

50376  
1994  
167

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
LILLE - FLANDRES - ARTOIS

50376  
1994  
167

**THESE**

présentée par

**PHILIPPE BECUWE**

pour l'obtention du

**DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**LES SUPEROXYDE DISMUTASES DE  
PLASMODIUM ET BABESIA:  
CONTRIBUTION A LEUR CARACTERISATION**

Soutenu le 15 Mars 1994

Composition du jury:

Pr <i>A. FAVIER</i>	Président
Dr <i>D. MAZIER</i>	Rapporteur
Dr <i>D. TOUATI</i>	Rapporteur
Pr <i>J.L. BERNIER</i>	Examineur
Pr <i>R. CACAN</i>	Examineur
Pr <i>D. CAMUS</i>	Examineur
Dr <i>D. DIVE</i>	Examineur

UNITE DE BIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE PARASITAIRES ET FONGIQUES  
INSERM U 42, VILLENEUVE D'ASCQ

*Je dédie cette thèse*

*à mes parents*

*à mes frères*

*qu'ils reçoivent toute ma  
reconnaissance et mon  
affection car leur soutien et  
leurs encouragements ont  
contribué à l'aboutissement  
de cette thèse*

**Ce travail s'est effectué à l'Unité de Biologie et de Biochimie Parasitaires et Fongiques de l'institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U 42) et a reçu le soutien financier de la UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Pr *D. Camus* de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour accomplir cette thèse. La confiance qu'il m'a portée et ses conseils pertinents ont sans aucun doute contribué à la réalisation de ce travail. C'est un honneur pour moi de le compter parmi les membres du jury. Je lui adresse mes plus vifs remerciements.

Je tiens également à remercier le Dr *D. Dive* pour la confiance qu'il m'a portée au cours de ces trois années. Qu'il sache combien j'ai pu apprécier les discussions scientifiques que nous avons entretenues, ainsi que sa grande expérience. Je le remercie également pour sa sincérité, sa grande disponibilité et sa gentillesse. Que cette thèse soit pour moi l'occasion de lui adresser mes plus vifs remerciements et mes respectueuses considérations.

C'est un honneur pour moi de compter parmi les membres du jury le Pr *A. Favier*, président du jury, ainsi que le Pr *J.L. Bernier*, le Pr *R. Cacan*, le Dr *D. Mazier* et le Dr *D. Touati*. Je leur adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie particulièrement *Marie-Noëlle Fourmaux* pour le temps qu'elle m'a consacré et le savoir faire qu'elle m'a transmis en biologie moléculaire. Je remercie également *Carmen Odberg-Ferragut* pour ses précieux conseils. Qu'elles reçoivent tous mes remerciements et ma profonde sympathie.

Je tiens également à remercier le Pr *J. Van Beeumen*, de l'Université de Gand pour la collaboration scientifique que nous avons entretenue. Qu'il sache combien j'ai apprécié son efficacité, sa disponibilité et sa sympathie. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je voudrais remercier le Dr *J.P. Touzel* du laboratoire de l'INRA, Villeneuve d'Ascq pour sa disponibilité et l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans ce travail.

Je voudrais remercier *Christian Slomianny* pour sa grande disponibilité et pour ses nombreux dépannages informatiques. Qu'il sache que j'ai apprécié sa pertinence scientifique et qu'il reçoive mes plus vifs remerciements.

Je tiens tout particulièrement à remercier *Bernadette Leu*, *Annick Masset*, *Marlène Mortuaire* et *Etienne Dewailly* pour leur aide dans la réalisation de ce travail. Je remercie également *Thierry Jouault* pour son aide dans la réalisation des graphiques. Je voudrais enfin exprimer toute ma reconnaissance et ma sincère amitié à tous les membres de l'Unité 42, chercheurs, étudiants, techniciens et tout le personnel. Qu'ils sachent que j'ai beaucoup apprécié au cours de ces trois années leur sympathie ainsi que l'ambiance qu'ils ont créée.

## SOMMAIRE

ABREVIATIONS .....	1
NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES ACIDES AMINES .....	2
INTRODUCTION .....	3
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	6
<b>CHAPITRE 1 : PALUDISME ET BABESIOSES .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. PLASMODIUM .....</b>	<b>7</b>
1.1.1. Systématique de <i>Plasmodium</i> .....	7
1.1.2. Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> .....	9
1.1.2.1. Le cycle chez le vertébré .....	9
1.1.2.2. Chez le moustique .....	10
<b>1.2. BABESIA .....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Systématique de <i>Babesia</i> .....	12
1.2.2. Cycle biologique de <i>Babesia</i> .....	12
1.2.2.1. Chez l'hôte vertébré .....	12
1.2.2.2. Chez l'hôte invertébré .....	13
<b>CHAPITRE 2 : LE CHOC OXYDATIF .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. DEFINITION .....</b>	<b>15</b>
2.1.1. Les espèces activées de l'oxygène (EAO) .....	15
2.1.1.1. Les différentes formes d'EAO .....	15
2.1.1.2. Origines des EAO .....	18
2.1.2. Effets biologiques .....	20
2.1.2.1. Peroxydation des lipides .....	20
2.1.2.2. Dégradation des protéines .....	21
2.1.2.3. Altérations de l'ADN .....	22
2.1.2.4. Autres molécules .....	22
<b>2.2. LES SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LE CHOC OXYDATIF ..</b>	<b>23</b>
<b>2.3. REGULATION DE LA DEFENSE CONTRE LE CHOC OXYDATIF</b>	<b>25</b>
<b>CHAPITRE 3 : LES SUPEROXYDE DISMUTASES (SOD) .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. TYPES DE SOD ET LEURS DISTRIBUTIONS CHEZ LES ETRES</b>	<b>27</b>
<b>VIVANTS .....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Les types de SOD .....	27
3.1.2. Distribution des différentes SOD chez les êtres vivants .....	28
3.1.2.1. Chez les Procaryotes .....	28
3.1.2.2. Chez les Eucaryotes .....	29
<b>3.2. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES ...</b>	<b>31</b>
3.2.1. Caractéristiques générales .....	31
3.2.1.1. Les SOD Cu/Zn .....	31
3.2.1.2. Les SOD-Fe et Mn .....	31
3.2.1.3. Action des inhibiteurs .....	32
3.2.2. Structure primaire .....	33
3.2.2.1. La SOD Cu/Zn .....	33
3.2.2.2. Les SOD-Fe et Mn .....	33
3.2.3. Organisation structurale des SOD .....	34
3.2.3.1. Les SOD Cu/Zn .....	34
3.2.3.2. Les SOD-Fe et Mn .....	34

3.2.4. Activité catalytique des SOD .....	35
3.2.4.1. La SOD Cu/Zn .....	35
3.2.4.2. Les SOD-Fe et Mn .....	36
3.2.4.3. Stabilité de l'activité des SOD .....	36
3.3. REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA SOD .....	37
3.3.1. Les inducteurs .....	37
3.3.1.1. L'oxygène et l'anion superoxyde .....	37
3.3.1.2. Le choc thermique .....	38
3.3.1.3. Les cytokines .....	38
3.3.2. Le métal cofacteur .....	38
3.3.3. Régulation de la SOD-Mn chez <i>E. coli</i> .....	39
CHAPITRE 4 : <i>PLASMODIUM</i> ET CHOC OXYDATIF .....	40
4.1. SENSIBILITE DE <i>PLASMODIUM</i> AUX ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE .....	40
4.1.1. Données épidémiologiques .....	40
4.1.2. Données expérimentales .....	41
4.2. ORIGINE DU CHOC OXYDATIF CHEZ <i>PLASMODIUM</i> .....	42
4.2.1. Production d'EAO par le parasite .....	42
4.2.2. Fragilisation de l'hématie parasitée .....	43
4.2.3. Molécules antimalariques .....	46
4.3. LE SYSTEME ENZYMATIQUE DE DEFENSE DE <i>PLASMODIUM</i> .....	47
4.3.1. La SOD .....	47
4.3.2. Les autres enzymes .....	48
RESULTATS EXPERIMENTAUX .....	51
CHAPITRE 1 : LA SUPEROXYDE DISMUTASE DE <i>BABESIA</i> .....	52
1.1. RESULTATS .....	52
1.1.1. Mise en évidence de la SOD chez <i>Babesia hylomysci</i> et <i>B.</i> <i>divergens</i> .....	52
1.1.2. Purification, caractérisation et microséquençage N-terminal de la SOD de <i>Babesia hylomysci</i> .....	56
1.1.2.1. Purification et caractérisation .....	56
1.1.2.2. Microséquençage N-terminal .....	60
1.1.3. Préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre la SOD de <i>B.</i> <i>hylomysci</i> .....	63
1.1.4. Article 1 .....	66
1.1.5. Article 2 .....	72
1.2. DISCUSSION .....	84
CHAPITRE 2 : LA SUPEROXYDE DISMUTASE DE <i>PLASMODIUM</i> .....	86
2.1. RESULTATS .....	86
2.1.1. Mise en évidence de la superoxyde dismutase chez différentes espèces de <i>Plasmodium</i> .....	86
2.1.1.1. Activités spécifiques .....	86
2.1.1.2. Isoélectrofocalisation .....	86
2.1.1.3. Tests d'inhibition .....	91
2.1.1.4. Article 3 .....	94
2.1.2. Purification et microséquençage N-terminal de la SOD de <i>P.</i> <i>falciparum</i> .....	98
2.1.2.1. Purification et caractérisation .....	98

2.1.2.2. Microséquençage N-terminal .....	102
2.1.3. Préparation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la SOD de <i>P. falciparum</i> .....	105
2.1.3.1. Reconnaissance du peptide synthétique correspondant à l'extrémité N-terminale de la SOD .....	105
2.1.3.2. Reconnaissance de la SOD de <i>P. falciparum</i> .....	108
2.1.4. Approche moléculaire .....	111
2.1.4.1. Amplification d'un fragment d'ADN génomique par PCR .....	111
2.1.4.2. Clonage du fragment amplifié .....	111
2.1.4.3. Séquençage du fragment cloné .....	113
2.1.4.4. Analyse comparative de la séquence peptidique ...	113
2.1.4.5. Hybridation avec l'ADN génomique .....	113
2.1.5. Article 4 .....	119
2.1.6. Localisation de la SOD de l'hôte internalisée par <i>Plasmodium</i>	135
2.2. DISCUSSION .....	137
 DISCUSSION GENERALE .....	 144
 CONCLUSION GENERALE .....	 152
 MATERIELS ET METHODES .....	 154
CHAPITRE 1 : PRODUCTION ET ISOLEMENT DES PARASITES .....	155
1.1. SOUCHES DE PARASITES UTILISEES .....	155
1.2. PRODUCTION DES PARASITES .....	156
1.2.1. Production <i>in vivo</i> chez la souris .....	156
1.2.2. Culture de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i> .....	156
1.3. ISOLEMENT DES PARASITES .....	157
CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'ACTIVITE SOD .....	158
2.1. PREPARATION DES HOMOGENATS PARASITAIRES .....	158
2.1.1. Lyse des parasites .....	158
2.1.2. Dosage des protéines .....	158
2.1.3. Dosage de l'hémoglobine .....	158
2.2. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE SOD SUR GELS .....	159
2.2.1. Isoélectrofocalisation .....	159
2.2.2. Electrophorèse verticale en conditions non dénaturantes ...	160
2.2.3. Révélation de l'activité SOD .....	160
2.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE SOD .....	161
2.3.1. Méthode au ferricytochrome c .....	161
2.3.1.1. Réactifs .....	161
2.3.1.2. Protocole de dosage .....	161
2.3.2. Méthode au pyrogallol .....	163
2.3.2.1. Réactifs .....	164
2.3.2.2. Protocole de dosage .....	164
2.3.3. Préparation du témoin globule rouge .....	166
CHAPITRE 3 : PURIFICATION ET MICROSEQUENCAGE DE LA SOD ....	167
3.1. PURIFICATION DE LA SOD DE <i>BABESIA HYLOMYSCI</i> .....	167
3.1.1. Chromatographie échangeuse d'ions .....	167
3.1.2. Gel filtration .....	168
3.1.3. Electrophorèse préparative et électroélution .....	168

3.2. PURIFICATION DE LA SOD DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> ..	169
3.2.1. Gel filtration .....	169
3.2.2. Chromatographie échangeuse d'ions .....	169
3.2.3. Electrophorèse préparative et électroélution .....	170
3.3. CONTROLE DE LA PURIFICATION .....	170
3.3.1. Electrophorèse en SDS-PAGE .....	170
3.3.2. Coloration des protéines au nitrate d'argent .....	170
3.3.2.1. Coloration au nitrate d'argent .....	170
3.4. MICROSEQUENCAGE .....	171
CHAPITRE 4: PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-SOD DE <i>BABESIA</i> ET <i>PLASMODIUM</i> .....	172
4.1. PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-SOD DE <i>PLASMODIUM</i> .....	172
4.1.1. Couplage du peptide à une protéine porteuse .....	172
4.1.2. Immunisation des lapins .....	173
4.1.3. Détection des anticorps spécifiques .....	173
4.1.3.1. ELISA .....	173
4.1.3.3. Electrotransfert et Immunoempreinte (Western Blot)	173
4.1.3.2. Epuisement du sérum contre la BSA .....	174
4.2. IMMUNOLOCALISATION DE LA SOD INTERNALISEE PAR LE PARASITE .....	175
4.2.1. Préparation des coupes .....	175
4.2.2. Réaction immunologique .....	175
CHAPITRE 5: APPROCHE MOLECULAIRE .....	176
5.1. PREPARATION DE L'ADN GENOMIQUE DE <i>Plasmodium falciparum</i>	176
5.2. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR) .....	176
5.2.1. Préparation des amorces de PCR .....	176
5.2.2. Réaction d'amplification .....	177
5.2.3. Analyse du fragment amplifié .....	177
5.3. CLONAGE DU FRAGMENT AMPLIFIE .....	177
5.3.1. Préparation du fragment amplifié .....	177
5.3.2. Insertion dans un vecteur plasmidique .....	178
5.3.3. Transformation des bactéries .....	178
5.3.4. Recherche des transformants .....	178
5.4. SEQUENCAGE DU FRAGMENT AMPLIFIE .....	179
5.4.1. Préparation du plasmide .....	179
5.4.2. Réaction de séquence .....	180
5.4.3. Préparation du gel de séquence et électrophorèse .....	180
5.4.4. Autoradiographie .....	181
5.5. ANALYSE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DE LA SOD .....	181
5.6. HYBRIDATION AVEC L'ADN GENOMIQUE .....	182
5.6.1. Marquage de la sonde .....	182
5.6.2. Digestion de l'ADN génomique .....	182
5.6.3. Electrophorèse et transfert (Southern Blot) .....	182
5.6.4. Réaction d'hybridation .....	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	184

## ABREVIATIONS

<b>Arc</b>	"Aerobic respiration control"
<b>BSA</b>	Albumine Sérique Bovine
<b>CI 50</b>	Concentration inhibitrice à 50%
<b>DEAE-Trisacryl</b>	Di Ethyl Amino Ethyl-Trisacryl
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DTPA</b>	Diéthylène Triamine Penta acide Acétique
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EAO</b>	Espèces Activées de l'Oxygène
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>ELISA</b>	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
<b>Fur</b>	"Ferric uptake regulation"
<b>G6PDH</b>	Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase
<b>GPx</b>	Glutathion Peroxydase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>Hepes</b>	Acide N-2-HydroxyéthylPipérazine-N-2'-éthanesulfonique
<b>HPGPx</b>	HydroPéroxyde Glutathion Peroxydase membranaire d'Ursini
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>IL-1,6</b>	Interleukine
<b>IPTG</b>	Iso Propyl- $\beta$ -D-Thio Galactoside
<b>kb</b>	kilobase
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide bactérien
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Déoxyribose Phosphate
<b>NBT</b>	Nitro Bleu de Tétrazolium
<b>OVA</b>	Ovalbumine ou albumine d'oeuf
<b>pb</b>	paire de base
<b>PBS</b>	"Phosphate Buffered Salin"
<b>PBSO</b>	PBS avec 1% d'OVA
<b>PCR</b>	"Polymerase Chain Reaction"
<b>pI</b>	point Isoélectrique
<b>PMSF</b>	PhénylméthylsulfonylFluoride
<b>RPMI</b>	"Roswell Park Memorial Institute"
<b>SDS</b>	Dodécyl Sulfate de Sodium
<b>SDS-PAGE</b>	Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide-SDS
<b>SOD</b>	Superoxyde Dismutase
<b>TAE</b>	Tris-Acétate-EDTA
<b>TBE</b>	Tris-Borate-EDTA
<b>Temed</b>	N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine
<b>TES</b>	Triéthanolamine-EDTA-Sucrose
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	"Tumor Necrosis Factor"
<b>Tris</b>	Tris hydroxyméthyl aminométhane
<b>Ve</b>	Volume d'élution
<b>Vo</b>	Volume d'exclusion
<b>X Gal</b>	5 bromo-4-chloro-3 indolyl $\beta$ D galactopyranoside

**NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES ACIDES AMINES**

<b>Alanine</b>	Ala	A
<b>Arginine</b>	Arg	R
<b>Asparagine</b>	Asn	N
<b>Acide Aspartique</b>	Asp	D
<b>Cystéine</b>	Cys	C
<b>Glutamine</b>	Gln	Q
<b>Acide Glutamique</b>	Glu	E
<b>Glycine</b>	Gly	G
<b>Histidine</b>	His	H
<b>Isoleucine</b>	Ile	I
<b>Leucine</b>	Leu	L
<b>Lysine</b>	Lys	K
<b>Méthionine</b>	Met	M
<b>Phénylalanine</b>	Phe	F
<b>Proline</b>	Pro	P
<b>Sérine</b>	Ser	S
<b>Thréonine</b>	Thr	T
<b>Tryptophane</b>	Trp	W
<b>Tyrosine</b>	Tyr	Y
<b>Valine</b>	Val	V

## **INTRODUCTION**

Le paludisme ou malaria représente la première endémie mondiale. Cette parasitose est causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* dont l'espèce la plus redoutable pour l'homme puisque responsable d'accès pernicieux, est *P. falciparum*. Chaque année, plus de cent millions de cas par an sont recensés, avec une mortalité d'environ 2 millions de personnes, principalement des enfants en bas âge en zone africaine. Toutes les populations vivant dans les régions intertropicales peuvent être considérées en zone endémique paludéenne, donc à risque. La lutte contre le paludisme, qui est une préoccupation prioritaire de l'Organisation Mondiale de la Santé, montre depuis quelques années des perspectives défavorables. En effet, la vaccination, qui représente le moyen le plus efficace pour lutter contre la maladie, n'apparaît plus actuellement comme une solution proche, et restera longtemps trop onéreuse pour être appliquée en masse dans les pays en voie de développement. Sur le plan prophylactique et thérapeutique, la chloroquine reste toujours le médicament de base, malgré l'extension croissante de la résistance qui tend à se généraliser à toute la zone d'endémie. L'utilisation d'autres molécules antimalariques susceptibles de remplacer la chloroquine, tels la méfloquine et les antifolates, a induit rapidement l'apparition de résistances, et conduit à des situations critiques, notamment en Asie du Sud-Est. Peu de molécules nouvelles sont disponibles actuellement (artémisinine et ses dérivés, naphthoquinones), et la démarche de criblage systématique de dizaines de milliers de molécules, qui avait abouti à la sélection de la méfloquine et de l'halofantrine, est très long et peu productif, face à la rapidité d'adaptation du parasite.

Ceci incite à adopter une nouvelle démarche pour le développement de nouveaux antimalariques, qui consiste à définir des cibles métaboliques potentielles, dont le rôle est indispensable pour la survie du parasite, pour ensuite essayer de les bloquer par des inhibiteurs spécifiques. Cette démarche n'est pas à l'abri de mécomptes, comme en témoigne le travail réalisé sur l'Atovaquone (naphthoquinone), ciblant des enzymes mitochondriales, et à laquelle le parasite semble s'adapter très rapidement, mais une telle approche apparaît plus rationnelle que le criblage systématique empirique.

Des travaux approfondis ont été ainsi entrepris chez *Plasmodium*, dans le but de bloquer la synthèse des phospholipides ou des acides nucléiques. Une autre voie qui mérite également d'être développée est celle du choc oxydant. Depuis quelques années, il a été clairement établi que ce parasite est sensible aux espèces activées de l'oxygène ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,

OH°), produites au cours de son développement dans l'hématie, ou lors de la réaction immune de l'hôte. Son système propre de défense contre les espèces activées de l'oxygène est encore très mal connu, et il est encore admis aujourd'hui que *Plasmodium* bénéficie du potentiel enzymatique de défense de sa cellule-hôte. On ignore donc ses possibilités d'adaptation au choc oxydant, dont l'étude s'avère indispensable si on veut estimer correctement le risque potentiel d'apparition de formes résistantes aux molécules oxydantes, tels les endoperoxydes dérivés de l'artémisinine qui représentent les antimalariques de l'avenir. Une bonne connaissance de ce système de défense peut également conduire à la découverte de nouvelles cibles potentielles pour développer de nouveaux antimalariques.

La présente étude consiste à approfondir nos connaissances sur les enzymes de défense de *Plasmodium*. Nous avons cherché à mettre en évidence et à caractériser l'une des enzymes de défense contre le choc oxydant, la superoxyde dismutase (SOD) chez *P. falciparum*, chez des espèces de *Plasmodium* de rongeurs et chez un autre protozoaire parasite de l'hématie, *Babesia*, agent de la piroplasmose chez de nombreux animaux domestiques. Notre approche, réalisée par des techniques de biochimie et de biologie moléculaire, nous a permis de caractériser de façon précise la SOD de *P. falciparum* et de *B. hylomysci*, en particulier en ce qui concerne le métal cofacteur de ces enzymes. Nous avons également mis au point les outils nécessaires à l'étude future de l'expression de l'enzyme chez *Plasmodium*, et en particulier son inductibilité éventuelle par un choc oxydant. Nous avons enfin pu apporter des résultats nouveaux sur le devenir de la SOD de l'hématie après son internalisation par *Plasmodium*, qui semblent montrer qu'elle ne pourrait pas assurer à elle seule la défense du parasite contre les espèces activées de l'oxygène. Ceci renforce donc l'intérêt de l'étude de l'enzyme parasitaire en tant que cible pour la définition de nouveaux antimalariques.

**PREMIERE PARTIE :**  
**ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE 1 : PALUDISME ET BABESIOSES

Le paludisme (ou malaria) et les babesioses (ou piroplasmoses) sont des maladies provoquées par le développement, chez des organismes vertébrés, de protozoaires parasites (*Plasmodia* et *Babesia* respectivement) appartenant au phylum des *sporozoa*. L'hôte vertébré est en fait un hôte intermédiaire car la phase sexuée du cycle s'effectue chez un hôte invertébré (insecte ou acarien). Chez l'hôte vertébré, la partie la plus importante du cycle s'effectue dans les érythrocytes. Une présentation brève des *Plasmodia* et des *Babesia* est nécessaire pour justifier le choix des modèles adoptés dans ce travail.

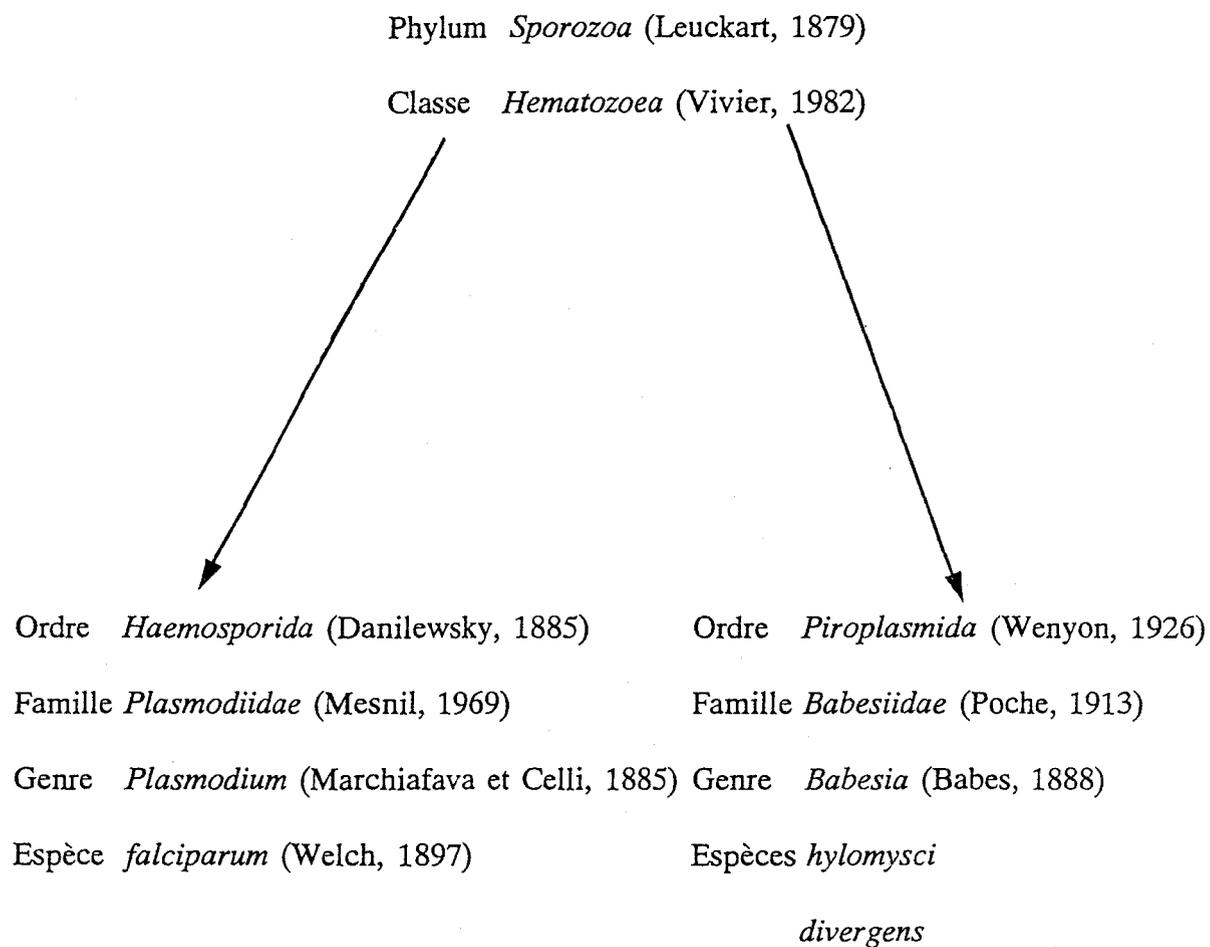
### 1.1. *PLASMODIUM*

#### 1.1.1. Systématique de *Plasmodium*

La classification de *Plasmodium* est donnée dans la **figure I.1**.

Les Plasmodiidae parasitent de nombreux vertébrés (reptiles, oiseaux, mammifères). Nous nous attacherons ici particulièrement aux *Plasmodium* qui infectent l'homme et ceux hébergés par les rongeurs.

Quatre espèces de *Plasmodium* parasitent l'homme *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Parmi ces 4 espèces, *P. falciparum* est la plus redoutable car elle est à l'origine des accès graves et pernicioeux de malaria. C'est aussi la seule espèce qui puisse être maintenue en culture *in vitro* pendant des périodes prolongées d'une façon reproductible. De nombreuses espèces de *Plasmodium* parasitent les rongeurs.



**Figure I.1:** Systématique de *Plasmodium* et *Babesia*.

### 1.1.2. Cycle biologique de *Plasmodium* (Fig.I.2)

Le cycle se déroule chez deux hôtes différents: le vertébré où s'accomplit la phase de multiplication asexuée et un insecte Diptère du genre *Anopheles* où se déroule la phase de multiplication sexuée. Les femelles d'anophèles, seules hématophages, sont les vecteurs spécifiques.

#### 1.1.2.1. Le cycle chez le vertébré

##### - Phase exoérythrocytaire

La piqûre d'une femelle anophèle infectée introduit dans la circulation sanguine des formes parasitaires infestantes, les sporozoïtes. Ceux-ci gagnent le foie en quelques minutes et pénètrent dans les hépatocytes. Les sporozoïtes subissent alors une phase de multiplication asexuée à l'intérieur de l'hépatocyte (phase exoérythrocytaire) pour donner naissance à des schizontes hépatiques. A maturité, ceux-ci éclatent pour libérer des mérozoïtes qui vont gagner la circulation sanguine et envahir les hématies. On peut signaler chez *P. vivax*, l'existence de formes hépatiques dormantes (hypnozoïtes) qui peuvent être à l'origine d'accès isolés survenant après de longs délais.

##### - Phase érythrocytaire

Lors de cette phase, les mérozoïtes pénètrent dans les hématies et s'y développent en passant par les stades anneau, trophozoïte, puis schizonte (Fig.I.3 A, B, C, D). Lors de la pénétration du mérozoïte, la membrane de l'hématie s'invagine pour former une vacuole parasitophore dans laquelle le parasite va vivre et se développer. Il croît alors rapidement en un jeune trophozoïte entouré de deux membranes: sa propre membrane cytoplasmique et la membrane de la vacuole parasitophore qui dérive de l'hématie, mais dont les composants sont modifiés au cours du développement du parasite. Au cours de sa croissance, le parasite internalise le contenu de l'hématie hôte, par un phénomène de pinocytose au cours du stade anneau, puis au cours du stade trophozoïte par formation d'un cytotome d'où dérive un tube cytotomal, à partir duquel se développent des vésicules d'endocytose (Fig.I.3 E) (Slomianny et coll. 1985). La dégradation de l'hémoglobine au sein des vacuoles digestives ainsi formées, conduit à l'apparition du pigment malarique par intervention d'une hème polymérase (Slater et Cerami, 1992). Au stade schizonte, les différentes vacuoles digestives fusionnent pour ne donner qu'une vésicule résiduelle. L'évolution du trophozoïte en schizonte passe aussi par des

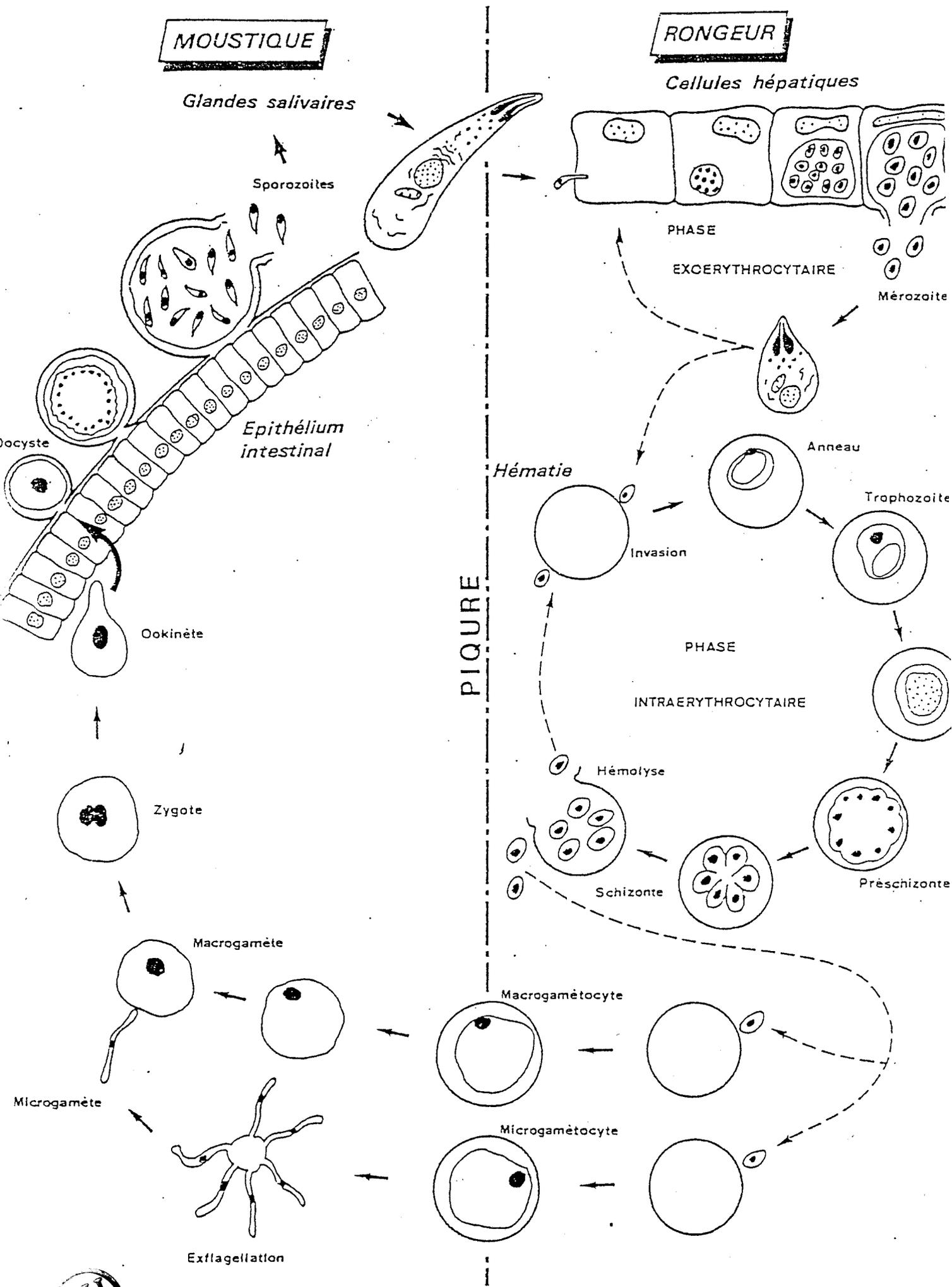


Figure I.2: Cycle biologique de *Plasmodium murin*.



divisions nucléaires successives conduisant à l'individualisation des mérozoïtes en nombre variable selon les espèces (16 pour *P. falciparum*). A maturité, les hématies contenant les schizontes éclatent et les mérozoïtes libérés peuvent pénétrer dans d'autres hématies pour s'y développer.

Après quelques cycles érythrocytaires, certains parasites vont se différencier en gamétocytes, formes sexués mâles (microgamétocyte) et femelles (macrogamétocyte) qui circulent de préférence dans les capillaires périphériques et vont permettre la continuité du cycle dans l'hôte définitif.

#### 1.1.2.2. Chez le moustique

Lors d'un repas, le moustique ingère des gamétocytes contenus dans le sang. Dans l'estomac du moustique, les microgamétocytes subissent une exflagellation pour donner naissance aux gamètes mâles et les macrogamétocytes évoluent en gamètes femelles. La fécondation aboutit à un oeuf mobile (oocinète) diploïde qui, après avoir traversé l'épithélium du tube digestif, s'enkyste sous la lame basale où il évolue en oocyste. A ce stade, se produit une phase de multiplication asexuée commençant par une méiose et donnant finalement des sporozoïtes haploïdes. Lorsque l'oocyste est mûr, il éclate et libère les sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires du moustique. Lors d'un repas, le moustique régurgite dans la circulation sanguine de l'hôte intermédiaire des sporozoïtes contenus dans la salive et, le cycle peut ainsi se poursuivre.

**Figure 1.3:** Les différents stades du cycle intraérythrocytaire de *Plasmodium falciparum*.

**A:** stade anneau x 19000

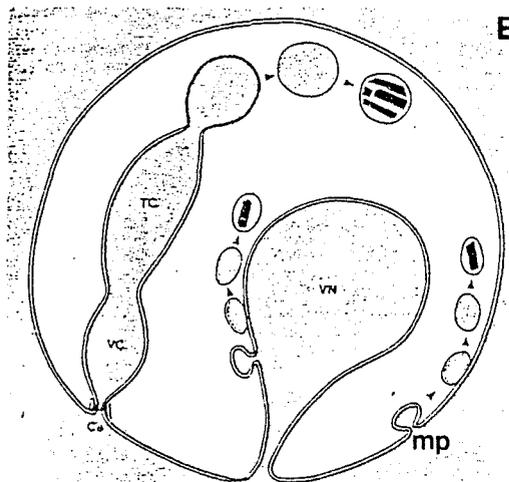
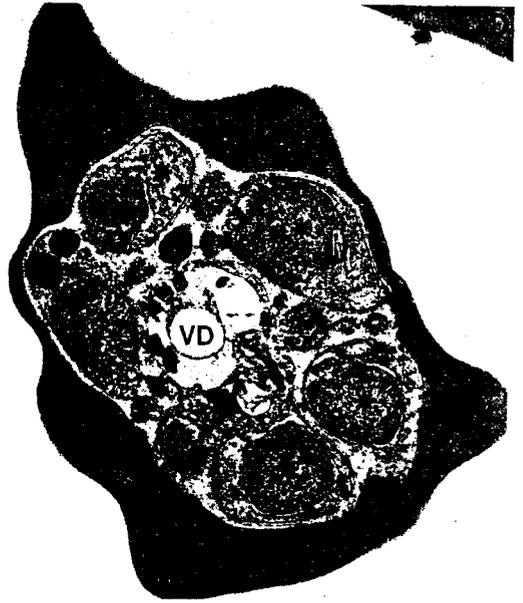
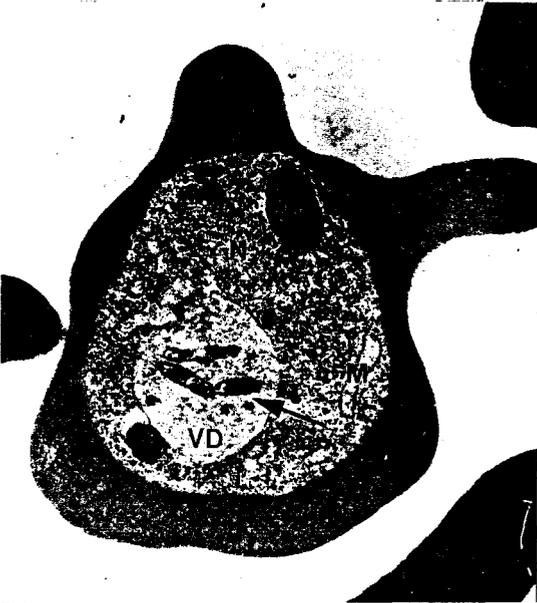
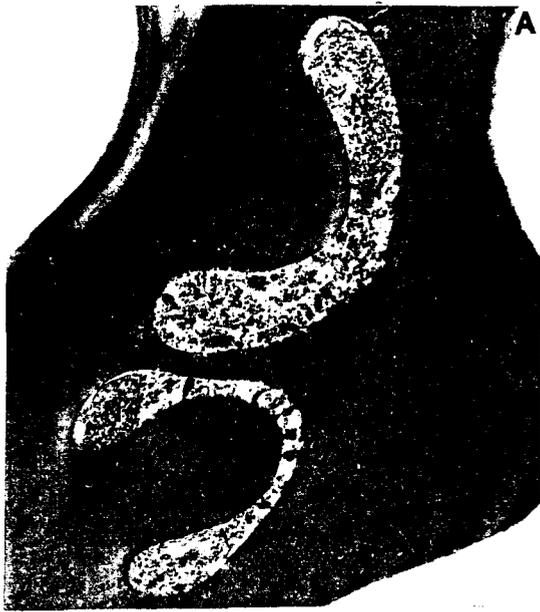
**B:** stade jeune trophozoïte x 32000

**C:** stade trophozoïte agé x 12000

**D:** stade schizonte x 14000

**E:** schéma du processus d'endocytose chez *Plasmodium chabaudi*

**CS** cytotome; **M** mitochondrie; **N** noyau; **mp** micropinocytose; **TC** tube cytotomal; **VC** vacuole cytotomale; **VN** vésicule nutritive; **VD** vésicule digestive; \* mérozoïte. La flèche indique le pigment malarique dans la vésicule digestive.



## 1.2. *BABESIA*

Les piroplasmoses sont de redoutables maladies du bétail, dans les régions tropicales et subtropicales et, quelquefois dans les régions tempérées. Les agents responsables de cette parasitose sont, comme *Plasmodium*, des sporozoaires mais ils appartiennent au genre *Babesia* ou *Theileria*. Les infections qui touchent les élevages de bovins peuvent avoir des conséquences économiques importantes. Les animaux domestiques, comme le chien, ne sont pas épargnés et dans quelques cas des infections par *Babesia* peuvent être fatales pour l'homme dans des circonstances particulières (sujets splénectomisés).

### 1.2.1. Systématique de *Babesia* (Fig.I.1)

*B. hylomysci* est une souche parasitant les rongeurs et *B. divergens* une souche capable de parasiter le bétail, certains ruminants sauvages, les rongeurs et l'homme. Ce parasite est très largement répandu en Europe.

Il existe d'autres espèces de *Babesia* comme *B. bovis* et *B. bigemina* qui parasitent également le bétail et certains ruminants sauvages, *B. canis* parasitant le chien, *B. equi* le cheval et l'âne, enfin *B. microti* les rongeurs et l'homme.

### 1.2.2. Cycle biologique de *Babesia* (Fig.I.4)

Les *Babesia* ou piroplasmes passent tous par un stade d'infection, chez un vertébré (phase asexuée), et sont transmis par un vecteur spécifique de l'espèce du *Babesia*, qui est une tique chez laquelle se déroule la phase sexuée (Mehlhorn et coll. 1993).

#### 1.2.2.1. Chez l'hôte vertébré

Lors de son repas, la tique inocule dans la circulation sanguine de l'hôte, des sporozoïtes. Contrairement à ce qui se passe chez *Plasmodium*, les sporozoïtes pénètrent directement dans les hématies sans passer par une phase hépatique. Contrairement aux Plasmodiidae, les *Babesia* ne forment pas de pigment à partir de l'hémoglobine de l'hématie hôte. De plus ces parasites n'internalisent pas le contenu du globule rouge par un phénomène de pinocytose. Dans l'hématie, les *Babesia* subissent une phase de multiplication asexuée (schizogonie), par division binaire ou par bourgeonnement. Chez certaines espèces, il se forme deux cellules filles haploïdes et chez d'autres quatre, comme chez *B. hylomysci* et *B.*

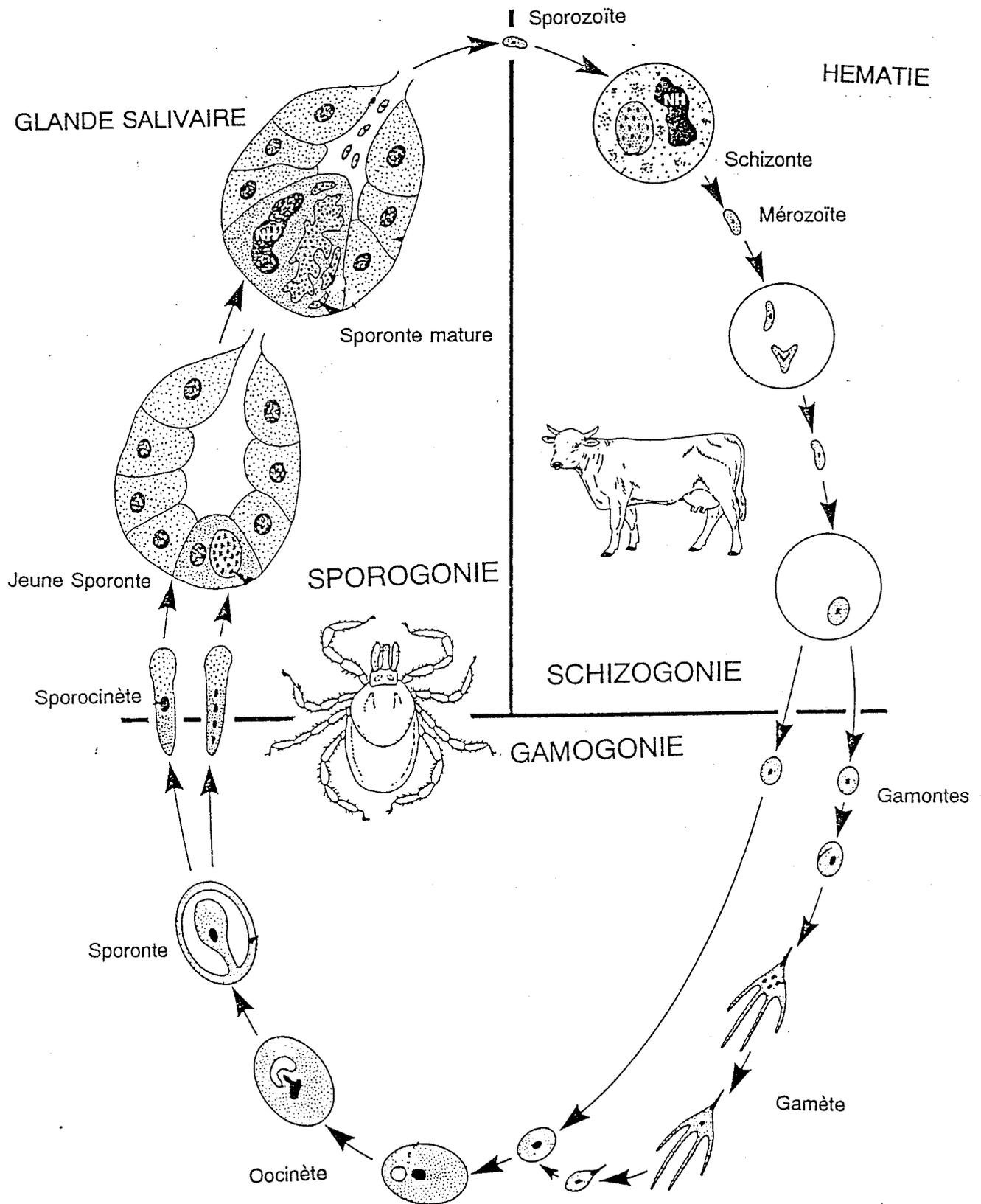


Figure I.4: Cycle biologique de *Babesia bovis*.

*divergens*. Le schizonte, constitué alors de quatre noyaux, a la forme d'une croix de Malte. A maturité, les mérozoïtes sont libérés par éclatement de la cellule hôte et réinfestent à nouveau des hématies saines. La progression de l'infection conduit à une anémie chez l'animal parasité. Certains mérozoïtes prennent une forme ovoïde et se différencient en gamontes, qui doivent être absorbés par une tique au moment de son repas sanguin, pour pouvoir continuer leur développement.

#### 1.2.2.2. Chez l'hôte invertébré

Chaque espèce de *Babesia* dépend d'une tique particulière pour accomplir son cycle. Pour *Babesia divergens*, c'est la tique, *Ixodes ricinus* qui est le vecteur.

A l'intérieur de l'intestin de la tique, les gamontes prennent une forme en massue et le noyau se divise pour en donner quatre. Chaque gamonte est à l'origine de quatre gamètes dont deux types différents fusionnent pour donner naissance à un oocinète. Celui-ci quitte alors l'intestin et pénètre dans des cellules d'autres organes comme les ovaires et les oeufs des femelles fertiles. A ce niveau, l'oocinète croît pour devenir un sporonte, qui subit à son tour une sporogonie pour donner naissance à des formes mobiles (sporocinètes). Ces formes mobiles gagnent les glandes salivaires ou peuvent rester dans les oeufs de la tique, infestant ainsi la future génération. Dans les glandes salivaires, les sporocinètes subissent une nouvelle sporogonie pour donner naissance à des formes infestantes, les sporozoïtes, transmis à l'hôte vertébré lors d'une piqûre de la tique.

Les babésioses sont essentiellement du ressort de la médecine vétérinaire, car les cas humains sont très rares, et relèvent d'ailleurs de condition de terrain tout à fait particulières (seuls les individus splénectomisés sont susceptibles de développer la maladie). Au contraire, le paludisme humain a été très étudié sur le plan physiopathologique. On connaît de nombreux effets du parasite sur son hôte, et certains des mécanismes de défense développés par l'homme pour lutter contre l'infection. Des médicaments antipaludéens efficaces ont été également développés et, parmi les plus récents, des molécules comme les endoperoxydes (artémisinine et ses dérivés) qui semblent agir via un choc oxydatif et qui détruirait le parasite. Ce type de choc peut également être le résultat de l'action du système immunitaire non spécifique. Dans la littérature, la sensibilité de *Plasmodium* au choc oxydatif a été maintes fois signalée.

Nous nous proposons d'examiner d'abord le choc oxydatif en général, et ses conséquences, puis les systèmes de défense existant chez les organismes. Nous envisagerons ensuite le cas de *Plasmodium* en montrant combien la connaissance approfondie de son système de défense peut être intéressante pour développer une nouvelle voie en matière de mise au point d'antimalariques.

## CHAPITRE 2 : LE CHOC OXYDATIF

### 2.1. DEFINITION

Beaucoup d'organismes dépendent strictement de l'oxygène pour vivre, mais cet oxygène, qui leur est indispensable, peut être également toxique voire léthal. La molécule d'oxygène, peu réactive, est réduite en eau au cours de la respiration cellulaire et dans de nombreuses oxydations biologiques. Dans des conditions normales, des intermédiaires dangereux, parce que très réactifs, peuvent apparaître, mais sont facilement éliminés par la cellule. Ces intermédiaires sont appelés espèces activées de l'oxygène (EAO). Lorsque ces EAO augmentent de façon trop importante, par des facteurs extracellulaires ou lors d'une déficience du système de défense de la cellule, les dommages causés sont irréversibles. Ce phénomène appelé "choc oxydatif" aboutit à la mort de la cellule. Dans l'organisme humain, il existe de nombreux effets biologiques provoqués par un choc oxydatif, et qui ont de graves conséquences pathologiques.

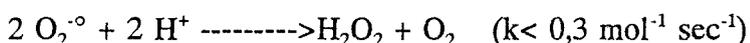
#### 2.1.1. Les espèces activées de l'oxygène (EAO)

##### 2.1.1.1. Les différentes formes d'EAO

- L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), résulte de la réduction monovalente de la molécule d'oxygène. Il est relativement stable et peu réactif à pH 7.

En solution aqueuse, il peut subir une dismutation spontanée en présence de  $H^+$  selon la réaction suivante:



Malgré sa faible réactivité, l'anion superoxyde peut intervenir dans un certain nombre de réactions amenant la transformation de molécules organiques. Il peut être à la fois oxydant et réducteur, et réagit bien avec les métaux. Sa réaction avec le cuivre est la base de sa

dismutation par la superoxyde dismutase Cu/Zn dépendante. Sa réaction avec le fer trivalent est à l'origine d'effets particuliers sur les hémoprotéines (méthémoglobine, cytochrome c). Il peut réduire des quinones selon la réaction suivante:



L'anion superoxyde peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO), facteur vasodilatateur, libéré par les cellules endothéliales et les macrophages activés, pour donner un puissant oxydant, le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>). Cet agent, très cytotoxique par son action oxydante sur les groupements thiols des protéines, intervient dans la peroxydation des lipides.

En milieu acide, l'anion superoxyde se protone pour donner le radical perhydroxyle HO<sub>2</sub><sup>·</sup> (pK = 4,8) plus liposoluble que O<sub>2</sub><sup>·-</sup> et dont la dismutation spontanée est beaucoup plus rapide au pH de formation que celle de O<sub>2</sub><sup>·-</sup>:

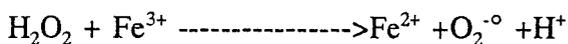


A pH 7,0 le rapport O<sub>2</sub><sup>·-</sup>/HO<sub>2</sub><sup>·</sup> est d'environ 100.

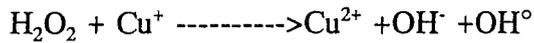
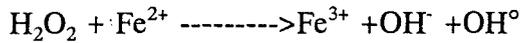
HO<sub>2</sub><sup>·</sup> peut également interagir avec les liaisons éthyléniques des acides gras polyinsaturés, il peut donc participer à la lipoperoxydation.

#### - Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

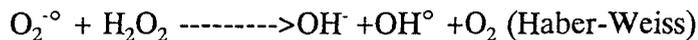
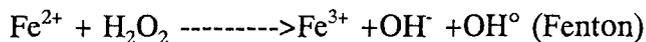
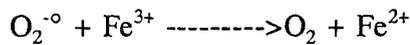
Il est formé secondairement par dismutation de l'anion superoxyde et est très réactif. En présence de cations métalliques, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être soit oxydant, soit réducteur. En réduisant certains métaux, il peut libérer de l'anion superoxyde, selon la réaction suivante:



Par oxydation de ces mêmes métaux, il libère le radical hydroxyle selon la réaction de Fenton (1894):



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ , sauf en présence d'anion superoxyde, qui le régénère en réduisant  $\text{Fe}^{3+}$ , selon la réaction d'Haber Weiss (Halliwell et Gutteridge, 1986a):



#### - Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ )

Ce radical est plusieurs milliers de fois plus réactif que les autres EAO. Il peut être formé à partir de l'oxydation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  catalysée par  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ .

Le radical hydroxyl réagit avec toutes les molécules biologiques en produisant d'autres radicaux. Dans le milieu biologique, sa vitesse de réaction est très grande si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation et qu'il n'est jamais détectable directement.

#### - L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )

Une dernière variété très réactive, l'oxygène singulet, est une molécule en état d'excitation et peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. Cette espèce activée n'apparaît que dans des cas particuliers, comme lors de processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et libère  $^1\text{O}_2$ . Il peut jouer le rôle d'oxydant pour entraîner l'apparition d' $\text{O}_2^{\cdot-}$



L'oxygène singulet a pour cibles biologiques les membranes, les acides nucléiques et

les protéines. Récemment, certains auteurs ont montré, qu'en présence d'un système générant l'oxygène singulet, les lipoprotéines, les protéines à groupements thiols étaient oxydées et la concentration en antioxydants comme l'ascorbate, l'urate, l'ubiquinol et la bilirubine, s'amenuisait dans le plasma (Wagner et *coll.* 1993).

#### 2.1.1.2. Origines des EAO

Dans les conditions normales, des EAO peuvent être libérées dans la cellule au cours de certaines réactions enzymatiques ou non enzymatiques, au niveau de différents organites comme la mitochondrie, le chloroplaste, les microsomes et les peroxysomes. Des facteurs environnementaux (xénobiotiques, facteurs physiques) peuvent également induire une production importante d'EAO.

##### - Dans la mitochondrie et le chloroplaste

Dans les mitochondries, au niveau de la chaîne respiratoire, l'accepteur final d'électrons est l'O<sub>2</sub> qui est réduit en 4 étapes, pour donner H<sub>2</sub>O. La réduction progressive de l'O<sub>2</sub> est représentée électron par électron. Dans les mitochondries, au niveau de la chaîne respiratoire, depuis l'O<sub>2</sub> il faut donc 4 électrons et 2 atomes d'hydrogène pour arriver jusqu'à l'eau. Ces réactions sont catalysées par trois complexes enzymatiques, la NAD(P)H:Quinone réductase, la cytochrome réductase et la cytochrome oxydase, qui sont susceptibles de libérer des O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Sohal et Brunk, 1992). La réduction de l'oxygène en eau n'est pas de 100% et, selon les auteurs, 2 à 5% de l'O<sub>2</sub> est libéré sous forme d'anion superoxyde, d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'OH<sup>•</sup> (Sohal et Brunk, 1992). Lors d'une anoxie ou d'une hypoxie des tissus d'un organisme, le transport des électrons est arrêté au niveau du coenzyme Q (ou ubiquinone) de la chaîne respiratoire. Lors de la réoxygénation des tissus, l'O<sub>2</sub> sera alors réduit électron par électron au niveau de ce coenzyme Q, produisant ainsi une quantité importante d'anion superoxyde.

Dans les chloroplastes, où se déroule la photosynthèse qui produit de l'O<sub>2</sub> à partir d'H<sub>2</sub>O, l'anion superoxyde peut être libéré au niveau de la ferredoxine du photosystème I et de la plastoquinone du photosystème II. De plus l'oxygène singulet peut être formé dans des chloroplastes soumis à des conditions d'illumination intenses (Salin, 1991).

- Dans les microsomes et peroxysomes

Ces organites possèdent des flavoprotéines dites "oxydases" qui sont des enzymes à FAD ou FMN, utilisant l'O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons. Ces enzymes interviennent dans l'oxydation de nombreuses substances comme des acides aminés, des amines (monoamine oxydase), le glucose (glucose oxydase), la xanthine (xanthine déshydrogénase). Lors de ces réactions, elles libèrent de l'anion superoxyde mais surtout du peroxyde d'hydrogène.

D'autres enzymes, appelées mono-oxygénases (ou hydroxylases), dépendantes du NADH ou du NADPH comme source d'électrons, peuvent libérer l'anion superoxyde et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en incorporant un ou deux atomes d'oxygène dans leur substrat. L'exemple le plus connu est le complexe cytochrome P450, une enzyme à fer pouvant être membranaire, microsomale ou mitochondriale dans le foie des mammifères, et qui peut produire des anions superoxydes et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Beaucoup d'autres enzymes comme l'aldéhyde oxydase, les flavines désydrégénases et la dihydroorotate désydrégénase peuvent, lors de leur fonctionnement, amener la production d'anions superoxyde. D'autres comme l'urate oxydase, la D amino acide oxydase et la glycolate oxydase peuvent entraîner la libération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

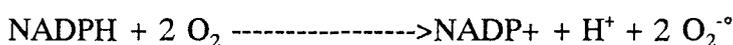
- Dans le cytoplasme

Dans la cellule, beaucoup de molécules comme l'hémoglobine, les catécholamines, le glutathion et d'autres molécules à groupements thiols peuvent réagir spontanément avec l'oxygène. L'autooxydation de ces molécules entraîne la libération d'anion superoxyde. Nous avons déjà souligné le rôle de métaux de transition, comme le fer et le cuivre, comme catalyseur dans la réaction de Fenton.

- Production des EAO par les leucocytes

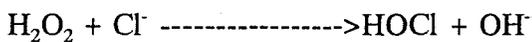
Les phagocytes (granulocytes neutrophiles et macrophages) sont des cellules spécialisées dans la production d'EAO. Dans leur membrane ils disposent d'une flavoenzyme, la NADPH oxydase qui catalyse la réaction suivante:

NADPH oxydase



Lorsque ces cellules sont stimulées par la présence d'antigènes, il se produit alors une forte consommation d'oxygène et une libération d'anion superoxyde ("flambée respiratoire"). L'anion superoxyde est transformé en  $H_2O_2$ , lui-même transformé en présence de métaux en  $OH^\circ$  qui possède des propriétés bactéricides. La dégranulation des leucocytes stimulés libère également la myéloperoxydase, qui produit des hypochlorites très actifs, à partir d' $H_2O_2$ :

myéloperoxydase



#### - Production des EAO par des facteurs externes

L'exposition des cellules à certains xénobiotiques, comme le paraquat, l'antimycine qui bloque la chaîne respiratoire, ou encore des carcinogènes chimiques, peuvent augmenter la production d'EAO intracellulaires. De même, les rayonnements comme les ultraviolets, les rayons X ou gamma, provoquent sur certaines molécules intracellulaires, comme les porphyrines, les flavoprotéines, les quinones, le NADH et le NADPH, une photooxydation qui libère des EAO, en particulier de l'anion superoxyde et de l'oxygène singulet (Morlière et *coll.* 1992).

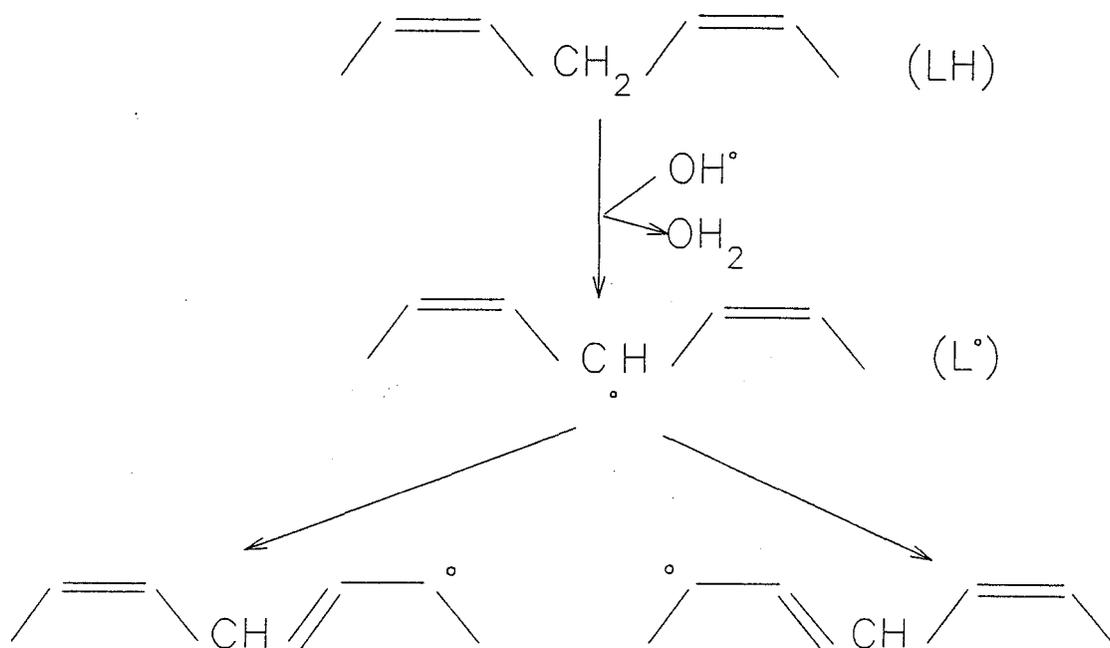
### 2.1.2. Effets biologiques

Les EAO formés dans la cellule peuvent réagir sur les lipides, sur les protéines et sur l'ADN.

#### 2.1.2.1. Peroxydation des lipides

Ce processus oxydatif d'altération porte essentiellement sur les acide gras polyinsaturés. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois phases successives (initiation, propagation et terminaison) et les radicaux libres oxygénés ainsi formés sont les radicaux peroxydes ( $ROO^\circ$ ), alcoyle ( $RO^\circ$ ) et hydroperoxydes ( $ROOH$ ). Ces radicaux résultent de l'action d'oxygénases membranaires ou solubles, intervenant dans la synthèse de médiateurs lipidiques (prostaglandines et thromboxanes), et agissant sur l'acide arachidonique et l'acide eicosapentanoïque. Ils peuvent aussi résulter de l'action d'une EAO, le plus souvent le radical hydroxyl ( $OH^\circ$ ), sur un acide gras polyinsaturé (Fig.I.5).

En présence de fer  $Fe^{2+}$ , les hydroperoxydes peuvent subir un phénomène de réactivation qui



PEROXYDATION DES LIPIDES

(Propagation explosive)

FORMATION DE PEROXYDES CYCLIQUES

FORMATION DE MALONDIALDEHYDE

(par hydrolyse des endoperoxydes)

FORMATION DES PONTS AIP

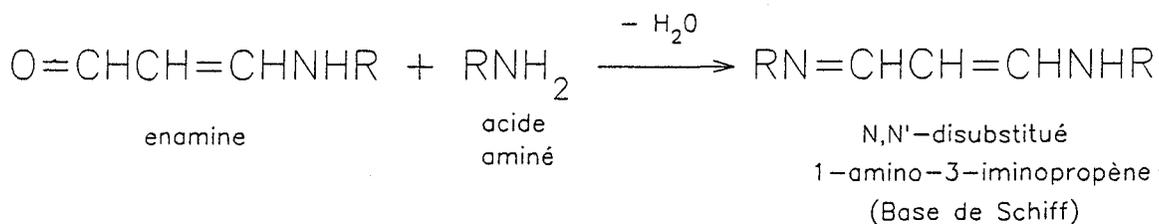
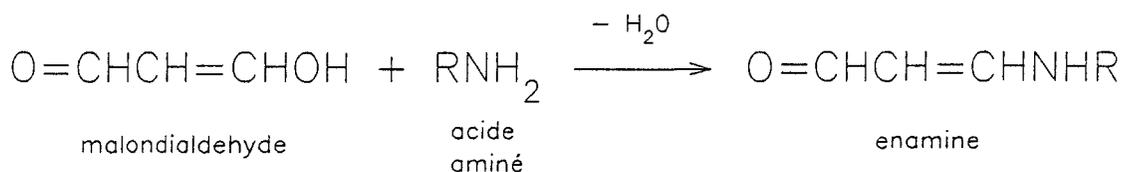
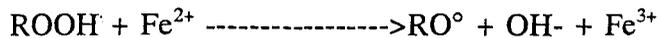


Figure I.5: La peroxydation des lipides.

les convertit en radical alcoxy  $RO^\circ$ , très agressifs, qui relancent une nouvelle chaîne de peroxydation:



A part le radical alcoxy, l'hydroperoxyde lipidique peut se décomposer en d'autres produits tous aussi réactifs, les aldéhydes dont les plus connus sont le dialdéhyde malonique et le 4-hydroxynonanal.

Le piégeage des radicaux formés ou leur réaction entre eux arrêtent la réaction radicalaire en chaîne:



De plus, au cours de la peroxydation des lipides, de l'oxygène singulet peut être produit (Sies, 1986).

La peroxydation des lipides entraîne une désorganisation des membranes cytoplasmiques, lysosomiales et mitochondriales, allant jusqu'à la perte de leur intégrité. Les principales conséquences sont une diminution de la fluidité membranaire, une perte de la perméabilité sélective et du potentiel de membrane, qui aboutissent à la mort de la cellule (Pré, 1991). De plus le dialdéhyde malonique formé peut réagir avec les protéines membranaires, comme nous le verrons plus loin.

#### 2.1.2.2. Dégradation des protéines

Les EAO, ainsi que les hydroperoxydes lipidiques peuvent réagir avec les protéines en les oxydant. Certains acides aminés comme la méthionine, la cystéine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine et la proline sont facilement oxydés (Sies, 1986). L'oxydation touche plus particulièrement les protéines qui contiennent des groupements sulfhydryle (SH). Ainsi de nombreuses enzymes vont être oxydées et inactivées. De même les radicaux  $OH^\circ$  et alcoxy peuvent fragmenter et créer des liaisons croisées dans certaines protéines de structure comme le collagène (Wolff et coll. 1986). Certains métaux se fixent à une protéine dans une zone particulière, et entraînent par formation d'un radical  $OH^\circ$  selon la réaction de Fenton, une oxydation à un endroit spécifique de cette protéine (Levine, 1983).

Le dialdéhyde malonique, résultant de la peroxydation des acides gras polyinsaturés, réagit avec les protéines situées à proximité des sites réactionnels (protéines de la membrane et sous-jacentes). Cette réaction induit la création de ponts amino-imino-propène (AIP) entre les chaînes polypeptidiques ou à l'intérieur d'une même chaîne (**Fig.I.5**). Le résultat aboutit à une agrégation des protéines sous forme de lipofuschine qui peut être détectée grâce à la fluorescence spécifique des ponts AIP (Chio et Tappel, 1969; Davies, 1988). L'accumulation de la lipofuschine est importante dans les lysosomes des cellules âgées ou ayant subi un stress oxydatif.

#### 2.1.2.3. Altérations de l'ADN

Les acides ribo- et déoxyribonucléiques sont très sensibles aux oxydants tels les  $\text{OH}^\circ$  et les hydroperoxydes, aux radiations ionisantes ou à la photooxydation. Les bases nucléiques sont facilement oxydées (guanine et surtout thymine), et peuvent ainsi créer des sites apuriques ou apyrimidiques dans l'ADN (Sies, 1986; Pacifici et Davies, 1991). Les altérations de l'ADN provoquées par ces oxydants entraînent d'importantes perturbations du fonctionnement de la cellule, au niveau de la réplication, la transcription et la traduction. Les réactions radicalaires provoquent également des cassures (Ranjbar and Hannigan, 1993) ou des mutations dans les chromosomes.

#### 2.1.2.4. Autres molécules

Les réactions radicalaires peuvent atteindre d'autres molécules biologiques comme les oses, des molécules auto-oxydables telles que l'adrénaline, la riboflavine, les quinones. Les radicaux libres peuvent également causer la dépolymérisation de l'acide hyaluronique et dégrader le collagène, tous composants essentiels du tissu de soutien et du cartilage.

## 2.2. LES SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LE CHOC OXYDATIF

Ces systèmes de défense intra- ou extracellulaires sont de trois types:

- 1) des molécules antioxydantes ou piègeurs de radicaux libres
- 2) des protéines chélatant les métaux catalysant les réactions radicalaires tels le fer et le cuivre
- 3) des enzymes qui éliminent les espèces activées de l'oxygène ( $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$ ), le seul système que nous aborderons ici.

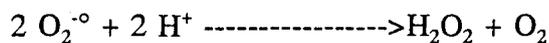
La cellule dispose également de systèmes enzymatiques, qui décomposent, réparent ou remplacent les molécules endommagées. Ces derniers ne seront pas examinés ici.

### Les enzymes antioxydantes

Ces enzymes ont une action complémentaire dans la destruction des EAO. La superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase sont les principales enzymes impliquées (Fig. I.6).

- La superoxyde dismutase (SOD)

Cette métalloenzyme a pour rôle de dismuter l'anion superoxyde en eau oxygénée et en oxygène moléculaire (Mc Cord et *coll.* 1969):



Cette réaction, extrêmement lente naturellement, est catalysée à une vitesse  $10^4$  à  $10^5$  fois supérieure en présence de SOD. Il existe trois types de SOD qui diffèrent par leur métal cofacteur (Cu/Zn, Mn ou Fe) et par leur localisation. Nous reviendrons en détail sur ces enzymes dans le chapitre 3.

## MECANISMES ENZYMATIQUES DE DEFENSE CONTRE LE CHOC OXYDANT

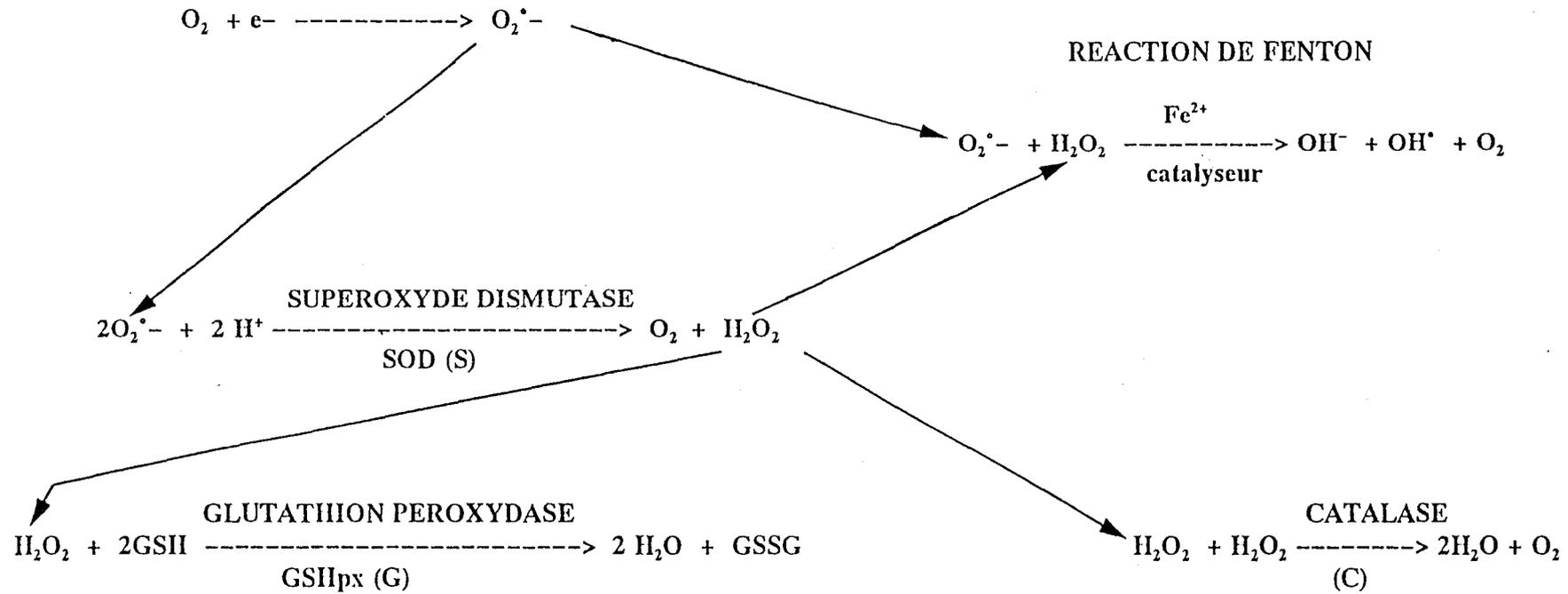
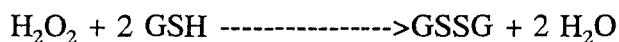


Figure I.6: Chaîne enzymatique de détoxification des E.A.O.

- La glutathion peroxydase (GPx)

Cette enzyme intervient à la suite de la SOD pour éliminer le peroxyde d'hydrogène en présence de glutathion (GSH), selon la réaction suivante:

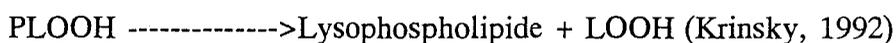


Elle décompose  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la cellule lorsque celui-ci est en faible concentration.

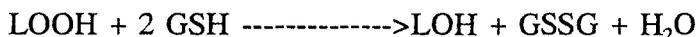
La GPx est une enzyme à sélénium (Flohé et *coll.* 1973), qui peut être cytosolique et mitochondriale, mais aussi membranaire.

Les GPx cytosolique, mitochondriale et plasmique sont des tétramères de 84000 daltons. Elles décomposent  $\text{H}_2\text{O}_2$  et les hydroperoxydes d'acides gras (LOOH) libérés des phospholipides membranaires (PLOOH) peroxydés, par une phospholipase A2 (Van Kuijk et *coll.* 1987).

PLase A2

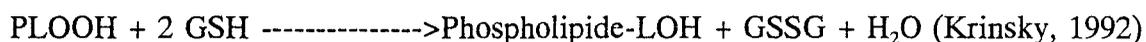


GPx



L'hydroperoxyde glutathion peroxydase membranaire ou GPx d'Ursini (HPGPx), décompose les hydroperoxydes d'acide gras, en agissant directement sur les phospholipides peroxydés (PLOOH) selon la réaction suivante:

HPGPx



Elle a une structure monomérique (20000 daltons) et se localise au niveau des membranes (Ursini et Bindoli, 1987).

La GPx requiert un cofacteur réducteur, le GSH. Le maintien de l'activité enzymatique nécessite donc un système de recyclage du glutathion réduit via une autre enzyme, la glutathion réductase:



L'activité de la glutathion réductase est dépendante de la quantité disponible de NADPH. Dans la cellule, ce cofacteur est produit de façon importante par différentes enzymes dont les principales sont la glucose 6-phosphate déshydrogénase par la voie des pentoses phosphate, la glutamate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase.

- La catalase

Elle est localisée essentiellement dans les peroxysomes et présente une activité peroxydasique à des concentrations importantes d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , selon la réaction suivante:



Cette enzyme est un tétramère d'environ 240 000 daltons, contenant 4 groupements héminiques au sein desquels le fer est sous sa forme ferrique (Deisseroth et Dounce, 1970).

- Les glutathion transférases

Les glutathion transférases peuvent également présenter une activité glutathion peroxydase. Mais cette activité ne s'exerce que sur les hydroperoxydes organiques et non sur  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 2.3. REGULATION DE LA DEFENSE CONTRE LE CHOC OXYDATIF

Cette régulation a particulièrement bien été étudiée chez les bactéries. Lorsque celles-ci sont exposées à un choc oxydatif, plusieurs protéines sont induites rapidement et la cellule devient tolérante vis à vis d'autres oxydants. Chez les bactéries, en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , une trentaine de protéines sont codées par le régulon oxyR. Certaines ont des activités antioxydantes comme la catalase, la glutathion réductase et l'alkyl hydroperoxyde réductase

(Demple, 1991; Lee et *coll.* 1993). En présence d'anion superoxyde, un autre régulon, appelé soxRS, code l'expression d'environ 40 protéines, dont la SOD, une endonucléase et la glucose 6-phosphate déshydrogénase (Demple, 1991; Harris, 1992).

Chez l'homme, certaines protéines sont induites lors d'un stress oxydatif, telles les enzymes antioxydantes, mais aussi l'hème oxygénase (Keyse et Tyrrell, 1989) et un facteur de transcription NF-kB qui régule les gènes impliqués dans la réaction inflammatoire (Sies, 1993). Les oncogènes c-fos, c-jun et c-myc sont également induits lors d'un stress oxydatif (Devary et *coll.* 1991; Sies, 1993). De plus chez le rat et l'homme, il a été montré que l'induction, lors d'un choc oxydatif, d'une glutathion transférase et d'une NAD(P)H:Quinone réductase est dépendante d'une région, appelée élément de réponse antioxydante. Cette région, située en amont du gène codant pour ces deux enzymes, peut être reconnue par le complexe protéique c-Jun/c-Fos (Li et *coll.* 1992; Nguyen et *coll.* 1992).

## CHAPITRE 3 : LES SUPEROXYDE DISMUTASES (SOD)

Dans la classification internationale, les SOD (EC 1.15.1.1) appartiennent au groupe des oxydoréductases. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. A pH 7,4 la vitesse de dismutation de  $O_2^{\circ}$  est d'environ  $2 \times 10^9 M^{-1} sec^{-1}$ .

### 3.1. TYPES DE SOD ET LEURS DISTRIBUTIONS CHEZ LES ETRES VIVANTS

#### 3.1.1. Les types de SOD

Il existe trois formes différentes de SOD selon la nature du métal cofacteur présent dans leur site actif: la SOD Cu/Zn décrite la première par Mc Cord et Fridovich (1969), la SOD dépendante du manganèse (SOD-Mn) décrite par Keele et *coll.* (1970) et la SOD dépendante du fer (SOD-Fe) caractérisée par Yost et Fridovich (1973).

Les SOD-Fe et Mn sont très homologues par leur structure et leur séquence. Actuellement, certains auteurs pensent que ces deux types de SOD proviendraient d'un gène ancestral commun. La première SOD aurait été à fer chez tous les organismes anaérobies. Mais l'apparition de l' $O_2$  sur terre provoqua une diminution du fer  $Fe^{2+}$  indispensable pour les organismes, en l'oxydant sous forme  $Fe^{3+}$  insoluble (Hassan, 1989), et a permis une évolution vers la SOD-Mn chez les organismes capable de s'adapter. Les SOD Cu/Zn se rencontrent presque exclusivement chez les eucaryotes, avec quelques exceptions chez les procaryotes. Cette SOD serait apparue plus tardivement et aurait évolué indépendamment des SOD-Fe et Mn, ce qui explique leur grande différence de séquence et de structure (Steinman, 1982).

Ces hypothèses sur l'évolution des SOD ont pu être avancées suite à l'examen de leur distribution dans les différents types d'organismes.

### 3.1.2. Distribution des différentes SOD chez les êtres vivants

#### 3.1.2.1. Chez les Procaryotes

Les SOD-Fe ont été mise en évidence chez les archéobactéries strictement anaérobies (Kirby et coll. 1981; Takao et coll. 1991), les bactéries anaérobies stricts (Yost et Fridovich, 1973; Hassan, 1989), chez des photobactéries marines (Puget et Michelson, 1974), enfin chez des cyanobactéries (Lumsden et Hall, 1974; Asada et coll. 1975; Cseke et coll. 1979; Stowers et Elkan, 1981; Caiola et coll. 1991; Canini et coll. 1992). Cependant, certaines archéobactéries aérobies peuvent posséder une SOD-Fe, comme *Thermoplasma acidophilum* (Searcy et Searcy, 1981), ou une SOD-Mn comme *Halobacterium halobium* et *Halobacterium cutirubrum* (Salin et coll. 1988; May et Dennis, 1989; Takao et coll. 1989).

Chez les bactéries anaérobies facultatives, telles *Streptococcus mutans* (Vance et Keele, 1972; Martin et coll. 1986), *Bacteroides* (Gregory et Dapper, 1983; Pennington et Gregory, 1986; Amano et coll. 1990), *Propionibacterium shermanii* (Meier et coll. 1982), *E. coli* (Clare et coll. 1984) et *Porphyromonas gingivalis* (Amano et coll. 1992), il existe une SOD dont l'apoprotéine est capable d'utiliser le fer en condition anaérobie ou le manganèse en condition aérobie.

Par contre chez les bactéries strictement aérobies, une seule forme de SOD est présente, dépendante du Mn et incapable de fixer le fer dans son site actif (Hassan, 1989; Brehm et coll. 1992; Chambers et coll. 1992). *E. coli*, une bactérie anaérobie facultative, possède une SOD-Fe et une SOD-Mn, dont l'apoprotéine est différente (Keele et coll. 1970; Yost et Fridovich, 1973). Seule la SOD-Fe est exprimée en condition anaérobie, mais en présence d'O<sub>2</sub> la SOD-Mn est induite.

La SOD Cu/Zn est une enzyme trouvée principalement chez les eucaryotes. Cependant ce genre de SOD a été mis en évidence dans l'espace périplasmique de certaines bactéries libres comme *Caulobacter crescentus* (Steinman, 1982; 1993), chez *Paracoccus denitrificans* (Vignais et coll. 1982), et chez différentes espèces de *Pseudomonas* (Steinman, 1985). La découverte d'une SOD Cu/Zn chez une bactérie symbiotique, telle que *Photobacterium leiognathi*, a suscité l'idée d'un premier cas de transfert de gène d'un eucaryote vers un procaryote (Bannister et Parker, 1985).

### 3.1.2.2. Chez les Eucaryotes

#### - Les Eucaryotes animaux

Une SOD identifiée comme étant à fer est très fréquente chez les protozoaires libres ou parasites (**Tableau I.1**) (Lindmark et Müller, 1974; Meshnick et Eaton, 1981; Le Trant et coll. 1983; Kitchener et coll. 1984; Sibley et coll. 1986; Barra et coll. 1990; Tannich et coll. 1991; Ismail et coll. 1994). Chez *Eimeria tenella*, les trois types de SOD sont exprimés à différents stades du cycle biologique du parasite (Michalski et Prowse, 1991).

Par contre chez les animaux plus évolués, on trouve en majorité une SOD Cu/Zn (Fridovich, 1986; Callahan, 1988) cytosolique et peroxysomale (Keller et coll. 1991; Dhaunsi et coll. 1992) et une SOD-Mn dans les mitochondries (Weisiger et Fridovich, 1973a; 1973b).

De plus chez les mammifères, il existe également une SOD Cu/Zn extracellulaire, différente de la SOD cytosolique, localisée au niveau des espaces extracellulaires dans les tissus mais aussi dans le plasma (Marklund, 1982; 1984). Chez certains helminthes parasites, tels *Trichinella spiralis* (Rhoads, 1983), *Taenia taeniaeformis* (Leid et Suquet, 1986), *Schistosoma mansoni* (Simurda et coll. 1988) et *Onchocerca volvulus* (Henkle et coll. 1991), une SOD Cu/Zn est sécrétée dans le milieu extracellulaire pour protéger le parasite de la réaction immunitaire de l'hôte.

#### - Les Eucaryotes végétaux

Les algues eucaryotes possèdent soit une SOD-Fe (Kanematsu et Asada, 1979), soit une SOD-Mn (Misra et Fridovich, 1977) et parfois une SOD Cu/Zn (Kanematsu et Asada, 1989).

Les plantes supérieures, de même que les animaux, possèdent en général une SOD Cu/Zn cytosolique (Fridovich, 1986), pouvant être localisée dans les glyoxysomes (Bueno et del Rio, 1992). Il existe cependant quelques exceptions pour lesquelles une SOD-Fe a été mise en évidence (Salin et Bridges, 1980; Duke et Salin, 1985). Les mitochondries des cellules végétales possèdent une SOD-Mn. Dans les chloroplastes, on a pu mettre en évidence une SOD Cu/Zn soluble dans le stroma, différente de la SOD Cu/Zn cytosolique (Lumsden et Hall, 1974; Kwiatowski et Kaniuga, 1986; Kröniger et coll. 1992) et d'une SOD-Fe localisée dans la membrane lamellaire des tylakoïdes (Lumsden et Hall, 1974).

ESPECE	METAL	PM	sU	pI	CN	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	REF
<i>Entamoeba histolytica</i>	Fe	ND	ND	ND	ND	ND	Tannich (1991)
<i>Euglena gracilis</i>	Fe	45	2	5,7 à 7,8	-	+	Kanematsu (1979)
	Mn	45	2	ND	-	+	Kanematsu (1979)
<i>Crithidia fasciculata</i>	Fe	43	2	5,0 - 5,2	-	+	Le Trant (1983)
<i>Tritrichomonas foetus</i>	Fe	ND	ND	6,0 à 6,9	-	+	Kitchener (1984)
<i>Monocercomonas</i> sp.	Fe	38	ND	ND	-	+	Lindmark (1974)
<i>Leishmania tropica</i>	Fe	ND	ND	4,9	-	+	Meshnick (1981)
<i>Leishmania donovani</i>	Fe	43	2	ND	-	+	Ismail (1994)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Meshnick (1983)
<i>Trypanosoma brucei</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Meshnick (1983)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Fe	80	4	7,0	-	+	Barra (1990)
	Cu/Zn	ND	ND	ND	+	±	Cassini (1989)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Cu/Zn	ND	ND	ND	+	±	Favero (1992)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Sibley (1986)
<i>Eimeria tenella</i>	Cu/Zn	ND	ND	ND	+	±	Michalski (1991)
	Mn	ND	ND	ND	-	-	Michalski (1991)
	Fe	ND	ND	ND	-	+	Michalski (1991)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Mn	ND	ND	6,8	-	-	Ranz (1989)
<i>Plasmodium murins</i>				ABSENTE			
<i>Babesia</i>				PAS DE DONNEES DISPONIBLES			

**Tableau I.1:** La SOD chez les protozoaires.

## 3.2. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES

### 3.2.1. Caractéristiques générales

Selon leur métal cofacteur, les SOD présentent des caractéristiques générales différentes et une sensibilité aux inhibiteurs qui permet de les distinguer lors de leur mise en évidence. Le **tableau I.2** récapitule ces caractéristiques que nous nous proposons de commenter.

#### 3.2.1.1. Les SOD Cu/Zn

Les enzymes purifiées de différents organismes sont constituées de deux sous unités identiques. Les enzymes natives ont un poids moléculaire de 32 à 36 kDa selon les espèces. Les deux sous-unités sont associées par des interactions non covalentes et ont un poids moléculaire de 15 à 17kDa. Chaque site actif contient un atome de cuivre et un atome de zinc. La SOD extracellulaire, présente dans le plasma des mammifères, est une molécule tétramérique, avec un poids moléculaire de 135 kDa et composée de 4 sous-unités identiques liées de façon non covalente et possédant chacune un atome de cuivre et un atome de zinc (Marklund, 1982).

Chez les mammifères, les SOD Cu/Zn sont souvent des protéines acides (points isoélectriques ou pI compris entre 4 et 6). Chez le rat et la souris, les isoformes de SOD Cu/Zn sont spécifiques du tissu (Fridovich, 1986). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les deux isoformes ont des pI basiques à 8,1 et 9 (Vanfleteren, 1992). Les isoformes de SOD peuvent résulter de modifications post-traductionnelles (Fridovich, 1986) ou de l'oxydation de certains acides aminés (Sharonov et Churilova, 1992). Récemment, certains auteurs ont montré que des isoformes de SOD Cu/Zn pouvaient être induites dans les cellules hépatiques d'organismes, tel les poissons, vivant dans un environnement pollué (Pedrajas et coll. 1993).

#### 3.2.1.2. Les SOD-Fe et Mn

Ces enzymes sont souvent constituées de deux sous-unités identiques, avec un poids moléculaire allant de 40 à 45 kDa. La mitochondrie et certaines bactéries possèdent une SOD-Mn tétramérique (Hassan, 1989). De même, il existe une SOD-Fe tétramérique chez certaines bactéries (Hassan, 1989) et chez le protozoaire, *Tetrahymena pyriformis* (Barra et coll. 1990).

TYPE DE SOD	PM (kDa)	NOMBRE DE S/U	STOECHIOMETRIE METAL/SOD	pI	INHIBITEURS		
					CN <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaN <sub>3</sub>
<b>SOD-Fe</b>							
(bactéries, protozoaires, plantes)	40-46	2	2	4-8	-	+	+
(bactéries, protozoaires)	80	4	4	4-8	-	+	+
<b>SOD-Mn</b>							
(bactéries)	40-43	2	2	4-8	-	-	+
(bactéries, mitochondrie)	80	4	4	4-8	-	-	+
<b>SOD-Cu/Zn</b>							
cytosolique	32-36	2	2	4-6	+	±	+
extracellulaire	135	4	4	4-6	+	±	+

**Tableau I.2:** Caractéristiques générales des SOD.

Ces enzymes tétramériques ont un poids moléculaire d'environ 80 kDa. Dans l'enzyme native, les sous-unités ne sont pas reliées entre-elles par un pont disulfure, mais seulement par des interactions ioniques. Chaque sous-unité d'environ 21 à 23 kDa, contient un atome de fer sous la forme  $Fe^{3+}$  ou un atome de Mn sous la forme  $Mn^{3+}$ . Ces enzymes ont des pI variant de 4 à 8. Il peut exister plusieurs isoformes de l'enzyme chez une même espèce. C'est le cas pour la SOD-Mn de *E. coli* (Hassan, 1989) ou la SOD-Fe chez *Euglena gracilis* (Kanematsu et Asada, 1979).

### 3.2.1.3. Action des inhibiteurs

Les inhibiteurs tels que le cyanure, l' $H_2O_2$  et l'azide, permettent de distinguer les trois types de SOD (Tableau I.2).

Les SOD Cu/Zn sont inhibées réversiblement par le cyanure (Rotilio et coll. 1972). Le carbone du cyanure interagit directement sur  $Cu^{2+}$  du site actif de l'enzyme. Les SOD-Fe et Mn y sont résistantes.

L'azide est aussi un inhibiteur réversible, mais non spécifique puisque les trois types de SOD sont inhibées à des degrés divers (CI 50 respectives de 30 mM, 4 mM et 20 mM pour les SOD Cu/Zn, Fe et Mn (Misra et Fridovich, 1978).

Le peroxyde d'hydrogène inactive irréversiblement la SOD Cu/Zn et beaucoup plus fortement la SOD-Fe, mais n'a aucun effet sur la SOD-Mn. Dans le cas de la SOD Cu/Zn, cette inactivation résulte d'une destruction par  $H_2O_2$  d'un résidu histidine dans le site actif (Hodgson et Fridovich, 1975). L'inactivation de la SOD-Fe résulterait elle d'une modification des résidus Trp, His et Cys proches du site actif (Yamakura, 1984; 1986). Mais certains auteurs rapportent que  $H_2O_2$  réagirait avec le fer du site actif pour libérer un radical  $OH^\circ$ , qui modifierait les résidus Trp (Beyer et Fridovich, 1987).

Récemment, certains auteurs ont montré que le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ), résultant de la réaction de l'anion superoxyde avec l'oxyde d'azote (NO), peut inactiver les trois types de SOD en réagissant avec une tyrosine dans le site actif, pour former une nitrotyrosine (Ischiropoulos et coll. 1992).

En présence des chélateurs de métaux, les SOD peuvent perdre leur activité. C'est le cas de la SOD Cu/Zn en présence de diéthylthiocarbamate qui chélate spécifiquement le cuivre (Misra, 1979).

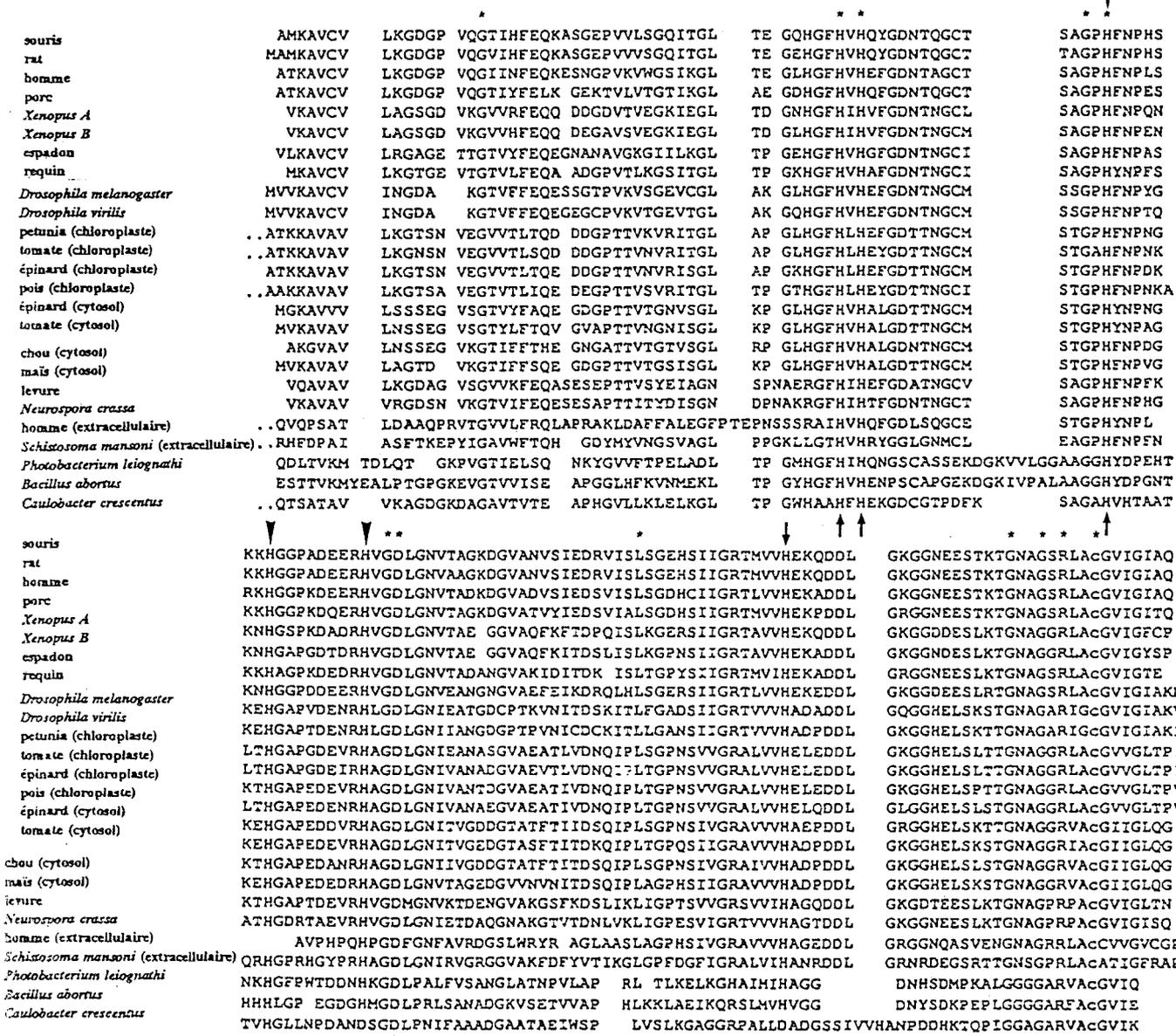


Figure 1.7: Alignement de 25 séquences de SOD Cu/Zn (d'après Smith et Doolittle, 1992). Les étoiles et les flèches indiquent respectivement les résidus conservés et les ligands du cuivre (↓) et du zinc (▼).

### 3.2.2. Structure primaire

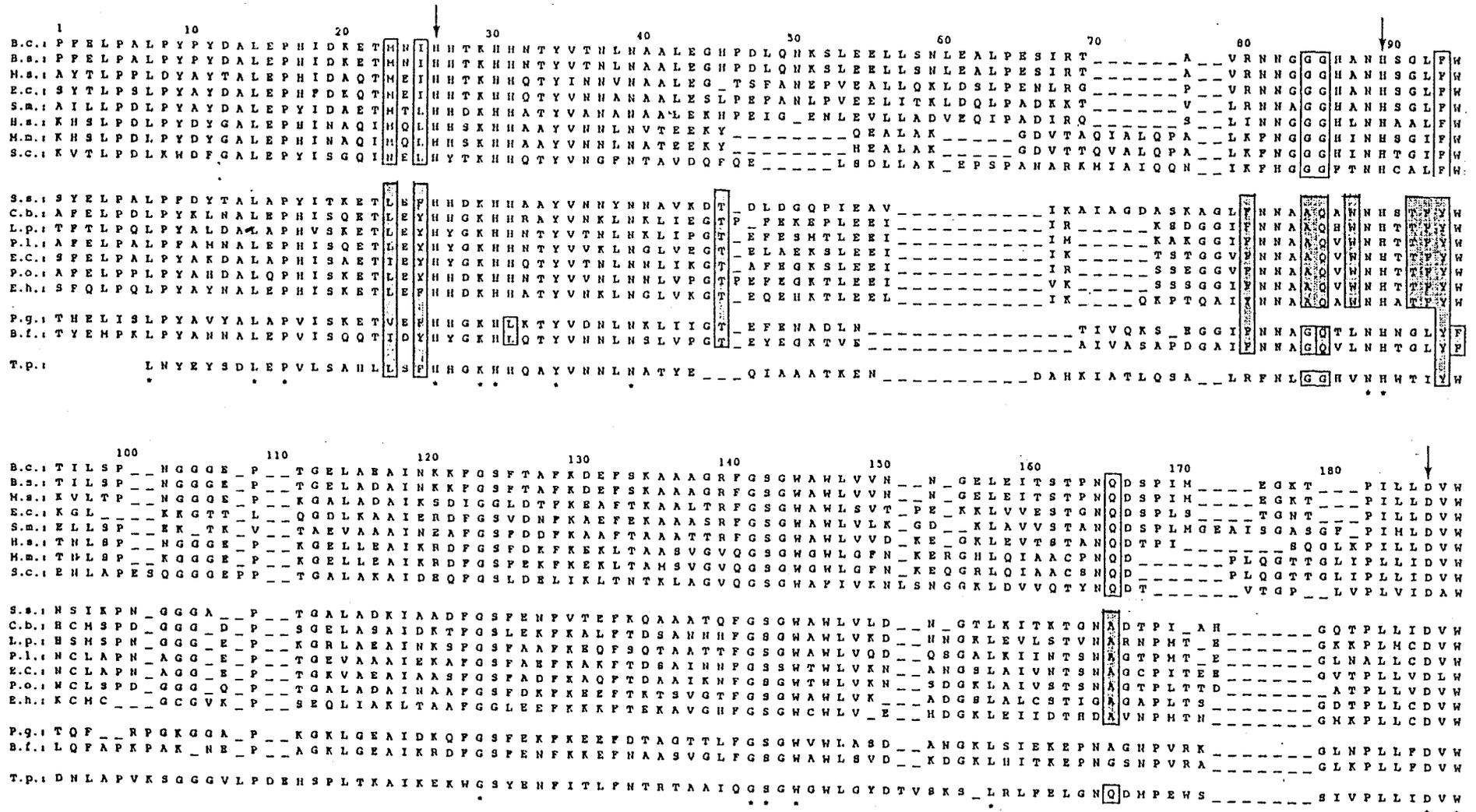
#### 3.2.2.1. La SOD Cu/Zn

Les séquences en acides aminés des SOD Cu/Zn cytosoliques provenant de différents organismes sont très conservées d'une espèce à l'autre (Fig.I.7), excepté pour *Photobacterium leiognathi* (Bannister et coll. 1991). L'extrémité N-terminale des enzymes chez les mammifères est acétylée. Sur environ 150 à 155 acides aminés, 21 résidus invariants sont situés près du pont disulfure et dans la région du site actif dans toutes les SOD Cu/Zn connues (Bannister et coll. 1991). La structure du gène de la SOD chez l'homme, le rat et la souris comprend 5 exons et 4 introns (Hsu et coll. 1992), et chez l'homme ce gène est localisé sur le chromosome 21.

La structure primaire de la SOD Cu/Zn des nématodes renferme une séquence signal très hydrophobe qui est probablement en rapport avec la sécrétion de l'enzyme dans le milieu extérieur (Simurda et coll. 1988; Henkle et coll. 1991; Hong et coll. 1992). La SOD extracellulaire humaine est une glycoprotéine, avec une séquence primaire distincte de la SOD Cu/Zn cytosolique et possède, comme la SOD des nématodes, un peptide signal (Hjalmarsson et coll. 1987). Un domaine très hydrophile dans la protéine est responsable de l'affinité de la SOD extracellulaire humaine pour les héparanes sulfates situés à la surface des cellules endothéliales (Bannister et coll. 1991).

#### 3.2.2.2. Les SOD-Fe et Mn

La structure primaire de ces SOD montre une forte homologie par la présence de régions et de certains résidus très conservés. Une analyse comparative met cependant en évidence certains résidus proches du site actif de l'enzyme, caractéristiques des SOD-Fe ou Mn, pouvant expliquer la spécificité pour le métal cofacteur (Isobe et coll. 1988; Parker et Blake, 1988). Dans le cadre d'études phylogéniques, ces résidus caractéristiques permettent de regrouper les SOD-Fe d'un côté et les SOD-Mn de l'autre (Smith et Doolittle, 1992). Il existe cependant une exception récemment signalée, qui montre que la séquence protéique partielle de la SOD d'*Aerobacter aerogenes*, déduite du gène, est groupée dans les SOD-Mn, alors que la protéine, précédemment caractérisée, semblait être à fer (Kim et coll. 1991; Lee et coll. 1993). Dans le cas des bactéries anaérobies facultatives, les enzymes, capables d'utiliser le Fe ou le Mn comme cofacteur, possèdent dans leur séquence, à proximité du site actif, à la fois des résidus spécifiques des SOD-Fe et Mn (Nakayama, 1990; Amano et coll.



**Figure 1.8:** Alignement des séquences de SOD-Mn et Fe. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR2 et EMBL sont indiquées entre parenthèses. La séquence N-terminale de la SOD-Mn de *Homo sapiens* et *Mus musculus* a été volontairement montrée incomplète et le 1er acide aminé correspond en réalité au 24ème dans la séquence complète. Les séquences présentées ont été volontairement interrompues au Trp(W)-188 de la région WEHAYY conservée dans toutes les SOD-Mn et Fe, avec H-190 correspondant au 4ème ligand du fer ou du manganèse.

**SOD-Mn:** B.c., *Bacillus caldotenax*; B.s., *Bacillus stearothermophilus*; M.s., *Methylobionas sp.*; E.c.(Mn), *Escherichia coli*; S.m., *Streptococcus mutans*; H.s., *Homo sapiens*; M.m., *Mus musculus*; S.c., *Saccharomyces cerevisiae*.

**SOD-Fe:** S.s., *Synechococcus sp.*; C.b., *Coxiella burnetii*; L.p., *Legionella pneumophila*; P.l., *Photobacterium leiognathi*; E.c.(Fe), *Escherichia coli*; P.o., *Pseudomonas ovalis*; E.h., *Entamoeba histolytica*; T.p., *Tetrahymena pyriformis*.

**SOD hybrides:** P.g., *Porphyromonas gingivalis*; B.f., *Bacteroides fragilis*.

Les résidus conservés entre les SOD-Mn et Fe sont indiqués par une étoile. Les résidus caractéristiques pour les SOD-Mn sont encadrés en clair, pour les SOD-Fe en gris foncé et pour les SOD hybrides en gris clair. Les flèches indiquent trois des quatre ligands du fer ou du manganèse.

1990; 1992). La structure primaire des SOD d'archéobactéries est très différente des autres SOD-Fe et Mn (Fig. I.8).

Il existe une grande homologie de séquence entre les SOD-Mn des procaryotes et la SOD-Mn mitochondriale des cellules eucaryotes. Cette homologie tend à supporter l'origine symbiotique de la mitochondrie (Steinman et Hill, 1973).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la SOD mitochondriale est codée par un gène nucléaire et synthétisée dans le cytosol sous la forme d'un précurseur qui présente une séquence supplémentaire de 27 acides aminés dans la partie N-terminale. Dans la mitochondrie, les 27 résidus sont éliminés pour libérer une enzyme active (Autor, 1982).

### 3.2.3. Organisation structurale des SOD

#### 3.2.3.1. Les SOD Cu/Zn

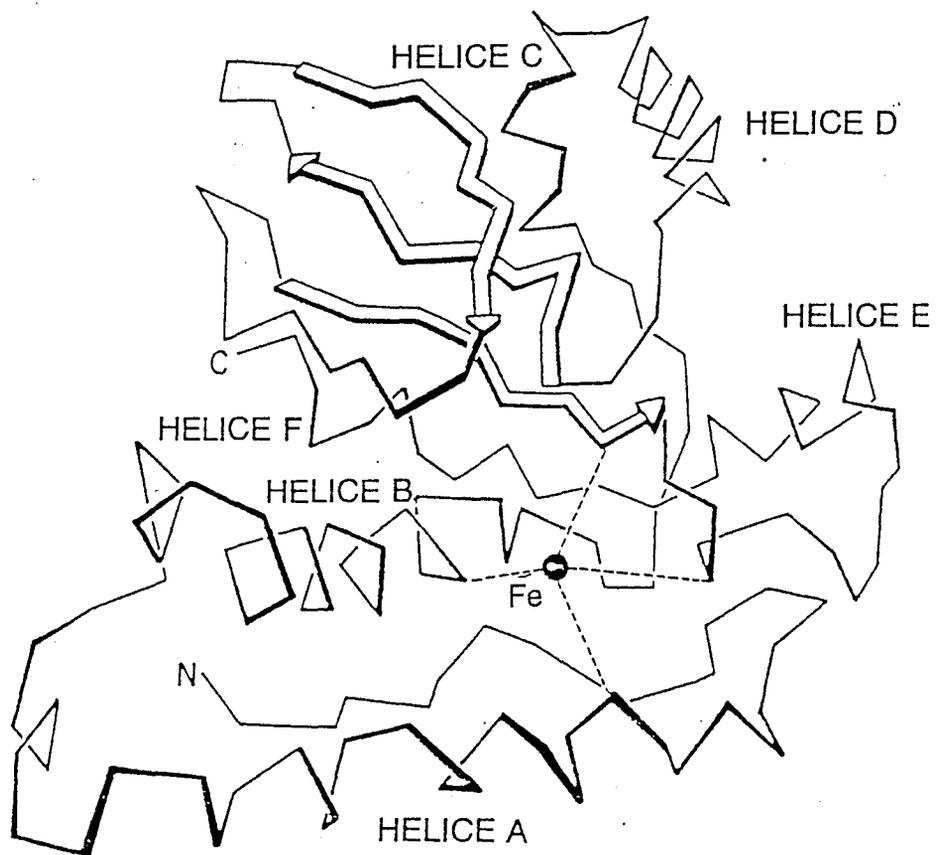
Des études réalisées sur un cristal de la SOD Cu/Zn d'hématie bovine, et aussi à partir de la séquence en acides aminés, montrent que chaque sous-unité contient un pont disulfure. Dans chaque sous-unité, l'atome de cuivre interagit avec 4 ligands, His 44, His 46, His 61 et His 118. Les 4 ligands du zinc sont His 61, His 69, His 78 et Asp 81 (Fig.I.7).

Des études aux rayons X avec une résolution à 2 Å et réalisée sur la SOD Cu/Zn bovine montre qu'elle représente dans l'espace un cylindre composé de brins sous forme de feuillet  $\beta$  antiparallèle. De ces structures partent deux larges boucles non hélicoïdales, au fond desquelles est situé le  $\text{Cu}^{2+}$  du site actif (Fridovich, 1986).

#### 3.2.3.2. Les SOD-Fe et Mn (Fig.I.9)

Les ligands du fer et du Mn sont identiques: His 26, His 89, Asp 186 et His 190 (Fig.I.8).

Au niveau structural, il existe une grande homologie entre les SOD-Fe et Mn (Stallings et coll. 1984). Elles ont une structure renfermant plus de 50% d'hélices  $\alpha$  (Roberts et coll. 1991). D'après les études comparatives des séquences et de la structure tri-dimensionnelle entre la SOD-Fe de *E. coli* et la SOD-Mn de *Thermus thermophilus*, la conformation générale dans l'espace est très semblable entre ces deux types d'enzymes (Carlioz et coll. 1988). Dans l'enzyme native, les interactions entre les sous-unités sont mal connues. Cependant à partir d'une étude en cristallographie à rayon X réalisée sur la SOD-Mn recombinante humaine, comparée à celle de *Thermus thermophilus*, les auteurs montrent une grande homologie des



**Figure I.9:** Organisation dans l'espace de la sous-unité d'une SOD-Fe. Les différentes hélices  $\alpha$ , les feuillets  $\beta$  et le cofacteur sont représentés (d'après Stallings et *coll.* 1984).

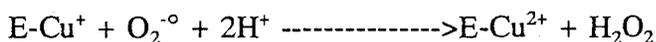
acides aminés intervenant dans l'interaction des sous-unités (Wagner et *coll.* 1993). La grande homologie de structure dans l'espace entre ces deux classes de SOD permet d'expliquer aussi que, chez *E. coli*, une enzyme hybride, constituée d'une sous-unité de la SOD-Fe et une de la SOD-Mn, soit active (Clare et *coll.* 1984).

### 3.2.4. Activité catalytique des SOD

Nous avons vu que chaque sous-unité contient un site actif, mais c'est leur association en dimère ou en tétramère, selon les cas, qui permet à l'enzyme d'avoir une activité catalytique.

#### 3.2.4.1. La SOD Cu/Zn

L'activité catalytique de la SOD Cu/Zn résulte d'une réduction, suivie d'une oxydation de l'ion cuivre du site actif:

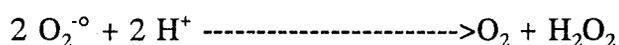
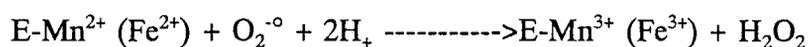
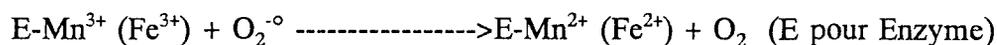


Dans les SOD Cu/Zn, le Zn ne participe pas à la réaction catalytique et joue un rôle important dans la stabilité de la structure de l'enzyme (Fridovich, 1975). Dans le site actif, le groupement guanidine du résidu Arg-141 intervient dans l'activité catalytique selon un mécanisme proposé par Tainer et *coll.* (1983).

L'activité de la SOD Cu/Zn est stable pour des pH compris entre 5,5 et 9,5 (Fridovich, 1986).

### 3.2.4.2. Les SOD-Fe et Mn

L'activité catalytique résulte de la réduction, puis l'oxydation du Mn ou du Fe, selon le schéma suivant:



Le mécanisme détaillé de la réaction catalytique au niveau du site actif est mal connu pour les SOD-Fe et Mn. Mais les similitudes au niveau de la disposition des ligands du site actif et les groupements environnants de la chaîne polypeptidique indiquent que l'activité catalytique des SOD-Fe et Mn impliquerait un mécanisme semblable à celui fonctionnant dans la SOD Cu/Zn.

Pour la plupart des SOD-Fe ou Mn, l'activité est perdue lorsque le métal cofacteur est enlevé. L'activité est restaurée en ajoutant à l'apoprotéine le métal cofacteur spécifique qui n'est pas interchangeable. Mais, comme nous l'avons vu précédemment chez certaines bactéries anaérobies facultatives, l'activité est restaurée avec l'un ou l'autre des cofacteurs (Hassan, 1989; Amano et *coll.* 1990; 1992).

A l'inverse de la SOD Cu/Zn, l'activité des SOD-Fe et Mn diminue rapidement à pH alcalin (Fridovich, 1986).

### 3.2.4.3. Stabilité de l'activité des SOD

La structure des SOD et la relative inaccessibilité du site actif leur confèrent une certaine stabilité.

Les SOD Cu/Zn sont généralement très stables en présence de solvants, tels le chloroforme ou l'acétone (Fridovich, 1986), qui de ce fait peuvent être utilisés pour la purification (Mc Cord et Fridovich, 1969). De plus leur activité subsiste en présence de 8 M d'urée ou de détergents, tels le SDS à 2% (Fridovich, 1986) ou le lubrol à 0,1% (Mailer et Maestro, 1991). Par contre, les SOD-Fe et Mn sont très instables en présence des solvants. Les SOD-Mn sont inactivées par le SDS et par un traitement au chloroforme éthanol (Weisiger et Fridovich, 1973), excepté la SOD-Mn de *Halobium cutirubrum* (May et Dennis,

1989) et la SOD-Fe de *Thermoplasma acidophilum* (Searcy et Searcy, 1981), deux archéobactéries.

### 3.3. REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA SOD

L'expression de certaines SOD peut être augmentée sous l'influence de nombreux facteurs physico-chimiques que nous nous proposons d'examiner. La disponibilité et le transport des métaux cofacteurs jouent également un rôle important. Enfin, les mécanismes responsables de la régulation de l'expression des SOD sont en général encore mal connus. C'est chez *E. coli* que le système a été le plus étudié.

#### 3.3.1. Les inducteurs

##### 3.3.1.1. L'oxygène et l'anion superoxyde

L'exposition à une concentration importante d'O<sub>2</sub> induit la biosynthèse de SOD-Fe ou Mn chez de nombreuses bactéries (Hassan, 1989). Chez *E. coli*, une SOD-Fe constitutive est présente en anaérobiose et en aérobiose. Par contre la SOD-Mn et la SOD hybride sont absentes en anaérobiose mais sont rapidement induites lors de l'exposition d'*E. coli* à l'O<sub>2</sub> (Hassan, 1988). Chez les mammifères, l'élévation de la pression en O<sub>2</sub> induit également l'expression de SOD dans beaucoup de cellules et de tissus (Fridovich, 1986). Les SOD Cu/Zn et Mn de *Saccharomyces cerevisiae* sont également inductibles par l'O<sub>2</sub> (Galiazzo et Labbe-Bois, 1993).

L'anion superoxyde est capable d'induire l'expression de la SOD. Certains composés comme le paraquat et la menadione, qui sont générateurs d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en présence d'O<sub>2</sub>, sont capables d'induire l'expression de la SOD-Mn chez *E. coli* (Hassan, 1989), ou la SOD Cu/Zn et Mn chez *Saccharomyces cerevisiae* (Galiazzo et Labbe-Bois, 1993) et les mammifères (St Clair et coll. 1991).

Certains anticancéreux (Bléomycine, mitomycine C, cisplatine, 5-fluorouracile et doxorubicine) ont été montré induire l'expression de la SOD dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Gogun et coll. 1990; Doroshov et coll. 1991). Cette induction de SOD est attribuée aux EAO libérées lors de la métabolisation de ces molécules par la cellule tumorale.

### 3.3.1.2. Le choc thermique

Il semble exister une relation, entre le choc thermique et le stress oxydatif. En présence d'O<sub>2</sub>, l'élévation de température, pendant une durée limitée, induit la biosynthèse de la SOD-Mn chez les bactéries et cette induction persiste encore quelques heures après le choc thermique (Privalle et Fridovich, 1988; Begonia et Salin, 1991). Cette réponse cellulaire semble être liée à une augmentation d'O<sub>2</sub><sup>•°</sup> intracellulaire pendant le choc thermique, car elle n'a pas lieu en absence d'O<sub>2</sub>.

L'induction de la SOD Cu/Zn par un choc thermique a été également rapportée chez les mammifères (Loven et *coll.* 1985; Sheil et *coll.* 1986; Hass et Massaro, 1988). Les résultats montrent que l'enzyme est induite surtout après et non pendant le choc thermique.

L'absence en amont des gènes de SOD, dans l'état des connaissances actuelles, de séquences caractéristiques des HSP est en accord avec cette observation et montre que l'induction thermique de la SOD en est une conséquence indirecte.

### 3.3.1.3. Les cytokines

Ces molécules ont un rôle très important de médiateurs dans la réponse immune, en agissant sur diverses cellules de l'organisme. Récemment, il a été montré que l'interféron gamma (IFN  $\gamma$ ), le Tumor Necrosis Factor (TNF) et l'interleukine 1 (IL-1) protègent les cellules contre la toxicité de l'O<sub>2</sub> et des EAO libérées lors de la réponse immune, en stimulant l'expression de la SOD-Mn de la mitochondrie dans diverses cellules normales ou cancéreuses (Masuda et *coll.* 1988; Visner et *coll.* 1990; Harris et *coll.* 1991; Warner et *coll.* 1991; Chang et *coll.* 1992; Pang et *coll.* 1992). L'IL-6 ainsi que le facteur de différenciation D et l'hormone de croissance potentialisent l'action du TNF  $\alpha$  sur l'induction de la SOD-Mn (Ono et *coll.* 1992; Tsan et *coll.* 1992a et b). Cependant une étude récente a montré que le TNF  $\alpha$  induisait la production d'O<sub>2</sub><sup>•°</sup>, via le Ca<sup>2+</sup> comme messenger, dans la mitochondrie (Hennet et *coll.* 1993). Ce résultat expliquerait la stimulation de l'expression de SOD mitochondriale par le TNF  $\alpha$ , via les O<sub>2</sub><sup>•°</sup> qu'il induit. Des cellules incubées en présence de LPS montrent une augmentation de l'activité de leur SOD-Mn (Visner et *coll.* 1990).

### 3.3.2. Le métal cofacteur

L'activité de toutes les SOD est dépendante du métal cofacteur spécifique du type de l'enzyme. L'absence de fer et de manganèse dans une culture d'*E. coli* bloque la synthèse des

deux SOD. De même, en présence de chélateurs du fer, *E. coli* synthétise sa SOD-Mn, même en absence d'O<sub>2</sub>. Par contre un excès de fer dans le milieu de culture stimule l'expression de la SOD-Fe (Hassan, 1989).

Chez les rongeurs, un régime alimentaire carencé en cuivre ou dans lequel est ajouté un chélateur du cuivre, conduit à une diminution de de 50 à 85% de la SOD Cu/Zn active, selon les tissus (Heikkila et coll. 1976; Prohaska, 1991). L'absence de cuivre fait baisser la quantité de SOD active, sans bloquer la synthèse de l'apoenzyme (Harris, 1992). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'addition de cuivre dans le milieu stimule l'expression du gène de la SOD Cu/Zn, même en absence d'O<sub>2</sub> (Galiazzo et coll. 1991). Dans ce modèle, le gène de la SOD Cu/Zn est co-régulé avec celui codant la métallothionéine captant le cuivre. Cette co-régulation est liée à l'existence d'une région promotrice commune entre ces deux gènes, pouvant interagir avec un facteur de transcription déjà décrit, ACE1 (Carri et coll. 1991).

### 3.3.3. Régulation de la SOD-Mn chez *E. coli*

Deux régulons, contrôlant la réponse à un choc oxydatif, ont été identifiés chez *E. coli*. Le régulon OxyR qui contrôle plusieurs gènes, dont la catalase, est inductible par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le régulon SoxRS est inductible par l'anion superoxyde. Il contrôle plusieurs gènes dont le gène *sodA* de la SOD-Mn (Demple, 1991).

Chez *E. coli*, il existe une SOD-Fe dont le gène *sodB* est exprimé de façon constitutive, en anaérobiose ou en aérobiose. Par contre, la SOD-Mn n'est pas exprimée en phase anaérobie et est induite en phase aérobie ou en présence de systèmes générateurs d'O<sub>2</sub><sup>•</sup>. En anaérobiose, la SOD-Mn peut être induite par des chélateurs du fer divalent (Fee, 1991).

L'expression du gène *sodA* chez *E. coli*, est contrôlée par plusieurs régulateurs de transcription (Demple et Cuevas, 1991; Fee, 1991; Compan et Touati, 1993). parmi lesquels Fur, qui est un régulateur du système d'entrée du fer chez *E. coli*, ArcB-ArcA qui contrôlent l'expression de l'enzyme lors du passage aérobie-anaérobie, HIF (facteur d'intégration de l'hôte), Fnr (fumarate nitrate réductase), SoxR et SoxS. Tous ces régulateurs de transcription se fixent en amont du gène *sodA* et un certain nombre interfèrent entre eux, notamment au niveau de l'"iron box" qui est la cible de Fur. La combinaison des différents régulateurs de transcription varie en aérobiose et en anaérobiose et permet d'expliquer comment *sodA* est régulé en fonction des conditions dans lesquelles se trouve la bactérie.

## CHAPITRE 4 : *PLASMODIUM* ET CHOC OXYDATIF

Des données épidémiologiques et expérimentales ont montré que *Plasmodium* est sensible à l'oxygène et à ses dérivés plus réactifs. Au cours du développement dans sa cellule hôte, le parasite est soumis à un stress oxydant provoqué par son propre métabolisme, mais aussi par une réaction de l'hôte. Cette sensibilité du *Plasmodium* au choc oxydatif a permis de nouvelles approches de chimiothérapie antipaludéenne, visant à utiliser des molécules oxydantes. Quelques enzymes de défense contre le choc oxydant ont été mises en évidence chez *Plasmodium*, mais leur rôle exact dans la défense du parasite n'est pas connu et la possibilité d'adaptation au choc oxydatif du parasite n'a pas encore été réellement explorée, faute de connaissance approfondie de ces enzymes.

### 4.1. SENSIBILITE DE *PLASMODIUM* AUX ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE

#### 4.1.1. Données épidémiologiques

Des études épidémiologiques ont montré dans des zones endémiques palustres, une fréquence importante de certaines maladies héréditaires touchant le globule rouge (drépanocytose,  $\alpha$  et  $\beta$  thalassémies, persistance d'hémoglobines foetales), de déficiences en enzymes telle la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Certains auteurs ont avancé que la présence de populations présentant ces maladies serait le résultat d'une pression de sélection de la malaria ayant favorisé l'émergence de populations plus résistantes à la parasitose.

En effet, dans des hématies dans lesquelles persistent des hémoglobines foetales ou provenant de sujets atteints de thalassémies, *Plasmodium*, cultivé *in vitro*, se développe plus difficilement que dans des hématies normales. Cette croissance réduite serait due à un stress oxydatif plus important dans ce genre d'hématies, lié à l'instabilité de l'hémoglobine (Friedman, 1979; Hebbel et coll. 1985; Orjih et coll. 1985; Golenser, 1989). La présence de quantités importantes d'hème libre dans ces hématies serait à l'origine de la production importante d'EAO. Pour une même tension en oxygène ou en présence de molécules oxydantes ou de systèmes enzymatiques générant des EAO, *Plasmodium* est plus sensible

dans les hématies pathologiques que dans les hématies normales (Clark et coll. 1989; Yuthavong et coll. 1990). Dans le cas d'une déficience en G6PDH, le développement de *Plasmodium* est également perturbé. C'est la seule enzyme qui régénère, par la voie des pentoses, le NADPH indispensable dans l'hématie pour maintenir le glutathion sous forme réduite. Nous verrons plus loin que le *Plasmodium* est à l'origine d'EAO qui augmentent le choc oxydant dans l'hématie parasitée et contribuent encore à sa fragilisation. C'est ainsi que les parasites sont 4 à 8 fois plus sensibles à l'action oxydante de l'acétylphénylhydrazine ou de la primaquine, dans des hématies déficientes en G6PDH que dans des hématies normales (Clark et coll. 1989; Golenser et coll. 1991).

Toutefois il faut signaler que, par prolongation des cultures, *Plasmodium* est capable de se développer dans de nombreuses hématies anormales. Il peut même exprimer une G6PDH dans des hématies déficientes (Usanga et Luzzatto, 1985). D'autre part, des études réalisées sur le terrain ont montré que la fréquence du paludisme dans des populations S- était identique à celle observée dans des populations normales. Les parasitémies observées sont légèrement plus faibles mais la différence n'est pas significative (Gendrel et coll. 1992).

#### 4.1.2. Données expérimentales

*Plasmodium* est très sensible au choc oxydant. En culture, *Plasmodium falciparum* croît dans de bonnes conditions en présence de 0,5 à 5% d'oxygène. En présence de 21% d'O<sub>2</sub>, la croissance du parasite est très fortement inhibée (Clark et coll. 1989).

Des études réalisées *in vitro*, en présence de systèmes enzymatiques libérant l'anion superoxyde (xanthine-xanthine oxydase) ou du peroxyde d'hydrogène (glucose-glucose oxydase) ont montré une diminution de la croissance. Les parasites restent bloqués au stade trophozoïte et schizonte (Wozencraft, 1986; Malhotra et coll. 1988). L'utilisation directe du peroxyde d'hydrogène *in vivo* et *in vitro* a montré la même efficacité à une concentration de 10 µM (Dockrell et Playfair, 1983; 1984). De même, l'injection de certaines substances, générant des EAO (phénylhydrazine, alloxane, tert-butylhydroperoxyde, divicine, primaquine et peroxyde d'amines), chez des souris infectées par *P. yoelii*, *P. vinckei* et *P. chabaudi* permet de réduire considérablement la parasitémie (Clark et Hunt, 1983; Clark et coll. 1984a; 1984b; Goldstein et Mc Donagh, 1976; Vennerstrom, 1989; Dockrell et Playfair, 1983). L'action de la primaquine est connue pour libérer de l'anion superoxyde ou de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Long-Hong et coll. 1992). La divicine et l'isouramil génèrent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et, *in vitro*, ont une activité

antimalarique plus efficace sur *P. falciparum* infectant des hématies déficientes en G6PDH que sur le parasite infectant des hématies normales (Clark et coll. 1989).

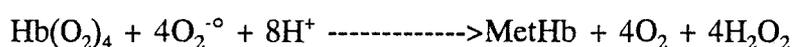
D'autres conditions expérimentales ou cliniques, comme les carences en vitamines antioxydantes, ont également permis d'impliquer les EAO comme agents qui perturbent la croissance de *Plasmodium*. On a montré que des carences en riboflavine ralentissaient le développement de *Plasmodium* aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et que celles-ci étaient liées à une diminution dans la cellule hôte du glutathion réduit (Hunt et Stocker, 1990). De même *P. berghei* et *P. vinckei* ont un taux de croissance très diminué lorsqu'ils infectent des souris carencées en vitamine E (Eaton et coll. 1976; Hunt et Stocker, 1990).

## 4.2. ORIGINE DU CHOC OXYDATIF CHEZ *PLASMODIUM* (Fig.I.10)

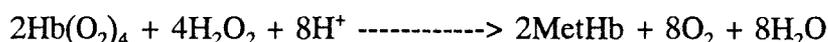
*Plasmodium* est soumis, au cours de son développement, à un stress oxydant, qui peut être soit d'origine endogène, soit d'origine exogène, provoqué par l'action du parasite sur l'hématie, par la réponse du système immunitaire de l'hôte, ou par des molécules antimalariques oxydantes.

### 4.2.1. Production d'EAO par le parasite

Au cours de son développement, *Plasmodium* internalise le cytosol de sa cellule hôte dans une vacuole digestive. La principale protéine de l'hématie, l'hémoglobine (sous forme d'oxyhémoglobine), est rapidement dégradée par plusieurs protéases (Goldberg et Slater, 1992). Dans les conditions acides (pH d'environ 5), qui sont celles rencontrées dans la vacuole digestive, l'oxyhémoglobine s'autooxyde en méthémoglobine et libère des anions superoxydes (Misra et Fridovich, 1972), qui à leur tour peuvent réagir avec l'oxyhémoglobine en donnant de la méthémoglobine et du peroxyde d'hydrogène:



En milieu acide, la dismutation spontanée des anions superoxydes produit du peroxyde d'hydrogène qui à son tour réagit avec l'oxyhémoglobine:



De plus, au cours de la dénaturation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive, du fer provenant de l'hème et l'hème lui-même peuvent induire la formation d' $\text{OH}^\circ$  par la réaction de Fenton (Golenser et coll. 1991; Gabay et Ginsburg, 1993). Dans les hématies de sujets atteints d'hémoglobinopathies, l'hémoglobine instable se transforme plus rapidement en méthémoglobine que dans des hématies normales, d'où une quantité plus importante d'anion superoxyde qui sensibilise le parasite, plus encore en présence d'une drogue oxydante. Les noyaux héminiques, lorsqu'ils sont polymérisés en pigment malarique par l'hème polymérase, sont incapables de générer ces  $\text{OH}^\circ$ . Chez *Plasmodium*, la possibilité de libération d'EAO au cours de la digestion de l'hémoglobine a été avancée par plusieurs auteurs (Atamna et Ginsburg, 1993). Atamna et Ginsburg (1993) émettent l'hypothèse que les EAO, produites dans la vacuole digestive, pourraient agir dans d'autres compartiments cellulaires du parasite. Les radicaux  $\text{OH}^\circ$  seraient à l'origine d'une dégradation de l'ADN (Har-El et coll. 1993). Aucune preuve expérimentale absolue ne supporte cette hypothèse. Il a seulement été montré que les anions superoxydes pouvaient traverser la membrane de fantômes de globules rouges (Lynch et Fridovich, 1978).

En dehors de la digestion du contenu de l'hématie, des EAO peuvent également être produites dans le parasite. Une enzyme, récemment caractérisée chez *P. berghei* et *P. falciparum*, la dihydroorotate déshydrogénase (Krungkrai et coll. 1991a; 1991b), peut produire de l'anion superoxyde dans la mitochondrie, en catalysant l'oxydation du dihydroorotate en orotate avec l'ubiquinone comme accepteur d'électrons (Krungkrai, 1991b).

#### 4.2.2. Fragilisation de l'hématie parasitée

Au cours de son développement, *Plasmodium* induit un choc oxydatif dans l'hématie, ce qui n'est pas sans conséquences pour lui-même. De plus, la réaction de l'hôte intensifie cet effet sur les hématies parasitées.

##### - Les causes

Le choc oxydatif induit par *Plasmodium* sur l'hématie est lié à l'internalisation de son contenu par le parasite. En dehors de l'hémoglobine, les enzymes de défense (SOD, catalase et GPx) et des molécules antioxydantes (acide ascorbique, GSH et NADPH) sont internalisées (Hunt et Stocker, 1990). L'internalisation des enzymes de défense comprend également la méthémoglobine réductase qui assure la régénération de l'oxyhémoglobine à partir de la

méthémoglobine. En conséquence, la quantité de méthémoglobine augmente rapidement dans l'hématie parasitée et la diminution des enzymes de défense conduit à une élimination moins efficace des EAO (Hunt et Stocker, 1990). Les hématies parasitées sont donc plus sensibles aux EAO.

Chez des sujets infectés par *Plasmodium*, les cellules phagocytaires assurant la défense de l'hôte agissent également sur les hématies parasitées. La présence de *Plasmodium* dans l'organisme déclenche une réponse immunitaire de type humoral et cellulaire. L'immunité humorale, stimulée par certains antigènes parasitaires libérés dans l'organisme, ne semble pas assurer une protection absolue. Certaines cellules immunitaires (macrophages et granulocytes neutrophiles) stimulées par des antigènes parasitaires ou par des cytokines (IL-1, interféron  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ ) interviennent également dans la défense de l'hôte, en phagocytant les hématies parasitées, en inactivant les parasites par libération de protéases lysosomiales, ou d'autres substances très cytotoxiques, comme des EAO, de l'hypochlorite, ou de l'oxyde d'azote qui endommagent les parasites. Des études réalisées *in vitro*, ont montré que des macrophages, activés par l'IFN  $\gamma$  ou des endotoxines, sécrétaient des radicaux oxygénés, qui induisaient la mort de *P. falciparum*. (Taverne et coll. 1981; Kharazami et Jepsen, 1984; Ockenhouse et coll. 1984; Wozencraft et coll. 1984; Golenser et coll. 1991). De même, des monocytes, isolés à partir de sujets infectés par *P. vivax* ou *P. falciparum*, ont une activité très nette sur les parasites *in vitro* (Dubey et coll. 1991). Dans les modèles murins, plusieurs auteurs ont montré le rôle important des phagocytes (Clark et Hunt, 1983; Dockrell et Playfair, 1983; Ockenhouse et Shear, 1984; Eze, 1991). Ce mécanisme d'action semble particulièrement efficace sur des hématies de sujets atteints d'hémoglobinopathies ou de déficience en G6PDH, et infectées par *Plasmodium*, et pourrait contribuer à la résistance de ces personnes au paludisme (Yuthavong et coll. 1990). La réponse de l'hôte fait intervenir des cytokines, dont le TNF  $\alpha$  qui, selon certains auteurs, pourrait agir seul (Haidaris et coll. 1983; Wozencraft et coll. 1984) ou en synergie avec d'autres cytokines sur les hématies parasitées (Taverne et coll. 1987), en induisant la libération d'EAO. Aucune expériences n'a pu montrer l'activité *in vitro* du TNF  $\alpha$  sur les parasites (Jensen et coll. 1987), alors qu'il est actif *in vivo* (Taverne et coll. 1987). L'action directe du TNF  $\alpha$  sur les cellules pourrait dépendre des EAO qu'il induit, comme cela a été montré sur des hépatocytes de souris (Adamson et Billings, 1992).

### - Les conséquences

La peroxydation des lipides, dans les hématies parasitées, est plus importante que dans les hématies saines (Simoes et coll. 1992). Le taux de dialdéhyde malonique augmente avec la parasitémie (Mohan et coll. 1992). Les peroxydes lipidiques et le dialdéhyde malonique produits dans l'hématie sont très toxiques *in vitro* sur *P. falciparum* (Clark et coll. 1987) qui, cultivé en présence de sérums d'animaux sensibilisés par des endotoxines, est inhibé par les peroxydes lipidiques, provenant des lipoprotéines du sérum (Rockett et coll. 1988). La membrane du parasite contient beaucoup moins de vitamine E (antioxydant capable de ralentir la peroxydation lipidique) que celle de l'hématie (Stocker et coll. 1985). Ceci peut expliquer en partie la sensibilité du parasite à une carence en vitamine E (Eaton et coll. 1976).

*In vivo*, la peroxydation des lipides membranaires de l'hématie et du parasite résulte de l'activité des phagocytes. Dans le sérum de patient impaludé, les taux de peroxydes lipidiques et de dialdéhyde malonique sont plus élevés que dans le sérum de sujets sains (Nakornchai et Anantavara, 1992; Das et Thurnham, 1992).

*In vitro*, le stress oxydatif induit par *Plasmodium* sur l'hématie est important. Il crée des altérations pouvant conduire à l'hémolyse. Dans une culture de *P. falciparum*, les hématies saines sont soumises à ce stress oxydatif, car l'éclatement des schizontes libère de l'hémoglobine et des produits toxiques comme le dialdéhyde malonique et des peroxydes lipidiques (Mohan et coll. 1992). *In vivo*, la situation est plus dramatique, car la libération de ces produits dans le sérum, associée à l'activité des phagocytes, provoque une diminution du potentiel antioxydant dans le plasma, ce qui accentue l'anémie chez le sujet impaludé (Das et Thurnham, 1992; Nakornchai et Anantavara, 1992). Pendant la phase hépatique, un choc oxydant a été observé chez des singes infectés par *P. knowlesi*, chez lesquels les EAO et la peroxydation des lipides augmentent au cours de l'infection (Srivastava et coll. 1992). Le stress oxydant, dû à la réaction de l'organisme face à une infection malarienne, touche d'autres tissus (Garnham, 1987). Dans les formes graves d'infection à *P. falciparum*, le taux de TNF  $\alpha$  et la production d'EAO par les phagocytes sont plus élevés (Descamps-Latscha et coll. 1987; Nielsen et Theander, 1989). Ceci peut entraîner des complications de type inflammatoire et des lésions neurovasculaires, comme dans la malaria cérébrale (Clark et coll. 1989).

### 4.2.3. Molécules antimalariques

La sensibilité de *Plasmodium* au choc oxydatif a ouvert de nouvelles perspectives dans la lutte contre le paludisme, basées sur le développement d'antimalariques provoquant un choc fatal au parasite.

A partir de plantes utilisées depuis 20 siècles dans la pharmacopée chinoise, il a été possible d'isoler le qinghaosu ou artémisinine, extrait d'*Artemisia annua* et le yingzhaosu, extrait d'*Artabotryx hexapetalus*, qui sont particulièrement efficaces contre les fièvres palustres. Le qinghaosu et le yingzhaosu sont des sesquiterpènes lactones, appartenant respectivement à la famille des trioxanes et des dioxanes, et caractérisés par la présence d'un pont endoperoxyde (**Fig.I.11**). A partir de l'artémisinine, un certain nombre de dérivés et d'analogues, présentant une configuration similaire, ont été produits (artémether et artéether) et ont montré une activité aussi efficace. L'artémisinine se concentre environ 150 fois plus dans les hématies parasitées que dans les hématies saines. Elle a des effets toxiques sur le parasite, au niveau des membranes, inhibe un certain nombre d'enzymes (Vennerstrom et Eaton, 1988) et induit une prolifération spectaculaire des membranes (Maeno et coll. 1993). Récemment, l'artémisinine a été localisée dans la mitochondrie et dans la vacuole digestive (Maeno et coll. 1993).

Le mécanisme d'action de l'artémisinine est très mal connu, cependant plusieurs travaux tendent à montrer que l'activité de cet endoperoxyde fait intervenir les EAO. La fonction endoperoxyde supporte l'activité antimalarique (Gu et coll. 1980), ce qui suggère un mode d'action de type oxydatif. De plus l'activité de l'artémisinine est potentialisée en présence d'oxygène, de drogues oxydantes ou de molécules comme les flavones (Elford et coll. 1987; Krungkrai et coll. 1987), mais elle est atténuée en présence d'agents antioxydants ( $\alpha$ -tocophérol, dithiothréitol, catalase) (Vennerstrom et Eaton, 1988). Des travaux récents ont également montré qu'en présence de fer, l'artémisinine était plus efficace (Kamchonwongpaisan et coll. 1992). Certains auteurs pensent que la forte activité de l'artémisinine envers *Plasmodium* proviendrait de son interaction avec le fer lié à l'hème (Meshnick et coll. 1991).

Sur le modèle de l'artémisinine, des endoperoxydes trioxanes, présentant une forte activité antimalarique, ont pu être développés (Posner et coll. 1992; Peters et coll. 1993). Les cas de résistance à l'artémisinine et à ses dérivés étaient inexistantes jusqu'à une date récente. Toutefois, Inselburg (1985) a obtenu par mutagenèse des mutants de *P. falciparum* résistants

à l'artémisinine et Vennerstrom avait signalé la possibilité d'apparition de souches moins sensibles chez les *Plasmodium* de rongeurs (Vennerstrom et coll. 1989). L'observation préliminaire récente, sur des isolats de *P. falciparum* provenant de l'Asie du Sud-Est, d'une sensibilité diminuée à l'artéether et à l'artésunate (Gay et coll. 1993), montre que dans des régions où l'utilisation des endoperoxydes devient importante du fait de la résistance à la chloroquine et à la méfloquine, le parasite pourrait s'adapter à ces antimalariques .

### 4.3. LE SYSTEME ENZYMATIQUE DE DEFENSE DE *PLASMODIUM* (fig.I.10)

Peu d'études ont porté sur les mécanismes propres de défense de *Plasmodium* au choc oxydatif et il est encore admis aujourd'hui, que le parasite bénéficie de l'équipement enzymatique important de sa cellule hôte.

#### 4.3.1. La SOD

Chez *P. falciparum*, une SOD endogène se différenciant de la SOD de l'hématie humaine, par son point isoélectrique (6,8) et par sa résistance au cyanure a été mise en évidence (Fairfield et coll. 1988). Cette SOD n'a pas été détectée au stade anneau mais au stade trophozoïte agé. La part de l'activité SOD endogène dans les formes âgées du parasite n'a jamais été mesurée et a été considérée comme négligeable (Hempelmann et coll. résultats non publiés, cités par Golenser, 1991). Sur la base de l'action des inhibiteurs, la SOD endogène de *P. falciparum* semblait être à manganèse, donc probablement d'origine mitochondriale (Ranz et Meshnick, 1989). Aucune activité endogène n'a été mise en évidence chez les *Plasmodium* de rongeurs (Suthipark et coll. 1982; Fairfield et coll. 1983; Seth et coll. 1985).

La SOD de l'hématie semble jouer un rôle important dans la protection de *P. berghei* et des formes jeunes de *P. falciparum*. Dans les extraits parasitaires, une SOD présentant les mêmes caractéristiques que celle de l'hôte est toujours détectée (Fairfield et coll. 1983; 1988). Par fractionnement cellulaire, il a été observé que la localisation de la SOD de la cellule hôte coïncidait avec les enzymes responsables de la dégradation de l'hémoglobine, chez *P. berghei*, ce qui laisse supposer qu'elle est internalisée dans les vésicules digestives (Fairfield et coll. 1986). La présence de la SOD adoptée dans les vésicules digestives pourrait être bénéfique au parasite car, au cours de la digestion de l'hémoglobine, de l'anion superoxyde est libéré.

Toutefois aucune preuve expérimentale n'a pu montrer une translocation de l'enzyme vers le compartiment cytoplasmique.

#### 4.3.2. Les autres enzymes

##### - La catalase

L'étude sur des extraits de *P. falciparum* isolé de sa cellule hôte a montré la présence d'une activité catalase non négligeable, à la fois dans les formes jeunes et âgées (Fairfield et coll. 1988), mais aucune mise en évidence sur gel ne permet de conclure à l'existence d'une activité endogène. Par contre l'activité catalase est négligeable dans des extraits de *P. berghei* et peut faire plutôt penser à une contamination provenant de l'hématie (Areekul et Boonme, 1992).

##### - La GPx

Une activité GPx significative a été observée dans des extraits de formes âgées de *P. falciparum*, mais elle n'était pas détectable dans les formes jeunes (Fairfield et coll. 1988). Cette activité GPx détectée a été décrite comme indépendante du sélénium (Fritsch et coll. 1987). Mais une fois encore, l'origine endogène de cette enzyme n'a pu être confirmée.

Actuellement, aucune glutathion réductase n'a été mise en évidence chez *Plasmodium*, mais selon certains auteurs, le parasite stockerait celle du globule rouge (Hempelmann et coll. 1987).

##### - Les enzymes régénérant le NADPH

Nous avons signalé précédemment l'importance du NADPH dans la régénération du GSH mais aussi dans des conditions de stress oxydatif. Au début de son développement, le parasite dépend du NADPH de l'hématie. Cependant, le stress oxydatif qu'il impose sur l'hématie diminue le NADPH. Pour faire face, il dispose d'au moins deux enzymes capables de régénérer le NADPH, la glutamate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase (Sherman et coll. 1971; Walter et coll. 1974; Vander-Jagt et coll. 1989; Sahni et coll. 1992). Une troisième enzyme, la G6PDH qui régénère le NADPH, a été caractérisée chez *P. falciparum* (Kurdi-Haidar et Luzzatto, 1990). L'enzyme endogène, qui est induite lorsque le parasite se développe dans des hématies déficientes en G6PDH, est un premier exemple d'adaptation du parasite au choc oxydatif (Usanga et Luzzatto, 1985).

Il a été montré par Stocker et *coll.* (1985) que les activités enzymatiques dans les hématies de souris infectées par *P. vinckei* diminuaient de façon significative avec la parasitémie. De même, il a été montré par Golenser et *coll.* (1993) que *P. berghei*, qui infectait soit des souris transgéniques surexprimant la SOD Cu/Zn, soit des souris normales, puis qui est traité *in vitro* au paraquat, était aussi sensible dans les deux cas. Ces résultats semblent donc aller à l'encontre de l'hypothèse que *Plasmodium* adopterait la SOD de l'hôte.

A côté des enzymes propres au parasite, pouvant assurer une ligne de défense lors d'un choc oxydatif, l'hôte représente une source importante d'enzymes et de molécules antioxydantes disponibles pour le parasite (Hunt et Stocker, 1990; Golenser et *coll.* 1991). Certains auteurs signalent que *Plasmodium* préfère envahir des hématies normales et jeunes (Golenser et *coll.* 1991), dont le potentiel de défense antioxydant serait plus important et protégerait donc le parasite au début de son développement dans la cellule hôte. L'internalisation du contenu apporte probablement au parasite les molécules pouvant lui assurer une certaine protection (NADPH, glutathion réduit, acide ascorbique).

La sensibilité de *Plasmodium* au choc oxydatif est maintenant bien établie bien qu'aucune démonstration rigoureuse n'ait jamais permis de montrer l'incidence des EAO dans le parasite. Face à cette agression, la survie de *Plasmodium* doit dépendre de ses possibilités d'adaptation. Cependant l'induction de l'expression d'une G6PDH endogène par le parasite dans des hématies déficientes en cette enzyme, montre qu'il doit posséder de telles capacités d'adaptation.

La seule enzyme de défense, dont on connaît l'existence, est la SOD. Pour la catalase et la GPx, toute l'interprétation de leur présence chez *Plasmodium* repose sur des dosages, dans lesquels il faut considérer les erreurs liées aux conditions opératoires (séparation de l'hématie et du parasite) et à l'internalisation du contenu de l'hématie par *Plasmodium*. Il est admis aussi que le parasite bénéficie du système enzymatique de défense du globule rouge.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'adaptation de *Plasmodium*, il fallait reprendre l'étude du système de défense du parasite contre les EAO par des approches en biochimie (purification des enzymes, développement d'anticorps spécifiques) et en biologie moléculaire (recherche des gènes des enzymes, mise au point de sondes nucléiques). Ce programme est actuellement en cours dans le laboratoire où nous avons effectué notre travail. Dans le cadre de ce programme, nous rapporterons ici les résultats d'un travail portant sur la SOD de *Plasmodium*. Nous avons recherché cette enzyme chez des *Plasmodia* de rongeurs et caractérisé celle de *Plasmodium falciparum*. En parallèle, nous avons également caractérisé la SOD chez un autre hématozoaire, *Babesia*, dont la sensibilité au choc oxydatif et la dépendance vis à vis du système enzymatique de l'hématie ne sont pas connues. Ce parasite a été sélectionné en raison de l'absence de phénomènes d'internalisation du contenu de l'hématie, qui limite ainsi les risques de contaminations par les enzymes de l'hôte. D'autre part, son système enzymatique de défense contre les EAO n'avait jamais été exploré.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**RESULTATS EXPERIMENTAUX**

## CHAPITRE 1 : LA SUPEROXYDE DISMUTASE DE *BABESIA*

### 1.1. RESULTATS

Dans cette étude, nous avons travaillé avec deux espèces de *Babesia*: *B. hylomysci* qui est un parasite de rongeurs et une souche de *B. divergens* qui a été isolée d'un cas humain et cultivée sur des hématies humaines. Les cultures de *B. divergens* ont été effectuées dans le laboratoire du Professeur J. Schrevel (Université de Poitiers) par A. Valentin.

#### 1.1.1. Mise en évidence de la SOD chez *Babesia hylomysci* et *B. divergens*

Nous avons vérifié en microscopie électronique l'intégrité des parasites libérés par la méthode d'extraction que nous avons mise au point. Les *Babesia* restent enveloppés par les fantômes des hématies hôtes et ne présentent aucune altération structurale visible (**Article 1, Fig. 1**).

L'activité SOD totale, mesurée avec la méthode au pyrogallol, dans les extraits de parasites est de  $2,92 \pm 0,36$  U/mg de protéines totales pour *B. hylomysci* et  $2,50 \pm 0,32$  U/mg de protéines totales pour *B. divergens*. Pour détecter la présence d'une SOD d'origine parasitaire, des tests d'inhibition utilisant le KCN et l' $H_2O_2$  sont effectués sur 0,5 U d'activité SOD totale du parasite. Les résultats sont comparés aux mêmes tests effectués sur 0,5 U d'activité de SOD Cu/Zn provenant d'un extrait d'hématie hôte, dont l'hémoglobine est précipitée. L'activité résiduelle de la SOD est mesurée et le % d'inhibition par rapport à l'activité est calculée (**Tableau II.1, Article 1 Table 1**).

Les résultats des tests d'inhibition montrent, dans les extraits des deux parasites, une activité SOD résistante au KCN et, au contraire, extrêmement sensible à  $H_2O_2$ . La SOD d'hématies murine ou humaine est elle très sensible au KCN et assez peu sensible à  $H_2O_2$ . Les extraits des deux espèces de *Babesia* semblent donc renfermer une activité SOD qui se différencie de celle de l'hématie par sa résistance au KCN et sa plus grande sensibilité à  $H_2O_2$ .

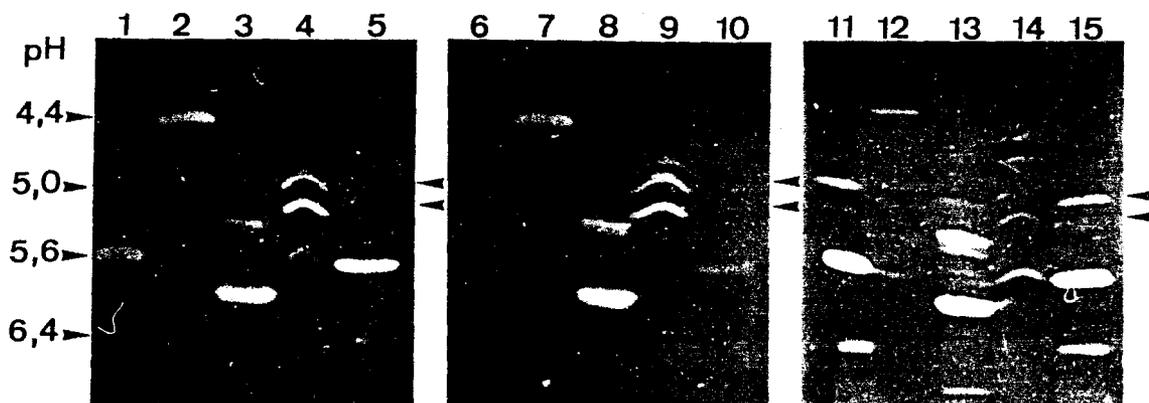
Nous avons confirmé la présence d'une activité SOD endogène dans les extraits de *Babesia* en réalisant une isoélectrofocalisation avec différents témoins sans inhibiteurs, puis en présence de KCN ou d' $H_2O_2$  (**Fig.II.1 et II.2, Article 1 Fig 2 et 3**). La révélation de l'activité SOD montre la présence dans l'extrait de *B. hylomysci* de deux bandes d'activité dont les pI sont estimés à 4,9 et 5,2 (**Fig.II.1, piste 4**) et une plus faible bande à un pI à 5,6 identique à une des isoenzymes détectées dans l'extrait total de l'hématie murine ou après précipitation de l'hémoglobine (**Fig.II.1, pistes 1 et 5**). En présence de 2mM de KCN, les bandes d'activité aux pI 4,9 et 5,2 de *B. hylomysci* sont toujours révélées mais la bande au pI 5,6 est très fortement inhibée (**Fig.II.1, piste 9**), de même que l'activité des isoenzymes de l'hématie murine (**Fig.II.1, pistes 6 et 10**). Par contre en présence de 2mM d' $H_2O_2$ , les activités observées aux pI 4,9 et 5,2 dans l'extrait parasitaire sont fortement inhibées (**Fig.II.1, piste 14**) par rapport aux activités de l'hématie murine (**Fig.II.1, pistes 11 et 15**) et de l'activité SOD-Mn de *E. coli* utilisée comme témoin (**Fig.II.1, pistes 3, 8 et 13**). L'autre témoin utilisé est la SOD-Fe de *E. coli* (**Fig.II.1, piste 2**), qui, comme les activités parasitaires, est résistante au KCN (**Fig.II.1, piste 7**) et sensible à l' $H_2O_2$  (**Fig.II.1, piste 12**).

Dans l'extrait de *B. divergens*, nous avons mis en évidence une activité SOD majeure à un pI estimé à 4,6 et une plus faible activité à un pI de 4,9 (**Fig.II.2, piste 4**) qui est comparable à celle détectée dans l'extrait total d'hématies humaines ou à la SOD humaine pure (**Fig.II.2, pistes 1 et 5**). L'activité de l'extrait parasitaire à pI 4,6 est résistante en présence de 2mM de KCN alors que l'activité à pI 4,9 est fortement inhibée (**Fig.II.2, piste 9**) de même que celle de la SOD de l'hématie humaine (**Fig.II.2, pistes 6 et 10**). En présence de 2mM d' $H_2O_2$ , l'activité d'origine parasitaire à pI 4,6 est très inhibée (**Fig.II.2, piste 14**), de même que celle de la SOD-Fe de *E. coli* (**Fig.II.2, piste 12**), comparativement à l'activité SOD de l'hématie humaine (**Fig.II.2, pistes 11 et 15**) et de la SOD-Mn de *E. coli* (**Fig.II.2, piste 13**).

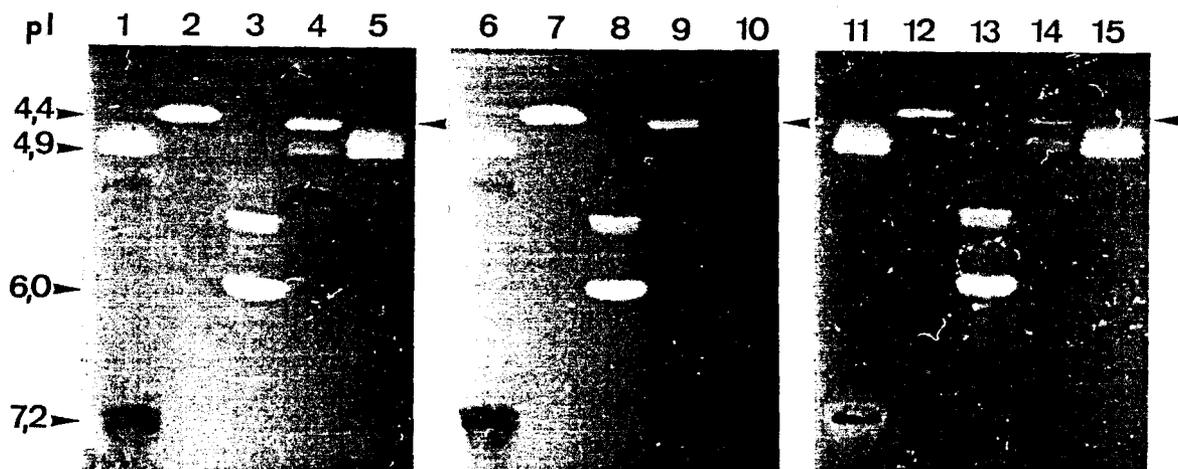
Les isoélectrofocalisations confirment donc la présence de SOD endogènes chez *B. hylomysci* et *B. divergens*, qui par leur résistance au KCN et leur sensibilité à l' $H_2O_2$ , semblent avoir une activité fer dépendante.

Espèce	Activité initiale	Activité résiduelle	% Inhibition par 1 mM KCN
<i>B. hylomysci</i>	0,560 ± 0,051	0,540 ± 0,021	3,6
Hématie souris	0,564 ± 0,023	0,044 ± 0,021	92,2
<i>B. divergens</i>	0,450 ± 0,066	0,425 ± 0,070	5,6
Hématie humaine	0,413 ± 0,018	0,047 ± 0,018	88,6
=====			
Espèce	Activité initiale	Activité résiduelle	% Inhibition par 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>B. hylomysci</i>	0,560 ± 0,051	0,041 ± 0,003	92,7
Hématie souris	0,564 ± 0,023	0,365 ± 0,035	35,3
<i>B. divergens</i>	0,450 ± 0,066	0	100
Hématie humaine	0,413 ± 0,018	0,292 ± 0,038	29,3

**Tableau II.1:** Tests d'inhibition en présence de 1 mM de KCN ou 2 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sur l'activité endogène de *B. hylomysci* et *B. divergens*. Ce test a été réalisé avec 0,5 unités de l'activité SOD totale dans l'extrait brut parasitaire et comparé au même test réalisé sur le témoin hématie correspondant. L'activité résiduelle dans chacun des tests a été estimée trois fois selon la méthode de Marklund.



**Figure II.1:** Mise en évidence en isoélectrofocalisation de l'activité SOD endogène dans un extrait brut de *Babesia hyalomysci*. La révélation est effectuée sans inhibiteurs (pistes 1-5), en présence de 2 mM de KCN (pistes 6-10), en présence de 2 mM d' $H_2O_2$  (pistes 11-15). Pistes 1, 6, 11: hématie murine (110 $\mu$ g); pistes 2, 7, 12: SOD-Fe de *E. coli* (1 U); pistes 3, 8, 13: SOD-Mn de *E. coli* (1 U); pistes 4, 9, 14: extrait brut de *B. hyalomysci* (130 $\mu$ g); pistes 5, 10, 15: hématie murine après une précipitation de l'hémoglobine (1 U). Les activités endogènes du parasite sont indiquées par des flèches.



**Figure II.2:** Mise en évidence en isoélectrofocalisation de l'activité SOD endogène dans un extrait brut de *Babesia divergens*. La révélation est effectuée sans inhibiteurs (pistes 1-5), en présence de 2 mM de KCN (pistes 6-10), en présence de 2 mM d' $H_2O_2$  (pistes 11-15). Pistes 1, 6, 11: hématie humaine (110 $\mu$ g); pistes 2, 7, 12: SOD-Fe de *E. coli* (1 U); pistes 3, 8, 13: SOD-Mn de *E. coli* (1 U); pistes 4, 9, 14: extrait brut de *B. divergens* (130 $\mu$ g); pistes 5, 10, 15: hématie humaine après une précipitation de l'hémoglobine (1 U). L'activité endogène du parasite est indiquée par une flèche.

FILE

### 1.1.2. Purification, caractérisation et microséquençage N-terminal de la SOD de *Babesia hylomyisci*

A partir d'un homogénat parasite, la SOD de *B. hylomyisci* a été purifiée successivement en 2 étapes chromatographiques et deux étapes électrophorétiques. La préparation de l'homogénat parasite pour chaque purification de SOD réalisée a nécessité le sacrifice de 80 souris à une parasitémie d'environ 80% au bout de 5 jours. A chaque extraction de parasites, la quantité de protéines totales obtenue varie de 15 à 20 mg.

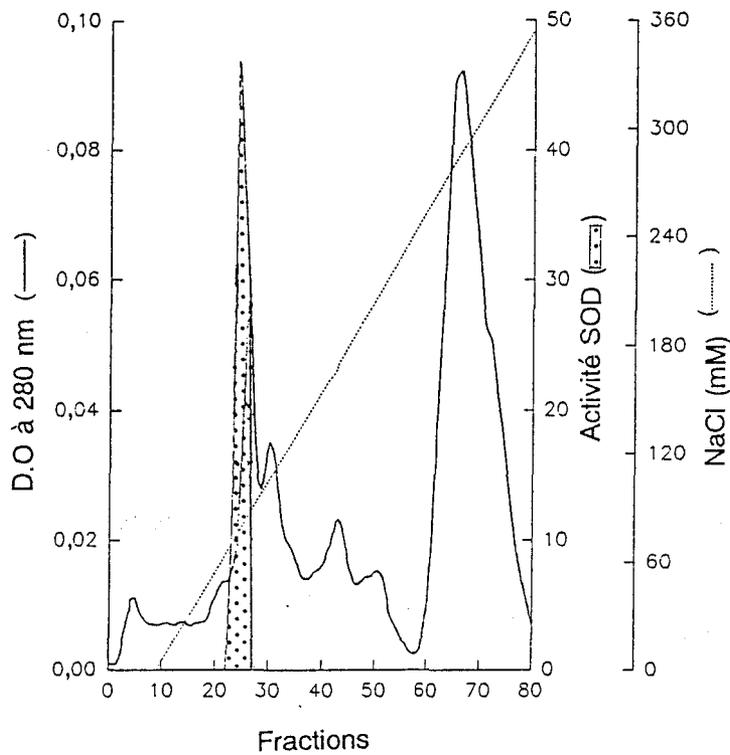
#### 1.1.2.1. Purification et caractérisation

Les protéines totales ont été déposées sur un gel de DEAE-Trisacryl et éluées de la colonne par un gradient linéaire de NaCl (0 à 500 mM). Un pic d'activité de SOD a été élué à 75 mM de NaCl (**Fig.II.3, Article 2 Fig 1**). L'activité spécifique a été multipliée par 10, mais 88% de l'activité SOD a été perdue (**Tableau II.2, Article 2 Table 1**).

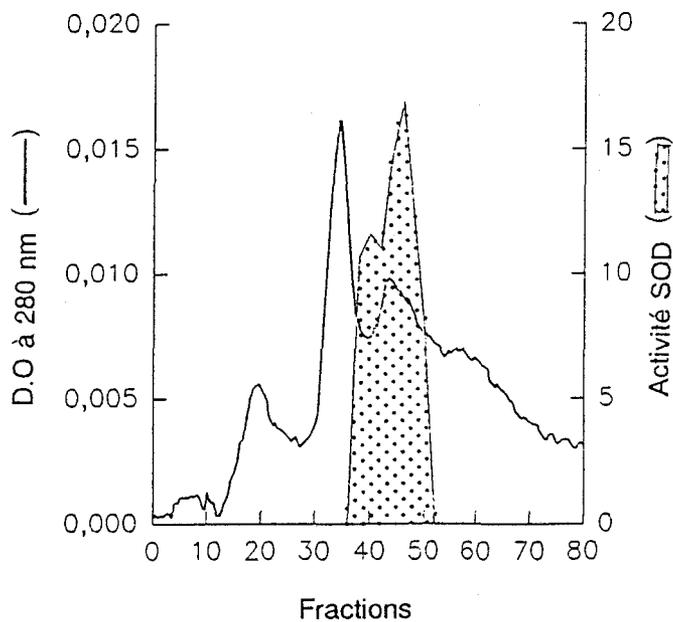
Les fractions contenant une activité SOD éluée de la DEAE, ont été rassemblées, concentrées et déposées sur une colonne de gel filtration (Sephadex G-100). Deux pics d'activité SOD se chevauchant ont été élués à 45 et 47 kDa (**Fig.II.4, Article 2 Fig 2**). L'activité spécifique a été multipliée par 12, mais avec une perte réduite à 14% (**Tableau II.2**). Les fractions contenant les deux pics d'activité ont été rassemblées et concentrées.

Une isoélectrofocalisation a permis de comparer les extraits issus des deux étapes de chromatographie avec l'extrait brut de *B. hylomyisci* (**Fig.II.5, Article 2 Fig 3**). Ce contrôle montre que les deux activités aux pI 4,9 et 5,2 de l'extrait brut (piste 2) restent présentes après les chromatographies échange d'ions et de gel filtration (**pistes 3 et 4**). En présence de KCN, la fraction active de la gel filtration est résistante (**piste 6**), comparée au témoin hématie murine (**piste 5**).

La fraction contenant la SOD parasite résultant de la gel filtration a été soumise à une électrophorèse préparative en conditions non dénaturantes. Après électroélution de la bande d'activité SOD, les protéines ont été analysées en SDS-PAGE sans réducteur. Une seule bande de protéine d'environ 22 kDa est observée (**Fig.II.6, piste 2; Article 2 Fig 4**). Son poids moléculaire est comparable à celui de SOD-Fe ou Mn déjà connues. L'activité SOD n'a pu être vérifiée à ce stade car elle a été perdue au cours de l'électroélution.



**Figure II.3:** Chromatographie sur DEAE-Trisacryl d'un extrait brut de *B. hylomysci*. Les protéines sont éluées de la colonne par un gradient linéaire de NaCl 0 à 0,5 M (---) et sont détectées à 280 nm (—). Activité SOD mesurée dans chaque fraction (▨).

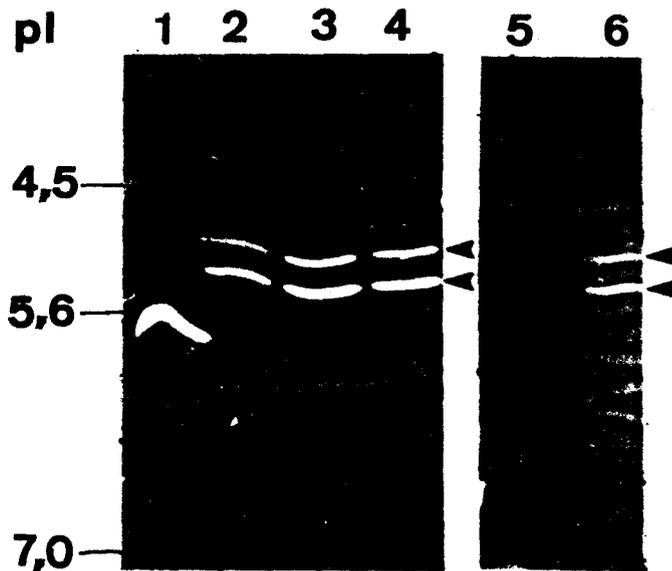


**Figure II.4:** Chromatographie en gel filtration. L'élué des protéines est suivie par la détection de l'absorbance à 280 nm (—). Activité SOD mesurée dans chaque fraction (▨).

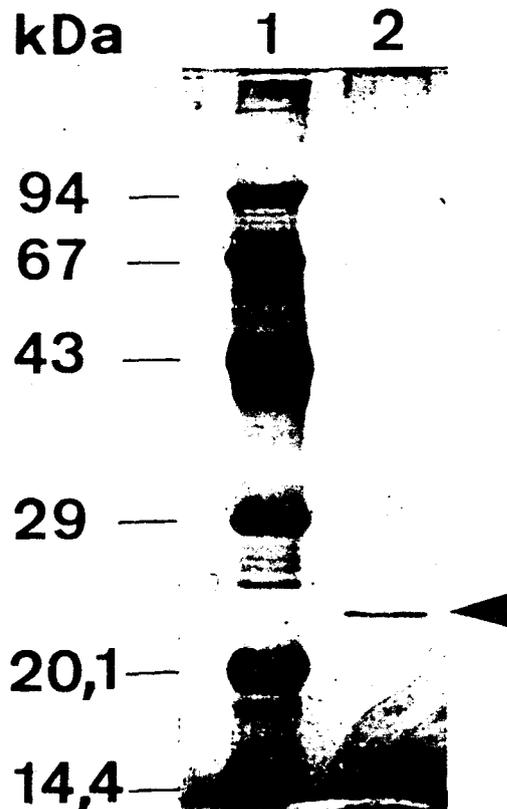


Etape purification	Protéines totales (mg)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité totale (U)	Activité spécifique U / mg pr.
Homogénat brut	17,8	14,8	78,3	4,40
Après échange d'ions	0,2	0,4	9,8	44,6
Après gel filtration	0,02	0,1	8,4	525

**Tableau II.2:** Bilan de purification de la SOD de *B. hylomysci*. L'activité SOD a été dosée avec la méthode de Marklund après la concentration des fractions issues des étapes chromatographiques et renfermant l'enzyme.



**Figure II.5:** Contrôle par isoélectrofocalisation des étapes de la purification de la SOD endogène de *B. hyalomysci*. L'activité de la SOD est révélée selon la technique de Beauchamp et Fridovich, en absence d'inhibiteurs (pistes 1 à 4) et en présence de 2 mM de KCN (pistes 5 et 6). Pistes 1 et 5: extrait d'hématie murine (110 $\mu$ g); piste 2: extrait brut de *B. hyalomysci* (0,65 U); piste 3: fraction provenant de la DEAE (0,50 U); pistes 4 et 6: fraction provenant de la gel filtration (0,63 U).



**Figure II.6:** Analyse en SDS-PAGE de la SOD purifiée de *B. hyalomysci*, colorée au nitrate d'argent. Piste 1: témoins de poids moléculaires (kDa): phosphorylase (94); albumine sérique bovine (67); ovalbumine (43); anhydrase carbonique (29); alpha-lactalbumine (20,1); lysozyme (14,4). Piste 2: la SOD purifiée (approximativement 0,1  $\mu$ g) indiquée par une flèche à environ 22 kDa.

### 1.1.2.2. Microséquençage N-terminal

Après une électrophorèse préparative en conditions dénaturantes et réductrices puis un transfert sur une membrane de PVDF des protéines électroéluées, la bande à 22 kDa a été soumise à un microséquençage N-terminal. L'extrémité de la protéine n'étant pas bloquée, le séquençage a été réalisé jusqu'au 34<sup>ème</sup> acide aminé:

Lys Ile Lys Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Ser Leu Asn Gly Leu Val Pro His Ile Ser Glu Glu Thr  
Leu Gln Phe His Thr Asn Lys His His Asn Thr Tyr

La présence de certains résidus très conservés dans toutes les SOD-Fe ou Mn permet de penser que la protéine de 22 kDa correspond à la SOD endogène de *B. hylomysci*. Ces résidus très conservés sont Leu-4, Pro-5, Leu-7, Leu-14, Pro-16, His-26, Lys-His-His(29-31) et Tyr-34.

La séquence obtenue a été alignée avec des séquences N-terminales provenant de SOD-Mn ou Fe (**Fig.II.7, Article 2 Fig 5**). Cet alignement met en évidence dans la séquence de la SOD de *B. hylomysci*, des résidus fréquemment présents dans les SOD-Fe. Ces résidus sont Ser-19, Glu-21, Leu-23 et Phe-25 dans les SOD-Fe. Par contre le résidu 11 est généralement un acide aminé aromatique (Phe/ Tyr-11) dans la séquence des SOD-Mn par rapport à un résidu variable dans celle des SOD-Fe (Leu-11 chez *B. hylomysci*). Au cours du séquençage, la présence de certains résidus provenant d'un polypeptide contaminant (environ 10%) a rendu plus difficile l'identification de certains résidus (1, 21, 25, 27 et 28) du principal polypeptide.

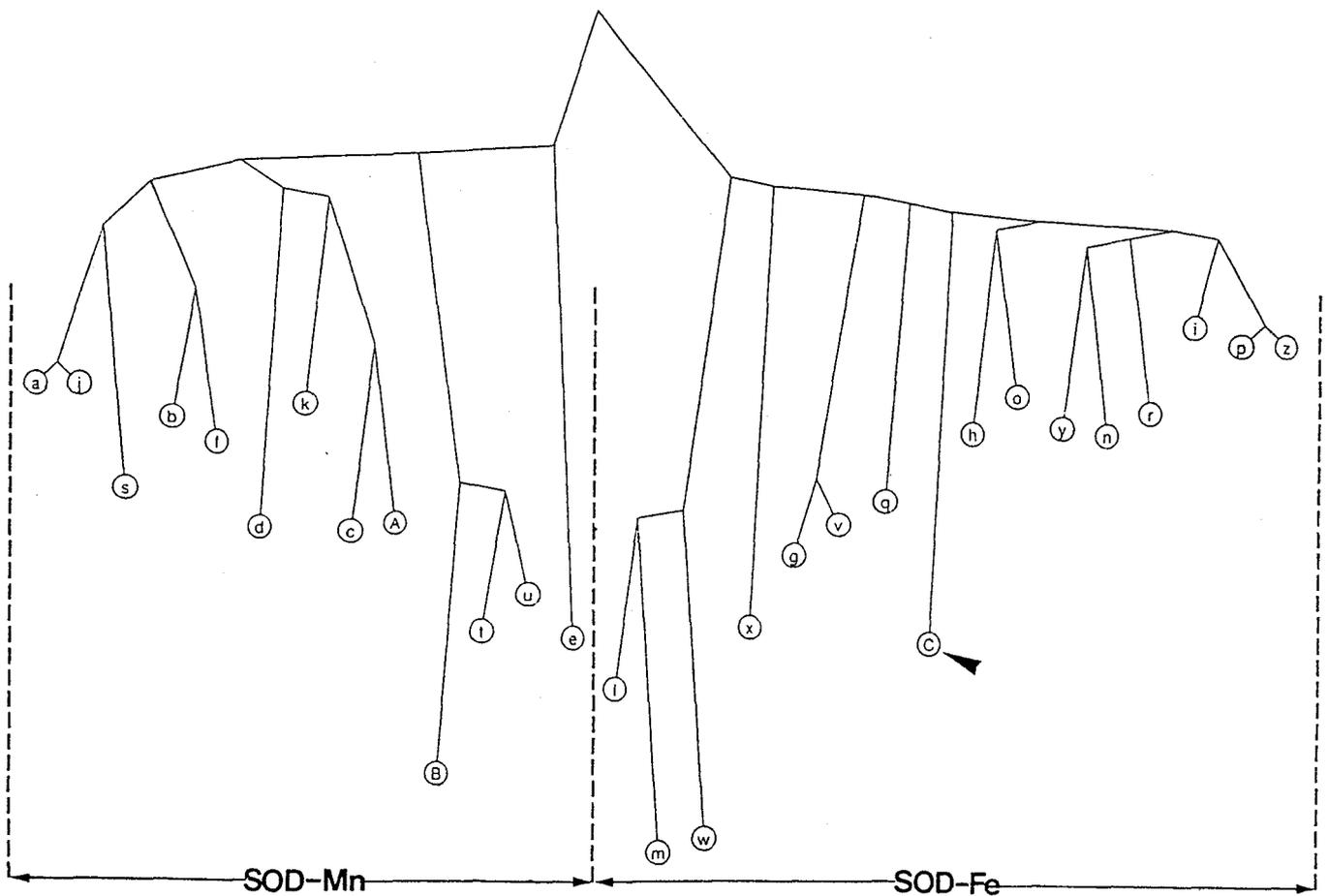
La séquence N-terminale, comparée avec celle de 29 SOD-Fe ou Mn connues, en utilisant le logiciel "DARWIN" montre une plus grande similitude avec les SOD-Fe qu'avec les SOD-Mn (**Fig.II.8, Article 2 Fig 6**).

	5	10	15	20	25	30	35
H.s.	K H S	L P D	L P Y D Y G A	L E P	H I N A Q I M Q L	H H S	K H H A A Y
M.m.	K H S	L P D	L P Y D Y G A	L E P	H I N A Q I M Q L	H H S	K H H A A Y
S.c.	K V T	L P D	L K W D F G A	L E P	Y I S G Q I N E L	H Y T	K H H Q T Y
B.s.	P F E	L P A	L P Y P Y D A	L E P	H I D K E T M N I	H H T	K H H N T Y
E.c.	S Y T	L P S	L P Y A Y D A	L E P	H F D K Q T M E I	H H T	K H H Q T Y
S.m.	A I L	L P D	L P Y A Y D A	L E P	Y I D A E T M T L	H H D	K H H A T Y
B.c.	P F E	L P A	L P Y P Y D A	L E P	H I D K E T M N I	H H T	K H H N T Y
M.	A Y T	L P P	L D Y A Y T A	L E P	H I D A Q T M E I	H H T	K H H Q T Y
B.h.	K I K	L P P	L P Y S L N G	L V P	H I S E E T L Q F	H T N	K H H N T Y
L.p.	T F T	L P Q	L P Y A L D A	L A P	H V S K E T L E Y	H Y G	K H H N T Y
P.l.	A F E	L P A	L P F A M N A	L E P	H I S Q E T L E Y	H Y G	K H H N T Y
C.b.	A F E	L P D	L P Y K L N A	L E P	H I S Q E T L E Y	H H G	K H H R A Y
E.c.	S F E	L P A	L P Y A K D A	L A P	H I S A E T I E Y	H Y G	K H H Q T Y
P.o.	A F E	L P P	L P Y A H D A	L Q P	H I S K E T L E Y	H H D	K H H N T Y
E.h.	S F Q	L P Q	L P Y A Y N A	L E P	H I S K E T L E F	H H D	K H H A T Y

\* \* \* \*

**Figure II.7:** Alignement de la séquence N-terminale de la SOD de *B. hylomyisci* avec celle de SOD-Mn et Fe connues. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR2 et EMBL sont indiquées entre parenthèses. La séquence N-terminale de la SOD-Mn de *Homo sapiens* et *Mus musculus* a été volontairement montrée incomplète et le 1er acide aminé correspond en réalité au 24ème dans la séquence complète. **SOD-Mn:** H.s., *Homo sapiens* (S13162); M.m., *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); S.c., *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST); B.s., *Bacillus stearothermophilus* (S27522); E.c.(Mn), *Escherichia coli* (A24141); S.m., *Streptococcus mutans* (A42710); B.c., *Bacillus caldotenax* (S22053); M., *Methylomonas sp.* (A38461).

**SOD-Fe:** B.h., *Babesia hylomyisci*; L.p., *Legionella pneumophila* (JS0749); P.l., *Photobacterium leiognathi* (A26707); C.b., *Coxiella burnetii* (A44791); E.c.(Fe), *Escherichia coli* (A29940); P.o., *Pseudomonas ovalis* (SODF\_PSEOV); E.h., *Entamoeba histolytica* (A45552). Les résidus conservés entre les SOD-Mn et Fe sont encadrés et ceux qui distinguent les SOD-Fe des SOD-Mn sont indiqués par une étoile.



**Figure II.8:** Analyse comparative par le système DARWIN entre la séquence N-terminale de la SOD de *B. hylomysci* et celle de 28 SOD-Mn ou Fe connues. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR2 et EMBL sont indiquées entre parenthèses.

a, *Bacillus caldotenax* (S22053); j, *Bacillus stearothermophilus* (S27522); s, *Listeria monocytogenes* (JC1272); b, *Escherichia coli* (A24141); f, *Methylomonas* sp. (A42710); d, *Thermus aquaticus* (S07147); k, *Streptococcus mutans* (A42710); c, *Homo sapiens* (S13162); A, *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); B, *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST); t, *Mycobacterium leprae* (A37212); u, *Mycobacterium tuberculosis* (S15205); e, *Caenorhabditis elegans* (JS0750); l, *Arabidopsis thaliana* (B39267); m, *Nicotiana Plumbaginifolia* (A39267); w, *Glycine max* (SOYFESOD); x, *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD); g, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC53977) (A43585); v, *Porphyromonas gingivalis* (S12882); q, *Synechococcus* sp. (SO4423); C, *Babesia hylomysci*; h, *Coxiella burnetii* (A44791); o, *Photobacterium leiognathi* (A26707); y, *Bordetella pertussis* (BPESODB); n, *Legionella pneumophila* (JS0749); r, *Escherichia coli* (A29940); i, *Entamoeba histolytica* (A45552); p, *Pseudomonas* sp. (s00157); z, *Pseudomonas ovalis* (SODF\_PSEOV).

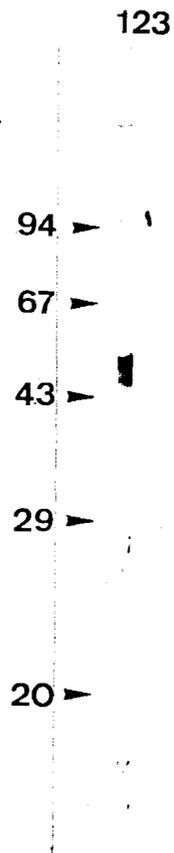
### 1.1.3. Préparation d'anticorps polyclonaux dirigés contre la SOD de *B. hylomysci*

L'immunisation d'un rat a nécessité plusieurs préparations de SOD de *B. hylomysci*. L'animal à chaque injection a reçu approximativement 3 µg d'enzyme purifiée. Le sérum a été testé successivement en Western blot sur des extraits totaux de *B. hylomysci*, puis en ELISA sur la SOD-Fe ou Mn d'*E. coli*.

Sur un extrait brut de *B. hylomysci*, transféré sur une membrane de nitrocellulose, le sérum de rat immunisé reconnaît 2 bandes situées approximativement à 45 et 47 kDa, mais aucune bande à 22 kDa (**Fig.II.9, piste 1**). Les anticorps semblent reconnaître l'enzyme spécifiquement sous sa forme dimérique. Le sérum de rat pré-immun utilisé comme témoin ne reconnaît aucune protéine dans l'extrait brut du parasite.

Nous avons testé également en ELISA le sérum de rat avec la SOD-Fe ou Mn d'*E. coli*. Seule la SOD-Fe est reconnue de façon significative pour des dilutions faibles de 1/10° et 1/20° et légèrement au 1/50° et 1/100° (**Fig.II.10.A**). Par contre la SOD-Mn n'est pas reconnue par le sérum (**Fig.II.10.B**).

Nous avons tenté de localiser la SOD dans le parasite à l'aide des anticorps polyclonaux par la technique d'immunolocalisation ultrastructurale. Des grains d'argent très dispersés dans le parasite semblaient indiquer plutôt une localisation cytosolique. Mais nous avons distingué également beaucoup d'agrégats de grains d'argent à l'extérieur des coupes. Les résultats obtenus n'ont donc pas été exploitables. Différentes méthodes de saturation des coupes ont été utilisées sans succès.



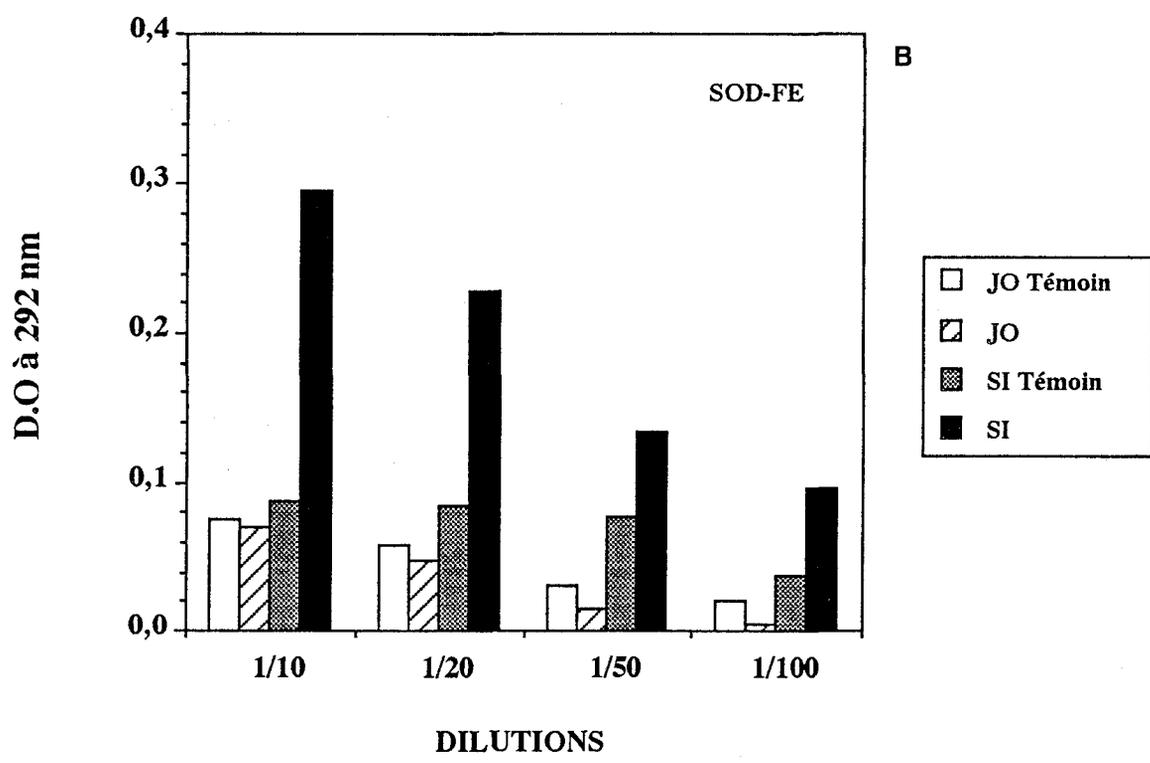
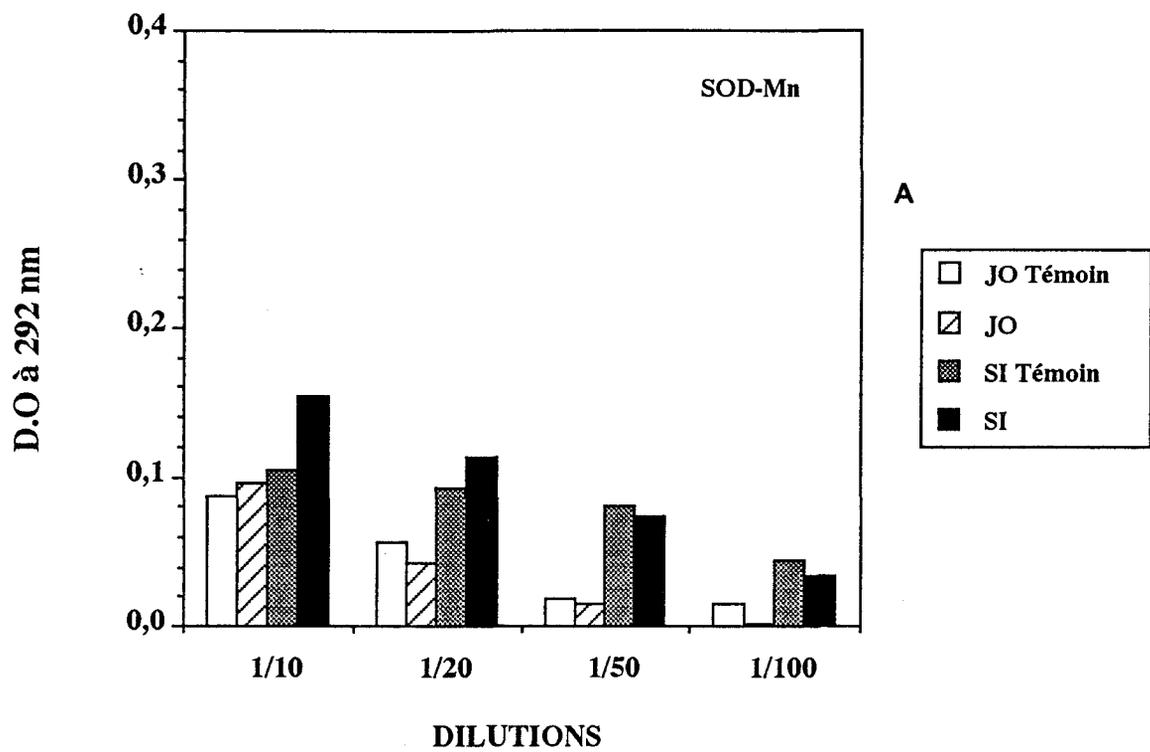
**Figure II.9:** Détection de la SOD sur un Western Blot réalisé avec un extrait de *B. hylomysci*, à l'aide d'un sérum de rat immunisé contre l'enzyme parasitaire:

Piste 1: sérum du rat dilué au 1/50°

Piste 2: sérum pré-immun du rat dilué au 1/50°

Piste 3: témoin conjugué.

(101)  
(11/12)



**Figure II.10:** Analyse par ELISA de la spécificité des anticorps dirigés contre la SOD de *B. hyalomysci* sur 0,1µg/puits de SOD-Mn (A) et 0,1µg/puits de SOD-Fe de *E. coli* (B). Le résultat est représenté sous forme d'un histogramme selon la D.O. à 492 nm mesurée deux fois pour chaque dilution du sérum de rat. JO correspond au sérum du rat avant immunisation, SI au sérum immun et AG à l'antigène. Les témoins correspondent aux essais réalisés en absence d'antigène.

## 1.1.4. Article 1

Endogenous superoxide dismutase activity in two *Babesia* species

P. BECUWE<sup>1</sup>, C. SLOMIANNY<sup>1</sup>, A. VALENTIN<sup>2</sup>, J. SCHREVEL<sup>2,3</sup>, D. CAMUS<sup>2</sup>  
and D. DIVE<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U42, B.P.39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Biologie Cellulaire, URA CNRS 290, 40 Avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Biologie Parasitaire et Chimiothérapie, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61 rue Buffon, 75231 Paris cedex 05, France

(Received 28 November 1991; revised 10 February 1992; accepted 12 February 1992)

## SUMMARY

*Babesia hylomysci* and *B. divergens* were studied for superoxide dismutase (SOD) activity by enzyme assay and isoelectric focusing (IEF). In the two *Babesia* species, parasite-associated SOD is cyanide-insensitive and inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicating that iron is the cofactor metal. Measurements of SOD activity from purified parasites show that the SOD activity detected in *Babesia* is, for the main part, due to an endogenous enzyme.

Key words: *Babesia*, superoxide dismutase, iron.

## INTRODUCTION

Cells are protected from damaging effects of oxygen radicals, such as superoxide anions, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, by scavengers and specific enzymes. Among these enzymes is superoxide dismutase (SOD), which catalyses the dismutation of superoxide anions to hydrogen peroxide (McCord & Fridovich, 1969) and is known in three different forms, characterized by their different metal cofactors (Fridovich, 1975) and sensitivities to various inhibitors. Cu/Zn-containing SOD, which is sensitive to cyanide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, has been found in the cytosol of a wide range of eukaryotic cells, including animals, plants and yeasts. Mn-containing SOD, which is insensitive to cyanide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, has been isolated from eukaryotic mitochondria (Fridovich, 1975; Weisiger & Fridovich, 1973), and from bacteria (Keele *et al.* 1970). The third isoform, which contains Fe, and is insensitive to cyanide but sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was demonstrated in many prokaryotes (Yost & Fridovich, 1973; Lumsden & Hall, 1974), some plants (Lumsden & Hall, 1974) and protozoa (Meshnick & Eaton, 1981; Le Trant *et al.* 1983; Kitchener *et al.* 1984; Sibley, Lawson & Weidner, 1986; Barra *et al.* 1990), but is unknown in high multicellular animals.

So far, only Fe-SOD has been found in parasitic protozoa, except for *Plasmodium falciparum*, which contains an endogenous Mn-dependent SOD activity (Fairfield *et al.* 1988; Ranz & Meshnick, 1989) and *Eimeria tenella*, which contains the three forms

of SOD during the different stages of its development (Michalski & Prowse, 1991). Dependence on the host cell for protection against oxygen radicals is known for malaria parasites (Clark, Chaudhri & Cowden, 1989), even though these organisms adopt host SOD (Fairfield, Meshnick & Eaton, 1983).

In the present work we report that another parasite of red cells, *Babesia*, contains an endogenous SOD which differs from the erythrocytic enzyme.

## MATERIALS AND METHODS

*Reagents and chemicals*

Glass beads were obtained from Braun (Melsungen, Germany). Diethylaminoethylcellulose (DE23) from Whatman (Maidstone, UK), Percoll from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Saponin was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), aprotinin and leupeptin were purchased from Boehringer (Mannheim, Germany). SOD from *E. coli* and bovine erythrocytes, Nitro-blue tetrazolium (NBT) and all reagents for the SOD assay were obtained from Sigma (St Louis, Mo, USA). The reagents for protein determinations were obtained from Bio-Rad (Richmond, Ca, USA). The IEF gels, with pH range 3–10 and 300 mM thickness, were purchased from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany). IEF was performed with LKB 2117 Multiphor system.

*Parasites*

*Babesia hylomysci*. Young Swiss white mice, weighing 20–30 g, were inoculated with *B. hylomysci*, by intraperitoneal blood passage. After 4 days, blood

\* Reprint requests to Dr D. Dive, INSERM U42, Domaine du CERTIA, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

from infected mice (50% parasitaemia in erythrocytes) was collected, after anaesthesia, by cardiac puncture, into isotonic phosphate buffer containing heparin. No significant reticulocytosis was observed. Leucocytes and platelets were removed from whole blood by passing it through glass beads and diethylaminoethylcellulose.

*Babesia divergens*. Human Rouen 1987 isolate was cultivated *in vitro* in human erythrocytes according to the method described by Gorenflot *et al.* (1991). Parasites were collected when parasitaemia reached 50%.

#### Extraction of parasites

Red blood cells were pelleted by centrifugation (1500 g, 5 min) and washed twice with PBS (NaCl, 136.9 mM; KCl, 2.7 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.47 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8 mM). Lysis was achieved by 10 volumes of 0.01% saponin in the same buffer, for 5 min at room temperature; after centrifugation for 10 min at 11000 g, parasites were washed once with PBS; resuspended in TES buffer, pH 7.5 (triethanolamine 5 mM-EDTA 1 mM-sucrose 0.25 M) and layered on a discontinuous Percoll gradient in TES buffer (densities 1.04 and 1.09). After centrifugation for 5 min at 4400 g the layer of purified parasites was collected and washed once in TES, and twice in PBS. When not used immediately, samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The purity of the parasite fractions was checked by electron microscopy.

#### Preparation of parasite homogenates

Frozen parasites were disrupted by 3 cycles of freeze-thawing, followed by sonication for 5 min into 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mg/ml aprotinin and 1 mM leupeptin in an ice-cold bath. After ultracentrifugation at 100000 g (Beckman 70 TI rotor) for 50 min, the supernatant fractions were dialysed against sodium phosphate buffer 2 mM, pH 7.8, at  $4^\circ\text{C}$ , for 24 h before they were concentrated. The dialysed material was stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

#### Protein determination

Protein was measured using the method of Bradford (1976), with serum albumin as the standard. The haemoglobin content of the lysates was determined using Drabkin's reagent (Bessis, 1972).

#### Enzyme assay

The SOD activity of parasite lysates was measured using the autoxidation of pyrogallol by superoxide anion radical according to the method of Marklund & Marklund (1974), using bovine erythrocyte super-

oxide dismutase as a standard. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of autoxidation of pyrogallol by 50%. Specific inhibitors (KCN and  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) were used at concentrations of 1 and 2 mM respectively in the final reaction mixture.

#### Isoelectric focusing

IEF was performed on polyacrylamide gel, pH range 3-10, according to the instructions of the manufacturer. Control mouse RBC extracts were prepared by haemoglobin precipitation according to the method described by Winterbourn (1975).

The gels were stained for SOD-specific activity by incubation with NBT, as described by Beauchamp & Fridovich (1971). To assess the effects of inhibitors, the staining for SOD activity was also done in the presence of 2 mM cyanide or 2 mM hydrogen peroxide.

#### Electron microscopy

Parasitized red blood cells and isolated parasites were pre-fixed for 15 min in glutaraldehyde (2.5% in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2), post-fixed for 1 h in osmium tetroxide (1% in cacodylate buffer), and pre-stained in uranyl acetate (2% in alcoholic solution) before inclusion in Epon. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, according to the method described by Reynolds (1963), before examination.

## RESULTS

#### Electron microscopy

Compared with *Babesias* in their natural host cells (Fig. 1A and B), isolated *Babesia hylomysci* cells (Fig. 1C) as well as *B. divergens* (Fig. 1D) showed good cell integrity. The numerous RBC membranes present in the first step of purification were eliminated during the preparation of parasite homogenates.

#### Enzyme assay

The total SOD activity was  $2.92 \pm 0.36$  U/mg total protein in *B. hylomysci* and  $2.50 \pm 0.32$  U/mg total protein in *B. divergens*.

Table 1 shows the results of inhibition tests with KCN and  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtained by enzyme assay. We compared inhibition of approximately 0.5 U of Cu/Zn-containing SOD activity from a red blood cell extract that contained no haemoglobin with 0.5 U SOD activity in a parasite extract. The SOD activity found in the *Babesia* extract was very resistant to 1 mM KCN and highly sensitive to 2 mM hydrogen peroxide. A small fraction of SOD activity was sensitive to KCN (3.6% and 5.6% respectively for *B. hylomysci* and *B. divergens*). Thus the SOD

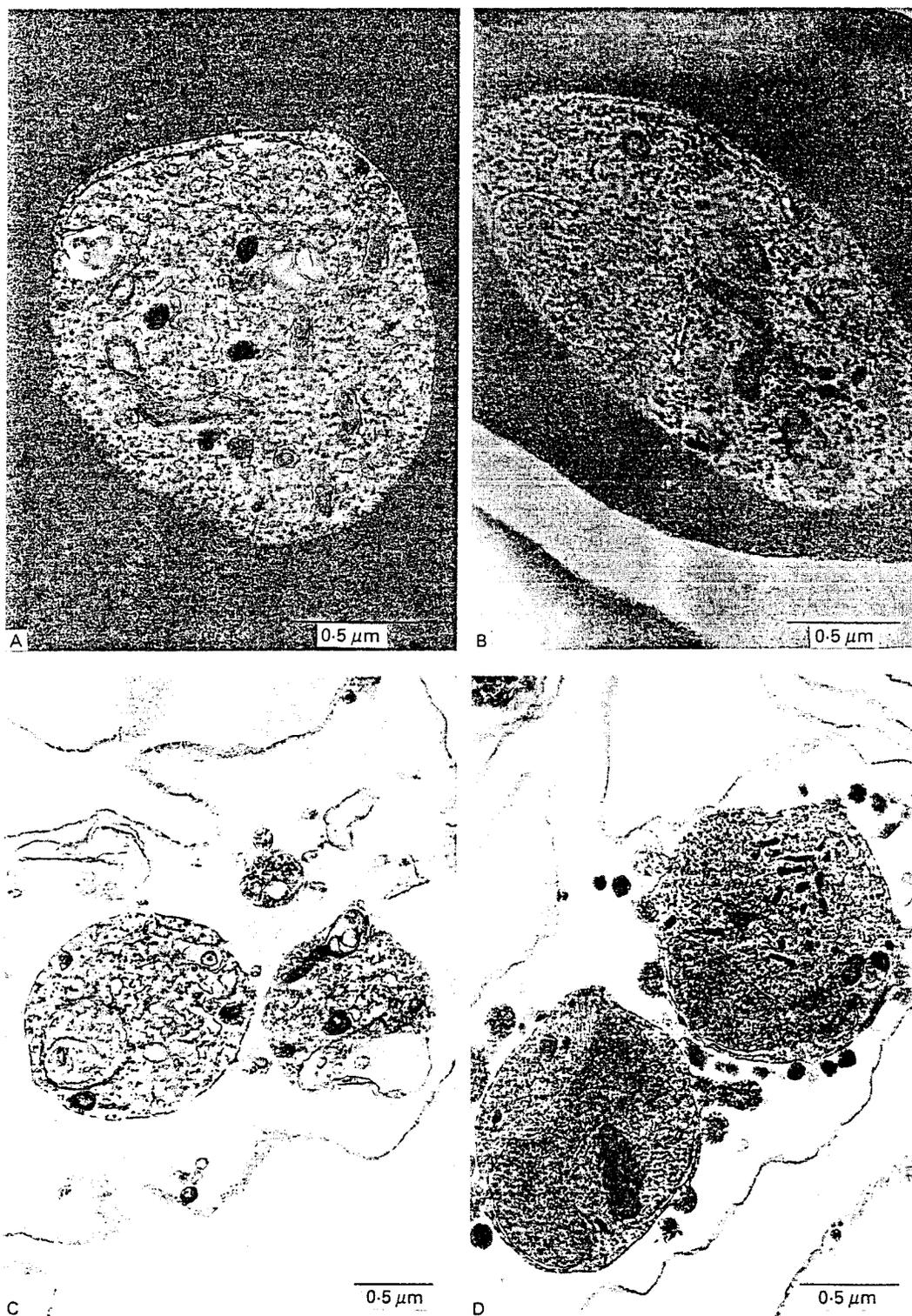


Fig. 1. Ultrastructural aspect of intra-erythrocytic (A) and isolated (C) *Babesia hyalomysci* and of intra-erythrocytic (B) and isolated (D) *Babesia divergens*.

activity detected in two *Babesia* extracts seems to be essentially Fe-dependent.

#### Isoelectric focusing

The results of IEF performed with dialysed *Babesia* extracts and different controls, shown in Figs 2 and 3, confirmed the presence in the parasites of

endogenous SOD activity, resistant to KCN and sensitive to  $H_2O_2$ . *B. hyalomysci* extract showed 2 bands of endogenous SOD activity at pI 4.9 and 5.2, and a band at pI 5.6 due to contamination by RBC SOD (Fig. 2, lane 4). Under the same conditions, mouse RBC extracts exhibited bands at pI 5.0, 5.6 and 6.4 (Fig. 2, lane 1), similar to control mouse RBC without haemoglobin (Fig. 2, lane 5). In the

Table 1. Sensitivity of SOD activity from *Babesia hylomysci* and mouse erythrocytes to various inhibitors

(Approximately 0.5 units of pure erythrocyte SOD or of total SOD activity in parasite extract were used for each test. Each measurement was performed in triplicate.)

Species	Initial activity	Residual activity	Inhibition by 1 mM KCN (%)
<i>B. hylomysci</i>	0.560 ± 0.051	0.540 ± 0.021	3.6
Mouse RBC	0.564 ± 0.023	0.044 ± 0.021	92.2
<i>B. divergens</i>	0.450 ± 0.066	0.425 ± 0.070	5.6
Human RBC	0.413 ± 0.018	0.047 ± 0.018	88.6

			Inhibition by 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)
<i>B. hylomysci</i>	0.560 ± 0.051	0.041 ± 0.003	92.7
Mouse RBC	0.564 ± 0.023	0.365 ± 0.035	35.3
<i>B. divergens</i>	0.450 ± 0.066	0	100
Human RBC	0.413 ± 0.018	0.292 ± 0.038	29.3

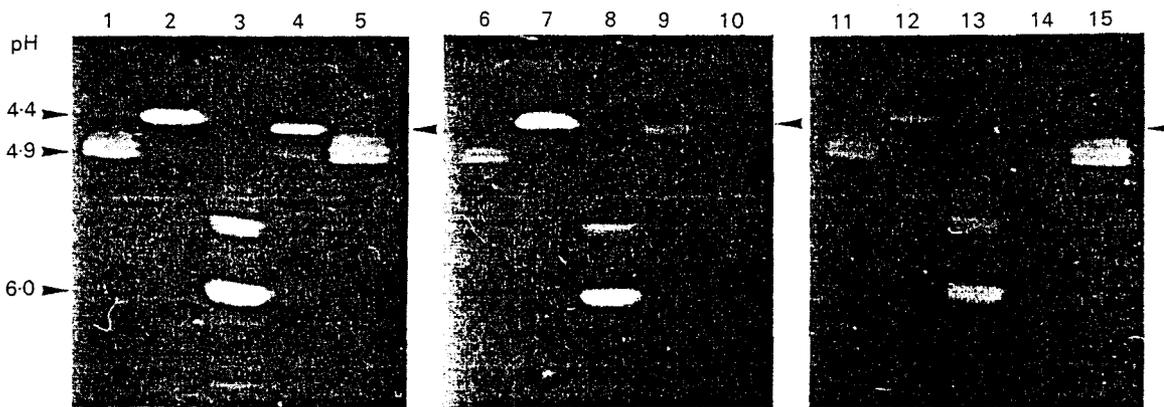


Fig. 2. Isoelectric focusing of *Babesia hylomysci* lysates. Lanes 1-5, SOD activity; lanes 6-10, sensitivity to 2 mM KCN; lanes 11-15, sensitivity to 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lanes 1, 6, 11, mouse RBC (110 mg). Lanes 2, 7, 12, *E. coli* Fe-SOD (1 U). Lanes 3, 8, 13, *E. coli* Mn-SOD (1 U). Lanes 4, 9, 14, *Babesia hylomysci* lysates (130 mg of protein or 0.8 U SOD activity). Lanes 5, 10, 15, mouse RBC after haemoglobin precipitation (1 U). Parasitic SOD activity is indicated by arrows.

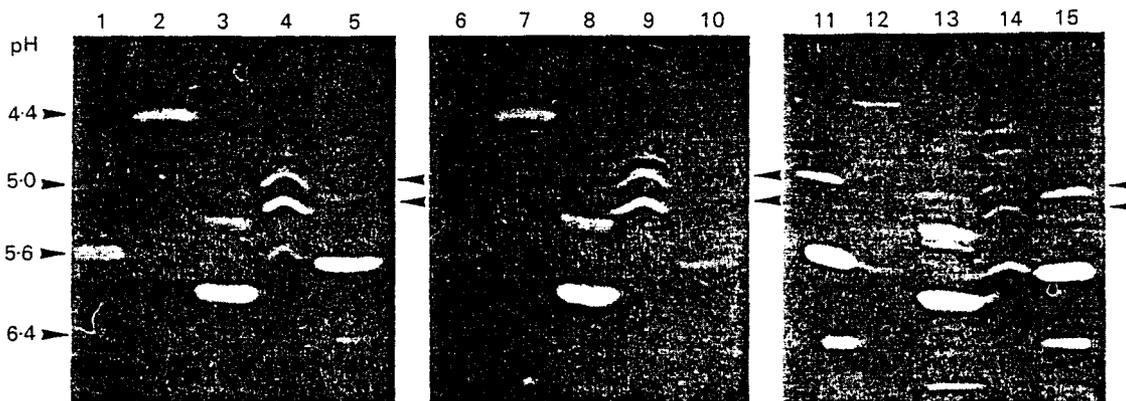


Fig. 3. Isoelectric focusing of *Babesia divergens* lysates. Lanes 1-5, SOD activity; lanes 6-10, sensitivity to 2 mM KCN; lanes 11-15, sensitivity to 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lanes 1, 6, 11, human RBC (110 mg). Lanes 2, 7, 12, *E. coli* Fe-SOD (1 U). Lanes 3, 8, 13, *E. coli* Mn-SOD (1 U). Lanes 4, 9, 14, *B. divergens* (140 µg of protein or 0.8 U SOD activity). Lanes 5, 10, 15, pure SOD from human RBC (1 U). Parasitic SOD activity is indicated by arrows.

presence of 2 mM cyanide, the bands at pI 4.9 and 5.2 of *B. hylomyisci* enzyme persisted (Fig. 2, lane 9), as did the control-resistant Fe-containing (Fig. 2, lane 7) and Mn-containing (Fig. 2, lane 8) SODs of *E. coli*, whereas the band at pI 5.6 disappeared as with mouse RBC SOD (Fig. 2, lanes 6 and 10). In the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the activities of the SODs at pI 4.9 and 5.2 were greatly reduced (Fig. 2, lane 14), as was the Fe-containing SOD from *E. coli* (Fig. 2, lane 12). In contrast, the Mn-containing SOD from *E. coli* (Fig. 2, lane 13) was only slightly decreased, since very little reduction in band intensity was observed. These results indicate that iron is the cofactor of endogenous SOD activity found in *B. hylomyisci* extract.

IEF of *B. divergens* extract is shown in Fig. 3. One major band of SOD activity was found at pI 4.6 and a doublet at pI 4.9 (Fig. 3, lane 4). The extract and a pure Cu/Zn-containing SOD from human RBC had a pI 4.9 (Fig. 3, lanes 1 and 5 respectively). The band at pI 4.6 was cyanide-insensitive (Fig. 3, lane 9) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive (Fig. 3, lane 14), which indicates that this SOD activity is iron-dependent. Only a little activity due to RBC SOD was found in these parasite extracts, visible as a doublet at pI 4.9, which was cyanide-sensitive (Fig. 3, lanes 6 and 10) and slightly inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 3, lanes 11 and 15).

## DISCUSSION

Endogenous superoxide dismutase has been demonstrated in *Plasmodium falciparum* (Fairfield *et al.* 1988), *Toxoplasma gondii* (Sibley *et al.* 1986), *Eimeria tenella* (Michalski & Prowse, 1991), *Leishmania* (Meshnick & Eaton, 1981), *Tritrichomonas foetus* (Kitchener *et al.* 1984), *Crithidia fasciculata* (Le Trant *et al.* 1983). In all cases where cofactor metal was studied, it has been found to be iron, except for *P. falciparum*, for which a Mn-SOD was shown (Ranz & Meshnick, 1989), *E. tenella*, which has the 3 enzyme forms, depending on the stage of development (Michalski & Prowse, 1991), and *Trypanosoma cruzi*, for which both an Fe-containing SOD (Meshnick *et al.* 1983) and a Cu/Zn-containing SOD (Giulivi *et al.* 1988) have been claimed.

Our results show that (1) the endogenous SOD activity of *Babesia* is iron-dependent, as shown in many parasitic protozoa and in the living ciliate *Tetrahymena* (Barra *et al.* 1990); (2) enzymes of the two species can be distinguished by their pI value. *B. hylomyisci* shows 2 bands of iron-dependent SOD activity, which can be separated by their pI. In *B. divergens*, only 1 band is found; and (3) the main part of SOD activity found in isolated parasites is due to an endogenous enzyme, as shown by isoelectric-focusing profiles, and enzyme assays. A small amount of RBC SOD activity was found, which can be the consequence of a residual contamination, or of a limited adoption of host SOD by the parasite. As

*Babesia* does not internalize the red cell content in digestive vacuoles, the mechanism of a possible adoption of the erythrocyte SOD by the parasite remains unexplained.

Iron-dependent SOD seems to be common in protozoa, and in a wide range of prokaryotic organisms and eukaryotic plants (Barra *et al.* 1990). Fe-dependent endogenous SOD of *Babesia* appears to be an interesting taxonomical marker, because it allows the two species to be easily distinguished on the basis of their enzyme pI (4.6 for *B. divergens* and 4.9 and 5.2 for *B. hylomyisci*). The 2 bands from *B. hylomyisci* may be distinct isoenzymes or they may be an artifact formed due to the instability of the Fe-dependent SOD, as shown for *Tetrahymena pyriformis* (Barra *et al.* 1990). Thus, it would be of interest to extend this work to other species of *Babesia*, to estimate exactly the value of SOD isozymic patterns for the classification of these parasites, as has been shown with *Naegleria amoebas* (Pernin, Cariou & Jacquier, 1985).

Isolated parasites exhibited only small amounts of Cu-Zn SOD activity, both on isoelectric focusing and in enzymic assays, in contrast to *P. falciparum* (Fairfield *et al.* 1988). This may be the result of two factors. (1) The mode of purification of the parasites, which allowed better removal of unlysed RBC and erythrocytic material, except for membranes which were then separated by ultracentrifugation after lysis of the organisms, resulting in the liberation of residual Cu/Zn SOD present in RBC ghosts. We cannot exclude the presence of a few RBC in the fraction containing isolated parasites. (2) The biology and the physiology of the parasite: (i) *Babesia* is not enclosed in a parasitophorous vacuole as are Plasmodia and (ii) no endocytosis of red cell contents can be observed in this parasite, in which a digestive vacuole and haem-containing pigment are absent. Thus, the amount of red-cell SOD adopted by the erythrocytic stages of some parasitic protozoa could result from their mode of digestion of red-cell contents.

Moreover, if erythrocytic SOD plays a role in the protection of *Babesia* from activated oxygen species, it is limited to radicals present in the RBC itself. At the parasite level, the Fe-dependent endogenous enzyme is the principal defence system against the superoxide anions. Therefore the Fe-SOD activity of *Babesia* could offer a selective target for drug design as proposed previously for *Leishmania* (Meshnick & Eaton, 1981), since the active site of this enzyme differs from that of the Cu/Zn-SOD of the host red blood cell (Tainer *et al.* 1983). Compare the situation with *P. berghei*, which subsumes the host SOD activity for its own use. This would only be possible if a significant difference exists between the amino acid residues at the active site potentially responsible for metal selection on the Fe-SOD of *Babesia* and the Mn-SOD of the host. In *Tetra-*

*hymena*, it seems that only one residue of amino acid confers the selectivity of SOD for iron (Barra *et al.* 1990). Thus, only the sequence determination of the region of the protein responsible for forming a complex with the metal would indicate whether a selective drug design is possible.

The authors wish to acknowledge the skilled technical assistance of Ms A. Masset, Mr E. Dewailly and Mr E. Caron.

#### REFERENCES

- BARRA, D., SCHININA, M. E., BOSSA, F., PUGET, K., DUROSA, P., GUISSANI, A. & MICHELSON, A. M. (1990). A tetrameric iron superoxide dismutase from the eucaryote *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 17680–7.
- BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**, 276–87.
- BESSIS, M. (1972). *Cellules du Sang Normal et Pathologique*. Paris: Masson.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–54.
- CLARK, I. A., CHAUDHRI, G. & COWDEN, W. B. (1989). Some roles of free radicals in malaria. *Free Radical Biology and Medicine* **6**, 315–21.
- FAIRFIELD, A., ABOSCH, A., RANZ, A., EATON, J. W. & MESHNICK, S. T. (1988). Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **30**, 77–82.
- FAIRFIELD, A., MESHNICK, S. R. & EATON, J. W. (1983). Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase. *Science* **221**, 764–6.
- FRIDOVICH, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **44**, 147–59.
- GIULIVI, C., TURRENS, J. F. & BOVERIS, A. (1988). Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **30**, 243–52.
- GORENFILOT, A., GRASSEUR, P., PRECIGOUT, E., L'HOSTIS, M., MARCHAND, A. & SCHREVEL, J. (1991). Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. *Parasitological Research* **77**, 3–12.
- KEELE, B. B. JR, MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B: a new manganese-containing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 4905–8.
- KITCHENER, K., MESHNICK, S. T., FAIRFIELD, A. S. & WANG, C. C. (1984). An iron-containing superoxide dismutase in *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **12**, 95–9.
- LE TRANT, N., MESHNICK, S. T., KITCHENER, K. R., EATON, J. W. & CERAMI, A. (1983). Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*: purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 125–30.
- LUMSDEN, J. & HALL, D. O. (1974). Soluble and membrane-bound superoxide dismutase in a blue-green alga (*Spirulina*) and Spinach. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **58**, 35–41.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* **244**, 6049–55.
- MARKLUND, S. & MARKLUND, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**, 469–74.
- MESHNICK, S. T. & EATON, J. W. (1981). Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **102**, 970–6.
- MESHNICK, S. R., TRANG, N. L., KITCHENER, E., CERAMI, A. & EATON, J. (1983). Iron containing superoxide dismutase in trypanosomatids. In *Oxyradicals and their Scavenger Systems: Molecular Aspects* vol. 2 (ed. Choen, G. & Greenwald, R. A.), pp. 348–351. New York: Elsevier-North Holland.
- MICHALSKI, W. P. & PROWSE, S. J. (1991). Superoxide dismutases in *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **47**, 189–96.
- PERNIN, P., CARIOU, M. L. & JACQUIER, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *Journal of Protozoology* **32**, 592–603.
- RANZ, A. & MESHNICK, S. R. (1989). *Plasmodium falciparum*: Inhibitor sensitivity of the endogenous superoxide dismutase. *Experimental Parasitology* **69**, 125–8.
- REYNOLDS, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**, 208–12.
- SIBLEY, D. L., LAWSON, R. & WEIDNER, E. (1986). Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **19**, 83–7.
- TAINER, J. A., GETZOFF, E. D., RICHARDSON, J. S. & RICHARDSON, D. C. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature, London* **306**, 284–6.
- WEISIGER, R. A. & FRIDOVICH, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 4793–6.
- WINTERBOURN, C. C., HAWKINS, R. E., BRIAN, M. & CAREWELL, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **85**, 337–41.
- YOST, F. J. & FRIDOVICH, I. (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 4905–8.

**1.1.5. Article 2****PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND AMINO TERMINAL SEQUENCE  
OF THE SUPEROXIDE DISMUTASE FROM *BABESIA HYLOMYSCI***

P. BECUWE<sup>1</sup>, J. VAN BEEUMEN<sup>2</sup>, B. SAMYN<sup>2</sup>, C. SLOMIANNY<sup>1</sup>, D. CAMUS<sup>1</sup> and D. DIVE<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U42, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, France

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Ledeganckstraat 35, 9000 Gent, Belgium

RUNNING TITLE : Superoxide dismutase in *Babesia hylomyisci*

<sup>1\*</sup> Correspondence must be addressed to :

DIVE Daniel, INSERM U42, Domaine du CERTIA, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, FRANCE.

tel (33) 20 47 23 97 ext 15

Fax (33) 20 05 91 72

**ABSTRACT**

*Babesia hylomysci* was found to contain two superoxide dismutase (SOD) isoenzymes with isoelectric points (pI) of 4.9 and 5.2. The two isoenzymes (MW 45 and 47 kDa) were composed of two subunits of 22 kDa. An unique amino terminal sequence was determined up to 34 residues from the pooled isoenzymes and was identified as a sequence of SOD. The comparison of this N-terminal sequence of *B. hylomysci* SOD with 29 known Fe- or Mn-SODs showed more homologies with Fe-SODs.

**KEY WORDS :** *Babesia*, superoxide dismutase, iron, N-terminal sequence

**ABBREVIATIONS USED :**

SOD, Superoxide Dismutase; IEF, Isoelectrofocusing; SDS, Sodium Dodecyl Sulfate; RBC, Red Blood Cell; PBS, Phosphate Buffer Saline

## INTRODUCTION

The metalloenzyme superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), is responsible for the elimination of superoxide anion and is an important defence enzyme against damaging effects of the oxidant stress in organisms (Mc Cord & Fridovich, 1969).

This enzyme has been purified and characterized in several organisms. Three groups of proteins can be distinguished according to the metal cofactor (Fridovich, 1975). The enzyme containing copper and zinc (Cu/Zn SOD) was found in eukaryotes, including animals, plants and yeasts (Fridovich, 1986). The manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) was purified from several bacteria (Keele, Mc Cord & Fridovich, 1970; Vance & Keele, 1972; Chambers *et al.*, 1992) and also from eukaryotic mitochondria (Weisiger & Fridovich, 1973; Fridovich, 1975). The iron-containing superoxide dismutase (Fe-SOD) was found in prokaryotic organisms (Hassan, 1989), in blue green algae (Lumsden & Hall, 1974; Asada *et al.*, 1975; Caiola *et al.*, 1991), in some plants (Lumsden & Hall, 1974; Salin & Bridges, 1980; Duke & Salin, 1985) and in protozoa (Lindmark & Müller, 1974; Meshnick & Eaton, 1981; Le Trant *et al.*, 1983; Meshnick *et al.*, 1983; Kitchener *et al.*, 1984; Sibley, Lawson & Weidner, 1986; Barra *et al.*, 1990; Tannich *et al.*, 1991; Bécuwe *et al.*, 1992; 1993).

The Fe-SODs characterized up to now are known as homodimers with a molecular weight between 40 and 46 kDa. A tetrameric SOD was found only in some bacteria (Hassan, 1989), in *Tetrahymena pyriformis* (Barra *et al.*, 1990) and in the Archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Takao *et al.*, 1991).

The Fe- and Mn-dependent SODs can be distinguished by the presence of some specific residues in the primary structure (Parker & Blake *et al.*, 1988), as some residues in the amino terminal sequence region differ between Fe- and Mn-SODs.

In a previous work we reported that *Babesia hylomysci* and *B. divergens*, parasites of red cells, contained an endogenous proposed iron-dependent SOD on the basis of their specific inhibition in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bécuwe *et al.*, 1992). In the present work, we report the purification of the SOD of *B. hylomysci* and the determination of the amino terminal sequence of the protein. The sequence has been compared with Fe- or Mn-dependent SODs from different organisms and appears to be related to Fe-SODs.

## MATERIAL AND METHODS

### *Parasites*

Young Swiss mice, weighing 20-30 g, were infected intraperitoneally with *Babesia hylomyisci*. After 4 days, infected mice were bled by puncture after anesthesia, and blood was collected in isotonic phosphate buffer (PBS) containing heparin. Leucocytes and platelets were removed by passing the blood on glass beads (Braun, Melsungen, Germany) and on diethylaminoethylcellulose (DE 23 Whatman, Maidstone UK). The extraction of parasites and preparation of homogenates were performed as described previously (Bécuwe *et al.*, 1992), but the parasite lysates were now dialyzed against 10mM Tris/HCl, pH 7.8, at 4°C, and then concentrated.

### *Assays*

Protein contents were measured using the method of Bradford (1976) with serum albumin as standard.

SOD activity was determined by the method of Marklund (1974), based on the autoxidation of pyrogallol.

### *SOD purification*

A DEAE Trisacryl M (IBF Sepracor, France) column of 1.4 x 13 cm was equilibrated at 4°C with 0.01 M Tris/HCl buffer, pH 7.8. *B. hylomyisci* homogenate (17.8 mg total protein) was applied on the column and eluted with a linear gradient of sodium chloride (0-500 mM, flow rate 16 ml/h). Absorbance was monitored at 280 nm and the SOD activity present in each 1.5ml fraction was assayed. The fractions showing a SOD activity were pooled, dialyzed against distilled water and concentrated at 4°C (Micro-Prodicon™ Membranes MWCO 15,000, Spectrum, Houston, USA).

A Sephadex G-100 (Pharmacia Uppsala, Sweden) column of 1.5 x 50cm was equilibrated at 4°C with 0.05M Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 0.1M NaCl and then calibrated with molecular weight markers:  $\beta$ -galactosidase 116 kDa, serum albumin 68 kDa, ovalbumin 43 kDa, carbonic anhydrase 29 kDa, cytochrome c 12.4 kDa (Pharmacia Uppsala, Sweden). The concentrated fractions from ion-exchange, diluted (vol/vol) with 0.1M Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 0.2M NaCl, were applied to the column and eluted with

equilibration buffer. The fractions containing SOD activity were pooled, dialyzed against distilled water and concentrated as mentioned above. The molecular weight of *B. hylomysci* non-denatured SOD was estimated from linear calibration curve  $V_e/V_o = f(\log \text{molecular weight})$  in which  $V_e$  is the elution volume of the molecule and  $V_o$  the exclusion volume determined with Blue dextran 2000.

The concentrated SOD containing fractions were submitted to a non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% acrylamide gel) and SOD activity was detected in the gel by the method of Beauchamp & Fridovich (1971). The bands corresponding to SOD activity were excised and electroeluted in 0.12 M Tris/0.04 M glycine, pH 9.2, for 4h at 3W. The concentrated sample was analysed on a 12% SDS-polyacrylamide gel and the purified SOD was visualized after silver staining according to Merrill *et al.*, 1981.

#### *Isoelectrofocusing*

Isoelectrofocusing (IEF) was performed on polyacrylamide gel (Serva Feinbiochemica Heidelberg, Germany), pH range 3-10, according to the instructions of the manufacturer. The gels were stained for SOD specific activity as described by Beauchamp & Fridovich (1971). The resistance of the *B. hylomysci* SOD to cyanide was controlled by addition of 2mM KCN into the staining mixture.

#### *Determination of the amino terminal sequence*

The purified SOD from *B. hylomysci* was submitted to 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in Tris-glycine buffer and then electroblotted overnight onto PVDF membrane (Applied Biosystem) in Tris 50mM/ borate 50mM, pH 8.5. Sequence analysis of the Coomassie stained protein band was performed on a 476 A Sequenator with on-line HPLC analysis of the phenyl thiohydantoin amino acids (Applied Biosystems, Foster city, USA).

#### *Analysis of amino terminal sequence of SOD*

The N-terminal sequence of *B. hylomysci* SOD was compared to 29 known Mn- or Fe-SODs using the DARWIN (Data Analysis and Retrieval With Indexed Nucleotide/Peptide Sequences) system (Gonnet *et al.*, 1992).

The N-terminal sequence of *B. hylomysci* was aligned with the sequence from the 13 most commonly used SODs selected in the literature.

## RESULTS

### *Purification of Fe-SOD*

The crude *B. hylomyisci* homogenate (17.8 mg) was applied on DEAE Trisacryl. The parasite SOD was eluted from the column at approximately 75 mM sodium chloride (Fig. 1). The specific activity was increased approximately 10-folds (44.6 U/mg), but the recovery was only 12% of the initial total SOD activity (Table 1).

After Sephadex G-100 gel filtration (Fig. 2), two isoenzymes were eluted at estimated sizes of 45 and 47 kDa respectively and the specific activity increased nearly 12-folds (525 U/mg, 86% recovery).

Isoelectrofocusing controls done at each purification step showed that the two bands at pI 4.9 and 5.2 found in crude extract (Fig. 3, lane 2) were present after ion-exchange and gel filtration chromatography (Fig. 3, lanes 3 and 4 respectively). In the presence of 2mM KCN, the active fraction found after gel filtration was resistant in comparison to Cu/Zn-containing SOD from mouse red blood cell (Fig. 3, lanes 5 and 6 respectively).

After non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and electroelution of the SOD activity bands, analysis on a 12% SDS-polyacrylamide gel showed a single band of protein after silver staining (Fig. 4). After electroelution the enzyme activity could not be tested because the activity was lost during this purification step. The molecular weight of the two denaturated isoenzymes, calculated from SDS-PAGE, was approximately 22 kDa, while the non-denaturated molecular weights of SOD were determined to be 45 and 47 kDa by gel filtration.

### *Determination of the amino terminal sequence of B. hylomyisci SOD*

The purified SOD of *B. hylomyisci*, submitted to N-terminal sequencing (34 residues) showed the presence of a major polypeptide chain with the sequence given in Fig. 5. This sequence is clearly similar to Fe- and Mn-SODs and contains the conserved residues 4, 5, 7, 14, 16, 26, 29-31 and 34. The N-terminal sequence analysis also indicated the presence of at least one minor ( $\pm 10\%$ ) polypeptide. Since the yield for each of the 20 different amino acids is known to be different, and especially to be low for Ser, Lys, Pro, His, Arg and Trp, the identity of the residues 1, 21, 25, 27 and 28 of the major chain remains slightly ambiguous because of the presence of roughly equal amounts of respectively Val, Arg, His, Lys and Trp.

The N-terminal sequence given in Fig. 5 was compared to 29 known Fe- or Mn-SODs by DARWIN system. This analysis showed that the N-terminal sequence of *B. hylomyisci* SOD is related to that of Fe-SODs and quite different of MnSODs (Fig. 6).

## DISCUSSION

In recent work, we reported the existence of an endogenous superoxide dismutase in *B. hylomyisci* and *B. divergens* (Bécuwe *et al.*, 1992). We demonstrated that these SODs were KCN resistant and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitive. We concluded that they were probably iron-dependent.

The purification of the SOD from *B. hylomyisci* allows the complete characterization of this enzyme. The isoelectrofocusing pattern previously found (Bécuwe *et al.*, 1992) was confirmed after the purification, suggesting that no important degradation occurs during the purification steps of the enzyme and that this SOD seems to be stable in these experimental conditions. The molecular weight of the two native isoenzymes at pI 4.9 and 5.2 was estimated to be 45 and 47 kDa and to be 22 kDa after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The *B. hylomyisci* SOD appears to be an homodimer composed of two subunits not linked by disulfide bonds, as many known Fe-dependent SODs (Yost & Fridovich, 1973; Canini *et al.*, 1992). A limit for the preparation of purified SOD was the production of sufficient amounts of the parasite *in vivo*. Since *B. hylomyisci* is a very small cell, a good extraction of the parasite results in a very low yield of total protein and, therefore, of the purified enzyme. It is the reason why we did not purify the two isoenzymes separately. It would have been very difficult to prepare sufficient amount of pure proteins for N-terminal microsequencing.

The protocol used for the enrichment of parasites apparently allowed a better removal of the contaminants (unlysed RBC and erythrocytic material) because no contamination by the Cu/Zn-containing mouse SOD was detected during the different purification steps. The absence of RBC SOD could be explained by the fact that *Babesia* does not internalize the host red cell content as does *Plasmodium*. It was shown indeed that *P. berghei* adopts the host SOD for its own defence (Fairfield *et al.*, 1983).

N-terminal sequence determination up to residue 34 confirmed that the studied protein is very different from the mouse Mn-SOD, so that it may be concluded that it is the endogenous SOD of *B. hylomyisci*. It seems unlikely that the heterogeneities detected at the

positions 1, 21, 25 and 27-28 are due to the presence of an SOD isoenzyme, the existence of which has been demonstrated by isoelectrofocusing and gel filtration.

The comparison of the N-terminal sequence shows that some residues (Ser-19, Glu-21, Leu-23 and Phe-25) are found only in Fe-SODs (Fig. 5). The residue 11 is often Tyr/Phe in Mn-SODs, in contrast to several possibilities in Fe-SODs (Leu-11 in SOD of *B. hylomysci*). The residues as Leu-23 and Phe/Tyr-25 are located in the active-site of Fe-SODs, in contrast to Met/Asn-23 and Ile/leu-25 in Mn-SODs (Parker & Blake, 1988). The comparison of the N-terminal sequences of the 29 Fe- and Mn-dependent SODs, available in databanks according to Gonnet, Cohen & Benner (1992) allows to distinguish clearly Mn- and Fe-SODs (Fig. 6) and shows that the SOD of *B. hylomysci* is effectively related to Fe-SODs.

In further studies we aim to raise polyclonal antibodies against a synthetic peptide of the N-terminal sequence of two *B. hylomysci* SOD isoenzymes. These antibodies may be used to study the distribution of the isoenzymes in the parasite and of their expression during the life cycle and the oxidant stress. These studies could also precise the exact role of the endogenous SOD of *Babesia* in the parasite protection.

#### *Acknowledgements*

J. P. Touzel (INRA, Villeneuve d'Ascq) has cooperated for the analysis with DARWIN system. The authors wish to acknowledge the skilled technical assistance of Mrs A. Masset and Mr P. Delcourt.

This investigation received financial support from the Belgian Fund for Joint Basic Research (contract 32.0018.91).

#### **REFERENCES**

- Asada K., Yoshikawa K., Takahashi M., Maeda Y. and Enmanji K. (1975). Superoxide dismutase from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* **250**, 2801-2807.
- Barra D., Schinina M. E., Bossa F., Puget K., Durosay P., Guissani A. and Michelson A. M. (1990). A tetrameric iron superoxide dismutase from the eucaryote *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 17680-17687.
- Beauchamp C. and Fridovich I. (1971). Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.

- Bécuwe P., Slomianny C., Valentin A., Schrevel J., Camus D. and Dive D. (1992). Endogenous superoxide dismutase activity in two *Babesia* species. *Parasitology* **105**, 177-182.
- Bécuwe P., Slomianny C., Camus D. and Dive D. (1993). Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species. *Parasitol. Res.* **79**, 349-352.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Caiola G., Canini A., Galiazzo F. and Rotilio G. (1991). Superoxide dismutase in vegetative cells, heterocysts and akinetes of *Anabaena cylindrica* Lemm. *FEMS Microbiol. Letts.* **80**, 161-166.
- Canini A., Civitareale P., Caiola M. G. and Rotilio G. (1992). Purification of iron superoxide dismutase from cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Lemm. and localization of the enzyme in heterocysts by immunogold labeling. *Planta* **187**, 438-444.
- Chambers S. P., Brehm J. K., Michael N. P., Atkinson T. and Minton N. P. (1992). Physical characterization and over-expression of the *Bacillus caldotenax* superoxide dismutase gene. *FEMS Microbiol. Letts.* **91**, 277-284.
- Duke M. V. and Salin M. L. (1985). Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 305-314.
- Fairfield A., Meshnick S. R. and Eaton J. W. (1983). Malaria Parasites Adopt Host Cell Superoxide Dismutase. *Science* **221**, 764-766.
- Fridovich I. (1975). Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 147-159.
- Fridovich I. (1986). Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* **58**, 62-97.
- Gonnet G. H., Cohen M. A. and Benner S. A. (1992). Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* **256**, 1443-1445.
- Hassan H. M. (1989). Microbial superoxide dismutases. *Adv. Genet.* **26**, 65-97.
- Keele B. B., Jr, Mc Cord, J. M. and Fridovich I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B: a new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.* **248**, 4905-4908.
- Kitchener K., Meshnick S. R., Fairfield A. S. and Wang, C. C. (1984). An iron-containing Superoxide Dismutase in *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **12**, 95-99.

- Le Trant N., Meshnick S. R., Kitchener K. R., Eaton J. W., and Cerami A. (1983). Iron-containing Superoxide Dismutase from *Crithidia fasciculata* : purification, characterization, and similarity to Leishmanial and trypanosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* **258**, 125-130.
- Lindmark D. G. and Muller M. (1974). Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates, *Tritrichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp. *J. Biol. Chem.* **249**, 4634-4637.
- Lumsden J. and Hall D. O. (1974). Soluble and membrane-bound superoxide dismutase in a blue-green alga (*Spirulina*) and Spinach. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **58**, 35-41.
- Mc Cord J. M. and Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **24**, 6049-6055.
- Marklund S. and Marklund G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
- Merril C. R., Goldman D., Sedman S. A. and Ebert M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**, 1437-1438.
- Meshnick S. T and Eaton J. W. (1981). Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res Comms.* **102**, 970-976.
- Meshnick S. R., Trang N. L., Kitchener E., Cerami A. and Eaton J. (1983). Iron containing superoxide dismutase in trypanosomatids. In *Oxyradicals and their scavenger systems: Molecular aspects* vol. 2 (ed. Choen, G. & Greenwald, R. A.), pp. 348-351. New York: Elsevier-North Holland.
- Parker M. W. and Blake C. C. F. (1988). Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Letts.* **229**, 377-382.
- Salin M. L. and Bridges S. M. (1980). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a Eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**, 369-374.
- Sibley D. L., Lawson R. and Weidner E. (1986). Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**, 83-87.
- Takao M., Yasui A. and Oikawa A. (1991). Unique characteristics of superoxide dismutase of a strictly anaerobic Archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14151-14154.

Tannich E., Bruchhaus I., Walter R. D. and Horstmann R. D. (1991). Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 61-72.

ance P. G. and Keele B. B. (1972). Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*: isolation and characterization of two forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **247**, 4782-4786.

Weisiger R. A. and Fridovich I. (1973). Mitochondrial Superoxide Dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* **248**, 4793-4796.

Yost F. J. and Fridovich I. (1973). An Iron-containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **248**, 4905-4908.

### LEGEND OF THE FIGURES

Fig. 1. Ion exchange chromatography on DEAE-Trisacryl. The crude extract from *B. hylomysci* was applied on a column (1.5 x 14 cm) and eluted with linear gradient of NaCl 0-0.5 M ( ). The absorbance of proteins was monitored at 280 nm ( ) and the SOD activity, expressed in % inhibition of autoxidation of pyrogallol, was detected in each fraction ( ).

Fig. 2. Chromatography on Sephadex G-100. The absorbance of proteins was monitored at 280 nm ( ) and the SOD activity, expressed in % inhibition of autoxidation of pyrogallol, was detected in each fraction ( ).

Fig. 3. Isoelectrofocusing of purification steps of SOD from *B. hylomysci*. Lanes 1-4, SOD activity; lanes 5 and 6, sensitivity to 2 mM KCN. Lane 1 and 5, mouse RBC (110 µg). Lane 2, *B. hylomysci* crude extract (0.65 U). Lane 3, DEAE Trisacryl (0.50 U). Lanes 4 and 6, Sephadex G-100 (0.63 U). The gel was stained for SOD-specific activity by incubation with NBT.

Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified SOD of *B. hylomysci*. The gel was stained with silver nitrate according to the method of Merril (1981). Lane 1, molecular weight markers (kDa): 94, phosphorylase; 67, bovine serum albumin; 43, egg albumin; 29, carbonic anhydrase; 20.1, alpha-lactalbumin; 14.4, lysozyme. Lane 2, the purified SOD (approximately 0.1 µg), indicated by a arrow at 22 kDa.

Fig. 5. Alignment of the N-terminal sequence of *B. hylomyisci* SOD with other Fe- or Mn-SODs. Reference of protein sequences in PIR2 and EMBL databases are given into brackets. **Mn-SODs:** H.s., *Homo sapiens* (S13162); M.m., *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); S.c., *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST); B.s., *Bacillus stearothermophilus* (S27522); E.c.(Mn), *Escherichia coli* (A24141); S.m., *Streptococcus mutans* (A42710); B.c., *Bacillus caldotenax* (S22053); M., *Methylomonas sp.*(A38461). **Fe-SODs:** B.h., *Babesia hylomyisci* ( ); L.p., *Legionella pneumophila* (JS0749); P.l., *Photobacterium leiognathi* (A26707); C.b., *Coxiella burnetii* (A44791); E.c.(Fe), *Escherichia coli* (A29940); P.o., *Pseudomonas ovalis* (SOD F\_PSEOV); E.h., *Entamoeba histolytica* (A45552). Identical residues are boxed; the significant residues for the distinction between FeSODs and MnSODs are indicated by asterisks.

Fig. 6. Comparison of the N-terminal sequence of *B. hylomyisci* SOD with 29 known Fe- or Mn-SODs by DARWIN system. Reference of protein sequences in PIR2 and EMBL databases are given into brackets. **a**, *Bacillus caldotenax* (S22053); **j**, *Bacillus stearothermophilus* (S27522); **s**, *Listeria monocytogenes* (JC1272); **b**, *Escherichia coli* (A24141); **f**, *Methylomonas sp.*(A38461); **d**, *Thermus aquaticus* (S07147); **k**, *Streptococcus mutans* (A42710); **c**, *Homo sapiens* (S13162); **A**, *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); **B**, *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST); **t**, *Mycobacterium leprae* (A37212); **u**, *Mycobacterium tuberculosis* (S15205); **e**, *Caenorhabditis elegans* (JS0750); **l**, *Arabidopsis thaliana* (B39267); **m**, *Curled-leaved tobacco* (A39267); **w**, *Glycine max* (SOYFESOD); **x**, *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD); **g**, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC53977) (A43585); **v**, *Porphyromonas gingivalis* (S12882); **q**, *Synechococcus sp.* (S04423); **C**, *Babesia hylomyisci* ( ); **h**, *Coxiella burnetii* (A44791); **o**, *Photobacterium leiognathi* (A26707); **y**, *Bordetella pertussis* (BPESODB); **n**, *Legionella pneumophila* (JS0749); **r**, *Escherichia coli* (A29940); **i**, *Entamoeba histolytica* (A45552); **p**, *Pseudomonas sp* (s00157); **z**, *Pseudomonas ovalis* (SOD F\_PSEOV).

## 1.2. DISCUSSION

Nos résultats sont en faveur de l'existence d'une SOD endogène chez deux espèces de *Babesia*, *B. hylomysci* et *B. divergens*. Pour obtenir ces résultats, nous avons mis au point une technique d'extraction plus efficace des parasites à partir de leur cellule hôte. Le principal objectif était de minimiser les contaminations des extraits parasitaires par le contenu de l'hématie. Le fait que *Babesia*, à l'inverse de *Plasmodium*, ne possède pas de vacuole parasitophore rend ce parasite plus fragile en présence de saponine. Avec cette technique d'extraction, nous sommes limités à l'étude des protéines parasitaires solubles et non membranaires, car les membranes des hématies, vidées de leur contenu, enveloppent encore le parasite.

L'étude de l'action des inhibiteurs spécifiques, sur les extraits et sur gels d'isoélectrofocalisation, ainsi que les informations données par la séquence N-terminale de la protéine purifiée, sont convergentes et indiquent que les SOD spécifiques de *Babesia* sont très probablement des SOD-Fe. Pour pouvoir démontrer cette hypothèse, le recours à la biologie moléculaire nous apparaît indispensable. En effet, il semble prohibitif (en terme de souris à sacrifier) d'obtenir, à partir des parasites, une quantité de SOD suffisante pour effectuer, soit un séquençage plus poussé de fragments de la protéine (obtenus par clivage enzymatique ou acide), soit des expériences d'inactivation consistant à séparer l'apoenzyme de son métal cofacteur, pour ensuite étudier la récupération de l'activité après addition de fer ou de manganèse (Kirby *et coll.* 1980).

L'hypothèse de l'existence d'une SOD endogène à fer chez *Babesia* ne constitue pas une exception, puisqu'une enzyme à fer a été mise en évidence chez tous les protozoaires chez lesquels une SOD a été recherchée (voir **Tableau I.1, p 30**), à l'exception de *Plasmodium falciparum* chez lequel l'enzyme serait manganèse dépendante (Ranz *et coll.* 1989). Chez tous ces organismes, la SOD-Fe semble constituer la quasi totalité de l'activité SOD observée, à l'exception d'*Eimeria tenella* (Michalski et Prowse, 1991). Chez ce sporozoaire, on a observé les trois types de SOD qui sont exprimées à différents stades du développement. On ne peut pas exclure chez *Babesia*, l'existence possible d'une autre SOD qui ne serait pas exprimée lors du cycle érythrocytaire.

La SOD de *Babesia* semble appartenir au modèle classique de SOD-Fe: une protéine dimérique dans laquelle les sous unités ne sont pas reliées par un pont disulfure. Des enzymes tétramériques ont cependant été caractérisées chez des bactéries (Hassan, 1989) et chez le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* (Barra *et coll.* 1990).

L'existence d'un profil isoenzymatique différent chez *B. divergens* et *B. hylomysci*, montre que la SOD peut constituer un marqueur taxonomique. Pernin *et coll.* (1985) l'a d'ailleurs déjà utilisé chez l'amibe *Naegleria*. La présence probable de deux isoformes de SOD chez *B. hylomysci* est confortée:

1- par la stabilité des profils d'isoélectrofocalisation obtenus lors des différentes étapes de purification, excluant des phénomènes de dégradation, comme il en a été observé chez *Tetrahymena* (Barra *et coll.* 1990)

2- par la présence de deux pics d'activité correspondant à des poids moléculaires distincts en gel filtration. Mais ces deux pics ont été réunis pour les étapes ultimes de purification de l'enzyme et nous n'avons obtenu qu'une seule séquence

N-terminale. La présence des deux isoformes pourrait résulter, soit de différences de séquence intervenant au delà du 35ème acide aminé, soit de modifications post-traductionnelles.

Les anticorps polyclonaux dirigés contre la SOD de *B. hylomysci*, utilisés en détection ultrastructurale, semblait indiquer une localisation cytosolique de l'enzyme, mais le bruit de fond est resté trop important, certainement dû à la formation d'agrégats d'anticorps à l'extérieur de la cellule. Néanmoins, ces anticorps ont une spécificité envers les SOD-Fe et reconnaissent préférentiellement l'enzyme sous forme native. En effet, ils reconnaissent la forme dimérique de la SOD du parasite. De plus, ils reconnaissent uniquement la SOD-Fe de *E. coli* en ELISA, mais pas en Western Blot.

L'activité SOD mesurée chez *Babesia* apparaît essentiellement d'origine endogène. La part de l'activité SOD Cu/Zn de l'hématie hôte est faible dans les extraits (3 à 5%) et peu visible sur les isoélectrofocalisations. On ne la détecte pas lors des étapes de purification. La présence aussi faible de l'enzyme de l'hématie résulterait plutôt d'une contamination, que de son adoption par le parasite. Actuellement il n'a jamais été montré chez *Babesia*, de phénomène d'internalisation du contenu de l'hématie dans des vésicules digestives. Ce comportement le différencie de *Plasmodium*, qui, selon certains auteurs, adopterait les enzymes de l'hématie, telle la SOD (Fairfield *et coll.* 1983).

## CHAPITRE 2 : LA SUPEROXYDE DISMUTASE DE *PLASMODIUM*

### 2.1. RESULTATS

#### 2.1.1. Mise en évidence de la superoxyde dismutase chez différentes espèces de *Plasmodium*

Nous avons recherché une activité SOD endogène chez *P. falciparum*, souche FCR3 cultivée *in vitro* et chez 4 espèces de *Plasmodium* de rongeurs : *P. berghei* N, *P. yoelii* nigeriensis et *P. vinckei* PV 80 et *P. chabaudi*. Comme pour *Babesia*, l'activité endogène a été mise en évidence par isoélectrofocalisation en absence et en présence d'inhibiteurs de l'activité. Nous avons également estimé la part de la SOD endogène pour chacune des espèces étudiées, excepté pour *P. chabaudi*.

##### 2.1.1.1. Activités spécifiques

Le dosage de l'activité SOD totale, selon la méthode au ferricytochrome c, dans les extraits de *P. falciparum* et des *Plasmodium* de rongeurs donne des activités spécifiques différentes selon les espèces. Dans le cas de *P. chabaudi*, cette activité spécifique augmente au cours du cycle (**Tableau II.3**).

##### 2.1.1.2. Isoélectrofocalisation

###### *P. falciparum*

Une isoélectrofocalisation réalisée avec un extrait brut de *P. falciparum*, qui a été lysé par sonication douce, montre la présence de plusieurs bandes d'activité de SOD (**Fig. II.11, Article 4 Fig 1**). Une bande d'activité est détectée à un pI de 4,9 à la fois dans l'extrait parasitaire et dans l'extrait d'hématies (**pistes 4 et 1**). Elle est fortement inhibée en présence de 2mM de KCN (**pistes 8 et 5**) et légèrement inactivée en présence de 2mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**pistes 12 et 9**). Dans l'extrait parasitaire, des bandes supplémentaires sont détectées à pI 6,2 et 6,8 et 2 autres moins marquées à pI 5,6 et 6,4 (**piste 4**). Ces activités sont résistantes en présence de 2mM de KCN, exceptée la bande à pI 5,6 qui est apparemment légèrement inhibée dans ces conditions (**piste 8**). Cependant, ces 4 activités parasitaires montrent une certaine sensibilité différentielle en présence de 2mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avec l'activité à pI 6,8 plus fortement

inactivée que les trois autres (**piste 12**), comme l'est le témoin SOD-Fe d'*E. coli* (**pistes 3, 7 et 11**). La SOD-Mn d'*E. coli* quant à elle persiste en présence de KCN ou d' $H_2O_2$  (**pistes 2, 6 et 10**).

La méthode de préparation des parasites peut induire une variation dans le profil isoélectromatique des SOD endogènes chez *P. falciparum*. Lorsque les parasites sont lysés par 3 cycles de congélation-décongélation, suivis d'une sonication très brève (1 min), seulement deux bandes d'activités endogènes sont détectées, à pI 5,6 et 5,4 (**Fig.II.12, piste 1**), résistantes au KCN (**piste 5**) et inactivées par l' $H_2O_2$  (**piste 11**). Cette différence dans les résultats sera discutée ultérieurement.

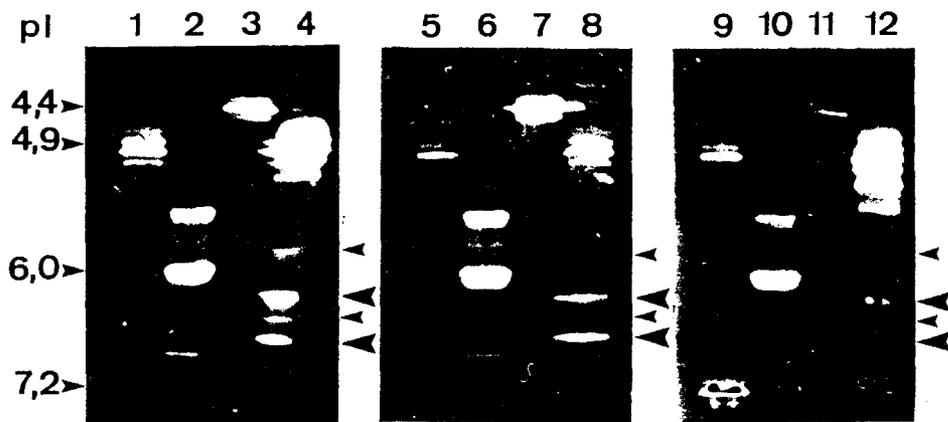
### Plasmodium de rongeurs

Une isoélectrofocalisation, réalisée avec l'extrait brut de 3 espèces de *Plasmodium* de rongeurs, *P. berghei*, *P. vinckei*, *P. yoelii* (**Fig.II.13, Article 3 Fig 1**), montre trois bandes d'activités avec un pI de 5,0, 5,6 et 6,4 présentes à la fois dans les extraits parasitaires et dans l'extrait d'hématies (**pistes 4, 5, 6 et 1**), très sensibles au KCN (**pistes 10, 11, 12 et 7**) et relativement insensibles à l' $H_2O_2$  (**pistes 16, 17, 18 et 13**). Deux autres bandes d'activités à pI 6,2 et 6,8 sont mise en évidence uniquement dans l'extrait parasitaire (**pistes 4, 5 et 6**), insensibles au KCN (**pistes 10, 11 et 12**), mais totalement inactivées par  $H_2O_2$  (**pistes 16, 17 et 18**) comme la SOD-Fe d'*E. coli* (**pistes 3, 9 et 15**). Pour l'extrait brut de *P. berghei* et *P. vinckei*, une bande d'activité au pI 5,7 très proche de l'isoenzyme de l'hématie à pI 5,6, est seulement mise en évidence en présence de KCN (**pistes 10 et 11**).

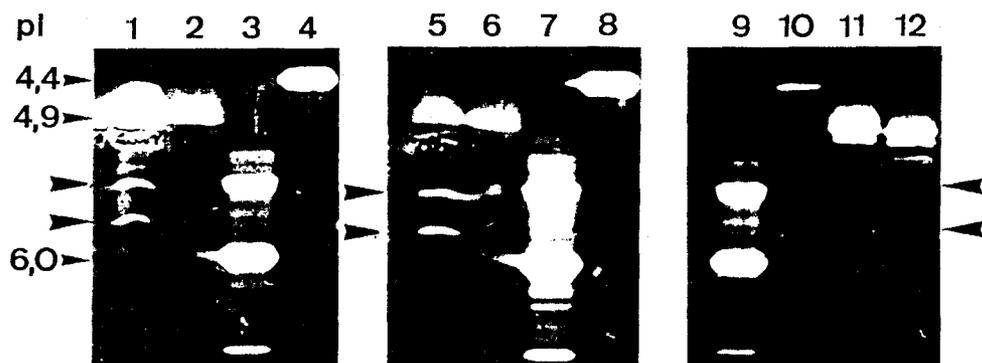
L'isoélectrofocalisation réalisée avec un extrait brut des différents stades de *P. chabaudi*, montre deux bandes d'activités endogènes (**Fig.II.14, pistes 4, 5 et 6**). Ces activités, estimées également à pI 6,2 et 6,8, différentes des activités détectées dans l'extrait d'hématies (**pistes 1, 7 et 13**) sont résistantes au KCN (**pistes 10, 11 et 12**) et sensibles à  $H_2O_2$  (**pistes 16, 17 et 18**). Ces activités sont toutefois très faibles au stade anneau (**piste 4**). Dans le profil obtenu au stade trophozoïte jeune, il apparaît une activité supplémentaire à pI 6,0 uniquement en présence de KCN (**piste 11**).

Espèces	1er extrait	2ème extrait
<i>P. berghei</i>	3,69 ± 1,51	4,00 ± 0,43
<i>P. yoelii</i>	6,56 ± 2,06	6,07 ± 0,86
<i>P. vinckei</i>	13,60 ± 3,83	8,96 ± 2,06
<i>P. chabaudi</i>	anneau	8,24 ± 0,29
	trophozoïte	13,06 ± 2,06
	schizonte	16,46 ± 0,87
<i>P. falciparum</i>	11,98 ± 0,59	12,90 ± 0,34

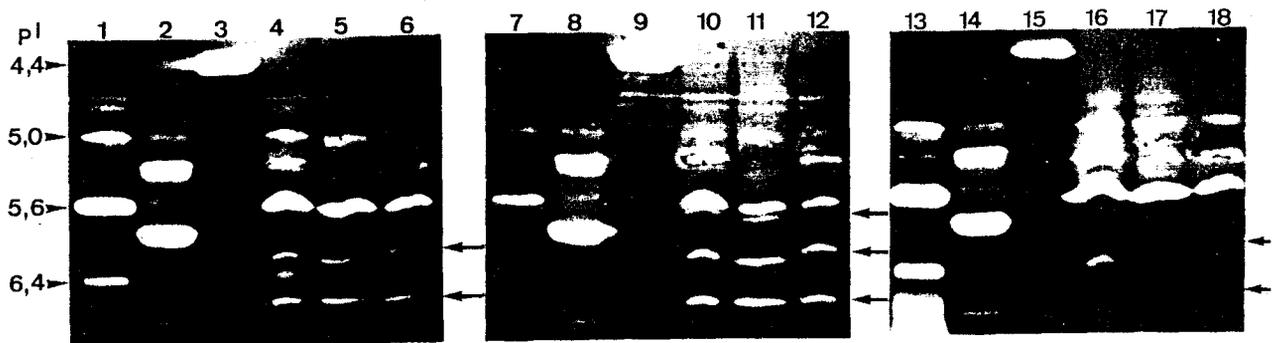
**Tableau II.3:** Activité spécifique de la SOD totale en Unités/mg de protéines, mesurée dans les extraits de différentes espèces de *Plasmodium* de rongeurs et de *P. falciparum*. Les dosages ont été réalisés avec la méthode au ferricytochrome c, sachant qu'une unité d'activité SOD correspond à la quantité d'enzyme capable d'inhiber la réduction du ferricytochrome c à 50%.



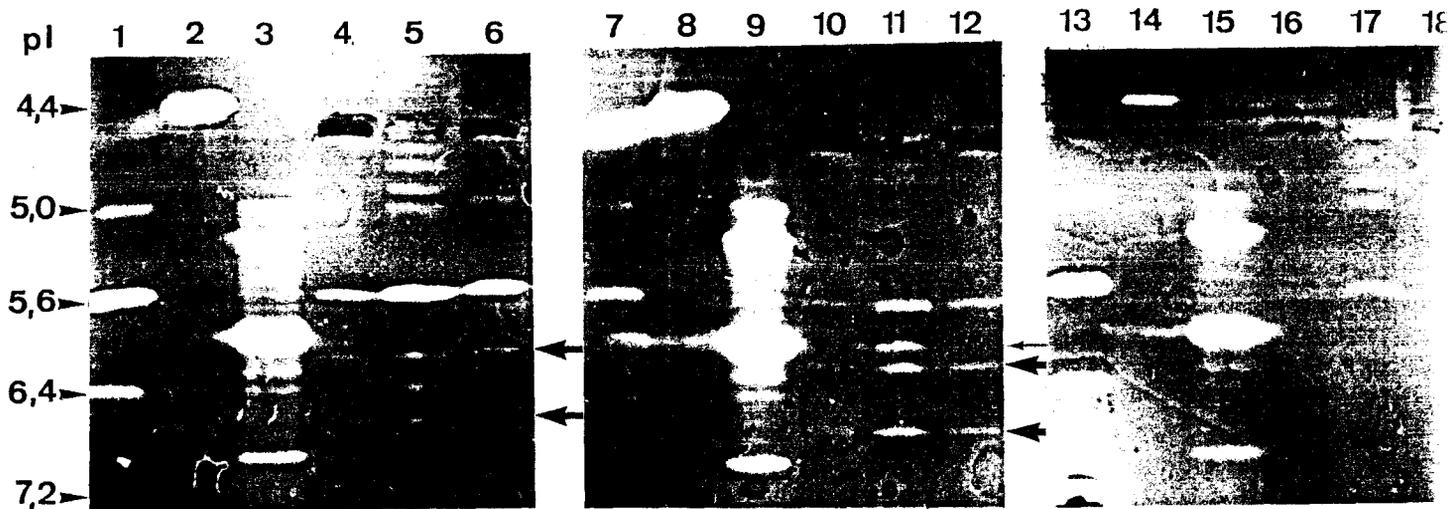
**Figure II.11:** Mise en évidence en isoélectrofocalisation de l'activité SOD endogène dans un extrait brut de *Plasmodium falciparum*. La révélation est effectuée sans inhibiteurs (pistes 1-4), en présence de 2 mM de KCN (pistes 5-8), en présence de 2 mM d' $H_2O_2$  (pistes 9-12). Pistes 1, 5, 9: hématie humaine ( $120\mu g$ ); pistes 2, 6, 10: SOD-Mn de *E. coli* (3 U); pistes 3, 7, 11: SOD-Fe de *E. coli* (3 U); pistes 4, 8, 12: extrait brut de *P. falciparum* ( $210\mu g$ ). Les activités endogènes du parasite sont indiquées par des flèches.



**Figure II.12:** Isoélectrofocalisation réalisée avec un extrait brut de *P. falciparum* lysé par congélation-décongélation. La révélation est effectuée sans inhibiteurs (pistes 1-4), en présence de 2 mM de KCN (pistes 5-8), en présence de 2 mM d' $H_2O_2$  (pistes 9-12). Pistes 1, 5, 11: extrait brut de *P. falciparum* ( $160\mu g$ ); pistes 2, 6, 12: hématie humaine ( $120\mu g$ ); pistes (3, 7, 9: SOD-Mn de *E. coli* (3 U); pistes (4, 8, 10: SOD-Fe de *E. coli* (3 U). Les activités endogènes du parasite sont indiquées par des flèches.



**Figure II.13:** Mise en évidence en isoélectrofocalisation de l'activité SOD endogène dans les extraits bruts de *Plasmodia* de rongeurs. La révélation est effectuée sans inhibiteurs (pistes 1-6), en présence de 2 mM de KCN (pistes 7-12), en présence de 2 mM d' $H_2O_2$  (pistes 13-18). Pistes 1, 7, 13: hématie murine ( $120\mu g$ ); pistes 2, 8, 14: SOD-Mn de *E. coli* (3 U); pistes 3, 9, 15: SOD-Fe de *E. coli* (3 U); pistes 4, 10, 16: extrait brut de *P. berghei* ( $340\mu g$ ); pistes 5, 11, 17: *P. vinckei* ( $270\mu g$ ); pistes 6, 12, 18: extrait brut de *P. yoelii* ( $270\mu g$ ). Les activités endogènes des parasites sont indiquées par des flèches.



**Figure II.14:** Isoélectrofocalisation réalisée avec un extrait brut des différents stades de *P. chabaudi*. La révélation est effectuée sans inhibiteurs (pistes 1-6), en présence de 2 mM de KCN (pistes 7-12), en présence de 2 mM d' $H_2O_2$  (pistes 13-18). Pistes 1, 7, 13: hématie murine ( $120\mu g$ ); pistes 2, 8, 14: SOD-Fe de *E. coli* (3 U); pistes 3, 9, 15: SOD-Mn de *E. coli* (3 U); pistes 4, 10, 16: *P. chabaudi* au stade anneau ( $80\mu g$ ); pistes 5, 11, 17: *P. chabaudi* au stade jeune trophozoïte ( $140\mu g$ ); pistes 6, 12, 18: *P. chabaudi* au stade trophozoïte âgé et schizonte ( $50\mu g$ ). Les activités endogènes des parasites sont indiquées par des flèches.

### 2.1.1.3. Tests d'inhibition

Pour estimer approximativement la contamination des extraits parasitaires par la SOD Cu/Zn de l'hématie, nous avons effectué des tests d'inhibitions avec le KCN ou l' $H_2O_2$  sur une unité d'activité totale de SOD. L'extrait de l'hématie, avec l'hémoglobine éliminée par précipitation, a été utilisé comme témoin de l'expérience. Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité SOD totale.

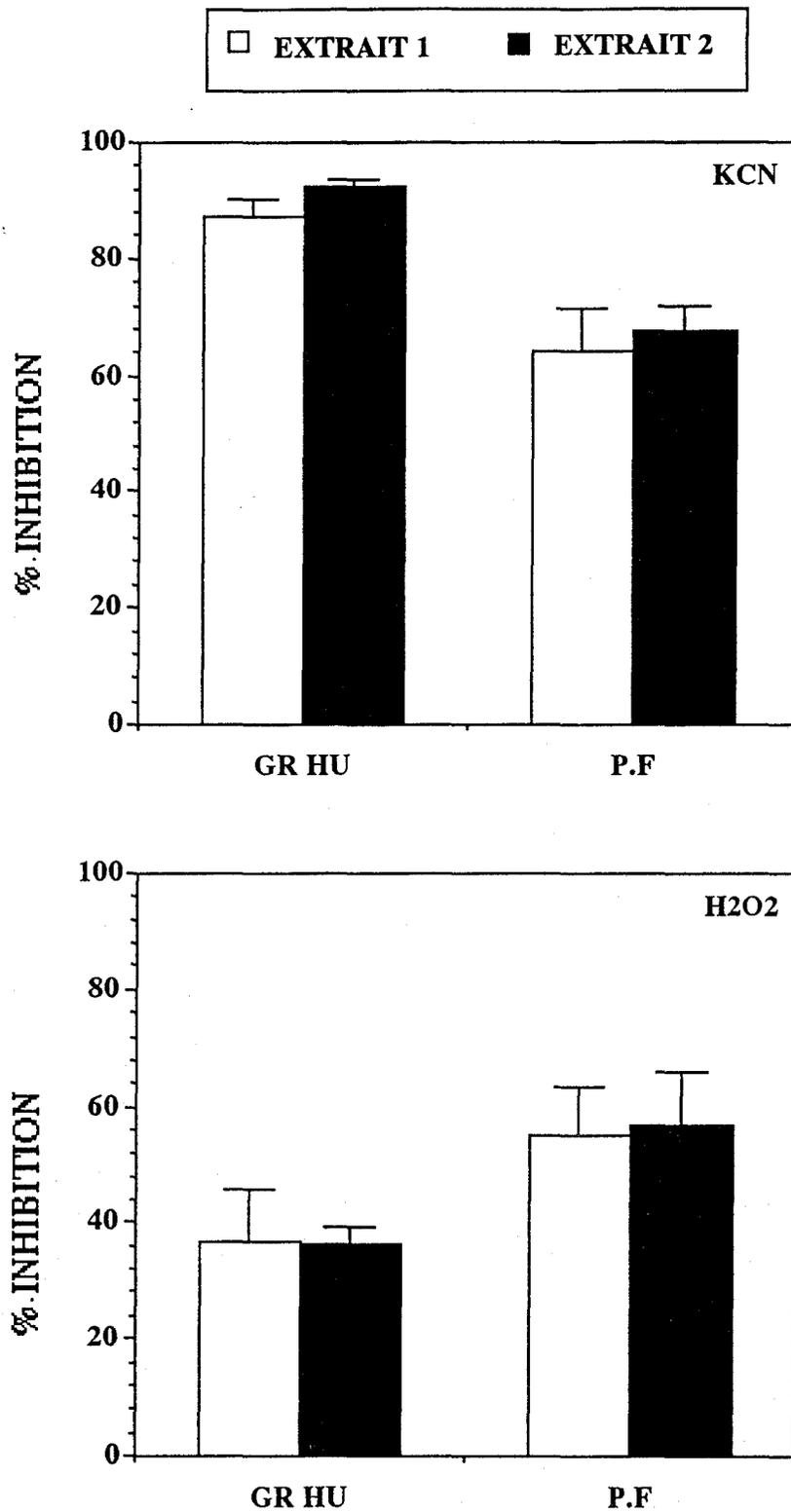
Pour *P. falciparum*, en présence de 1mM de KCN, l'activité SOD totale est inhibée entre 64 et 68% comparativement aux 92% d'inhibition observés avec l'extrait d'hématies humaines (Fig.II.15 A, Article 4 Fig 2). Toutefois, en présence de 2mM d' $H_2O_2$ , celle des extraits parasitaires est inhibé entre 55 et 57% alors que l'inhibition est de 36% lorsqu'est utilisé un extrait d'hématies humaines (Fig.II.15 B, Article 4 Fig 2).

Pour chacun des extraits de *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. vinckei*, l'activité SOD totale est inhibée de 40 à 60% selon les espèces en présence de KCN, alors que l'inhibition est de 80 à 90% dans le cas d'hématies murines (Fig.II.16 A, Article 3 Fig 2). En présence d' $H_2O_2$ , l'activité SOD dans les extraits parasitaires est plus fortement inhibée (60 à 75% selon les espèces) par rapport à ce qui est observé (40% environ) en présence d'hématies murines (Fig.II.16 B, Article 3 Fig 2).

Ces résultats confirment la présence dans les extraits de parasite, d'une proportion significative d'activité SOD d'origine parasitaire, se différenciant de la SOD de la cellule hôte par sa résistance au cyanure et sa sensibilité au peroxyde d'hydrogène.

A partir des résultats obtenus avec les tests d'inhibitions sur une unité d'activité SOD totale dans les extraits parasitaires, nous avons estimé la part de la SOD endogène chez les espèces de *Plasmodium* étudiées, par la différence entre le % d'inhibition de l'activité SOD de l'hématie hôte avec le % d'inhibition obtenu pour l'extrait parasitaire.

On observe une proportion importante de SOD Cu/Zn provenant de la cellule hôte dans les extraits parasitaires. Mais la proportion de SOD endogène varie de 20 à 30% selon les espèces au lieu des quasi 100% observés chez *Babesia* (Fig.II.17).

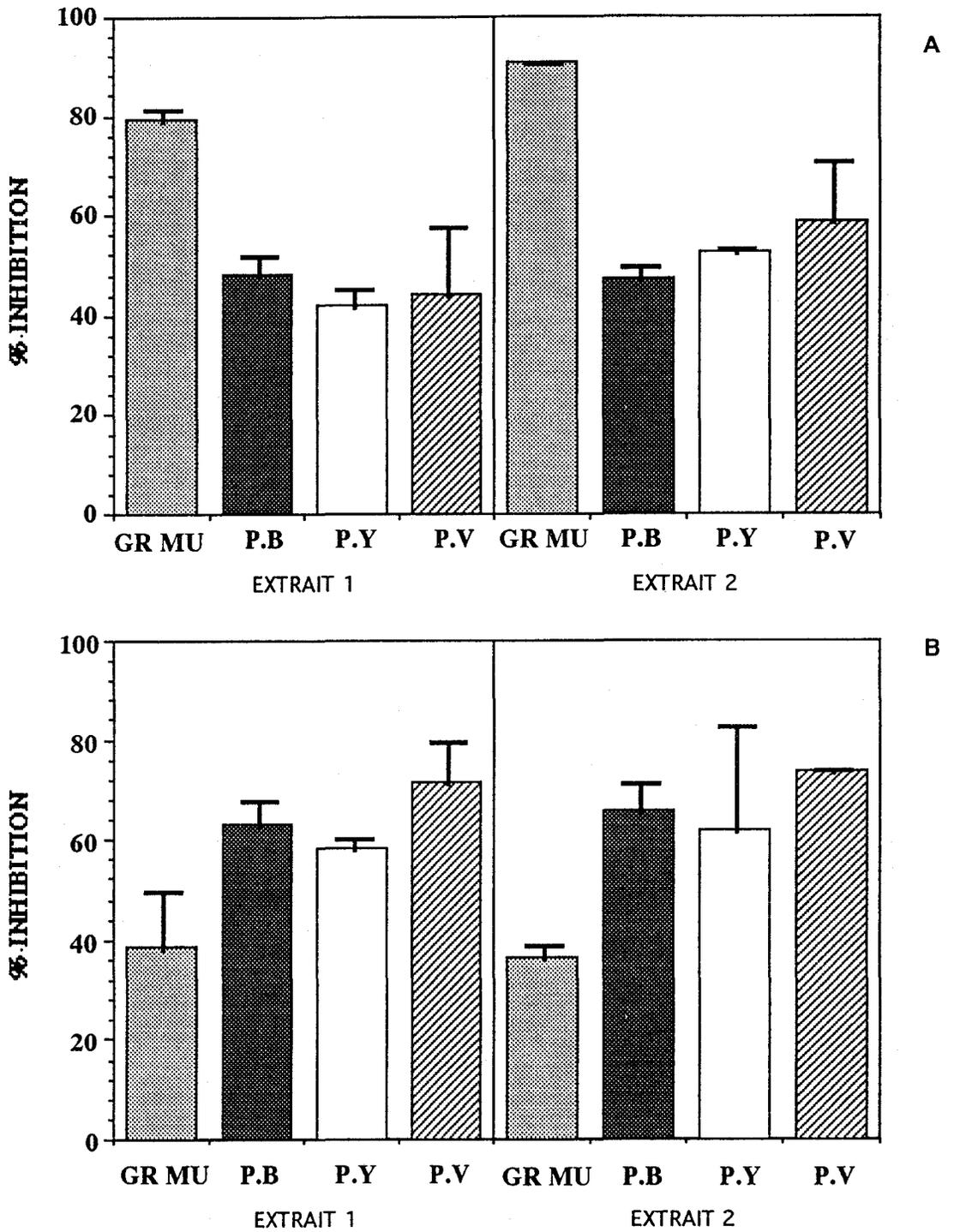


A

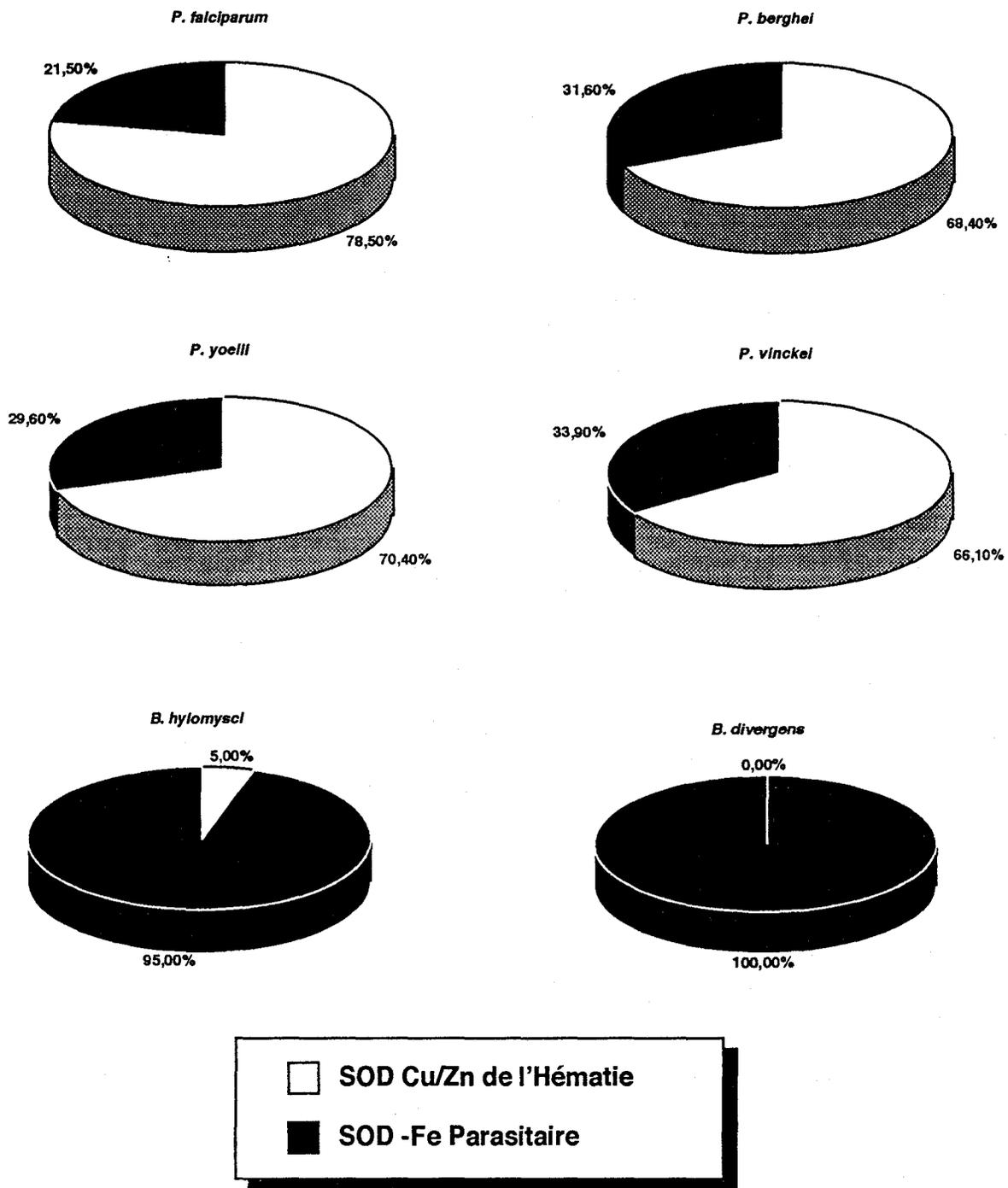
B



**Figure II.15:** Tests d'inhibition sur l'activité SOD totale des extraits de *P. falciparum*, en présence de 1 mM de KCN (A) ou 2 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B). Les tests ont été réalisés avec 1 unité d'activité enzymatique, et les résultats, exprimés en % d'inhibition de cette activité, correspondent à trois mesures sur chacun des deux extraits. Globule rouge humain: GR Hu; *P. falciparum*: P.F.



**Figure II.16:** Tests d'inhibition sur l'activité SOD totale des extraits de trois espèces de *Plasmodium* de rongeurs, en présence de 1 mM de KCN (A) ou 2 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B). Les tests ont été réalisés avec 1 unité d'activité enzymatique, et les résultats, exprimés en % d'inhibition de cette activité, correspondent à trois mesures sur chacun des deux extraits. Globule rouge murin: GR Mu; *P. berghei*: P.B; *P. vinckei*: P.V; *P. yoelii*: P.Y.



**Figure II.17:** Proportion de l'activité de la SOD endogène dans l'activité totale chez *Plasmodium* et *Babesia*.

## Original investigations

## Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species

P. Bécuwe, C. Slomianny, D. Camus, D. Dive

INSERM U42, Domaine du CERTIA, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Received: 6 November 1992 / Accepted: 17 February 1993

**Abstract.** Superoxide dismutase (SOD) was investigated in three species of rodent malaria (*Plasmodium berghei*, *P. yoelii* and *P. vinckei*). The isoelectric points (pI) of isoenzymes found in purified parasites were identical. SOD activities detected by isoelectrofocusing at pI 5.0, 5.6, and 6.4 were cyanide-sensitive and could be considered as having been adopted by the parasites from the host red blood cell. The three rodent malaria parasites also contained a cyanide-resistant, hydrogen peroxide-sensitive SOD activity not found in the host red blood cell. It is therefore concluded that the three rodent malaria parasites possess an endogenous SOD. Two bands of endogenous SOD were found at pI 6.2 and 6.8 for the three species, and one additional band was detected at pI 5.7 for *P. berghei* and *P. vinckei*. This first report of endogenous SOD in rodent *Plasmodium* of a cyanide-resistant, hydrogen peroxide-sensitive SOD suggests that these parasites may be capable of at least partly resisting activated oxygen species using an endogenous SOD.

The susceptibility of malaria parasites to the stress produced by oxygen radicals such as superoxide anion, hydrogen peroxide, or hydroxyl radicals has been clearly established (Clark and Hunt 1983; Dockrell and Playfair 1983; Clark et al. 1984; Wozencraft 1986). During the erythrocytic stage, *Plasmodium* is exposed to free radicals of different origins (Clark et al. 1989; Krungkrai et al. 1991), and its enzymatic oxidant defenses have therefore been investigated (Seth et al. 1985; Fairfield et al. 1986, 1988; Fritsch et al. 1987).

The human malaria parasite *P. falciparum* is known to contain both an adopted host cyanide-sensitive superoxide dismutase (SOD) and an endogenous cyanide-resistant, hydrogen peroxide-resistant SOD (Fairfield et al. 1988; Ranz and Meshnick 1989). A similar adopted host cyanide-sensitive SOD has also been described for the

rodent malaria parasite *P. berghei*; however, no endogenous SOD has been detected in this parasite (Fairfield et al. 1983).

From recent experiments reported herein, it appears that three rodent malaria parasites, including *P. berghei*, contain an endogenous SOD. Moreover, this endogenous SOD differs from the *P. falciparum* endogenous SOD in that it is cyanide-resistant and peroxide-sensitive.

## Materials and methods

## Reagents and chemicals

Glass beads were obtained from B. Braun (Melsungen, Germany) and diethylaminoethylcellulose (DE 23) was supplied by Whatman (Maidstone, England). Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), aprotinin, and leupeptin were purchased from Boehringer (Mannheim, Germany). SOD from *Escherichia coli*, nitro blue tetrazolium (NBT), and the reagents for SOD assays were obtained from Sigma (St. Louis, Mo., USA). The reagents for protein determinations were obtained from Bio-Rad (Richmond, Calif., USA) and Percoll was supplied by Pharmacia (Uppsala, Sweden). Isoelectrofocusing (IEF) gels with a pH range of 3–10 and a 0.3-mm thickness were purchased from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany). Saponin and all other reagents were obtained from Merck. IEF was performed with an LKB 2117 Multiphor system.

## Rodent malaria parasites

Female Swiss mice weighing 20–30 g were inoculated with *Plasmodium berghei* N (chloroquine-sensitive), *P. yoelii nigeriensis*, or *P. vinckei* PV80 by intraperitoneal blood passage of  $5 \times 10^5$  parasites per mouse. Blood from infected mice was collected into phosphate-buffered saline (NaCl, 136.9 mM; KCl, 2.7 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.47 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8 mM; pH 7.2) containing heparin when levels of parasitemia had reached about 50% (6 days after inoculation for *P. berghei* and *P. vinckei*; 4 days postinoculation for *P. yoelii*). No significant reticulocytopenia was observed. Leukocytes and platelets were removed from whole blood by passing the latter through glass beads and DE 23.

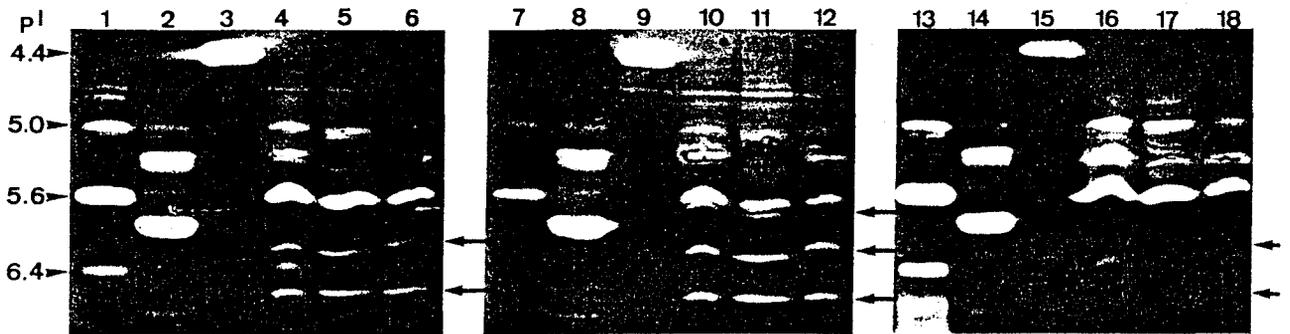


Fig. 1. Isoelectrofocusing of rodent *Plasmodium* extracts. Gels were stained for SOD activity without inhibitors (lanes 1–6) or in the presence of 2 mM KCN (lanes 7–12) or 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lanes 13–18). Lanes 1, 7, 13, Murine RBC extract (120 µg); lanes 2, 8, 14,

*Escherichia coli* Mn-SOD (3 U); lanes 3, 9, 15, *E. coli* Fe-SOD (3 U); lanes 4, 10, 16, *P. berghei* extract (340 µg); lanes 5, 11, 17, *P. vinckei* extract (270 µg); lanes 6, 12, 18, *P. yoelii* extract (270 µg). Endogenous SOD activities are indicated by arrowheads.

### Extraction of parasites

Red blood cells (RBC) were pelleted by centrifugation (1500 g, 5 min) and washed two times in phosphate-buffered saline (PBS). Lysis was achieved using 10 vols. of 0.01% saponin in the same buffer for 5 min at room temperature. After centrifugation at 11000 g, parasites were washed once with PBS, resuspended in TES buffer [pH 7.5; triethanolamine, 5 mM; ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM; sucrose, 0.25 M], and layered on a discontinuous Percoll gradient in TES buffer (densities, 1.04 and 1.09). After 5 min centrifugation at 4400 g, the layer of purified parasites was collected and washed once in TES and twice in PBS. When not used immediately, the samples were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Preparation of parasite homogenates

Frozen parasites were disrupted by three cycles of freeze-thawing followed by 5 min sonication into 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mg aprotinin/ml and 1 mM leupeptin in an ice-cold bath. After ultracentrifugation at 100000 g (Beckman 70 TI rotor) for 50 min, the supernatants were dialyzed against 2 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) at 4°C for 24 h before they were concentrated. This dialyzed and concentrated material was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Protein determination

Protein contents were measured according to the method of Bradford (1976) using serum albumin as the standard. The hemoglobin content of the lysates was determined using Drabkin's reagent (Bessis 1972).

### Isoelectrofocusing

IEF was performed on polyacrylamide gel (pH range, 3–10) according to the instructions of the manufacturer. The gels were stained for SOD-specific activity by incubation in NBT as described by Beauchamp and Fridovich (1971). For assessments of the effects of inhibitors, staining for SOD activity was also done in the presence of 2 mM potassium cyanide or 2 mM hydrogen peroxide. Control mouse and human RBC extracts were prepared by hemoglobin precipitation according to Winterbourn et al. (1975).

### Enzyme assays

SOD activity was measured by determination of the rate of reduction of cytochrome c in the presence of the xanthine-xanthine oxidase system according to McCord and Fridovich (1969); 1 unit of SOD activity is defined as the quantity of enzyme that inhibits the reduction of cytochrome c by 50%. Bovine erythrocyte SOD was used as the standard. For estimations of the part of the endogenous SOD activity deriving from *Plasmodium*, the enzyme assays were done on 1 unit of total enzymatic activity in the presence of 1 mM KCN or 2 mM hydrogen peroxide. For studies of inhibition by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assays of SOD activity were done after preincubation for 5 min at 25°C of 50 µl of diluted extract (calculated for 1 unit) with the same volume of 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assay reagents were then added to a final volume of 3 ml. Under these conditions, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was diluted 30-fold for SOD assay and was not found to interfere with the measurement. The remaining activity was measured after the action of the inhibitor and was expressed as the percentage of inhibition of the initial activity (1 unit) used for the assay.

## Results

### Enzyme assays

The SOD-specific activity detected by the cytochrome c method in two different extracts of isolated parasites differed among the three species. The SOD activity measured in the *Plasmodium vinckei* extracts ( $13.60 \pm 3.83$  and  $8.96 \pm 2.06$  units/mg protein) was 2-fold that detected in the *P. yoelii* extracts ( $6.56 \pm 2.06$  and  $6.07 \pm 0.86$  units/mg protein) and about 3-fold that observed in the *P. berghei* extracts ( $3.69 \pm 1.51$  and  $4.00 \pm 0.43$  units/mg protein).

### Isoelectrofocusing

IEF of dialyzed rodent *Plasmodium* extracts and different controls (Fig. 1) showed the presence in parasites of an endogenous SOD activity. Three activity bands at isoelectric points (pI) 5.0, 5.6, and 6.4 were detected in both mouse RBC and isolated parasite extracts (Fig. 1, lanes 1, 4–6). These SOD activities were sensitive

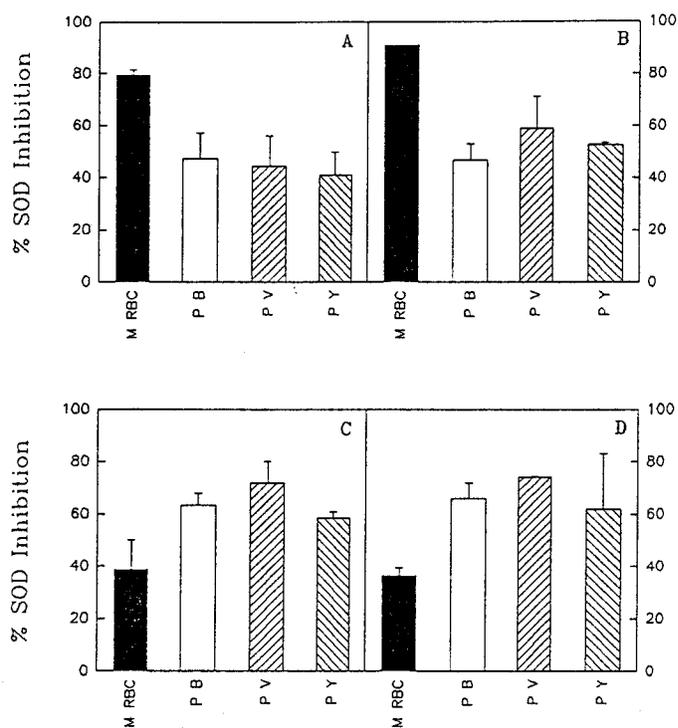


Fig. 2A–D. Inhibition of SOD activity in extracts by 1 mM KCN (A, B) or 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C, D). Initially, 1 unit of enzyme activity was used for the assays. Each result, expressed as a percentage of SOD inhibition, is the mean value for three measurements on the same extract. Two extracts were tested for each strain (respectively, A and C for the first extract and B and D for the second). M RBC, Mouse RBC; P B, *P. berghei*; P V, *P. vinckei*; P Y, *P. yoelii*

to 2 mM cyanide (Fig. 1, lanes 7, 10–12) but were rather insensitive to hydrogen peroxide (Fig. 1, lanes 13, 16–18). Two activities found in the three parasite species at pl 6.2 and 6.8 (Fig. 1, lanes 4–6) were resistant to 2 mM cyanide (Fig. 1, lanes 10–12) and sensitive to 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1, lanes 16–18), as was an Fe-containing SOD control from *Escherichia coli* (Fig. 1, lanes 3, 9, 15). The cyanide-inhibition assay enabled the detection of an activity band resistant to KCN at approximately pl 5.7 in *P. berghei* and *P. vinckei* extracts (Fig. 1, lanes 10, 11), close to the RBC isozyme at pl 5.6. By comparison, the Mn-containing SOD activity from *E. coli* was resistant to 2 mM KCN and to 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1, lanes 2, 8, 14).

#### Inhibition tests

The total SOD activity of each parasite extract was determined before and after KCN or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and the result was expressed as a percentage of the inhibition of SOD activity. The total SOD activity of mouse RBC was strongly inhibited by KCN (80%–90% inhibition), whereas that of isolated parasites from the three species tested was inhibited by only 40%–60% (Fig. 2A, B). In contrast, we observed that the total SOD activity of mouse RBC was slightly inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (less than 40% inhibition), whereas that of the isolated parasites

was inhibited by 60%–75% (Fig. 2C, D). These findings indicate that a significant amount of a KCN-resistant and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive SOD activity is present in the parasite extracts.

#### Discussion

It has previously been reported that *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* malaria parasites are capable of adopting the cyanide-sensitive SOD from their host RBC (Fairfield et al. 1983, 1988). In the present report we describe the detection in isolated parasites of three cyanide-sensitive activity bands at pl 5.0, 5.6, and 6.4, respectively, for *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. vinckei*, which can be considered as the adopted host cell Cu-Zn enzyme.

It appears from the present study that *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. vinckei* contain a cyanide-resistant, hydrogen peroxide-sensitive SOD activity not found in the host RBC. It can therefore be concluded that the three rodent malaria parasites possess an endogenous SOD. Two activities of endogenous SOD were found at the same pl (6.2 and 6.8) for the three species of rodent parasites studied, and one additional activity band was detected at pl 5.7 for *P. berghei* and *P. vinckei*. Our results do not confirm the observation of Fairfield et al. (1983), who were unable to detect an endogenous SOD activity in *P. berghei*. This apparent discrepancy can probably be explained by the method of parasite extraction we followed, whereby after saponin treatment, parasites were further purified by centrifugation through Percoll.

Endogenous SOD with an activity resistant to both cyanide and hydrogen peroxide has previously been described in *P. falciparum* (Ranz and Meshnick 1989). However, the endogenous SOD activity we detected in *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. vinckei* was cyanide-resistant and hydrogen peroxide-sensitive. This result is in accordance with the cyanide resistance and hydrogen peroxide sensitivity reported for endogenous SOD in various protozoa, including sporozoa such as *Toxoplasma* (Sibley et al. 1986) and *Babesia* (Bécuwe et al. 1992), for one of the three SODs of *Eimeria* (Michalski and Prowse 1991), for SOD in flagellates (Meshnick and Eaton 1981; Le Trant et al. 1983; Meshnick et al. 1983; Kitchener et al. 1984), and for SOD in the ciliate *Tetrahymena* (Barra et al. 1990).

The endogenous activity we detected in *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. vinckei* is probably iron-dependent based on its resistance to cyanide and its sensitivity to hydrogen peroxide. The precise determination of the metal cofactor has not been investigated, since according to Kirby et al. (1980), this characterization would need the sacrifice of about 1,600 mice. As iron-dependent SODs are localized in the cell cytosol, it can be postulated that this endogenous SOD may play a significant role in the defense of the parasite against activated oxygen species. SOD adopted from the host cell has been detected in the lysosome system, i.e., the parasite's digestive vacuoles (Fairfield et al. 1986). Under these conditions, the adopted SOD could be sequestered and thus

could not participate in the protection of other cell compartments against superoxide anions. If an translocation of this adopted enzyme occurs, its mechanism remains unknown. Another possibility might be that the adopted SOD remains in the digestive vacuole and thus protects it during the digestion of hemoglobin and that the endogenous SOD may account for the protection of the cytoplasmic compartment. These suggested roles of the SODs may help to explain the susceptibility of *Plasmodium* to oxygen radicals and, particularly, its sensitivity to hydrogen peroxide (Dockrell and Playfair 1983), since the parasite's endogenous SOD is more sensitive to this product than is the RBC SOD.

**Acknowledgements.** Ms. A. Masset and M. Mortuaire and Mr. E. Dewailly are gratefully acknowledged for their expert technical assistance.

## References

- Barra D, Schinina ME, Bossa F, Puget K, Durosay P, Guissani A, Michelson AM (1990) A tetrameric iron superoxide dismutase from the eucaryote *Tetrahymena pyriformis*. *J Biol Chem* 265:17680-17687
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287
- Bécuwe P, Slomianny C, Valentin A, Schrevel J, Camus D, Dive D (1992) Endogenous superoxide dismutase activity in two *Babesia* species. *Parasitology* 105:177-182
- Bessis M (ed) (1972) Cellules du sang normal et pathologique. Masson, Paris, pp 31-32
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Clark IA, Hunt NH (1983) Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun* 39:1-6
- Clark IA, Hunt NH, Cowden WB, Maxwell IE, Mackie EJ (1984) Radical-mediated damage to parasites and erythrocytes in *Plasmodium vinckei*-infected mice after injection of t-butyl hydroperoxide. *Clin Exp Immunol* 56:524-530
- Clark IA, Chaudhri G, Cowden WB (1989) Some roles of free radicals in malaria. *Free Radicals Biol Med* 6:315-321
- Dockrell HM, Playfair JHL (1983) Killing of blood-stage murine malaria parasites by hydrogen peroxide. *Infect Immun* 39:456-459
- Fairfield AS, Meshnick SR, Eaton JW (1983) Malaria parasite adopt host cell superoxide dismutase. *Science* 221:764-766
- Fairfield AS, Eaton JW, Meshnick SR (1986) Superoxide dismutase and catalase in the murine malaria parasite, *Plasmodium berghei*: content and subcellular distribution. *Arch Biochem Biophys* 25:526-529
- Fairfield AS, Abosch A, Ranz A, Eaton JW, Meshnick SR (1988) Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 30:77-82
- Fritsch B, Dieckmann A, Menz B, Hempelmann E, Fritsch C, Jung A (1987) Glutathione and peroxide metabolism in malaria: parasitized erythrocytes. *Parasitol Res* 73:515-517
- Kirby T, Blum J, Kahane I, Fridovich I (1980) Distinguishing between Mn-containing and Fe-containing superoxide dismutase in crude extracts of cells. *Arch Biochem Biophys* 201:551-555
- Kitchener E, Meshnick SR, Fairfield AS, Wang CC (1984) An iron-containing superoxide dismutase in *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 12:95-99
- Krungkrai J (1991) Malarial dihydroorotate dehydrogenase mediates superoxide radical production. *Biochem Int* 24:833-839
- Le Trant N, Meshnick SR, Kitchener KR, Eaton JW, Cerami A (1983) Iron-containing superoxide dismutase from *Criethidia fasciculata*: purification, characterization and similarity to leishmanial and trypanosomal enzymes. *J Biol Chem* 258:125-130
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055
- Meshnick SR, Eaton JW (1981) Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 102:970-976
- Meshnick SR, Trang NL, Kitchener E, Cerami A, Eaton JW (1983) Iron containing superoxide dismutase in trypanosomatids. In Choen G, Greenwald RA (eds) *Oxy radicals and their scavenge systems: molecular aspects*, vol 1. Elsevier-North Holland, New York, pp 348-351
- Michalski WP, Prowse SJ (1991) Superoxide dismutases in *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol* 47:189-196
- Ranz A, Meshnick SR (1989) *Plasmodium falciparum*: inhibitory sensitivity of the endogenous superoxide dismutase. *Exp Parasitol* 69:125-128
- Seth RK, Saini AS, Jaswall TS (1985) *Plasmodium berghei*: oxidant defense system. *Exp Parasitol* 60:414-416
- Sibley DL, Lawson R, Weidner E (1986) Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 19:83-87
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carewell RW (1975) The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85:337-341
- Wozencraft AO (1986) Damage to malaria-infected erythrocytes following exposure to oxidant-generating systems. *Parasitology* 92:559-567

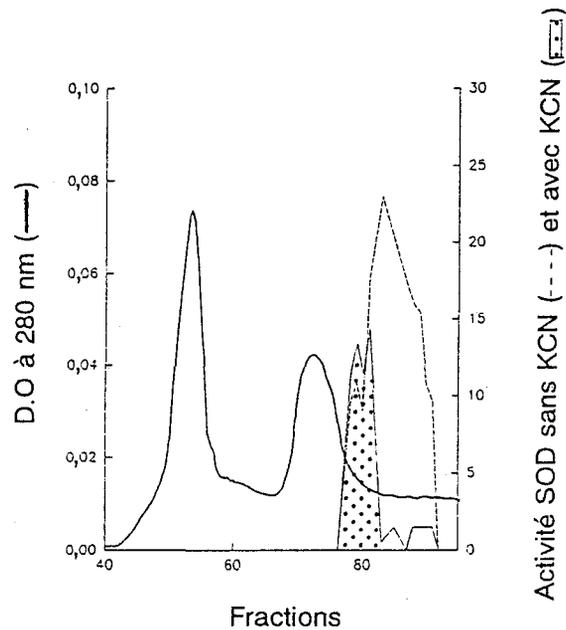
## 2.1.2. Purification et microséquençage N-terminal de la SOD de *P. falciparum*

Nous avons pu purifier la SOD de *P. falciparum* à partir de la préparation d'un homogénat parasitaire en 2 étapes chromatographiques et 2 étapes électrophorétiques.

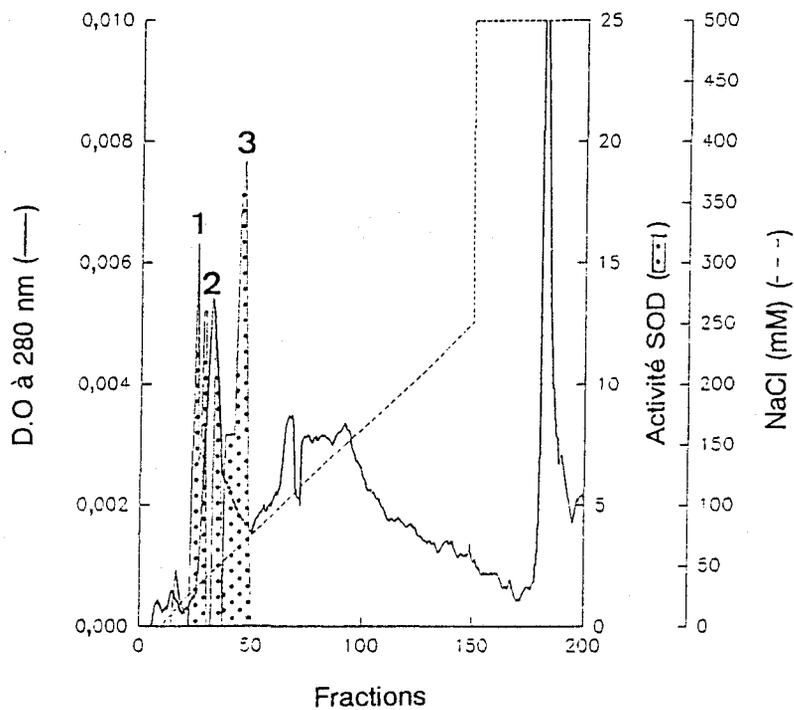
### 2.1.2.1. Purification et caractérisation

L'extrait brut parasitaire (14,5 mg) a été déposé sur une colonne Sephadex G75. Au cours de l'élution des protéines, deux pics d'activité SOD ont été détectés (**Fig.II.18, Article 4 Fig 3A**). En présence de KCN, le 1er pic, résistant, contenait la SOD parasitaire. Le poids moléculaire de cette SOD a été estimée à 43 kDa, à partir du rapport  $V_e/V_o$  de 1,35 ( $V_e = 182\text{ml}$ ) reportée sur la courbe de calibration de la colonne. La SOD de l'autre pic, sensible au KCN, avait un poids moléculaire de 36 kDa ( $V_e/V_o$  de 1,41 avec  $V_e = 190\text{ml}$ ) correspondant à l'enzyme de l'hématie humaine. Les fractions correspondantes au 1er pic ont été rassemblées puis concentrées. La quantité de protéines et l'activité spécifique de la SOD ont alors été mesurées (**Tableau II.4, Article 4 Table 1**): l'activité spécifique de la SOD est multipliée par 6 par rapport à l'extrait brut, mais 65% de cette activité est encore inhibée par le KCN. Ceci montre qu'après la gel filtration, la SOD parasitaire est encore contaminée par la SOD Cu/Zn de l'hématie humaine, car les deux pics d'activité détectés se chevauchent.

La chromatographie échange d'ions (DEAE-Trisacryl), après élution par un gradient linéaire de NaCl (0 à 250 mM) a permis de séparer un premier pic d'activité SOD parasitaire élué à 30 mM de NaCl et, qui selon les expériences, peut être dédoublé, puis un second pic élué à 40mM de NaCl (**Fig.II.19, Article 4 Fig 3B**). Les fractions correspondantes ont été rassemblées et concentrées. L'activité spécifique est multipliée par 3 et 10% seulement de cette activité est inhibée par le KCN (**Tableau II.4**). Un 3ème pic d'activité a été élué à 80mM de NaCl, correspondant à la SOD contaminante provenant de l'hématie humaine hôte.



**Figure II.18:** Chromatographie en gel filtration de l'extrait brut de *P. falciparum*. L'élué des protéines est suivie par la détection de l'absorbance à 280 nm (—). Activité SOD en absence de KCN (- - -) et en présence de KCN (· · ·).



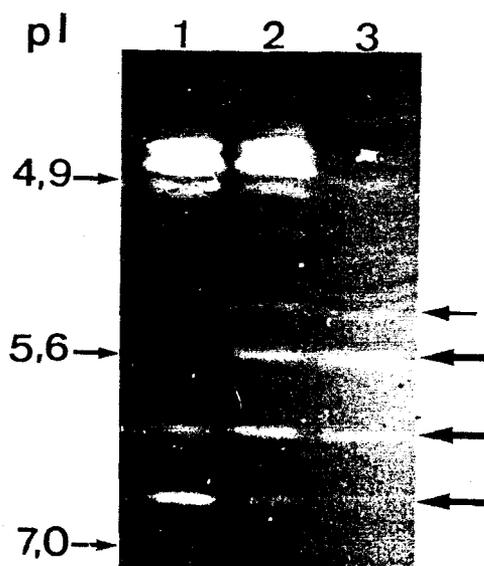
**Figure II.19:** Chromatographie sur DEAE-Trisacryl. Les protéines sont éluées de la colonne par un gradient linéaire de NaCl 0 à 250 mM (- - -) et sont détectées à 280 nm (—). Activités SOD (pics 1, 2 et 3) (· · ·).

Etape purification	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique U / mg pr.	% inhibition par le KCN
Homogénat brut	14,50	128	8,80	62
Après gel filtration	0,35	17	49	65
Après échange d'ions	0,02	3	150	10

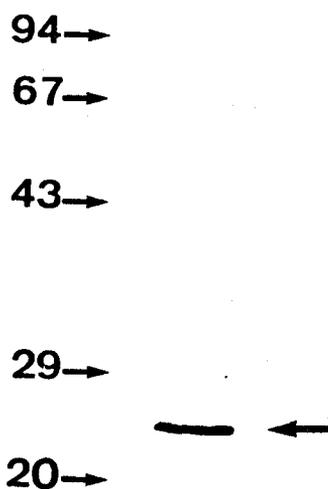
**Tableau II.4:** Bilan de la purification de la SOD de *P. falciparum*. L'activité SOD a été dosée selon la méthode de Marklund après la concentration des fractions issues des étapes chromatographiques et renfermant l'enzyme.

Ces deux premières étapes de la purification ont été analysées en isoélectrofocalisation (**Fig.II.20, Article 4 Fig 4A**). Le résultat montre que les fractions issues de la gel filtration sont contaminées par la SOD d'hématie (**piste 2**). Par contre après la chromatographie d'échange d'ions, la contamination est faible dans les fractions contenant la SOD parasitaire (**piste 3**). Le profil d'activité de la SOD du parasite est modifié après deux étapes chromatographiques, par rapport au profil d'activité de l'extrait brut. En effet, l'activité SOD au pI 6,8 est moins importante après la gel filtration et absente après l'échange d'ions (pistes 2 et 3), alors que l'activité au pI 5,6 devient plus apparente au cours des deux étapes de purification.

Une électrophorèse préparative en conditions non dénaturantes a été réalisée avec les fractions concentrées contenant la SOD d'origine parasitaire et l'activité SOD a été révélée en présence de KCN. La seule bande d'activité SOD mise en évidence a été découpée. Les protéines électroéluées du gel ont été analysées en SDS-PAGE, en conditions non réductrices. Deux bandes de protéines (23 et 28 kDa) sont détectées après une coloration à l'argent (**Fig.II.21, Article 4 Fig 4B**). La principale protéine de 23 kDa présente un poids moléculaire comparable à la forme monomérique des SOD-Mn et Fe connues.



**Figure II.20:** Contrôle par isoélectrofocalisation des étapes de la purification de la SOD endogène de *P. falciparum*. L'activité de la SOD est révélée selon la technique de Beauchamp et Fridovich. Piste 1: extrait brut de *P. falciparum* (120 $\mu$ g); piste 2: fraction issue de la gel filtration (15 $\mu$ g); piste 3: fraction issue de la DEAE-Trisacryl (2 $\mu$ g).



**Figure II.21:** Analyse en SDS-PAGE de la SOD purifiée de *P. falciparum*. Les protéines sont colorées au nitrate d'argent. La flèche indique la SOD purifiée (0,2 $\mu$ g) à approximativement 23 kDa.



### 2.1.2.2. Microséquençage N-terminal

Une électrophorèse préparative en conditions dénaturantes et réductrices a été réalisée avec les protéines électroéluées, puis transférées sur une membrane de PVDF. La principale bande à 23 kDa a été découpée et la protéine a été séquencée. L'extrémité N-terminale n'était pas bloquée et 29 acides aminés ont pu être identifiés, s'organisant selon la séquence suivante:

Val Ile Thr Leu Pro Lys Leu Lys Tyr Ala Leu Asn Ala Leu Ser Pro His Ile Ser Glu Glu Thr Leu Asn Phe His Tyr Tyr Lys.

Le rendement de la Val-1 était de 27 picomoles et la Lys-29 de 0,6 picomoles. Nous avons obtenu un second polypeptide séquencé qui était différent du premier uniquement par la présence d'une méthionine précédant la Val-1. Le rendement de cette méthionine-1 était de 18,6 picomoles.

La séquence obtenue diffère de celle des SOD Cu/Zn et Mn humaines, ce qui confirme que la protéine de 23 kDa purifiée correspond à la SOD de *P. falciparum*. Cette SOD montre de fortes homologies avec les SOD-Fe ou Mn connues. En effet les acides aminés Leu-4, Pro-5, Leu-7, Ala-Leu-13-14, Pro-16, His-26 et Lys-29 sont très conservés dans toutes les séquences de SOD-Mn et Fe (**Fig.II.22**). La séquence N-terminale de la SOD de *P. falciparum* montre de fortes homologies avec celle de *B. hylomysci* (70%), en particulier une séquence de 8 acides aminés située entre les résidus compris Phe-16 à Leu-23 (**Fig.II.23**).

Une analyse réalisée avec le programme "DARWIN", comparant les séquences N-terminales des SOD-Fe ou Mn connues, classe la SOD de *P. falciparum* dans la famille des SOD-Fe (**Fig.II.24**). Sur l'arbre obtenu, la séquence N-terminale la plus proche est celle de *B. hylomysci*.

```

      1              10              20
B.c.: P F E L P A L P Y P Y D A L E P H I D K E T M N I H H T K
B.s.: P F E L P A L P Y P Y D A L E P H I D K E T M N I H H T K
M.s.: A Y T L P P L D Y A Y T A L E P H I D A Q T M E I H H T K
E.c.: S Y T L P S L P Y A Y D A L E P H F D K Q T M E I H H T K
S.m.: A I L L P D L P Y A Y D A L E P Y I D A E T M T L H H D K
H.s.: K H S L P D L P Y D Y G A L E P H I N A Q I M Q L H H S K
M.m.: K H S L P D L P Y D Y G A L E P H I N A Q I M Q L H H S K
S.c.: K V T L P D L K W D F G A L E P Y I S G Q I N E L H Y T K

P.f.: V I T L P K L K Y A L N A L S P H I S E E T L N F H Y Y K

S.s.: S Y E L P A L P F D Y T A L A P Y I T K E T L E F H H D K
C.b.: A F E L P D L P Y K L N A L E P H I S Q E T L E Y H H G K
L.p.: T F T L P Q L P Y A L D A L A P H V S K E T L E Y H Y G K
P.l.: A F E L P A L P F A M N A L E P H I S Q E T L E Y H Y G K
E.c.: S F E L P A L P Y A K D A L A P H I S A E T L E Y H Y G K
P.o.: A F E L P P L P Y A H D A L Q P H I S K E T L E Y H H D K
E.h.: S F Q L P Q L P Y A Y N A L E P H I S K E T L E F H H D K
      * * * * * * * * * *

```

**Figure II.22:** Alignement de la séquence N-terminale de la SOD de *P. falciparum* avec celle de SOD-Mn et Fe connues. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR2 et EMBL sont indiquées entre parenthèses. La séquence N-terminale de la SOD-Mn de *Homo sapiens* et *Mus musculus* a été volontairement montrée incomplète et le 1er acide aminé correspond en réalité au 24ème dans la séquence complète.

**SOD-Mn:** B.c., *Bacillus caldotenax* (S22053); B.s., *Bacillus stearothermophilus* (S27522); M.s., *Methylomonas sp.* (A38461); E.c.(Mn), *Escherichia coli* (A24141); S.m., *Streptococcus mutans* (A42710); H.s., *Homo sapiens* (S13162); M.m., *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); S.c., *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST).

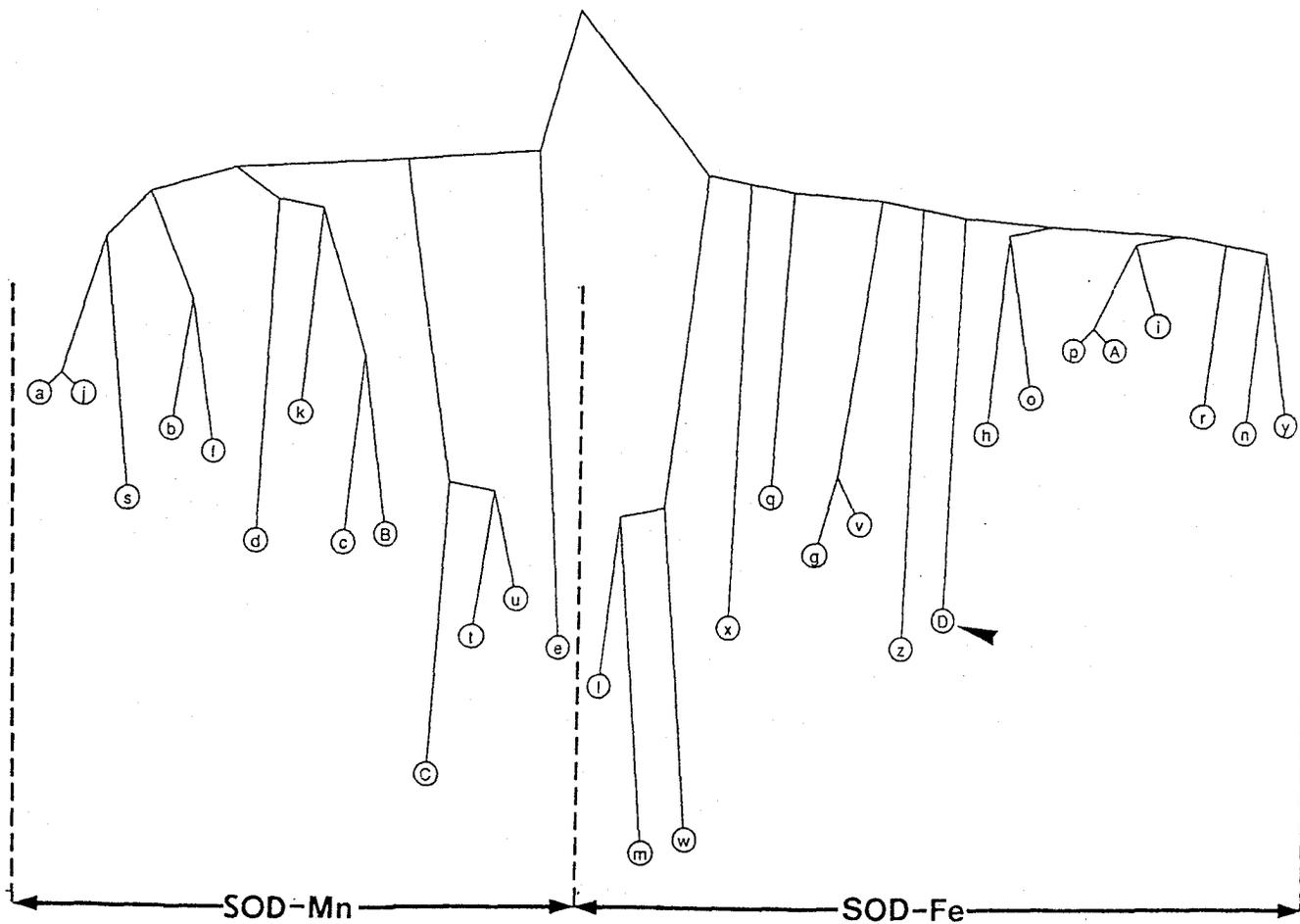
**SOD-Fe:** P.f., *Plasmodium falciparum*; S.s., *Synechococcus sp.* (S04423); C.b., *Coxiella burnetii* (A44791); L.p., *Legionella pneumophila* (JS0749); P.l., *Photobacterium leiognathi* (A26707); E.c.(Fe), *Escherichia coli* (A29940); P.o., *Pseudomonas ovalis* (SODF\_PSEOV); E.h., *Entamoeba histolytica* (A45552). Les résidus conservés entre les SOD-Mn et Fe sont indiqués par une étoile. Les résidus caractéristiques pour les SOD-Mn sont encadrés en clair et ceux pour les SOD-Fe en gris. Le résidu 19 plus souvent rencontré dans les SOD-Fe est indiqué par une flèche.

```

P. falciparum  V I T L P K L K Y A L N A L S P H I S E E T L N F H Y Y K
B. hylomysci  K I K L P P L P Y S L N G L V P H I S E E T L Q F H T N K H H N T Y

```

**Figure II.23:** Alignement de la séquence N-terminale de *P. falciparum* et *B. hylomysci*. Les résidus homologues entre les deux séquences sont encadrés.



**Figure II.24:** Analyse comparative par le système DARWIN entre la séquence N-terminale de la SOD de *P. falciparum* et celle de 29 SOD-Mn ou Fe connues. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR2 et EMBL sont indiquées entre parenthèses.

a, *Bacillus caldotenax* (S22053); j, *Bacillus stearothermophilus* (S27522); s, *Listeria monocytogenes* (JC1272); b, *Escherichia coli* (A24141); f, *Methylomonas* sp. (A42710); d, *Thermus aquaticus* (S07147); k, *Streptococcus mutans* (A42710); c, *Homo sapiens* (S13162); B, *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); C, *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST); t, *Mycobacterium leprae* (A37212); u, *Mycobacterium tuberculosis* (S15205); e, *Caenorhabditis elegans* (JS0750); l, *Arabidopsis thaliana* (B39267); m, *Nicotiana plumbaginifolia* (A39267); w, *Glycine max* (SOYFESOD); x, *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD); q, *Synechococcus* sp. (SO4423); g, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC53977) (A43585); v, *Porphyromonas gingivalis* (S12882); z, *P. falciparum*; D, *Babesia hylomysci*; h, *Coxiella burnetii* (A44791); o, *Photobacterium leiognathi* (A26707); p, *Pseudomonas* sp. (s00157); A, *Pseudomonas ovalis* (SODF\_PSEOV); i, *Entamoeba histolytica* (A45552); r, *Escherichia coli* (A29940); n, *Legionella pneumophila* (JS0749); y, *Bordetella pertussis* (BPESODB); n, *Legionella pneumophila* (JS0749); r, *Escherichia coli* (A29940); i, *Entamoeba histolytica* (A45552); p, *Pseudomonas* sp. (s00157); z, *Pseudomonas ovalis* (SODF\_PSEOV).

### 2.1.3. Préparation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la SOD de *P. falciparum*

#### 2.1.3.1. Reconnaissance du peptide synthétique correspondant à l'extrémité N-terminale de la SOD

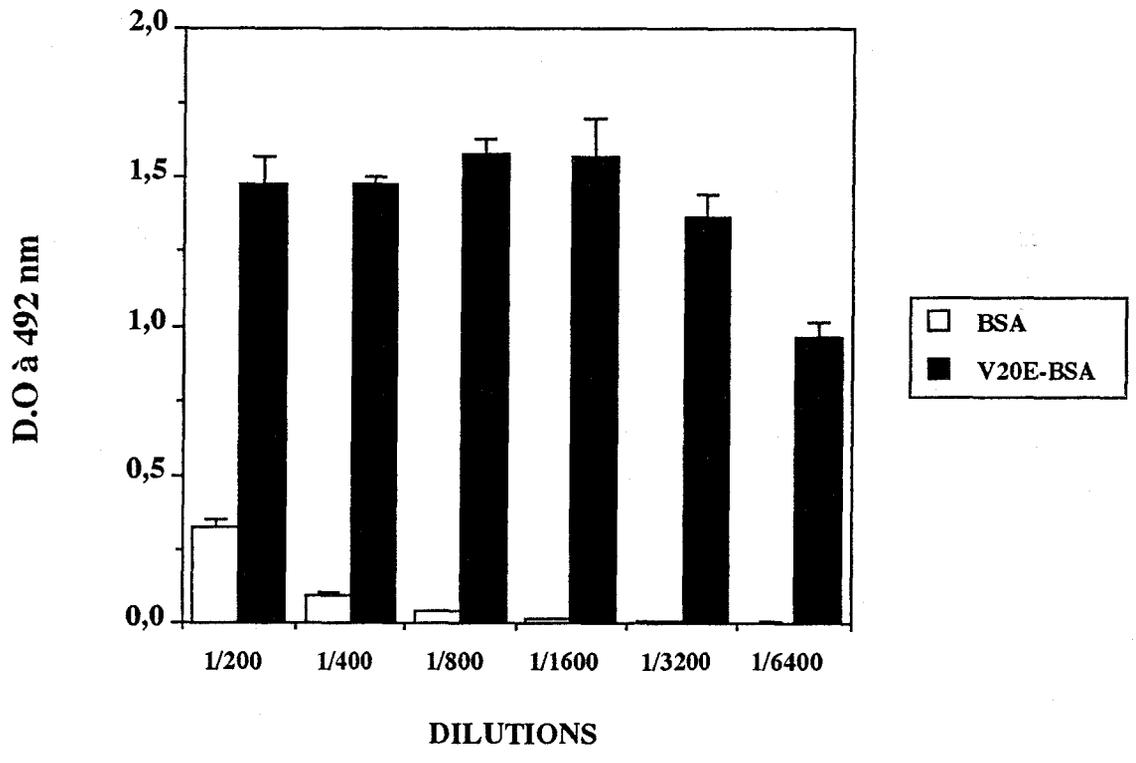
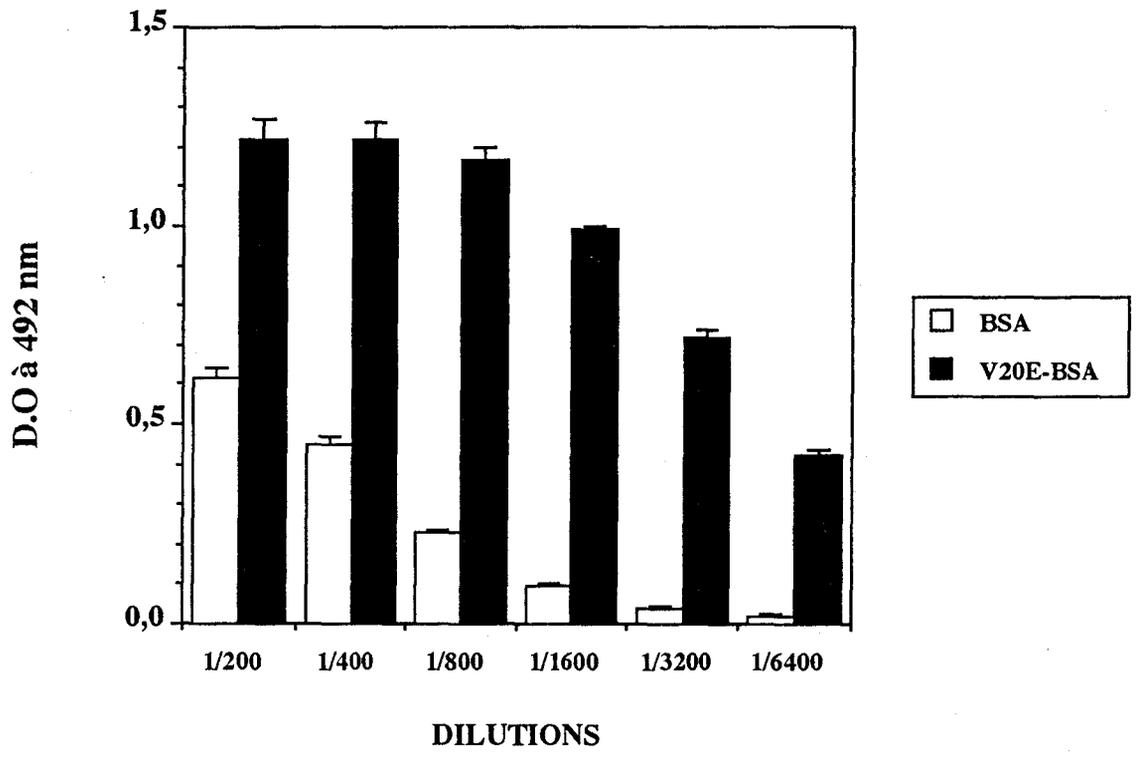
Un test ELISA réalisé en utilisant le peptide synthétique V20E couplé à la BSA ou la BSA seule comme antigènes, montre que le sérum contient des anticorps capables de reconnaître les deux (**Fig.II.25**). Mais l'intensité de la réponse contre le peptide couplé à la BSA est plus importante, avec un effet de dilution moins marqué, et elle reste significative jusqu'à la dilution au 1/6400<sup>e</sup> du sérum. Par contre, la réponse est négligeable vis à vis de la BSA à partir de la dilution au 1/1600<sup>e</sup>.

La préparation d'une colonne de Sépharose CL 4B sur laquelle la BSA a été greffée a permis d'éliminer en partie les anticorps dirigés contre cette protéine présents dans le sérum. Le test ELISA montre que la réponse vis à vis de la BSA devient alors négligeable à partir de la dilution au 1/400<sup>e</sup>, alors que la réponse vis à vis du peptide couplé à la BSA reste équivalente à celle observée lors du test ELISA précédent (**Fig.II.26**).

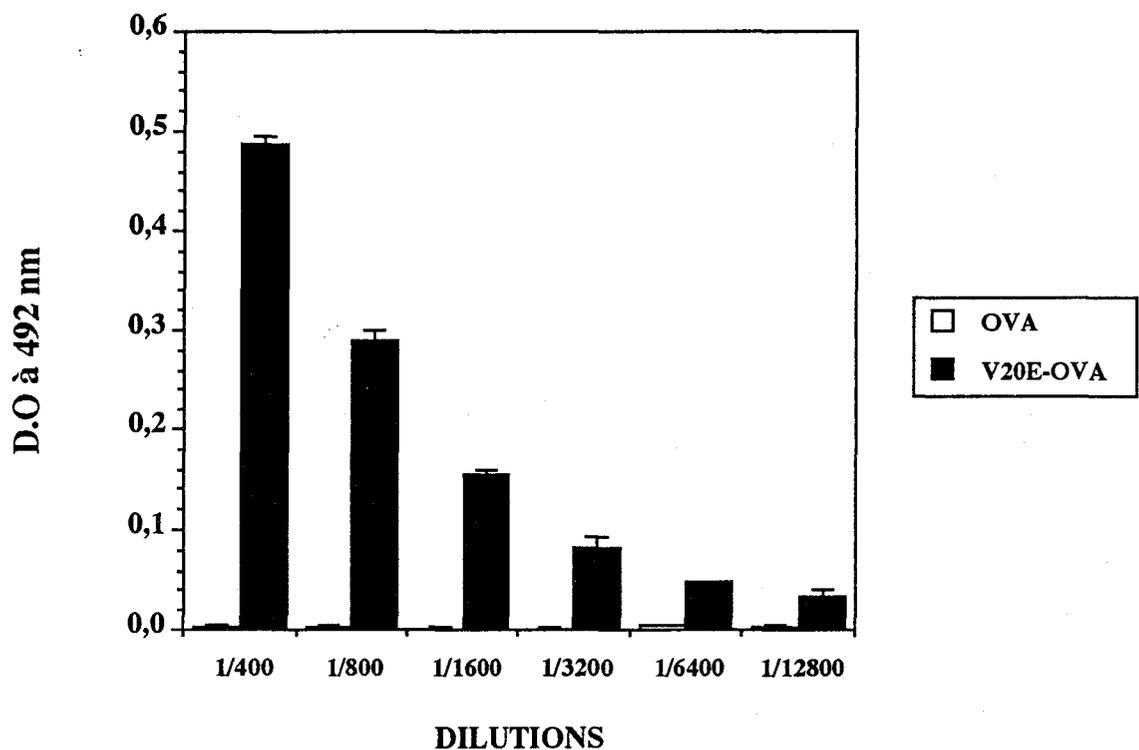
Pour confirmer la présence d'anticorps capable de reconnaître le peptide V20E, nous avons réalisé un test ELISA avec ce peptide couplé à une autre protéine porteuse, l'ovalbumine. Le résultat montre que les anticorps sont capables de reconnaître seulement le peptide couplé à l'ovalbumine sans reconnaître la protéine porteuse (**Fig.II.27**). Le sérum du lapin avant immunisation a servi de témoin d'expériences et ne reconnaissait pas l'OVA et la BSA ainsi que le peptide V20E.

**Figure II.25:** Détection par ELISA d'anticorps dirigés contre le peptide synthétique couplé à la BSA (V20E-BSA) et la BSA. La plaque a été sensibilisée avec 0,1 $\mu$ g d'antigène par puits. La réactivité des anticorps du sérum de lapin immunisé avec V20E-BSA est exprimée par trois mesures de la D.O à 492nm pour chaque dilution du sérum.

**Figure II.26:** Détection par ELISA d'anticorps dirigés contre le peptide synthétique couplé à la BSA (V20E-BSA) et la BSA après épuisement du sérum sur une colonne Sépharose CL-4B auquel la BSA a été couplée. La plaque a été sensibilisée avec 0,1 $\mu$ g d'antigène par puits. La réactivité des anticorps du sérum de lapin immunisé avec V20E-BSA est exprimée par trois mesures de la D.O à 492 nm pour chaque dilution du sérum.



1  
6066



**Figure II.27:** Détection par ELISA d'anticorps dirigés contre le peptide synthétique couplé à l'Ovalbumine (OVA). La plaque a été sensibilisée avec 0,1 $\mu$ g d'antigène par puits. La réactivité des anticorps du sérum de lapin immunisé avec V20E-BSA est exprimée par trois mesures de la D.O à 492 nm pour chaque dilution du sérum.

### 2.1.3.2. Reconnaissance de la SOD de *P. falciparum*

Le sérum épuisé en anticorps dirigés contre la BSA a été utilisé pour tenter de reconnaître la SOD en Western Blot.

A partir de l'électrotransfert d'extrait brut de *P. falciparum*, le sérum reconnaît une protéine qui migre au même niveau que la sous-unité de la SOD purifiée de *P. falciparum* (23 kDa) (**Fig.II.28 A**). Trois autres protéines sont également mises en évidence mais à des poids moléculaires très différents (approximativement 34, 55 et 60 kDa) de celui de la SOD du parasite.

Une expérience équivalente réalisée avec la fraction éluée à 30 et 40mM de NaCl en DEAE, contenant la SOD parasitaire, montre une seule bande à 23 kDa reconnue par les anticorps. (**Fig.II.28 B**).

A partir d'une isoélectrofocalisation, nous avons électroélué les bandes d'activité à pI 6,2 et 6,8. Après électrophorèse et transfert, le sérum reconnaît une seule bande à 23 kDa dans les deux éluats (**Fig.II.28 C et D**).

Aucune reconnaissance n'a été observée sur l'extrait de globule rouge humain (**Fig. II.29 C**). De même nous avons testé le sérum de lapin sur la SOD Cu/Zn d'hématie humaine, ainsi que sur les SOD-Fe et Mn d'*E. coli* transférées sur nitrocellulose. Le sérum ne reconnaît aucune de ces SOD (**Fig.II.29 B**).

**Figure II.28: A:** Reconnaissance de la SOD de *P. falciparum* par le sérum de lapin anti-V20E BSA. Le sérum de lapin est testé sur un Western Blot réalisé avec un extrait brut parasitaire à une dilution au 1/100<sup>e</sup> (piste 3) et au 1/200<sup>e</sup> (piste 5). Pistes 2 et 4: sérum du lapin avant immunisation, respectivement dilué au 1/100<sup>e</sup> et au 1/200<sup>e</sup>; piste 1: témoin conjugué. La flèche indique la SOD à 23 kDa.

**B:** Reconnaissance de la SOD en Western Blot réalisé avec les fractions éluées à 30 et 40 mM de NaCl en DEAE, par le sérum de lapin anti-V20E BSA.

Pistes 1 et 2: sérum de lapin avant immunisation respectivement dilué au 1/100<sup>e</sup> et au 1/200<sup>e</sup>.

Pistes 3 et 4: sérum de lapin anti-V20E BSA respectivement dilué au 1/100<sup>e</sup> et au 1/200<sup>e</sup>.

Piste 5: témoin conjugué.

**C-D:** Reconnaissance des isoenzymes à pl 6,2 (**C**) et 6,8 (**D**) de la SOD de *P. falciparum* par le sérum de lapin anti-V20E-BSA. Après une isoélectrofocalisation, les isoenzymes ont été électroéluées. Après un SDS-PAGE, elles ont été transférées sur nitrocellulose.

**C:** Piste 1: témoin conjugué

Pistes 2 et 3: sérum de lapin avant immunisation respectivement dilué au 1/100<sup>e</sup> et au 1/200<sup>e</sup>.

Pistes 4 et 5: sérum de lapin anti V20E-BSA respectivement dilué au 1/100<sup>e</sup> et au 1/200<sup>e</sup>.

**D:** Piste 1: sérum de lapin avant immunisation dilué au 1/100<sup>e</sup>

Piste 2: sérum de lapin anti-V20E-BSA dilué au 1/100<sup>e</sup>.

**Figure II.29: A:** Reconnaissance de la SOD de *P. falciparum* par le sérum de lapin anti-V20E BSA. Le sérum de lapin est testé sur un Western Blot réalisé avec un extrait brut parasitaire à une dilution au 1/100<sup>e</sup> (piste 3) et au 1/200<sup>e</sup> (piste 5). Pistes 2 et 4: sérum du lapin avant immunisation, respectivement dilué au 1/100<sup>e</sup> et au 1/200<sup>e</sup>; piste 1: témoin conjugué. La flèche indique la SOD à 23 kDa.

**B:** Western Blot réalisé sur la SOD-Fe de *E. coli* (pistes 1 et 2), sur la SOD-Mn de *E. coli* (pistes 3 et 4) et sur la SOD Cu/Zn d'hématie humaine (pistes 5 et 6).

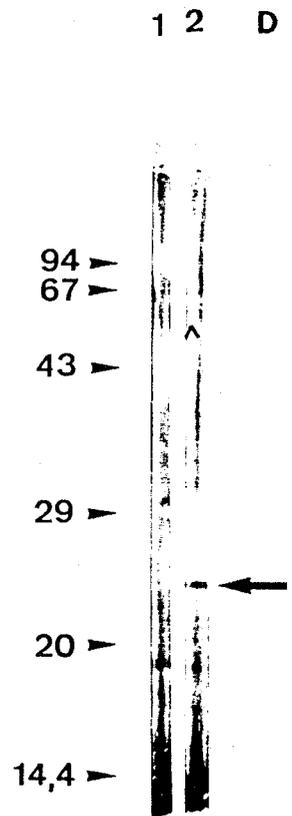
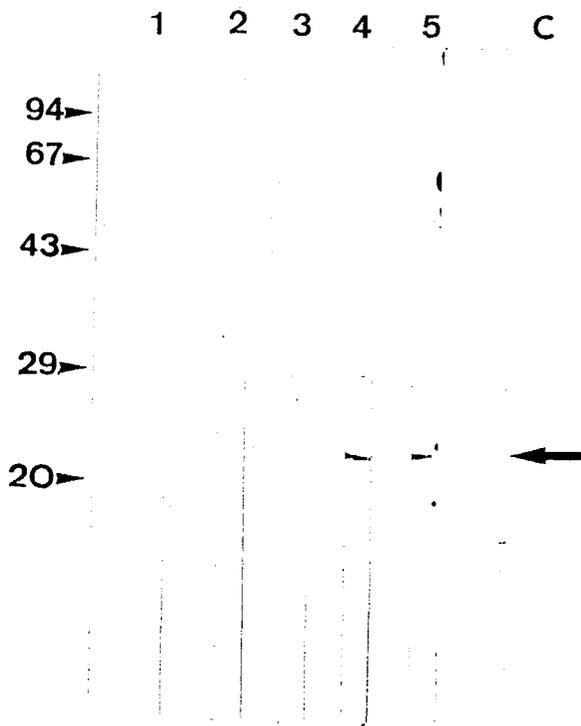
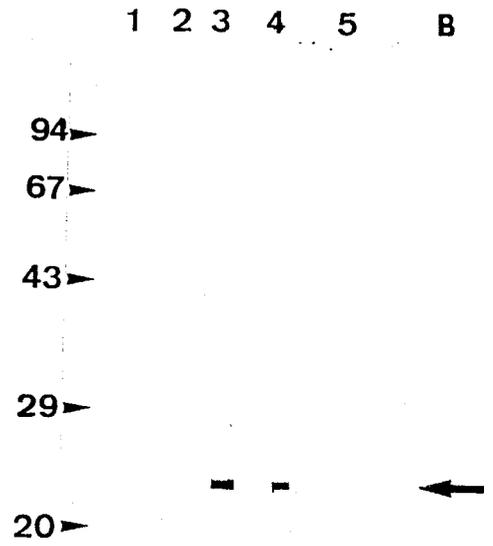
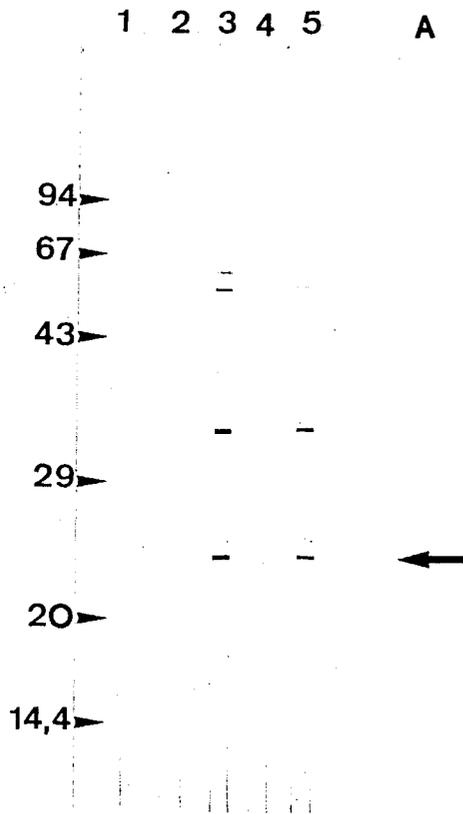
Pistes 1, 3 et 5: les SOD correspondantes colorées au rouge ponceau

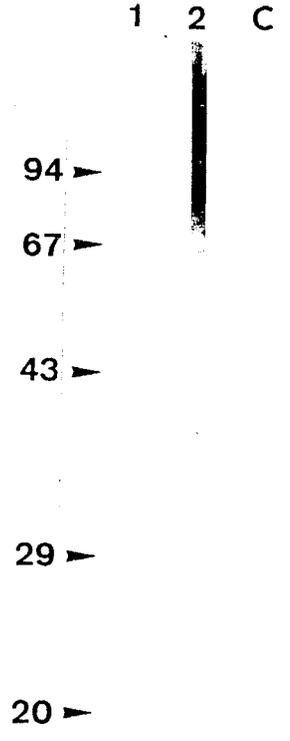
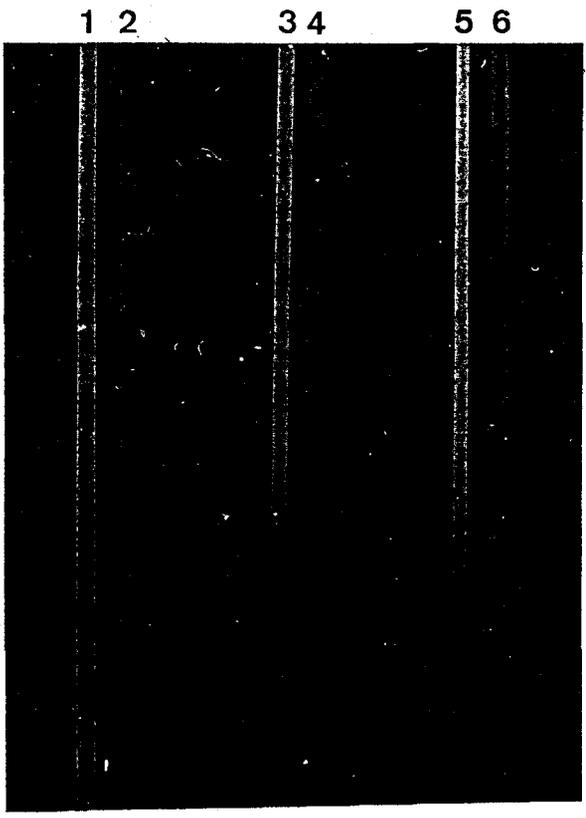
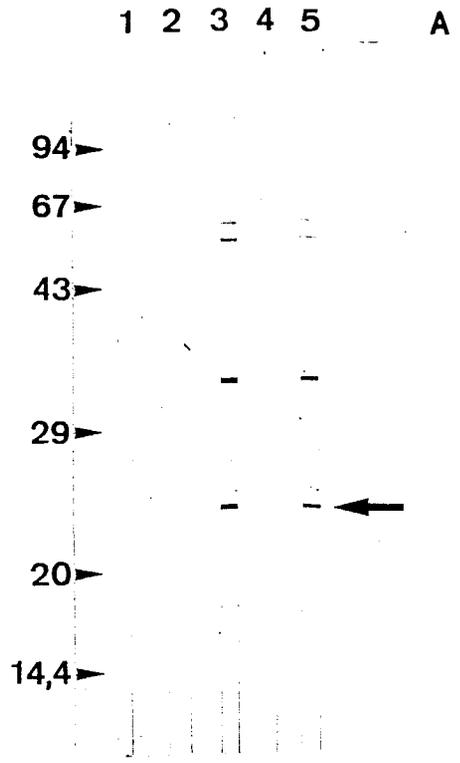
Pistes 2, 4 et 6: sérum de lapin anti V20E-BSA dilué au 1/50<sup>e</sup>.

**C:** Western Blot réalisé sur un extrait d'hématies humaines.

Piste 1: sérum de lapin avant immunisation dilué au 1/50<sup>e</sup>

Piste 2: sérum de lapin anti V20E-BSA dilué au 1/50<sup>e</sup>





## 2.1.4. Approche moléculaire

### 2.1.4.1. Amplification d'un fragment d'ADN génomique par PCR (Article 4 Fig 5)

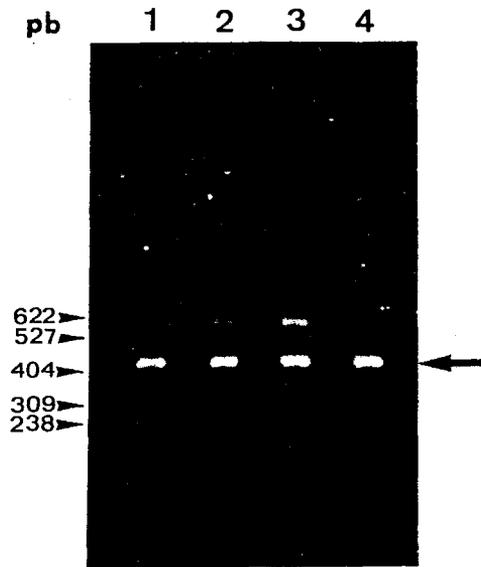
Pour tenter d'amplifier un fragment de gène de SOD de *P. falciparum* à partir d'ADN génomique, nous avons sélectionné deux séquences très conservées dans l'ensemble des SOD-Fe ou Mn (Fig.I.8, p.34). La fréquence d'apparition des codons chez *Plasmodium falciparum* a été prise en compte pour la synthèse nucléotidique des deux amorces et un site de restriction a été introduit du côté 5'. (voir Matériels et Méthodes, p 176).

Pour une concentration d'amorce constante (1 $\mu$ M) mais différentes concentrations d'ADN, nous avons obtenus des résultats différents (Fig.II.30). Avec 0,25 $\mu$ g et 1 $\mu$ g d'ADN, nous avons amplifié un seul fragment d'environ 430 paires de bases (pb) (pistes 1 et 4). Avec 0,5 $\mu$ g et 0,75 $\mu$ g d'ADN, un deuxième fragment moins intense, d'environ 540 pb, a été amplifié en même temps que le premier (pistes 2 et 3).

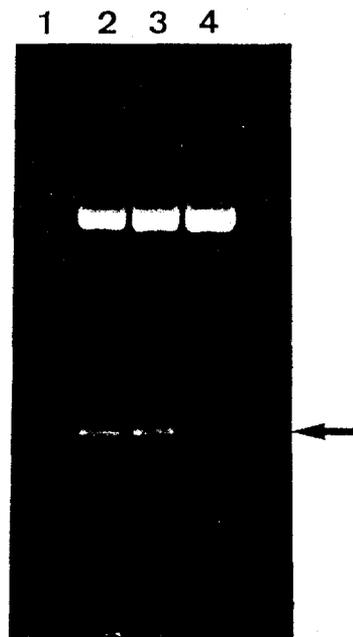
Si aucun intron n'était situé entre les séquences sélectionnées pour la PCR, le fragment amplifié devait théoriquement mesurer environ 430 pb, ce qui correspond au fragment observé constamment en PCR.

### 2.1.4.2. Clonage du fragment amplifié

Le plasmide de deux colonies (clones 6 et 9) sur une vingtaine analysées a montré une différence de migration par rapport au plasmide des autres colonies blanches et à la colonie bleue utilisée comme témoin. Pour vérifier si le plasmide des clones 6 et 9 porte l'insert, nous avons effectué une double digestion du plasmide par Sac I et BamH I (Fig.II.31). Le résultat de cette digestion montre que le plasmide de ces deux clones porte le fragment amplifié par PCR. La différence avec le fragment non inséré est d'environ 30 nucléotides car les sites de Sac I et BamH I sont situés sur le plasmide pCR Script SK (+) à environ 15 nucléotides de part et d'autre du site d'insertion Srf I.



**Figure II.30:** Amplification par PCR d'un fragment d'ADN génomique de *P. falciparum*. La réaction a été effectuée soit avec 0,25 $\mu$ g d'ADN (piste 1); soit 0,5 $\mu$ g (piste 2); soit 0,75 $\mu$ g (piste 3); ou encore 1 $\mu$ g (piste 4). Le fragment amplifié est comparé aux marqueurs de poids moléculaires, exprimés en paires de bases (pb), dérivés de la digestion du plasmide pBr 322 par Msp I.



**Figure II.31:** Digestion du plasmide portant le fragment amplifié à partir de l'ADN génomique de *P. falciparum*, par Sac I et BamH I. Piste 1: fragment amplifié après digestion par les deux enzymes; pistes 2 et 3: clone 6 et clone 9 après la digestion; piste 4: le plasmide ne portant pas d'insert ayant été soumis à la digestion.

#### 2.1.4.3. Séquençage du fragment cloné

Les travaux de séquençage n'ont porté que sur l'insert cloné dans le plasmide du clone 9.

A partir de culture en milieu liquide, le plasmide portant l'insert extrait du clone 9 a été dénaturé puis purifié, avant d'être soumis à une réaction de séquençage.

Comme pour les autres gènes étudiés chez *P. falciparum*, la séquence nucléotidique obtenue est très riche en adénine et en thymine, avec une proportion de 69% (**Fig.II.32, Article 4 Fig 6**). La longueur du fragment amplifié par PCR, en déduisant la séquence des amorces, est de 387 bases. La séquence déduite en acides aminés montre des régions très conservées dans toutes les SOD-Fe ou Mn (**Fig.II.33, Article 4 Fig 7**) et confirme que le fragment amplifié par PCR correspond à un morceau du gène de la SOD de *P. falciparum*. Cette portion du gène ne semble donc pas contenir d'intron.

#### 2.1.4.4. Analyse comparative de la séquence peptidique obtenue

La séquence protéique déduite du fragment du gène de la SOD de *P. falciparum* a été comparée aux séquences répertoriées dans la banque de données, en utilisant le serveur "BLITZ". Les 38 premières séquences sélectionnées correspondent à des SOD-Fe ou Mn, avec un maximum de recouvrement d'acides aminés d'environ 56,2% avec la SOD-Fe d'*E. coli* (**Tableau II.5**).

Notre séquence partielle a été comparée à 31 séquences de SOD-Fe et Mn connues, en utilisant le programme "DARWIN". Cette analyse classe la séquence partielle de la SOD de *P. falciparum*, parmi les SOD-Fe, entre celle de *Synechococcus* sp. et d'une plante, *Glycine max* (**Fig.II.34, Article 4 Fig 8**).

#### 2.1.4.5. Hybridation avec l'ADN génomique

Cette réaction d'hybridation a été réalisée dans le but de contrôler si le fragment du gène de la SOD hybridait avec l'ADN génomique de *P. falciparum*, digéré par une enzyme de restriction (**Fig.II.35**).

Deux bandes ont été révélées avec l'ADN digéré par Pst I (**piste 1**), dont la plus haute est située au niveau de l'ADN mal digéré. L'autre bande a un poids moléculaire d'environ 14 kb. Par contre le signal obtenu avec l'ADN digéré par EcoR I est situé au niveau du témoin de 21 kb (**piste 2**).

AAA CAT CAT GCA GGA TAC GTA AAT AAA TTA AAT ACC TTA ATT AAG  
 K H H A G Y V N K L N T L I K

GAC ACA CCA TTT GCT GAA AAA TCT TTA TTA GAT ATA GTA AAA GAA  
 D T P F A E K S L L D I V K E

TCA TCA GGA GCT ATT TTT AAC AAC GCT GCT CAA ATA TGG AAC CAT  
 S S G A I F N N A A Q I W N H

ACT TTT TAC TGG GAT TCT ATG GGA CCT GAT TGT GGT GGT GAG CCT  
 T F Y W D S M G P D C G G E P

CAT GGA GAA ATT AAG GAA AAA ATT CAA GAA GAT TTT GGA TCT TTT  
 H G E I K E K I Q E D F G S F

AAC AAT TTC AAA GAA CAA TTT TCC AAT ATA TTA TGT GGT CAT TTT  
 N N F K E Q F S N I L C G H F

GGT TCC GGT TGG GGA TGG TTA GCT TTA AAT AAT AAT AAC AAA TTA  
 G S G W G W L A L N N N N K L

GTT ATA TTA CAA ACA CAT GAT GCT GGT AAT CCA ATT AAG GAT AAT  
 V I L Q T H D A G N P I K D N

ACA GGT ATT CCA ATA TTA ACA TGT GAT ATA TGG GAA CAT GCA TAT  
 T G I P I L T C D I W E H A Y

TAT  
 Y

**Figure II.32:** Séquence nucléotidique du fragment amplifié à partir de l'ADN génomique de *P. falciparum*. Les parties soulignées indiquent la séquence correspondante aux deux amorces utilisées pour la PCR. La séquence déduite en acides aminés est indiquée en dessous.

**Figure II.33:** Alignement de la séquence partielle de la SOD de *P. falciparum* avec celle des SOD-Mn ou Fe connues. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR2 et EMBL sont indiquées entre parenthèses. La séquence N-terminale de la SOD-Mn de *Homo sapiens* et *Mus musculus* a été volontairement montrée incomplète et le 1er acide aminé correspond en réalité au 24ème dans la séquence complète.

**SOD-Mn:** **B.c.**, *Bacillus caldotenax* (S22053); **B.s.**, *Bacillus stearothermophilus* (S27522); **M.s.**, *Methylomonas sp.* (A38461); **E.c.(Mn)**, *Escherichia coli* (A24141); **S.m.**, *Streptococcus mutans* (A42710); **H.s.**, *Homo sapiens* (S13162); **M.m.**, *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); **S.c.**, *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST).

**SOD-Fe:** **P.f.**, la 1ère séquence correspond à la séquence N-terminale de la SOD purifiée de *Plasmodium falciparum*; **P.f.**, la 2ème séquence correspond à la séquence en acides aminés déduite du fragment du gène de la SOD de *P. falciparum*, **S.s.**, *Synechococcus sp.* (S04423); **C.b.**, *Coxiella burnetii* (A44791); **L.p.**, *Legionella pneumophila* (JS0749); **P.l.**, *Photobacterium leiognathi* (A26707); **E.c.(Fe)**, *Escherichia coli* (A29940); **P.o.**, *Pseudomonas ovalis* (SODF\_PSEOV); **E.h.**, *Entamoeba histolytica* (A45552); **T.p.**, *Tetrahymena pyriformis* (SGC5) (A39223).

**SOD hybrides:** **P.g.**, *Porphyromonas gingivalis* (S12882); **B.f.**, *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD).

Les résidus conservés entre les SOD-Mn et Fe sont indiqués par une étoile. Les résidus caractéristiques pour les SOD-Mn sont encadrés en clair, pour les SOD-Fe en gris foncé et pour les SOD hybrides en gris clair. Les résidus soulignés correspondent aux acides aminés déduits de la séquence des amorces de PCR.

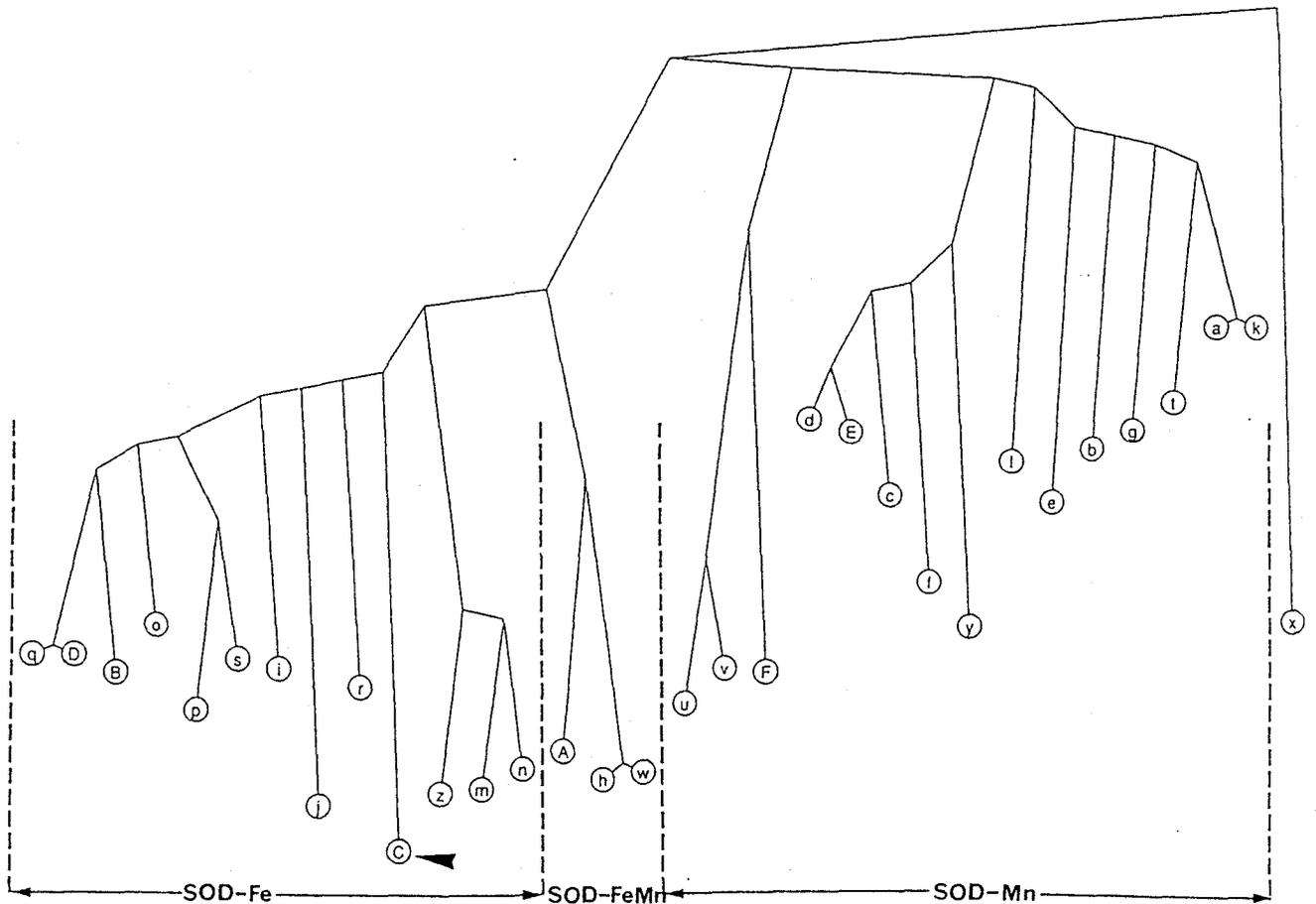
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90  
B.c.: PFELPALPYPYDALEPHIDKKTMMNIIHHTKHHNTYVTNLNAAALEGHPPDLQNKSLLEELLNLEALPESIRTA--VRNNGGGGHANHSGLFW  
B.s.: PFELPALPYPYDALEPHIDKKTMMNIIHHTKHHNTYVTNLNAAALEGHPPDLQNKSLLEELLNLEALPESIRTA--VRNNGGGGHANHSGLFW  
M.s.: AYTLPLLDYAYDALEPHIDAQQTMMNIIHHTKHHQTYINNVAALLEG--TSFANLEPVEALLQKLDLDPENLRG--VRNNGGGGHANHSGLFW  
E.c.: SYTLPLLDYAYDALEPHIDKKTMMNIIHHTKHHQTYINNVAALLEG--TSFANLEPVEALLQKLDLDPADKKT--VRNNGGGGHANHSGLFW  
S.m.: AILLPLLDYAYDALEPHIDAQQTMMNIIHHTKHHQTYINNVAALLEG--TSFANLEPVEALLQKLDLDPADIRQ--LINNGGGHLLHAAALFW  
H.s.: KHSLPLLDYAYDALEPHINAQIMQQLHHHSKHHAAAYVNNLNVTTEEKY--QEALAK--GDVTAQIALQPA--LKFNNGGGHINHSGLFW  
M.m.: KHSLPLLDYAYDALEPHINAQIMQQLHHHSKHHAAAYVNNLNVTTEEKY--HEALAK--GDVTTQVALQPA--LKFNNGGGHINHSGLFW  
S.c.: KVTLPDLKWDGFALEPYISGQINELHHYTRHHQTYVNGFNTAVDQFQE--LSDLLAK--EPSPANARKMIAIQQN--IKFRGGGFFTHCALFW

P.f.: VITLPLKLYALNALSPHISEETLNHFFHYK  
P.f.: KHHAGYVNNKLNLTLIKDT\_P\_FAEKSLLDI--VK--ESSGAIFFNNAAGIINHTTFYFW  
S.s.: SYELPALPPDYATALAPYITKETLEFHHDKHHAAAYVNNYNNNAVKD--DLDGQPIEAV--IKAIAGDASKAGLFFNNAAGIINHTTFYFW  
C.b.: AFELPDLPYKLNALAPHISQETLEFHHGKHHRAYVNNKLNKLIIEGTP--FBEKPLEEII--IR--KSDGGIIFNNAAGIINHTTFYFW  
L.p.: TFTLPQLPYALDALAPHVSKETLEFHHYHGKHHNTYVNNLNKLIIEGTP--EFESMTLEEII--IM--KAKGGIIFNNAAGIINHTTFYFW  
P.l.: AFELPALPPAMNALAPHISQETLEFHHYHGKHHNTYVNNLNKLIIEGTP--ELAEEKSLEEII--IK--TSTGGVIFNNAAGIINHTTFYFW  
E.c.: SFELPALPPAKDALAPHISAETLEFHHYHGKHHQTYVNNLNKLIIEGTP--AFEGKSLLEEII--IR--SSEGGVIFNNAAGIINHTTFYFW  
P.o.: AFELPPLPYAHDALOPHISKETLEFHHDKHHNTYVNNLNKLIIEGTP--EFEGKTLLEEII--VK--SSSGGIIFNNAAGIINHTTFYFW  
E.h.: SFQLPQLPYAYNALEPHISKETLEFHHDKHHATYVNNLNKLIIEGTP--EQEHTTLLEEII--IK--QKPTQAIFFNNAAGIINHTTFYFW  
P.g.: THELISLPHYAVYALAPVISKETVEFHHGKHLLKTYVDNLNKLIIEGTP--EFENADLN--TIVQKS\_EGGIIFNNAAGIINHTTFYFW  
B.f.: TYEMPKLPHYANNALAPVISQETLEFHHYHGKHLQTYVNNLNKLIIEGTP--EYEGKTVE--AIVASAPDGAIFNNAAGIINHTTFYFW  
T.p.: LNYEYS DLEPVLSAHLLSFHHGKHHQAYVNNLNATYE--QIAAATKEN--DAHKIATLQSA--LRFNLCGGHVNHTTFYFW

100 110 120 130 140 150 160 170 180  
B.c.: TILSP--NGGGE\_P--TGELAEAINKKFGSFTAFKDEFSSKAAAGRFGSGWAWLVVN--N--GELEITSTPNQDSDPIM--EGKT--PILLD VW  
B.s.: TILSP--NGGGE\_P--TGELADAIINKKFGSFTAFKDEFSSKAAAGRFGSGWAWLVVN--N--GELEITSTPNQDSDPIM--EGKT--PILLD VW  
M.s.: KVLTP--NGGGE\_P--KGALADAIKSDIGGLDTFKAEFTKAAALTRFGSGWAWLSVT--PE--KKLVVESTGNQDSDPLS--TGNT--PILLD VW  
E.c.: KGL--KKGTT\_L--QGDLKAAIERDFGSDVDFKAEFEKAAASRFSGSGWAWLVVK--GD--KLAVVSTANQDSDPLMGEAISGASGF--PIMLD VW  
S.m.: ELLSP--EK\_TK\_V--TAEVAAAINEAFGSDDFKAAFTAAATTRFGSGWAWLVVD--KE--GKLEVSTANQDSDPIT--SQGLKPIILLD VW  
H.s.: TNLSP--NGGGE\_P--KGELLEAIKRDGSGFDKFKKLTAAASVGVQSGSGWGLGFN--KERGHLQIAACPND--PLQGTGLIPLLID VW  
M.m.: TNLSP--KGGGE\_P--KGELLEAIKRDGSGFPEKFKKLTAAASVGVQSGSGWGLGFN--KEQGRLQVIAACSNQD--PLQGTGLIPLLID VW  
S.c.: ENLAPESQGGGEP--TGALAKAIRDQFGSLDDELIKLNTKSLAGVQSGSGWAFIVKNSNGGKLDVQTYNQD--VTGP--LVPLVIDA W  
P.f.: DSMGPD\_CGG\_E\_P--HGEIKKIKQEDFGSFFNFKEQFSNILCGHFGSGWGLALN--NNNKLVILOTHDAGNPIKDN--TGIPILCDIN  
S.s.: NSIKPN\_GGGA\_P--TGALADKIAADFGSPENFVTEFKQAAAATQFGSGWAWLVLD--N--GTLKIKITGNADTPI\_AH--GQTPLLID VW  
C.b.: HCHSPD\_GGG\_D\_P--SGELASAIKDTFGSLEKFKALFTDSANNHFGSGWAWLVKD--NNGKLEVLSTVNAARNPMT\_E--GKKPLMCD VW  
L.p.: HSMSPN\_GGG\_E\_P--KGRLEAIAIKSPGSAFAAFKQFSQTAATTFGSGWAWLVQD--QSGALKIINTSNAAGTPTMTE--GLNALLCD VW  
P.l.: TGEVAAAIEKAFGSAFAEFKAKFTDSAINNFSGSSTWLVKN--ANGSLAIVNTSNAAGCPIITER--GVTPLLVDL VW  
E.c.: NCLAPN\_AGG\_E\_P--TGKVAABIAASFGSFAADFKAQFTDAAIKNTFGSGWAWLVKN--SDGKLAIVSTSNAGTPLTTD--ATPLLVD VW  
P.o.: NCLSPD\_GGG\_Q\_P--TGALADAINAASFGSFDKFKKFTKTSVGTFGSGWAWLVK--ADGSLALCSTIGAGAPLTS--GDTPLLCD VW  
E.h.: KCMC\_GCGVK\_P--SEQLIAKLTAAAFGLLEEFKAKFTKSAVGHFGSGWCWLV\_E--HDGKLEIIDTRDAKVNPMNTN--GDKTPLLCD VW  
P.g.: TQF--RPGKGG\_A\_P--KGLLGEAIDKQFGSFEKFKKEEFDTAGTTLFGSGWVWLASD--ANGKLSIEKEPNAGNPVRK--GLNPLLFD VW  
B.f.: LQFAPKPAK\_NE\_P--AGKLGEAIKRDGSGPENFKKEFNAAASVGLFGSGWAWLSVD--KDGKLIHITKEPNNGSNPVRA--GLKPLLFD VW  
T.p.: DNLA PVKSGGGVLPDEHSP LTKAIKEKWSYENFITL FNTRTAAIQSGSGWGLGYDTVSKS\_LRLFELGNQDMPPEWS--SIVPLLID VW

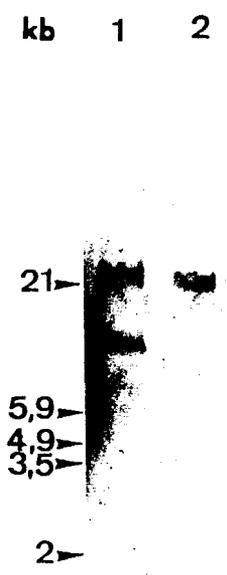
Ordre	% Homologies	Longueur	Identification
1	56,2	192	SOD-Fe <i>Escherichia coli</i>
2	56	193	SOD-Fe <i>Photobacterium leiognathi</i>
3	55,8	192	SOD-Fe <i>Legionella pneumophila</i>
4	54,9	193	SOD-Fe <i>Coxiella burnetii</i>
5	52,6	195	SOD-Fe <i>Pseudomonas ovalis</i>
6	42	201	SOD-Fe <i>Synechococcus</i> sp.
7	39,6	191	SOD-Fe/Mn <i>Porphyromonas gingivalis</i>
8	39,4	202	SOD-Fe <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (chl)
9	37,7	226	SOD-Fe <i>Arabidopsis thaliana</i> (chl)
10	34,9	202	SOD-Mn <i>Listeria monocytogenes</i>
11	34,8	202	SOD-Mn <i>Listeria ivanovii</i>
12	34,3	222	SOD-Mn Souris (mit)
13	34,2	203	SOD-Mn <i>Bacillus caldotenax</i>
14	34,1	203	SOD-Mn <i>Bacillus stearothermophilus</i>
15	34,0	222	SOD-Mn Rat (mit)
16	34,0	222	SOD-Mn Homme (mit)
17	32,6	202	SOD-Fe/Mn <i>Methylomonas</i> sp.
18	31,2	248	SOD-Fe <i>Glycine maxima</i> (chl)
19	28,4	203	SOD-Mn <i>Thermus thermophilus</i>
20	27,3	221	SOD-Mn <i>Caenorhabditis elegans</i> (mit)
35	21,6	196	SOD-Fe <i>Tetrahymena pyriformis</i>

**Tableau II.5:** Résultat en % de l'analyse comparative, en utilisant le serveur BLITZ, de la séquence N-terminale, associée à la séquence protéique déduite du fragment du gène de la SOD de *P. falciparum* avec les séquences répertoriées dans la banque de données. Les 35 premières séquences sélectionnées correspondent à des SOD-Fe ou Mn, avec un maximum de recouvrement (56,2%) avec la SOD-Fe d'*Escherichia coli*. chl = chloroplaste et mit = mitochondrie.



**Figure II.34:** Analyse comparative par le système DARWIN de la séquence partielle de la SOD de *P. falciparum* avec celle de 31 SOD-Mn ou Fe connues. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR2 et EMBL sont indiquées entre parenthèses.

q, *Pseudomonas* sp. (s00157); D, *Pseudomonas ovalis* (SODF\_PSEQV); B, *Bordetella pertussis* (BPESODB); o, *Legionella pneumophila* (JS0749); p, *Photobacterium leiognathi* (A26707); s, *Escherichia coli* (A29940); i, *Coxiella burnetii* (A44791); j, *Entamoeba histolytica* (A45552); r, *Synechococcus* sp. (SO4423); C, *Plasmodium falciparum*; z, *Glycine max* (SOYFESOD); m, *Arabidopsis thaliana* (B39267); n, *Nicotiana plumbaginifolia* (A39267); A, *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD); h, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC53977) (A43585); w, *Porphyromonas gingivalis* (S12882); u, *Mycobacterium leprae* (A37212); v, *Mycobacterium tuberculosis* (S15205); F, *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST); d, *Homo sapiens* (S13162); E, *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); c, *Branchiostoma floridae* (S23658); f, *Caenorhabditis elegans* (JS0750); y, *Palinurus vulgaris* (PVSODMNP); l, *Streptococcus mutans* (A42710); e, *Thermus aquaticus* (S07147); b, *Escherichia coli* (A24141); g, *Methylobionas* sp. (A42710); t, *Listeria monocytogenes* (JC1272); a, *Bacillus caldolenax* (S22053); k, *Bacillus stearothermophilus* (S27522); x, *Tetrahymena pyriformis* (SGC5) (A39223).



**Figure II.35:** Hybridation du fragment amplifié avec l'ADN génomique de *P. falciparum*.  
L'ADN (15 $\mu$ g) a été digéré par une enzyme de restriction:  
piste 1: Pst I  
piste 2: EcoR I



## 2.1.5. Article 4

**Characterization of Iron-Dependent Endogenous Superoxide Dismutase  
of *Plasmodium falciparum***

**Philippe Bécuwe \*, Marie-Noëlle Fourmaux \*, Jozef Van Beeumen \*\*, Bart Samyn\*\*,  
Christian Slomianny \*, Jean Pierre Touzel \*\*\*, Daniel Camus \* and Daniel Dive \*<sup>1</sup>**

\* INSERM U42, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex France.

\*\* Department of Biochemistry, Physiology and Microbiology, Ledeganckstraat 35, 9000 Gent

\*\*\* INRA, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex

<sup>1</sup> Correspondence to : Daniel Dive

INSERM U42, Domaine du CERTIA, 369 rue Jules Guesde, B. P. 39, 59651 Villeneuve  
d'Ascq cedex, France.

Tel : (33) 20 47 23 97 ext 15

Fax : (33) 20 05 91 72

## SUMMARY

Two main SOD activities at isoelectric points (pI) 6.2 and 6.8 and two minor at pI 5.6 and 6.4 were found in crude extracts of *Plasmodium falciparum*. These activities were cyanide-resistant and hydrogen peroxide-sensitive and represented 20-30% of the total SOD activity found in the crude extract. The SOD was purified and submitted to N-terminal sequencing for 29 residues. A fragment of 423 bp, amplified from genomic DNA from *P. falciparum*, was cloned and sequenced. The deduced amino acids sequence identified this fragment as a coding region of a SOD gene. The N-terminal sequence of the purified protein and the amino acid sequence deduced from the fragment of the SOD gene were compared with 31 known Fe or MnSODs by the "DARWIN" system. This analysis showed that both sequences were related to FeSODs. It can be concluded that the endogenous SOD of *P. falciparum* may be iron-dependent, and not manganese-dependent as previously described.

## INTRODUCTION

Many experiments have shown that malaria parasites are affected by oxidant stress both during the intraerythrocytic (1,2), the hepatic (3) and the gametocyte (4) stages of the parasite cycle. During the malaria infection, reactive oxygen species produced by activated phagocytes (5, 6, 7, 8, 9) but also in parasitized erythrocytes (10, 11) can cause various cellular damages leading to irreversible injury. *In vitro*, *P. falciparum* fails to grow under normal oxygen tensions (12) and must be cultured in presence of 3-5 % oxygen.

Various organisms are equipped with several enzymatic and non-enzymatic systems which protect them against oxidative stress. Among the enzymes, the superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) protects the organism against the toxic effects of the superoxide anion by catalysing its dismutation to molecular oxygen and hydrogen peroxide. Three types of this metalloenzyme can be distinguished, according to their cofactor in living organisms. Cu/ZnSODs are very sensitive to cyanide and slightly sensitive to hydrogen peroxide; MnSODs are resistant to both cyanide and hydrogen peroxide, and FeSODs are cyanide resistant but very sensitive to hydrogen peroxide (13). Most eukaryotes synthesize a Cu/Zn cytosolic SOD and a mitochondrial MnSOD, with exceptions known for some plants which have a chloroplastic FeSOD (14) and for many protozoa which have a FeSOD (15, 16, 17, 18, 19). Most procaryotes synthesize an SOD with either Fe or Mn as cofactor metal, but some bacteria produce a Cu/ZnSOD (20, 21). FeSOD and MnSOD have a high degree of homology in their primary structure and they appear to be unrelated to the Cu/ZnSODs (22). However several residues at different positions are specific in Fe-SOD sequence and make it distinguishable from MnSOD (22, 23).

In *Plasmodium falciparum*, the presence of a Mn-dependent endogenous SOD has been reported (24, 25). Moreover the parasite internalizes the content of its host red blood cell (RBC) and is therefore considered as adopting its Cu/ZnSOD (24, 26). The presence of a FeSOD shown in many other Protozoa, including Sporozoa (27, 17, 28) and recently in three murine malaria species (19) lead us to reinvestigate the presence of an endogenous FeSOD in *P. falciparum* by biochemical and molecular biology approaches.

In the present work, we have more thoroughly investigated the presence of an endogenous SOD for *P. falciparum* using both a biochemical and a molecular biology approach in order to know the family to which it can belong.

## MATERIALS AND METHODS

### *Reagents*

SOD from *E. coli*, Nitro blue tetrazolium (NBT), Sephadex G75 superfine and the reagents for SOD assays were obtained from Sigma (St Louis, Mo, USA). The reagents for protein determinations were obtained from Bio-Rad (Richmond, Ca, USA). The isoelectrofocusing (IEF) gels with pH range 3-10 and of 0.3 mm thickness were purchased from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany). DEAE Trisacryl M was obtained from IBF Sepracor (France). The reagent kit Amplitaq DNA polymerase for Polymerization Chain Reaction (PCR) was purchased from Perkin Elmer Cetus and the kit for cloning in PCR Script SK(+) plasmid from Stratagene. The Sequenase version 2.0 kit for the DNA sequencing was obtained from United States Biochemical (USB, Cleveland, USA).

### *Preparation of Plasmodium falciparum homogenates*

Strain FCR3 of *P. falciparum* was cultured according to Trager and Jensen (29). Mass cultures were routinely carried out in Doubletray™ culture vessels (Nunc).

The extraction of parasites and preparation of homogenates were performed as described previously (19), but the parasite lysate was dialysed at 4°C against 10mM Tris/HCl pH 7.8, and then concentrated.

### *Protein determination*

Protein contents were measured using the method of Bradford (30) with serum albumin as standard. The hemoglobin content of the lysates was determined using Drabkin's reagent (31).

### *Enzyme assays*

SOD activity was measured by determination of the rate of reduction of cytochrome c in presence of the xanthine-xanthine oxydase system according to McCord and Fridovich (32) with bovine erythrocyte SOD as standard. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme needed to inhibit the reduction of the cytochrome c by 50%. To estimate the part of the endogenous SOD activity from *P. falciparum*, the enzyme assays were carried out on 1 unit of total enzymatic activity in the presence of 1mM KCN or 2mM hydrogen

peroxide as described previously (18). During the purification of the SOD of *P. falciparum*, we used the method of Marklund (33) to analyse SOD activity in the fractions.

### *Isoelectrofocusing*

Isoelectrofocusing (IEF) was performed using the LKB 2117 Multiphor System, according to the instructions of the manufacturer. The gels were stained for SOD specific activity by incubation in nitro blue tetrazolium as described by Beauchamp and Fridovich (34). To assess the effects of inhibitors, the staining for SOD activity was also carried out in the presence of 2mM potassium cyanide or 2mM hydrogen peroxide. Control human red blood cell (RBC) extract was prepared by hemoglobin precipitation according to Winterbourn *et al.* (35).

### *SOD purification*

A Sephadex G-75 column (2.5 x 90 cm) was equilibrated at 4°C with 10mM Tris/HCl pH 7.8, and calibrated with the molecular weight (MW) markers serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), and cytochrome c (12.4 kDa) (Sigma, St Louis, Mo., USA). The crude extract of *P. falciparum* was applied to Sephadex G-75 and eluted with equilibration buffer (flow rate 12 ml/h). Absorbance was monitored at 280 nm and SOD activity of each fraction was assayed in the presence or in the absence of 1 mM KCN. The fractions exhibiting a KCN-resistant SOD activity were pooled and concentrated at 4°C. The MW of the native *P. falciparum* SOD was estimated from the linear calibration curve  $V_e/V_o = f(\log MW)$  in which  $V_e$  is the elution volume of the molecule and  $V_o$  the exclusion volume determined with Blue dextran 2000.

The concentrated fractions from gel filtration were applied to a DEAE Trisacryl M column (1.5 x 8 cm) equilibrated at 4°C with 10mM Tris/HCl pH 7.8. Proteins were eluted with a linear gradient of sodium chloride (0-250 mM, flow rate: 18 ml/h). Absorbance was monitored at 280 nm and the fractions containing SOD activity were pooled and concentrated.

The concentrated fractions from DEAE Trisacryl M were submitted to non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% acrylamide). SOD activity was detected in the gel with the Nitro-blue tetrazolium reagent. The bands corresponding to a SOD activity resistant to 2 mM KCN were excised and the protein electroeluted in 0.12M Tris / 0.04M glycine pH 9.2, for 4 h at 3W. The concentrated sample was analysed on a 12 % SDS-polyacrylamide

gel according to Laemmli (36) and the purified SOD was visualized after silver staining according to Merrill (37).

#### *Determination of amino terminal sequence of SOD from P. falciparum*

The purified SOD from *P. falciparum* was submitted to 15 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in Tris-glycine buffer and then electroblotted overnight onto PVDF membrane (Applied Biosystem) in Tris 50 mM/ borate 50 mM pH 8.5. Sequence analysis of the Coomassie stained protein band was performed on a 476 A sequenator with on-line HPLC analysis of the phenyl thiohydantoin amino acids (Applied Biosystem, Foster City, USA).

#### *Preparation of P. falciparum genomic DNA*

Parasites were treated at 50°C with proteinase K (0.4 mg/ml) in 7.5 mM Tris buffer, pH 8, 7.5 mM EDTA, 1% SDS) overnight, and the DNA was then prepared by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation.

#### *Polymerisation Chain Reaction (PCR)*

Two oligonucleotide primers AM1 (5'-GAA TTC CAT CAT GAT AAA CAT C-3') and AM2 (5'-ATC GAT ATA ATA TGC ATG TTC CC-3') were provided by Oligonucleotide Department of Institut Pasteur (Paris, France). The sequences of the primers were deduced from two regions found to be highly conserved in the amino acid sequences of Mn and FeSOD from several organisms (Fig 7). Primer AM1 was a 22-mer sense oligonucleotide deduced from the residues upstream the histidine at position 31. Primer AM2 was a 23-mer antisense oligonucleotide deduced from the residues downstream the tryptophan 188 of all analysed Mn and FeSODs. The nucleotide sequence of two primers was selected according to relative codon frequencies in *P. falciparum* (38). A restriction site was added to each Primer in order to use it eventually in cloning experiments (EcoR1 for AM1 and Cla1 for AM2).

The PCR was performed with a Geneamp kit (Cetus) using the manufacturer's buffers and the AM1 and AM2 oligonucleotides (1µM each). The genomic DNA was first denatured and then amplified for 30 cycles in an automated thermal cycler (Prem, Andover, Hampshire, UK). Each cycle consisted of 1.5 min of denaturation at 94°C, 1.5 min at the annealing temperature of 50°C, and 1.5 min of extension at 72°C. The final extension step continued for

an additional 5 min.

#### *Cloning and sequencing of amplified fragment from genomic DNA*

The amplified DNA fragment from *P. falciparum* was cloned with PCR-Script SK (+) cloning system (Stratagene) according to Bauer (39). Sequencing was carried out by the dideoxychain-termination method (40) using a Sequenase kit (USB).

#### *Analysis of amino terminal and deduced protein sequences*

The deduced protein sequence of *P. falciparum* was compared to 31 known Mn or FeSODs after alignment and a tree constructed, using DARWIN (Data Analysis and Retrieval With Indexed Nucleotide/Peptide Sequences) system according to Gonnet et al (41). To show alignment and homologies (fig 7), we selected 18 of the 31 SOD sequences.

## RESULTS

#### *Characterization of an endogenous SOD activity in P. falciparum extracts*

IEF of concentrated *P. falciparum* extracts and of different controls showed the presence of an endogenous SOD activity in parasites (Fig. 1). An activity detected at pI 4.9 both in human RBC and isolated parasite extracts (Fig. 1, lanes 1 and 4), was sensitive to 2mM cyanide (lanes 5 and 8) and less sensitive to 2mM hydrogen peroxide (lanes 9 and 12). Two main activities at pI 6.2 and 6.8 (lane 4) found in parasite extracts were cyanide-resistant (lane 8) and inactivated in presence of 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lane 12) as was an FeSOD control from *E. coli* (lanes 3, 7 and 11). By comparison, the MnSOD activity from *E. coli* was resistant to 2mM KCN and to 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lanes 2, 6 and 10). Two minor activities at pI 5.6 and 6.4 were also detected in parasite extract, and the band at pI 6.4 seemed to be more resistant to KCN and sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than that at pI 5.6 (lanes 4, 8 and 12).

The total SOD activity was estimated in two different extracts of purified parasites (11.98 ± 0.59 and 12.90 ± 0.34 Units/mg protein). The inhibition tests were done in the presence of KCN or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with aliquots of purified parasite extracts or human RBC extracts corresponding to one unit of total SOD activity. The results were expressed as a percentage of the inhibition of the total SOD activity (Fig. 2). The Cu/ZnSOD activity of human RBC

was very sensitive to KCN (85-95% inhibition), whereas the SOD activity of parasite extracts exhibited only 65% inhibition (Fig. 2A). In presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the Cu/ZnSOD activity of human RBC was slightly inhibited (less than 36%) whereas the SOD activity of parasite extracts was inhibited by 55-57% (Fig. 2B). These results suggest the presence in the extracts of a KCN-resistant and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive SOD activity, specific for the parasite and different of the host cell. Based on the results of the inhibition tests with KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the part of the parasite SOD activity can be estimated to be 20-30% of the total activity detected in extracts.

*Purification and amino-terminal sequencing of the endogenous SOD from P. falciparum*

A peak of cyanide-resistant SOD activity was eluted by gel filtration of a *P. falciparum* homogenate (Fig. 3A) at an estimated MW of 43 kDa, in comparison with the 36 kDa MW of the human RBC SOD (second peak). The fractions corresponding to the peak containing the parasite SOD were pooled and concentrated. The specific activity was increased approximately 6 fold, but 65% of the remaining SOD activity was cyanide-sensitive (Table I), probably corresponding to the part of the overlapping peak of human RBC Cu/ZnSOD.

With DEAE Trisacryl, three peaks of SOD activity were separated in the concentrated fractions from gel filtration. The two first peaks contained the cyanide-resistant parasitic enzyme rapidly eluted from the column at 30mM and 40mM of sodium chloride respectively (Fig. 3B) and the corresponding fractions were pooled. The specific activity was increased approximately 3 fold and only 10% of cyanide-sensitive SOD activity was detectable by enzyme assay (Table I).

The presence of the parasite SOD was monitored by isoelectrofocusing at each purification step (Fig. 4A).

After non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, the part of the gel corresponding to the cyanide-resistant SOD activity was excised. Electroelution was performed and eluted proteins were analysed on 12% SDS-PAGE (Fig.4B). Two bands of proteins (23 and 28 kDa) were detected after silver staining. The main band of protein (23 kDa) was submitted to N-terminal microsequence analysis with the following result: Val Ile Thr Leu Pro Lys Leu Lys Tyr Ala Leu Asn Ala Leu Ser Pro His Ile Ser Glu Glu Thr Leu Asn Phe His Tyr Asn Lys. The initial yield of Val-1 was 27 picomoles, the amount of the last detectable residue Lys-29 was 0.6 picomoles. The sample also contained a second polypeptide

chain which differed from the first one by the presence of an additional methionine residue preceding Val-1. The initial yield of this Met-1 residue was 18.6 picomoles.

#### *Amplification and sequencing of a genomic DNA fragment of P. falciparum*

The result of PCR (Fig. 5) showed only one amplified fragment at approximately 430 bp, which was the expected result if no intron occurred in the targeted gene portion. This fragment was sequenced and the protein sequence deduced (Fig. 6). The nucleotide sequence had a 69 % of AT and was different of the sequence of human MnSOD. In the deduced amino acids sequence, all conserved characteristic regions of SODs were found.

#### *Analysis of sequences obtained from N-terminus microsequencing of protein and from the fragment of parasite SOD gene.*

The encoded protein sequences, deduced from the DNA amplified fragment and from the N-terminal sequence of the purified protein, were compared to known Fe and MnSODs. For the assignment of the sequence to a Fe or a MnSOD, we have selected 18 known SODs for alignment (Fig. 7). Of the 29 first N-terminal amino acids, residues 7, 14, 16, 26, 29 are conserved in all SODs (we do not consider the polypeptide chain with the extra methionine at the N-terminal position). Furthermore, aliphatic amino acids residues Leu/Ile/Val-23 and aromatic residues Phe/Tyr-25 are characteristic of Fe and hybrid SODs (enzyme able to use Fe or Mn as cofactor), in place of respectively Met/Asn-23 and Leu/Ile-25 in MnSODs. The protein sequence deduced from the amplified genomic DNA confirms that the gene fragment studied corresponds to a FeSOD, by the presence of the characteristic regions 81-88 and 91-93 flanking the second ligand His-89 and of the characteristic residues 45 and 165.

The N-terminal amino acids sequence of purified SOD and the amino acids sequence deduced from the amplified genomic DNA of *P. falciparum* were analyzed separately by interrogation of Swiss-Prot databank by BLITZ server (42) according to the algorithm of Smith and Waterman (43). The 35 first sequences selected were Fe or Mn SODs. For the N-terminal sequence, a maximum match of 71% was observed with *Legionella pneumophila* FeSOD and the for the sequence deduced from the amplified genomic DNA, a maximum of 56.2 % match was observed with *E. coli* FeSOD.

The N-terminal sequence together with the sequence deduced from the amplified

genomic DNA was then compared with 31 known Fe or MnSODs by DARWIN system (Fig. 8). This analysis showed, and that the resulting sequence is related to FeSODs and quite different of MnSODs. The most related SODs seem to be those of *Synechococcus sp.* and *Entamoeba histolytica*.

## DISCUSSION

The present work consisted in the characterization of *P. falciparum* endogenous SOD through enzymatic activity, the determination of N-terminal amino acids sequence and sequencing of an enzyme gene fragment.

The inhibition tests performed suggested the presence of an iron dependent SOD since it was cyanide-resistant and hydrogen peroxide-sensitive. We estimated that the endogenous FeSOD of *P. falciparum* contributed 20-30% of the total specific activity, which was in accordance with the results obtained previously in murine malaria parasites (19).

The observation of a 23 kDa band in SDS-PAGE without DTT in contrast to the MW of 43 kDa observed in gel filtration suggests that this SOD is a dimeric molecule composed of two subunits not linked by disulfide bonds, as it is the case for all known Fe or MnSODs. Among eukaryotic organisms, only the FeSOD from *Tetrahymena pyriformis* is known to have a tetrameric form (16). Although several isoforms of SOD were detected in the crude extract of parasites by isoelectrofocusing, it was only possible to determine a single N-terminal sequence, an observation that would be related to the instability of the enzyme, as suggested for the isoforms of *Tetrahymena* SOD by Barra *et al* (16). During the purification of *P. falciparum* SOD, we observed a modification of the isoenzymes pattern, that could be in accordance with this hypothesis.

The N-terminal microsequencing of the purified protein as well as the sequencing of a fragment of the gene of *P. falciparum* SOD showed amino acids or sequence regions characteristic of FeSODs. These results were confirmed by the comparison of the parasite SOD with 31 known Fe and MnSODs by the "DARWIN" system. Such analysis done on the 29 N-terminal residues alone gave the same discrimination between the 29 Fe and MnSODs, and arranged the *P. falciparum* SOD unambiguously in FeSODs (results not shown).

It can be noted that if the hybrid SODs from *P. gingivalis* and *B. fragilis* were more apparented to FeSODs at the residues positions 23, 25, 45, 80, and 93, they had an intermediate sequence between Fe and MnSODs at the residues positions 84-85 and and

characteristics residues at positions 31 and 94. The FeSOD of *Tetrahymena pyriformis* seemed to be very similar to FeSODs on residues 23, 25 and 93, and similar to MnSODs for the residues positions 84-85 and 165, that can explain the position of this SOD on the tree. It must be noted that residue 93 in FeSODs of plant is a Phe as in MnSODs and not a Tyr.

In a previous report, an endogenous MnSOD activity, considered to be negligible on the basis of IEF results (24, 25) was found in *P. falciparum* (25). Moreover, the same authors showed that rodent malaria and *P. falciparum* could adopt the host SOD (24, 26, 45). The present results, based on inhibition tests, the N-terminus sequencing of the protein and sequencing of a gene fragment, are in favour of an endogenous FeSOD in *P. falciparum* as described for many protozoa (15, 16, 17, 18, 19, 27, 28). The activity of this endogenous enzyme which represents 20-30% of the total activity found in purified parasites, cannot be considered to be negligible. The remaining 70-80 % activity is may correspond to the RBC SOD internalized in the digestive system of the parasite. However, this adopted SOD has never been shown to participate in the protection of other cellular compartments. Conversely, the character of the endogenous *P. falciparum* FeSOD seems to indicate that it could play a significant role in the defence of the parasite against superoxide anion. Studies are in progress to localize this enzyme and to define its involvement in parasite protection both in normal conditions and under oxidant stress.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thanks Ms O. Mercereau Puijalon and C. Odberg-Ferragut for fruitfull discussions.

The skillful technical assistance of Ms B. Leu, M. Mortuaire and A. Masset is gratefully acknowledged.

This investigation received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, and from the Belgian Fund for Joint Basic Research (contract 32.0018.91).

## REFERENCES

1. Golenser, J., Marva, E., and Chevion, M. (1991) *Parasitol. Today* **7**, 142-146
2. Marva, E., Chevion, M., Golenser, J. (1991) *Free Rad. Res. Comm.* **12(3)**, 115-118
3. Pied, S., Rénia, L., Nüssler, A., Miltgen, F., and Mazier, D. (1991) *Parasite Immunol.* **13**, 211-217
4. Meshnick, S. R., Tsang, T. W., Lin, F. B., Pan, H. Z., Chang, C. N., Kuypers, F., Chin, D., and Lubin, B. (1993) *In Malaria and the red cell 2nd ed. Alan R. Liss. Inc*, p.95
5. Dubey, M. L., Rai, S. K., Ganguly, N. K., Kalra, A., Varma, S. C., and Mahajan, R.C. (1991) *APMIS* **99**, 210-212
6. Eze, M. O. (1991) *Cytobios.* **66**, 93-104
7. Golenser, J., Kamy, M., Tsafack, A., Marva, E., Cohen, A., Kitrossky, N., and Chevion, M. (1992) *Free Rad. Res. Comm.* **17(4)**, 249-262
8. Malhotra, K., Salmon, D., Le Bras, J., and Vilde, J. I. (1988) *Inf. Immun* **56**, 3305-3309
9. Rockett, K. A., and Playfair, J. H. L. (1990) *Blood cells* **16**, 602-6047.
10. Simoës, A. P. F. C., Van Den Berg, J. J. M., Roelofsen, B., Op den Kamp, J. A. F. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **298** (2), 651-657
11. Wozencraft, A. O. (1986) *Parasitology* **92**, 559-567
12. Clark, I.A., Chaudhri, G. and Cowden, W. B. (1989) *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 315-321
13. Fridovich, I. (1975) *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 147-159
14. Fridovich, I. (1986) *Adv. Enzymol.* **58**, 62-97
15. Docampo, R. (1990) *Chem. Biol. Interactions* **73**, 1-27
16. Barra, D., Schinina, M. E., Bossa, F., Puget, K., Durosay, P., Guissani, A., Michelson, A. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17680-17687
17. Tannich, E., Bruchhaus, I., Walter, R. D., and Horstmann, R. D. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 61-72
18. Bécuwe, P., Slomianny, C., Valentin, A., Schrevel, J., Camus, D., Dive, D. (1992) *Parasitology* **105**, 177-182
19. Bécuwe, P., Slomianny, C., Camus, D., and Dive, D. (1993) *Parasitol. Res.* **79**,

- 349-352
20. Hassan, H. M. (1989) *Adv. Genet.* **26**, 65-97
  21. Canini, A., Civitareale, P., Marini, S., Grilli Caiola, M., and Rotilio, G. (1992) *Planta* **187**, 438-444
  22. Isobe, T., Fang, Y. I., Munro, D., and Okuyama, T. (1988) *Biochem. Intern.* **3**, 495-501
  23. Parker, M. W., and Blake, C. C. F. (1988) *FEBS Letters* **229**, 377-382
  24. Fairfield, A. S., Abosch, A., Ranz, A., Eaton, J.W., and Meshnick, S. R. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**, 77-82
  25. Ranz, A., and Meshnick, S. R. (1989) *Exp. Parasitol* **69**,125-128
  26. Fairfield, A. S., Meshnick, S. R., and Eaton, J. W. (1983) *Science* **221**, 764-766
  27. Michalski, W. P., and Prowse, S. J. (1991) *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**: 189-196
  28. Sibley, D. L., Lawson, R., and Weidner., E. (1986) *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 87
  29. Trager, W., and Jensen, J. B. (1976) *Science* **193**, 673-675
  30. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
  31. Bessis, M. (1972) *Masson Ed. Paris*,31-32
  32. Mc Cord, J. M., and Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055
  33. Marklund, S., and Marklund, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474
  34. Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) *Anal. Biochem.* **44**, 276-287
  35. Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., Carewell, R. W. (1975) *J. Lab. Clin. Med.* **85**, 337-341
  36. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
  37. Merrill, C. R. (1981) *Science* **211**, 1437-1438
  38. Hyde, J. E., Kelly, S. L., Holloway, S. P., Snewin, V. A., and Sims, P. F. G. (1989) *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**, 247-262
  39. Bauer, J. (1992) *Strategies* **5**, 62-64
  40. Sanger, F. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
  41. Gonnet, G. H., Cohen, M. A., and Benner, S. A. (1992) *Science* **256**, 1443-1445
  42. Sturrock, S.S., Collins, J.F. (1993). MPsrch version 1.3., Biocomputing Res Unit, Univ Edimburgh, U.K.
  43. Smith, T.F., Waterman, M.S. (1981) *J. Mol. Biol.* **147**, 195-197
  44. Amano, A., Shizukuishi, S., Tsunemitsu, A., and Tsunasawa, S. (1992) *Oral*

*Microbiol. Immunol.* **7(6)**, 368-371

45. Fairfield, A. S., Eaton, J.W., Meshnick, S. R. (1986) *Arch Biochem Biophys* **25**, 526-529

#### LEGENDS OF THE FIGURES

**Fig. 1. Isoelectrofocusing of *Plasmodium falciparum* extract.** The gel was stained for SOD activity without inhibitor (*lanes 1-4*), in the presence of 2mM KCN (*lanes 5-8*) or in presence of 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*lanes 9-12*). *Lanes 1, 5 and 9*, Human RBC extract (120µg); *lanes 2, 6 and 10*, *E. coli* Mn-SOD (3U); *lanes 3, 7 and 11*, *E. coli* Fe-SOD (3U); *lanes 4, 8 and 12*, *P. falciparum* extract (210µg). Endogenous SOD activities are indicated by arrowheads.

**Fig. 2. Inhibition test of SOD activity in parasite extracts by 1mM KCN or 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Initially, 1 unit of enzyme activity was used for the assays. Each result, expressed as a percentage of SOD inhibition, is the mean value for three measurements on the same extract; two extracts were tested. HRBC, Human RBC; PF, *P. falciparum*.

**Fig. 3. Purification of SOD of *P. falciparum*.** (A) Elution pattern for the gel filtration of the crude extract from *P. falciparum*.

(B) **Ion exchange chromatography on DEAE-Trisacryl.** The fractions from gel filtration containing SOD activity were applied after pooling on a column (1.5x8cm) and eluted with a linear gradient of NaCl. The peaks 1 and 2 correspond to pooled SOD activity of *P. falciparum*.

Fig. 4. (A) Analysis of the purification procedure of *P. falciparum* SOD by isoelectrofocusing of the sample from the different purification steps. The gel was stained for SOD activity. Lane 1, crude extract from *P. falciparum* (120 $\mu$ g); lane 2, after Sephadex G-75 (15 $\mu$ g); lane 3, after DEAE Trisacryl (2 $\mu$ g).

(B) Analysis of the purified SOD from *P. falciparum* on SDS-PAGE. The proteins were stained with silver nitrate. The arrow indicates the 23 kDa monomeric *P. falciparum* SOD (0.2 $\mu$ g).

Fig. 5. Amplification by PCR of a fragment from genomic DNA of *P. falciparum*. The PCR was realised with 0.25  $\mu$ g of genomic DNA and 1  $\mu$ M of primers (lane 2). The amplified fragment was compared to molecular markers derived of pBr 322 plasmid digested by Msp I (lane 1).

Fig. 6. The nucleotide sequence of the fragment of endogenous SOD gene amplified by PCR from genomic DNA of *P. falciparum*. The translated protein sequence is likewise given. Underlined parts correspond to oligonucleotidic sequences of the primers.

Fig. 7. Alignment of *P. falciparum* SOD partial sequence (164 residues) with other Mn-or Fe-SODs. Reference of proteins sequences in PIR2 and EMBL databases are given into brackets. The first amino acid shown for *Homo sapiens* and *Mus musculus* SODs is the 24th N-terminal residue of the sequence. **MnSODs:** **B.c.**, *Bacillus caldotenax* (S22053); **B.s.**, *Bacillus stearothermophilus* (S27522); **M.**, *Methylomonas sp.* (A38461); **E.c.(Mn)**, *Escherichia coli* (A24141); **S.m.**, *Streptococcus mutans* (A42710); **H.s.**, *Homo sapiens* (S13162); **M.m.**, *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); **S.c.**, *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST)

**FeSODs:** **P.f. a**, N-terminus sequence of purified SOD from *Plasmodium falciparum* ( ); **P.f. b**, deduced amino acids sequence of fragment of SOD gene from *Plasmodium falciparum* ( ); **S.s.**, *Synechococcus sp.* (S04423); **C.b.**, *Coxiella burnetii* (A44791); **L.p.**, *Legionella pneumophila* (JS0749); **P.l.**, *Photobacterium leiognathi* (A26707); **E.c.(Fe)**, *Escherichia coli* (A29940); **P.o.**, *Pseudomonas ovalis* (SOD F\_PSEOV); **E.h.**, *Entamoeba histolytica* (A45552); **T.p.**, *Tetrahymena pyriformis* (SGC5) (A39223).

**Hybrid SOD:** **P.g.**, *Porphyromonas gingivalis* (S12882); **B.f.**, *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD). The conserved residues in all SODs are indicated by an asterisk. The

characteristic residues for MnSODs are enclosed in light boxes, for FeSODs in shaded boxes and for hybrid SODs in lightly shaded boxes. Gaps were introduced into the sequences for optimal alignment. The underlined parts correspond to amino acids sequences deduced of the primers used for PCR.

**Fig. 8. Comparison of the partial sequence of *P. falciparum* SOD (164 residues) with 31 known Fe- or Mn-SODs by DARWIN system.** Reference of proteins sequences in PIR2 and EMBL databases are given into brackets. **q**, *Pseudomonas sp* (s00157); **D**, *Pseudomonas ovalis* (SOD F\_PSEOV); **B**, *Bordetella pertussis* (BPESODB); **o**, *Legionella pneumophila* (JS0749); **p**, *Photobacterium leiognathi* (A26707); **s**, *Escherichia coli* (A29940); **i**, *Coxiella burnetii* (A44791); **j**, *Entamoeba histolytica* (A45552); **r**, *Synechococcus sp.* (S04423); **C**, *Plasmodium falciparum* ( ); **z**, *Glycine max* (SOYFESOD); **m**, *Arabidopsis thaliana* (B39267); **n**, *Curled-leaved tobacco* (A39267); **A**, *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD); **h**, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC53977) (A43585); **w**, *Porphyromonas gingivalis* (S12882); **u**, *Mycobacterium leprae* (A37212); **v**, *Mycobacterium tuberculosis* (S15205); **F**, *Saccharomyces cerevisiae* (SODM\_YEAST); **d**, *Homo sapiens* (S13162); **E**, *Mus musculus* (SODM\_MOUSE); **c**, *Florida lancelet* (S23658); **f**, *Caenorhabditis elegans* (JS0750); **y**, *Palinurus vulgaris* (PVSODMNP); **l**, *Streptococcus mutans* (A42710); **e**, *Thermus aquaticus* (S07147); **b**, *Escherichia coli* (A24141); **g**, *Methylomonas sp.*(A38461); **t**, *Listeria monocytogenes* (JC1272); **a**, *Bacillus caldotenax* (S22053); **k**, *Bacillus stearothermophilus* (S27522); **x**, *Tetrahymena pyriformis* (SGC5) (A39223).

### 2.1.6. Localisation de la SOD de l'hôte internalisée par *Plasmodium*

Avec un anticorps monoclonal anti-SOD Cu/Zn de l'hématie humaine, une réaction immunologique réalisée sur des coupes à congélation de *P. falciparum* au stade trophozoïte et schizonte, montre un marquage correspondant à une concentration de plusieurs points dans le parasite (**Fig.II.36**). Ce marquage, dans la vacuole digestive, est très faible et correspond à des points dispersés au stade trophozoïte agé (**Fig.II.36 A, C**). Cependant, en dehors de la vacuole digestive, nous pouvons distinguer plusieurs concentrations de points (**Fig.II.36 A et C**), mais il est difficile à plus fort grossissement de distinguer la structure sous jacente selon les coupes (**Fig II.36 B et D**). Au stade schizonte, aucun marquage n'est apparent dans la vésicule digestive résiduelle, mais en dehors subsistent toujours les concentrations de points, que l'on observe également dans les mérozoïtes qui s'individualisent (**Fig.II.36 E**). Aucun marquage n'est observé dans le noyau du parasite.

**Figure II.36:** Immunolocalisation ultrastructurale de la SOD de l'hématie internalisée par *P. falciparum*. Coupes ultrafines réalisées sur des trophozoïtes âgés (**A, B, C, D** et **F**) et schizonte (**E**). Le marquage a été effectué avec un anticorps monoclonal anti-SOD Cu/Zn de l'hématie.

**A:** Trophozoïte âgé x 25000. Quelques grains d'argent sont dispersés dans la vacuole digestive (**VD**). Par contre des concentrations de grains d'argent sont observables en dehors de cette vacuole (cadre).

**B:** Détail du cadre de la **figure A** montrant une concentration de grains d'argent dans une vésicule en dehors de la vacuole digestive (flèche). On distingue faiblement la membrane. x 100000

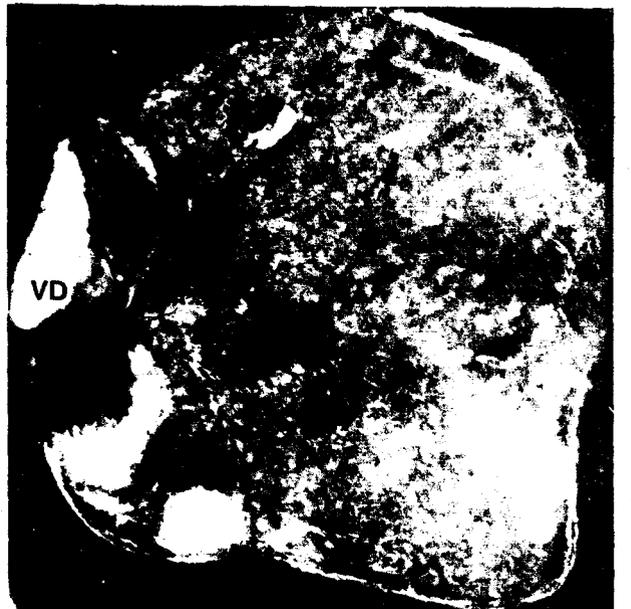
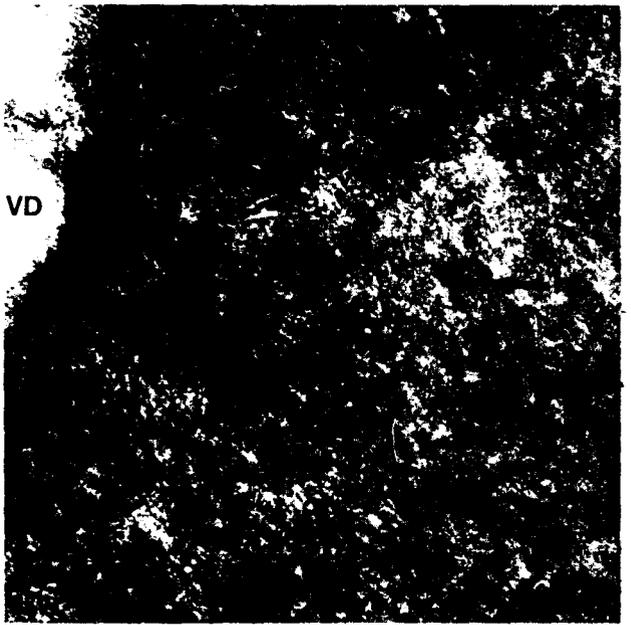
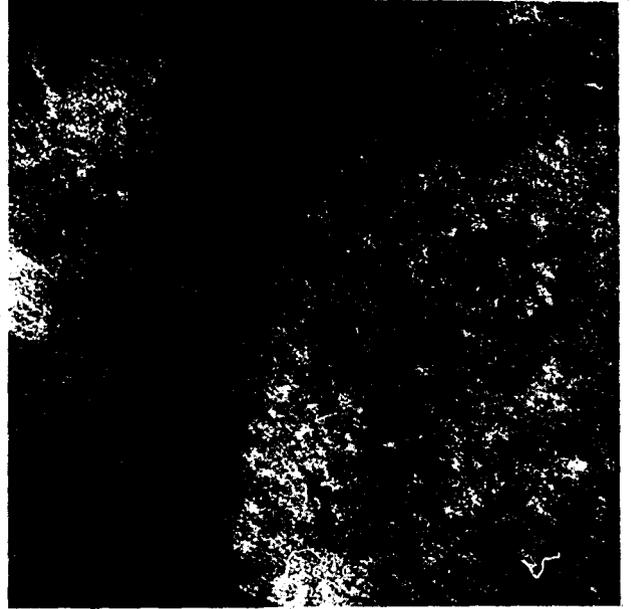
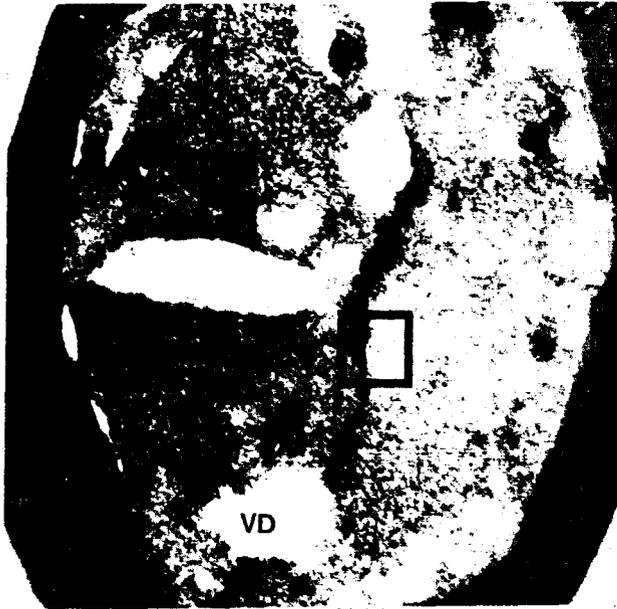
**C:** Trophozoïte âgé x 28000. On distingue des grains dispersés dans la vacuole digestive et en dehors de celle-ci (flèche 1 et 2).

**D:** Détail des flèches 1 et 2 de la **figure C** montrant une concentration de grains d'argent en dehors de la vacuole digestive (flèche). x 90000

**E:** Schizonte x 26000. Aucun marquage n'est observable dans la vacuole digestive. Par contre, quelques grains d'argent sont observés en dehors de la vacuole digestive et dans les mérozoïtes (\*).

**F:** Trophozoïte x 27000. La réaction immunologique a été réalisée uniquement avec l'anticorps anti-immunoglobulines de souris.

**N** = Noyau; **VD** = Vacuole Digestive; \* = Mérozoïte



## 2.2. DISCUSSION

Ce travail montre l'existence d'une SOD endogène, à la fois chez *P. falciparum* mais aussi chez les *Plasmodium* de rongeurs sur la base d'isoélectrofocalisations et de dosages d'activité enzymatique réalisés sur des extraits de parasites purifiés. Les travaux antérieurs (Ranz *et coll.* 1989) n'avaient pas permis de caractériser une activité de SOD endogène chez les espèces de *Plasmodium* murins. Selon les espèces de *Plasmodium*, l'activité de la SOD endogène représente de 20 à 30% de l'activité totale. Cette activité endogène est sans doute sous-estimée, car les extraits sont contaminés par de la SOD Cu/Zn de l'hématie, internalisée par le parasite (Fairfield *et coll.* 1983; 1986; 1988). Chez *Babesia*, nous avons pu estimer l'activité de la SOD endogène avec plus de précision, car celle de l'hématie ne représente que 3 à 5% environ de l'activité totale des extraits, et correspond probablement à une contamination résiduelle des parasites purifiés plutôt qu'à une internalisation du contenu de sa cellule hôte. La présence d'une quantité importante de SOD Cu/Zn dans les extraits de *Plasmodium* avait conduit Hempelmann *et coll.* (résultats non publiés, cités par Golenser, 1991) à considérer l'activité de la SOD endogène comme négligeable. Notre méthode de purification plus poussée des parasites, en réduisant la contamination, nous a permis de mettre en évidence une quantité appréciable de SOD chez *Plasmodium*.

Cette activité endogène est déjà présente au stade anneau chez *P. chabaudi*, ce qui pourrait indiquer qu'elle est exprimée tout au long du cycle. Fairfield *et coll.* (1988) n'avaient pas observé d'activité au stade anneau chez *P. falciparum* et considéraient qu'à ce stade, le parasite dépendait totalement de la SOD de l'hématie. L'anticorps polyclonal que nous avons développé contre l'extrémité N-terminale de la SOD de *P. falciparum*, nous permettra dans un proche avenir d'étudier de façon précise l'expression de l'enzyme au cours du cycle cellulaire chez cette espèce, afin de vérifier si elle est présente à tous les stades, comme nous l'avons vu chez *P. chabaudi*.

La SOD de *P. falciparum* a un poids moléculaire de 43 kDa et est constituée de deux sous-unités de 23 kDa chacune non reliées entre-elles par un pont disulfure, car elles se séparent en absence d'agent réducteur. Cette structure dimérique est un des modèles connus de SOD-Fe, comme nous l'avons déjà discutés à propos de *Babesia*. Les SOD-Mn mitochondriales connues chez les eucaryotes étant à notre connaissance des enzymes tétramériques (Fridovich, 1986), il semble bien que la SOD endogène de *P. falciparum* soit

de nature différente.

Il existe deux isoenzymes majeures dans toutes les espèces que nous avons étudiées (pI 6,2 et 6,8). Ce profil isoenzymatique apparaît très homogène chez *Plasmodium*, comparé à ce que nous avons observé chez *Babesia*. Cependant, chez *P. falciparum*, on observe en plus deux autres isoenzymes mineures (pI 5,6 et 6,4) qui semblent résulter d'une certaine instabilité. En effet, nous avons observé que l'apparition de ces bandes dépendait de la méthode de préparation de l'extrait parasitaire et évoluait au cours de la purification de l'enzyme. Lorsque les parasites sont lysés par congélation-décongélation, les bandes d'activités principales ne sont pas observées et seules les bandes mineures sont révélées. Quelle que soit la méthode de préparation des extraits de *Plasmodium* de rongeurs, nous avons toujours révélé le même profil isoenzymatique. La présence d'une isoenzyme supplémentaire, au stade trophozoïte jeune chez *P. chabaudi*, pourrait s'expliquer par le fait que l'extrait a dû être concentré et que cette étape a pu entraîner des modifications des protéines. Au cours de la purification de la SOD de *P. falciparum*, nous avons également observé une variation du profil isoenzymatique après les étapes chromatographiques, avec la disparition de l'isoenzyme à pI 6,8 mais une activité à pI 5,6 plus importante que dans l'extrait de départ. Nous ne pouvons pas exclure la perte de l'isoenzyme de pI 6,8 au cours de la purification. C'est d'ailleurs une hypothèse qui pourrait expliquer le pourcentage encore important de SOD sensible au KCN après la gel filtration. La modification du profil isoenzymatique pourrait être liée aux conditions de purification. La SOD de *B. hylomyisci* montre une plus grande stabilité, car nous n'avons observé aucune variation dans le profil isoenzymatique de la SOD, quelle que soit la méthode de préparation de l'extrait parasitaire et lors des étapes de purification. L'instabilité de la SOD a déjà été signalée par Barra *et coll.* (1990) qui ont observé ce phénomène au cours de la purification de l'enzyme de *Tetrahymena pyriformis*.

Ces deux isoenzymes de la SOD de *P. falciparum* ont le même poids moléculaire, car à l'inverse de *Babesia*, un seul pic d'activité est élué lors de la gel filtration. Dans l'étude actuelle du travail, il est impossible de conclure si ces isoenzymes diffèrent par leur séquence primaire, par des modifications post-traductionnelles ou à la suite d'un phénomène de dégradation. Notre anticorps reconnaît les deux isoenzymes électroéluées séparément en Western Blot. D'autre part, une seule séquence N-terminale a été obtenue à partir du mélange

des deux isoenzymes. Si une différence dans la séquence primaire existe, elle doit donc se situer au delà des 29 premiers acides aminés. L'analyse en biologie moléculaire doit être poursuivie pour vérifier si des différences de séquences peuvent être observées au delà du 29ème acide aminé.

Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus convergent tous vers l'existence d'une SOD endogène fer-dépendante chez *P. falciparum*:

1- la sensibilité de l'enzyme à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, démontrée en isoélectrofocalisation et lors des dosages. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux de Ranz et Meshnick (1988), qui ont montré que l'activité SOD était résistante à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et sur la base de ce test, avaient conclu que le manganèse devait être le cofacteur de cette enzyme qui était donc probablement mitochondriale.

2- l'identification de certains résidus caractéristiques des SOD-Fe dans la séquence N-terminale.

L'alignement de cette séquence met en évidence, en dehors des résidus très conservés dans toutes les SOD-Fe et Mn, la Ser-19 à proximité du 1er ligand du fer (His-26), l'acide aminé aliphatique en position 23 et aromatique en position 25 (Leu-23 et Phe-25 chez *P. falciparum*). L'analyse DARWIN a sans aucune ambiguïté placé l'enzyme de *P. falciparum* avec les SOD-Fe sur la base de la séquence de cette extrémité N-terminale.

3- le séquençage d'un fragment de gène amplifié, codant pour une SOD.

Une analyse approfondie de la séquence indique, en dehors des résidus très conservés, la présence d'acides aminés caractéristiques des SOD-Fe dans la région proche du site actif, c'est à dire au niveau du 2ème ligand du métal cofacteur (His-89), des SOD-Fe et Mn (**Fig.II.33**): l'acide aromatique Phe/Tyr-80, Ala-Gln-84-85, Trp-87, la séquence Thr-Phe-Tyr (91 à 93) peuvent être à l'origine, selon certains auteurs, de l'affinité du site actif pour le fer et sont très différents dans les SOD-Mn (Isobe *et coll.* 1988; Parker et Blake, 1988). Dans la séquence des SOD hybrides, caractérisées chez *Bacteroides fragilis* et *Porphyromonas gingivalis*, l'affinité du site actif pour le Mn et le Fe peut s'expliquer en partie par la présence de certains acides aminés caractéristiques des SOD-Mn (Gly-84, Leu-87 à la place de Trp-87,

Gly-Leu-91-92 à la place de Tyr-Phe) et des SOD-Fe (Phe-80, Gln-85, Tyr-93). D'autres acides aminés, loin du site actif, sont très caractéristiques des SOD-Fe: la Thr-45 et l'Ala-165. La présence de ces résidus dans la séquence de la SOD de *P. falciparum* explique le classement de cette enzyme parmi les SOD-Fe dans l'arbre déduit de l'analyse de DARWIN. La SOD de *Tetrahymena pyriformis* a été caractérisée comme étant dépendante du fer, mais elle constitue une branche isolée des autres SOD dans l'analyse de DARWIN (**Fig.II.34**). Ceci s'explique par la présence de résidus plus souvent caractéristiques des SOD-Mn. Les SOD hybrides, ayant autant de résidus caractéristiques des deux types de SOD, sont donc situées au centre de l'arbre (**Fig.II.34**).

La quantité finale de protéine purifiée, que l'on peut obtenir directement à partir des parasites, reste trop faible et limite les possibilités de caractériser la SOD de manière plus poussée, par d'autres approches biochimiques et biophysiques. L'expression de l'enzyme recombinante, à partir de bactéries transformées avec l'ADNc de la SOD de *P. falciparum*, devrait permettre d'obtenir une quantité suffisante d'enzyme pour envisager, soit des expériences d'inactivation consistant à séparer l'apoenzyme de son métal cofacteur, pour ensuite étudier la récupération de l'activité après addition de fer ou de manganèse (Kirby, 1980), soit des études en spectroscopie d'absorption atomique, permettant d'identifier le métal cofacteur dans le site actif de l'enzyme.

L'existence d'une SOD endogène fer-dépendante chez *P. falciparum* n'est pas une exception chez les protozoaires (voir **Tableau I.1, p 30**). Ceci pourrait expliquer en partie la grande sensibilité de *P. falciparum* au peroxyde d'hydrogène (Dockrell et Playfair, 1983). De plus, l'enzyme peut constituer une cible possible pour les chélateurs de fer, telle que la desferroxamine dont on connaît l'activité antimalarique (Raventos-Suarez *et coll.* 1982; Pollack *et coll.* 1987; Traore *et coll.* 1991; Gordeuk *et coll.* 1992b).

La portion codante du gène de la SOD de *P. falciparum* n'est pas complète à la fois du côté C-terminal et du côté N-terminal, et la séquence N-terminale de la protéine purifiée n'a pas recoupé suffisamment loin la partie correspondant au fragment du gène. Dans l'état actuel, nous ne pouvons donc pas affirmer avec certitude que cette protéine est le produit du gène, dont nous avons amplifié un fragment. Nous envisageons le clonage du gène ou de l'ADNc, à partir d'une banque afin d'approfondir l'étude.

La détermination de la séquence N-terminale de la SOD de *P. falciparum* nous a permis de développer un anticorps polyclonal grâce à un peptide synthétique. Cette voie représentait la seule possible pour obtenir un anticorps dirigé contre l'enzyme si l'approche en biologie moléculaire échouait. La quantité était trop faible pour immuniser directement un animal. En effet, d'après le bilan de purification, la SOD ne représente qu'environ 0,01% des protéines totales. De plus, pour obtenir une quantité suffisante de parasites purifiés, la culture est longue et onéreuse. La technique d'extraction, une fois mise au point, nous a permis de préparer des extraits parasitaires beaucoup moins contaminés par l'hématie hôte. Nous avons donc tenté, à partir d'une fraction contenant la SOD de *P. falciparum* partiellement purifiée, d'immuniser une souris en vue de produire un anticorps monoclonal. A la sortie de la fusion, aucun clone positif n'a pu être isolé. Cet échec est sans doute lié à la trop faible quantité d'enzyme utilisée pour l'immunisation.

L'anticorps polyclonal, préparé contre un peptide synthétique, reconnaît la SOD de *P. falciparum* en Western Blot, mais ne reconnaît pas la SOD-Fe ou Mn de *E. coli*, ni la SOD Cu/Zn humaine. Dans l'extrait brut de *P. falciparum*, trois autres protéines sont également reconnues. Il est donc difficile d'envisager d'utiliser cet anticorps pour une localisation ultrastructurale de l'enzyme dans le parasite. Toutefois, ces résultats montrent que le peptide est très immunogène et nous incite à envisager de développer un anticorps monoclonal plus spécifique. Cet outil pourrait être utilisé pour localiser l'enzyme dans le parasite. Néanmoins, notre anticorps polyclonal est utilisable pour étudier l'expression de l'enzyme au cours du cycle du parasite ou lors d'un choc oxydatif. Cet anticorps doit être testé sur des extraits de *Babesia*, car nous avons montré de fortes homologues entre la séquence N-terminale de la SOD de *Babesia hyalomysci* et celle de *P. falciparum*. Il faut également vérifier si cet anticorps reconnaît la SOD des différentes espèces de *Plasmodium* de rongeurs, car il peut représenter une sonde immunologique intéressante pour l'étude de l'expression de cette enzyme dans les modèles *in vivo* au cours de l'infection, au cours du cycle extraérythrocytaire, lors d'un choc oxydatif ou d'un traitement antimalarique.

Lors de notre recherche d'une SOD endogène de *P. falciparum*, nous n'avons détecté aucune activité à la fois résistante au KCN et à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. S'il existe une SOD-Mn chez *Plasmodium*, comme le suggèrent Ranz *et coll.* (1989), il est possible qu'elle ne soit pas exprimée, ou que nos conditions opératoires ne permettent pas de la révéler. Au cours de la

purification de la SOD de *P. falciparum*, malgré la quantité de matériel parasitaire importante que nous avons utilisé, nous n'avons pas détecté d'activité autre que les 4 isoenzymes sensibles à  $H_2O_2$ . Les régions très conservées dans toutes les SOD-Mn et Fe connues, qui nous ont servi à établir les amorces pour la PCR, pouvaient nous conduire à amplifier aussi bien un fragment du gène de SOD-Mn et/ou Fe, approximativement de même taille. Après le clonage du fragment, nous avons travaillé sur un seul des transformants. De ce fait, nous ne pouvons pas écarter l'existence d'un gène de SOD-Mn qui ne serait pas ou très peu exprimé au cours du cycle érythrocytaire de *Plasmodium*.

La SOD Cu/Zn de l'hématie représente environ 75% de l'activité SOD totale dans les extraits de *Plasmodium*. Certains auteurs ont postulé que cette enzyme était internalisée au cours du développement du parasite, en même temps que le contenu de l'hématie, et pouvait jouer un rôle dans la défense du parasite. Dans le but d'étudier le devenir de cette SOD internalisée, nous l'avons localisée à l'aide d'un anticorps du commerce, qui est spécifique de l'enzyme sous une forme dimérique donc proche de l'état natif. Cette étude préliminaire s'est focalisée essentiellement sur les stades agés de *P. falciparum*, où l'internalisation du contenu de l'hématie est important.

L'immunodétection ultrastructurale sur coupes à congélation nous a permis d'observer un marquage au niveau de certaines vésicules. Selon Fairfield *et coll.* (1983; 1986), qui ont fractionné *P. berghei*, ces vésicules correspondraient à des "lysosomes", car elles renferment certaines enzymes responsables de la dégradation de l'hémoglobine. Nous ne pouvons pas identifier avec certitude les structures que nous observons en microscopie électronique et donc les comparer à celles que Fairfield *et coll.* ont caractérisées par un fractionnement cellulaire sans étude ultrastructurale des fractions. Dans notre cas, ces vésicules pourraient résulter de la persistance d'un phénomène de micropinocytose du contenu de l'hématie à un stade agé chez *P. falciparum*. Normalement, dès le stade trophozoïte, l'internalisation du contenu de l'hématie est dépendante d'un système cytotosomal qui remplace le phénomène de pinocytose (Slomianny *et coll.* 1985). Dans les vésicules que nous observons, la SOD Cu/Zn est reconnue par l'anticorps monoclonal, ce qui suggère que l'enzyme se présente encore sous sa forme dimérique. La détection d'enzyme native au niveau de ces vésicules expliquerait la présence d'une activité SOD Cu/Zn dans les extraits de stade agé de *P. falciparum*. Une étude de

l'internalisation de la catalase de l'hématie par *Plasmodium* au cours du cycle cellulaire a été réalisé dans notre laboratoire (Clarebout, communication personnelle). L'auteur a montré par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la catalase humaine, que l'enzyme est internalisée puis digérée par le parasite. En immunodétection ultrastructurale, on observe un marquage très important dans la vacuole digestive du parasite. Cette différence avec nos résultats vient du fait que l'anticorps polyclonal anti-catalase reconnaît aussi l'enzyme dénaturée. En dehors de cette vésicule, la catalase a été détectée au niveau de petites vésicules semblables à celles que nous observons avec l'anticorps dirigé contre la SOD Cu/Zn. Cette observation rejoint la nôtre pour suggérer la persistance d'une micropinocytose chez *Plasmodium* après la mise en place du système cytosomal. Mais ceci demande à être vérifié par des approches complémentaires.

Compte-tenu des conditions rencontrées dans les vésicules digestives du parasite, défavorables à l'enzyme, en particulier par la présence de peroxyde d'hydrogène et d' $\text{OH}^\circ$ , il est difficile d'envisager que la SOD puisse rester longtemps active dans ces vésicules.

Des études complémentaires, utilisant un anticorps polyclonal, dirigé contre la SOD Cu/Zn de l'hématie humaine, permettront de suivre plus précisément le devenir de l'enzyme au cours du développement du parasite dans l'hématie.

**TROISIEME PARTIE :**  
**DISCUSSION GENERALE**

Notre travail montre que *Plasmodium* et *Babesia* possèdent un système enzymatique endogène de défense contre les espèces activées de l'oxygène. Dans l'état actuel des connaissances, ce système est constitué au moins d'une SOD à fer (nos travaux), et d'une glutathion peroxydase sélénodépendante (Gamain et coll. 1993). Des incertitudes subsistent encore au sujet de l'existence d'une catalase endogène chez ces deux parasites (Clarebout et coll., communication personnelle).

Le rôle de protection des enzymes de l'hématie-hôte, qui demande encore à être précisé, serait cantonné à la protection du compartiment digestif du parasite au cours de la dégradation de l'hémoglobine (Fairfield et coll. 1983; 1986; 1988).

Ces résultats ainsi que certains éléments de la littérature, méritent d'être discutés sur plusieurs points:

- Quelle est en réalité la sensibilité de *Plasmodium* aux choc oxydant?
- Existe t'il une ou plusieurs SOD chez *Plasmodium*?
- Ce système de défense constitue-t-il une bonne cible potentielle pour le développement de molécules antimalariques, et quelle stratégie peut on adopter pour une telle démarche?
- quel est l'intérêt présenté par *Babesia* pour l'étude du système enzymatique de défense des protozoaires parasites intraérythrocytaires contre le choc oxydant?

### 1. La sensibilité de *Plasmodium* au choc oxydatif.

Les résultats obtenus par différents auteurs font état de la sensibilité de *Plasmodium* *in vitro* et dans des modèles *in vivo*. Les seuls résultats obtenus *in vitro* pouvant être considérés comme acceptables sont ceux obtenus sur *P. falciparum*. En effet, la sensibilité au choc oxydant de différentes espèces de *Plasmodium* murins résultent d'expériences qui

consistaient à infecter une souris, puis à traiter les parasites *in vitro* par différents oxydants. Mais on connaît la difficulté de maintien des souches murines en dehors de leur hôte (Mons et coll. 1983; Janse et coll. 1984). Les expériences réalisées sur ces espèces *in vitro*, en présence de la concentration atmosphérique en oxygène (Dockrell et Playfair, 1983), introduisent un biais considérable dans les résultats, et la toxicité observée peut être attribuée au moins en partie aux conditions expérimentales utilisées. Il n'est envisagé en particulier aucune interaction possible entre les oxydants utilisés (tert-butyl hydroperoxyde, peroxyde d'hydrogène) avec les concentrations élevées en oxygène dans le milieu réactionnel. Or de telles interactions ont pu être observées avec le qinghaosu (Elford et coll. 1987; Krungkrai et Yuthavong, 1987) chez *P. falciparum*.

Les concentrations en produits utilisées tant *in vivo* qu' *in vitro* sont très élevées, de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  M pour le tert-butyl hydroperoxyde et le peroxyde d'hydrogène, alors que le qinghaosu est actif à des doses comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M. L'action oxydante directe de ces produits sur le parasite peut elle-même être discutée. Les expériences réalisées en présence de chélateurs de métaux comme la desferrioxamine montrent que l'activité antimalarique de l'alloxane et du tert-butyl hydroperoxyde ne se manifeste qu'en présence de  $Fe^{2+}$  catalysant probablement une réaction de Fenton (Clark et Hunt, 1983; Clark et coll. 1984).

D'autre part, les milieux de culture utilisés pour *P. falciparum* sont très différents des conditions rencontrées dans le plasma. Un certain nombre de piègeurs de radicaux susceptibles de protéger les parasites contre les EAO dans les conditions naturelles sont absents dans les conditions de culture (protéines plasmatiques, acide ascorbique, acide urique, vitamine E, bilirubine etc...). Or, aucune étude globale n'a été réalisée afin de mesurer exactement l'effet protecteur possible du plasma sur les parasites. La sensibilité réelle de *Plasmodium* au choc oxydant dans ces conditions semble devoir être reposée.

Si le parasite est réellement dépourvu de possibilités d'adaptation au choc oxydant, cela expliquerait sa sensibilité aux EAO. Mais l'expression d'une G6PDH endogène dans des hématies déficientes (Usanga et Luzzatto, 1985), l'existence d'enzymes capables de régénérer le NADPH (Sherman et coll. 1971; Walter et coll. 1974; Vander-Jagt et coll. 1989; Kurdi-haidar et Luzzatto, 1990; Sahni et coll. 1992), l'adaptation possible de souches dans des hématies porteuses d'hémoglobinopathies (qui ne s'accompagne pas d'une augmentation de sensibilité au choc oxydatif) (Golenser et coll. 1991), la possibilité d'obtenir par pression

médicamenteuse (ou par mutagénèse), des souches plus résistantes aux endoperoxydes (Inselburg, 1985) ainsi que l'observation des souches résistantes chez des malades (Gay et coll. 1993) ne sont pas en faveur de cette théorie.

La mise en évidence d'une SOD endogène chez *Plasmodium* implique l'existence d'au moins une enzyme capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène, et par la même d'un système de défense contre les EAO. Si le parasite est capable de s'adapter au choc oxydant, cela peut se traduire par une modulation de l'expression de ce système de défense.

## 2. Existe t'il une ou plusieurs SOD chez *Plasmodium*?

Notre travail nous a permis d'établir que *P. falciparum*, différentes souches de *Plasmodium* murins et deux espèces de *Babesia* possédaient une superoxyde dismutase qui est fer-dépendante. Notre anticorps ne nous a pas pour l'instant permis de la localiser avec précision dans le parasite. Il serait intéressant de vérifier l'existence de l'enzyme au moins chez les autres espèces de *Plasmodium* parasitant l'homme (*P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*). Est ce la seule SOD existant dans ces deux parasites?

La nature de son métal cofacteur peut faire penser à une enzyme cytosolique, mais il ne faut pas perdre de vue qu'une faible activité SOD cyanure- et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-résistante a été trouvée chez *P. falciparum* (Ranz et Meshnick, 1989). La présence d'une mitochondrie chez *Plasmodium* rend l'existence d'une SOD-Mn plausible. Notre approche en biologie moléculaire nous permettait d'amplifier, en fonction des amorces utilisées, aussi bien un fragment de gène d'une SOD-Fe que d'une SOD-Mn. Comme nous n'avons analysé qu'un seul clone ayant intégré le fragment amplifié, on ne peut pas exclure la présence, dans la bande de 423 pb, d'un ADN correspondant à une SOD-Mn. En ce qui concerne le fragment de 540pb, des travaux complémentaires (Gratepanche, communication personnelle) ont montré qu'il n'hybridait pas avec le fragment de 423 pb. Une étude complémentaire doit être envisagée à l'aide d'une sonde beaucoup plus caractéristique des SOD-Mn et dont la séquence tiendrait compte du codage préférentiel de *Plasmodium falciparum* (Hyde et coll. 1989). A ce propos, il faut noter que la séquence nucléotidique que nous avons obtenue pour le fragment amplifié différait parfois sensiblement de ce qui était attendu, en particulier au niveau des séquences caractéristiques NNAAQ des SOD-Fe ou des séquences théoriques NGGG d'une possible

SOD-Mn. Ceci peut expliquer les résultats négatifs enregistrés en PCR avec ces amorces, et qui n'ont pas été mentionnés dans la partie précédente du travail.

Si ces recherches complémentaires aboutissaient à la mise en évidence d'une SOD-Mn chez *Plasmodium*, l'étude de l'expression des deux SOD endogènes serait indispensable pour bien comprendre le système de défense du parasite contre l'anion superoxyde. En effet, chez *Eimeria*, il semble que des SOD différentes soient exprimées au cours des phases du cycle biologique (Michalski et Prowse, 1991). On ne peut pas exclure qu'il en soit de même chez *Plasmodium* et *Babesia*. Il faudrait donc rechercher les SOD exprimées par le parasite en particulier lors de la phase sexuée chez le moustique (oocystes et sporozoïtes) et au cours de la phase exoérythrocytaire chez le mammifère (phase hépatique). De même, nous ne pouvons pas exclure, au moins chez *P. falciparum*, que les conditions de culture, en particulier en présence de 5% d'oxygène, ne favorisent l'expression préférentielle d'une SOD-Fe. Cependant, une autre SOD pourrait être induite en présence de tensions en oxygène supérieures à 5%. Chez les procaryotes possédant à la fois des SOD-Fe et Mn, l'aérobiose favorise en général l'expression de la SOD-Mn (Hassan, 1989). Toutefois, des SOD-Fe inductibles ont été rapportées (Stowers et Elkan, 1981). Chez *Tetrahymena* qui exprime dans les conditions normales une SOD-Fe, un stress oxydant fait apparaître une SOD Cu/Zn (Favero et coll. 1992). Chez les autres eucaryotes, on observe à la fois une surexpression de la SOD-Mn mitochondriale et de la SOD Cu/Zn en cas de choc oxydant.

Si la SOD-Fe que nous avons étudiée ici est la seule SOD endogène de *Plasmodium*, l'étude de son expression et de sa régulation est indispensable pour estimer les possibilités d'adaptation du parasite à l'anion superoxyde. Le fragment amplifié à partir de l'ADN génomique, et l'anticorps polyclonal que nous avons développés constitueront les deux outils de base pour l'étude de l'expression de l'enzyme qui devra être réalisée chez *P. falciparum* au cours du cycle intraérythrocytaire, dans des conditions de cultures normales ou en très basses tensions en O<sub>2</sub>, et en présence d'un excès d'anions superoxyde. Des cultures pourront être réalisées avec *P. falciparum* dans des hématies atteintes d'hémoglobinopathies pour vérifier si une éventuelle adaptation du parasite dans ces hématies est en relation avec une expression plus importante de sa SOD endogène. Pour l'étude de l'expression de l'enzyme dans les formes exoérythrocytaires, les souches murines constituent un modèle beaucoup plus commode à utiliser. Mais il nous faudra préalablement valider nos deux sondes pour ces modèles ou en

préparer de plus spécifiques. De plus, si la SOD-Fe chez *Plasmodium* est inductible, il serait intéressant dans l'avenir d'étudier le système de régulation de l'expression de cette enzyme, en recherchant, à partir du clonage de son gène, des séquences consensus régulatrices en amont. Récemment une séquence homologue à l'"iron box" de *E. coli* a été montrée en amont du gène de la SOD-Fe du protozoaire *Entamoeba histolytica* (Bruchhaus et coll. 1993).

### 3. Cette SOD endogène peut elle constituer une cible potentielle ?

La SOD endogène de *Plasmodium* étant fer-dépendant, elle se distingue de celles de l'hôte qui sont Mn- et Cu/Zn dépendantes. On peut donc envisager un ciblage médicamenteux qui affecterait préférentiellement la SOD parasitaire. Une telle démarche pourrait fragiliser encore plus le parasite vis à vis des EAO auxquelles il est exposé au cours de son développement. Si l'enzyme est inductible par les anions superoxyde, une telle démarche serait encore plus intéressante.

Le développement de molécules inhibitrices spécifiques de la SOD endogène nécessite à la fois une étude approfondie de la structure et du fonctionnement de la protéine afin de déterminer au mieux la molécule inhibitrice.

La protéine étant présente en trop petite quantité dans le parasite pour qu'on puisse envisager son étude directe après purification, il faudrait la produire par expression après clonage du gène ou de l'ADNc. Ce genre de travail a permis d'exprimer une SOD-Fe fonctionnelle chez *E. coli* à partir de l'ADNc de *Leishmania donovani chagasi* (Ismail et coll. 1994). Une démarche identique est en cours actuellement dans le laboratoire. L'expression de la protéine en grande quantité autoriserait ensuite son étude structurale et fonctionnelle par des méthodes biophysiques, après purification, et la conception d'inhibiteurs spécifiques serait ainsi facilitée.

Une alternative à l'utilisation des inhibiteurs spécifiques est de faire appel à des chélateurs du fer. Des travaux (Heppner et coll. 1988; Gordeuk et coll. 1992) ont montré que la desferrioxamine présentait un intérêt dans la thérapeutique des accès graves à *Plasmodium falciparum*, probablement en évitant la libération, au niveau des capillaires cérébraux, d'une quantité importante de  $Fe^{2+}$  qui pourrait catalyser des réactions de Fenton conduisant à des lésions irréversibles. Chez les malades traités par la desferrioxamine, on observe également une chute de la parasitémie. Des expériences réalisées sur *P. falciparum in vitro* sur des cultures (Raventos-Suarez et coll. 1982; Gordeuk et coll. 1992b) et *in vivo* chez des singes infectés (Pollack et coll. 1987) ou lors de traitement chez l'homme (Traore et coll. 1991) montrent également un effet inhibiteur de ce chélateur du fer, sans que le mécanisme d'action de la molécule soit bien élucidé. Il a été proposé que la privation en fer pouvait entraîner l'inhibition de la ribonucléotide réductase du parasite, mais la SOD endogène pourrait constituer également une cible potentielle. D'autres sidérophores, comme les  $\alpha$ -cétohydroxypyridones (Heppner et coll. 1988), la desferriferrithiocine, et des sidérophores synthétiques sont également des inhibiteurs de *P. falciparum* (Fritsch et coll. 1987b; Iheanacho et coll. 1990). Il serait intéressant d'étudier si une inhibition de la SOD endogène du parasite peut expliquer au moins une partie de l'activité antimalarique de ces produits. Il importe aussi de vérifier si ces chélateurs ne sont pas trop actifs, aux doses utilisées, contre les SOD de l'hôte dont ils pourraient également complexer en partie les métaux cofacteurs.

#### 4. Intérêt du modèle *Babesia* pour l'étude du système enzymatique de défense contre le choc oxydant.

La grande différence existant entre *Plasmodium* et *Babesia* est l'absence d'un système digestif structuré (tube cyto-stomal, vésicules digestives) chez *Babesia*. Un tel système, chez *Plasmodium*, permet une internalisation du contenu de l'hématie hôte. On peut alors s'interroger sur le rôle des enzymes internalisées avec l'hémoglobine, en particulier celles intervenant dans la défense contre le choc oxydant. Notre étude préliminaire sur le devenir de la SOD de l'hématie internalisée par *P. falciparum* semble montrer que l'enzyme est digérée dans la vésicule digestive au même titre que l'hémoglobine. Son rôle protecteur serait donc limité au système digestif du parasite et au temps de digestion. Du fait de

l'internalisation du contenu de l'hématie, l'estimation exacte de l'activité SOD endogène, et son rôle dans la défense du parasite contre l'anion superoxyde ne sont pas facile à définir. Par comparaison, *Babesia* ne présente pas ces inconvénients. Du fait de l'absence d'un processus d'internalisation, les parasites peuvent être obtenus très purs et l'estimation des activités endogènes est plus précise. L'absence d'internalisation des enzymes de l'hématie hôte par *Babesia* semble montrer que ce parasite dépendrait de son propre système de défense et que l'intégrité de l'hématie pourrait également contribuer à le protéger. Par contre, la diminution du potentiel enzymatique de l'hématie induite par *Plasmodium*, doit contribuer à la sensibilisation du parasite. Certaines études, qui ont montré la sensibilité de *Plasmodium* au choc oxydant, méritent à l'avenir d'être appliquées à *Babesia*. Ces travaux permettraient de comparer la sensibilité au choc oxydant de ces deux parasites.

La suite de l'étude de la SOD endogène de *Plasmodium* nécessite la réunion d'un ensemble de disciplines différentes (biochimie, biologie moléculaire, biophysique et pharmacologie). Dans cette optique, le laboratoire a entrepris des collaborations dans le cadre d'une approche multidisciplinaire de la définition de nouvelles cibles en chimiothérapie antipaludéenne. A côté de ce travail visant à concevoir un inhibiteur de la SOD-Fe de *Plasmodium*, nous avons déjà envisagé des études de polymorphisme de la carte de restriction sur la partie codante du gène de la SOD-Fe chez d'autres souches de *P. falciparum* et d'autres espèces.

La mise au point d'un inhibiteur spécifique de la SOD-Fe de *P. falciparum* permettra de définir son rôle exact. Nous avons la possibilité d'étudier les conséquences de l'inhibition de l'enzyme sur le choc oxydant subi par le parasite puisque, dans le laboratoire, nous disposons d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines modifiées par un choc oxydant (Slomianny et coll.).

Si la conception d'un inhibiteur spécifique de la SOD-Fe devenait réalisable, nous pensons que cette stratégie ne se limiterait pas qu'au *Plasmodium*, mais aussi à d'autres parasites du sang tels *Babesia*, *Leishmania* et *Trypanosoma* qui possèdent tous une SOD-Fe.

## **CONCLUSION GENERALE**

Ce travail avait pour but de mettre en évidence et de caractériser biochimiquement ainsi qu'au niveau moléculaire les SOD chez *Plasmodium* et *Babesia*. Nous avons pu établir sans ambiguïté l'existence d'une SOD fer-dépendante chez *Plasmodium falciparum*, où seule une SOD supposée à manganèse était connue. Nous avons également mis en évidence une SOD-Fe chez plusieurs espèces de *Plasmodium* de rongeurs où elle était considérée comme inexistante. Enfin, alors qu'aucune étude n'avait été effectuée sur *Babesia*, nous avons montré chez deux espèces, que ce parasite possédait une SOD-Fe. Chez *Plasmodium*, la SOD endogène représente une fraction non négligeable de l'activité présente dans les parasites purifiés, contrairement à ce qui était admis auparavant. Il apparaît maintenant évident que *Plasmodium* et *Babesia* possèdent un système propre de défense contre les espèces activées de l'oxygène, et la mise en évidence de la SOD chez ces organismes implique l'existence d'enzymes capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, qui font l'objet de travaux actuellement en cours au laboratoire.

Nous avons pu mettre au point une sonde nucléique et une sonde anticorps qui vont permettre dans l'avenir

- de définir le rôle exact de la SOD endogène dans les parasites,
- de mieux comprendre les capacités d'adaptation de *Plasmodium* au choc oxydatif,
- de réaliser l'étude approfondie de la protéine sur le plan structural et fonctionnel.

Une telle étude présente des intérêts multiples:

- préciser l'importance de la SOD endogène en tant que cible potentielle pour de nouveaux médicaments antimalariques. Les résultats que nous avons obtenus ont montré que la SOD de *Plasmodium* se distinguait de celles de l'hôte et pouvait se prêter à la mise au point d'un inhibiteur spécifique. Cette nouvelle approche concernera également, par la suite, d'autres enzymes de défense contre le choc oxydant, comme la GPx et la catalase.

- étudier la relation possible entre cette enzyme et le risque d'apparition de la résistance aux endoperoxydes actuellement utilisés dans la lutte contre les infections à *Plasmodium falciparum*. Si cette relation était effective, la conception d'inhibiteurs serait d'autant plus intéressante que de telles molécules pourraient retarder l'apparition de la résistance aux endoperoxydes, en bloquant l'un des mécanismes de l'adaptation du parasite au choc oxydant.

**QUATRIEME PARTIE :**  
**MATERIELS ET METHODES**

## CHAPITRE 1 : PRODUCTION ET ISOLEMENT DES PARASITES

### 1.1. SOUCHES DE PARASITES UTILISEES

Nous avons utilisé 5 espèces de *Plasmodium* dans le cadre de ce travail.

#### Plasmodium humain:

*Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), parasitant les hématies humaines:

- souche FCR3, originaire de Gambie (Jensen et Trager, 1978) (partiellement résistante à la chloroquine)

#### Plasmodium de rongeurs:

*Plasmodium berghei* (Vincke et Lips, 1948): souche N (sensible à la chloroquine)

*Plasmodium yoelii nigeriensis* (Killick-Kendrick, 1973): souche DF2

*Plasmodium vinckei* (Rodhain, 1952): souche PV80

Nous avons également utilisé une espèce de *Plasmodium* de rongeurs dont la particularité est d'avoir chez la souris un cycle naturellement synchrone:

*Plasmodium chabaudi* (Landau, 1965)

Nous avons enfin utilisé deux souches de *Babesia*:

*Babesia hylomysci* (Souche fournie par le Dr Wery, Anvers)

*Babesia divergens* (isolat humain, Rouen, 1987 d'après Gorenflot et coll. 1990)

## 1.2. PRODUCTION DES PARASITES

A l'exception de *Plasmodium falciparum*, parasite humain qui ne peut être entretenu qu'*in vitro*, tous les autres *Plasmodium* et *Babesia hylomysci* sont entretenus *in vivo* chez la souris.

L'entretien de la souche par inoculation de sang contaminé de souris à souris limite strictement le cadre de notre travail au cycle érythrocytaire.

Le dénombrement des parasites est effectué sur frottis (réalisé à partir d'une goutte de culture de *P. falciparum* ou d'une goutte de sang de souris prélevé à la queue) après fixation au méthanol et coloration au Giemsa (Merck) et l'estimation de la parasitémie sur au moins 1000 hématies.

### 1.2.1. Production *in vivo* chez la souris

Les *Plasmodium* de rongeurs et *Babesia hylomysci* sont produits sur souris. On utilise des souris Swiss femelles, pesant 20 à 30g. L'infestation est réalisée par injection intrapéritonéale de  $5 \cdot 10^5$  hématies parasitées provenant d'une souris contaminée (parasitémie d'au moins 50%). Le rythme des passages diffère en fonction de la vitesse de multiplication de la souche utilisée:

- tous les 6 jours pour *P. berghei* et *P. vinckei*
- tous les 5 jours pour *P. chabaudi*
- tous les 4 jours pour *P. yoelii* et *B. hylomysci*

Pour les études, le sang est récupéré quand la parasitémie atteint au moins 50%.

*P. chabaudi* a un cycle synchrone d'environ 24 heures chez la souris, avec la schizogonie se déroulant entre 24 heures et 2 heures du matin. Pour les études envisagées, nous avons donc recueilli des parasites à 3 moments du cycle:

- stade anneau vers 4 heures du matin
- stade jeune trophozoïte vers 11 heures du matin
- stade vieux trophozoïte et schizonte vers 22 heures le soir.

### 1.2.2. Culture de *Plasmodium falciparum in vitro*

La souche FCR3 est cultivée *in vitro* selon la méthode Trager et Jensen (1976) sur des hématies du groupe O+ en milieu RPMI 1640 (Boehringer) additionné d'Hepes 25 mM, de

NaHCO<sub>3</sub> 0,89 mM, de gentamycine 10 mg/ml et de 10% de sérum humain du groupe A+ décomplémenté (milieu complet). Les cultures sont placées à 37°C en atmosphère à 5% d'O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. Dans ces conditions le taux de croissance est de l'ordre de 10 par cycle de 43 à 46 heures.

Pour produire les parasites en masse (Banic, Thèse de Doctorat, 1992) on part de 6 boîtes de culture de 150 cm<sup>2</sup> (parasitémie 4% et hémocrite 6%). Le culot globulaire de 4 boîtes (environ 8 ml) est resuspendu dans 400 ml de milieu complet et cultivé pendant 24 heures dans une boîte de culture de 1200 cm<sup>2</sup> (Doubletray, Nunc). Les cellules sont alors récupérées pour l'extraction des parasites. Les 2 autres boîtes de cultures sont utilisées pour préparer 6 nouvelles boîtes de 150 cm<sup>2</sup> qui serviront au cycle de culture suivant.

### 1.3. ISOLEMENT DES PARASITES

Pour les cultures *in vitro* de *P. falciparum*, l'isolement peut être effectué directement à partir du culot globulaire. Pour les *Plasmodium* et *Babesia* produits *in vivo*, il est nécessaire d'éliminer du sang les globules blancs et les plaquettes avant la purification des parasites. Le sang est prélevé par ponction du sinus sous clavier et recueilli dans du tampon phosphate isotonique contenant de l'héparine. Il est ensuite passé sur une colonne contenant des billes de verre (Braun Melsungen) qui vont adsorber les globules blancs, et de la Diéthylaminoéthylcellulose (DE23, Whatman) qui adsorbent les plaquettes. La suspension globulaire obtenue en sortie de colonne est utilisable pour l'extraction des parasites.

Les hématies sont centrifugées (1500g, 5 min) et lavées 2 fois en tampon phosphate isotonique ou PBS (NaCl 136,9 mM ; KCl 2,7 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM). Le culot est lysé par addition de 10 volumes de PBS contenant 0,01% de saponine (Merck) à température ambiante, pendant 5 min pour les *Plasmodium* et 2 à 3 min pour les *Babesia*. Après centrifugation 10 min à 8800g, les parasites libérés sont lavés une fois en PBS et resuspendus dans du tampon TES (Triéthanolamine 5 mM - EDTA 1 mM - Saccharose 0,25 mM). Afin d'éliminer les hématies non lysées, la suspension de parasites est déposée sur un gradient discontinu de Percoll (Pharmacia) de densité 1,04 et 1,09 et centrifugée pendant 5 min à 4400g. La couche de parasites située à l'interface des densités 1,09 et 1,04 est récupérée dans du TES et centrifugée 10 min à 8800g. Le culot de parasite est enfin lavé 1 fois en PBS avant d'être congelé à -80°C.

## CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'ACTIVITE SOD

### 2.1. PREPARATION DES HOMOGENATS PARASITAIRES

#### 2.1.1. Lyse des parasites

Les parasites sont traités par sonication douce (Sonics and Materials) pendant 5 min sur glace pilée dans un tampon de lyse [tampon phosphate mono/disodique 50 mM, pH 7,4; EDTA 2 mM ; PMSF 1 mM ; aprotinine (Boehringer) 0,1 mg/ml ; leupeptine (Boehringer) 1 mM]. Après ultracentrifugation à 100 000g (Beckman rotor 70 TI) pendant 1 heure, le surnageant (20 à 30 ml) est dialysé et concentré à 4°C contre du tampon phosphate mono/disodique 50 mM à pH 7,8 avec un seuil d'exclusion à 15000 (Microprodicon PM 15000). L'extrait brut obtenu est stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

Les parasites ont été également lysés par 3 cycles de congélation dans l'azote liquide et décongélation, puis par sonication brève pendant 1 min. Ces conditions ont été abandonnées pour les raisons signalées dans les résultats expérimentaux p 87.

#### 2.1.2 Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant l'albumine sérique bovine (Boehringer) pour réaliser la courbe étalon à partir d'une solution aqueuse de 1 mg/ml de protéine, avec une gamme de concentration finale de 2, 4, 6, 8 et 10 µg/ml. On ajoute dans chaque tube 2,5 ml de solution de bleu de Coomassie (Bio Rad), diluée 5 fois dans de l'eau distillée. Le blanc est réalisé par 2,5 ml de solution de bleu de Coomassie dilué. Le dosage est effectué sur 5 µl d'échantillon dilué ou non pour rester dans les limites de la gamme étalon. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm et reportée sur la courbe étalon.

#### 2.1.3. Dosage de l'hémoglobine

La concentration d'hémoglobine est déterminée en utilisant le réactif de Drabkin (Bessis, 1972).

La solution de Drabkin diluée (NaHCO<sub>3</sub> 1g/l ; KCN 0,05g/l ; K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub> 0,2g/l) doit être conservée à 4°C et à l'obscurité. La réaction s'effectue en traitant 20 µl de lysat parasite

par 2,5 ml de solution de Drabkin diluée. Le blanc est constitué par la solution de Drabkin diluée. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 540 ou 546 nm après 10 min d'incubation à température ambiante. La concentration d'hémoglobine est donnée par la formule suivante:

$$\frac{DO_x \times 126}{0,70} = \text{mg d'hémoglobine /ml (Thèse de Doctorat de Aissi-Yehouessi, 1983)}$$

## 2.2. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE SOD SUR GELS

### 2.2.1. Isoélectrofocalisation

Les isoélectrofocalisations sont réalisées soit à partir de gels du commerce (Serva Feinbiochemica), soit à partir de gels préparés au laboratoire. Les gels commercialisés, d'une épaisseur de 300  $\mu\text{m}$ , contiennent 5% d'acrylamide et 3% de N,N'-méthylène bisacrylamide et renferment 5% d'ampholine Servalyt permettant d'obtenir un gradient de pH allant de 3 à 10. Pour les gels préparés au laboratoire, une solution mère à 30% d'acrylamide et 0,8% de bisacrylamide est diluée dans l'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 6% d'acrylamide. On ajoute 3% d'ampholine Servalyt de pH 3 à 10 (Serva). Le gel est coulé entre 2 plaques de verre séparées de 0,75 mm par une bande caoutchouc qui sert d'espaceur et assure l'étanchéité. Après 1 heure de polymérisation, le gel est démoulé et placé sur une feuille de plastique de même taille. Le gel est installé sur un système de migration horizontale (LKB 2117 Multiphor system). Une bande de silicone standard (Serva) permet le dépôt des échantillons à la surface du gel (dépôt de 15  $\mu\text{l}$ ). En haut et en bas du gel sont déposées des bandes de papier inbibées de tampons respectivement à pH 3 et à pH 10 (Anode fluid 3 et cathode fluid 10, Serva). La migration est réalisée pendant 4 heures en courant constant adapté selon l'épaisseur du gel (respectivement 0,05 et 0,1  $\text{mA}/\text{cm}^2$  pour les gels de 0,3 mm et 0,75 mm). Le gradient de pH se constitue au cours des 30 premières minutes pendant que les échantillons pénètrent dans le gel. Au bout de ces 30 min, la bande en silicone est retirée et la migration est poursuivie pendant 3h30.

La calibration est réalisée en déposant des marqueurs de points isoélectriques (Serva).

### 2.2.2. Electrophorèse verticale en conditions non dénaturantes

Le gel inférieur de 0,75 mm d'épaisseur à 7,5% en acrylamide dans un tampon Tris/HCl 375 mM pH 8,8 est coulé entre 2 plaques de verre. Le gel de concentration à 5% d'acrylamide est préparé dans le même tampon. Les échantillons sont repris dans un tampon (Tris/HCl 62,5 mM pH 8,8 ; saccharose 10% ; bleu de bromophénol 0,2%). La migration est réalisée à 4°C en tampon de migration (Tris 25 mM/glycine 192 mM, pH 8,6) pendant 2 heures à 30 mA.

### 2.2.3. Révélation de l'activité SOD

La révélation de l'activité SOD sur les gels est réalisée selon la technique de Beauchamp et Fridovich (1971) que nous avons légèrement modifiée. Le principe de la réaction repose sur la transformation du Nitro Bleu de Tétrazolium (NBT) en bleu de formazan insoluble, en présence d'anion superoxyde. Le radical est produit par réaction entre l'oxygène et la riboflavine en présence de lumière. La SOD, en détruisant localement l'anion superoxyde, empêche la formation du bleu de formazan et se manifeste par une zone non colorée dans le gel.

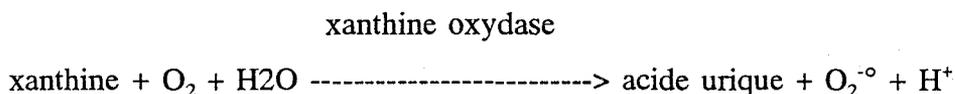
Le gel est immergé dans une solution de NBT (Sigma) à 250 mg/l d'eau distillée pendant 20 min, puis dans un tampon (phosphate mono/disodique 0,05 M, pH 7,8 ; Temed (Merck) 0,028 M ; riboflavine (Sigma) 28  $\mu$ M) pendant 15 min. Ces tampons doivent être strictement protégés de la lumière. Les 2 incubations sont également effectuées à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après avoir éliminé le liquide du deuxième bain, le gel est exposé à une lumière de 18 W pendant 5 à 10 min jusqu'à un maximum de contraste entre le fond bleu du gel et les zones non colorées correspondant à l'activité SOD.

Pour étudier l'action des inhibiteurs spécifiques de l'activité SOD, la coloration est réalisée soit en présence de 2 mM KCN ajouté au tampon phosphate de sodium contenant Temed et riboflavine, soit en présence de 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté aux 2 solutions de révélation.

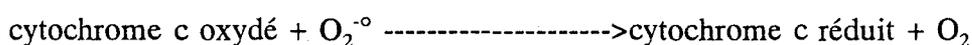
## 2.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE SOD

### 2.3.1. Méthode au ferricytochrome c (Mc Cord et Fridovich, 1969)

L'activité SOD peut être déterminée en mesurant le taux de réduction du cytochrome c par l'anion superoxyde produit lors de l'oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase.



Le cytochrome c réduit lors de la réaction est détecté à 550 nm. On mesure sa vitesse d'apparition qui est diminuée par la présence de SOD.



#### 2.3.1.1. Réactifs

##### Solution A:

tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,216 M pH 7,8  
 EDTA disodique 10,7 mM  
 xanthine (Sigma) 0,108 mM  
 cytochrome c type VI (Sigma) 1,1 mM

##### Solution B:

xanthine oxydase (Sigma) 0,05 unités/ml d'eau distillée

Les solutions doivent être préparées extemporanément: la solution A doit être maintenue à l'obscurité et la solution B doit être maintenue sur glace pilée pendant le dosage.

#### 2.3.1.2. Protocole de dosage

La réaction s'effectue dans un volume final de 3 ml et à une température de 25°C. Les solutions A et B sont préalablement équilibrées à 25°C.

- Le témoin blanc (T<sub>0</sub>) :

Avant de commencer tout dosage, nous réalisons un témoin blanc en absence de SOD pour déterminer la quantité de xanthine oxydase à utiliser. Cette quantité sera ensuite constante durant tout le dosage:

cuve témoin: 2,8 ml de solution A + x µl de solution B (au maximum 100 µl), complété à 3 ml. Le volume de solution B (x) doit être tel que la variation de densité optique par minute ( $\delta DO_{550}$ ) soit de  $0,025 \pm 0,005$  en absence de SOD.

La réaction est initiée par l'addition de la solution B. On effectue une mesure au bout de 30 secondes, puis 4 autres mesures pendant 2 min, soit une mesure toutes les 30 secondes. Nous obtenons ainsi 5 valeurs d'absorbances A1, A2, A3, A4, A5 qui doivent être alignées et la  $\delta DO/\text{min}$  est calculée de la manière suivante:

$$A2 - A1 \times 5 / 2 = \delta DO1 / \text{min}$$

$$A3 - A2 \times 5 / 2 = \delta DO2 / \text{min}$$

$$A4 - A3 \times 5 / 2 = \delta DO3 / \text{min}$$

$$A5 - A4 \times 5 / 2 = \delta DO4 / \text{min}$$

$$\delta DO / \text{min moyenne} = \frac{\Sigma \delta DO}{4}$$

-La courbe étalon

Cette courbe est réalisée avec une gamme de concentration de SOD Cu/Zn d'hématie bovine (Sigma). La variation de densité optique pour chaque concentration de SOD est calculée. A partir de cette valeur, nous calculons le pourcentage d'inhibition de la réduction du cytochrome c par la SOD avec la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition du cytochrome c} = \frac{\delta DO T_0 - \delta DO T_x}{\delta DO T_0} \times 100$$

T<sub>0</sub> correspond au témoin blanc défini et T<sub>x</sub> à la concentration de SOD bovine ou de l'échantillon à doser.

La gamme de concentration de SOD utilisée est la suivante:

1    2,5    5    7,5    10    15    20  $\mu\text{g/ml}$

100  $\mu\text{l}$  de chaque solution de cette gamme sont utilisés.

La variation du pourcentage d'inhibition de la réduction du cytochrome c en fonction de la concentration de SOD constitue la courbe étalon. Une unité d'activité enzymatique de SOD est définie comme la quantité d'enzyme qui inhibe de 50% la réduction du cytochrome c.

1 unité d'activité SOD correspond approximativement à 0,42  $\mu\text{g}$  de SOD bovine.

#### -Le dosage de l'échantillon

A 2,8 ml de solution A sont ajouté x  $\mu\text{l}$  de l'échantillon à doser et la quantité de xanthine oxydase préalablement déterminée. Le volume est complété à 3 ml final avec de l'eau déminéralisée (résistivité de 16 milli  $\Omega$ ).

Après lecture au spectrophotomètre, on calcule le pourcentage d'inhibition de la réduction du cytochrome c comme dans le cas précédent. L'activité SOD dans l'échantillon peut être alors déterminée à partir de la courbe étalon.

#### - Le dosage de l'échantillon en présence d'inhibiteurs

L'action du KCN est étudiée en ajoutant au milieu réactionnel une concentration finale de 1 mM de KCN (20  $\mu\text{l}$  de KCN 0,3M).

L'action de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne peut être testée directement du fait de la sensibilité du cytochrome c à ce produit. On ajoute donc volume à volume une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  4 mM à l'échantillon de façon à obtenir une concentration finale de 2 mM et on incube à 25°C pendant 5 min avant d'effectuer le dosage. Dans ces conditions, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ajouté est suffisamment dilué pour ne pas interférer avec le cytochrome c.

### **2.3.2. Méthode au pyrogallol (Marklund et Marklund, 1974)**

L'activité SOD peut être aussi déterminée en mesurant le taux d'auto-oxydation du pyrogallol en milieu alcalin par l'anion superoxyde. Le pyrogallol oxydé lors de la réaction est détecté à 420 nm. On mesure sa vitesse d'apparition qui est diminuée en présence de SOD. Nous avons utilisé cette technique pour le dosage de la SOD dans des extraits parasitaires et pour la détection d'activité au cours de la purification de la SOD.

### 2.3.2.1. Réactifs

#### Solution A:

Tampon Tris 50 mM- acide cacodylique, pH 8,2

Diéthylène Triamine Penta Acétique ou DTPA 1 mM

Le Tris est dissous dans 90% du volume final du tampon. On ajoute ensuite l'acide cacodylique en poudre jusqu'à obtenir un pH de 8,2.

#### Solution B:

solution mère de Pyrogallol 120 mM dans HCl 0,01 N

Pour le dosage, on utilise une solution de Pyrogallol 6 mM dans HCl 0,01 N

Les solutions doivent être préparées extemporanément et la solution B est conservée à 4°C à l'obscurité.

### 2.3.2.2. Protocole de dosage

La réaction s'effectue dans un volume final de 2 ml et à une température de 30°C. De même le tampon Tris-acide cacodylique est préalablement équilibrée à 30°C.

#### - Le témoin blanc ( $T_0$ ) :

Comme pour le dosage au cytochrome c, nous réalisons un témoin blanc en absence de SOD pour déterminer la quantité de solution de pyrogallol 6 mM à ajouter dans le milieu réactionnel, pour avoir une variation de  $DO_{420} / \text{min}$  de  $0,020 \pm 0,005$ . Cette quantité sera ensuite constante durant tout le dosage:

On prend 1,8 ml de solution A + le volume nécessaire de solution B (au maximum 100  $\mu\text{l}$ ), le tout complété à 2 ml avec de l'eau déminéralisée.

Les temps de lecture sur le spectrophotomètre (Uvikon) sont identiques à celles utilisées pour la méthode de dosage au cytochrome c, à savoir 5 mesures d'absorbance en 2 min.

Pour doser les fractions lors de la purification de la SOD, l'activité est détectée sur 5 mesures d'absorbance réparties sur 1 min. A partir des 5 valeurs d'absorbance, la variation de DO/min est calculée.

- La courbe étalon

Cette courbe est réalisée avec la SOD Cu/Zn d'hématie bovine (Sigma) dans les mêmes conditions que précédemment. La variation de DO/min pour chaque concentration de SOD est calculée. A partir de cette valeur, nous calculons le pourcentage d'inhibition de l'autoxydation du pyrogallol par la SOD avec la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\delta \text{ DO } T_0 - \delta \text{ DO } T_x}{\delta \text{ DO } T_0} \times 100$$

$T_0$  correspond au témoin blanc défini et  $T_x$  à la concentration de SOD bovine ou de l'échantillon à doser.

La variation du pourcentage d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol en fonction de la concentration de SOD constitue la courbe étalon. Une unité d'activité enzymatique de SOD est définie comme la quantité d'enzyme qui inhibe de 50% l'auto-oxydation du pyrogallol.

- Le dosage de l'échantillon

A 1,8 ml de solution A est ajouté  $x \mu\text{l}$  de l'échantillon à doser et la quantité de pyrogallol déterminée précédemment. Lors de la purification de la SOD, nous utilisons 100  $\mu\text{l}$  de chaque fraction éluée des colonnes pour détecter une activité.

Après lecture au spectrophotomètre et les calculs effectués comme précédemment, l'activité SOD dans l'échantillon peut être déterminée à partir de la courbe étalon.

- Le dosage de l'échantillon en présence d'inhibiteurs

La mesure est effectuée en présence de KCN ou d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ajoutés à 1 mM final dans la solution A. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'agissant pas sur le pyrogallol, comme sur le cytochrome c, le test d'inhibition peut être réalisé directement.

### **2.3.3. Préparation du témoin globule rouge**

Pour mesurer l'activité SOD dans les hématies, il est indispensable d'éliminer l'hémoglobine car celle-ci peut mimer une activité SOD dans les deux méthodes de dosage utilisées. Nous avons précipité l'hémoglobine en utilisant la technique de Winterbourn (1975).

Le culot de globules rouges murins ou humains est lysé dans 9 volumes d'eau distillée glacée. Après une centrifugation rapide à 1500g, 0,4 ml d'éthanol et 0,4 ml de chloroforme froids (-20°C) sont ajoutés à 1 ml du lysat placé sur glace pilée. L'ensemble est agité 1 min au vortex, puis centrifugé 20 min à 2500g. La phase éthanolique, renfermant l'activité SOD Cu/Zn du globule rouge, est ensuite récupérée et dialysée contre du PBS pendant 24 heures.

## CHAPITRE 3 : PURIFICATION ET MICROSEQUENCAGE DE LA SOD

La différence biologique fondamentale qui existe entre *Plasmodium* et *Babesia*, à savoir que seul *Plasmodium* internalise le contenu de l'hématie hôte, nous a incités à purifier la SOD des parasites par deux approches différentes.

### 3.1. PURIFICATION DE LA SOD DE *BABESIA HYLOMYSCI*

A partir d'un extrait brut, l'enzyme est purifiée en 4 étapes successives:

- une chromatographie échangeuse d'ions
- une gel filtration ou chromatographie d'exclusion
- une électrophorèse préparative en conditions non dénaturantes avec électroélution de la bande d'activité SOD
- une électrophorèse en SDS-PAGE qui est identique pour les deux méthodes de purification et qui sera expliquée plus loin

#### 3.1.1. Chromatographie échangeuse d'ions

Une colonne (IBF) de 1,5 cm de diamètre contenant une résine de Diéthylaminoéthyl ou DEAE-Trisacryl (IBF) (14 cm de hauteur de gel) est équilibrée à 4°C par du tampon Tris/HCl 0,01 M pH 7,8. L'extrait brut de *Babesia hylomysci* est déposé à la surface du gel. Après un rinçage par 1 volume de colonne avec le même tampon, les protéines sont éluées à 4°C par un gradient linéaire de NaCl (0 à 0,5 M) avec une pente de 5 mM/cm de colonne (débit de 16 ml/heure), en fractions de 1,5 ml. La sortie des protéines est contrôlée par un détecteur UV à 280 nm (LKB) relié à un enregistreur. L'activité SOD est mesurée par la méthode au pyrogallol dans chaque fraction. Toutes les fractions montrant une activité sont alors rassemblées et concentrées à 4°C en Microprodicon PM 15000 contre de l'eau distillée et constituent l'extrait P1.

### 3.1.2. Gel filtration

Une colonne de Sephadex G100 (Pharmacia) de 1,5 cm de diamètre et 50 cm de haut est équilibrée à 4°C avec un tampon Tris/HCl 0,05 M pH 7,4 contenant 0,1 M NaCl. Elle est calibrée avec différents marqueurs de poids moléculaire connu (Sigma): le bleu dextran (2000 kDa), la bêta-galactosidase (116 kDa), l'albumine sérique bovine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique (29 kDa) et le cytochrome c (12,4 kDa). On calcule le rapport volume d'éluion  $V_e$  des différents marqueurs / volume mort  $V_o$  de la colonne obtenu par l'exclusion du bleu dextran. La courbe linéaire de calibration correspond à la fonction ( $V_e/V_o = f(\log \text{ du poids moléculaire})$ ).

L'extrait P1 est dilué 2 fois dans du tampon Tris/HCl 0,1M pH 7,4 contenant 0,2 M NaCl, puis déposé à la surface de la colonne. Les protéines sont éluées à 4°C par le tampon d'équilibration (débit 12 ml/heure) et collectées en fraction de 1 ml. L'éluion est suivie à 280 nm. Les fractions contenant une activité SOD sont alors rassemblées et concentrées comme précédemment pour donner l'extrait P2. Le poids moléculaire de l'enzyme native peut être estimé en rapportant, sur la courbe de calibration de la colonne, la valeur du  $V_e$  du pic d'activité de SOD /  $V_o$ .

### 3.1.3. Electrophorèse préparative et électroéluion

L'extrait P2 est soumis à une électrophorèse préparative en conditions non dénaturantes (voir p 160). L'activité SOD est révélée selon la technique de Beauchamp et Fridovich décrite plus haut. La bande non colorée révélant la présence de la SOD est alors découpée et l'enzyme est électroéluée du gel dans une cuve ISCO (ISCO electroelution cup, ISCO Inc, Lincoln, Ne 68 505) en tampon Tris 0,12 M/glycine 0,04M pH 9,2 sous une puissance constante de 3 watts par cuve pendant 4 heures. L'éluat constitue l'extrait P3.

### 3.2. PURIFICATION DE LA SOD DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

L'homogénat de *Plasmodium* renferme des protéines contaminantes de l'hématie dont de l'hémoglobine non digérée et de la SOD Cu/Zn. C'est pourquoi la gel filtration est pratiquée en tête et permet de séparer en grande partie la SOD endogène de *Plasmodium* de l'hémoglobine et de la SOD Cu/Zn de l'hôte.

A partir d'un extrait brut, l'enzyme est purifiée en 4 étapes successives:

- une gel filtration
- une chromatographie échangeuse d'ions
- une électrophorèse préparative en conditions non dénaturantes et électroélution
- une électrophorèse en SDS-PAGE

#### 3.2.1. Gel filtration

Une colonne de Sephadex G75-50 (Sigma) de 2,5 cm de diamètre et 92 cm de haut est équilibrée par du tampon Tris/HCl 0,01 M pH 7,8 à 4°C et calibrée avec les marqueurs de poids moléculaire utilisés précédemment (la bêta-galactosidase exclue). La courbe  $V_e/V_0 = f(\log \text{ poids moléculaire})$  est alors tracée.

L'extrait brut de *Plasmodium falciparum* est déposé à la surface de la colonne. Les protéines sont éluées par le tampon Tris/HCl 0,01 M pH 7,8 à 4°C, avec un débit de 10 ml/heure et leur sortie est suivie à 280 nm. L'activité SOD est mesurée dans chacune des fractions de 2 ml par la méthode au pyrogallol avec ou sans KCN. Les seules fractions contenant de la SOD KCN résistante sont rassemblées et concentrées en Microprodicon PM 15000 contre du tampon Tris/HCl 0,01 M pH 7,8 à 4°C (extrait P1).

#### 3.2.2. Chromatographie échangeuse d'ions

L'extrait P1 est déposé sur une colonne DEAE-Trisacryl (IBF) de 1,5 x 8 cm préalablement équilibrée avec du Tris/HCl 0,01 M pH 7,8. Après un lavage par un volume de colonne du même tampon, les protéines sont éluées par un gradient de NaCl (0 à 0,25 M) avec une pente de 5 mM/cm et un débit de 20 ml/heure. La détection de l'activité SOD est réalisée dans chacune des fractions de 1,5 ml et celles renfermant une activité résistante au KCN sont rassemblées puis concentrées à 4°C contre de l'eau distillée (extrait P2).

### 3.2.3. Electrophorèse préparative et électroélution

Après une électrophorèse préparative en conditions non dénaturantes, puis révélation de l'activité SOD, les bandes de gel contenant l'enzyme sont découpées et les protéines sont électroéluées comme précédemment (extrait P3).

## 3.3. CONTROLE DE LA PURIFICATION

### 3.3.1. Electrophorèse en SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Un gel de séparation de 0,75 mm d'épaisseur à 12% d'acrylamide dans un tampon (Tris/HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1%), est coulé entre 2 plaques de verre (grand gel) ou entre une plaque de verre et d'alumine (mini gel). Le gel de concentration à 5% d'acrylamide est préparé dans un tampon (Tris/HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1%). Les échantillons sont dilués dans un tampon de reprise (Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% ; saccharose 10% ; bleu de bromophénol 0,2%). Selon les cas on peut ajouter 0,1 M de dithiothréitol. Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min. L'électrophorèse est réalisée en courant constant à 30 mA pendant 2 heures pour les grands gels et 30 minutes pour les mini gels.

Le gel est calibré à l'aide de dépôts de marqueurs de poids moléculaire (LMW kit de Pharmacia).

### 3.3.2. Coloration des protéines au nitrate d'argent (Merril et coll. 1981)

Les protéines sont fixées dans le gel successivement par une solution contenant 50% de méthanol et 12% d'acide acétique pendant 30 min, puis par 3 bains de 10 min dans 10% d'éthanol et 5% d'acide acétique. Le gel est ensuite trempé pendant 5 min dans une solution contenant 3,4 mM de  $K_2Cr_2O_7$  et 3,2 mM d' $HNO_3$ . Après avoir été rincé plusieurs fois à l'eau bidistillée, le gel est trempé dans une solution de 12 mM de nitrate d'argent sous agitation pendant 30 min. La révélation des protéines est réalisée par une solution de 0,28 M de carbonate de sodium contenant 0,5 ml/l de formaldéhyde à 37%. La coloration est arrêtée par de l'acide acétique à 1% puis le gel est rincé à l'eau avant d'être séché.

### 3.4. MICROSEQUENCAGE

Après la dernière étape de la purification, l'extrait P3 est concentré par centrifugation sous vide (Speed Vac, Savant). L'extrait concentré est repris dans le tampon de reprise (voir p 170) contenant 0,1M de dithiothréitol comme agent réducteur, puis chauffé à 95°C pendant 5 min, avant d'être soumis à une électrophorèse en SDS-PAGE en gel de 1,5 mm d'épaisseur (cf. ci dessus).

Après l'électrophorèse, l'enzyme est transférée du gel vers une membrane de polyvinylène difluoride (PVDF, Applied Biosystem). Le transfert est effectué en tampon Tris 50 mM/Borate 50 mM, pH 8,6 pendant 18 heures à 25 volts (cuve Bio Rad).

Après l'électrotransfert, la membrane de PVDF est colorée (Bleu de Coomassie 0,01%; acide acétique 5% ; méthanol 35%), puis séchée à l'air. La bande correspondant à la SOD est découpée et placée directement dans un séquenceur phase gaz (type 470 A, Applied Biosystem). Les phénylthio-hydantoïne acides aminés, obtenus selon la dégradation d'Edman (1956), sont analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) couplée au séquenceur. Le microséquencage de la SOD a été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand (Pr. Josef Van Beeumen).

## CHAPITRE 4: PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-SOD DE *BABESIA* ET *PLASMODIUM*

### 4.1. PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ANTI-SOD DE *PLASMODIUM*

La détermination de la séquence N-terminale de la SOD de *P. falciparum* nous a permis de faire synthétiser un peptide correspondant aux 20 premiers acides aminés (V20E) par la firme Neosystem.

#### 4.1.1. Couplage du peptide à une protéine porteuse

Le couplage est réalisé selon la technique de Goodfriend (1964), utilisant le carbodiimide. Ce réactif permet de lier le peptide par son extrémité C-terminale sur la protéine porteuse et donc de laisser l'extrémité N-terminale libre.

Le peptide est dissous dans l'Hepes 50 mM pH 8,5, à raison de 0,2 mg de peptide par ml de tampon. Pour permettre la réaction exclusive du carbodiimide sur le groupement carboxyle libre du peptide, il est nécessaire de protéger les groupements aminés libres du peptide en utilisant l'anhydride citraconique (Sigma), à raison de 10 moles d'anhydride par mole de fonction amine libre du peptide. La solution est stabilisée à pH 9,0 par NaOH 1M, puis incubée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation rotative (Labover). L'agent de couplage, le 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl)carbodiimide (Sigma) est ensuite ajouté à la solution de peptide à une concentration finale de 10mg/ml. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante sous agitation rotative. La protéine porteuse (albumine sérique bovine: BSA; ovalbumine: OVA) préalablement dissoute dans un tampon phosphate de potassium 0,2M pH 7,4 est ensuite ajoutée au mélange, à raison de 1 mole de protéine porteuse pour 10 moles de peptide. Après une incubation de 3 heures à température ambiante et sous agitation rotative, le mélange est dialysé une première fois contre de l'acide acétique à 5% pendant 3 heures à 4°C afin de libérer les groupements aminés du peptide, puis une seconde fois contre le PBS pendant 24 heures à 4°C pour éliminer l'acide acétique.

#### 4.1.2. Immunisation des lapins

Les lapins sont immunisés par voie intradermique à raison d'une injection toutes les 2 semaines. Les animaux reçoivent d'abord 3 injections de 0,5 mg du peptide couplé (V20E-BSA), dont la première avec adjuvant complet de Freund et 4 mg de mycobactéries (BCG) et les deux autres avec l'adjuvant incomplet de Freund. Deux autres rappels avec 0,5 mg de peptide libre avec adjuvant incomplet de Freund sont injectés aux lapins.

#### 4.1.3. Détection des anticorps spécifiques

##### 4.1.3.1. ELISA

Une plaque de 96 puits est sensibilisée par 0,1 µg/puits d'antigène (V20E-BSA ou BSA ou V20E-OVA ou OVA) dilué dans un tampon carbonate-bicarbonate 50 mM pH 9,6, pendant une nuit à 4°C. La plaque est ensuite saturée 1 heure à 37°C avec du PBS contenant 5% de lait écrémé, puis lavée 2 fois avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20. Les sérums dilués préalablement dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20 sont ajoutés dans chacun des puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la plaque est lavée 3 fois avec le PBS-Tween 20. L'anticorps anti-immunoglobulines de lapin, conjugué à une peroxydase (Zymed, californie, USA) est dilué au 1/3000<sup>e</sup> dans le PBS-Tween et ajouté à chaque puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C et 3 lavages, l'activité peroxydasique est révélée en utilisant le o-phenylènediamine comme substrat (0,4 mg/ml dans un tampon citrate 0,2 M/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05M pH 5 contenant 1,5 µl/ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%). La réaction colorée est arrêtée en ajoutant 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N par puits. La densité optique à 492 nm est mesurée pour chaque puits par un lecteur ELISA automatique (J Bio).

##### 4.1.3.3. Electrotransfert et Immunoempreinte (Western Blot)

Cette technique a pour but de mettre en évidence, par les anticorps anti-V20E, la SOD de *P. falciparum* à partir d'un extrait brut ou d'extraits partiellement purifiés, après une électrophorèse en SDS-PAGE.

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (LKB) selon la méthode de Towbin et coll. (1978). Le gel de séparation est placé sur une membrane de nitrocellulose et l'ensemble est inséré entre deux séries de feuilles de papier Watman n°3, imbibées par un tampon de transfert (Tris 48 mM/glycine 39 mM; SDS 0,0375%; méthanol 20%). Le transfert

est réalisé sous ampérage constant ( $0,8 \text{ mA/cm}^2$ ) pendant 1 heure. Après transfert, la membrane de nitrocellulose est colorée 10 min par une solution de rouge ponceau 0,2% dans 3% d'acide trichloroacétique, puis rincée à l'eau.

La détection de protéines spécifiques transférées s'effectue par révélation immunochimique. La feuille de nitrocellulose est découpée en bandelettes, puis celles-ci sont incubées 30 min dans un tampon TNT (Tris/HCl 15mM pH 8 ; NaCl 0,14 M ; Tween 20 0,05%) contenant 1% de gélatine, afin de saturer la bande et d'éviter toute adsorption non spécifique sur la nitrocellulose. Les sérums de lapins utilisés à différentes dilutions dans le TNT sont ajoutés et les bandelettes sont incubées 2 heures à température ambiante. Après 3 lavages de 10 min avec du TNT contenant 1M de NaCl, chaque bandelette est incubée pendant 1 heure à température ambiante, en présence d'un anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G de lapin conjugué à la phosphatase alcaline, dilué au 1/7500<sup>e</sup> dans le TNT. Les bandelettes sont à nouveau lavées avec du TNT contenant 1M de NaCl. La phosphatase alcaline est ensuite révélée à l'obscurité en présence de BCIP (Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate) et de NBT (Kit Promega). La réaction est arrêtée par un lavage des bandelettes à l'eau distillée.

#### 4.1.3.2. Epuisement du sérum contre la BSA

Pour éliminer les anticorps dirigés contre la protéine porteuse, nous avons préparé une colonne sur laquelle la BSA est greffée.

Le couplage est réalisé avec 0,6g de Sépharose CL 4B (Pharmacia) préactivé par le BrCN et 20 mg de BSA dissoute dans le tampon de couplage ( $\text{NaHCO}_3$  0,1M ; NaCl 0,5M pH 8,6) pendant 3 heures à température ambiante et sous agitation rotative. Le gel est ensuite centrifugé et la concentration de BSA non couplée présente dans le surnageant est estimée par lecture de la D.O à 280 nm. Pour bloquer les sites actifs non occupés par la BSA, le gel est alors incubé toute la nuit à 4°C dans du Tris/HCl 0,1M pH 8. On lave ensuite successivement pendant 10 min dans du tampon acide (acétate de Na 0,1 M pH 4 ; NaCl 0,5 M) et le tampon de couplage ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M pH8,6 ; NaCl 0,5 M). L'opération est répétée en tout trois fois. Le gel est ensuite équilibré avec du PBS.

Par passage du sérum sur la colonne Sépharose couplée à la BSA, les anticorps dirigés contre la protéine porteuse sont adsorbés et la fraction non retenue, contenant les anticorps dirigés contre le peptide, est testée en ELISA et en Western Blot.

## 4.2. IMMUNOLOCALISATION DE LA SOD INTERNALISEE PAR LE PARASITE

Nous avons utilisé un anticorps monoclonal du commerce (Janssen Biochimica), reconnaissant la SOD Cu/Zn humaine uniquement sous la forme dimérique. Pour cette raison, nous avons dû travailler dans des conditions permettant de préserver au mieux la structure native de l'enzyme dans les échantillons étudiés.

### 4.2.1. Préparation des coupes (Tokuyasu, 1980; Griffiths, 1984)

Une culture de *P. falciparum* à 30% de parasitémie est fixée pendant 30 min à 4°C dans 4% de paraformaldéhyde et 0,1% de glutaraldéhyde. Après plusieurs lavages en PBS, le culot d'hématies est incubé une nuit à 4°C dans un préservateur constitué par un tampon phosphate mono/disodique pH 7,4 ; sucrose 2,3 M et polyvinylpyrrolidone 20%. Le culot de cellules est ensuite disposé en forme de cône sur un clou en aluminium, avant d'être congelé dans l'azote pateux à -196°C.

A l'aide d'un cryo-ultramicrotome (Reichert), des coupes d'une épaisseur d'environ 60 nm sont réalisées, recueillies sur une goutte de sucrose 2,3 M, puis déposées sur des grilles membranées. Les grilles sont alors rincées et saturées toute la nuit à 4°C dans du PBS contenant 1% d'ovalbumine (PBSO).

### 4.2.2. Réaction immunologique

Après une incubation d'une heure à 37°C avec l'anticorps monoclonal anti-SOD Cu/Zn, dilué au 10<sup>ème</sup> dans du PBSO, les coupes sont lavées 6 fois 5 min dans le PBSO, puis réincubées 1 heure à 37°C avec un anticorps de lapin anti-immunoglobulines de souris (Miles), dilué au 1/500<sup>e</sup> dans le PBSO. Après lavages, les coupes sont enfin incubées 1 heure à 37°C avec la protéine A couplée à des particules d'or de diamètre d'environ 5 nm, diluée au 1/25<sup>e</sup> dans le PBSO. Après 5 lavages dans le PBSO, 1 fois dans le PBS, puis 2 fois brièvement dans l'eau, les coupes sont traitées successivement par un bain de méthylcellulose à 2% pendant 5 min, puis par un autre bain contenant 3 volumes de méthylcellulose pour 1 volume d'acétate d'uranyle à 2% pendant 5 min. Les coupes sont séchées à l'air, puis observées au microscope électronique à transmission (Hitachi H 600). Des réactions avec le second anticorps (lapin anti-souris) et/ou la protéine A sont réalisées comme témoins à chaque expérience.

## CHAPITRE 5: APPROCHE MOLECULAIRE

### 5.1. PREPARATION DE L'ADN GENOMIQUE DE *Plasmodium falciparum*

Un culot d'environ  $2,5 \cdot 10^9$  parasites est resuspendu dans 10 ml de tampon d'extraction (Tris 7,5 mM pH 8 ; EDTA 7,5 mM ; SDS 10%) contenant 20 mg/ml de protéinase K (Interchim) et incubé à 50°C pendant une nuit. Après une extraction des protéines au phénol/chloroforme, l'ADN présent dans la phase aqueuse est précipité par 1/10<sup>e</sup> de volume d'acétate de sodium 3M, pH 6 et 2 volumes d'éthanol absolu conservé à -20°C, puis enroulé sur une baguette de verre stérile. Après un lavage dans l'éthanol à 70°C à -20°C, l'ADN est redissous dans du tampon TE (Tris/HCl 10mM, pH 7,5 ; EDTA 1mM).

La concentration de l'ADN est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm, en sachant que 1 unité de D.O correspond à une concentration de 50µg/ml.

### 5.2. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)

#### 5.2.1. Préparation des amorces de PCR

La synthèse des oligonucléotides a été réalisée par la société Eurogentec. Une solution de chaque oligonucléotide est préparée à la concentration de 100 µM.

La séquence en acides aminés des 2 amorces synthétisées correspondent à 2 régions très conservées des SOD-Fe et Mn. La séquence nucléotidique des amorces a été sélectionnée en tenant compte de la fréquence d'apparition des codons chez *P. falciparum* (Hyde et coll. 1989).

L'amorce AM1 du côté N-terminal représente la séquence nucléotidique de la séquence protéique H H D K H:

5'- GAA TTC CAT CAT GAT AAA CAT C -3'

EcoRI

L'amorce AM2 du côté C-terminal représente la séquence nucléotidique complémentaire de la séquence protéique W E H A Y Y:

5'- ATC GAT ATA ATA TGC ATG TTC CC -3'

ClaI

Deux sites de restriction EcoRI et ClaI ont été rajoutés en 5' respectivement de AM1 et AM2.

### **5.2.2. Réaction d'amplification**

Cette réaction est réalisée avec le kit "Geneamp" (Cetus), contenant les tampons et les nucléotides. Chaque réaction est réalisée avec 1  $\mu$ M d'amorce, 0,25  $\mu$ g d'ADN génomique de *P. falciparum* et 0,5 unités de Taq polymérase (Cetus). Un témoin négatif contient uniquement les 2 amorces et l'enzyme. L'échantillon est soumis à 30 cycles d'amplification dans un appareil automatique (Prem). Chaque cycle est constitué de 1 min 30 de dénaturation de l'ADN à 94°C, puis 1 min 30 à la température d'hybridation des amorces sur l'ADN (50°C), enfin 1 min 30 à 72°C permettant l'extension. Les 30 cycles se terminent par 5 min supplémentaire à 72°C.

### **5.2.3. Analyse du fragment amplifié**

L'analyse électrophorétique des fragments amplifiés à partir de l'ADN génomique est réalisée en gel de 2% d'agarose. Cet agarose est préparé dans du tampon TBE 1X (Tris 90 mM/Borate 90 mM pH 8 ; EDTA 2mM) contenant 0,5  $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium (Sigma). Les échantillons sont déposés avec une solution contenant 50% de glycérol, 50% d'eau et du bleu de bromophénol. La séparation électrophorétique est réalisée en courant constant à 50 mA pendant 2 heures. Les bandes d'ADN amplifié sont visualisées sous U.V grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé. Des marqueurs de poids moléculaires (Boehringer) sont déposés en parallèle.

## **5.3. CLONAGE DU FRAGMENT AMPLIFIÉ**

### **5.3.1. Préparation du fragment amplifié**

Une électrophorèse préparative en gel de 2% d'agarose, préalablement dissous en tampon TAE (Tris 40 mM/Acétate 40 mM, pH 8; EDTA 1mM) est réalisée et la bande correspondant à l'ADN amplifié est excisée. L'ADN est ensuite élué du gel à l'aide du kit "Qiaex" (Qiagen), contenant les tampons et le gel "Qiaex". L'ADN adsorbé sur ce gel, est ensuite élué par du tampon TE.

### 5.3.2. Insertion dans un vecteur plasmidique

Le clonage du produit de PCR dans le plasmide pCR-Script™ SK(+) est réalisé selon la technique de Bauer (1992) avec le kit développé par Stratagene. Le matériel fourni comprend le vecteur prédigéré (10ng/μl), la T4 ligase (4U/μl), l'enzyme de restriction Srf I (5U/μl) et les tampons. Le plasmide porte la résistance à l'ampicilline et l'opéron lactose.

A 50 ng de vecteur pCR-Script sont ajoutés 150 ng de produit de PCR, 4U de T4 ligase et 10U d'enzyme Srf I et l'ensemble est laissé en contact 1 heure à température ambiante. L'échantillon est ensuite chauffé pendant 10 min à 65°C afin d'inactiver les enzymes, et conservé sur la glace jusqu'à utilisation pour la transformation.

### 5.3.3. Transformation des bactéries

Les bactéries compétentes *Epicurian Coli*<sup>®</sup> XL1-Blue MRF kan' sont fournies avec le vecteur. Ces bactéries compétentes sont mises en contact avec 25mM de beta-mercaptoéthanol pendant 10 min sur glace. On ajoute alors 10ng d'ADN issu de l'étape de ligation. Après 30 min sur glace, les bactéries subissent un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes.

Les bactéries ainsi traitées sont incubées 1 heure sous agitation à 37°C en milieu SOC (20g/l Tryptone ; 5g/l extrait de levure ; 0,5g/l NaCl ; 2g/l MgCl<sub>2</sub> ; 1,2g/l MgSO<sub>4</sub> ; 3,6g/l glucose), afin de restaurer la résistance à l'antibiotique exprimée par le plasmide, avant d'être étalées sur le milieu LB agar (10g/l tryptone ; 5g/l extrait de levure; 10g/l NaCl ; 20g/l Bactoagar) à pH 7, contenant 20μg/ml d'ampicilline, 40 μl d'IPTG 100 mM et 20 μl de XGal 20 mg/ml, puis incubées une nuit à 37°C.

### 5.3.4. Recherche des transformants

Le fragment est inséré au site Srf I situé dans l'opéron lactose et rend ainsi la β-galactosidase non fonctionnelle. En présence d'un inducteur de l'opéron lactose, les bactéries transformées avec le plasmide portant l'insert sont incapables d'exprimer une β-galactosidase fonctionnelle et donc de métaboliser le substrat coloré de cette enzyme. Les colonies ainsi obtenues sont d'apparence blanches. Par contre les bactéries transformées avec le plasmide sans insert sont de couleur bleue. Les bactéries ne renfermant pas le plasmide sont incapables de se développer en présence d'ampicilline. Après examen des boîtes de Pétri, les colonies blanches, renfermant l'insert, sont repiquées stérilement et cultivées en milieu LB liquide

contenant de l'ampicilline. Le plasmide est ensuite extrait selon la méthode de Birnboim et Doly (1979).

Après une centrifugation de la culture 30 min à 3000g, le culot de bactéries est remis en suspension dans un tampon de lyse (Tris/HCl 25 mM, pH 8 ; EDTA 10 mM ; glucose 50 mM). L'ADN et les protéines sont dénaturés par addition volume à volume d'un mélange SDS 2% et NaOH 0,4 M pendant 10 min sur la glace. La neutralisation du lysat en haute force ionique par un tampon acétate de potassium 3M, pH 4,8 permet une précipitation de l'ADN chromosomique des bactéries, tandis que l'ADN plasmidique se renature et se retrouve dans le surnageant après une centrifugation de 10 min à 10000g. Après une extraction des protéines par un mélange phénol/chloroforme, le plasmide présent dans la phase aqueuse est précipité par 1 volume d'isopropanol pendant 2 min à température ambiante, puis lavé dans l'éthanol à 70°C avant d'être dissous dans le tampon TE. Les ARN sont éliminés par un traitement à la RNase (USB) 1 heure à 37°C. Cette RNase est extraite par un mélange phénol/ chloroforme et le plasmide est à nouveau précipité par l'isopropanol, puis redissous dans le TE. Pour mettre en évidence l'insert dans le plasmide, celui-ci est digéré par 2 enzymes de restriction BamHI et SacI (20U/μg d'ADN) pendant 2 heures à 37°C. Les produits de digestion sont ensuite analysés par une électrophorèse en gel de 2% d'agarose.

## **5.4. SEQUENCAGE DU FRAGMENT AMPLIFIÉ**

### **5.4.1. Préparation du plasmide**

Le plasmide renfermant l'insert à séquencer est dénaturé par un traitement à la soude, qui est ensuite éliminée par passage sur une colonne de Sépharose CL-4B (Pharmacia).

La colonne est équilibrée par 2 volumes de tampon TE, puis séchée par centrifugation à 1000g pendant 2 min. Le plasmide est dénaturé en simple brin par NaOH 2M pendant 10 min à température ambiante et déposé au sommet de la colonne Sépharose CL-4B. Le plasmide est séparé de la soude par centrifugation de la colonne à 1000g, 2 min et récupéré dans l'éluat, avant d'être soumis à une réaction de séquence.

### 5.4.2. Réaction de séquence

La technique de séquençage selon la méthode de Sanger (1977) est réalisée avec le kit Sequenase<sup>R</sup> version 2.0 (USB), contenant les tampons, l'ADN polymérase du phage T7, les nucléotides froids et la solution d'arrêt. Le principe de la méthode est basé sur la capacité des ADN polymérases d'allonger une amorce hybridée sur l'ADN à séquencer, jusqu'à ce qu'un didéoxynucléotide soit incorporé et bloque la synthèse. Le séquençage du double brin de l'insert est réalisé, en utilisant comme amorces, les promoteurs T3 et T7 (USB) qui s'hybrident respectivement sur le brin codant et non codant du vecteur.

Pour chaque amorce est réalisée une réaction de séquence. Dans chacun des deux tubes, l'amorce est hybridée au plasmide dénaturé pendant 2 min à 65°C. A ce mélange sont ajoutés, lorsque la température est descendue à 35°C, 0,1M de DTT, 0,5 µCi de dATP [<sup>35</sup>S] (Amersham) et la quantité requise de tampon contenant les nucléotides. La réaction de synthèse et de marquage est initiée dans chacun des tubes lorsque l'ADN polymérase T7 est ajoutée au mélange. Après 5 min de réaction à température ambiante, le mélange est transféré dans 4 tubes différents renfermant chacun un didéoxynucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) et laissé en contact encore 5 min à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par addition de la solution d'arrêt du kit.

### 5.4.3. Préparation du gel de séquence et électrophorèse

Un gel dénaturant est préparé à partir d'une solution d'Hydrolink<sup>TM</sup> Long Ranger<sup>TM</sup> qui est diluée à 5% final (Bioprobe system) dans du tampon TBE 1,2x (Tris/Borate 108 mM pH8; EDTA 2,4 mM) contenant 420 g/l d'urée et coulé entre deux plaques de verre.

Le mélange de la réaction de marquage est chauffé à 90°C, 5 min, puis déposé dans 4 puits (puits/didéoxynucléotide). La migration s'effectue en tampon TBE 0,6x à 55 watts. Trois dépôts successifs sont réalisés pour pouvoir analyser un nombre important de bases. Après la migration des 3 dépôts, le gel est fixé pendant 15 min dans le méthanol 20% : acide acétique 10%. Le gel est ensuite placé entre une feuille de papier Watman et un film de plastique, avant d'être séché sous vide 30 min à 80°C.

#### 5.4.4. Autoradiographie

Le gel est exposé sur un film photographique XOMAT pendant 2 à 3 jours. Ce film est ensuite développé 5 min dans un révélateur, 5 min dans un fixateur.

La séquence nucléotidique est analysée à l'aide du programme PC gene (programme 6.7, Intelligenetics Inc.) et traduite en séquence peptidique.

#### 5.5. ANALYSE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DE LA SOD

La séquence partielle a été analysée par interrogation de la banque de données Swiss-Prot à l'aide du serveur "BLITZ" (Sturrock et Collins, 1993) selon l'algorithme de Smith et Waterman (1981). Cette analyse consiste à comparer acide aminé par acide aminé notre séquence peptidique avec toutes les protéines répertoriées dans la banque de données (EMBL, Heidelberg). Les "gap" consécutifs aux alignements sont considérés comme des différences. Cette analyse permet donc de rechercher les protéines ayant le plus d'homologie avec celle dont nous avons déterminé la séquence.

La séquence, que nous avons obtenue, a été comparée à celles de toutes les SOD-Fe et Mn disponibles dans les banques PIR3 et EMBL. Nous avons utilisé le logiciel DARWIN d'après l'approche de Gonnet (1992). Dans une telle approche, ce sont des fragments de séquence conservés qui permettent de regrouper les protéines sous forme d'un arbre après alignement des séquences. Contrairement à la méthode précédente, les "gap" ne sont pas une source de pénalité, et le remplacement d'un acide aminé par un autre est tempéré si le nouvel acide aminé est homologue (un acide aminé aliphatique remplacé par un autre acide aminé aliphatique, ou un aromatique par un autre aromatique, etc.). La matrice d'équivalence des acides aminés est celle qui a été utilisée par Gonnet.

L'analyse par les logiciels BLITZ et DARWIN a été réalisée en collaboration avec le Dr. J.P. Touzel (INRA, Villeneuve d'Ascq).

## 5.6. HYBRIDATION AVEC L'ADN GENOMIQUE

### 5.6.1. Marquage de la sonde

Le marquage de la sonde est réalisé par marquage au hasard (random priming) avec le kit commercialisé par Boehringer. Environ 50 ng de sonde sont dénaturés 10 min à 100°C et refroidis sur la glace. On ajoute alors successivement 3 µl d'dATP, de dGTP, de dTTP, puis 2 µl de mélange réactionnel fournis dans le kit contenant les hexanucléotides servant d'amorces, 5 µl de dCTP [alpha 32P] correspondant à 50 µCi, enfin 1 µl de polymérase de Klenow. Le volume final est ramené à 20 µl avec de l'eau. L'ensemble est incubé 30 min à 37°C. La réaction de marquage est arrêtée par chauffage à 65°C pendant 10 min. Le reliquat du nucléotide radiomarqué libre est ensuite éliminé par gel filtration (Sephadex G-50, Pharmacia).

### 5.6.2. Digestion de l'ADN génomique

Environ 15 µg d'ADN génomique de *P. falciparum* sont digérés par une endonucléase de restriction, EcoRI ou PstI (Biolabs), à raison de 6 unités d'enzyme par µg d'ADN, pendant 3 heures à 37°C.

### 5.6.3. Electrophorèse et transfert (Southern Blot)

L'ADN génomique digéré est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% en TAE, pendant 4 heures (100 volts) parallèlement à un témoin contenant différents marqueurs de poids moléculaires.

Pour favoriser le transfert des fragments de taille supérieure à 10 kb, le gel est traité dans une solution d'HCl 0,25 M pendant 15 min pour dépuriner l'ADN. Après un bref rinçage dans l'eau, l'ADN est dénaturé en plaçant le gel dans un bain de soude 0,4 M pendant 30 min, puis transféré par capillarité sur une membrane d'Immobilon (Millipore) pendant une nuit à température ambiante en présence de NaOH 0,4 M. La membrane est ensuite rincée dans un tampon SSC 2x (préparé à partir d'une solution mère SSC 20x : citrate de Na 0,3M pH 7 ; NaCl 3 M), séchée. L'ADN est fixé par cuisson de la membrane à 80°C pendant 1 heure.

#### 5.6.4. Réaction d'hybridation

La préhybridation est effectuée pendant 1 heure à 42°C avec une solution contenant le tampon SSPE ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  45 mM ; NaCl 0,75 M; EDTA 5 mM, pH 7,4), la solution de Denhardt 5x (Ficoll 0,1% ; Polyvinylpyrrolidone 0,1% ; BSA 0,1%), 0,5% de SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 10 min à 100°C et 30% de formamide. L'hybridation est réalisée toute la nuit à 42°C, dans la même solution dans laquelle est ajoutée une quantité de sonde équivalente à  $3 \cdot 10^7$  coups/min, préalablement dénaturée 10 min à 100°C. La membrane est ensuite lavée à 42°C, d'abord 2 fois par du SSC 2x, puis 2 fois par du SSC 1x, 1 fois par du SSC 0,5x, enfin 2 fois par du SSC 0,1x contenant 0,1% de SDS.

La membrane de nylon est séchée puis mise au contact d'un film photographique XOMAT (Kodak) pendant 3 jours à -70°C.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

ADAMSON, G.M., BILLINGS, R.E. (1992). Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**: 223-229.

AISSI-YEHOUESSI, E. (1983). Mécanisme de dégradation de l'hémoglobine par les *Plasmodium*: étude comparative des systèmes protéolytiques de *Plasmodium yoelii nigeriensis* et de *Babesia hylomysci*. *Thèse de Doctorat d'Etat des Sciences Pharmaceutiques, Université LILLE II*.

AMANO, A., SHIZUKUISHI, S., TSUNEMITSU, A., MAEKAWA, K., TSUNASAWA, S. (1990). The primary structure of superoxide dismutase purified from anaerobically maintained *Bacteroides gingivalis*. *FEBS.* **272**: 217-220.

AMANO, A., SHIZUKUISHI, S., TAMAGAWA, H., IWAKURA, K., TSUNASAWA, S., TSUNEMITSU, A. (1990). Characterization of superoxide dismutases purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* **172**: 1457-1463.

AMANO, A., SHIZUKUISHI, S., TSUNEMITSU, A., TSUNASAWA, S. (1992). Identity of amino acid sequences of superoxide dismutase purified from both anaerobically maintained and aerated *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* **7**: 368-371.

AREEKUL, S., BOONME, Y. (1992). Catalase activity in red cell and liver of mice infected with *Plasmodium berghei*. In "*Lipid-soluble antioxidants: Biochemistry and Clinical applications*". A.S.H.ONG et L. PACKER eds, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1ère Edit., 416-423.

ASADA, K., YOSHIKAWA, K., TAKAHASHI, M.A, MAEDA, Y., ENMANJI, K. (1975). Superoxide dismutases from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* **250**: 2801-2807.

ATAMNA, A., GINSBURG, H. (1993). Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 231-242.

AUTOR, A.P. (1982). Biosynthesis of mitochondrial manganese-superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **257**: 2713-2718.

BANIC, D.M. (1992). Etude de l'immunogénicité et de l'antigénicité de la protéine p126 de *Plasmodium falciparum*. *Thèse de Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé, Université LILLE II*.

BANNISTER, J.V., PARKER, M.W. (1985). The presence of a copper/zinc superoxide dismutase in the bacterium *Photobacterium leiognathi*: a likely case of gene transfer from eukaryotes to prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 149-152.

BANNISTER, W.H., BANNISTER, J.V., BARRA, D., BOND, J., BOSSA, F. (1991). Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free. Rad. Res. Comms.* **12-13**: 349-361.

- BARRA, D., SCHININA, M.E., BOSSA, F., PUGET, K., DUROSAY, P., GUISSANI, A., MICHELSON, M. (1990). A tetrameric iron superoxide dismutase from the eucaryote *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* **265**: 17680-17687.
- BAUER, J., DEELY, D., BRAMAN, J., VIOLA, J., WEINER, M. (1992). pCR-Script SK(+) cloning system: a simple and fast method for PCR cloning. *Strategies in Mol. Biol.* **5**: 62-64.
- BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**: 276-287.
- BEGONIA, G., SALIN, M. (1991). Elevation of superoxide dismutase in *Halobacterium halobium* by heat shock. *J. Bacteriol.* **173**: 5582-5584.
- BESSIS, M.(ed) (1972). Cellules du sang normal et pathologique. *Masson, Paris*, pp 31-32.
- BEYER, W.F., FRIDOVICH, I. (1987). Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **26**: 1251-1257.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. (1979). *Nucl. Acid Res.* **7**: 1513-1522.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BREHM, K., HAAS, A., GOEBEL, W., KREFT, J. (1992). A gene encoding a superoxide dismutase of the facultative intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Gene* **118**: 121-125.
- BRUCHHAUS, I., TANNICH, E. (1993). Regulation of an iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica*. In *Abstracts of IX International Congress of Protozoology, Berlin Germany*.
- BUENO, P., DEL RIO, L.A. (1992). Purification and properties of glyoxysomal cuprozinc superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Citrullus vulgaris* Schrad). *Plant Physiol.* **98**: 331-336.
- CAIOLA, M.G., CANINI, A., GALIAZZO, F., ROTILIO, G. (1991). Superoxide dismutase in vegetative cells, heterocysts and akinetes of *Anabaena cylindrica* Lemm. *FEMS Microbiol. Letters* **80**: 161-166.
- CALLAHAN, H.L., CROUCH, R.K., JAMES, E.R. (1988). Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol. Today* **4**: 218-225.
- CANINI, A., CIVITAREALE, P., MARINI, S., CAIOLA, M.G., ROTILIO, G. (1992). Purification of iron superoxide dismutase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Lemm. and localization of the enzyme in heterocysts by immunogold labeling. *Planta* **187**: 438-444.

- CARLIOZ, A., LUDWIG, M.L., STALLINGS, W.C., FEE, J.A., STEINMAN, H.M., TOUATI, D. (1988). Iron superoxide dismutase: nucleotide sequence of the gene from *Escherichia coli* K12 and correlations with crystal structures. *J. Biol. Chem.* **263**: 1555-1562.
- CARRI, M.T., GALIAZZO, F., CIRIOLO, M.R., ROTILIO, G. (1991). Evidence for co-regulation of Cu,Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor. *FEBS* **2278**: 263-266.
- CHAMBERS, S.P., BREHM, J.K., MICHAEL, N.P., ATKINSON, T., MINTON, N.P. (1992). Physical characterisation and over-expression of the *Bacillus caldotenax* superoxide dismutase gene. *FEMS Microbiol. Letters* **91**: 277-284.
- CHANG, D.J., RINGOLD, G.M., HELLER, R.A. (1992). Cell killing and induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor-alpha is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **188**: 538-546.
- CHIO, K., TAPPEL, A. (1969). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino-acids. *Biochemistry* **8**: 2821-2827.
- CLARE, D.A., BLUM, J., FRIDOVICH, I. (1984). A hybrid superoxide dismutase containing both functional iron and manganese. *J. Biol. Chem.* **259**: 5932-5936.
- CLARK, I.A., HUNT, N.H. (1983). Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect. Immun.* **39**: 1-6.
- CLARK, I.A., COWDEN, W.B., HUNT, N.H., MAXWELL, L.E., MACKIE, E.J. (1984). Activity of divicine in *Plasmodium vinckei*-infected mice has implications for treatment of favism and epidemiology of G-6-P-D deficiency. *Br. J. Haem.* **57**: 479-487.
- CLARK, I.A., HUNT, N.H., COWDEN, W.B., MAXWELL, L.E., MACKIE, E.J. (1984). Radical-mediated damage to parasites and erythrocytes in *Plasmodium vinckei*-infected mice after injection of t-butyl hydroperoxide. *Clin. Exp. Immunol.* **56**: 524-530.
- CLARK, I.A., COWDEN, B., HUNT, N.H. (1985). Free radical-induced pathology. *Med. Res. Rev.* **5**: 297-332.
- CLARK, I.A., BUTCHER, G.A., BUFFINGTON, G.D., HUNT, N.H., COWDEN, W.B. (1987). Toxicity of certain products of lipid peroxidation to the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 543-546.
- CLARK, I.A., CHAUDHRI, G., COWDEN, W.B. (1989). Some roles of free radicals in malaria. *Free Rad. Biol. Med.* **6**: 315-321.
- COMPAN, I., TOUATI, D. (1993). Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **175**: 1687-1696.

CSEKE, C., HORVATH, L.I., SIMON, P., BORBELY, G., KESZTHELYI, L., FARKAS, G.L. (1979). An iron-containing superoxide dismutase from *Anacystis nidulans*. *J. Biochem.* **85**: 1397-1404.

DAS, B.S., THURNHAM, D.I. (1992). Plasma lipid peroxidation in *P. falciparum* malaria. In A.S.H. ONG, PACKER L. (eds) "*Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*", 1992, Birkhäuser-Verlag, Basel/Switzerland, 397-405.

DAVIES, K.J. (1988). Protein oxidation, protein cross-linking, and proteolysis in the formation of lipofuscin; in Nagy, Lipofuscin-1987: state of the art, pp. 109-133 (Elsevier, Amsterdam 1988).

DEISSEROTH, A., DOUNCE, A. (1970). Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.* **50**: 319-375.

DEMPLE, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 315-337.

DEMPLE, B., AMABILE-CUEVAS, C.F. (1991). Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* **67**: 837-839.

DESCAMPS-LATSCHA, B., LUNEL-FABIANI, F., KARABINIS, A., DRUILHE, P. (1987). Generation of reactive oxygen species in whole blood from patients with acute *falciparum* malaria. *Parasite Immunol.* **9**: 275-279.

DEVARY, Y., GOTTIELB, R.A., LAU, L.F., KARIN, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2804-2811.

DHAUNSI, G.S., GULATI, S., SINGH, A.K., ORAK, J.K., ASAYAMA, K., SINGH, I. (1992). Demonstration of Cu-Zn superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **267**: 6870-6873.

DOCKRELL, H.M., PLAYFAIR, J.H.L. (1983). Killing of blood stage murine malaria parasites by hydrogen peroxide. *Infect. Immun.* **39**: 456-459.

DOCKRELL, H.M., PLAYFAIR, J.H.L. (1984). Killing of *Plasmodium yoelii* by enzyme-induced products of the oxidative burst. *Infect. Immun.* **43**: 451-456.

DOROSHOW, J.H., AKMAN, S., ESWORTHY, S., CHU, F.F., BURKE, T. (1991). Doxorubicin resistance conferred by selective enhancement of intracellular glutathione peroxidase or superoxide dismutase content in human MCF-7 breast cancer cells. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 779-781.

DUBEY, M.L., RAI, S.K., GANGULY, N.K., KALRA, A., VARMA, S.C., MAHAJAN, R.C. (1991). Generation of reactive oxygen species by blood monocytes in human *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections. *APMIS* **99**: 210-212.

- DUKE, M.V., SALIN, M.L. (1985). Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 305-314.
- EATON, J.W., ECKMAN, J.R., BERGER, E., JACOB, H.S. (1976). Suppression of malaria infection by oxidant-sensitive host erythrocytes. *Nature* **264**: 758.
- EDMAN, P. (1956). On the mechanism of the phenylisothiocyanate degradation of peptides. *Acta. Chem. Scand.* **10**: 761.
- ELFORD, B.C., ROBERTS, M.F., PHILLIPSON, J.D., WILSON, J.M. (1987). Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 434-436.
- EZE, M.O. (1991). Production of superoxide by macrophages from *Plasmodium chabaudi* infected mice. *Cytobios* **66**: 93-104.
- FAIRFIELD, A.S., MESHNICK, S.R., EATON, J.W. (1983). Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase. *Science* **221**: 764-766.
- FAIRFIELD, A.S., EATON, J.W., MESHNICK, S.R. (1986). Superoxide dismutase and catalase in the murine malaria, *Plasmodium berghei*: content and subcellular distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**: 526-529.
- FAIRFIELD, A.S., ABOSCH, A., RANZ, A., EATON, J.W., MESHNICK, S.R. (1988). Oxidant defense system of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**: 77-82.
- FAVERO, M., CASSINI, A., ALBERGONI, V. (1992). Superoxide dismutase in *Tetrahymena thermophila*. In *Abstracts of 1st European Congress of Protozoology, British Society of Parasitology, England*.
- FEE, J.A. (1991). Regulation of sod genes in *Escherichia coli*: relevance to superoxide dismutase function. *Mol. Microbiol.* **5**: 2599-2610.
- FENTON, H.J.H. (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.* **65**: 899-910.
- FLOHE, L., GUNZLER, W.A., SCHOCK, H.H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS* **32**: 132-134.
- FRIDOVICH, I. (1975). Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* **44**: 147-159.
- FRIDOVICH, I. (1986). Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* **58**: 62-97.
- FRIEDMAN, M.J. (1979). Oxidant damage mediates variant cell resistance to malaria. *Nature* **280**: 245-247.

FRITSCH, B., DIECKMANN, A., MENZ, B., HEMPELMANN, E., FRITSCH, K.G., FRITSCH, G., JUNG, A. (1987). Glutathione and peroxide metabolism in malaria-parasitized erythrocytes. *Parasitol. Res.* **73**: 515-517.

FRITSCH, G., SAWATZKI, G., TREUMER, J., JUNG, A., SPIRA, D.T. (1987b). *Plasmodium falciparum*: inhibition *in vitro* with lactoferrin, desferrierrithiocin, and desferrirocic. *Exp. Parasitol.* **63**: 1-9.

GABAY, T., GINSBURG, H. (1993). Hemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate. A possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. *Exp. Parasitol.* **77**: 261-272.

GALIAZZO, F., CIRIOLO, M.R., CARRI, M.T., CIVITAREALE, P., MARCOCCI, L., MARMOCCHI, F., ROTILIO, G. (1991). Activation and induction by copper of Cu/Zn superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **196**: 545-549.

GALIAZZO, F., LABBE-BOIS, R. (1993). Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* **315**: 197-200.

GAMAIN, B. (1993). Mise en évidence d'une glutathion peroxydase séléno-dépendante chez *Plasmodium sp.* Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie, Université de LILLE II.

GARNHAM, P.C.C. (1987). The liver in malaria with special reference to the erythrocytic phase. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **577-585**.

GAY F., BUSTOS, D.G., VENTURIN, C., CICERON, L., COUNALI, J.B., SAMPANG, J., NADIRE, M., SANIEL, M.C., GENTILINI, M. (1993). *In vitro* drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* strains from 3 endemic continents tested against 4 classic antimalarials and 4 qinghaosu derivatives. *Annual Meeting Amer. Soc. Trop. Med. Hyg., Atlanta, Oct 31-Nov 4, 1993*.

GENDREL, D., KOMBILA, M., NARDOU, M., GENDREL, C., DJOUBA, F., MARTZ, M., RICHARD-LENOBLE, D. (1992). Paludisme et hémoglobine S: interactions chez l'enfant africain. *Presse Méd.* **21**: 887-890.

GOGUN, Y., SAKURADA, S., KIMURA, Y., NAGUMO, M. (1990). Enhancement of superoxide dismutase activity in cancer cells lines by anticancer drugs. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **8**: 85-92.

GOLDBERG, D.E., SLATER, A.F.G. (1992). The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitol. Today* **8**: 280-283.

GOLDSTEIN, B.D., MC DONAGH, E.M. (1976). Spectrofluorescent detection of *in vitro* red cell lipid peroxidation in patients treated with diaminodiphenylsulphone. *J. Clin. Invest.* **57**: 1302-1307.

- GOLENSER, J., CHEVION, M. (1989). oxidant stress and malaria: host-parasite interrelationships in normal and abnormal erythrocytes. *Sem. Hematol.* **26**: 313-325.
- GOLENSER, J., MARVA, E., CHEVION, M. (1991). The survival of *Plasmodium* under oxidant stress. *Parasitol. Today* **7**: 142-146.
- GOLENSER, J., MARVA, E., HAR-EL, R., CHEVION, M. (1991b). Induction of oxidant stress by iron available in advanced forms of *Plasmodium falciparum*; *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 639-643.
- GOLENSER, J., KAMYL, M., TSAFACK, A., MARVA, E., COHEN, A., KITROSSKI, N., CHEVION, M. (1992). Correlation between destruction of malaria parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. *Free Rad. Res. Comms.* **17**: 249-262.
- GOLENSER, J., GRONER, Y., PELED-KAMAR, M., SCHWARTZ, E., POLLACK, Y. (1993). The effects of elevated levels of superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes from transgenic mice, on the development of *Plasmodium berghei*. In *Abstracts of IX International Congress of Protozoology, Berlin Germany*.
- GONNET, G.H., COHEN, M.A., BENNER, S.A. (1992). Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* **256**: 1443-1445.
- GOODFRIEND, T.L., LEVINE, L., FASMAN, G.D. (1964). Antibodies to bradykinine and angiotensin: a use of carbodiimides in Immunology. *Science* **144**: 1344-1346.
- GORDEUK, V.R., THUMA, P., BRITTENHAM, G., McLAREN, C., BACKENSTOSE, A., BIEMBA, G., MSISKA, R., HOLMES, L., McKINLEY, E., VARGAS, L., GILKESON, R., POLTERA, A.A. (1992). Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. *New Engl. J. Med.* **327**: 1473-1477.
- GORDEUK, V.R., THUMA, P., BRITTENHAM, G., ZULU, S., SIMWANSA, G., MHANGU, A., FLESCHE, G., PARRY, D. (1992b). Iron chelation with desferrioxamine B in adults with asymptomatic *Plasmodium falciparum* parasitemia. *Blood* **79**: 308-312.
- GORENFLOT, A., BRASSEUR, P., BONMARCHAND, G., LANEELLE, D., SIMONIN, D. (1990). Deux cas de babésiose humaine graves traités avec succès. *Presse Med.* **19**: 335.
- GREGORY, E.M., DAPPER, C.H. (1983). Isolation of iron-containing superoxide dismutase from *Bacteroides fragilis*: reconstitution as a Mn-containing enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **220**: 293-300.
- GRIFFITHS, G. (1984). On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J. Ultrastruct. Res.* **89**: 65-78.
- GU, H.M., LU, B.F., QU, Z.X. (1980). Activities of 25 derivatives of artemisinin against chloroquine-resistant *Plasmodium berghei*. *Acta Pharmacol. Sinica* **1**: 48-50.
- GUTTERIDGE, J.M.C., ROWLEY, D.A., HALLIWELL, B. (1982). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. *Biochem. J.* **206**: 605-609.

- Haidaris, C.G., Haynes, J.D., Meltzer, M.S., Allison, A.C. (1983). Serum containing tumor Necrosis Factor is cytotoxic for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Inf. Immun.* **42**: 385-393.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1986a). Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 372-375.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1986b). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246** (2): 501-514.
- Har-el, R., Marva, E., Chevion, M., Goleenser, J. (1993). Is hemin responsible for the susceptibility of plasmodium to oxidant stress? *Free Rad. Res. Comms.* **18**: 279-290.
- Harris, C.A., Derbin, K.S., Hunte-McDonough, B., Krauss, M.R., Chen, K.T., Smith, D.M., Epstein, L.B. (1991). Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. *J. Immunol.* **147**: 149-154.
- Harris, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* **6**: 2675-2683.
- Harris, E.D. (1992). Copper as a cofactor and regulator of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Nutr.* **122**: 636-640.
- Hassan, H.M. (1988). Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Rad. Biol. Med.* **5**: 377-385.
- Hassan, H.M. (1989). Microbial superoxide dismutase. *Adv. in Genetics* **26**: 65-97.
- Hass, M.A., Massaro, D. (1988). Regulation of the synthesis of superoxide dismutases in rat lungs during oxidant and hyperthermic stresses. *J. Biol. Chem.* **263**: 776-781.
- Hebbel, R.P., Eaton, J.W., Balasingam, M., Steinberg, M.H. (1985). Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **70**: 1253-1259.
- Heikkila, R.E., Cabbat, F.S., Cohen, G. (1976). In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.* **251**: 2182-2185.
- Hempelmann, E., Schirmer, R.H., Fritsch, G., Hundt, E., Gröschel-Stewart, U. (1987). Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**: 19-24.
- Henkle, K.J., Liebau, E., Müller, S., Bergmann, B., Walter, R.D. (1991). Characterization and molecular cloning of a Cu/Zn superoxide dismutase from the human parasite *Onchocerca volvulus*. *Infect. Immun.* **59**: 2063-2069.
- Hennet, T., Richter, C., Peterhans, E. (1993). Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem. J.* **289**: 587-592.

- HEPPNER, D.G., HALLAWAY, P.E., KONTOGHIORGHES, G.J., EATON, J.W. (1988). Antimalarial properties of orally active iron chelators. *Blood* **72**: 358-361.
- HJALMARSSON, K., MARKLUND, S.L., ENGSTROM, A., EDLUND, T. (1987). Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6340-6344.
- HODGSON, E.K., FRIDOVICH, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* **14**: 5294-5299.
- HONG, Z., KOSMAN, D.J., THAKUR, A., REKOSH, D., LOVERDE, P.T. (1992). Identification and purification of a second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **60**: 3641-3651.
- HONG, Y.L., PAN, H.Z., SCOTT, M.D., MESHNICK, S.R. (1992). Activated oxygen generation by a primaquine metabolite: inhibition by antioxidants derived from chinese herbal remedies. *Free Rad. Biol. Med.* **12**: 213-218.
- HSU, J-L., VISNER, G.A., BURR, I.A., NICK, H.S. (1992). Rat copper/zinc superoxide dismutase gene: isolation, characterization, and species comparison. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **186**: 936-943.
- HUNT, N.H., STOCKER, R. (1990). Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* **16**: 499-526.
- HYDE, J.E., KELLY, S.L., HOLLOWAY, S.P., SNEWIN, V.A., SIMS, P.F.G. (1989). A general approach to isolating *Plasmodium falciparum* genes using non-redundant oligonucleotides inferred from protein sequences of other organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**: 247-262.
- IHEANACHO, E.N., SAMUNI, A., AVRAMOVICI-GRISARU, S., SAREL, S., SPIRA, D.T. (1990). Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth by a synthetic iron chelator. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**: 213-216.
- INSELBURG, J. (1985). Induction and isolation of artemisinin-resistant mutants of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 417-418.
- ISCHIROPOULOS, H., ZHU, L., CHEN, J., TSAI, M., MARTIN, J.C., SMITH, C.D., BECKMAN, J.S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 431-437.
- ISMAIL, S.O., SKEIKY, Y.A.W., BHATIA, A., OMARA-OPYENE, L.A., GEDAMU, L. (1994). Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of iron superoxide dismutase cDNA from *Leishmania donovani chagasi*. *Inf. Immun.* **62**: 657-664.

ISOBE, T., FANG, Y., MUNO, D., OKUYAMA, T. (1988). Difference between amino acid residues in the metal-ligand environments of iron- and manganese-superoxide dismutases. *Biochem. Int.* **16**: 495-501.

JANSE, C.J., MONS, B., CROON, J.J.A.B., VAN DER KAAY, H.J. (1984). Long-term *in vitro* cultures of *Plasmodium berghei* and preliminary observations on gametocytogenesis. *Int. J. Parasitol.* **14**: 317-320.

JENSEN, J.B., TRAGER, W. (1978). *Plasmodium falciparum* in culture: establishment of new strains. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 743-746.

JENSEN, J.B., VANDE WAA, J.A., KARADSHEH, A.J. (1987). Tumor necrosis factor does not induce *Plasmodium falciparum* crisis forms. *Infect. Immun.* **55**: 1722-1724.

KAMCHONGWONGPAISAN, S., VANITCHAREON, N., YUTHAVONG, Y. (1992). The mechanism of antimalarial action of artemisinin (qinghaosu). In A.S.H. ONG, PACKER L. (eds) "*Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*", 1992, Birkhäuser-Verlag, Basel/Switzerland, 363-372.

KANEMATSU, S., ASADA, K. (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**: 535-545.

KANEMATSU, S., ASADA, K. (1989). CuZn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Spirogyra* sp.: Occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. *Plant Cell Physiol.* **30**: 717-727.

KEELE, B.B., McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **245**: 6176-6181.

KELLER, G.A., WARNER, T.G., STEIMER, K.S., HALLEWELL, R.A. (1991). Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7381-7385.

KEYSE, S.M., TYRRELL, R.M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UV A radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 99-103.

KHARAZAMI, A., JEPSEN, S. (1984). Enhanced inhibition of *in vitro* multiplication of *Plasmodium falciparum* by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **57**: 287-292.

KIM, S.W., LEE, S.O., LEE, T.H. (1991). Purification and characterization of superoxide dismutase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 101-108.

KIRBY, T., BLUM, J., KAHANE, I., FRIDOVICH, I. (1980). Distinguishing between Mn-containing and Fe-containing superoxide dismutase in crude extracts of cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**: 551-555.

- KIRBY, T.W., LANCASTER, J.R., FRIDOVICH, I. (1981). Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**: 140-148.
- KITCHENER, K.R., MESHNICK, S.R., FAIRFIELD, A.S., WANG, C.C. (1984). An iron-containing superoxide dismutase in *Tritrichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **12**: 95-99.
- KRINSKY, N.I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *P.S.E.B.M.* **200**: 248-254.
- KROLL, J.S., LANGFORD, P.R., LOYNDS, B.M. (1991). Copper-Zinc superoxide dismutase of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. *J. Bacteriol.* **173**: 7449-7457.
- KRÖNIGER, W., RENNENBERG, H., POLLE, A. (1992). Purification of two superoxide dismutase isozymes and their subcellular localization in needles and roots of norway spruce (*Picea abies* L.) trees. *Plant Physiol.* **100**: 334-340.
- KRUNGKRAI, S.R., YUTHAVONG, Y. (1987). The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 710-714.
- KRUNGKRAI, J. (1991). Malarial dihydroorotate dehydrogenase mediates superoxide radical production. *Biochem. Int.* **24**: 833-839.
- KRUNGKRAI, J., CERAMI, A., HENDERSON, G.B. (1991). Purification and characterization of dihydroorotate dehydrogenase from the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Biochemistry* **30**: 1934-1939.
- KURDI-HAIDAR, B., LUZZATTO, L. (1990). Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 83-92.
- KWIATOWSKI, J., KANIUGA, Z. (1986). Isolation and characterization of cytosolic and chloroplast isoenzymes of Cu,Zn-superoxide dismutase from tomato leaves and their relationships to other Cu,Zn-superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta* **874**: 99-115.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LEID, R.W., SUQUET, C.M. (1986). A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**: 301-311.
- LEE, J.S., HAH, Y.C., ROE, J.H. (1993). The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1013-1018.

- LEE, S.O., KIM, S.W., UNO, I., LEE, T.H. (1993). Direct sequencing of superoxide dismutase genes from two bacterial strains amplified by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1454-1460.
- LE TRANT, N., MESHNICK, S.R., KITCHENER, K., EATON, J.W., CERAMI, A. (1983). Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* **258**: 125-130.
- LEVINE, R.L. (1983). Oxidative modification of glutamine synthetase. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol. Chem.* **258**: 11823-11827.
- LI, Y., JAISWAL, A.K. (1992). Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene: role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* **267**: 15097-15104.
- LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. (1974). Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates, *Tritrichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp.. *J. Biol. Chem.* **249**: 4634-4637.
- LOVEN, D.P., LEEPER, D.B., OBERLEY, L.W. (1985). Superoxide dismutase levels in chinese hamster ovary cells and ovarian carcinoma cells after hyperthermia or exposure to cycloheximide. *Cancer Res.* **45**: 3029-3033.
- LUMSDEN, J., HALL, D.O. (1974). Soluble and membrane-bound superoxide dismutases in a blue-Green alga (*Spirulina*) and spinach. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **58**: 35-41.
- LYNCH, R.E., FRIDOVICH, I. (1978). Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* **253**: 4697-4699.
- MAENO, Y., TOYOSHIMA, T., FUJIOKA, H., ITO, Y., MESHNICK, S.R., BENAKIS, A., MILHOUS, W.K., AIKAWA, M. (1993). Morphologic effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 485-491.
- MAILER, K., DEL MAESTRO, R.F. (1991). Stability of the anti-oxidative enzymes in aqueous and detergent solution. *Mol. Cell. Biochem.* **107**: 47-54.
- MALHOTRA, K., SALMON, D., LE BRAS, J., VILDE, J.L. (1988). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to a peroxidase-mediated oxygen-dependent microbicidal system. *Infect. Immun.* **56**: 3305-3309.
- MARKLUND, S., MARKLUND, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
- MARKLUND, S.L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7634-7638.
- MARKLUND, S.L. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* **222**: 649-655.

- MARTIN, M.E., ROWE BYERS, B., OLSON, M.O.J., SALIN, M.L., ARCENEUX, J.E.L., TOLBERT, C. (1986). A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **261**: 9361-9367.
- MAY, B.P., DENNIS, P.P. (1989). Evolution and regulation of the gene encoding superoxide dismutase from the Archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *J. Biol. Chem.* **264**: 12253-12258.
- Mc CORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocypre)in. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. (1993). The piroplasms: "a long story in short" or "Robert Koch has seen it". *Eur. J. Protistol.* **29**: 279-293.
- MEIER, B., BARRA, D., BOSSA, F., CALABRESE, L., ROTILIO, G. (1982). Synthesis of either Fe- or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent of the metal supplied. *J. Biol. Chem.* **257**: 13977-13980.
- MERRIL, C.R., GOLDMAN, D., SEDMAN, S.A., EBERT, M.H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**: 1437-1438.
- MESHNICK, S.R., EATON, J.W. (1981). Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **102**: 970-976.
- MESHNICK, S.R., THOAMS, A., RANZ, A., XU, C.M., PAN, H.Z. (1991). Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular heme in its mechanism of antimalarial action. *Mol. Biochem. Parasitol* **49**: 181-190.
- MICHALSKI, W., PROWSE, S. (1991). Superoxide dismutase in *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**: 189-196.
- MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1977). Purification and properties of superoxide dismutase from red alga, *Porphyridium cruentum*. *J. Biol. Chem.* **252**: 6421-6423.
- MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1978). Inhibition of superoxide dismutase by azide. *Arch. Biochem. Biophys.* **189**: 317-322.
- MISRA, H.P. (1979). Reaction of copper-zinc superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.* **254**: 11623-11628.
- MOHAN, K., GANGULY, N.K., DUBEY, M.L., MAHAJAN, R.C. (1992). Oxidative damage of erythrocyte infected with *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* study. *Ann. Hematol.* **65**: 131-134.
- MONS, B., JANSE, C.J., CROON, J.J.A.B., VAN DER KAAJ, H.J. (1983). *In vitro* culture of *Plasmodium berghei* using a new suspension system. *Int. J. Parasitol.* **13**: 213-217.

MORLIERE, P., MOYSAN, A., GABORIAU, F., SANTUS, R., MAZIERE, J.C., DUBERTRET, L. (1992). Ultraviolet A et peau: implications d'espèces activées de l'oxygène, tendances actuelles et résultats récents. *Pathol. Biol.* **40**: 160-168.

MURPHY, M.E., SIES, H. (1991). Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10860-10864.

NAKAYAMA, K. (1990). The superoxide dismutase-encoding gene of the obligately anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Gene* **96**: 149-150.

NIELSEN, H., THEANDER, T.G. (1989). Blood monocyte oxidative burst activity in acute *P. falciparum* malaria. *APMIS* **97**: 469-471.

NOKORNCHAI, S., ANANTAVARA, S. (1992). Oxygen free radical in malaria. In A.S.H. ONG, PACKER L. (eds) "*Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*", 1992, Birkhäuser-Verlag, Basel/Switzerland, 355-361.

NGUYEN, T., PICKETT, C.B. (1992). Regulation of rat glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: DNA-protein interaction at the antioxidant response element. *J. Biol. Chem.* **267**: 13535-13539.

OCKENHOUSE, C.F., SCHULMAN, S., SHEAR, H.L. (1984). Induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by  $\gamma$ -interferon-activated, monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.* **133**: 1601-1608.

OCKENHOUSE, C.F., SHEAR, H.L. (1984). Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium yoelii* by activated macrophages. *J. Immunol.* **132**: 424-431.

ONO, M., KOHDA, H., KAWAGUCHI, T., OHHIRA, M., SEKIYA, C., NAMIKI, M., TAKEYASU, A., TIKINUCHI, N. (1992). Induction of Mn-superoxide dismutase by tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 in human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **182**: 100-1107.

ORJIH, A.U., CHEVLI, R., FITCH, C.D. (1985). Toxic heme in sickle cells: an explanation for death of malaria parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 223-227.

PACIFICI, R.E., DAVIES, K.J.A. (1991). Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* **37**: 166-180.

PANG, X-P., ROSS, N.S., PARK, M., JUILLARD, G.J.F., STANLEY, T.M., HERSHMAN, J.M. (1992). Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates nuclear factor kB and induces manganous superoxide dismutase and phosphodiesterase mRNA in human papillary thyroid carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 12826-12830.

PARKER, M.W., BLAKE, C.C.F. (1988). Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS* **229**: 377-382.

PEDRAJAS, J.R., PEINADO, J., LOPEZ-BAREA, J. (1993). Purification of Cu, Zn-superoxide dismutase isoenzymes from liver: appearance of new isoforms as a consequence of pollution. *Free Rad. Res. Comms.* **19**: 29-41.

PENNINGTON, C.D., GREGORY, E.M. (1986). Isolation and reconstitution of iron- and manganese-containing superoxide dismutases from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* **166**: 528-532.

PERNIN, P., CARIOU, M.L., JACQUIER, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.* **32**: 592-603.

PETERS, W., ROBINSON, B.L., ROSSITER, J.C., MISRA, D., JEFFORD, C.W. (1993). The chemotherapy of rodent malaria. XLIX. The activities of some synthetic 1,2,4-trioxanes against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant parasites. Part 2: Structure-activity studies on *cis*-fused cyclopentano-1,2,4-trioxanes (fenzans) against drug-sensitive and drug-resistant lines of *Plasmodium berghei* and *P. yoelii* ssp. NS *in vivo*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **87**: 9-16.

POLLACK, S., ROSSAN, R.N., DAVIDSON, D.E., ESCAJADILLO, A. (1987). Desferrioxamine suppresses *Plasmodium falciparum* in *Aotus* monkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **184**: 162-164.

POSNER, G.H., OH, C.H., GERENA, L., MILHOUS, W. (1992). Extraordinarily potent antimalarial compounds: new, structurally simple, easily synthesized, tricyclic 1,2,4-trioxanes. *J. Med. Chem.* **35**: 2459-2467.

PRE, J. (1991). La lipoperoxydation. *Pathol. Biol.* **39**: 716-736.

PRIVALLE, C.T., FRIDOVICH, I. (1987). Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2723-2726.

PROHASKA, J.R. (1991). Changes in Cu,Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *J. Nutr.* **121**: 355-363.

PUGET, K., MICHELSON, A.M. (1974). Iron containing superoxide dismutase from luminous bacteria. *Biochimie* **56**: 1255-1267.

RANJBAR, S., HANNIGAN, B.M. (1993). DNA damage in human T-lymphoblastoid cell line Molt-3 induced by reactive oxygen species. *Mutation Res.* **285**: 225-228.

RANZ, A., MESHNICK, S.R., (1989). *Plasmodium falciparum*: Inhibitor sensitivity of the endogenous superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* **69**: 125-128.

RHOADS, M.L. (1983). *Trichinella spiralis*: identification and purification of superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* **56**: 41-54.



- ROBERTS, V.A., FISHER, C.L., REDFORD, S.M., McREE, D.E., PARGE, H.E., GETZOFF, E.D., TAINER, J.A. (1991). Mechanism and atomic structure of superoxide dismutase. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 269-278.
- ROCKETT, K.A., TARGETT, G.A.T., PLAYFAIR, J.H.L. (1988). Killing of blood-stage *Plasmodium falciparum* by lipid peroxides from tumor necrosis serum. *Inf. Immun.* **56**: 3180-3183.
- ROTILIO, G., BRAY, R.C., FIELDEN, E.M. (1972). A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta* **268**: 605-609.
- SAHNI, S.K., SAXENA, N., PURI, S.K., DUTTA, G.P., PANDEY, V.C. (1992). NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*: partial purification and characterization. *J. Protozool.* **39**: 338-342.
- SAINT CLAIR, D.K., OBERLEY, T.D., HO, Y.S. (1991). Overproduction of human Mn-superoxide dismutase modulates paraquat-mediated toxicity in mammalian cells. *FEBS* **293**: 199-203.
- SALIN, M.L., DUKE, M.V., OESTERHELT, D., MA, D.P. (1988). Cloning and determination of the nucleotide sequence of the Mn-containing superoxide dismutase gene from *Halobacterium halobium*. *Gene* **70**: 153-159.
- SALIN, M.L. (1991). Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 851-858.
- SALIN, M.L., BRIDGES, S.M. (1980). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**: 369-374.
- SANGER, F.S., NICKLEN (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- SEARCY, K.B., SEARCY, D.G. (1981). Superoxide dismutase from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta* **670**: 39-46.
- SETH, R.K., SAINI, A.S., JASWAL, T.S. (1985). *Plasmodium berghei*: oxidant defence system. *Exp. Parasitol.* **60**: 414-416.
- SHARONOV, B.P., CHURILOVA, I.V. (1992). Inactivation and oxidative modification of Cu, Zn superoxide dismutase by stimulated neutrophils: the appearance of new catalytically active structures. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **189**: 1129-1135.
- SHEIL, C.A., HASS, M.A., MASSARO, D. (1986). *In vitro* heat shock increases the synthesis of Cu-Zn superoxide dismutase by normal mammalian tissue. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **45**: 317.
- SHERMAN, I.W., PETERSON, I., TANIGOSHI, L., TING, I.P. (1971). The glutamate dehydrogenase of *Plasmodium lophurae* (avian malaria). *Exp. Parasitol.* **29**: 433-439.

- SIBLEY, L.D., LAWSON, R., WEIDNER, E. (1986). Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 83-87.
- SIES, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**: 1058-1071.
- SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**: 213-219.
- SIMOES, A.P.C.F., VAN DEN BERG, J.J.M., ROELOFSEN, B., OP DEN KAMP, J.A.F. (1992). Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 651-657.
- SIMURDA, M.C., VAN KEULEN, H., REKOSH, D.M., LOVERDE, P.T. (1988). *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Exp. Parasitol.* **67**: 73-84.
- SLATER, A.F.G., CERAMI, A. (1992). Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* **355**: 167-169.
- SLOMIANNY, C., PRENSIER, G., CHARET, P. (1985). Comparative ultrastructural study of the process of hemoglobin degradation by *P. berghei* (Vincke and Lips, 1985) as a function of the state of maturity of the host cell. *J. Protozool.* **32**: 1-5.
- SMITH, T.F., WATERMAN, M.S. (1981). *J. Mol. Biol.* **147**: 195-197.
- SMITH, M.W., DOOLITTLE, R.F. (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J. Mol. Evol.* **34**: 175-184.
- SOHAL, R.S., BRUNK, U.T. (1992). Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation Res.* **275**: 295-304.
- SRIVASTAVA, P., PURI, S.K., DUTTA, G.P., PANDEY, V.C. (1992). Status of oxidative stress and antioxidant defences during *Plasmodium knowlesi* infection and chloroquine treatment in *Macaca mulatta*. *Int. J. Parasitol.* **22**: 243-245.
- STALLINGS, W.C., PATTRIDGE, K.A., STRONG, R.K., LUDWIG, M.L. (1984). Manganese and iron superoxide dismutase are structural homologs. *J. Biol. Chem.* **259**: 10695-10699.
- STEINMAN, H.M., HILL, R.L. (1973). Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 3725-3729.
- STEINMAN, H.M. (1982). Superoxide dismutases: protein chemistry and structure-function relationships. In "Superoxide dismutase", L.W. Oberley (Ed.) Vol I, CRC Boca Raton Fla.: 11-68.
- STEINMAN, H.M. (1982). Copper-zinc superoxide dismutase from *Caulobacter crescentus* CB15. *J. Biol. Chem.* **257**: 10283-10293.

- STEINMAN, H.M. (1985). Bacteriocuprein superoxide dismutases in Pseudomonads. *J. Bacteriol.* **162**: 1255-1260.
- STEINMAN, H.M. (1993). Function of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **175**: 1198-1202.
- STOCKER, R., HUNT, N.H., BUFFINGTON, G.D., WEIDEMANN, M.J., LEWIS-HUGHES, P.H., CLARK, I.A. (1985). Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in relation to *Plasmodium vinckei* load. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 548-551.
- STOCKER, R., COWDEN, W.B., TELLAM, R.L., WEIDEMANN, M.J., HUNT, N.H. (1987). Lipids from *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes and their susceptibility to oxidative damage. *Lipids* **22**: 51-57.
- STOWERS, M.D., ELKAN, G.H. (1981). An inducible iron-containing superoxide dismutase in *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* **27**: 1202-1208.
- STURROCK, S.S., COLLINS, J.F. (1993). MPsrch version 1.3., Biocomputing Research Unit, University of Edimburgh, U.K.
- SUTHIPARK, U., KRUNGKRAI, J., JEARNPIPATKUL, A., YUTHAVONG, Y., PANIJPAN, B. (1982). Superoxide dismutase (SOD) in mouse red blood cells infected with *Plasmodium berghei*. *J. Parasitol.* **68**: 337-339.
- TAINER, J.A., GETZOFF, E.D., RICHARDSON, J.S., RICHARDSON, D.C. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**: 284-286.
- TAKAO, M., KOBAYASHI, T., OIKAWA, A., YASUI, A. (1989). Tandem arrangement of photolyase and superoxide dismutase genes in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **171**: 6323-6329.
- TAKAO, M., YASUI, A., OIKAWA, A. (1991). Unique characteristics of superoxide dismutase of a strictly anaerobic archaebacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* **266**: 14151-14154.
- TANNICH, E., BRUCHHAUS, I., WALTER, R.D., HOSRTMANN, R.D. (1991). Pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 61-72.
- TAVERNE, J., DOCKRELL, H.M., PLAYFAIR, J.H.L. (1981). Endotoxin-induced serum factor kills malarial parasites *in vitro*. *Inf. Immun.* **33**: 83-89.
- TAVERNE, J., TAVERNIER, J., FIERS, W., PLAYFAIR, J.H.L. (1987). Recombinant tumor necrosis factor inhibits malaria parasites *in vivo* but not *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* **67**: 1-4.
- TOKUYASU, K.T. (1980). Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem. J.* **12**: 381-403.

- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1978). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- TRAGER, W., JENSEN, J.B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**: 673-675.
- TSAN, M.F., WHITE, J.E., DEL VECCHIO, P.J., SHAFFER, J.B. (1992). IL-6 enhances TNF- $\alpha$  and IL-6-induced increase of Mn superoxide dismutase mRNA and O<sub>2</sub> tolerance. *Am. J. Physiol.* **263**: L22-L26.
- TSAN, M.F., WHITE, J.E., WONG, G.H.W. (1992). D-factor and growth hormone enhance tumor necrosis factor-induced increase of Mn superoxide dismutase mRNA and oxygen tolerance. *Cytokine* **4**: 101-105.
- USANGA, E.A., LUZZATTO, L. (1985). Adaptation of *Plasmodium falciparum* to glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient host red cells by production of parasite-encoded enzyme. *Nature* **313**: 793-795.
- URSINI, F., BINDOLI, A. (1987). The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids* **44**: 255-276.
- VANCE, P.G., KEELE, B.B., RAJAGOPALAN, K.V. (1972). Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* **247**: 4782-4786.
- VAN DER JAGT, D.L., HUNSAKER, L.A., KIBIRIGE, M., CAMPOS, N.M. (1989). NADPH production by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* **74**: 471-474.
- VANFLETEREN, J.R. (1992). Cu-Zn superoxide dismutase from *Caenorhabditis elegans*: purification, properties and isoforms. *Comp. Biochem. Physiol.* **102B**: 219-229.
- VAN KUIJK, F.J.G.M., SEVANIAN, A., HANDELMAN, G.J., DRATZ, E.A.A. (1987). A new role for phospholipase A2: Protection of membranes from lipid peroxidation damage. *TIBS* **12**: 31-34.
- VAN LOON, A.P.G.M., PESOLD-HURT, B., SCHATZ, G. (1986). A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3820-3824.
- VENNERSTROM, J.L., ACTON, N., LIN, A.J., KLAYMAN, D.L. (1989). Peroxides as oxidant antimalarials. *Drug Des. Deliv.* **4**: 45-54.
- VENNERSTROM, J.L., EATON, J.W. (1988). Oxidants, oxidant drugs, and malaria. *J. Med. Chem.* **31**: 1269-1277.
- VIGNAIS, P.M., TERECH, A., MEYER, C.M., HENRY, M.F. (1982). Isolation and characterization of a protein with cyanide-sensitive superoxide dismutase activity from the prokaryote, *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **701**: 305-317.

VISNER, G.A., DOUGALL, W.C., WILSON, J.M., BURR, I.A., NICK, H.S. (1990). Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **265**: 2856-2864.

WAGNER, J.R., MOTCHNIK, P.A., STOCKER, R., SIES, H., AMES, B.N. (1993). The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **268**: 18502-18506.

WAGNER, U.G., PATTRIDGE, K.A., LUDWIG, M.L., STALLINGS, W.C., WERBER, M.M., OEFNER, C., FROLOW, F., SUSSMAN, J.L. (1993). Comparison of the crystal structures of genetically engineered human manganese superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*: differences in dimer-dimer interactions. *Protein Science* **2**: 814-825.

WALTER, R.D., NORDMEYER, J.P., KONIGK, E. (1974). NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Plasmodium chabaudi*. *Zeitsch. Physiol. Chemie* **355**: 495-500.

WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I. (1973). Superoxide dismutase: organelle specificity. *J. Biol. Chem.* **248**: 3582-3592.

WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **248**: 4793-4796.

WINTERBOURN, C.C., HAWKINS, R.E., BRIAN, M., CAREWELL, R.W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* **85**: 337-341.

WOLFF, S.P., GAMER, A., DEAN, R.T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends. Biochem. Sci.* **11**: 27-31.

WOZENCRAFT, A.O., DOCKRELL, H.M., TAVERNE, J., TARGETT, G.A.T., PLAYFAIR, J.H.L. (1984). Killing of human malaria parasites by macrophages secretory products. *Inf. Immun.* **43**: 664-669.

WOZENCRAFT, A.O. (1986). damage to malaria-infected erythrocytes following exposure to oxidant-generating systems. *Parasitology* **92**: 559-567.

YAKAMURA, F. (1984). Destruction of tryptophan residues by hydrogen peroxide in iron-superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122**: 635-641.

YAKAMURA, F., SUZUKI, K. (1986). Inactivation of *Pseudomonas* iron-superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **874**: 23-29.

YOST, F.J., FRIDOVICH, I. (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **248**: 4905-4908.

YUTHAVONG, Y., BUNYARATVEJ, A., KAMCHONGWONGPAISAN, S. (1990). Increased susceptibility of malaria-infected variant erythrocytes to the mononuclear phagocytes system. *Blood Cells* **16**: 591-597.

