; pH 8,2) par passage sur PD 10.

Chapitre **III**

Résultats

III.1- Purification de la XOR du lait humain et bovin



III.1.1- Purification de la XOR du lait bovin

Les résultats de la purification de la XOR du lait bovin frais selon la méthode décrite dans matériel et méthode (Section II.2.1) sont résumés dans le tableau 1

Tableau 1: Purification de la XOR à partir du lait bovin

Les valeurs sont la moyenne de trois purifications \pm "standard deviation"
(moyenne \pm SD). nd= non déterminé

Etapes de purifications	Volume total (ml)	Quantité totale de protéine (mg)	Quantité totale de la XOR (mg)	Activité totale Xanthine/NAD ⁺ /O ₂ UI	Activité spécifique UI/ mg de protéine	RPF
Lait	4000	nd	nd	nd	nd	nd
1 ^{ère} précipitation	283,33 \pm 14,43	135,66 \pm 13,61	72,21 \pm 12,67	53,92,5 \pm 5,57	0,4058 \pm 0,069	10,01 \pm 0,23
Extrait brut	38,33 \pm 3,81	95,53 \pm 2,2	61,08 \pm 11,76	73,947 \pm 19,670	0,82061 \pm 0,287	8,12 \pm 0,55
XOR purifiée	20,83 \pm 4,37	48,17 \pm 1,53	34,85 \pm 6,22	73,852 \pm 29,261	1,59059 \pm 0,657	5,56 \pm 0,24

Vu la turbidité du lait, la mesure de l'activité de la XOR dans le lait n'est pas spectrophotométriquement possible. Ainsi, le taux et le rendement de la purification n'ont pas été déterminés. La quantité de l'enzyme purifiée à partir du lait bovin frais est d'environ 8,71 \pm 0,765 mg/L correspondant à la moitié de la quantité estimée dans l'extrait brut (15,26 \pm 2,94 mg de la XOR/L). Contrairement à ces pertes, d'environ 43%, il est à noter que les pertes d'enzyme entre la première précipitation et l'extrait brut ne dépassent pas les 15% (Tableau 1).

La XOR est éluée de la colonne d'héparine-agarose, par le tampon contenant du NaCl (0,1 M), en un seul pic symétrique distinctement sépare des autres protéines contaminantes (Fig. 1, Pic b). Une quantité, non négligeable, de XOR (1,265 \pm 0,11 mg/L; n=3) est éluée de la colonne d'héparine-agarose par le tampon contenant du NaCl (0,4 M) avec une faible pureté (RPF = 7,95 \pm 0,65; Fig.1, Pic c). Le spectre d'absorption UV/ visible de l'enzyme purifiée est identique à celui de l'enzyme bovine commercialisée par Biozyme (Fig. 2 A et B) montrant des pics d'absorption à 280 nm; à 450 nm et dans la région 400 - 300 nm. Le RPF

III.1- Purification de la XOR du lait humain et bovin

III.1.1- Purification de la XOR du lait bovin

Les résultats de la purification de la XOR du lait bovin frais selon la méthode décrite dans matériel et méthode (Section II.2.1) sont résumés dans le tableau 1

Tableau 1: Purification de la XOR à partir du lait bovin

Les valeurs sont la moyenne de trois purifications \pm "standard deviation"
(moyenne \pm SD). nd= non déterminé

Etapes de purifications	Volume total (ml)	Quantité totale de protéine (mg)	Quantité totale de la XOR (mg)	Activité totale Xanthine/NAD ⁺ /O ₂ UI	Activité spécifique UI/ mg de protéine	RPF
Lait	4000	nd	nd	nd	nd	nd
1 ^{ère} précipitation	283,33 \pm 14,43	135,66 \pm 13,61	72,21 \pm 12,67	53,92,5 \pm 5,57	0,4058 \pm 0,069	10,01 \pm 0,23
Extrait brut	38,33 \pm 3,81	95,53 \pm 2,2	61,08 \pm 11,76	73,947 \pm 19,670	0,82061 \pm 0,287	8,12 \pm 0,55
XOR purifiée	20,83 \pm 4,37	48,17 \pm 1,53	34,85 \pm 6,22	73,852 \pm 29,261	1,59059 \pm 0,657	5,56 \pm 0,24

Vu la turbidité du lait, la mesure de l'activité de la XOR dans le lait n'est pas spectrophotométriquement possible. Ainsi, le taux et le rendement de la purification n'ont pas été déterminés. La quantité de l'enzyme purifiée à partir du lait bovin frais est d'environ 8,71 \pm 0,765 mg/L correspondant à la moitié de la quantité estimée dans l'extrait brut (15,26 \pm 2,94 mg de la XOR/L). Contrairement à ces pertes, d'environ 43%, il est à noter que les pertes d'enzyme entre la première précipitation et l'extrait brut ne dépassent pas les 15% (Tableau 1).

La XOR est éluée de la colonne d'héparine-agarose, par le tampon contenant du NaCl (0,1 M), en un seul pic symétrique distinctement séparé des autres protéines contaminantes (Fig. 1, Pic b). Une quantité, non négligeable, de XOR (1,265 \pm 0,11 mg/L; n=3) est éluée de la colonne d'héparine-agarose par le tampon contenant du NaCl (0,4 M) avec une faible pureté (RPF = 7,95 \pm 0,65; Fig.1, Pic c). Le spectre d'absorption UV/ visible de l'enzyme purifiée est identique à celui de l'enzyme bovine commercialisée par Biozyme (Fig. 2 A et B) montrant des pics d'absorption à 280 nm; à 450 nm et dans la région 400 - 300 nm. Le RPF

de la XOR-b purifiée est de $5,56 \pm 0,24$ qui est presque identique à celui de la XOR-b (Biozyme) de 5,63. Un RPF proche de 5 est un critère de pureté de la préparation (Bray, 1975).

L'augmentation de l'activité spécifique au cours de la purification (de $0,40561 \pm 0,034$ à $1,59 \pm 0,657$ UI/mg de protéine) est un indice de l'élimination des protéines contaminantes. L'activité spécifique NADH oxydase ($0,099 \pm 0,006$ UI / mg) est 16 fois plus faible par rapport à l'activité spécifique xanthine oxydase ($1,59 \pm 0,657$ UI/mg). L'analyse de la XOR purifiée sur SDS - PAGE a montré une bande majeure de PM approximative 150 KDa et une bande mineure de PM approximative 80 KDa avec d'autres bandes moins apparentes (Fig.3). Le gel montre que l'enzyme préparée est relativement pure par rapport à la XOR-b (Biozyme). La présence de quelques impuretés dans la préparation enzymatique a nécessité un deuxième passage sur colonne d'héparine. L'analyse de l'éluat contenant la XOR-b ainsi obtenu sur SDS - PAGE a montré une seule bande majeure de PM d'environ 150 KDa avec disparition de toutes les autres bandes mineures (Fig. 4).

Environ 83 à 95% de l'activité de la XOR purifiée, en absence d'agent réducteur tel que le DTT est de type oxydase avec seulement 1 à 4% de type deshydrogenase (n=3). L'incubation de la XOR-b préparée en présence de DTT (10mM) à 37°C pendant une heure entraîne une conversion d'environ 60 à 70% de l'activité oxydase en activité deshydrogénase.

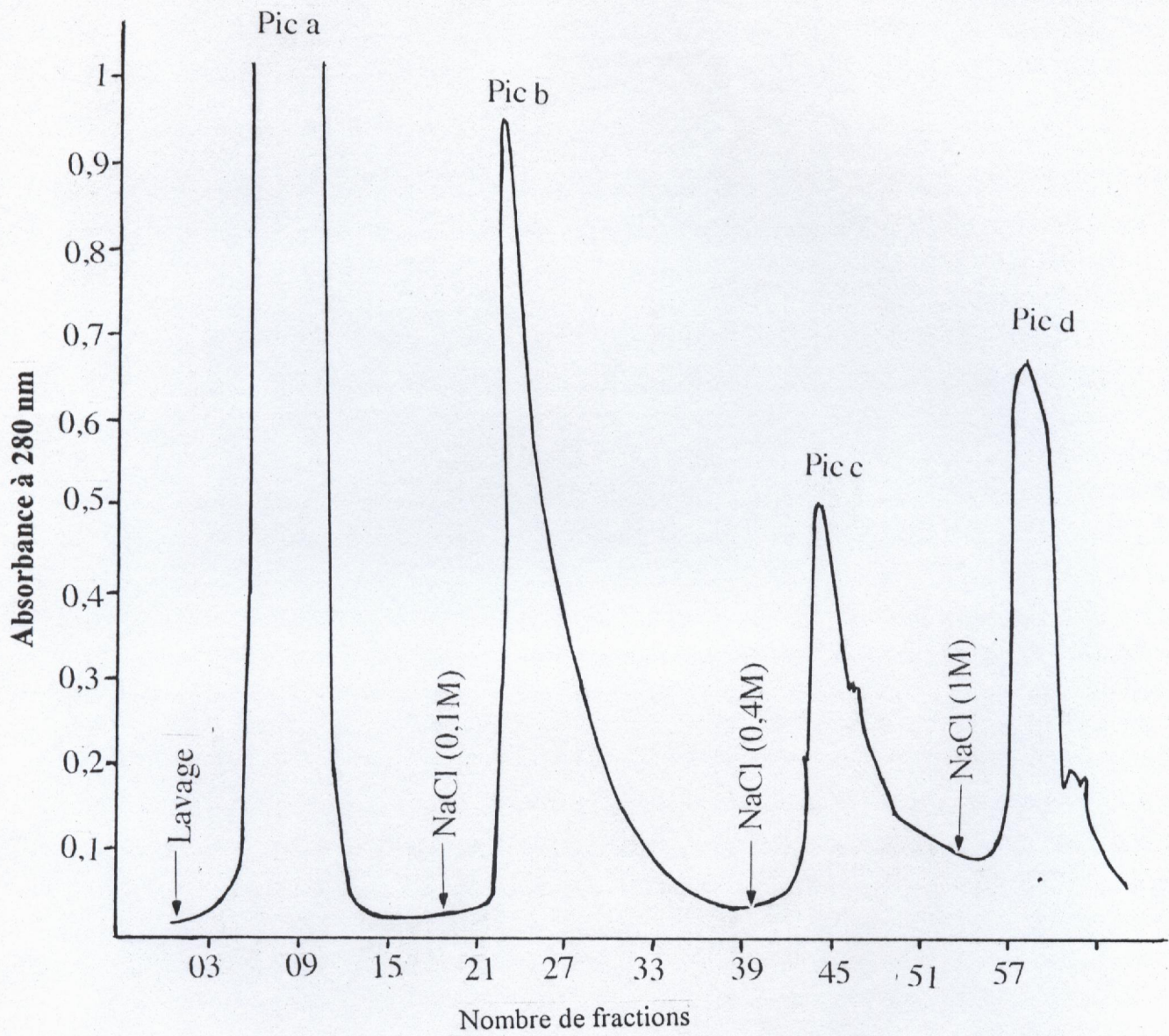


Figure 1 : Profil d'élution de la XOR-b de la colonne d'heparine -agarose avec un débit de 18 ml / h .Le volume de chaque fraction = 2 ml

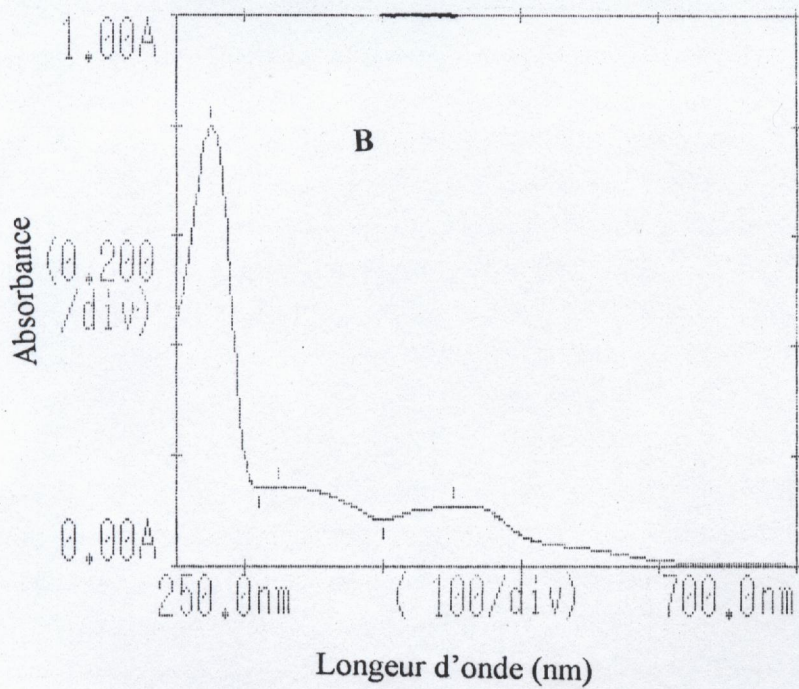
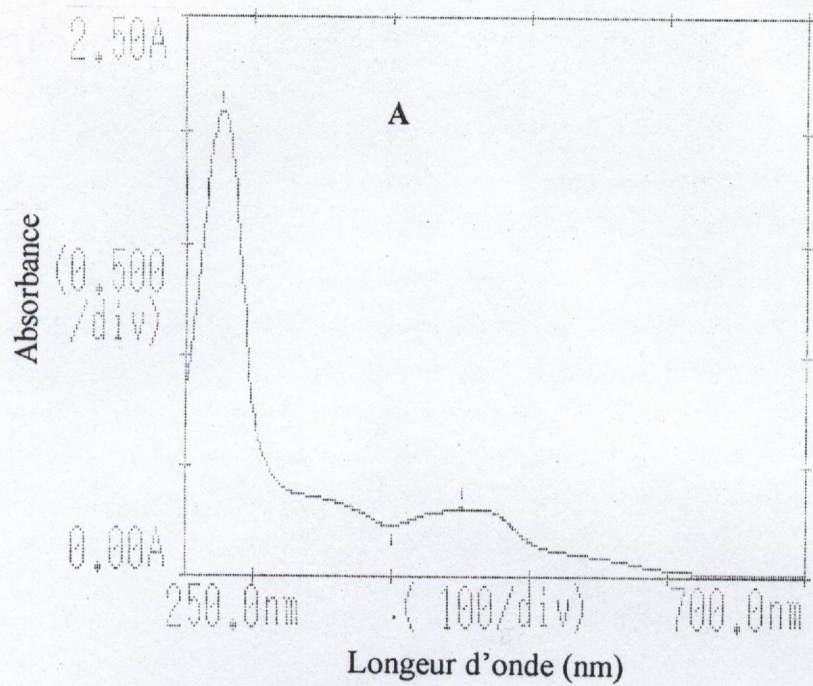


Figure 2: Spectre d'absorption UV- Visible de la XOR-b purifiée (A) et de la XOR-b commercialisée par la firme Biozyme (B).

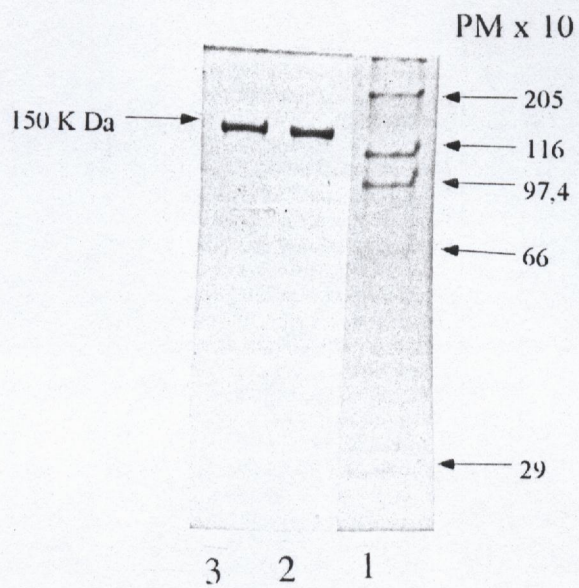


Figure 4 : SDS-PAGE (10%) de la XOR-b après un deuxième passage sur colonne d'héparine-agarose.

Ligne 1 : Protéines standards.

Ligne 2 et 3 : XOR-b pure.

III.2.2- Purification de la XOR du lait humain

Pour des raisons purement techniques, les conditions de collection et de conservation du lait humain n'ont pas été adéquates. Il est donc possible, en raison de telles conditions, qu'aucune quantité de XOR n'a été récupérée de trois purifications du lait humain utilisé et congelé pendant plus de trois mois à -5° . De ce fait, les extraits bruts de la XOR-h ont été procurés du laboratoire de Dr. Harrison de l'université de Bath en Angleterre par Dr. Benboubetra. Ces extraits bruts ont été utilisés pour la purification de l'enzyme sur colonne d'héparine au niveau de notre laboratoire dont les résultats de la purification sont présentés dans le tableau 2.

De plus, l' hors d'un stage au niveau du laboratoire de Dr. Harrison, Mr. Beghiani (un membre de notre équipe de recherche) a réalisé trois purifications de la XOR à partir du lait humain congelé. Les résultats de ces purifications sont comme suit:

$$\text{Rendement} = 6,44 \pm 1,08 \text{ mg de XOR/L}$$

$$\text{Activité totale} = 80,82 \pm 10,15 \text{ mUI/mg de protéine}$$

$$\text{La forme oxydase} = 70,2 \pm 3,38\%$$

$$\text{RPF} = 5,4 \pm 0,17$$

La quantité de la XOR récupérée à partir du lait humain varie de 4,7-14,83 mg/L (n=4). Le passage de l'extrait brut à travers la colonne d'héparine-agarose engendre des pertes d'enzyme inférieures au tiers (de 6,68 mg /L à 4,7 mg /ml). La majorité de l'activité de la XOR purifiée à partir du lait humain, en absence d' agent réducteur, est de type oxydase (66- 84,8 %). L'activité spécifique NADH oxydase de la forme O de XOR -h ($0,117 \pm 0,015 \text{ UI/mg ; n=3}$) est légèrement supérieure par rapport à son activité xanthine oxydase ($0,08 \pm 0,01 \text{ UI/mg ; n=3}$).

La XOR-h avait un spectre UV - visible (Fig. 5A.) semblable à celui de XOR-b (Biozyme, Fig.5B) avec les mêmes maxima. L'enzyme humaine purifiée à un R P F de $5,17 \pm 0,27$ (n=4) et présente principalement une bande majeure de PM d'environ 150 KDa sur SDS - PAGE (Fig.6 et 7).

Tableau 2: Purification typique sur colonne d'héparine-agarose de la XOR de l'extrait brut du lait humain congelé. nd: non déterminé.

Etapes de la purification	Lait	Extrait brut	XOR purifiée
Volume total (ml)	1200	30	11
Quantité totale en protéine (mg)	nd	17,72	7,23
Quantité totale XOR (mg)	nd	8,02	5,63
Activité spécifique mUI/mg de protéine	nd	47,50	73,43
% de la forme Oxydase	nd	nd	80,8
% de la forme Deshydrogénase en présence de D T T (10 mM)	nd	nd	70,72
RPF	nd	7,09	4,48

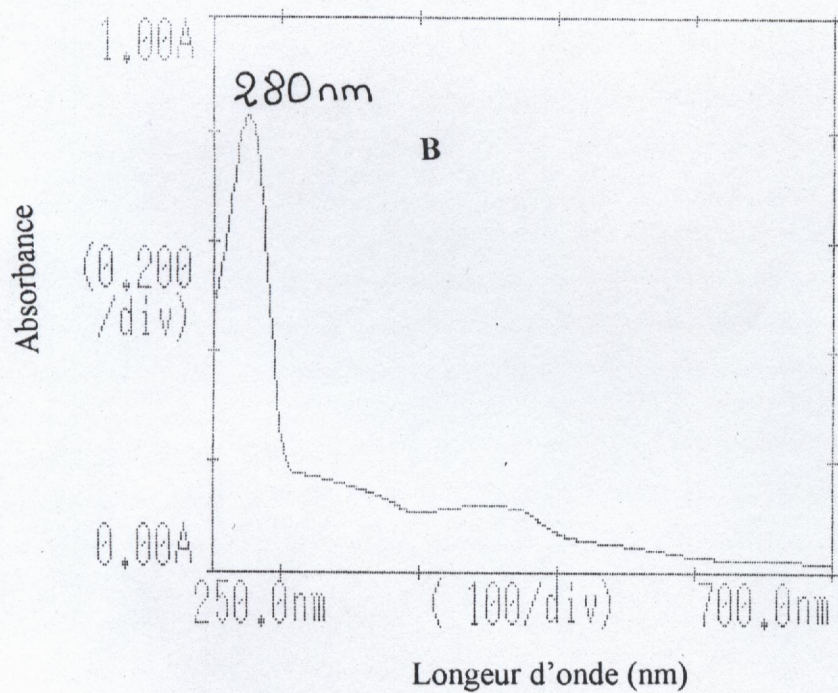
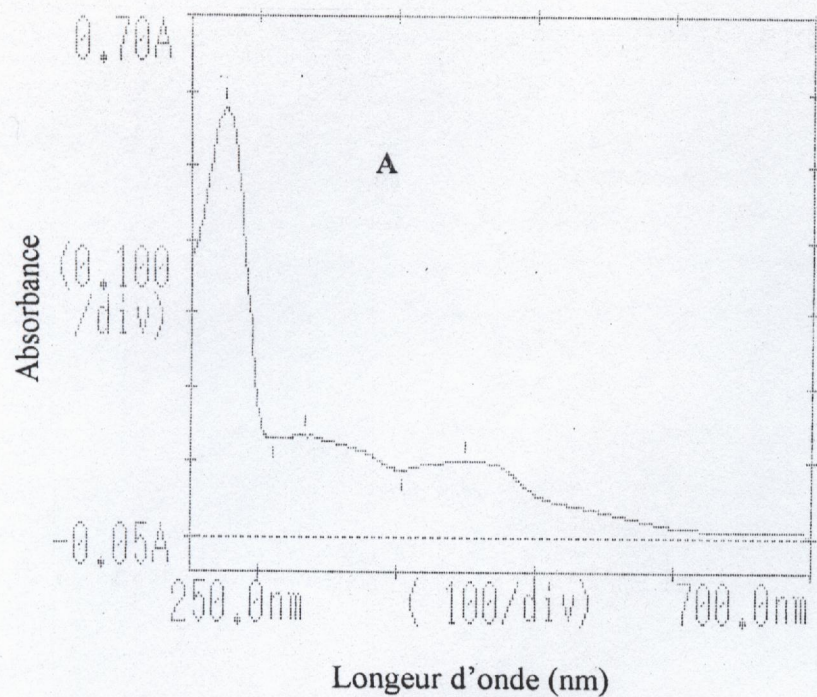


Figure 5 : Spectre d'absorption UV- Visible de la XOR-h purifiée (A) et de la XOR-b commercialisée par la firme Biozyme (B).

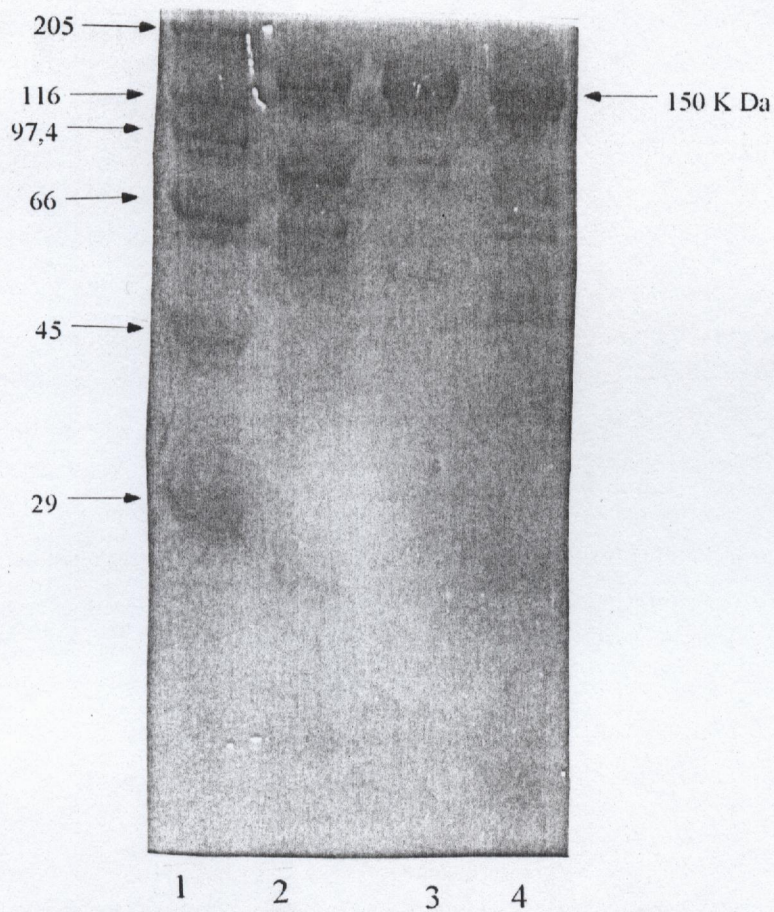


Figure 6 : SDS-PAGE (10%) de la XOR purifiée sur colonne d'héparine-agarose à partir du lait humain congelé pendant 2 jours.

Ligne 1 : Protéines standards.

Ligne 2 : XOR-b(Biozyme).

Ligne 3 : XOR-h purifiée sur colonne d'héparine

Ligne 4 : Extrait brut de la XOR-h.

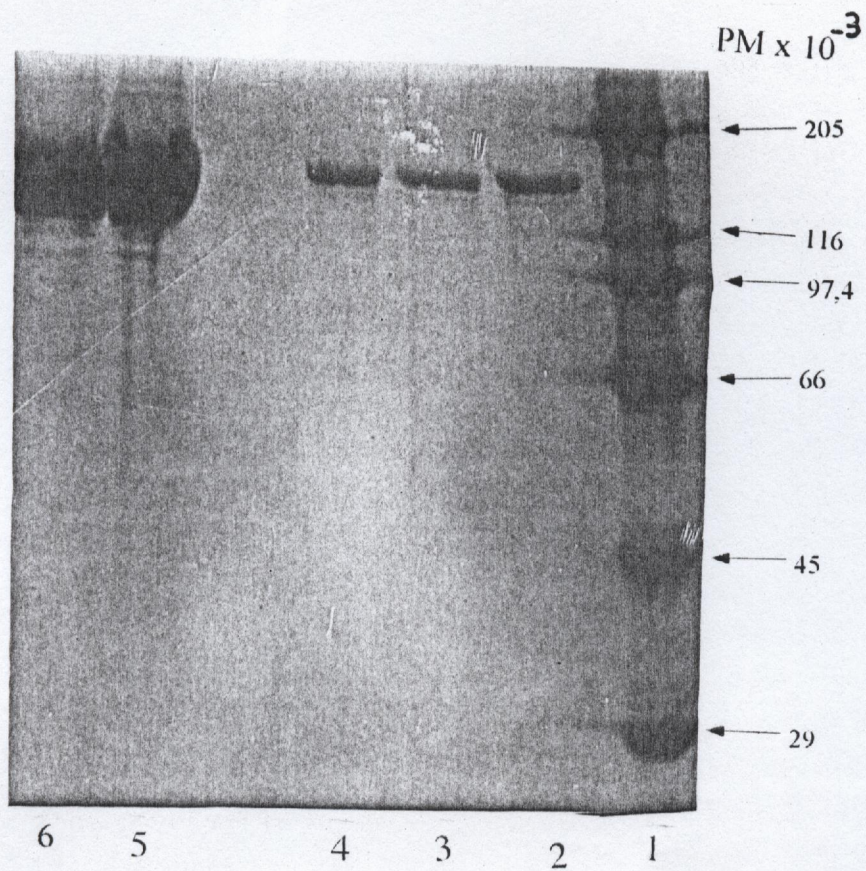


Figure 7: SDS-PAGE (10%) de la XOR purifiée sur colonne d'héparine-agarose à partir du lait humain congelé.

Ligne 1 : Protéines standards.

Lignes 2,3 et 4 : XOR-b pure.

Ligne 5 et 6 : Extrait brut de la XOR-h

III.2- Immunisation de lapins par XOR-b ou XOR-h

III.2.1- Le titre du sérum

Pour déterminer le titre sérique en anti-XOR, le sérum de lapins avant et après immunisation par la XOR-h ou la XOR-b est testé par ELISA indirecte et les résultats sont présentés dans le tableau 3. La XOR-b a induit une réponse immunitaire plus intense que celle induite par la XOR-h (Fig. 8 A et B). En effet, le titre sérique en anti-XOR-b, après chaque injection, est le double de celui en anti-XOR-h (tableau 3).

Tableau 3: Titre sérique en anti- XOR-b et anti XOR-h de lapins immunisés par la XOR-b et XOR-h respectivement. Le titre sérique est établi comme étant la dilution maximale à laquelle la réaction enzymatique, de la HR Peroxydase couplée au deuxième anticorps, peut être détectée

Injection	Titre sérique en anti XOR-b	Titre sérique anti XOR-h
1 ^{ère}	4000	2000
2 ^{ème}	8000	4000
3 ^{ème}	32000	16000
4 ^{ème}	64000	32000

III.2.2- Préparation de la fraction d'IgG du sérum de lapin

La première stratégie utilisée pour récupérer la fraction totale d'IgG de sérum anti-XOR et du sérum témoin est la précipitation au sulfate de sodium (matériel et méthode, section II.2.6-3). La fraction d'IgG ainsi obtenue est purifiée sur protéine A- Sepharose 4B (tableau 4).

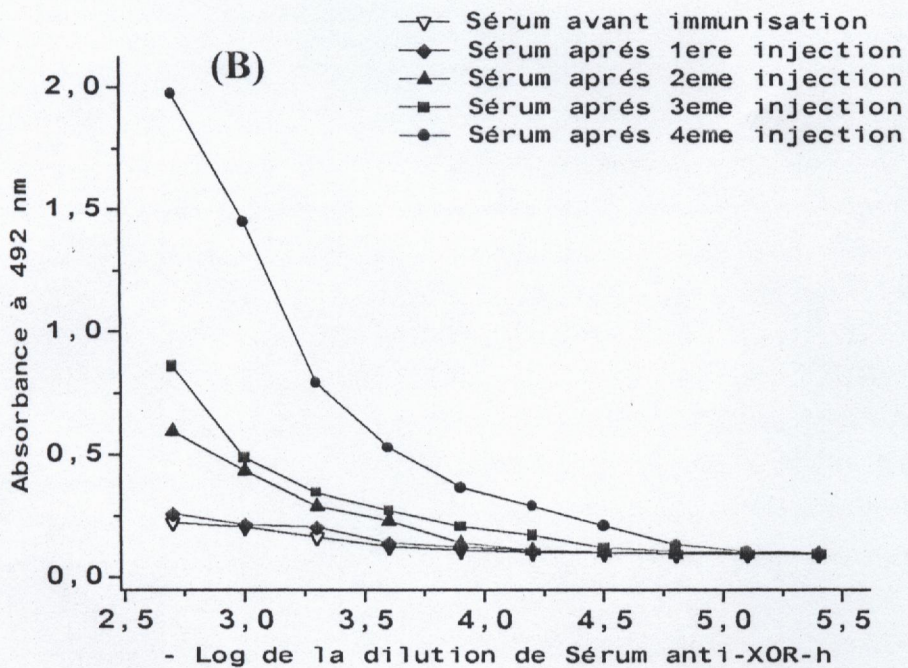
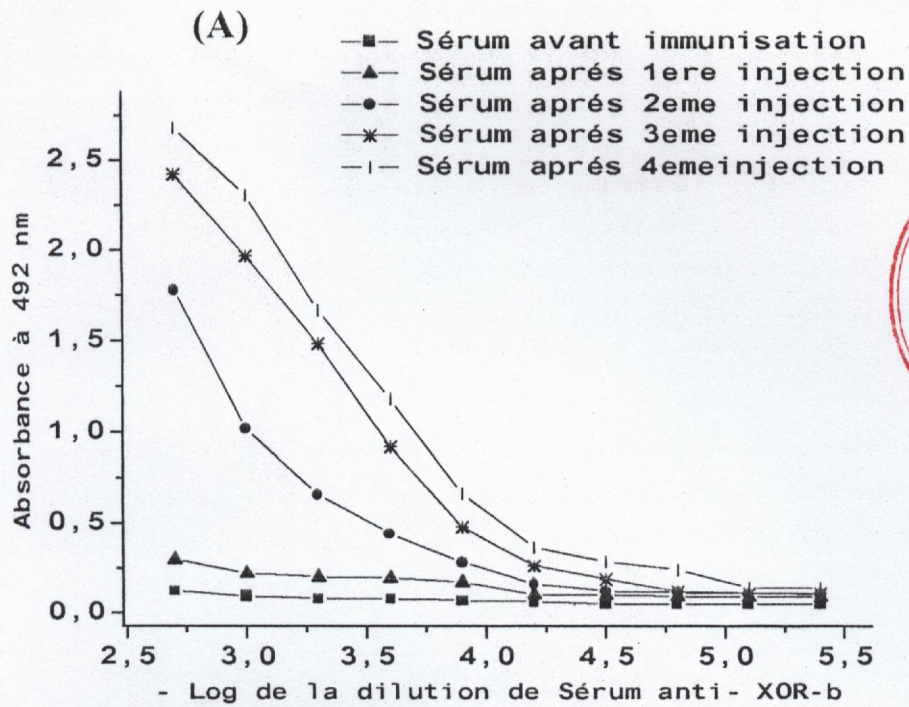


Figure 8 : Courbes de titration du sérum de lapins immunisés par la XOR
 Chaque point est la moyenne de trois déterminations

A : Sérum anti XOR-b

B : Sérum anti XOR-h

Tableau 4: Préparation d'IgG du sérum de lapin. L'estimation protéique est faite selon la méthode de Macart et Gerbaut (1982) et exprimée par rapport au volume du sérum utilisé. Les valeurs sont la moyenne de trois préparations

Sérum	Protéine estimée (mg/6ml du sérum) après précipitation du sérum (moyenne ± SD)	Quantité d'IgG estimée (mg /6ml du sérum) après purification sur protéine A-Sépharose 4B (moyenne ± SD)	% de fixation sur protéine A
Témoin	38,52 ± 10,4	30,63 ± 9,10	77,3 ± 3,22%
Anti XOR-h	45,46 ± 5,47	38,28 ± 5,86	83,16 ± 3,93%
Anti XOR-b	43,04 ± 4,76	35,14 ± 4,42	81,34 ± 1,45%
Moyenne pour les 3 sérums	42,34 ± 1,63	34,68 ± 1,52	80,6 ± 0,43%

Le rendement de trois préparations est de 7,05 mg d'IgG/ ml de sérum. Après passage sur protéine A - Sepharose 4B, la fraction d'IgG est éluée en un seul pic symétrique (Fig. 9, Pic b) dont la quantité récupérée est estimée à environ 5,78 mg d'IgG/ ml de sérum soit un rendement d'environ 80,6 ± 0,43%.

Sur SDS-PAGE, la fraction d'IgG obtenue présente une bande majeure correspondant à la chaîne lourde et une bande mineure moins apparente correspondant à la chaîne légère de la molécule d'IgG (Fig. 10)

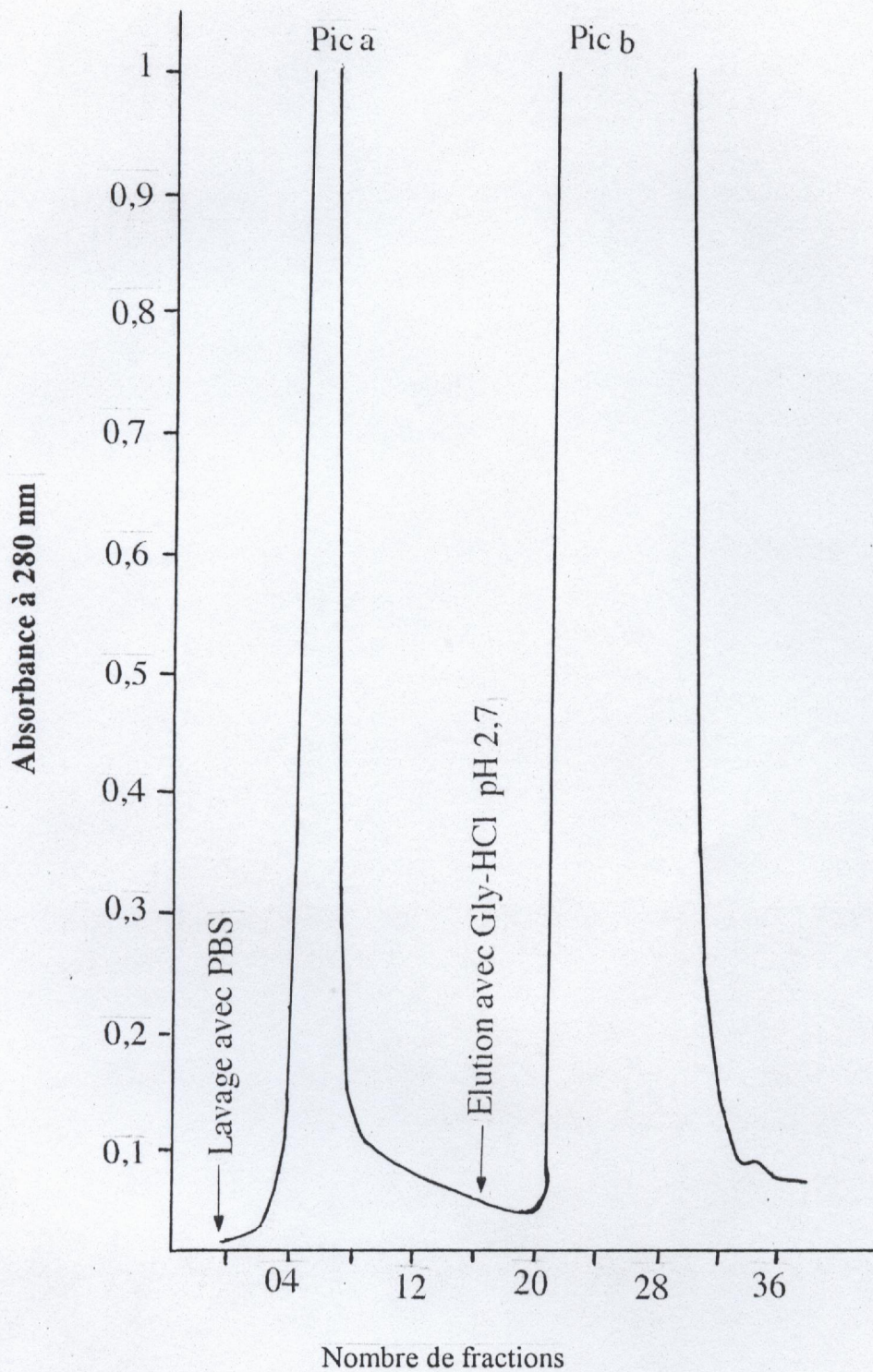


Figure 9 : Profil d'elution des Ig G de la colonne de protéine A- sepharose 4 B d'environ 2 ml (L'efficacité de couplage est estimée à 2,14 mg de protéine A/ ml de sepharose 4 B) avec un débit de 12 ml /h . Le Volume de chaque fraction =1ml .
 Pic a : Fractions récupérées par lavage avec PBS.
 Pic b : Fraction d'IgG éluee avec Gly - HCL(pH 2,7) .

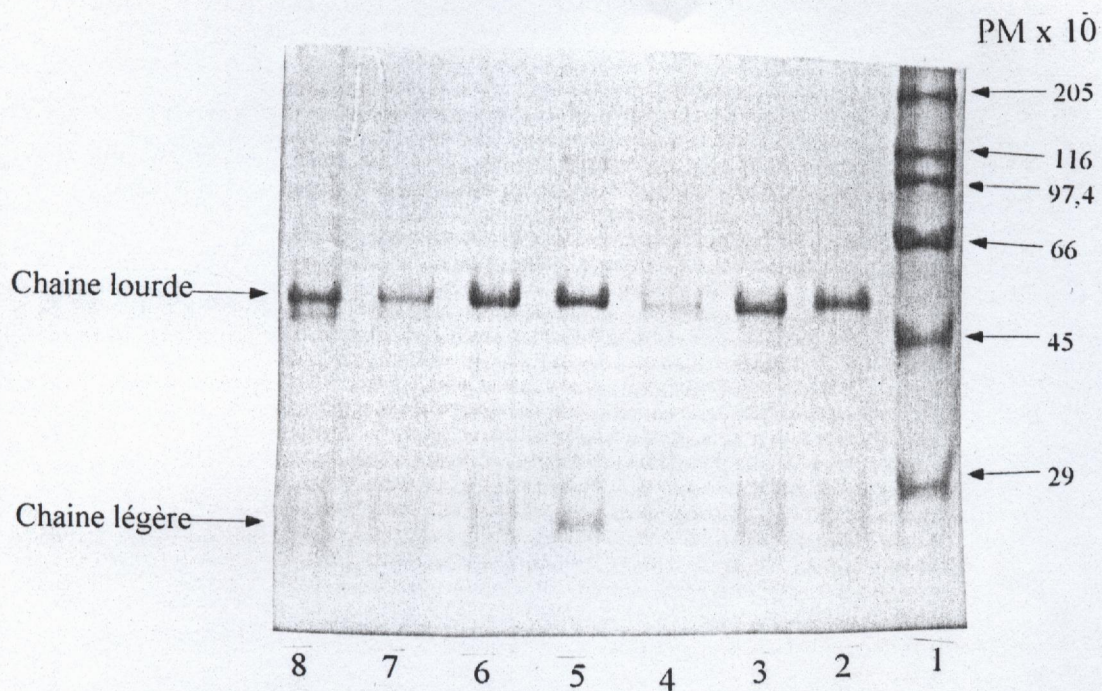


Figure 10 : SDS- Page (10%) en présence de β -mécaptométhanol des IgG isolées du sérum de lapin.

Ligne 1: Protéines Standards.

Ligne 2: Anticorps anti-XOR-b spécifiques.

IgG purifiée sur colonne de protéine A- Sepharose 4B

Ligne 3: IgG du Sérum anti-XOR-b.

Ligne 4: IgG du Sérum Anti-XOR-h.

Ligne 5: IgG du Sérum témoin.

IgG isolée du sérum de la pin par précipitation

Ligne 6: IgG du Sérum anti-XOR-b.

Ligne 7: IgG du Sérum anti-XOR-h.

Ligne 8: IgG du Sérum témoin.

III.2.3- Préparation des anticorps polyclonaux anti XOR-b

La fraction d'IgG, obtenue à partir du sérum anti XOR-b de lapins, est utilisée pour préparer les anticorps polyclonaux anti-XOR-b par immunoaffinité sur colonne de XOR-b-Sephrose 4B. Le taux d'anticorps est de $0,33 \pm 0,6$ mg / ml de sérum (tableau 5)

La fraction d'anticorps anti -XOR-b, éluee en un seul pic symétrique (Fig. 11, Pic b) montre sur SDS- PAGE en présence de β -mercaptoethanol les bandes caractéristiques des chaînes lourdes et légères (Fig.10).

Tableau 5: Préparation des anticorps polyclonaux anti -XOR-b à partir du sérum de lapin immunisé par la XOR-b

Nombres d'essais	Préparation d'IgG du sérum de lapin immunisé par la XOR-b (mg /6ml du sérum)	Quantité d'anticorps polyclonaux anti-XOR-b purifiée (mg / 6ml du sérum)	Rendement
1	36,00	2,75	7,64
2	36,36	2	5,5
3	36,8	1,2	3,26

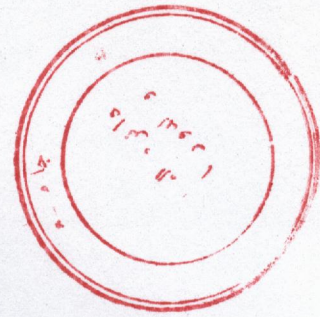
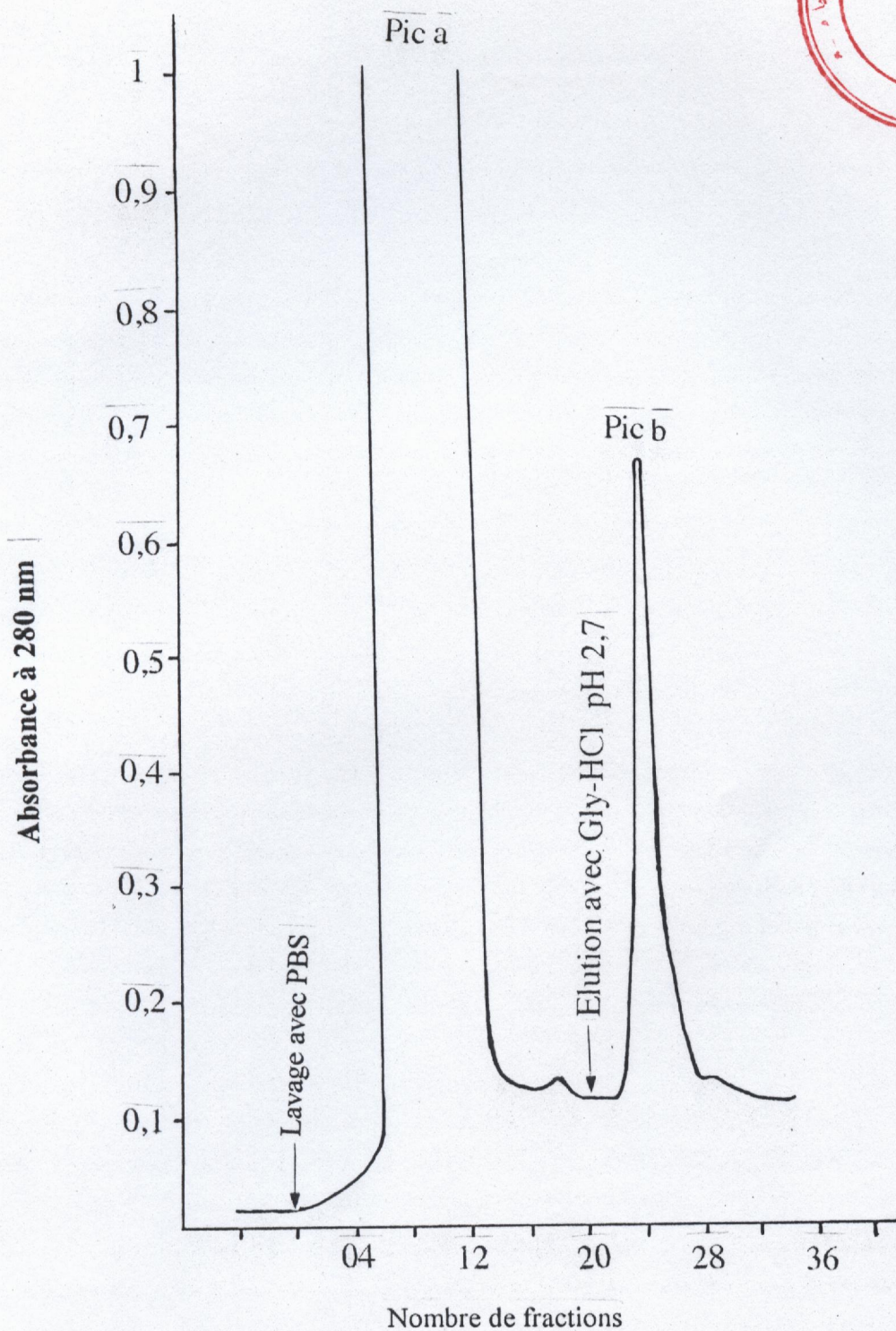
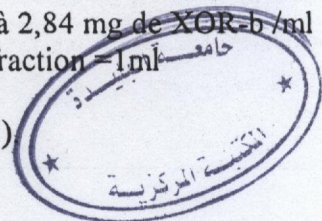


Figure 11 : Profil d'elution des anticorps anti-XOR-b spécifiques de la colonne de XOR -b Sepharose 4 B d'environ 3,5 ml (L'efficacité de couplage estimée à 2,84 mg de XOR-b /ml de sepharose 4B) avec un débit de 12 ml / h . Le volume de chaque fraction = 1ml
 Pic a : Fractions récupérées par lavage avec PBS
 Pic b : Fraction d'anticorps anti-XOR-b éluée avec Gly -HCl (pH 2,7)



III.3- Etude immunochimique de la XOR

III.3.1- Optimisation de la concentration de XOR et des IgG de lapins

Pour déterminer les concentrations optimales de la XOR et des IgG, un titrage des deux composantes fut effectué. Les résultats montrent que les concentrations de 10 et 15 µg/ml sont optimales aussi bien pour la XOR-b que pour la XOR-h (Fig. 12 A et B). Du fait que la sensibilité d'ELISA est meilleure à faible concentration d'antigène adsorbé (Madri et Barwick, 1983), la concentration de 10 µg/ml est choisie pour les tests d'inhibition. La concentration d'anticorps doit être suffisamment faible pour éviter les interférences (Brunner et wachtel, 1988) pour cela les concentrations de 250 ng/ml et de 500ng/ml d'IgG du sérum anti -XOR-b et anti -XOR-h sont respectivement retenues (Fig. 12 A et B).

III. 3.2- ELISA d'inhibition

Dans une série d'expériences utilisant l'essai d'inhibition, la réactivité des IgG, isolées de l'antisérum de lapin par la méthode décrite dans (Matériel et Methode II.2.6.4), contre la XOR native est étudiée. La XOR-b et la XOR-h sont utilisées comme des inhibiteurs, dans la réaction Ac-Ag, des IgG de l'antisérum anti XOR-h et anti- XOR-b. Les IgG sont préincubées avec XOR pendant 2 h à température ambiante avant l'introduction du mélange (IgG-XOR) aux puits contenant la XOR adsorbée.

L'incubation des IgG de sérum anti -XOR -b et anti- XOR-h avec la XOR-b ou La XOR-h à différentes concentrations a montré des effets inhibiteurs (Fig. 13A et B) Pour une même inhibition de 40% de la réactivité d'IgG du serum anti -XOR-b, la concentration de la XOR -h dans la solution (10µg/ml, Fig.13 A) doit être 12 fois plus grande que la XOR-b (0,8 µg/ml; Fig.13 A). Par contre, une même inhibition de 40% des IgG anti-XOR-h est atteinte avec des concentrations proches de XOR-b et XOR-h, 0,8µg/ml et 0,6 µg/ml, respectivement (Fig.13B). La caseine, utilisée comme témoin, entraîne une inhibition inférieure à 9% pour les deux types d' IgG.

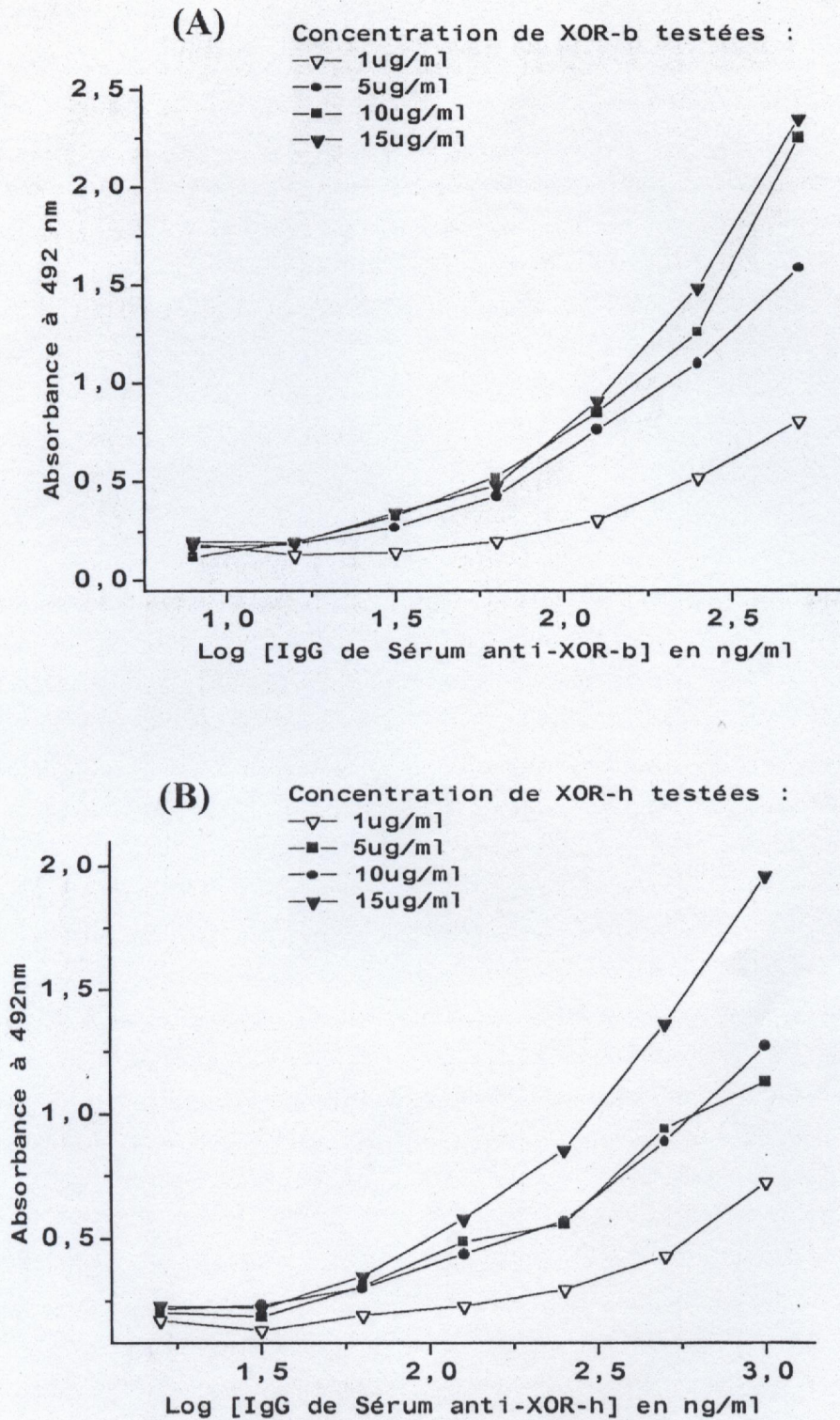


Figure 12 : Les courbes d'optimisation de la concentration d'IgG de l'antisérum et de XOR. Les concentrations des IgG de sérum anti-XOR-b incubées avec différentes concentrations de XOR-b (A) et d'IgG de sérum anti-XOR-h incubées avec différentes concentrations de XOR-h (B).

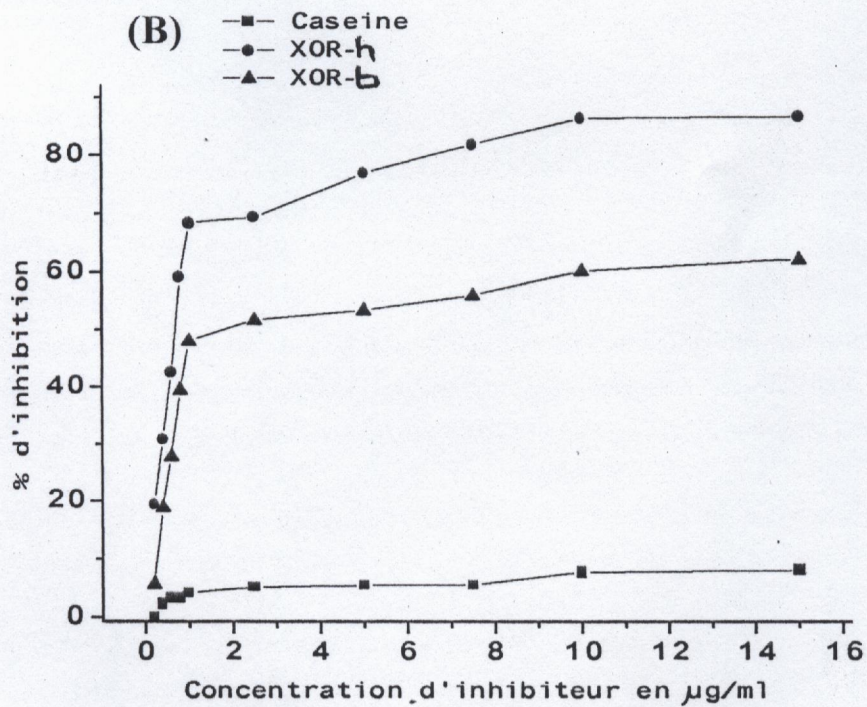
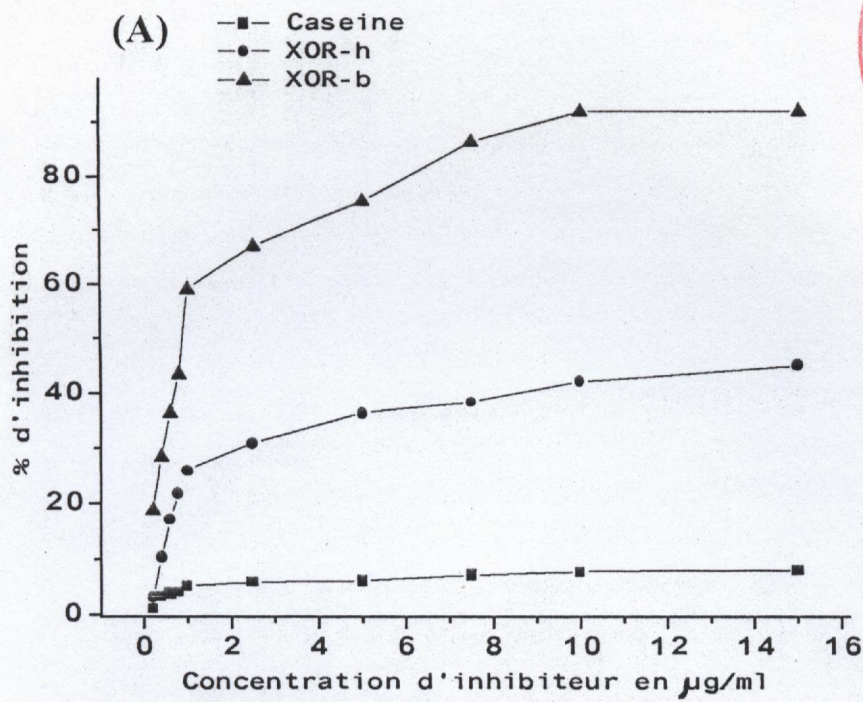


Figure 13: Inhibition de la réactivité d'IgG de sérum anti-XOR-b (A) et d'IgG de sérum anti XOR-h (B) par différentes concentrations de XOR-b, XOR-h et la caseine .

III.4- Effet des d'IgG de lapins sur les activités de la XOR

III.4.1- L'activité xanthine oxydase (xanthine/O₂)

L'activité xanthine oxydase de la XOR-b est partiellement inhibée d'une manière proportionnelle par différentes concentrations d'IgG du sérum de lapin anti-XOR (Tableau 6). La fraction d'IgG du sérum de lapin témoin donne une inhibition de l'ordre de 30% irrespectively de la concentration (Tableau 6). On constate, qu'une inhibition maximale plus de 30% est atteinte avec la même concentration d'IgG du serum anti-XOR-h et anti-XOR-b (4,2mg/ml).

Tableau 6: Pourcentage d'inhibition de l'activité xanthine oxydase de la XOR-b par les IgG de l'antisérum et du sérum témoin de lapin.

Concentration en mg/ml	% d'inhibition de l'activité xanthine oxydase de la XOR-b (moyenne \pm SD; n=3)		
	IgG de Sérum témoin	IgG du Sérum anti -XOR- h	IgG du Sérum anti-XOR-b
0,2	29,13 \pm 2,3	25,92 \pm 2,75	17,36 \pm 3,97
0,8	28,19 \pm 3,67	27,56 \pm 1,28	19,52 \pm 3,96
1,6	27,7 \pm 3,91	27,71 \pm 2,95	22,67 \pm 2,97
3,2	27,57 \pm 0,62	31,36 \pm 2,95	27,37 \pm 2,58
4,2	29,54 \pm 1,47	32,71 \pm 1,57	33,67 \pm 1,51

Les IgG du sérum anti-XOR-h et anti-XOR-b n'ont aucun effet sur l'activité xanthine oxydase de la XOR-h comme le montre le tableau7.

Tableau7: Activité xanthine oxydase de la XOR- h en présence des IgG du sérum anti-XOR-h et anti-XOR-b de lapin. Les IgG du sérum témoin sont utilisées comme témoins

Concentration en mg/ml	Activité xanthine oxydase de la XOR-h (UI/ mg d'enzyme) (moyenne \pm SD; n=2)		
	IgG du Sérum témoin	IgG du Sérum anti -XOR- b	IgG du Sérum anti-XOR-h
0	0,07 \pm 0,002	0,07 \pm 0,002	0,07 \pm 0, 02
0,5	0,072 \pm 0,001	0,074 \pm 0,006	0,068 \pm 0,007
1	0,071 \pm 0,006	0,072 \pm 0,002	0,077 \pm 0,002
1,5	0,072 \pm 0,001	0,072 \pm 0,007	0,082 \pm 0,003
2,5	0,071 \pm 0,001	0,074 \pm 0,006	0,073 \pm 0,009

III.4.2- Activité NADH oxydase (NADH/O₂)

Les IgG du sérum de lapin anti-XOR-h et anti-XOR-b ont inhibé l'activité NADH oxydase de XOR bovine et humaine (Fig.14 A et B). La fraction d'IgG du sérum témoin, utilisée comme témoin, entraîne une inhibition de l'activité NADH oxydase de la XOR-h et la XOR-b inférieure à 20%. Une inhibition maximale plus de 70% et de 40% de l'enzyme bovine est atteinte avec une concentration d'IgG anti-XOR-b (3,2 mg/ml) et anti-XOR-h (4,2mg/ml), respectivement (Fig14 A). De même, une inhibition plus de 50% et de 30% de l'enzyme humaine est également obtenue avec une même concentration d'IgG (2.5 mg/ ml) anti-XOR-h et anti-XOR-b respectivement (Fig.14B)

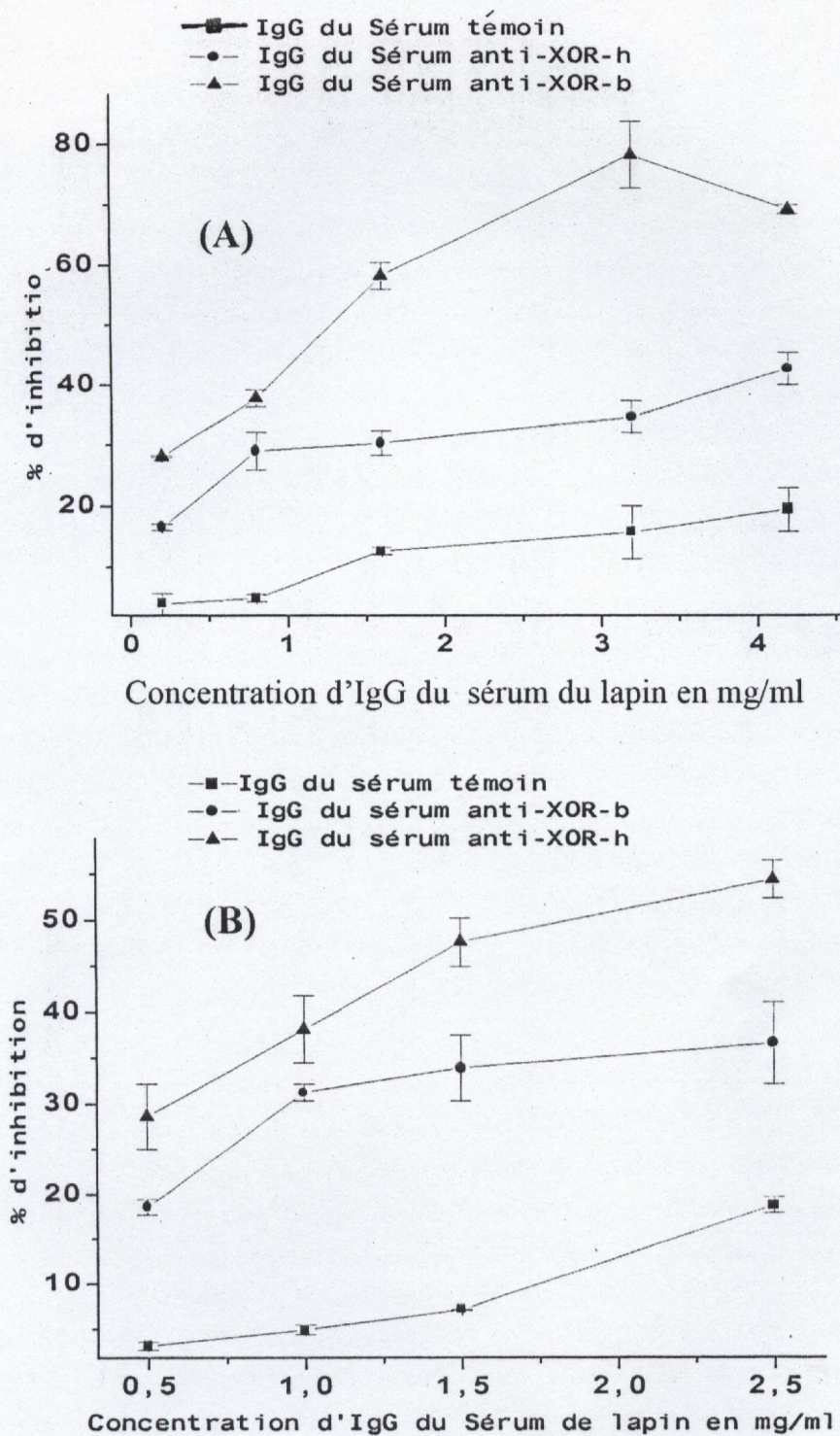


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de l'activité NADH oxydase de la XOR-b (A) et de la XOR-h (B) par les IgG de sérum de lapin anti-XOR-h et anti XOR-b. Les IgG du sérum de lapin non immunisé sont utilisés comme témoins. Chaque point est la moyenne de trois essais réalisés en duplicata (A) et de deux essais réalisés en triplicata (B) \pm standard de déviation (moyenne \pm SD)

III.5-Digestion protéolytique de la XOR

L'analyse de la XOR-b sur SDS -PAGE- après digestion pendant 2, 4 et 20 h par la trypsine a montré l'apparition de quatre bandes majeures de PM d'environ 93, 88, 35 et 6 KDa avec plusieurs bandes mineures (Fig. 15A). On constate, la disparition de la bande de 150KDa après 20 h de digestion, indiquant une digestion totale. Après 2, 4 et 20h de digestion par la chymotrypsine, on observe la disparition de la bande de 150 KDa correspondant à la sous-unité de la XOR-b native et l'apparition de trois bandes majeures de PM d'environ 93, 35 et 6 KDa et des bandes mineures. On note également la disparition des bandes mineures après 20 h de digestion (Fig. 15 B).

On observe après 2 et 4 h de digestion de la XOR-h par la trypsine l'apparition de trois bandes de PM d'environ 93, 35, 4 KDa et une bande de 88 KDa moins apparante (Fig. 16A). La digestion de la XOR-h après 2 et 4h par chymotrypsine a montré sur SDS-PAGE la présence de quatre bandes majeures de PM approximative de 93, 35, 29 et 6 KDa (Fig. 16B).

III.6- Fractionnement des polypeptides issues de la protéolyse de la XOR par gel-filtration

La digestion protéolytique de la XOR-b par la chymotrypsine et la trypsine en fonction du temps d'incubation est presque identique (Fig. 15A et B). De ce fait, la digestion de la XOR-b par la chymotrypsine pendant une courte durée de 2 h est utilisée pour le fractionnement sur Ultrogel type AcA34 de différents polypeptides. Le chromatogramme de fractionnement de la XOR-b protéolysée par la chymotrypsine montre un pic principale (Fig. 17; Pic a) avec deux pics mineurs (Fig. 17; Pic b et c). L'électrophoregramme du pic principal est similaire à celui de la XOR-b protéolysée avant fractionnement (Fig. 18). On note également l'absence de bande protéique après l'analyse de l'état de deux pics mineurs ce qui peut être dû aux faibles quantités de protéines déposées sur gel.

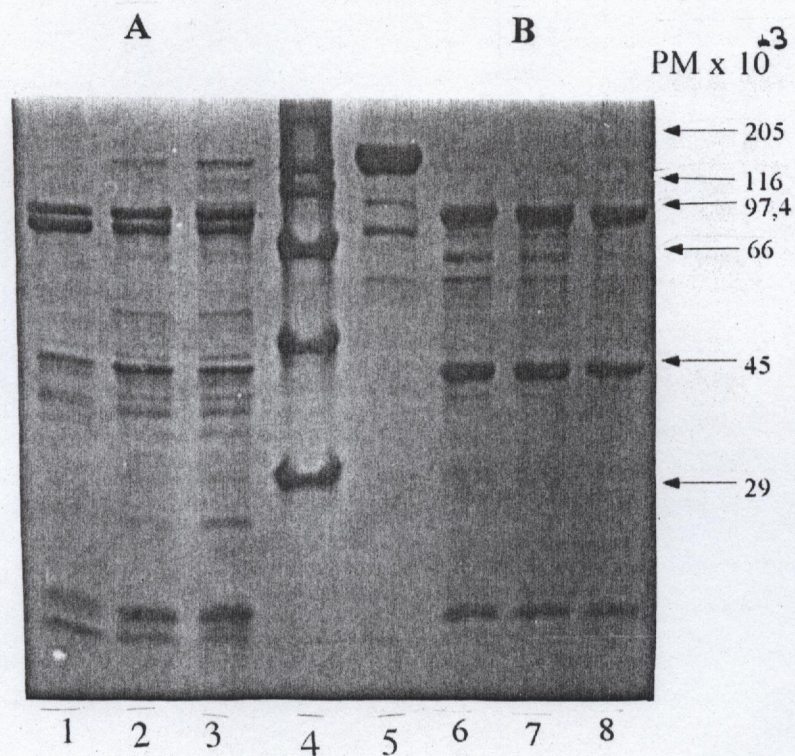


Figure 15 : SDS- PAGE (10%) de la XOR-b après digestion par la trypsine(A) et par la chymotrypsine (B).

Ligne 4: Protéines Standards.

Ligne 5: XOR-b avant digestion.

A

Ligne 3: Après 2h de digestion

Ligne 2: Après 4h de digestion

Ligne 1: Après 20h de digestion

B

Ligne 6: Après 2h de digestion

Ligne 7: Après 4h de digestion

Ligne 8: Après 20h de digestion

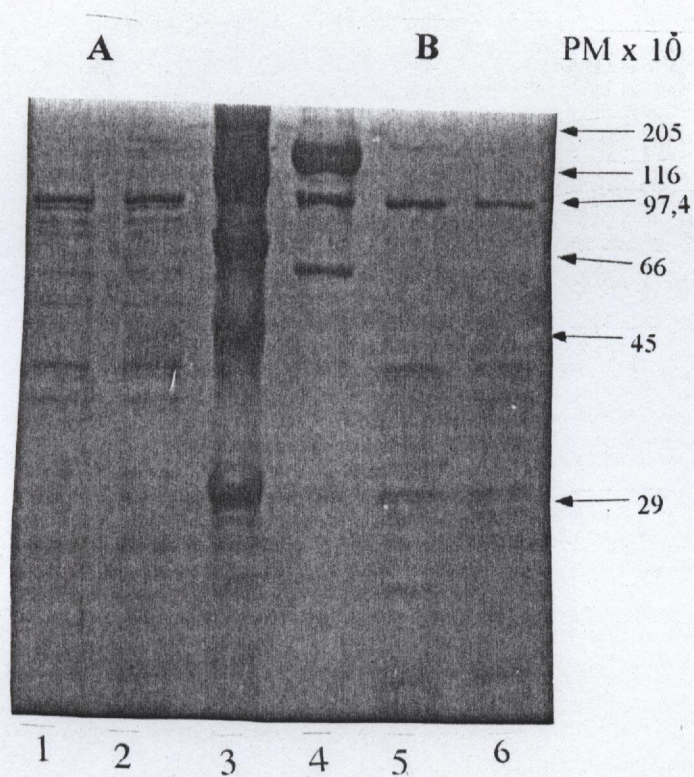


Figure 16 : SDS- PAGE de la XOR-h après la digestion par la trypsine (A) et par chymotrypsine (B).

Ligne 3: Protéines Standards.

Ligne 4: XOR-h avant digestion.

A

Ligne 2: Après 2h de digestion

Ligne 1: Après 4h de digestion

B

Ligne 5: Après 2h de digestion

Ligne 6: Après 4h de digestion

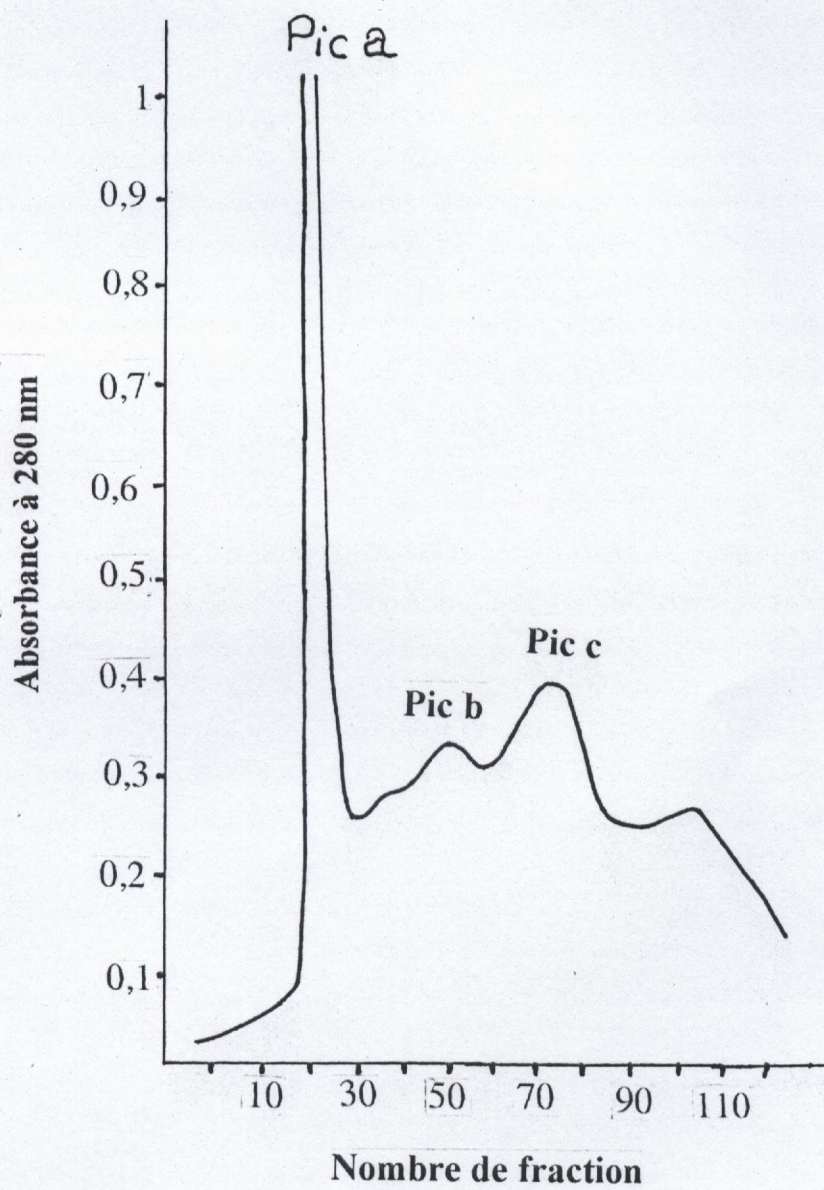


Figure 17 : Profil d'élution de la XOR-b protéolysée pendant 2h par la chymotrypsine (10%) sur Ultrogel AcA34 (28x3cm) avec un débit de 6 ml/h en présence de l'urée (6m). Le volume de chaque fraction = 1ml.

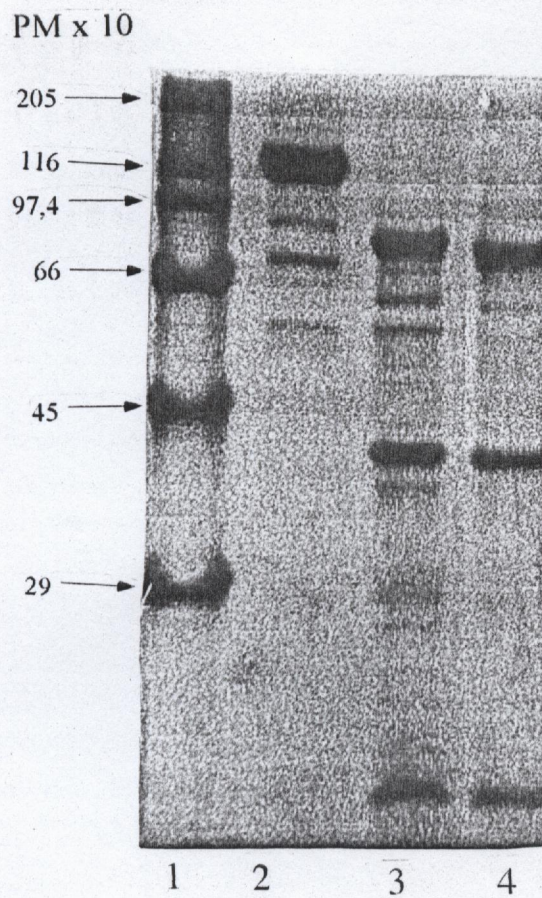


Figure 18 : SDS- PAGE (10%) de la XOR-b protéolysée après fonctionnement sur Ultrogel Ac A 34.

- Ligne 1: Protéines Standards.
- Ligne 2: XOR-b avant digestion
- Ligne 3: XOR-b après 2h de digestion par la chymotrypsine.
- Ligne 4: XOR-b protéolysée après fractionnement.

*Chapitre*IV

Discussion

IV.1- Purification de la XOR du lait bovin et humain

IV.1.1- Purification de la XOR du lait bovin

La XOR du lait est répartie entre la crème et la phase écrémée (Kitchen *et al.*, 1970, Zikakis *et al.*, 1983). Dans notre étude, la méthode de purification adaptée consiste à l'extraction de la XOR de la crème dans laquelle l'enzyme se trouve liée aux membranes des globules gras du lait (Mather *et al.*, 1980 ; Zikakis *et al.*, 1983 ; Benboubetra, 1989). La perturbation de ces membranes par lavage de la crème (Matériel et Méthode II.2.1.1), libère la majorité de la XOR dans la phase aqueuse et par conséquent augmente l'efficacité de la purification. La XOR se libère des globules gras mais reste partiellement liée aux fragments membranaires d'où la nécessité de l'addition du butanol pour libérer l'enzyme.

L'extraction de la XOR de la crème conduit à des pertes dans le lait écrémé. Il faut noter que la purification de la XOR du lait entier par la méthode de Hunt et Massey (1992) augmente le taux des impuretés dans la préparation finale et l'élimination de telles impuretés nécessite une étape supplémentaire de purification par gel-filtration qui diminue le rendement par formation d'agregats de XOR (Powell, 1995 ; Khan, 1995). D'autre part, Zikakis *et al.*(1983) ont développé une méthode de purification qui met en jeu le chauffage du lait de 40 à 45°C et une congélation rapide pour éliminer les caséines. Ces deux étapes conduisent à la dégradation de l'enzyme (Khan, 1995).

La XOR purifiée sur colonne d'héparine-agarose est homogène; la présence principale d'une bande majeure de PM 150 KDa sur SDS-PAGE est en accord avec ce qui a été rapporté dans les autres études (Zikakis et Silver, 1984 ; Cheng *et al.*, 1984 ; Benboubetra, 1989 ; Khan, 1995) et une bande mineure de 80 KDa. Cette dernière peut bien correspondre à un fragment de dégradation et/ou à une protéine contaminante (Resultats III.1.1; Fig. 3). Un deuxième passage sur colonne d'héparine-agarose a amélioré le degré de pureté de l'enzyme en donnant sur SDS-PAGE, une seule bande (Resultats III.1.1; Fig.4) sans aucune variation dans le rapport $A_{280} : A_{450}$. Ce qui laisse supposer que la bande mineure du premier passage est un produit de dégradation de l'enzyme.

Le rapport $A_{280} : A_{450}$ de l'enzyme purifié est similaire à celui des autres préparations obtenues avec la même procédure (Sanders *et al.*, 1997), ou avec d'autres procédures telles que sur chromatographie de folate, un inhibiteur compétitif de la XOR (Nishino *et al.*, 1981), et sur chromatographie de phosphate de calcium (Nakamura et Yamazaki, 1982). Ce rapport est également en concordance avec les préparations de l'enzyme à partir des autres sources tel que le foie de rat (Amaya *et al.*, 1990). Cependant, la XOR purifiée du lait

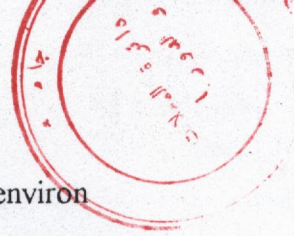
bovin par Zikakis *et al.* (1983) a montré un degré de pureté élevé (RPF= 4.1) avec un faible rendement.

L'efficacité de l'héparine dépend de la qualité de l'extrait brut (Powell, 1995). Ceci ne peut pas expliquer les pertes d'enzyme observées dans les lavages lors de la purification sur l'héparine-agarose (Resultats III.1.1; Tableau 1) car nos extraits sont de bonne qualité (Resultats III.1.1; Tableau1 et Fig 3). De telles pertes peuvent être liées à la ré-utilisation excessive de l'héparine-agarose qui conduit à la réduction de son efficacité (Powell, 1995) ou à une dégradation de l'enzyme donnant des fragments sans affinité pour l'héparine (Fukushima *et al.*, 1995). Malgré les pertes enregistrées, l'héparine reste le moyen le plus adapté pour la purification des grandes quantités de XOR. Sa ré-utilisation et sa conservation sont un grand avantage. Par contre, le phosphate de calcium présente plusieurs inconvénients sur le plan efficacité et capacité (Khan, 1995). De même, la quantité de la XOR purifiée sur gel de folate est également critique (4.5 mg de XOR/ml de gel) (Khan, 1995). Le gel de folate est généralement utilisé pour séparer les formes actives des formes inactives demolybdo (Nishino *et al.*, 1981).

IV.1.2- Purification de la XOR du lait humain

Le lait humain, utilisé dans notre étude, est soumis à plusieurs congélation et décongélation au cours de sa collection et de sa conservation. Comme il a été rapporté, la XOR est liée aux membranes des globules gras avec des liaisons de type hydrophobe relativement faible (Khan, 1995), la congélation et la décongélation peuvent libérer la XOR dans la phase soluble et par conséquent sa teneur dans la crème sera faible. De ce fait, l'étude immunochimique et cinétique de la XOR humaine est faite sur l'enzyme procurée par le laboratoire du Dr. Harrison (Université de Bath, U.K.) dans le cadre d'une collaboration.

La quantité de la XOR récupérée du lait varié de 4,7 à 14,83 mg de XOR /lL du lait. La régulation de l'activité de XOR au niveau moléculaire en fonction de régime alimentaire a été montré chez certains animaux (Kelley et Amy, 1984; Cherry et Amy, 1987). L'activité de XOR augmente pendant les premiers jours de post-partum puis diminue rapidement et reste constante durant la lactation (Zikakis *et al.*, 1983; Brown *et al.*, 1995). L'élévation de l'activité de l'enzyme humaine durant les premiers jours de post-partum a suggéré un rôle physiologique de l'enzyme [Protection bactéricide de l'intestin du nouveau-né (Björck et Claesson, 1979) et / ou une contribution dans l'absorption intestinale du fer alimentaire chez le nouveau-né (Zikakis *et al.*, 1983)].



L'activité spécifique de la XOR-h que nous avons purifiée est d'environ 80.82 ± 10.5 mUI (Resultats III.1.2) qui est 20 fois plus faible que l'activité de la XOR-b que nous avons également purifié (1590.59 ± 657 mUI). La faible activité de la XOR-h *vis-à-vis* de la xanthine par rapport à celle de la XOR-b peut s'expliquer par la présence de l'enzyme humaine en majorité sous forme inactive. Ainsi, il a été établi que plus de 60% de la XOR-b et 98% de la XOR-h sont sous formes inactives (Ventom *et al.*, 1988; Abadeh *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995).

L'enzyme humaine et bovine sous leur forme oxydase ont presque une même activité catalytique *vis-à-vis* du substrat NADH ($0,107 \pm 0,015$ UI /mg et $0,099 \pm 0,006$ UI/mg; n=3 respectivement). L'activité NADH oxydase de la forme O de la XOR-h ($0,107 \pm 0,015$; n=3 UI/mg) est légèrement supérieure à son activité xanthine oxydase ($0,07 \pm 0,01$ UI/mg; n=3). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés (Nakamura et Yamazaki, 1982; Hunt et Massey, 1992; Abadeh *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1997). Il a été rapporté que la forme deshydrogénase de l'enzyme humaine et bovine est catalytiquement plus active *vis-à-vis* du substrat NADH que la forme oxydase (Nakamura et Yamazaki, 1982; Hunt et Massey, 1992; Sanders *et al.*, 1997). Dans notre étude, l'activité NADH oxydase de la forme D des deux enzymes humaine et bovine n'a pas été déterminée néanmoins, les mêmes conclusions mentionnées ci-dessus ont été obtenues par ma collègue (F. Larguet, communication personnelle). L'aptitude de la forme D de produire les RLO *via* la voie NADH oxydase est de grand intérêt en raison de la prédominance de la forme D à l'état physiologique dans la plupart des tissus humains (Hellsten- Westing, 1993; Moriwaki *et al.*, 1996; Sarnesto *et al.*, 1996)

La purification de la XOR-h sur colonne d'héparine-agarose donne une enzyme pure présentant une seule bande sur SDS- PAGE (Resultats III.1.2, Fig.7) correspondant à la sous-unité de l'enzyme native. Le PM estimé à 150KDa est en concordance avec ceux qui ont été publiés (Zikakis *et al.*, 1983; Krenitsky *et al.*, 1986; Abadeh *et al.*, 1992; Moriwaki *et al.*, 1993). La congélation et la décongélation peuvent entraîner la dégradation de l'enzyme (Abadeh *et al.*, 1992; Hellsten-Westing, 1993). L'apparition de deux bandes mineures observées dans l'une des préparations de XOR-h à haute pureté (RPF= 4.18) correspondent plutôt aux fragments de dégradation de l'enzyme et non pas aux impuretés (Resultats III.1.2; Fig. 6).

Il semble que l'héparine a plus d'affinité pour l'enzyme humaine que pour l'enzyme bovine. Un seul passage de la préparation brute de l'enzyme humaine sur colonne

d'héparine-agarose permet d'obtenir un produit pur. Par contre, les impuretés dans la préparation de l'enzyme bovine ne sont éliminées qu'après un deuxième passage sur colonne d'héparine-agarose. De plus les pertes de la XOR-b lors du passage sur colonne d'héparine-agarose sont plus importantes que celles observées dans la préparation de l'enzyme humaine (43% et 30%, respectivement). Les conditions d'élution (force ionique et pH) de l'enzyme humaine et bovine de l'héparine-agarose fournissent une autre évidence de l'affinité élevée de l'héparine pour la XOR-h. L'enzyme humaine est éluée de l'héparine-agarose par un tampon phosphate de sodium de pH 7,4 contenant du NaCl (0,4 M) (Adachi *et al.*, 1992) et l'enzyme bovine est éluée de l'héparine-agarose par un tampon Mes-NaOH de pH 6,0 contenant du NaCl (0,1 M) (Khan, 1995; Sanders *et al.*, 1997). Il est à souligner qu'une fraction de l'enzyme bovine ($1,265 \pm 0,11$ mg/l) est éluée avec une concentration du NaCl de 0,4 M contenant des impuretés (RPF= 7.95 ± 0.65). La nature de l'interaction physico-chimique entre l'héparine et la XOR n'est pas encore claire. Bien que Adachi *et al.* (1993) d'une part et Radi *et al.* (1997) d'autre part ont suggéré une liaison de type électrostatique et que l'héparine agit comme un échangeur de cation par la présence des groupements sulfates anioniques (Fig. 1). Cependant les expériences réalisées avec la XOR humaine et bovine dans les laboratoires du Dr. Harrison (Powell, 1995., Khan, 1995., Benboubetra *et al.*, 1997, Sanders *et al.*, 1997) montrent que l'héparine est plus efficace qu'un échangeur d'ions et que des interactions ioniques contribuent certainement à une liaison d'affinité de la XOR à l'héparine.

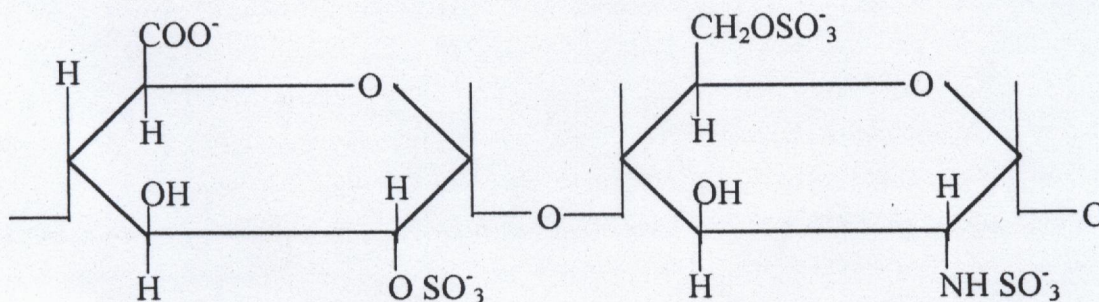


Figure 1: Structure de l'héparine

Dans notre étude, la XOR, purifiée du lait bovin et humain, se trouve en majorité sous forme oxydase réversible (XO). Le DTT, un agent réducteur qui converti la forme oxydase en forme déhydrogénase (Battelli *et al.*, 1972, 1973; Nakumara et Yamazaki, 1982). Le traitement de l'enzyme purifiée par le DTT a donné une conversion d'environ 70%. Le pourcentage de la conversion dans la plupart des préparations est variable (Battelli *et al.*, 1973; Nishino *et al.*, 1981; Nakamura et Yamazaki, 1982; Cheng *et al.*, 1988;

Hunt et Massey, 1992) mais, à notre connaissance aucune étude ne fait référence d'une conversion de 100%. En effet, plus de 10% de l'activité de l'enzyme des préparations traitées par des agents réducteurs sont de type oxydase irréversible (Nishino et Tamura, 1991 ; Hunt et Massey, 1992) dûs probablement à une conversion protéolytique inévitable, par les protéases du lait, au cours de la purification (Nakamura et Yamazaki, 1982 ; Powell, 1995). Après une réduction par le DTT, l'activité deshydrogenase mesurée à 340 nm en présence du NAD⁺ est toujours inférieure à l'activité totale mesurée à 295nm en présence du NAD⁺ et de l'O₂ exprimant la présence d'un pourcentage de la forme O irréversible. Alternativement, l'activité oxydase intrinsèque de la forme D peut être une autre possibilité de la non conversion totale en forme D. Ceci a été déjà montré par l'aptitude de la XDH préparée du coeur de rat (Kaminski *et al.*, 1986), du foie du rat (Saito et Nishino, 1989) et du lait bovin (Hunt et Massey, 1992) d'oxyder la xanthine en présence seulement de l'O₂ avec une vitesse plus faible de celle rapportée pour la XO.

IV.2- Etude immunochimique de la XOR

IV.2.1- L'immunogénicité de la XOR-h et la XOR-b

Le pouvoir immunogène d'une molécule dépend de plusieurs facteurs, souvent interdépendants. La complexité structurale et le poids moléculaire élevée sont particulièrement considérés comme des impératifs pour l'immunogénicité d'une molécule (Bach, 1986; Letonturier, 1994). L'immunisation des lapins par la XOR-h ou la XOR-b a induit une réponse immunitaire élevée dont le titre sérique en anti- XOR-h et anti XOR-b est de 32000 et de 64000, respectivement. Ce resultat confirme la haute immunogénicité due à la complexité de la molécule de XOR (Zikakis *et al.*, 1983; Price, 1997). Même en absence d'adjuvant, des injections de 200 µg de XOR/lapin ont induit des réponses immunitaires satisfaisantes. L'adjuvant retarde la dégradation et l'élimination des antigènes sans modifier leur pouvoir immunogène(Letonturier, 1994). En présence d'adjuvant Alum, Price (1997) a montré des titres élevées en anti- XOR-h et anti- XOR-b chez les lapins.

Dans notre étude, le titre serique en anti-XOR-h après chaque injection temoigne de l'immunogénicité élevée de la XOR-h. Ceci n'est pas en accord avec les travaux de Graham *et al.*(1989) qui ont rapporté une faible ou absence d'immunogénicité de la XOR et que la production d'anticorps anti-XOR-h avec un titre modéré n'est possible qu'après immunisation de lapins par la XOR-h couplée à la Keyhole limpet hemocyanine dans l'adjuvant de Ribi. L'enzyme humaine est moins immunogène que l'enzyme bovine (Resultats

III.2.1; Fig. 8 A et B), ceci peut être dû, à la conservation structurale parmi les espèces. La structure primaire en acide aminé de la XOR-h (Ichida *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994) révèle une homologie de 52% avec la séquence de la XOR de *Drosophila melanogaster* (Keith *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987) et de 91% avec la séquence de XOR du foie de rat (Amaya *et al.*, 1990) et de la souris (Terao *et al.*, 1992). En raison d'une homologie extrêmement élevée entre la XOR-h et de la XOR du foie de la souris, pour produire des anticorps monoclonaux, Hellsten- Westing (1993) a immunisé les souris par la XOR-b et seulement la dernière injection est faite par la XOR-h.

IV.2.2- La relation antigénique entre la XOR-h et la XOR-b

Les IgG du sérum de lapin immunisé par la XOR-h ou la XOR-b sont utilisées dans une étude, par ELISA d'inhibition, de relation antigénique entre les deux enzymes natives. La réactivité des IgG de sérum anti- XOR-h et anti-XOR-b est observée avec les deux enzymes (Resultats III .3.2; Fig.13 A et B). les IgG du sérum anti-XOR-h et anti-XOR-b peuvent différencier entre la XOR-h et la XOR-b, donnant une préférence à leurs antigènes correspondants. Ceci indique qu'une certaine variation antigénique existe entre les deux enzymes. La réactivité de la XOR-b avec les IgG de sérum anti-XOR-h est plus élevée que celle de la XOR-h avec les IgG de serum anti-XOR-b. Ceci est du probablement à la conservation de certains epitopes majeurs (immunodominants) de la XOR-h par la XOR-b. Contrairement, les détereminants antigéniques (immunodominants) de la XOR-b ne sont pas conservés dans la XOR-h d'ou une homologie partielle entre les deux molecules (XOR-b et XOR-h). Ce resultat est en effet d'interpretation difficile en raison de l'hétérogénéité des anticorps contenus dans la fraction d'IgG de l'antisérum polyclonal du lapin.

La réactivité des anticorps anti-XOR-h du sérum humain avec la XOR-b a été rapportée par plusieurs études (Bruder *et al.*, 1984; Harrison *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 1990; Benboubetra *et al.*, 1997). Aucune de ces études ne fait référence d'une réactivité similaire des anticorps anti-XOR-h du sérum humain avec l'enzyme humaine et bovine. Contrairement, Price (1997) a montré que les anticorps de lapin anti-XOR-h réagissent d'une manière similaire avec la XOR-h et la XOR-b, par contre la réactivité des anticorps de lapin anti-XOR-b est plus élevée avec la XOR-b qu'avec la XOR-h. Dans le même contexte, Bruder *et al.*(1984) ont montré que les anticorps anti-XOR-b du sérum bovin ne reconnaissent pas la XOR-h et que les anticorps anti-XOR-b produits chez les cobayes, immunisés par la XOR-b, ont une cross-réactivité avec l'enzyme humaine.

L'apparenté immunologique entre la XOR-h et la XOR-b ne peut pas être confirmée par l'étude de la réactivité des anticorps anti-XOR présents naturellement dans le sérum humain. A présent, l'origine de tels anticorps n'est pas encore clair, ils peuvent être dus à une réponse immunitaire provoqué par l'enzyme endogène ou exogène ou les deux à la fois (Schoutsen et Dejong, 1984; Bruder *et al.* 1984; Ng *et al.*, 1990; Lewis et Ng, 1991). Recemment, Benboubetra *et al.* (1997) ont montré que les anticorps anti-XOR présents dans le sérum des sujets normaux ne sont pas exclusivement des anticorps anti-XOR-h, seulement que le taux d'anticorps anti-XOR-h est significivement élevé que celui d'anticorps anti-XOR-b. Il semble que l'apparenté immunologique entre l'enzyme humaine et bovine est relativement importante. Il a été rapporté que les anticorps monoclonaux spécifiques pour la XOR-h ou la XOR-b réagissent avec les deux enzymes (Hellsten- Westing, 1993; Khan, 1995). Jusqu'à présent, aucun anticorps monoclonal anti-XOR en nombre de sept produits par Dr. Benboubetra à l'université de Bath (Angleterre) n'a une réaction selective. Bien que Pr. Bulkley (Baltimore, USA), nous a confirmé d'avoir un anticorps monoclonal sélectif pour la XOR-h (communication personnelle)

La réactivité des anticorps anti-XOR-h du sérum humain avec la XOR du lait humain indique une conservation antigénique de la XOR à l'intérieur de la même espèce (Abadeh, *et al.* 1993; Benboubetra *et al.*, 1997). La réactivité des anticorps anti-XOR-h ou anti XOR-b avec la XOR-h et la XOR-b indique une conservation immunologique interespèce de la XOR. (Bruder *et al.*, 1984; Harrison *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 1990; Price, 1997).

IV.3- Effet des IgG de lapins sur l'activité de la XOR

Le rôle fonctionnel des anticorps anti-XOR présents dans le sérum des sujets normaux et des patients n'est pas encore clair (Bruder *et al.*, 1984; Harrison *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 1990.). Cependant, vu la capacité de l'enzyme circulante de produire les RLO impliqués dans les réactions inflammatoires aiguës et chroniques, il est concevable que de tels anticorps peuvent avoir un rôle dans son élimination. Ainsi, l'effet des IgG du sérum de lapin immunisé par la XOR sur l'activité de l'enzyme fut étudiée. Aucun effet sur l'activité xanthine oxydase de l'enzyme humaine n'a été enregistré (Resultats III.4.1; Tableau 7). En comparaison avec les IgG du sérum de lapin non immunisé, les IgG du sérum de lapin immunisé sont sans effet sur l'activité xanthine oxydase de la XOR-b (Resultats III.4.1; Tableau 6). On peut donc suggérer que les sites antigéniques de la XOR ne font pas partie du centre actif molybdoptérine. L'inhibition d'environ 30% observée dans le cas de la XOR-b peut être le résultat d'un encombrement moléculaire entre les IgG et la XOR-b. Nos

resultats ne sont pas en accord avec ceux rapportés par Ulmann *et al.* (1962) ou les Ig_s de l'antisérum de lapin ont entraîné une inhibition plus de 70% de l'activité xanthine oxydase de la XOR. Benboubetra *et al.* (1997) ont montré que les anticorps anti-XOR-h du sérum humain normal entraînent une inhibition partielle de 20 à 30% de l'activité xanthine oxydase de la XOR-h et de la XOR-b.

Contrairement à leur effet sur l'activité xanthine oxydase, les IgG de l'antisérum de lapin entraîne une inhibition importante de l'activité NADH oxydase de l'enzyme humaine et bovine (Resultats III.4.2; Fig. 14 AetB). Les IgG anti-XOR-h et anti-XOR-b ont entraîné des inhibitions plus de 50% et 30% de l'activité NADH oxydase de la XOR-h respectivement et plus de 40% et 70% de l'activité NADH oxydase de la XOR-b respectivement. Il s'agit donc d'une inhibition spécifique résultante d'une interaction entre la XOR et ses anticorps. En effet même en absence d'un blocage stérique du centre FAD de l'enzyme par les anticorps, les changements conformationnels aux environs du FAD induits lors de l'interaction de la XOR avec ses anticorps sont suffisants pour changer le potentiel redox du FAD et par conséquent la perte de l'affinité pour le substrat NADH. Il a été démontré que les changements conformationnels aux environs du FAD induits lors de la conversion de la XDH en XO, sont responsables du changement du potentiel redox du FAD et par conséquent la perte de l'activité deshydrogenase (Massey *et al.*, 1989 ; Saito *et al.*, 1989; Hunt *et al.*, 1993). Nos resultats sont en accord avec ceux rapportés par Benboubetra *et al.* (1997) qui ont montré une inhibition moins de 60% de l'activité NADH oxydase de deux enzymes la XOR-h et la XOR-b par les anticorps anti-XOR- h de sérum humain normal.

La XOR du lait humain est plus active avec le substrat NADH qu'avec le substrat xanthine (Sanders *et al.*, 1997). Donc si la XOR des autres tissus humains possède la même propriété catalytique de XOR du lait, cette enzyme sera une source potentielle de production des RLO par l'activité NADH oxydase. Bien que, actuellement, peu est connu sur les propriétés de la XOR tissulaire, les activités pour les substrats physiologique, hypoxanthine et xanthine, sont généralement faibles (Parks et Granger, 1986; Dejong *et al.*, 1990; Sarnesto *et al.*, 1996), suggerant une identité catalytique avec la XOR du lait. La XOR du foie et de l'intestin, sources de la XOR circulante (Coty *et al.*, 1990; Yokoyama *et al.*, 1990; Kooij *et al.*, 1994; Neilsen *et al.*, 1994; 1995; 1996), diffère de la XOR des autres tissus par son activité relativement importante pour la xanthine identique à celle de XOR purifiée du lait bovin et du foie de rat (Krenitsky *et al.*, 1986; Parks et Granger, 1986., Sarnesto *et al.*, 1996). L'activité NADH oxydase de la XOR-b est similaire à

celle de la XOR du lait humain (Sanders *et al.*, 1997) et que les formes deshydrogenases de la XOR-h et de la XOR-b sont catalytiquement plus actives avec le substrat NADH que les formes oxydases (Nakamura et Yamazaki, 1982; Hunt et Massey, 1992; Sanders *et al.*, 1997).

Lors de l'ischémie, le taux du NADH augmente de 5 à 6 fois de sa valeur normale (1µM) (Williamson, 1966, Battelli *et al.*, 1992). A la reperfusion, la forme D produit des quantités considérables de RLO sans conversion en forme O (Figure 2).

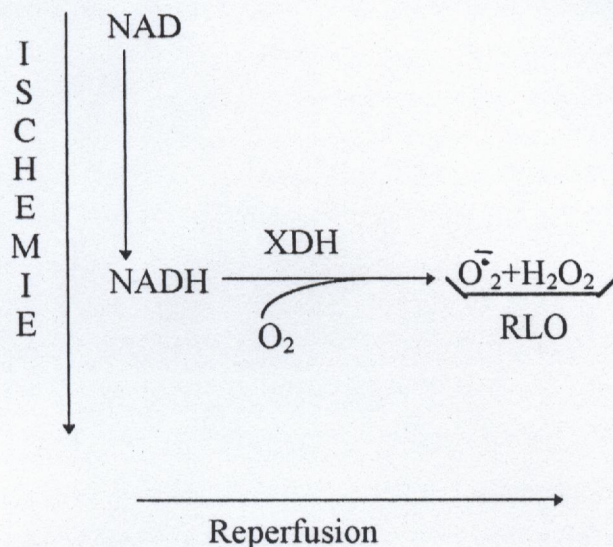


Figure 2: Mécanisme de la production des EOR par la XDH au cours de l'ischémie-reperfusion (D'après Harrison et Benboubetra, 1997).

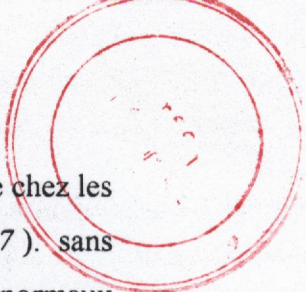
A l'état physiologique, l'activité de la XOR dans le sang humain est à la limite de détectable (Parks et Granger, 1986 b; Yamamoto *et al.*, 1996) et l'augmentation de son activité dans le sang est rapportée d'être d'origine tissulaire (Friedl *et al.*, 1991; Tan *et al.* 1995; Nielson *et al.*, 1996; Novak *et al.*, 1996). L'élévation de l'activité NADH oxydase dans le plasma des rhumatoïdes (Jawed *et al.*, 1997) a fourni une évidence de la contribution de la XOR tissulaire dans la production des RLO *via* la voie NADH oxydase (Harrison et Benboubetra, 1997; Blake *et al.*, 1997). La forme O à l'état physiologique représente 10-20% de l'activité totale de la XOR tissulaire (Parks *et al.*, 1988; Nishino et Tamuro, 1991). Le temps de conversion de la XDH en XO d'une part et l'augmentation de l'activité de la XO observé lors de l'ischémie sont sujets d'un grand débat. Les études préliminaires sur les animaux ont rapporté l'élévation de l'activité XO après 3 h d'ischémie jusqu'à 61% dans les intestins grêles (Parks *et al.*, 1988) et à 50% dans le foie de rat (Engerson *et al.*, 1987). Elle atteint 50 % de conversion après 4 h de l'ischémie régionale

du coeur de rat (Engerson *et al.*, 1987) et 100 % après 5min de l'ischémie globale du coeur de rat (Downey *et al.*, 1988). D'autre part, Thompson- Gorman et Zweier (1990) ont rapporté une diminution dans le rapport XDH/ XO après 30 min d'ischémie globale du coeur de rat sans aucune augmentation de l'activité oxydase. Contrairement, Terada *et al.*, (1992) d'une part et Poss *et al.*(1996) d'autre part ont montré qu'une exposition hypoxique prolongée entraîne une augmentation des deux activités (XDH et XO) sans alteration du rapport XDH/ XO. Recemment, il a été rapporté que l'ischémie n'a aucun effet sur la conversion de la XDH en XO et que l'ischémie induit seulement la liberation de la XOR dans la circulation (Yokoyama *et al.*, 1990; Kooij *et al.*, 1994). L'augmentation de l'activité de XO dans le sang après ischémie-reperfusion a été rapporté par plusieurs études (Coty *et al.*, 1990; Neilson *et al.*, 1994, 1995, 1996; Sangstad *et al.*, 1996).

La XOR humaine diffère de celle des autres mammifères par sa présence en majorité sous des formes inactives demolybdo ou de sulfo (Abadeh *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995). De plus il a été rapporté que l'activité NADH oxydase de la forme O est relativement faible par rapport à la forme D (Nakamura et Yamazaki, 1982; Hunt et Massey, 1992; Sanders *et al.*, 1997). La production des radicaux oxygénés par la forme O *in vivo* necessite d'autres études. Comme la génération des RLO par la forme physiologique (la forme deshydrogenase) en oxydant le NADH est plus evident que par la forme pathologique (la forme oxydase) soit en oxydant la xanthine ou le NADH, donc l'inhibition de l'activité NADH oxydase par les anticorps peut contribuer de façon efficace a la réduction des lésions tissulaires post-ischémiques.

Recemment, il a été rapporté que presque la moitié des anticorps humain anti-XOR sont sous forme de complexe immuns (Ng et Lewis, 1994; Benboubetra *et al.*, 1997). Ce qui peut expliquer la faible activité de la XOR circulante à l'état normal (Yamamoto *et al.*, 1996; Sarnesto *et al.*, 1996). Par ailleurs, la présence de tels complexes peut attribuer aux anticorps anti-XOR un rôle immunologique protecteur dans l'élimination de la XOR sérique par une clairance physiologique normale (Neg et Lewis, 1994; Benboubetra *et al.*, 1997).

La XOR endogène peut être liberée dans la circulation durant le renouvellement physiologique ou traumatique des cellules (Bruder *et al.*, 1984; Ng *et al.*, 1990; Lewis et Ng, 1991). La présence des anticorps anti-XOR de type IgM dans le sérum humain normal (Lewis et Ng, 1991; Benboubetra *et al.*, 1997) et dans le sérum des patients à maladies cardiovasculaires (Harrison *et al.*, 1990) et que le taux d'IgM anti-XOR-h est plus élevé que le taux d'IgM anti-XOR-b (Benboubetra *et al.*, 1997) supporte l'hypothèse de la liberation de la XOR endogène dans la circulation. Dans ce cas, le système immunitaire peut acquies une



certaine tolérance pour la XOR. Ainsi, l'élévation significative de la XOR circulante chez les sujets rhumatoïdes (Miesel et Zuber, 1993; Blake *et al.*, 1997; Jawed *et al.*; 1997). sans aucune différence dans le taux d'anticorps anti-XOR par rapport aux sujets normaux (Abadeh, 1993) supporte l'hypothèse précédente. Le rôle protecteur des anticorps anti-XOR peut être efficace durant l'état physiologique mais pas à l'état pathologique responsable de l'augmentation de l'activité XOR circulante (Grum *et al.*, 1987; Friedl *et al.*, 1989; Neilson *et al.*, 1994; 1996; Saugstad *et al.*, 1996.).

IV.4- Digestion protéolytique de la XOR

La trypsine (10 %, P/P) clive la XOR-h et XOR-b en 4 fragments de PM d'environ 93; 88; 35 et 4 KDa et 93, 88, 35, et 6KDa respectivement. La chymotrypsine (10 %, P/P), à son tour, clive la XOR-h et la XOR-b en fragments de PM d'environ 93; 35, 29 et 6 KDa et 93; 35 et 6 KDa, respectivement (Resultats III.5; Fig. 15 et 16). Nos resultats sont, en majorité, en accord avec ceux rapportés par les études de Cheng *et al.*, (1988) qui ont montré que la digestion de la XOR-b par la trypsine et la chymotrypsines (20 %, P/P), pendant 4h, libère 3 polypeptides de PM approximative 85-100; 30-35; 18-20 KDa et de Amaya *et al.*(1990) ou l'effet de la trypsine sur la XOR du foie de rat (4 %, P/P) pendant 20h, a fragmenté l'enzyme de rat en 3 polypeptides de PM approximative 80, 40 et 20 KDa. L'apparition des fragments de 4 et 6 KDa dans nos préparations humaine et bovine protéolysées n'a pas été rapportée. La concordance de nos resultats avec ceux de Amaya *et al.*(1990) confirme les données sur la conservation des sites de clivage spécifique à l'action de la trypsine sur la XOR-h et la XOR du rat. De même, Ichida *et al.* (1993) ont montré que les résidus lys¹⁸⁵ et lys⁵⁵² dans la sequence de XOR-h correspondent aux sites de clivage, de la XOR du rat, par la trypsine.

Dans l'étude de Powell (1995), le clivage de la XOR-h et de la XOR-b par la trypsine (1 %, P/P) pendant 1h d'incubation à 37°C, libère un seul fragment de 130 KDa; l'action de la chymotrypsine sur l'enzyme humaine et bovine (10 %, P/P) donne un polypeptide de PM d'environ 80 KDa avec plusieurs peptides de faible PM. Nos resultats et ceux publiés (Cheng *et al* 1988; Amaya *et al.*, 1990) ne sont pas en accord avec les resultats de Powell. Ceci peut s'expliquer par la courte durée de la protéolyse et la faible concentration de la trypsine de 1% (P/P).

Dans notre étude, l'augmentation du temps d'incubation de l'enzyme bovine avec les deux protéases, au delà de 2 h n'a aucun effet majeur sur la dégradation de l'enzyme. Contrairement à nos résultats, Sato *et al.*(1995) ont montré que le clivage de la XDH du

foie de poulet, par subtilisine (10%, P/P), pendant 3 h, libère 3 fragments de 20; 37 et 80 KDa et la disparition du fragment de 80 KDa avec apparition de 2 polypeptides de 24; et 59 KDa après 24 h de digestion.

Nos résultats montrent que les fragments issus de la protéolyse de la XOR-h avec la trypsine et la chymotrypsine sont en majorité identiques à ceux dérivés de la digestion de la XOR-b par ces deux protéases. Ces résultats confirment la conservation des sites de clivage spécifiques à la trypsine et la chymotrypsine dans la XOR-humaine et bovine et par conséquent, une structure primaire probablement proche.

IV.5- Fractionnement des polypeptides issus de la protéolyse de la XOR par gel- filtration

Sous les conditions dénaturantes (urée 6M), les polypeptides dérivés de la protéolyse de la XOR-b par la chymotrypsine pendant 2 h (Résultats III.5; Fig.15) sont élués ensemble (Résultats III.6; Fig.17). L'analyse de l'éluat sur SDS - PAGE révèle 3 bandes dont les PM sont identiques à ceux des fragments de l'enzyme bovine protéolysée non fractionnée (Résultats III.6; Fig.18).

La migration électrophorétique de l'enzyme bovine protéolysée sur gel en conditions non dénaturantes est identique à celle de l'enzyme native (Nagler et Vartanyan, 1976; Zikakis et Silver, 1984; Cheng *et al.*; 1988; Nishino et Nishino, 1988). Donc la séparation nette des polypeptides issus de la protéolyse de la XOR-b et XOR-h sur SDS -PAGE n'est probablement pas le résultat des protéases mais plutôt du SDS. Malgré la présence de l'urée 6M, la séparation sur Ultrogel AcA34, de différents polypeptides n'a pas été possible. Le résultat obtenu est similaire à celui rapporté dans l'étude de Amaya *et al.* (1990) où la XOR de foie de rat protéolysée par la trypsine est éluee, dans les conditions non dénaturantes, en un seul pic identique à l'enzyme native. Cheng *et al.* (1988) ont rapporté une seule bande sur gel polyacrylamide, en présence de l'urée 6M et β -mercaptoéthanol, de la XOR-b protéolysée par la trypsine, chymotrypsine, plasmine, pancréatine et papaine (20% P/P) et que la séparation de différents fragments de l'enzyme protéolysée n'est observée qu'en présence du SDS. Pour séparer les différents fragments Amaya *et al.* (1990) ont d'abord traité l'enzyme de rat par le chlorure de guanidine et la séparation en HPLC n'est effectuée qu'en présence de SDS (0,1 %,P/V).

Nos résultats confirment l'hypothèse que les protéases induisent seulement des ruptures au sein de la XOR sans la dissocier en différents polypeptides. La dissociation n'est possible qu'en présence d'un agent dénaturant puissant le SDS (Nagler et Vartanyan, 1976;

Nishino et Nishino, 1988; Cheng *et al.*, 1988; Amaya *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1995). Le SDS, un agent dénaturant anionique a la propriété de rompre les liaisons hydrophobes et entrainer la séparation des proteines oligometriques en leurs sous- unités constitutives par contre, l'urée a la propriete de rompre les liaisons d'hydrogènes (Scopes, 1983). Nos resultats sont en concordance avec ceux de la litterature indiquant que la XOR est de nature hydrophobe et par conséquent sa resistance au traitement protéolytique même en présence de certains dénaturants tel que l'urée (Nagler et Vartanyan, 1976; Cheng *et al.*, 1988; Amaya *et al.*, 1990; Nishino, 1994).



Chapitre V

Conclusion

La méthode de purification décrite dans notre étude nous permet d'obtenir de grande quantité de XOR à partir du lait bovin frais ($8,71 \pm 1,765 \text{ mg/L}$) et humain congelé ($6,41 \pm 1,08 \text{ mg/L}$) de haute pureté. La XOR-h et la XOR-b sont purifiées sous leurs formes native présentant une seule bande de 150 KDa sur SDS-PAGE avec une activité spécifique, pour le substrat xanthine, de $1,59 \pm 0,3287 \text{ UI/mg}$ et de $0,08 \pm 0,01 \text{ UI/mg}$ respectivement. L'activité spécifique de xanthine oxydase de l'enzyme bovine est 20 fois supérieure à celle de l'enzyme humaine par contre, l'activité spécifique NADH oxydase de la XOR-h et de la XOR-b est similaire ($0,107 \pm 0,0154 \text{ UI/mg}$ et $0,099 \pm 0,006 \text{ UI/mg}$, respectivement). Ceci confirme la présence de l'enzyme humaine en majorité sous formes inactives demolybdo et/ou desulfo (Abadeh et al, 1992 Brown et al., 1995).

Des lapins ont été immunisés par la XOR-h et la XOR-b et le titre sérique en anticorps déterminé par ELISA indirecte révèle que ces deux enzymes sont hautement immunogène. Les IgG du sérum de lapin anti-XOR-h et anti-XOR-b réagissent avec les deux enzymes (XOR-h et XOR-b). Cette réaction croisée témoigne la présence d'une certaine homologie structurale entre la XOR-h et la XOR-b néanmoins, une certaine variation antigénique entre les deux enzymes est révélée par la réaction élevée des IgG du sérum de lapin anti-XOR-h et anti-XOR-b avec leurs antigènes correspondants. Cette communauté antigénique entre l'enzyme humaine et bovine suggère une certaine identité dans l'organisation structurale spatiale des deux enzymes.

A présent, le rôle fonctionnel et l'origine des anticorps anti-XOR présents dans le sérum humain normal n'est pas encore clair. Dans notre étude, l'activité NADH oxydase de la XOR-h et de la XOR-b est inhibée par les IgG du sérum de lapin anti-XOR-h et anti-XOR-b par contre, ces IgG sont sans effet sur l'activité xanthine oxydase des deux enzymes. Ceci peut probablement être dû à la localisation de la quasi totalité des déterminants antigéniques de la XOR dans la région du centre FAD. Il faut rappeler que dans l'étude de Benboubetra et al.(1997), les anticorps anti-XOR du sérum humain normal ont inhibé les deux activités xanthine et NADH oxydase des deux enzymes par environ 30 et 60% respectivement. Pour mieux définir le rôle fonctionnel des anticorps anti-XOR présents soit naturellement dans le sérum humain ou produits chez les animaux, il serait plus évident d'étudier directement l'effet de ces anticorps sur l'activité de la XOR circulante en relation à des pathologies humaines.

Vu l'hydrophobicité de la XOR, les fragments issus de la protéolyse de la XOR n'ont pas été séparés même en présence de l'urée. Cette propriété augmente l'interaction des fragments entre eux et par conséquent leur dissociations nécessitera un traitement par un dénaturant puissant tel que le SDS ayant l'aptitude de rompre les liaisons hydrophobes.

Bibliographie

Abadeh, S., Killackey, J., Benboubetra, M. and Harrison, R. (1992). Purification and partial characterization of xanthine oxidase from human milk. *Biochem. 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. and Harrison, R. (1993). Purification of xanthine oxidase from human heart. *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 99S

Adachi, T., Fukushima, T., Usami, Y. and Hirano, K. (1993). Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial cell surface. *Biochem. J.* **289**: 523-527

Adkison, D., Hollwarth, M.E., Benoit, J.N., Parks, D.A., McCord, J.M. and Granger, D.N. (1986). Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* **548**: 101-107

Allen, R.E., Outhwalte, J.M., Morris, C.J. and Blake, D.R. (1987). Xanthine oxidoreductase is present in human synovium. *Ann. Rheum. Dis.* **46**: 843-845.

Amaya, Y., Yamazaki, K-I., Sato, M., Noda, K., Nishino, T. and Nishino, T. (1990). Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J. Biol. Chem.* **265**: 14170-14176.

Angermuller, S., Bruder, G., Volkl, A., Wesch, H. and Fahimi, D. (1987). Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes: a cyto-chemical and biochemical study. *Eur. J. Cell. Biol.* **45**: 137-144.

Avis, P.G., Bergel, F. and Bray, R.C. (1956). Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Estimations of the cofactors and the catalytic activities of enzyme fractions from cow's milk. *J. Chem. Soc.* **227**: 1100 -1105

Bach, J-F. (1986). *Immunologie*. Flammarion Medecine-Sciences (Ed.), Paris, pp. 101-127

Battelli, M.G., Della Corte, E. and Stirpe, F. (1972). Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochem.J.* **126**: 747-749

Battelli, M.G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. (1973). Milk xanthine oxidase type D (Dehydrogenase) and type O (oxidase). *Biochem. J.* **131**: 191-198.

Battelli, M.G., Abbondoza, A. and Stirpe, F. (1992). Effets of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes: conversion form D to form O and Leakage from cells. *Chem. Biol. Interactions.* **83**: 73-84.

Benboubetra, M., (1989). Characterization and significance of human antibodies to bovine milk fat globule membrane. Ph.D. Thesis. University of Bath, U.K.

Benboubetra, M. Gleeson, A., Harris, C.P.D., Khan, J., Arrar, L., Brennand, D., Reid, J., Reckless, J.D. and Harisson, R. (1997). Circulating anti- (xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**: 1-9

Biemond, P., Swoack, A.J.C., Beindorff, C.M. and Koster, J.F. (1986). Superoxide-dependent and independent mechanisms of iron mobilization from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem. J.* **239**: 169-173

Björck, L. and Claesson, O. (1979). Xanthine oxidase as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase system in milk. *J. Dairy. Sci.* **62**: 1211-1215.

Blake, D. R., Stevens, C.R., Sahinoglu, T. , Ellis, G., Gaffney, K., Edmonds, S., Benboubetra, M., Harrison, R., Jawed, S. Kanczler, J., Millar, T. M., Winyard, P.G. and Zhang, Z. (1997). Xanthine oxidase: four roles for the enzyme in rheumatoid pathology *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 812-816.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brass, C.A., Narciso, J. and Gollan, J.L.** (1991). Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver regulation and pathophysiologic significance. *J. Clin. Invest.* **87**:424-431
- Bray, R.C.** (1975). Molybdenum iron: sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In: *The enzyme* (edited by Boyer, P.D.) 3rd ed., vol.12, pp 299-419. New York: Academic press
- Brown, A-M., Benboubetra, M., Ellison, M., Powell, D., Reckless, J.D. and Harrison, R.**(1995). Molecular activation - deactivation of xanthine oxidase in human milk. *Biochim. Biophys. Acta* .**1245** :248-254.
- Bruder, G., Heid, H., Jarash, E-D., Keenan, T.W. and Mather, I.H.** (1982). Characteristics of membrane bound and soluble forms of xanthine oxidase from milk and endothelial cells of capillaries. *Biochem. Biophys. Acta.* **701**: 357-369.
- Bruder, G., Heid., Jarash, E-D. and Mather, I.H.** (1983). Immunological identification and determination of xanthine oxidase in cells and tissues. *Differentiation.* **23.** 218-225.
- Bruder, G., Jarash, E-D. and Heid, W.** (1984). High concentrations of antibodies to xanthine oxidase in human and animal sera molecular characterization. *Am. soc. clin. Invest . Inc.* **74**: 783-794.
- Brunner, M. and Wachtel, S.S.**(1988) . Two new ELISA using monoclonal H-Y antibody . *J. Immunol. Methods* **106**: 49-55.
- Bulkley, G.B.** (1987). Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *Br. J. Cancer.* **55** (Suppl. III): 66-73.
- Burton, L.K., Velasco, S.E., Patt, A., Terada, L.S. and Repine J.E.** (1995). Xanthine oxidase contributes to lung leak in rats subjected to skin burn. *Inflammation.* **19**: 31-38.

Carr, C.J., Talbot, J.M. and Fisher, K.D. (1975). A review of the significance of bovine milk xanthine oxidase in etiology of atherosclerosis. Food and drug administration, Bethesda, Md., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 1-65

Caty, M.G., Schmeling, D.J., Friedl, H.P., Oldham, K.T., Guice, K.S. and Till, G.O. (1990). Histamine: a promoter of xanthine oxidase activity in intestinal ischemia-reperfusion. *J. Pediat. Surg.* **25**: 218-223

Chambers, D.J., Parks, D.A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J.M., Yoshida, S., Parmley, L.F. and Downey, J.M. (1985). Xanthine oxidase as source of radical damage in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **17**:145-152

Chambers, D.J., Takahashi, A., Humphrey, S.M., Harvey, D.M. and Hearse, D.J. (1992). Allopurinol-enhanced myocardial protection does not involve xanthine oxidase inhibition or purine salvage. *Basic. Res. Cardiol.* **87**: 227-238.

Chapeville, F. et Clauser, H. (1974). *Biochimie*. Hermann (Ed.), Paris. pp 105-218

Cheng, S.G., Ursula, K. and Brunner, J.R. (1988). Characteristics of purified cows' milk xanthine oxidase and its submolecular characteristic. *J. Dairy. Sci.* **71**: 901-916

Cherry, D. M. and Amy, N.K (1987). Effects of dietary protein and iron on the fractional turnover rate of rat liver xanthine oxidase. *J.Nutr.* **117** :2054-2060.

Clavel, J.P., Emerit, J. and Thuillier, A. (1985). Lipidoperoxydation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et pathologie. *Path. Biol.*, **33** :61-69.

Clifford, A.J., Ho, C.Y. and Swenerton, H. (1983). Homogenized bovine milk xanthine oxidase: a critique of the hypothesis relating to plasmalogen depletion and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **38**: 327-332

Coudray, C., Charlon, V. Deleiris, J. and Favier, A. (1994). Xanthine oxidase and oxidant enzym activities and glutathione content in infarct rat heart. *Biochem. Arch.* **10**: 79-86

- Das, D.K., Engelman, R.M., Clement, R. Otani, H., Prasad, M.R. and Rao, P.S. (1987). Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **184**: 314-319
- Davies, D.F., Davies, J.R. and Richards, M.A. (1969). Antibodies to reconstituted dried cow's milk protein in coronary heart disease. *J. Atheroscler. Res.* **9**: 103-107
- Davies, D.F., Rees, B.W.G. Johnson, A.P., Elwood, P.C. and Abernethy, M. (1974). Food antibodies and myocardial infarction. *Lancet.* **1**: 1012-1014
- Davies, D.F., Rees, B.W.G. and Davies, P.T.G. (1980). Cow's milk antibodies and coronary heart disease. *Lancet.* **1**: 190-191
- Deeth, H.C. (1983). Homogenized milk and atherosclerotic disease: a review. *J. Dairy. Sci.* **160**: 477-482
- De Jong, J.W., Vander Meer, P., Nieukoop, A.S., Huizer, T., Stroeve, R.J. and Bos, E. (1990). Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species including humans. *Circ. Res.* **67**: 770-773
- Della Corte E. and Stirpe, F. (1968). The regulation of rat liver xanthine oxidase : Activation by proteolytic enzymes. *FEBS lett.* **2**: 83-84.
- Della Corte, E. and Stirpe, F. (1972.) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.*, **126**: 739-745
- Dixon, M. and Thurlow, S. (1924). Studies on xanthine oxidase. I. Preparation and properties of the active material. *Biochem. J.* **18**: 971-975
- Downey, J.M., Hearse, D.J. and Yellon, D.M. (1988). The role of xanthine oxidase during myocardial ischemia in several species including man. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20** (Suppl. II): 55-63.

Engerson, T.D., Mckelvey, T.G. Rhyne, D. B., Boggio, E.B., Snyder, S.J. and Jones, H.P. (1987). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J. Clin. Invest.* **79**: 1564 -1570.

Engvall, E. (1980). EnzymeImmuno-assay ELISA and EMIT. In: H.V. Vunakis and J.J. Langone (Eds.), *Methods Enzymol.*, Vol. 10, Immunochemical Techniques Part A. Academic Press, New York, p. 419.

Frederiks, W.M., Marx, F. and Kooij. A. (1993). The effect of ischaemia on xanthine oxidase activity in rat intestine and liver. *Int. J. Exp. Path.* **74**: 21-26.

Frederiks, W.M. and Bosch, K.S. (1995). The role of xanthine oxidase in ischemia reperfusion damage of rat liver. *Histol. histopathol.* **10**:111-116.

Friedl, H.P, Till, G.O., Trentz, O. and Ward, P.A. (1989). Roles of histamine, Complement and xanthine Oxidase in thermal injury of skin. *Am. J. Pathol.* **135**: 203-217.

Friedl, H.P., Guerra, E.E., Cramer, T., Giachero, D. Toledo-Pereyra, L.H. and Till, G.O. (1990). Histamine and xanthine oxidase in hepatic ischemia- reperfusion injury. *Transplantation proceedings.* **22**: 513-515.

Friedl, H.P., Smith, D.J., Till, G.O., Thomson, P.D., Louis, D.S. and Ward, P.A. (1991). Ischemia - reperfusion in humans appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Path.* **136**: 491-495.

Fukushima, T., Adachi, T. and Hirano, K. (1995). The heparine- binding site of human xanthine oxidase. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 156-158.

Furth-Walker, D and Amy, N.K. (1987). regulation of xanthine oxidase activity and immunologically detectableproteine in rats in reponse to dietary and iron. *J. Nutr.* **117**: 1697-1703.

Giler, S.H., Sperting, H.O., Brosk, S., Urca, I. and Devries, A.(1975). Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clin. Chim. Acta.* **63**: 37-40.

- Goding, J. (1978). Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol.* **20**: 241-253.
- Grabar, P. (1983). Autoantibodies and physiological role of immunoglobulins. *Immunol. Today.* **4**: 337-340.
- Graham, K., Fleming, J.E., Young, R. and Bensch, K.G. (1989). Preparation of antibodies against xanthine oxidase from human milk. *Int.J.Biochem.* **21**: 715-722
- Granger, D.N., Rutili, G and McCord, J.M. (1981). Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* **90**: 22-29.
- Granger, D.N., McCord, J.M., Parks, D.A. and Hollwarth, M.E. (1986). Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology.* **90**: 80-84.
- Granger, D.N. (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. physiol.* **255** (Heart circ. physiol. 24) H 1269- H 1275.
- Green, E.L. and Paller, M.S. (1992). Xanthine oxidase Produces O_2^- in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am.J. Physiol.* **263** (Renal fluid electrocyte physiol. 32): F251-F255.
- Grishman, M.B., Hernandez, L.A. and Granger, D.N. (1986). Xanthine oxidase and neutrophil in filtration in intestinal ischemia. *Am. J. physiol.* **251** (Gastrointest. liver. 14): G 567- G 574.
- Grishman, M.B., and Granger, D.N. (1988). Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig. dis. sci.* **33**: 65-145.
- Grum, C.M., Ragsdale, R.A., Ketai, L.H. and Simon, R.H. (1987 a). Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J. Crit care.* **2**: 22-26.
- Grum, C.M., Ketai, L.H., Myers, C.L. and Schlafer, M. (1987b). Purine efflux after cardiac ischemia: relevance to allopurinol cardioprotection. *Am. J. physiol.* **255** (Heart crit. physiol. 24) H 368- H373.

Grum, C.M., Gallagher, K.P., Kirsh, M.M. and shlafer, M. (1989). Absence of detectable xanthine oxidase in human myocardium. *J. Cell. Cardiol.* **21**: 263-267.

Grum, C.M.,(1993). Tissue oxygenation in low flow states and during hypoxemia. *Crit. Care. Med.* **21**: S44 - S49.

Harrison, R., Benboubetra, M., Bryson, S Tomas, R. D. and El wood,. P.C. (1990). Antibodies to xanthine oxidase: elevated levels in patients with acute myocardial infarction. *CardioScience.* **1**: 183-189.

Harrison, R., Benboubetra, M.(1997). Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 786- 790.

Hart, L.I., Megartoll, M.A., Chapman, H.R. and Bray, R.C. (1970). The composition of milk xanthine oxidase. *Biochem. J.* **116**: 851-864.

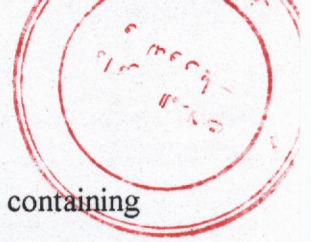
Hellsten- Westing, Y. (1993). Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. *Histochemistry.* **100**: 215-222.

Hernandez, L.A., Grisham, M.B., Twohig, B., Arfors, K.E., Harlan, J.M. and Granger, D.N. (1987). Role of neutrophils in ischemia- reperfusion- induced microvascular injury. *Am. J. Physiol.* **253** (Heart circ. Physiol. 22): H 699- H703.

Hille, R., and Massey , V. (1981). Studies on the oxidative half- reaction of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **256**: 9090-9095.

Hille, R., Fee, J.A. and Massey , V. (1981). Equilibrium properties of xanthine oxidase containing FAD analogs of varying oxidation- reduction potential. *J. Biol. chem.* **256**: 8933-8940.

Hille, R., and Massey , V. (1985). Molybdenum- containing hydroxylases: Xanthine oxidase, Aldehyde oxidase and sulfite oxidase. in: *Molybdenum enzymes* (edited by Spiro, T.G.). Vol. 7, pp. 443-518. Wiley Interscience publishing New York.



Hille, R., and Massey, V. (1991). The Kinetic behavior of xanthine oxidase containing chemically Modified flavins. *J. Biol. Chem.* **226**: 17401-17408.

Hille, R., and Anderson, R.F. (1991). Electron transfer in milk xanthine oxidase as studied by pulse radiolysis. *J. Biol. chem.* **266**: 5608- 5616.

Hunt, J. and Massey, V. (1992). Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase. *J. Biol. chem.* **267**: 21479- 21485.

Hunt, J., Massey, V., Dunham, W.R. and Sunders, R.H. (1993). Redox potentiels of milk xanthine dehydrogenase. Room temperature measurement of the FAD and 2 Fe / 2 S centre potentiels. *J. Biol. Chem.* **268**: 18685-18688

Ichida, K., Amaya, Y., Nada, k., Minoshina, S., Hosoya, T., Osamu, S., Shimizu, N. and Nishino, T. (1993). Cloning of the CDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase) structural analysis of the protein and chromosal location of the gene. *Gene.* **100**: 279- 284.

Ichikawa, M., Nischino T., Nishino, I. and Ichikawa, A. (1992). Subcellular localization xanthine oxidase in rat hepatocytes: high resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis. *J. Histochem. Cytochem.* **40**: 1097-1103.

Itoh, R. Nishino, T., Usami, C. and Tsushima, K. (1978). Immunochemical study of the changes in children liver xanthine dehydrogenase activity during dietary adaptation. *J. Biochem.* **84**: 19-26.

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

Jarasch, E.D., Bruder, G. and Heid, H. W. (1986). Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **548**: 39-46.

Kooij, A., M., Frediriks, W. M., VanNoorden, DC.J.F. and James, J.(1992 a). Distribution of xanthine oxidoreductase in human tissue. A histochemical and biochemical study. *Virchows Arch [B] cell Path.* **63**: 17-23.

Kooij, A., Bosh, K.S., Frediriks, W.M. and VanNoorden, C.J.F. (1992 b). High levels of xanthine oxidoreductase in rat endothelial, epithelial and connective tissue cells. A relation between localization and function? *Virchows Archiv. [B] cell pathol.* **62**: 143-150.

Kooij, A., Shiller H.J., Schijns, M., Van Noorden, and Frediriks, W.M. C.J.F. (1994). Conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia *Hepatology.* **19**: 1488-1495.

Krenitsky, T.A and Tuttle, J.V., Cattau, Jr. EL. and Wang, P.A. (1974). Comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase: *Comp. Biochem. physiol.* **49B**: 687-703.

Krenitsky, T.A. Tuttle, J.V. (1978). Xanthine oxidase activites: Evidence for two catalytically different types. *Arch. Biochem. Biophys.* **85**: 370-375.

Kurose, I. and Granger, D. N. (1994). Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion- induced microvascular dysfunction. *Ann. N Y. Acad. Sci.* **723**: 158-179.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**: 680-685.

Lee, C.S, curtis,D., McCrron, M.,love,c.,Gray,M.,Bender,W.and chavnick, A..(1987), Mutation affecting expression of the rosy locus in drosophila melanoguster. *Genetics.* **116**:55-66

Letonturier, P. (1994). *Immunologie général.* Masson (Ed.), Paris, Milan ,Barcelan,pp:16-28.

Lewis, W.H.P. and N ,Y.L.E. (1991). Human xanthine oxidase antibody levels: variation between males and females in chinese and europeans. *Med .Lab.Sci.* **48**: 84-838.

Macart ,M. and Gerbaut, L.(1982). An improvement of the coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins: application to cerebrospinal fluid. *clin. chim. acta.* **122**:93-101.

Macart, M., Gerbaut, L. et Henocque, G .(1986). Le dosage des proteins urinaires par le réactif au bleu de coomassie dodecyl sulfate de sodium. Adaptation au koné progress cobas bio et ABA100. *Revue français des laboratoires.* **152**:77-81.

Madri, J.A.and Barwick, K.W.(1983). Use of avidin- biotin complex in an ELISA system : a quantitative comparison with two other immunoperoxidase dection systems using keratin antisera. *Methods Lab. Invest.* **48**:98-102.

Martinez- Cayuela, M. (1995). oxygen free radicals and human disease. *Biochemie.* **77**: 147 -161.

Massey, V., Brumby P.E., Komai, H. and Palmer, G. (1969). Studies on milk xanthine oxidase: Some spectral and Kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **244**: 1682-1691.

Massey, V., and Edmondson, D. (1970). On the mecanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.* **245**: 6595-6598.

Massey, V., Schopfer, L.M. and Nishino, T. and 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**: 10567-10573.

Mather, I.H., Tanplin, C.B.and Irving, M.G.(1980). Separation of the proteins of bovine milk-fat-globule menbrane bay electrofocucing with retention of enzymatic and immunological activity. *Eur.J. biochen.* **110**:327.336.

McCord J.M. (1985). Oxygen- derived free raduculs in post ischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* **312**: 159-163.

McCord J.M. (1987). Oxygen- derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.* **46**, 2402-2406.

McCord J.M. (1988). Free radicals and myocardial ischemia: Overview and out look. *Free Rad. Biol. Med.* **4**: 9-14.

Mchale, A., Grimes, H. and Coughlan, M.P.(1979). Human serum xanthine oxidase: fluoremetric assay applicable to the investigation of liver disorders. *Int. J; Biochem.* **10**: 317-319.

Miesel, R. and Zuber, M. (1993). Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and auto-immune rheumatic diseases. *Inflammation.*, **17**: 551-561.

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., Tokahashi, S., Agbedona, O.E., Hada, T. and Higashino, K. (1993). purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* **1164**: 327-330.

Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Yamaguchi, m., Yamatita, J., Takahashi, S. and Higashino, K. (1996). Immunohistochemical localisation of xanthine-oxidase in human tissues. *Acta. Histochem. Cytochem.* **29**: 153-162.

Nagler, L.G . and Vartanyan, L.S. (1976). Subunit structure of bovine milk xanthine oxidase. effect of limited cleavage of proteolytic enzymes on activity and structure. *Biochem. Biophys. Acta.* **427**: 78-90.

Nakamura, M. and Yamazaki, I. (1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as a dehydrogenase form. *J. Biochem.* **92**. 1279-1286.

Ng, Y.L.E., Lewis, W.H.P. and Chui, S.H. (1990). Enzyme linked immunosorbent assay for determination of antibodies to xanthine oxidase. *Med. Lab. Sci.* **47**: 30-35.

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

Nichols, M.B. and Low, P.S. (1986). The redox centers of xanthine oxidase are on independent structural domains of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**: 488-497

Nielsen, V.G., Weinbroun, A., Tan, S., Samuelson, P.N. Gelman, S. and Parks, D.A. (1994). Xanthine oxidoreductase release after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits. *J. thorac. Cardiovasc. Surg.* **107**: 1222-1227.

Nielsen, V.G., McCammon, A.T., Tan, S., Kirk, K.A., Samuelson, P.N. and Parks, D.A. (1995). Xanthine oxidase inactivation attenuates postocclusion shock after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits. *J. thorac. Cardiovasc. Surg.* **110**: 715-722.

Nielsen, V.G., Tan, S., Weinbroun, A., Mc Common, A.T. Samuelson, P.N. Gelman, S. and Parks, D.A. (1996). Lung injury after hepatoenteric ischemia reperfusion. Role of xanthine oxidase. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **154**: 1364-1369.

Nishino, T., Nishino, T. and Tsushima, K. (1981). Purification of highly active milk xanthine oxidase by affinity chromatography on Sepharose 4 B folate gel. *FEBS lett.* **131**:369-372.

Nishino, T., Nishino, T. (1989). Reactivity of chicken liver xanthine dehydrogenase containing modified flavins. *J. Biol. chem.* **264**: 6075-6085.

Nishino, T. and Tamuran, I. (1991). The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme and reperfusion injury. In: *Purine and pyrimidine metabolism in man VII, part A.* (edited by Harkness, R.A., Elion, G.B., Zöllner, N.). New York: Plenum press. pp 327-333.

Nishino, T., Amaya, Y., Noda, K. and Nishino, T. (1991). Cysteine residues responsible for dehydrogenase-oxidase conversion of rat liver xanthine dehydrogenase. In: *Flavins and flavoproteins.* (edited by Cruti, B., Ronchi, S. and Zanetti, G.), Water de gruyter, Berlin. pp. 703-706.

- 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
- Novak, L., Stipek, S. and Novakova, J. (1996). Circulating xanthine oxidase as a mediator of toxic liver-injury. *Chemicke listy*, **90**: 752-755.
- Ohora, Y., Peterson, T.E. and Harrison, D.G. (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* **91**: 2546-2551.
- Olson, J.S., Ballou, D.P., Palmer, G. and Massey, V. (1974). The mechanism of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **249**: 4363-4382.
- Oster, K., Oster, J.B. and Ross, D.J. (1974). Immune response to bovine xanthine oxidase in atherosclerotic patients. *Am. Lab.* **6**: 41-47.
- Palluy, O., Morliere, L., Gris, J.C., Bonne, C. and Modat, G. (1992). Hypoxial reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 21-30.
- Partridge, C.A., Blamenslock, F.A. and Asrar, B.M. (1992). Pulmonary microvascular endothelial cells constitutively release xanthine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**: 184-187.
- Parks, D.A. and Granger, D.N., Bulkley, G.B., and Shah, A.K. (1985). Serine protease inhibitor attenuates ischemic injury in the feline small intestine. *Gastroenterology*. **89**: 6-12.
- Parks, D.A. and Granger, D.N. (1986a). Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am. J. Physiol.* **250** (Gastro-intest. Liver physiol. 13): G 749-G753.
- Parks, D.A. and Granger, D.N. (1986b). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and Physiology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **548**: 87-99

Parks, D.A., Williams, T.K. and Beckman, J.S. (1988). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: reevaluation. *Am.J.Physiol.* **254** (Gastrointest. Liver physiol 17): G768-G774.

Peterson, D.A., Kelly, B, Gerrard, J.M. (1986). Allopurinol can act as an electron transfer agent. Is this relevant during reperfusion injury? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 76-79

Poss, W. B., Huecksteadt, T.P., Freeman, B.A. and Hoidal, J.R. (1996). Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *Am. J. Physiol.* **270** (Lung cell.mol.physiol.14):L941-L946.

Powell, D. (1995). Purification, Characterisation and regulation of human xanthine oxidase. Ph. D. Thesis. University of bath. U.K.

Price, L. (1997). Generation, of anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies and their application to the quantification and purification of the mammalian enzyme. Ph. D. Thesis. University of bath, N.K

Radi, R., Rubbo, H., Bush, K. and Freeman, B.A. (1997). Xanthine oxidase binding to glycoaminoglycans: Kinetics and superoxide dismutase interactions immobilized xanthine oxidase-heparin complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**: 125-135.

Rajagopalan, K.V. and Johnson, J.L. (1992). The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.* **267**: 10199-10202

Ramboer, C., Piessen, F. and DeGroot, J. (1972). Serum xanthine oxidase and liver disease. *Digestion.* **7**: 183-195.

Rzucidlo, S. J. and Zikakis, J.P. (1990). Absorption of enzymatically active ¹²⁵I-labeled bovine milk xanthine oxidase fed to rabbits. *J. Agric. Food. Chem.* **38**: 1227-1232.

Saito, T. (1987). The properties of sulfhydryl groups involved in the interconversion between the NAD^+ - dependent and O_2 - dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase. *Yokoyama. Med. Bull.* **38**: 151-168.

Saito, T., Nishino, T. and Massey, V. (1989). Differences in environment of FAD between NAD^+ - dependent and O_2 - dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase shown by active site probe study. *J. Biol. Chem.* **264**: 15930- 15935.

Saito, T. and Nishino, T. (1989). Differences in redox and kinetic properties between NAD^+ - dependent and O_2 - dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**: 10015-10022

Sandalio, L.M., Fernandez, V.M., Ruperez, F.L. and DelRio, L.A. (1988). Superoxide free radicals are produced in glyoxomes. *Plant. Physiol.* **87**: 1-4.

Sanders, S.A., Eisenthal, R. and Harrison, R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase generation of superoxide anion. *FEBS. Eur.J. Biochem.* **245**: 541- 548.

Sarnesto, A., Linder, N. and Raivio, K.B. (1996). Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase xanthine oxidase protein. *Lab. Invest.* **74** : 48-56

Sato, A., Nishino, T., Noda, K., Amaya, Y. and Nishino, T. (1995). the structure of chicken liver xanthine dehydrogenase. DNA cloning and the domain structure. *J. Biol. Chem.* **270**: 2818-2826.

Saugstad, O.D. (1996). Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia-reoxygenation injury. *pediatrics*, **98**: 103-107.

Schouten, B. and DeJong, J.W. (1984). Xanthine oxidase in rabbit plasma after application of a bovine milk preparation to small intestine. *Arch. Int. Physiol. Biochem* **92**: 379-384.

Schreck, R., Rieber, P. and Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\alpha\beta$ transcription factor and HIV-1. *EMBO. J.* **10** : 2247-2258

Scopes, R. K. (1987). *Protein purification: Principles and practice* (edited by Cantor, C. R.), New York, pp. 167-170.

Smith, S. M., Grisham, M.B., Mancini, E.A., Granger, D.N. and Kvietys, P.R. (1987). Gastric mucosal injury in rat: role of iron and xanthine oxidase. *Gastroenterology.* **92**: 950-960.

Smith, J. K., Grisham, M.B., Granger, D.N. and Korthuis, R.J. (1989). Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in post ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **256** (Heart circ. physiol. 25): H789-H793.

Stirpe, F. and Della Corte, E. (1969). The regulation of rat liver xanthine oxidase: Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **214**: 3855-3863.

Sussman, M.S. and Bulkley, G.B. (1990). Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods Enzymol.* **186**: 711-723.

Tan, S., Yokoyama, Y., Dickens, E., Cash, T.G., Freeman, B.A., and Parks, D.A. (1993). xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Rad. Biol Med.* **15**: 407-414.

Tan, S., Gelman, S., Wheat, J.K., and Parks, D.A. (1995). Circulating Xanthine-Oxidase in human ischemia-reperfusion. *South. Med J.* **88**: 479-482.

Tavenier, M., Benboubetra, M., Vander Kwast, T. H., Harrison, R., Sharma, H.S. and Willem deJong, J. (1997). Immuno histochemical evidence for xanthine oxidase in human myocardium. *J. Immunohistochem.* In press.

Terada, L/S., Guidot, D.M. Leff, J.A., Willingham, IR., Hanley, M.E., Piermattei, D. and Repine, J.E.(1992). Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 3362-3366.

Terao, M., Cazzaniga, G., Ghezzi, P., Bianchi, M., Falciani, F., Perani, P. and Garattini, E. (1992). Molecular cloning of a cDNA Coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. Regulation of its transcript by interferons in vivo. *Biochem. J.* **283**: 863- 870.

Thompson- Gorman, S.L. and Zweier, J.L. (1990). Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **265**: 6656- 6663.

Till, G. O., Friedel, H. P. and Ward, P. A. (1991). Lung injury and complement activation: role of neutrophils and xanthine oxidase. *Free Rad. Biol. Med.* **10**: 379-386

Topham, R.W., Walker, M.C. and Calisch, M.P. (1982a). Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilisation. *Biochem. Biophys Res. Comm.*, **109**: 1240-1246.

Topham, R.W., Walker, M.C., Calisch, M.P. and Williams, R.W. (1982b). Evidence for the participation of intestine xanthine oxidase in the mucosal processing of iron. *Biochem.* **21**. 4529-4535.

Tubaro, E., Lotti, B., Cavallo, G., Groce, C. and Borelli, G. (1980a). Liver xanthine oxidase increase in mice in three pathological models. A possible defense mechanism. *Biochem. Pharm.* **29**: 1339-1343.

Tubaro, E., Lotti, B., Santiangeli, G., and Cavallo, G., (1980 b). Xanthine oxidase in polymorphonuclear leucocytes and macrophages in mice in three pathological situations: *Biochem. Pharm.* **29**: 1939- 1943.

Ulmann, J. E., Feigelson, P. and Harris, s. (1962). The effect of Specific antibodies on xanthine oxidase from various sources. *J. Immunol.* **88** ; 113-120.

- Varani, J. and Ward, P.A., (1994). Mecanism of endothelial cell injury in acute inflammation. *Shock*. **2**: 311-319.
- Ventom, A.M., Deishing, J. and, Bray, R.C. (1988). The isolation of demolybdo-(Xanthine Oxidase) from bovine milk. *Biochem. J.* **255**: 949-956.
- Waud, W.R. and Rajagopalan, K.V. (1976a). Purification and properties of NAD⁺. dependent (type D) and O₂- dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **172**: 354-364.
- Waud, W.R and Rajagopalan, K.V. (1976 b). The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺. dependent (type D) to an O₂- dependent form (type O). *Arch. Biochem. Biophys.* **192**: 365-379.
- Werns, S.W., and Lucchesi, B.R. (1990). Free radicals and ishemic tissue injury. *TiPS*. **11**: 161-165.
- Wilkins, E.G. Rees, R.S., Smith, D., Cashmer, B., Punch,J., Till., G.O., And Smith, D.J. (1993). Identification of xanthine oxidase activity following reperfusion in human tissue. *Ann. Plast. Surg.* **31**: 60-65.
- Williamson, J. R. (1966). Glycolytic control mechanisms II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic-anoxic transition in perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **241** : 5026-5036
- Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J. and Blake, D.R. (1993). Free radicals in inflammation: Second messegers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* **49**: 506- 522.
- Woodruff, T., Blake, D.R., Freeman, J., Andrews, F.J., Salt, P. and lunec, J. (1986). Is chonic synovitis an example of reperfusioninjury? *Ann. Rheum. Dis.* **45**: 608-611.
- Wu, X.M., Sawada, M. and Carlson, J.C. (1992). Stimulation of phospholipase A₂ by xanthine oxidase in the rat corpus luteum. *Biol. Reprod.* **47**: 1053-1058.

Xu, P., Huecksteadt, T.P., Harrison, R. and Hoidal, J.R. (1994). Molecular cloning tissue expression of human xanthine dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **199**: 998-1004.

Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Takahashi, S., Hada, T., Suda, M., Imanishi, H., Agbedana, O.E., Nanahoshi, M. and Higashino, K. (1991a). A xanthinuric family the proposita having immunologically reactive xanthine oxidase but no xanthine oxidase activity. Purine and pyrimidine metabolism in man VII. Part A. (edited by Harkness, R. A., Elion, G. B., Zöllner, N.). New York; Plenum Press. pp. 369-372.

Yamamoto, T., Kario, K., Suda, M., Moriwaki, Y., Takahashi, S and Higashino, K. (1991b). A case of xanthinuria: A study on the metabolism of pyrazinamide and allopurinol. *JPN. J. Med.* **30**: 430-434.

Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Takahashi, S., Tsutumi, Z., Yamakita, J. NaSako, Y., Hiroishi, K., Higashino, k. (1996). Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog. B. Biomed. Appl.* **681**: 395-100.

Yokoyama, Y., Beckman, J.S., Beckman, T.K., Wheat, J.K., Cashi, T.G., Freeman, B.A. and Parks, D.A. (1990). Circulating xanthine oxidase: potentiel mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.* **258** (Gastro intest. liver. physio 21): G564- G570.

Zhong, Z., Lemasters, J.J. and Tharman, R.G. (1989). Role of purines and xanthine oxidase in reperfusion injury in perfused rat liver. *J. Pharm. Exp. Therap.* **25**: 470-475.

Zikakis, J. P., Dressel, M. A. and Sliver, M. R. (1983). Bovine, caprine, and human milk xanthine oxidases : isolation, purification and characterization. *Inst. Anal. Foods.* **2** : 243-302.

Zikakis, J.P. and Sliver, M. R. (1984). Bovine milk xanthine oxidase : effecte of limited proteolysis on kinetics and structure. *J. Agric. Food Chem.* **32** : 340-343.

Zimmerman, B.J., Parks, D.A. Grisham, M.B. and Granger, D.N. (1988). Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid. *Am. J. Physiol.* **255** (heart circ. physiol. 24): H202-H206.

Zimmerman, B.J., and Granger, D.N. (1990). Reperfusion -induced leucocyte infiltration: role of elastase . *Am. J. Physiol* **259** (Heart Circ. physiol. 28). H 390-H394

Zimmerman, B.J., Grisham, M.B. and Granger, D.N. (1990). Role of oxidants in ischemia / reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am. J. Physiol.* **258** (Gastrointest. liver physiol.21): G 185-G 190.

Zweier, J.L., Flahearty. J.T. and Weisfeldt, M.L. (1987). Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Nalt. Acad. Sci.* **84**: 1404-1407.

Zweier, J.L., Kupusamy, P. williams, R., Rayburn, B.K. Smith,D., Weisfeldt, M.L. and Flahearty, J.T. (1989). Measurement and characterization of post ischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J. Biol. Chem.* **264**: 18890-18895.

Zweier, J.L., Broderick, R., Kuppusamy, P., Thompson- Gorman and luty, G.A. (1994). Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to an anoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **269**: 24156-24162.