

## FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

## La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes.

D. SERTEYN<sup>1,2</sup>, S. GRULKE<sup>1,2</sup>, T. FRANCK<sup>2</sup>, A. MOUITHYS-MICKALAD<sup>2</sup>, G. DEBY-DUPONT<sup>2</sup>

1. Anesthésiologie et Pathologie Chirurgicale des Grands Animaux,

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, B41, 4000 Sart Tilman, Liège.

2. Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement (CORD), B6a, Sart Tilman, Liège.

*Ce travail est financé par un projet " Initiative " de la Région Wallonne (Convention 011/4695).*

Correspondance : Professeur Didier Serteyn,

Tél 32 4 3664103

Fax 32 4 3664108

e-mail : didier.serteyn@ulg.ac.be

**RESUME :** La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme hémique présente en concentrations importantes ( $\pm 5\%$  en poids) dans les granules primaires des cellules polymorphonucléaires neutrophiles. Outre son activité de peroxydase, elle présente une activité de chloration, utilisant le peroxyde d'hydrogène et les ions chlorures pour former l'acide hypochloreux, un oxydant fort, capable de chlorer les molécules. Dans le phagolysosome, la MPO exerce une forte activité antimicrobienne. Par contre, les concentrations anormalement élevées en MPO dans le plasma, dans les liquides biologiques et dans les tissus indiquent une activation importante ou excessive des neutrophiles. La mesure de la MPO par voie enzymatique est difficile dans le plasma par la présence de l'albumine; une mesure immunologique est donc nécessaire pour rendre compte de la totalité de l'enzyme libérée.

### INTRODUCTION

L'appel des cellules phagocytaires et la réaction inflammatoire en réponse à l'infection sont des mécanismes de défense essentiels pour éliminer les microorganismes. Les neutrophiles sont un élément clef de cette réponse: ils sont attirés précocement par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse en traversant des capillaires dont la perméabilité s'est accrue. Ils phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiaux pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation des neutrophiles permet la digestion bactérienne par une activation de la consommation d'oxygène (la flambée respiratoire ou *respiratory burst*) et une dégranulation, indépendante de l'oxygène. La dégranulation libère des protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéoly-

tiques, tandis que la flambée respiratoire implique le fonctionnement de la NADPH-oxydase, de la myéloperoxydase (MPO), et de la NOSynthase (appelée aussi NOSynthétase), agissant de concert pour éliminer les microorganismes en produisant des espèces oxydantes capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (Babior, 1999; Babior, 2000).

Dans la phagocytose, la MPO joue un rôle essentiel en produisant l'acide hypochloreux (HOCl). L'enzyme a été mentionnée pour la première fois par Agner sous le nom de verdoperoxydase (Agner, 1941). Elle a été purifiée depuis chez l'homme, le bovin, le porc, le chien, les rongeurs (Himmelhoch *et al.*, 1969; Bakkenist *et al.*, 1978; Matheson *et al.*, 1981; Harrison *et al.*, 1977; Cooray *et al.*, 1993) et pour la première fois chez le cheval par notre équipe (Mathy-Hartert *et al.*, 1998). Les connais-

sances accumulées sur les MPO des différentes espèces animales montrent une grande similitude de comportement enzymatique, une similitude de conformation (masse moléculaire similaire, structure oligomérique, présence de l'hème, formation d'une hémi-enzyme, etc...), mais avec des séquences d'acides aminés différentes puisque les anticorps obtenus contre la MPO d'une espèce ne reconnaissent pas celles d'autres espèces.

Parmi les différentes MPO, la plus étudiée est l'enzyme humaine parce que la séquence de ses acides aminés a été entièrement élucidée et qu'elle est désormais produite par génie génétique (Moguilevsky *et al.*, 1991), ce qui a permis d'en obtenir des quantités suffisantes pour des études de structure et de réactivité approfondies. C'est la raison pour laquelle les données reprises dans cette revue concernent la MPO humaine, sauf dans la dernière partie qui est consacrée à la MPO équine.

## CARACTÉRISTIQUES ET ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA MYÉLOPEROXYDASE

### Structure et activité enzymatique

La MPO est une peroxydase hémique (EC 1.11.1.7) présente en concentrations importantes (2 à 5 % en poids) dans les granules primaires des cellules polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) (Tobler et Koeffler, 1991; Borregaard et Cowland, 1997; Klebanoff, 1999). On la trouve également dans les monocytes en concentration plus faible, mais la présence de l'enzyme devient indétectable lors de la maturation en macrophages (Mathy-Hartert *et al.*, 1996). Elle appartient à la famille des peroxydases de mammifères qui comprend, outre la MPO, la lactoperoxydase, l'éosinophile peroxydase, la peroxydase thyroïdienne et la prostaglandine H synthase (PGHS), avec un pourcentage important d'homologie dans la structure de ces enzymes.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'isolement de la MPO à partir des neutrophiles humains, à sa caractérisation, au séquençage de l'enzyme, à l'étude cristallographique de sa structure, à son mode de fonctionnement et à sa biosynthèse (Ehrenberg et Agner, 1958; Bakkenist *et al.*, 1978; Matheson *et al.*, 1981; Olsson *et al.*, 1984; Tobler et Koeffler, 1991; Mathy-Hartert *et al.*, 1996; Fiedler *et al.*, 2000). La séquence des acides aminés de la MPO humaine est totalement décryptée, le gène est localisé et la séquence nucléotidique est connue (Miyasaki *et al.*, 1986; Inazawa *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989; Zaki *et al.*, 1990; Yamada *et al.*, 1993). L'enzyme a été clonée et est produite par génie génétique sous la forme du précurseur monomérique enzymatiquement actif, avec une glycosylation différente de celle de l'enzyme naturelle de sorte qu'elle ne subit pas la protéolyse qui la transformerait en enzyme mature (Morishita *et al.*, 1987; Jacquet *et al.*, 1991; Moguilevsky *et al.*, 1991). L'expression du gène de la MPO humaine est strictement régulée (Tobler *et al.*, 1988). Sa présence et celle de son mRNA sont confinées aux premiers stades de la différenciation myéloïde, avec un pic au stade promyélocyte et un arrêt à la fin de ce stade de différenciation de sorte que le gène devient indétectable dans les

granulocytes matures (Zhao *et al.*, 1996).

La synthèse de la MPO humaine sous sa forme mature nécessite l'insertion du groupe prosthétique dans l'apoprotéine pour arriver à une conformation normale, une sortie du réticulum endoplasmique et une maturation finale (Nauseef *et al.*, 1988; Nauseef *et al.*, 2000). La forme précurseur de l'enzyme est une protéine de 75 à 80 kDa, modifiée dans le réticulum endoplasmique par N-glycosylation pour donner une apoprotéine de 90 kDa inactive. Dans le réticulum endoplasmique, elle interagit avec les chaperonines calréticuline et calnexine, d'une manière séquentielle et régulée, et incorpore le groupe prosthétique hémique à  $Fe^{3+}$  pour donner la proMPO de 90 kDa. La proMPO quitte alors le réticulum endoplasmique et passe dans un compartiment pré-granulaire où elle devient l'enzyme mature (DeLeo *et al.*, 1998; Nauseef *et al.*, 2000). L'hème, dérivé de la protoporphyrine IX, est lié par son atome  $Fe(III)$  à deux histidines (His<sub>261</sub> distale et His<sub>502</sub> proximale) de la protéine (Fenna *et al.*, 1995): la nature de cette liaison n'a pas été précisée, mais la comparaison avec d'autres protéines et enzymes hémiques suggère qu'il s'agit d'une liaison coordinative avec l'histidine proximale et d'une liaison par pont hydrogène avec l'histidine distale, permettant la formation d'un complexe hexacoordonné sur le  $Fe(III)$  (Rifkind *et al.*, 1994).

L'hème présente également, au niveau de deux noyaux pyrroles, trois liaisons covalentes avec des acides aminés de la protéine: deux groupes méthyles modifiés sont liés respectivement à un résidu aspartate (Asp<sub>94</sub>) et à un résidu glutamate (Glu<sub>242</sub>). Ces deux liaisons sont communes à toutes les peroxydases de mammifère (figure 1). La troisième liaison se forme entre le groupe vinyle d'un noyau pyrrole et l'atome de soufre de la méthionine (Met<sub>243</sub>): cette liaison sulfonium est caractéris-

tique de la MPO et responsable des propriétés de chloration (Fenna *et al.*, 1995; Kooter *et al.*, 1999).

L'enzyme mature humaine est un homodimère symétrique, formé de 2 héli-enzymes, chacune à 2 sous-unités (une chaîne légère de 15 kDa et une chaîne lourde de 59 à 64 kDa produite par excision de 6 acides aminés à partir du précurseur commun), reliées par un pont disulfure (Nauseef *et al.*, 2000). La protéine est glycosylée, ce qui explique les variations de son poids moléculaire (120 à 150 kDa). Elle possède un pic d'absorption caractéristique à 430 nm dû à sa structure hémique (pic de Soret). Son site actif est localisé à la base d'une poche hydrophobe, étroite et profonde, qui ne permet l'accès qu'aux substrats de faible poids moléculaire (Podrez *et al.*, 2000).

La MPO (sous sa forme proMPO et sous sa forme mature) possède une activité de peroxydase et de chloration. Elle utilise le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et catalyse l'oxydation à 2 électrons des ions  $Cl^-$  pour former l'acide hypochloreux (HOCl); elle peut aussi utiliser les ions bromures ou iodures pour former les acides hypohalogénés correspondants (Taugog et Dorris, 1992). Depuis peu, on admet que son activité de chloration produit des espèces intermédiaires, hautement réactionnelles, comme  $Cl_2$  ou le chlore à l'état natif ( $^*Cl$ ) (Dunford, 2000; Podrez *et al.*, 2000) conduisant à la formation de

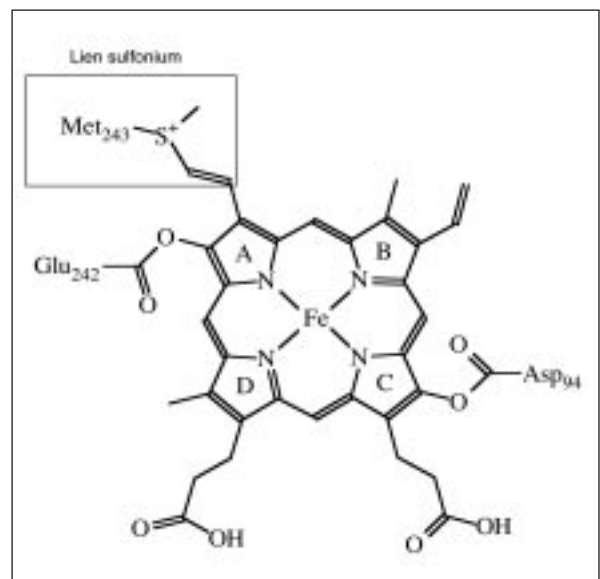


Figure 1 : Structure du noyau hémique de la MPO humaine (d'après Fenna *et al.*, 1995). Les noyaux pyrroles A et C portent trois liaisons covalentes avec des résidus aminés de la protéine. La liaison sulfonium avec la méthionine 243 (Met<sub>243</sub>) est caractéristique de la MPO et paraît responsable de l'activité de chloration de l'enzyme. Les histidines distale et proximale se placent perpendiculairement au plan de la figure et ne sont pas représentées ici.

**Tableau I :** Ensemble des réactions contrôlées par la myéloperoxydase (MPO).  
[Cd I = MPO+•-Fe(IV)=O; Cd II = MPO-Fe(IV)=O]

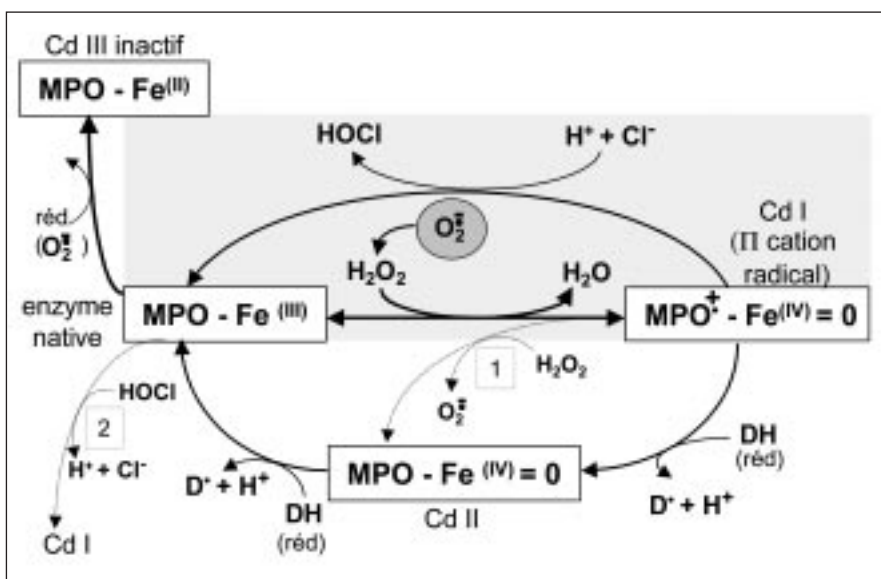
<p><b>• activité de chloration:</b>  <math>MPO-Fe(III) + H_2O_2 \rightleftharpoons Cd\ I + H_2O</math>  <math>Cd\ I + Cl^- + H^+ \rightleftharpoons MPO-Fe(III) + HOCl</math>  <i>oxydation à deux électrons, quasi-simultanéité des deux étapes réactionnelles</i></p> <p><b>• activité de peroxydase:</b>  <math>MPO-Fe(III) + H_2O_2 \rightleftharpoons Cd\ I + H_2O</math>  <math>Cd\ I + DH \rightleftharpoons Cd\ II + D^\bullet + H^+</math>  <math>Cd\ II + DH \rightleftharpoons MPO-Fe(III) + D^\bullet + H^+</math>  <i>deux étapes d'oxydation à un électron, nécessitant deux molécules de substrat réducteur</i></p> <p><b>• formation du Cd III:</b>  <math>MPO-Fe(III) + \text{substrat red.} \rightleftharpoons MPO-Fe(II) \text{ (Cd III)} + \text{substrat oxydé}</math>  <math>MPO-Fe(II) + O_2 \rightleftharpoons MPO-Fe(II)-O_2</math>  <i>oxydation à un électron nécessitant une molécule de substrat réducteur et fixation de l'oxygène</i></p>
--

dérivés chlorés comme la chlorotyrosine (Gaut *et al.*, 2001). La MPO diffère des autres peroxydases de la même famille par la grande réactivité de sa forme naturelle MPO-Fe(III) et de son composé I (*compound I* ou Cd I) de courte durée de vie, très réactionnel, formé d'une structure hémique à Fe(IV) avec un radical centré sur un acide aminé de la protéine et appelée " $\pi$ -cation radical" (figure 2). Ce Cd I réagit rapidement avec les ions chlorures (Cl<sup>-</sup>) pour former l'acide hypochloreux (HOCl) et restituer la MPO-Fe(III). Il réagit

aussi avec des substrats réducteurs (DH) pour former le Cd II (où la MPO a une structure hémique à Fe(IV) mais n'a plus de radical centré sur un acide aminé) et une espèce oxydée radicalaire D<sup>•</sup> dérivée de DH. Le Cd II retourne à l'état de MPO-Fe(III) par réaction avec un nouveau réducteur (formation d'un nouveau D<sup>•</sup>). Parmi les réducteurs pouvant intervenir dans ce cycle de formation de Cd II et de retour à la MPO native, on mentionne les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), l'ascorbate, l'urate, les catécholamines, les œstrogènes, la sérotonine et la

tyrosine: les formes radicalaires produites à partir de ces substrats peuvent diffuser et conduire à la formation de composés actifs, comme le radical tyrosyle à l'origine de lipoperoxydations (Podrez *et al.*, 2000). Le tryptophane est également un substrat pour le Cd I, mais bloquerait le Cd II, inhibant le retour à l'état natif et donc le fonctionnement de l'enzyme et sa production d'HOCl (Kettle et Candaeis, 2000). La formation du Cd I en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réversible: Cd I réagirait avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et le Cd II (voie réactionnelle annexe 1 sur la figure 2) (Furtmüller *et al.*, 2000b). La MPO pourrait aussi réagir avec HOCl pour former le Cd I (voie réactionnelle annexe 2 sur la figure 2) (Winterbourn *et al.*, 1985; Floris et Wever, 1992). Pour éviter les voies réactionnelles annexes 1 et 2 et obtenir une production maximale d'HOCl, il faut des concentrations suffisantes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en Cl<sup>-</sup> (Podrez *et al.*, 2000). La MPO-Fe(III) peut aussi former (de façon réversible) le Cd III inactif, MPO-Fe(II), sous l'action de réducteurs parmi lesquels on mentionne O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Winterbourn *et al.*, 1985; Kettle et Winterbourn, 1989; King *et al.*, 1997). Cette inactivation pourrait se produire au début de la phagocytose lorsque le pH du phagolysosome est alcalin ou neutre, permettant un fonctionnement maximal de la NADPH oxydase et une "quiescence" de la MPO (Segal *et al.*, 1981; Cech et Lehrer, 1984). La MPO dont le pH de fonctionnement optimal se situe vers 5,5 devient active lorsque le pH du phagolysosome s'abaisse. On signale également une inactivation irréversible de la MPO (avec destruction de l'hème) par HOCl, suggérant un mécanisme d'auto-régulation (Edwards *et al.*, 1987). Le tableau 1 résume les principales réactions de la MPO (Furtmüller *et al.*, 2000a).

Au total, de nombreux paramètres régulent les voies réactionnelles et le fonctionnement de la MPO: le pH, la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> conduisant à la formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la concentration en Cl<sup>-</sup> (100 mM dans le plasma), les concentrations en réducteurs (ascorbate, méthionine...), mais aussi le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>). Lors de la phagocytose, MPO et NOsynthase sont secrétées dans le phagolysosome: à faible concentration de NO<sup>•</sup>, l'activité peroxydasique de la MPO serait augmentée parce que le NO<sup>•</sup> réduirait



**Figure 2 :** Etapes détaillées de l'activité enzymatique de la MPO [MPO-Fe(III): enzyme native] et de la formation des composés (Cd) intermédiaires.  
 Cd I : composé portant un radical libre sur un acide aminé de la chaîne protéique.  
 DH : substrat donneur d'électrons (réd : forme réduite).  
 Do : radical dérivé de DH (par perte de Ho)  
 1 et 2 : voies réactionnelles annexes.

le Cd II en MPO-Fe(III). Aux concentrations élevées, le NO• agirait par ses capacités de nitrosation des hèmes et la MPO serait inhibée par formation d'une MPO nitrosée [MPO-Fe(III)-NO] (Abu-Soud et Hazen, 2000a). Le NO• peut aussi réduire le Cd I en Cd II, augmentant la fonction peroxydase de la MPO (Podrez *et al.*, 2000; Abu-Soud et Hazen, 2000b).

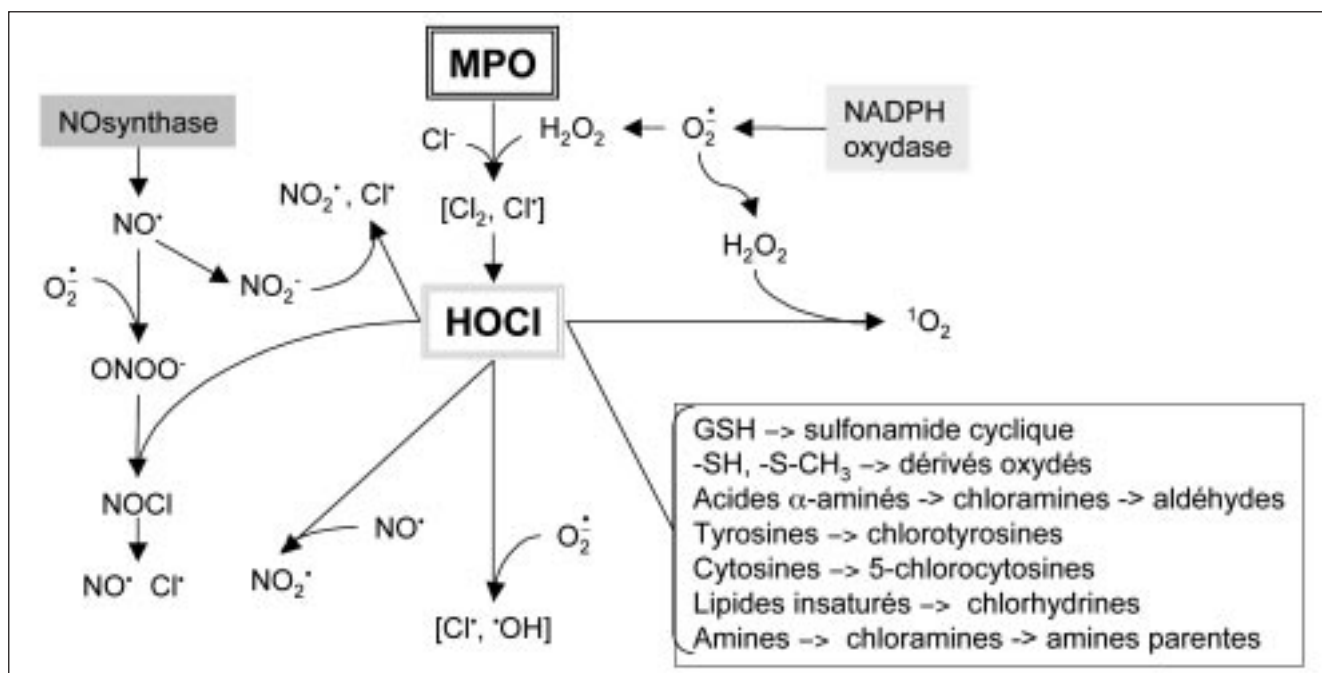
### Espèces oxydantes produites par la myéloperoxydase

Les données qui suivent ont été obtenues pour la MPO humaine, mais toutes les MPO isolées à ce jour à partir des neutrophiles de différentes espèces produisent les mêmes famille d'oxydants, avec en premier HOCl, un oxydant fort, capable d'oxyder et de chlorer de nombreuses molécules (Klebanoff, 1999). Dans le phagolysosome, il fonctionne comme un bactéricide puissant (Hampton *et al.*, 1998). En dehors du phagolysosome, il oxyde les thiols (-SH) et transforme le soufre substitué de la méthionine (-S-CH<sub>3</sub>) en sulfoxyde, produits majeurs d'oxydation par HOCl, formés facilement et rapidement dans les milieux biologiques (figure 3). Avec le glutathion (GSH), il forme une sulfonamide cyclique stable (Winterbourn et Brennan, 1997). HOCl forme des dérivés chlorés avec

les amines, composés qui sont eux-mêmes oxydants et évoluent vers la formation d'amines parentes par réduction (réaction avec l'ascorbate, les thiols et la méthionine) (Thomas *et al.*, 2000; Carr *et al.*, 2001). Il réagit avec les acides α-aminés pour former des dérivés chlorés instables (chloramines), évoluant rapidement (avec production d'espèces radicalaires intermédiaires) vers la formation de carbonyles (à l'origine de pontages) et d'aldéhydes en libérant CO<sub>2</sub> et l'ammonium (Hawkins et Davies, 1998; Hazen *et al.*, 1998a). Il forme, plus lentement mais de manière spécifique, des dérivés chlorés avec les résidus tyrosyles (3-chlorotyrosine, 3,5-dichlorotyrosine), les lipides insaturés (chlorhydrines) et les cytosines (5-chlorocytosine) (Kettle et Winterbourn, 1997; Shishido *et al.*, 2000; Winterbourn et Kettle, 2000). Il réagit avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et avec les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, dérivés de la réaction de •NO avec l'oxygène), et même avec le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>), pour donner des espèces nitrantes (Radi *et al.*, 2001). HOCl réagirait également avec O<sub>2</sub><sup>•</sup> pour former le radical hydroxyle (•OH). Par cette voie réactionnelle, la MPO serait responsable de l'apoptose des cellules transformées comme les cellules tumorales, productrices d'O<sub>2</sub><sup>•</sup>, mais ces données restent contestées (Engelmann *et al.*,

2000; Paul et Bauer, 2001). HOCl est aussi responsable de l'activation de pro-enzymes comme la matrilysine (métalloprotéinase matricielle MMP-7), la procollagénase et la pro-élastase (Weiss *et al.*, 1985; Peppin et Weiss, 1986; Fu *et al.*, 2001).

La MPO réagit avec NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et ONOO<sup>-</sup> (directement ou via sa production d'HOCl), intervient dans la nitration et la chloration des acides aminés aromatiques comme la tyrosine, par l'oxydation de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en •NO<sub>2</sub> (van Dalen *et al.*, 2000) ou par la voie d'un intermédiaire instable, le chlorure de nitryle (NO<sub>2</sub>Cl), générateur des radicaux •NO<sub>2</sub> et •Cl, surtout à pH acide. Ces deux espèces radicalaires sont des agents de nitration, de chloration et de dimérisation (Hazen *et al.*, 1996b; van der Vliet *et al.*, 1997; Eiserich *et al.*, 1998; Sampson *et al.*, 1998) (figure 3). Ces réactions de nitration et de chloration (avec des rendements variables) sont démontrées *in vitro*, mais plus difficiles à mettre en évidence *in vivo*. Des protéines nitrées sont formées dans les alvéoles au cours des réactions inflammatoires aiguës (broncho-pneumonie, syndrome de détresse respiratoire aiguë) en relation avec la présence des neutrophiles et l'activité intra-alvéolaire de la MPO (Lamb *et al.*, 1999; van der Vliet *et al.*, 1999; Mathy-Hartert *et al.*, 2000; Sittipunt



**Figure 3 :** Produits formés par action oxydante de HOCl et réactions d'HOCl avec d'autres espèces activées de l'oxygène et de l'azote.  
 NO<sup>•</sup> : monoxyde d'azote ; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : anion superoxyde ; ONOO<sup>-</sup> : peroxy-nitrite ; NOCl : chlorure de nitrosyle ; NO<sub>2</sub><sup>•</sup> : dioxyde d'azote (radical nitryle) ; Cl<sup>•</sup> : chlore à l'état natif ; •OH : radical hydroxyle ; <sup>1</sup>O<sub>2</sub> : oxygène singulet.  
 GSH : glutathion ; -SH : fonction thiol ; -S-CH<sub>3</sub> : méthionyle.

*et al.*, 2001). Des dérivés chlorés (chlorotyrosine) apparaissent *in vivo* dans l'infection (Gaut *et al.*, 2001). Des lipoprotéines de faible densité (LDL), des stérols et des résidus tyrosyles sont chlorés par la MPO dans les pathologies d'athérosclérose (Hazen *et al.*, 1996a; Hazen et Heinecke, 1997; Podrez *et al.*, 2000). L'activité de la MPO est à l'origine de la production d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) par réaction entre HOCl et  $H_2O_2$  (Karnofsky *et al.*, 1984). Cette forme de l'oxygène, non radicalaire mais très énergétique, est capable d'oxyder la majorité des composés organiques, mais la réalité de sa production *in vivo* reste discutée.

La MPO est donc responsable de la synthèse directe ou indirecte de nombreuses espèces oxydantes qui participent à la défense de l'hôte et sont à l'origine de la chimioluminescence observée lors de la stimulation des neutrophiles *in vitro*.

## **RÔLES DE LA MYÉLOPEROXYDASE**

Les données présentées ici ont été obtenues pour la MPO humaine et indiquent clairement que les effets de l'enzyme sont liés à l'activité des neutrophiles. Elles sont extrapolables aux MPO d'autres espèces animales, bien que ces MPO aient été beaucoup moins étudiées, particulièrement au niveau des pathologies liées à l'activation excessive des neutrophiles.

### **Le rôle bénéfique de la myéloperoxydase : son activité antimicrobienne**

Le neutrophile phagocyte les microorganismes qui sont séquestrés et détruits dans les vacuoles phagocytaires, les phagolysosomes, par l'action oxydante des espèces activées (dérivées de l'activité de la NADPH-oxydase, de la NOSynthase et de la MPO) et l'action des enzymes protéolytiques granulocytaires (Babior, 1999; Babior, 2000). La NADPH-oxydase est activée très rapidement dans la membrane plasmique et dans les granules spécifiques (Karlsson et Dahlgren, 2002) et produit, en milieu légèrement alcalin ou neutre,  $O_2^{\bullet}$  d'où dérive  $H_2O_2$ . La fusion des granules spécifiques avec les granules azurophiles contenant la MPO est à l'origine de nouvelles espèces activées, notamment par l'action de la MPO

dont l'activité s'intensifie avec l'acidification du milieu. La MPO est active sur une grande variété de microorganismes qu'elle attaque par oxydation en différents points et de différentes manières (virus, bactéries, fungi, protozoaires) (Klebanoff, 1999; Babior, 2000). Son activité bactéricide comprend une étape de fixation sur la membrane bactérienne en de nombreux points où existent des structures polysaccharidiques, résistantes aux enzymes protéasiques et hydrolytiques. Cette liaison permet à la MPO une attaque extracellulaire des microorganismes comme les parasites et les fungi trop volumineux pour être phagocytés (Wright et Nelson, 1988). En contact avec les microorganismes, elle produit l'HOCl et d'autres espèces capables de chlorations et de nitrations qui attaquent une large gamme de molécules: les hèmes, les groupes aminés, les centres Fe-S, les groupes -SH, les lipides insaturés et les bases nucléiques (Saran *et al.*, 1999). Avec les lipides membranaires, HOCl forme des amines chlorées et des chlorhydrines et perturbe la perméabilité (Carr *et al.*, 1998). En oxydant les structures hémiques, il altère de nombreuses fonctions enzymatiques, notamment celles de la chaîne respiratoire entraînant la mort bactérienne (Rosen et Klebanoff, 1985; Rakita *et al.*, 1990).

La MPO est également un facteur d'appoint pour la destruction bactérienne par les macrophages qui ne possèdent plus l'enzyme mais peuvent capturer celle des neutrophiles. Cette capture se produit via des récepteurs au mannose (Shepperd et Hoidal, 1990) et leur permet une destruction plus facile de certaines espèces bactériennes particulièrement celles qui possèdent des capsules polysaccharidiques comme le *Pseudomonas aeruginosa* (Locksey *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1995; Mathy-Hartert *et al.*, 1996).

### **La myéloperoxydase, un agent cytotoxique et inflammatoire**

Au cours d'une activation normale, l'activité de la MPO s'exerce dans les vacuoles intracellulaires et seules des quantités limitées de MPO sont libérées dans le milieu extracellulaire (estimées aux environs de 10 à 15%) (Eiserich *et al.*, 1998). Mais lorsque la réaction inflammatoire devient incontrôlée, la dégranulation massive

et la mort des neutrophiles relâchent la MPO et les enzymes protéolytiques dans le milieu extracellulaire ou au contact d'autres cellules avec un risque de destruction locale. Dans le milieu extracellulaire, l'albumine et d'autres protéines comme la céruloplasmine ou les lipoprotéines de faible densité (LDL) empêchent la mesure de l'activité enzymatique de la MPO parce que l'enzyme agit plus rapidement sur des acides aminés sensibles de ces protéines (Jacquet *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1993; Segelmalk *et al.*, 1997; Carr *et al.*, 2000), mais cette inhibition est réversible (King *et al.*, 1997). La présence de concentrations anormalement élevées en MPO dans le plasma, dans les liquides biologiques (lymphe, liquide d'ascite, liquide d'exsudation) et dans les tissus est le signe d'une activation importante ou excessive des neutrophiles. Depuis ces dernières années, la MPO est prise comme marqueur dans de nombreuses pathologies, liées à l'activation des neutrophiles et à leur infiltration tissulaire dans les pathologies de soins intensifs, dans les maladies cardiovasculaires et dans des pathologies non infectieuses (McConnico *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Hoy *et al.*, 2002).

La MPO est cytotoxique pour les hématies (Klebanoff et Clark, 1975; Klebanoff, 1999), active la stimulation des plaquettes et peut oxyder les neutrophiles eux-mêmes. Elle est particulièrement cytotoxique pour les cellules endothéliales et les fibroblastes qui sont capables de la fixer et de l'internaliser (Zabucchi *et al.*, 1989; Mathy-Hartert *et al.*, 1995). *In vivo*, les neutrophiles peuvent adhérer et s'activer au contact de l'endothélium ou dans les tissus qu'ils ont atteints par diapédèse. Leur dégranulation locale libère la MPO au contact des cellules voisines comme les cellules endothéliales ou les fibroblastes. A l'intérieur des cellules endothéliales, la MPO reste active et peut utiliser le peroxyde d'hydrogène et d'autres espèces actives produites par la cellule hôte (activité de la NADPH-oxydase, de la xanthine-oxydase en situation d'ischémie reperfusion) produisant un afflux local d'espèces activées de l'oxygène (agression oxydante) (Weiss, 1989). Une activité peroxydasique attribuée à la MPO a été identifiée dans les tissus intestinaux au cours des pathologies d'ischémie-reperfusion (Arndt *et al.*,

1991). Dans les pathologies inflammatoires aiguës (infections, syndrome de détresse respiratoire aiguë), les concentrations plasmatiques de la MPO sont élevées et l'enzyme active se retrouve dans les alvéoles en corrélation avec le nombre de neutrophiles et d'autres produits de la dégranulation de ces cellules (élastase, lactoferrine), et en corrélation avec une activité oxydante des liquides de lavage alvéolaire (Cochrane *et al.*, 1983; Weiland *et al.*, 1986; Eiserich *et al.*, 1998; Mathy-Hartert *et al.*, 2000). La concentration sanguine de la MPO s'élève également au cours des interventions chirurgicales qui s'accompagnent d'une activation leucocytaire comme les interventions de pontage aortique avec circulation extracorporelle (Faymonville *et al.*, 1991).

L'activité de la MPO est responsable de l'inactivation d'enzymes et de l'oxydation de nombreuses molécules comme les protéines hémiques, les porphyrines, les lipides insaturés, les centres à fer et soufre, les thiols, le DNA, les nucléotides, les amines et les acides aminés. L'HOCl oxyde pratiquement tous les acides aminés en aldéhydes qui deviennent des composés actifs au site inflammatoire (Hazen *et al.*, 1998b) et détruit les antiprotéases comme l' $\alpha_1$ protéinase inhibiteur et l' $\alpha_2$ macroglobuline permettant à l'élastase libre de se retrouver dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire chez les patients en détresse respiratoire aiguë (Cochrane *et al.*, 1983; Suter *et al.*, 1992). Le GSH, un composé important de la balance oxydo-réductrice cellulaire, est oxydé par HOCl en dérivés (notamment une sulfonamide cyclique) qui ne peuvent plus être ramenés au stade de GSH par la GSH réductase, entraînant une chute du GSH, une diminution des défenses antioxydantes et une perturbation de l'équilibre oxydo-réducteur (Winterbourn et Brennan, 1997). La MPO agit encore au site inflammatoire en activant des enzymes latentes comme la progélatinase et la procollagénase, activation qui conduit à la destruction des tissus connectifs. Cette activation est attribuée à l'action oxydante d'HOCl (Weiss *et al.*, 1985; Peppin et Weiss, 1986) qui conduit à une fragilisation du squelette protéique (Hawkins et Davies, 1998).

Il existe donc un intérêt thérapeutique à limiter l'activité de la MPO dans les pathologies qui s'accompagnent d'une

activation incontrôlée des neutrophiles, mais les inhibiteurs actuellement connus ne sont ni spécifiques de la MPO, ni dénués de toxicité.

### **La myéloperoxydase, un agent modulateur des fonctions cellulaires**

Les espèces activées de l'oxygène sont impliquées dans la transduction du signal intracellulaire comme seconds messagers en conditions normales ou comme éléments perturbateurs dans les situations de production excessive (Schulze-Osthoff *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Irani, 2000; Thannickal et Fanburg, 2000). Puisque la phosphorylation et la déphosphorylation des résidus tyrosines est une étape importante dans la transduction du signal, notamment pour l'activation des protéines kinases, la chloration et la nitration des résidus tyrosines pourraient être des éléments de perturbation de la transduction du signal avec des effets activateurs ou répresseurs selon le point d'action. La MPO et HOCl activent le facteur nucléaire NF-KB (Schoonbroodt *et al.*, 1997; Nys *et al.*, 2002) qui peut augmenter l'expression de médiateurs de l'inflammation, avec un effet bénéfique ou néfaste selon l'endroit et le moment où se produit la réaction inflammatoire. Les espèces oxydantes dérivées de la MPO sont impliquées dans l'activation de la caspase-3 et dans l'apoptose (Paul et Bauer, 2001; Myzak et Carr, 2002).

Libérée par la dégranulation des neutrophiles et par les neutrophiles mourant au site inflammatoire, la MPO produit localement des espèces oxydantes diffusibles qui vont influencer les fonctions des cellules voisines. L'activité des lymphocytes tueurs (*natural killers*, NK) est diminuée dans les tumeurs en présence de phagocytes et lorsqu'ils sont exposés aux monocytes et neutrophiles activés. Le système MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> perturbe les fonctions de prolifération, de production d'anticorps et de cytolysse des lymphocytes B, T et NK (El-Hag et Clark, 1987), sans entraîner la mort lymphocytaire et d'une manière dépendante du nombre de neutrophiles, de leur proximité et du potentiel antioxydant de l'environnement. De nombreux points restent mal compris dans les interactions entre MPO et lymphocytes.

La MPO est captée par les macrophages après sa fixation sur les récepteurs au mannose et module, d'une manière dose-dépendante, la production de certaines cytokines (TNF $\alpha$ , IL1, IFN $\alpha$ ), par des mécanismes qui pourraient dépendre de l'activation de la transduction du signal (Lefkowitz *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1996). Elle augmente la cytotoxicité de ces cellules en accroissant leur potentiel oxydant et leur efficacité vis-à-vis des microorganismes à capsules polysaccharidiques résistantes aux protéases (Lincoln *et al.*, 1995; Mathy-Hartert *et al.*, 1996).

La MPO peut interagir avec de nombreuses autres cellules (fibroblastes, érythrocytes, plaquettes, cellules endothéliales), soit en augmentant leurs défenses soit en les altérant, selon l'intensité et les cibles atteintes par les espèces oxydantes produites dans ou en surface des cellules. Les cocultures de cellules endothéliales et de neutrophiles ont montré une altération de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine par altération oxydante. La MPO agit sur les neutrophiles eux-mêmes en diminuant leur activité de phagocytose au niveau de la fixation et de l'ingestion, par modification oxydante des récepteurs cellulaires. Cette activité de la MPO peut avoir un effet limitant sur la réaction inflammatoire (Stendahl *et al.*, 1984).

### **Intervention de la myéloperoxydase dans les pathologies autres que les pathologies inflammatoires aiguës**

Chez l'homme, la MPO est impliquée dans plusieurs pathologies où elle agit selon des mécanismes mal définis (Nauseef, 2001; Hoy *et al.*, 2002). Des anticorps circulants dirigés contre la MPO sont associés à la glomérulonéphrite et à la vasculite systémique (Longhurst *et al.*, 1996). La MPO est impliquée dans le démarrage et le développement des cancers, par sa capacité à produire des espèces oxydantes (Song et Santanan, 2001). Un polymorphisme dans la région promotrice du gène de la MPO, réduisant la transcription de l'enzyme, s'accompagne d'un moindre risque à développer un cancer du poumon (London *et al.*, 1997; Kantarci *et al.*, 2002) et est associé de manière épidémiologique à la pathogénie de la sclérose multiple (Nagra *et al.*, 1997) et

de la leucémie promyélocytaire aiguë (Nauseef *et al.*, 1988). La MPO est également impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Reynolds *et al.*, 1999) et surtout dans l'athérosclérose où son rôle n'est plus contesté (Whitman *et al.*, 1999; Heller *et al.*, 2000; Malle *et al.*, 2000; Podrez *et al.*, 2000). Elle est amenée dans les tissus par les monocytes et les neutrophiles qui infiltrent l'intima où son activité pourrait être favorisée par les conditions hypoxiques créant un pH acide (Gerrity, 1981). Elle a été identifiée sous forme active dans les lésions athéroscléreuses chez l'homme (Daugherty *et al.*, 1994). Elle intervient dans l'oxydation des lipoprotéines légères (LDL) (Hazell et Stocker, 1993) avec formation de cholestérol chloré, d'aldéhydes dérivés d'acides aminés, de 3-chlorotyrosine et de dityrosine, mis en évidence dans les lésions athéroscléreuses chez l'homme (Hazell *et al.*, 1996; Hazen *et al.*, 1998b; Malle *et al.*, 2000). Les acides aminés (lysine et tryptophane) de l'apoprotéine B sont les premières cibles oxydées par l'activité de la MPO dans les LDL, entraînant leur agrégation (Jerlich *et al.*, 1998). La MPO participe aussi à la rupture des plaques athéromateuses en activant la métalloprotéinase matricielle MMP-7 (Fu *et al.*, 2001).

Les pathologies liées à une déficience en MPO sont moins nombreuses et mal comprises. Des déficiences en MPO sont décrites avec une fréquence de 1 pour 2000 à 4000 individus (Nauseef, 1988; Nauseef *et al.*, 2000). La déficience peut être complète ou partielle et ne s'accompagne pas d'une déficience en peroxydase dans les éosinophiles malgré 70% d'homologie dans la séquence des deux enzymes (Rosen et Michel, 1997). Ces déficiences correspondent à la présence de mutations du gène. Quatre mutations *missense* héréditaires ont été identifiées chez l'homme, affectant souvent une seule paire de bases (Kizaki *et al.*, 1994; Romano *et al.*, 1997; DeLeo *et al.*, 1998). Le remplacement d'une arginine par un tryptophane (mutation R569W) entraîne la synthèse d'une apopro-MPO sans insertion de l'hème conduisant à une déficience complète en enzyme mature (Kizaki *et al.*, 1994; Nauseef *et al.*, 1996; Nauseef *et al.*, 2000). Le remplacement d'une tyrosine par une cystéine (mutation Y173C) entraîne la synthèse du pré-

cursor (avec insertion de l'hème) qui est glycosylé et associé à la calnexine, mais qui n'est pas transformé en enzyme mature, ni sécrété, et qui semble dégradé par un mécanisme dépendant du protéasome (DeLeo *et al.*, 1998). Les mutations ne sont pas toujours accompagnées de symptômes cliniques (Petrides, 1998). Chez les patients déficients en MPO, on observe souvent une défense diminuée face aux fungi (*Candida albicans*), et les granulocytes de patients diabétiques déficients en MPO présentent une activité bactéricide diminuée ou nulle vis-à-vis du *Staphylococcus aureus* et du *Candida albicans*. La déficience en MPO est associée à la *chronic granulomatous disease* et des auto-anticorps dirigés contre la MPO (MPO-ANCA: *auto-antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens*) sont présents dans la glomérulonéphrite nécrosante idiopathique et dans l'hémorragie pulmonaire idiopathique (Bosch *et al.*, 1991; Bosch *et al.*, 1992). Mais, les études de cas individuels montrent qu'en général, en l'absence d'autres conditions pathologiques comme le diabète, il n'y a pas de sensibilité accrue à l'infection ou de réponse inflammatoire altérée. Par contre, il existe chez les patients déficients en MPO une augmentation de la phagocytose et de la flambée respiratoire des neutrophiles étudiés *in vitro* (Rosen et Michel, 1997), phénomène qui, selon Gerber et collaborateurs (1996), compenserait la déficience en MPO et expliquerait la résistance normale aux infections sévères observées chez ces patients.

On connaît aussi des pathologies humaines liées à une production excessive de MPO, les leucémies myéloïdes aiguës, souvent caractérisées par l'expression accrue du gène de la MPO (Ferrari *et al.*, 1989), expliquée par une translocation du gène du chromosome 17 vers le chromosome 15 (Weil *et al.*, 1988). Cette explication reste contestée, mais il existe désormais des techniques et des sondes pour l'analyse de l'ARN messager de la MPO humaine, permettant d'envisager l'étude d'une large gamme de maladies sanguines néoplasiques et préneoplasiques (Traweek *et al.*, 1995; Austin *et al.*, 1998).

## LA MYÉLOPEROXYDASE ÉQUINE

En partant de l'hypothèse que, chez le cheval comme chez l'homme, les neutrophiles stimulés libèrent la MPO dans le plasma ou dans les tissus où ils se sont infiltrés, et que les variations plasmatiques ou tissulaires de la MPO reflètent une activation excessive des neutrophiles, il nous a paru intéressant de mettre au point une méthode de dosage de la MPO chez le cheval (Deby-Dupont *et al.*, 1998) pour étudier les variations éventuelles de sa concentration sanguine dans les pathologies intestinales étranglées, dans la fourbure et de manière plus générale dans les pathologies où l'activation des neutrophiles est probable (Moore et Morris, 1992; Green et Adams, 1992). Une première étape dans la mise au point de ce dosage était la purification de la MPO à partir des neutrophiles équins, purification qui n'avait jamais été réalisée auparavant (Mathy-Hartert *et al.*, 1998). Pour la mener à son terme, nous avons adapté le protocole de purification mis au point pour la MPO humaine (Mathy-Hartert *et al.*, 1996) et comparé ses propriétés enzymatiques à celles de l'enzyme humaine. Mais il reste beaucoup d'inconnues, et il serait prématuré de généraliser à l'enzyme équine tout ce que l'on sait sur l'enzyme humaine.

### Caractéristiques et activité enzymatique de la myéloperoxydase équine

Les caractéristiques déterminées pour la MPO équine sont semblables à celles de la MPO humaine: enzyme glycosylée (masse moléculaire de 120 à 150 kDa), existence d'un précurseur de masse moléculaire proche de 90 kDa et de deux héli-enzymes actives comprenant une sous-unité lourde contenant l'hème ( $\pm 60$  kDa) et une sous-unité légère ( $\pm 15$  kDa). Les caractéristiques spectrales de l'enzyme mature indiquent la présence d'un hème (absorbance intense caractéristique à 430 nm) comme pour la MPO humaine. Les modalités de son activité enzymatique (pH optimal, activité de peroxydase et de chloration, inhibition par l'albumine, influence de la concentration en NaCl) sont similaires à celles de la MPO humaine (Mathy-Hartert *et al.*, 1998). On ne connaît pas encore sa séquence en acides aminés, sa struc-

ture cristalline et, par conséquent, les acides aminés impliqués dans la fixation de l'hème et dans le site enzymatique. De même, rien n'est connu sur le gène de la MPO équine et sur ses mutations éventuelles, ni sur les étapes et les détails de la biosynthèse de l'enzyme dans les cellules de la lignée myélocytaire.

### Implications pathologiques

Chez le cheval, le champ des recherches impliquant la MPO s'étend d'année en année : les pathologies digestives, les pathologies intestinales étranglées, le choc septique, les pathologies pulmonaires chroniques et aiguës (invasion des alvéoles par les neutrophiles), les phénomènes d'ischémie-reperfusion, les pathologies articulaires (présence des neutrophiles dans l'articulation) ... Quelques travaux relient les pathologies de fourbure et d'étranglement intestinal avec infection à une activation des neutrophiles, d'abord locale puis atteignant la circulation systémique (Morris, 1991; Moore and Morris, 1992; Green and Adams, 1992). Les pathologies d'étranglement intestinal sont à l'origine d'une ischémie locale conduisant à la nécrose et au choc endotoxinique, cause d'un pourcentage élevé de mortalité (Barclay *et al.*, 1980; Pascoe *et al.*, 1983; Snyder *et al.*, 1989; Moore et Morris, 1992; Serteyn *et al.*, 1994). Trois à quatre heures d'étranglement de l'intestin grêle suffisent pour conduire à la nécrose complète de la muqueuse épithéliale s'étendant jusqu'à la base des cryptes; les couches musculaires sont nécrosées après 6 à 7 heures (White *et al.*, 1980; Barker et Van Dreumel, 1985). Ces nécroses entraînent l'arrivée des endotoxines dans la circulation systémique, avec choc endotoxinique (Snyder *et al.*, 1989; Allen et Tyler 1990; Snyder *et al.*, 1992; Trim *et al.*, 1997). L'ischémie-reperfusion et les altérations locales, avec leurs libérations de médiateurs, appellent et provoquent l'accumulation des neutrophiles dans la muqueuse intestinale chez le cheval, et les endotoxines contribuent largement à l'activation de ces cellules (Morris, 1991; Green et Adams, 1992; Moore et Morris, 1992; Seahorn *et al.*, 1994). Des activités de MPO élevées ont été détectées dans les muqueuses intestinales après ischémie-reperfusion expérimentale et dans des modèles de colite

aiguë chez le cheval (Moore *et al.*, 1994; Yarbrough *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996; McConnico *et al.*, 1999). Selon McConnico et collaborateurs (1999), la MPO peut être considérée comme un marqueur caractéristique d'une activité inflammatoire dans la muqueuse intestinale. : " Intestinal tissue inflammation scores correlated positively with tissue MPO activity in adjacent specimens. Tissue MPO assay may be a useful laboratory tool to quantify intestinal mucosal inflammation in ponies ".

La biologie clinique vétérinaire ne possède aucune technique de mesure rapide et aisée de mesure de la MPO dans les fluides biologiques chez le cheval, d'autant plus que, dans le plasma, la mesure des concentrations sanguines en MPO par méthode enzymatique est quasi impossible par l'effet inhibiteur des protéines plasmatiques (Mathy-Hartert *et al.*, 1998). Nous avons mis au point une méthode radio-immunologique de dosage de la MPO équine et établi les valeurs physiologiques normales de MPO dans le plasma de chevaux sains (Deby-Dupont *et al.*, 1998). En utilisant cette technique de dosage de la MPO, nous avons montré une élévation de la concentration plasmatique de la MPO dans les pathologies équines d'étranglement intestinal, avec des valeurs supérieures à celles mesurées dans les pathologies intestinales sans étranglement et des valeurs particulièrement élevées dans les cas qui ne survivront pas à la pathologie (Deby-Dupont *et al.*, 1998; Grülke *et al.*, 1999; Grülke, 2002).

### Rôle de la myéloperoxydase dans les interactions des neutrophiles avec l'endothélium

Une des premières cibles des neutrophiles est l'endothélium. Les cellules endothéliales portent des récepteurs d'adhésion dont l'expression en surface est augmentée sous l'effet des endotoxines et des cytokines, dans le choc hémorragique, dans l'hypoxie et même sous l'effet des variations du flux sanguin (*shear stress*) (Griendling *et al.*, 2000). Un accroissement d'adhésion des neutrophiles à l'endothélium et leur migration dans les tissus interstitiels s'accompagnent d'un risque d'activation et de dégranulation locale entraînant des lésions des parois vasculaires. Il a été démontré

que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires peuvent incorporer la MPO humaine (Zabucchi *et al.*, 1989; Shepperd et Hoidal, 1990; Mathy-Hartert *et al.*, 1995) et qu'elles possèdent une enzyme analogue à la NADPH oxydase des neutrophiles (Meyer *et al.*, 1999; Griendling *et al.*, 2000; Holland *et al.*, 2000), capable de produire O<sub>2</sub><sup>•</sup> et son dérivé H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substrat de la MPO. Les conditions sont ainsi réunies pour le fonctionnement de la MPO *in situ* et la production d'HOCl et d'autres espèces oxydantes.

Dans l'étranglement intestinal chez le cheval, la réaction inflammatoire locale et l'ischémie sont responsables d'une activation des endothéliums vasculaires et de l'appel des neutrophiles, avec des interactions locales conduisant à une aggravation des lésions. Nous avons mis au point un modèle de culture des cellules endothéliales équines, isolées à partir de l'artère carotidienne, permettant l'étude des interactions entre cellules endothéliales et neutrophiles activés. Sur ce modèle, nous avons montré que lorsque les cellules endothéliales sont mises en présence de neutrophiles stimulés (simulation d'une réaction inflammatoire aiguë), il y a adhésion immédiate des neutrophiles et toxicité pour les cellules endothéliales (rétraction cytoplasmique, altérations nucléaires et détachement) en relation avec le nombre des neutrophiles (Benbarek *et al.*, 2000). Cette souffrance endothéliale se manifeste aussi lorsqu'il n'y a pas de contact direct entre cellules endothéliales et les neutrophiles activés : en effet, nous avons observé que les liquides récoltés par centrifugation après l'activation des neutrophiles et mis en contact avec les cellules endothéliales suffisent pour induire une cytotoxicité corrélée à la concentration en MPO active présente dans ces liquides (Benbarek *et al.*, 2000).

Nous utilisons actuellement ce modèle des cellules endothéliales équines en culture pour étudier les effets directs de la MPO sur l'endothélium, particulièrement les effets sur la membrane et sur le métabolisme cellulaire. Ce modèle nous permet aussi l'étude des effets d'une anoxie non létale, suivie d'une réoxygénation de courte durée, sur les interactions entre cellules endothéliales et neutrophiles et sur le rôle particulier de la MPO. Les premiers



résultats indiquent que les neutrophiles équins, ajoutés en fin d'anoxie, adhèrent instantanément aux cellules endothéliales, provoquant des dégâts irréversibles et que l'addition de la MPO, avant le début de la période d'anoxie, augmente les altérations (Serteyn *et al.*, 2000).

## CONCLUSION

La MPO exerce son activité de peroxydase et de chloration dans le phagolysosome avec production d'espèces oxydantes, en interaction avec d'autres espèces oxydantes produites par le neutrophile. Elle participe à la destruction des organismes étrangers et assure la défense anti-infectieuse. Mais son activité doit être contrôlée en restant circonscrite au phagolysosome et au foyer inflammatoire. Libérée en dehors du phagocyte, elle est inactivée d'une manière rapide

mais réversible dans le plasma et peut être toxique pour les cellules et les tissus de l'hôte. Son activité oxydante est particulièrement dangereuse au contact de l'endothélium, dans les espaces interstitiaux et dans les alvéoles pulmonaires. On ne connaît aucun inhibiteur spécifique de son activité qui soit dépourvu de toxicité. Le contrôle de l'activité de la MPO passe donc par une répression de la stimulation et de la dégranulation des neutrophiles, répression qui devra être strictement contrôlée et limitée en temps, car elle peut diminuer la défense de l'hôte dans les réactions inflammatoires consécutives à l'infection.

## Summary

Myeloperoxidase (MPO) is a haemic enzyme present in important amounts ( $\pm$  5% of

weight) in the primary granules of neutrophil polymorphonuclear leucocytes. Together with its peroxidasic activity, MPO has a chlorination activity, producing hypochlorous acid from hydrogen peroxide and chloride anions, which is a strong oxidant, able to chlorinate biomolecules. In phagolysosomes, MPO exerts as a strong bactericidal activity. But, high concentrations of MPO in plasma, biological fluids and tissues are markers of an important or excessive activation of neutrophils. MPO enzymatic activity measurement in plasma is difficult by the presence of albumin; an immunological technique is thus needed to evaluate the total amounts of released MPO.

---

## BIBLIOGRAPHIE

- ABU-SOUD H.M., HAZEN S.L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 2000a, **275**, 5425-5430.
- ABU-SOUD H.M., HAZEN S.L. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J. Biol. Chem.*, 2000b, **275**, 37524-37532.
- AGNER K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta Physiol. Scand.*, 1941, **2**(suppl 8), 1-62.
- ALLEN D., TYLER D.A. Pathophysiology of acute abdominal disease. In : White N.A. (ed.), *The equine acute abdomen*, Lea & Febiger : Philadelphia, 1990, 65-89.
- ARNDT H., KUBES P., GRANGER D.N. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury in the small intestine. *Klin. Wochenschr.*, 1991, **69**, 1056-1060.
- AUSTIN G.E., ZHAO W.G., REGNI A., LU J.P., BRAUN G.E. Identification of an upstream enhancer containing an AML1 site in the human myeloperoxidase (MPO) gene. *Leuk. Res.*, 1998, **22**, 1037-1048.
- BABIOR B.M. NADPH Oxidase: An update. *Blood*, 1999, **93**, 1464-1476.
- BABIOR B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 2000, **109**, 33-44.
- BAKKENIST A.R.J., WEVER R., VULSMA T., PLAT H., VAN GELDER B.F. Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **524**, 45-54.
- BARCLAY W.P., FOERNER J.J., PHILLIPS T.N. Volvulus of the large colon in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1980, **177**, 629-630.
- BARKER I.K., VAN DREUMEL A.A. The alimentary system. In : Jubb W., Kennedy P.C., Palmer N. (eds), *Pathology of domestic animals*. Academic Press : New York 1985, 60-66.
- BENBAREK H., GRULKE S., DEBY-DUPONT G., DEBY C., MATHY-HARTERT M., CAUDRON I., DESSY-DOIZE C., LAMY M., SERTEYN D. Cytotoxicity of stimulated equine neutrophils on equine endothelial cells in culture. *Equine Vet. J.*, 2000, **4**, 327-333.
- BORREGAARD N., COWLAND J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997, **89**, 3503-3521.
- BOSCH X., MIRAPEIX E., FONT J., INGELMO M., REVERT L. Anti-myeloperoxidase antibodies in crescentic glomerulonephritis. *Nephron*, 1991, **59**, 504-505.
- BOSCH X., FONT J., MIRAPEIX E., REVERT L., INGELMO M., URBANO-MARQUEZ A. Antimyeloperoxidase autoantibody-associated necrotizing alveolar capillaritis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, **146**, 1326-1329.
- CARR A.C., VAN DEN BERG J.M., WINTERBOURN C.C. Differential reactivities of hypochlorous and hypobromous acids with purified *Escherichia coli* phospholipid: formation of haloamines and haloalcohols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1392**, 254-264.
- CARR A.C., MYZAK M.C., STOCKER R., MCCALL M.R., FREI B. Myeloperoxidase binds to low density lipoprotein : potential implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.*, 2000, **487**, 176-180.

- CARR A.C., HAWKINS C., THOMAS S.R., STOCKER R., FREI B. Relative reactivities of N-chloramines and hypochlorous acid with human plasma constituents. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 526-536.
- CECH P., LEHRER R.I. Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood*, 1984, **63**, 88-91.
- COCHRANE C.G., SPRAGG R.G., REVAK S.D., COHEN A.B., MCGUIRE W.W. The presence of neutrophil elastase and evidence of oxidation activity in bronchoalveolar lavage fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1983, **127**, 525-527.
- COORAY R., PETERSON C.G.B., HOLMOBERG O. Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1993, **38**, 261-272.
- DAUGHERTY A., DUNN J.L., RATERI D.L., HEINECKE J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.*, 1994, **94**, 437-444.
- DEBY-DUPONT G., GRÜLKE S., CAUDRON I., MATHY-HARTERT M., BENBAREK H., DEBY C., LAMY M., SERTEYN D. Equine myeloperoxidase in plasma: design of a radio-immunoassay and first results in septic pathologies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **66**, 257-271.
- DELEO F.R., GOEDKEN M., MCCORMICK S.J., NAUSEEF W.M. A novel form of hereditary myeloperoxidase deficiency linked to endoplasmic reticulum/proteasome degradation. *J. Clin. Invest.*, 1998, **101**, 2900-2909.
- DUNFORD H.B. Peroxidase-catalyzed halide ion oxidation. *Redox Report*, 2000, **5**, 169-171.
- EDWARDS S.W., NURCOMBE H.L., HART C.A. Oxidative inactivation of myeloperoxidase released from neutrophils. *Biochem. J.*, 1987, **245**, 925-930.
- EHRENBERG A., AGNER K. The molecular weight of myeloperoxidase. *Acta Chem. Scand.*, 1958, **12**, 95-100.
- EISERICH J.P., HRISTOVA M., CROSS C.E., JONES A.D., FREEMAN B.A., HALLIWELL B., VAN DER VLIET A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 1998, **391**, 393-397.
- EL-HAG A., CLARK R.A. Immunosuppression by activated human neutrophils. *J. Immunol.*, 1987, **139**, 2406-2413.
- ENGELMANN I., DORMANN S., SARAN M., BAUER G. Transformed target cell-derived superoxide anions drive apoptosis induction by myeloperoxidase. *Redox Report*, 2000, **5**, 207-214.
- FAYMONVILLE M.E., PINCEMAIL J., DUCHATEAU J., PAULUS J.M., ADAM A., DEBY-DUPONT G., DEBY C., ALBERT A., LARBUISSON R., LIMET R., LAMY M. Myeloperoxidase and elastase as markers of leukocyte activation during cardiopulmonary bypass in humans. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1991, **102**, 309-317.
- FENNA R., ZENG J., DAVEY C. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **316**, 653-656.
- FERRARI S., TAGLIAFICO E., CECCHERELLI G., SELLERI L., CALABRETTA B., DONELLI A., TEMPERANI P., SARTI M., SACCHI S., EMILIA G. Expression of the myeloperoxidase gene in acute and chronic myeloid leukemias : relationship to the expression of cell cycle-related genes. *Leukemia*, 1989, **3**, 423-430.
- FIEDLER T.J., DAVEY C.A., FENNA R.E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 11964-11971.
- FLORIS R., WEVER R. Reaction of myeloperoxidase with its product HOCl. *Eur. J. Biochem.*, 1992, **207**, 697-702.
- FU X., KASSIM S.Y., PARKS W.C., HEINECKE J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 2001, **27**, 41279-41287.
- FURTMÜLLER P.G., BURNER U., JANTSCHKO W., REGELSBERGER G., OBINGER C. The reactivity of myeloperoxidase compound I formed with hypochlorous acid. *Redox Report*, 2000a, **5**, 173-178.
- FURTMÜLLER P.G., OBINGER C., HSUANYU Y., DUNFORD H.B. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride anion. *Eur. J. Biochem.*, 2000b, **267**, 5858-5864.
- GAUT J.P., YEH T.G.C., DUY TRAN H., BYUN J., HENDERSON J.P., RICHTER G.M., BRENNAN M.L., LUSIS A.J., BELAAOUAJ A., HOTCHKISS R.S., HEINECKE J.W. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**, 11961-11966.
- GERBER C.E., KUCI S., ZIPFEL M., NIETHAMMER D., BRUCHELT G. Phagocytic activity and oxidative burst of granulocytes in persons with myeloperoxidase deficiency. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1996, **34**, 901-908.
- GERRITY R.G. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am. J. Pathol.*, 1981, **103**, 181-190.
- GREEN E.M., ADAMS R. New perspectives in circulatory shock: pathophysiologic mediators of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **200**, 1834-1841.
- GRIENDLING K.K., SORESCU D., USHIO-FUKAI M. NAD(P)H Oxidase : role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 2000, **86**, 494-501.
- GRÜLKE S. Les obstructions intestinales chirurgicales chez le cheval: approche clinique, activation leucocytaire et étude du pancréas. Thèse de Doctorat en Sciences Vétérinaires, Université de Liège, 2002, 298 pages.
- GRÜLKE S., BENBAREK H., CAUDRON I., DEBY-DUPONT G., MATHY-HARTERT M., FARNIR F., DEBY C., LAMY M., SERTEYN D. Plasma myeloperoxidase level and polymorphonuclear leukocyte activation in horses suffering from large intestine obstruction requiring surgery: preliminary results. *Can. J. Vet. Res.*, 1999, **63**, 142-147.

- HAMPTON M.B., KETTLE A.J., WINTERBOURN C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 1998, **92**, 3007–3017.
- HARRISON JE, PABALAN S, SCHULTZ J. The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase. *Biochem Biophys Acta* 1977, **493**, 247-259.
- HAWKINS C.L., DAVIES M.J. Hypochlorite-induced damage to proteins : formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.*, 1998, **332**, 617-625.
- HAZELL L.J., STOCKER R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem. J.*, 1993, **290**, 165-172.
- HAZELL L.J., ARNOLD L., FLOWERS D., WAEG G., MALLE E., STOCKER R. Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.*, 1996, **87**, 1535-1544.
- HAZEN S.L., HSU F.F., DUFFIN K., HEINECKE J.W. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes converts low density lipoprotein cholesterol into a family of chlorinated sterols. *J. Biol. Chem.*, 1996a, **271**, 23080-23088.
- HAZEN S.L., HSU F.F., MUELLER D.M., CROWLEY J.R., HEINECKE J.W. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J. Clin. Invest.*, 1996b, **98**, 1283-1289.
- HAZEN S.L., HEINECKE J.W. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed chlorination is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.*, 1997, **99**, 2075-2081.
- HAZEN S.L., D'AVIGNON A., ANDERSON M.M., HSU F.F., HEINECKE J.W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> system to oxidize-amino acids to a family of reactive aldehydes: mechanistic studies identifying labile intermediates along the reaction pathway. *J. Biol. Chem.*, 1998a, **273**, 4997-5005.
- HAZEN S.L., HSU F.F., D'AVIGNON A., HEINECKE J.W. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry*, 1998b, **37**, 6864-6873.
- HELLER J.I., CROWLEY J.R., HAZEN S.L., SALVAY D.M., WAGNER P., PENNATHUR S. p-Hydroxyphenylacetaldehyde, an aldehyde generated by myeloperoxidase, modifies phospholipid amino groups of low density lipoprotein in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 9957–9962.
- HIMMELHOCH R.S., EVANS W.H., MAGE M.G., PETERSON E.A. Purification of myeloperoxidase from the bone marrow of the guinea pig. *Biochemistry*, 1969, **8**, 914-921.
- HOLLAND J.A., O'DONNELL R.W., CHANG M.M., JOHNSON D.K., ZIEGLER L.M. Endothelial cell oxidant production : effect of NADPH oxidase inhibitors. *Endothelium*, 2000, **7**, 109-119.
- HOY A., LEININGER-MULLER B., KUTTER D., SIEST G., VISVIKIS S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002, **40**, 2-8.
- HU, ML., LOUIE, S., CROSS C.E., MOTCHNIK, P., HALLIWELL, B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, 1993, **121**, 257-262.
- INAZAWA J., INOUE K., NISHIGAKI H., TSUDA S., TANIWAKI M., MISAWA S., ABE T. Assignment of the human myeloperoxidase gene (MPO) to bands q21.3----q23 of chromosome 17. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1989, **50**, 135-136.
- IRANI K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. *Circ. Res.*, 2000, **87**, 179-183.
- JACQUET A., DEBY C., MATHY M., MOGUILLEWSKY N., DEBY-DUPONT G., THIRION A., GOORMAGHTIGH E., GARCIA-QUINTANA L., BOLLEN A., PINCEMAIL J. Spectral and enzymatic properties of human recombinant myeloperoxidase : comparison with the mature enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **291**, 132-138.
- JERLICH A., FABJAN J.S., TSCHABUSCHNIG S., SMIRNOVA A., HORAKOVA L., HAYN M., AUER H., GUTTENBERGER H., LEIS H.J., TATZBER F., WAEG G., SCHAUR R.J. Human low density lipoprotein as a target of hypochlorite generated by myeloperoxidase. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, **24**, 1139-1148.
- JOHNSON K., GEMPERLEIN I., HUDSON S., SHANE S., ROVERA G. Complete nucleotide sequence of the human myeloperoxidase gene. *Nucleic Acids Res.*, 1989, **17**, 7985-7986.
- KANTARCI O.H., LESNICK T.G., YANG P., MEYER R.L., HEBRINK D.D., MCMURRAY C.T., WEINSHENKER B.G. Myeloperoxidase -463 (G↔A) polymorphism associated with lower risk of lung cancer. *Mayo Clin. Proc.*, 2002, **77**, 17-22.
- KARLSSON A., DAHLGREN C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid. Redox Signal*, 2002, **4**, 49-60.
- KARNOFSKY J.R., WRIGHT J., MILES-RICHARDSON G.E., TAUBER A. Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *J. Clin. Invest.*, 1984, **74**, 1489-1495.
- KETTLE A.J., WINTERBOURN C.C. Influence of superoxide on myeloperoxidase kinetics measured with a hydrogen peroxide electrode. *Biochem. J.*, 1989, **263**, 823–828.
- KETTLE A.J., WINTERBOURN C.C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Report*, 1997, **3**, 3–15.
- KETTLE A.J., CANDAEIS L.P. Oxidation of tryptophan by redox intermediates of myeloperoxidase and inhibition of hypochlorous acid production. *Redox Report*, 2000, **5**, 179-184.
- KETTLE A.J. Neutrophils convert tyrosin residues in albumin to chlorotyrosine. *FEBS Lett.*, 2000, **379**, 103-106.

- KING C.C., JEFFERSON M.M., THOMAS E.L. Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1997, **61**, 293-302.
- KIZAKI M., MILLER C.W., SELSTED M.E., KOEFFLER H.P. Myeloperoxidase (MPO) gene mutation in hereditary MPO deficiency. *Blood*, 1994, **83**, 1935-1940.
- KLEBANOFF S.J., CLARK R.A. Hemolysis and iodination of erythrocyte components by a myeloperoxidase-mediated system. *Blood*, 1975, **45**, 699-707.
- KLEBANOFF S.J. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 1999, **111**, 383-389.
- KOOTER I.M., MOGUILEVSKY N., BOLLEN A., VAN DER VEEN L.A., OTTO C., DEKKER H.L., WEVER R. The sulfonium ion linkage in myeloperoxidase. Direct spectroscopic detection by isotopic labeling and effect of mutation. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 26794-26802.
- LAMB N.J., QUINLAN G.J., WESTERMAN S.T., GUTTERIDGE J.M.C., EVANS T.W. Nitration of proteins in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome receiving inhaled nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, 1031-1034.
- LEFKOWITZ D.L., MILLS K., MORGAN M., LEFKOWITZ S. Macrophage activation and immuno-modulation by myeloperoxidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1992, **199**, 204-210.
- LINCOLN J.A., LEFKOWITZ D.L., CAIN T., CASTRO A., MILLS K.C., LEFKOWITZ S.S., MOGUILEVSKY N., BOLLEN A. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 3042-3047.
- LOCKSEY R.M., NELSON C., FANKHAUSER J.E., KLEBANOFF S.J. Loss of granule myeloperoxidase during *in vitro* culture of human monocytes correlates with decay in antiprotozoa activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, **36**, 541-548.
- LONDON S.J., LEHMAN T.A., TAYLOR J.A. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res.*, 1997, **57**, 5001-5003.
- LONGHURST C., EHRENSTEIN M.R., LEAKER B., STEVENSON F.K., SPELLERBERG M., CHAPMAN C., LATCHMEN D., ISENBERG D.A., CAMBRIDGE G. Analysis of immunoglobulin variable region genes of a human IgM anti-myeloperoxidase antibody derived from a patient with vasculitis. *Immunology*, 1996, **87**, 334-338.
- MALLE E., WAEG G., SCHREIBER R., GRONE E.F., SATTLER W., GRONE H.J. Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 4495-4503.
- MATHESON N.R., WONG P.S., TRAVIS J. Isolation and properties of human myeloperoxidase. *Biochemistry*, 1981, **20**, 325-330.
- MATHY-HARTERT M., DEBY-DUPONT G., DEBY C., JADOUL L., VANDENBERGHE A., LAMY M. Cytotoxicity induced by neutrophil myeloperoxidase towards human endothelial cells : protection by ceftazidime. *Mediat. Inflamm.*, 1995, **4**, 1-7.
- MATHY-HARTERT M., DEBY-DUPONT G., MELIN P., LAMY M., DEBY C. Cultured macrophages acquire a bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* after incorporation of myeloperoxidase. *Experientia*, 1996, **52**, 1-8.
- MATHY-HARTERT M., BOURGEOIS E., GRÜLKE S., DEBY-DUPONT G., CAUDRON I., DEBY C., LAMY M., SERTEYN D. Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes. *Can. J. Vet. Res.*, 1998, **62**, 127-132.
- MATHY-HARTERT M., DAMAS P., NYS M., DEBY-DUPONT G., CANNIVET J.L., LEDOUX D., LAMY M. Nitrotyrosine proteins in bronchoalveolar lavage fluid of intensive care patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia. *Eur. Respir. J.*, 2000, **16**, 296-301.
- MCCONNICO R.S., WEINSTOCK D., POSTON M.E., ROBERTS M.C. Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1999, **60**, 807-813.
- MEYER J.M., HOLLAND J.A., ZIEGLER L.M., CHANG M.M., BEEBE G., SCHMITT M.E. Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells : a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium*, 1999, **7**, 11-22.
- MIYASAKI K.T., WILSON M.E., COHEN E., JONES P.C., GENCO R.J. Evidence for and partial characterization of three major and three minor chromatographic forms of human neutrophil myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, **246**, 751-764.
- MOGUILEVSKY N., GARCIA-QUINTANA L., JACQUET A., TOURNAY C., FABRY L., PIÉRDARD L., BOLLEN A. Structural and biological properties of human recombinant myeloperoxidase produced by Chinese hamster ovary cell lines. *Eur. J. Biochem.*, 1991, **197**, 605-614.
- MOORE J.N., MORRIS D.D. Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **200**, 1903-1914.
- MOORE R.M., BERTONE A.L., BAILEY M.Q., MUIR W.W., BEARD W.L. Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1454-1463.
- MORISHITA K., KUBOTA N., ASANO S., KAZIRO Y., NAGATA S. Molecular cloning and characterization of cDNA for human myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 3844-3851.
- MORRIS D.D. Endotoxemia in horses: a review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J. Vet. Int. Med.*, 1991, **5**, 167-181.
- MYZAK M.C., CARR A.C. Myeloperoxidase-dependent caspase-3 activation and apoptosis in HL-60 cells : protection by the antioxidants ascorbate and (dihydro)lipoic acid. *Redox Report*, 2002, **7**, 47-53.
- NAGRA R.M., BECHER B., TOURTELLOTTE W.W., ANTEL J.P., GOLD D., PALADINO T., SMITH R.A., NELSON J.R., REYNOLDS W.F. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 1997, **78**, 97-107.

- NAUSEEF W.M. Myeloperoxidase deficiency. *Hemat. Oncol. Clin North. Am.*, 1988, **2**, 135-158.
- NAUSEEF W.M., OLSSON I., ARNLJOTS K. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase: a marker of myeloid cell differentiation. *Eur. J. Haematol.*, 1988, **40**, 97-110.
- NAUSEEF W.M., COGLEY M., MCCORMICK S. Effect of the R569W missense mutation on the biosynthesis of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 9546-9549.
- NAUSEEF W.M., MCCORMICK S., GOEDKEN M. Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase. *Redox Report*, 2000, **5**, 197-206.
- NAUSEEF W.M. Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system. *Int. J. Hematol.*, 2001, **74**, 125-133.
- NISHIZAWA H., YAMAMDA H., MIYAZAKI H., OHARA M., KANEKO K., YAMAKAWA T. WIENER-KRONISH J., KUDOH I. Soluble complement receptor type 1 inhibited the systemic organ injury caused by acid instillation into a lung. *Anesthesiology*, 1996, **85**, 1120-1128.
- NYS M., DEBY-DUPONT G., HABRAKEN Y., LEGRAND-POELS S., KOHNEN S., LEDOUX D., CANIVET JL., DAMAS P., LAMY M. Bronchoalveolar lavage fluids of ventilated patients with acute lung injury activate the NF-kappaB transcription factor in a human epithelial alveolar cell line. *Clinical Science*, 2002, **103**, 577-585.
- OLSSON I., PERSSON A.M., STRÖMBERG K. Biosynthesis, transport and processing of myeloperoxidase in the human leukæmic promyelocytic cell line HL-60 and normal marrow cells. *Biochem. J.*, 1984, **223**, 911-920.
- PASCOE P.J., MCDONELL W.N., TRIM C.M., VAN GORDER J. Mortality rates and associated factors in equine colic operations – A retrospective study of 341 operations. *Can. J. Vet.*, 1983, **24**, 76-85.
- PAUL K., BAUER G. Promyelocytic HL-60 cells induce apoptosis selectively in transformed cells : involvement of myeloperoxidase, nitric oxide and target cell-derived superoxide anions. *Anticancer. Res.*, 2001, **21**, 3237-3246.
- PEPPIN G.J., WEISS S.J. Activation of endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 4322-4326.
- PETRIDES P.E. Molecular genetics of peroxidase deficiency. *J. Mol. Med.*, 1998, **76**, 688-698.
- PODREZ E.A., ABU-SOUD H.M., HAZEN S.L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **28**, 1717-1725.
- RADI R., PELUFFO G., ALVAREZ M.N., NAVILIAT M., CAYOTA A. Unraveling peroxynitrite formation in biological system. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 463-488.
- RAKITA R.M., MICHER B.R., ROSEN H. Differential inactivation of *Escherichia coli* membrane dehydrogenases by a myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Biochemistry*, 1990, **29**, 1075-1080.
- REYNOLDS W.F., RHEES J., MACIEJEWSKI D., PALADINO T., SIEBURG H., MAKI R.A., MASLIAH E. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.*, 1999, **155**, 31-41.
- RIFKIND J.M., ABUGO O., LEVY A., HEIM J. Detection, formation and relevance of hemichromes and hemochromes. *Methods Enzymol.*, 1994, **231**, 449-480.
- ROMANO M., DRI P., DADALT L., PATRIARCA P., BARALLE F.E. Biochemical and molecular characterization of hereditary myeloperoxidase deficiency. *Blood*, 1997, **90**, 4126-4134.
- ROSEN H., KLEBANOFF S.J. Oxidation of microbial iron-sulfur centers by the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halide antimicrobial system. *Infect. Immun.*, 1985, **47**, 613-618.
- ROSEN H., MICHEL B.R. Redundant contribution of myeloperoxidase-dependent systems to neutrophil-mediated killing of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 4173-7178.
- SAMPSON J.B., YE Y., ROSEN H., BECKMANN J.S. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosin nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **356**, 207-213.
- SARAN M., BECK-SPEIER I., FELLERHOFF B., BAUER G. Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 482-490.
- SCHOONBROODT S., LEGRAND-POELS S., BEST-BELPOMME M., PIETTE J. Activation of the NF-kB transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, **321**, 777-785.
- SCHULZE-OSTHOFF K., BAUER M., VOGT M., WESSELBORG S., BAEUERLE P.A. Reactive oxygen intermediates as primary signals and second messengers in the activation of transcription factors. In : Forman H.J., Cadenas E. (eds), *Oxidative stress and signal transduction*. Chapman and Hall : New York, 1997, 32-51.
- SCHWARTZ M.D., MOORE E.E., MOORE F.A., SHENKAR R., MOINE P., HAENEL J.B., ABRAHAM E. Nuclear factor-kB is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.*, 1996, **24**, 1285-1292.
- SEAHORN T.L., GUANT S.D., BERRY C. Blood cell deformability in horses with intestinal colic. *Am. J. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **55**, 321-324.
- SEGAL A.W., GEISOW M., GARCIA R., HARPER A., MILLER R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 1981, **290**, 406-409.
- SEGELMARK M., PERSSON B., HELLMARK T., WIESLANDER J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO) : a major function of ceruloplasmin. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, **108**, 167-174.
- SERTEYN D., CAUDRON I., SZOKE M., FONTAINE G., STACQUEZ S., CHEVE D. Diagnosis and prognosis of the surgical intestinal pathologies in horses. *Prat. Vét. Equine*, 1994, **26**, 135-145.

- SERTEYN D., GRÜLKE S., MOUTHYS-MICKALAD A., DEBY-DUPONT G. Anoxia-reoxygenation enhanced the myeloperoxidase cytotoxicity on equine endothelial cells in culture. 10<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (SFFR 2000), Kyoto 16-20 octobre 2000, Abstract Book p 69.
- SHEPPERD V.L., HOIDAL J. Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1990, **2**, 335-340.
- SHISHIDO N., NAKAMURA S., NAKAMURA M. Dissociation of DNA double strand by hypohalous acids. *Redox Report*, 2000, **5**, 243-247.
- SITTIPUNT C., STEINBERG K.P., RUZINSKI J.T., MYLES C., ZHU S., GOODMAN R.B., HUDSON L.D., MATALON S., MARTIN T.R. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, **163**, 503-510.
- SNYDER J.R., PASCOE J.R., OLANDER H.J., SPIER S.J., MEAGHER D.M., BLEIFER D.R. Strangulating volvulus of the ascending colon in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **195**, 757-764.
- SNYDER J.R., PASCOE J.R., OLANDER H.J., HARMON F.A., HINDS D.M., VATISTASA N.J., TYLER W.S. Ultrastructural mucosal injury after experimental ischemia of the ascending colon in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 1917-1924.
- SONG M., SANTANAN N. Increased myeloperoxidase and lipid peroxide-modified protein in gynecological malignancies. *Antioxid. Redox Signal*, 2001, **3**, 1139-1146.
- STENDAHL O., COBLE B.I., DAHLGREN C., HED J., MOLIN L. Myeloperoxidase modulates the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Studies with cells from a myeloperoxidase-deficient patient. *J. Clin. Invest.*, 1984, **73**, 366-373.
- SUTER P.M., SUTER S., GIRARDIN E., ROUX-LOMBARD P., GRAU G.E., DAYER J.M. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, **145**, 1016-1022.
- SUZUKI Y.J., FORMAN H.J., SEVANI A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, **22**, 269-285.
- TAUROG A., DORRIS M.L. Myeloperoxidase-catalyzed iodination and coupling. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **296**, 239-246.
- THANNICKAL V.J., FANBURG B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000, **279**, L1005-L1028.
- THOMAS E.L., JEFFERSON M.M., LEARN D.B., KING C.C., DABBOUS M. Myeloperoxidase-catalyzed chlorination of histamine by stimulated neutrophils. *Redox Report*, 2000, **5**, 191-196.
- TOBLER A., KOEFFLER H.P. Myeloperoxidase: localization, structure, and function. In : Harris G.R. (ed), Blood cell biochemistry 3. Lymphocytes and granulocytes. Plenum Press : New York, 1991, 255-288.
- TOBLER A., MILLER C.W., JOHNSON K.R., SELSTED M.E., ROVERA G., KOEFFLER H.P. Regulation of gene expression of myeloperoxidase during myeloid differentiation. *J. Cell Physiol.*, 1988, **136**, 215-225.
- TRAWEEK S.T., LIU J., BRAZIEL R.M., JOHNSON R.M., BYRNES R.K. Detection of myeloperoxidase gene expression in minimally differentiated acute myelogenous leukemia (AML-M0) using *in situ* hybridization. *Diagn. Mol. Pathol.*, 1995, **4**, 212-219.
- VAN DALEN J., WINTERBOURN C., SENTHILMOHAN R., KETTLE A.J. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 11638-11644.
- TRIM C.M., BARTON M.H., QUANDT J.E. Plasma endotoxin concentrations in anesthetized horses with colic. *Vet. Surgery*, 1997, **26**, 2, 163.
- VAN DER VLIET A., EISERICH J., HALLIWELL B., CROSS C.E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 7617-7625.
- VAN DER VLIET A., EISERICH J.P., SHIGENAGA M.K., CROSS C.E. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. Epiphenomena or a pathophysiological mechanism of disease? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, 1-9.
- WEIL S.C., ROSNER G.L., REID M.S., CRISHOLM R.L., LEMONS R.S., SWANSON M.S., CARRINO J.J., DIAZ M.O., LE BEAU M.M. Translocation and rearrangement of myeloperoxidase gene in acute promyelocytic leukemia. *Science*, 1988, **240**, 790-792.
- WEILAND J.E., DAVIS W.B., HOLTER J.F., MOHAMMED J.R., DORINSKY P.M., GADEK J.E. Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1986, **133**, 218-225.
- WEISS S.J. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 365-376.
- WEISS S.J., PEPPIN G., ORTIZ X., RAGSDALE C., TEST S.T. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science*, 1985, **227**, 747-749.
- WHITE N.A., MOORE J.N., TRIM C.M. Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 193-198.
- WHITMAN S.C., HAZEN S.L., MILLER D.B., HEGELE R.A., HEINECKE J.W., HUFF M.W. Modification of type III VLDL, their remnants, and VLDL from ApoE-knockout mice by p-hydroxyphenyl- acetaldehyde, a product of myeloperoxidase activity, causes marked cholesteryl ester accumulation in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, **19**, 1238-1249.
- WINTERBOURN C.C., GARCIA R., SEGAL A.W. Production of the superoxide adduct of myeloperoxidase (compound III) by stimulated neutrophils, and its reactivity with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and chloride. *Biochem. J.*, 1985, **228**, 583-592.
- WINTERBOURN C.C., BRENNAN S.O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, **326**, 87-92.

- WINTERBOURN C.C., KETTLE A.J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **29**, 403-409.
- WRIGHT C.D., NELSON R.D. Candidacidal activity of myeloperoxidase: characterization of myeloperoxidase-yeast complex formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **154**, 809-817.
- YAMADA M., YOSHIDA M., HASHINAKA K. Identification of transcriptional cis-elements in introns 7 and 9 of the myeloperoxidase gene. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 13479-13485.
- YARBROUGH J.B., SNYDER J.R., HARMON F.A., O'CONNELL K.A. Evaluation of myeloperoxidase concentrations in experimentally induced equine colonic ischemia and reperfusion. *Equine Vet.*, 1994, **26**, 67-69.
- ZABUCCHI G., SORANZO M.R., MENEGAZZI R., BERTONCIN P., NARDON E., PATRIARCA P. Uptake of human eosinophil peroxidase and myeloperoxidase by cells involved in the inflammatory process. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, **37**, 499-508.
- ZAKI S.R., AUSTIN G.E., SWAN D.C., HOOPER W.C., GREER P.W., EVATT B.L., CHAN W.C. Studies of myeloperoxidase gene expression at the cellular level by *in situ hybridization*. *Leukemia*, 1990, **4**, 813-818.
- ZHANG R., BRENNAN M.L., FU X., AVILES R.J., PEARCE G.L., PENN M.S., TOPOL E.J., SPRECHER D.L., HAZEN S.L. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 2001, **286**, 2136-2142.
- ZHAO W.G., REGMI A., AUSTIN E.D., BRAUN J.E., RACINE M., AUSTIN G.E. Cis-elements in the promoter region of the human myeloperoxidase (MPO) gene. *Leukemia*, 1996, **10**, 1089-1093.