

20106761  
50376  
1975  
372

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE - FLANDRES - ARTOIS**

**THESE**

présentée par

**Gervais CLAREBOUT**

pour l'obtention du

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



**CATALASE ENDOGENE ET CATALASE INTERNALISEE  
CHEZ *PLASMODIUM***

soutenue le 15 Décembre 1995

La Commission d'examen est composée de :

Pr J-L. BERNIER	Président
Pr A. FAVIER	Rapporteur
Dr J. LE BRAS	Rapporteur
Pr D. CAMUS	Examineur
Dr D. DIVE	Examineur

**UNITE DE BIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE PARASITAIRES ET FONGIQUES  
INSERM U42 - VILLENEUVE D'ASCQ**

**Ce travail a été 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 de Villeneuve d'Ascq), unité dirigée par le Pr Daniel CAMUS.**

**Cette thèse était placée sous la direction du Dr Daniel DIVE et a occasionné la réalisation d'une publication et de quatre communications.**

## Liste de Publication / Communications

La publication concerne une étude parallèle à celle développée dans ce manuscrit :

Clarebout G., Gamain, B., Slomianny, C., Camus, D. et Dive, D. "The course of *Plasmodium berghei*, *P. chabaudi* and *P. yoelii* infections in  $\beta$ -thalassaemic mice". Sous presse dans la revue *Parasitology*.

### Communications

Clarebout, G., Slomianny, C., Middelkoop, E., Leu, B., Masset, A., Delcourt, P., Camus D. et Dive D. " Catalase adoptée et catalase endogène chez *Plasmodium*. "  
*XXXIIIème Réunion du G.P.L.F.*, Nice, 12 -15 Mai 1994.

Clarebout, G., Beuzard, Y., Slomianny, C., Masset, A., Delcourt, P. et Dive, D. "Etablissement d'un modèle de paludisme sur souris  $\beta$ -thalassémiques. Etude expérimentale."  
*XXXIIIème Réunion du G.P.L.F.*, Nice, 12 -15 Mai 1994.

Clarebout, G., Slomianny, C., Middelkoop, E. et Dive, D. "Devenir de la catalase de l'hématie internalisée par *P. falciparum*."  
*XXIIème Forum des jeunes chercheurs*, Grenoble, 4-7 juillet 1995.

Clarebout, G., Gamain, B., Slomianny, C., Précigout, E., Gorenflot, A. et Dive, D.  
"Comparaison of catalase and glutathione peroxidase activities in *Babesia hylomysci* obtained *in vivo* and in *Babesia divergens* cultivated *in vitro*."  
*Deuxième Congrès Européen de Protistologie et Huitième Conférence Européenne sur la Biologie des Ciliés*, Clermont-Ferrand 21-26 juillet 1995.

## **Avant propos**

Je voudrais exprimer en quelques mots l'estime que j'éprouve pour tous ceux qui ont contribué au déroulement et à la réalisation de cette thèse.

Toute ma reconnaissance au Pr. D. CAMUS, pour la confiance qu'il m'a témoigné en m'accueillant dans son laboratoire.

Je remercie vivement le Dr. D. DIVE, pour son efficacité, son expérience et sa patience qu'il m'a accordé tout au long de ce travail. Je le remercie également pour m'avoir fait partager sa passion pour la recherche. Je voudrais lui témoigner ma grande reconnaissance et mes vifs remerciements.

Monsieur le Pr. Alain FAVIER

Soyez remercié de l'intérêt que vous portez à ce travail pour avoir accepté d'en être le rapporteur.

Monsieur Jacques LE BRAS

Vous acceptez de me faire profiter de votre haute compétence scientifique en jugeant ce travail. Je suis très honoré de votre présence dans les membres du jury en tant que rapporteur et vous en remercie vivement.

Monsieur Jean Luc BERNIER

Vous acceptez de participer à la soutenance de thèse, c'est un grand plaisir pour moi.

Je tiens également à remercier le Pr. A. Gorenflot de Montpellier pour son accueil chaleureux au sein de son équipe, le Pr. J. Van Beeunmen, de l'Université de Gand pour l'essai de séquençage N-terminal de la catalase endogène ainsi que le Dr. Middelkoop du Centre Médical Académique d'Amsterdam pour m'avoir donné les anticorps monoclonaux.

Je ne saurais terminer sans remercier les membres de l'Unité 42 :

Christian pour sa patience dans mes nombreux problèmes d'informatique et pour son aide dans la réalisation des graphiques. Qu'il sache que j'ai apprécié sa pertinence scientifique et qu'il reçoit mes plus vifs remerciements.

Etienne pour ses précieux conseils techniques, son humour quotidien et pour son aide dans la lecture attentive du manuscrit. Je le remercie sincèrement.

Marlène, Annick, Bernadette, Philippe pour leur aide efficace dans la réalisation de ce travail. Enfin, que l'ensemble du laboratoire, chercheurs, étudiants, techniciens et tout le personnel, sache que j'ai toujours apprécié l'ambiance sympathique qui y règne.

## SOMMAIRE

### ABREVIATIONS

### NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES ACIDES AMINES

### INTRODUCTION 1

### GENERALITES

#### Chapitre I : *PLASMODIUM ET BABESIA*

<b>1. Taxonomie de <i>Plasmodium</i> et <i>Babesia</i>.</b>	3
<b>2. <i>Plasmodium</i>.</b>	
2.1. Présentation de <i>Plasmodium</i> .	3
2.2. Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> .	
2.2.1. La phase asexuée.	
2.2.2.1. Etape hépatique.	3
2.2.2.2. Etape sanguine.	4
2.2.2. La phase sexuée.	5
<b>3. <i>Babesia</i>.</b>	
3.1. Systématique de <i>Babesia</i> .	5
3.2. Cycle biologique de <i>Babesia</i> .	
3.2.1. La phase asexuée.	5
3.2.2. La phase sexuée chez la tique.	6

#### Chapitre II : LE CHOC OXYDANT.

<b>1. Les espèces activées de l'oxygène (E.A.O.).</b>	
1.1. L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ).	7
1.2. L'anion superoxyde.	8
1.3. Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).	9
1.4. Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ).	9
<b>2. Sources biologiques des espèces activées de l'oxygène.</b>	
2.1. Formation de $\text{O}_2^{\circ-}$ .	10
2.2. Dans les microsomes et les peroxysomes.	10
2.3. Dans le globule rouge.	11
2.4. Lors de la phagocytose.	11
2.5. Dans le cytoplasme.	12
2.6. Production de radicaux libres par les facteurs externes	12
<b>3. Les cibles cellulaires des espèces activées de l'oxygène.</b>	
3.1. Action sur les lipides.	
3.1.1. L'initiation.	13
3.1.2. La propagation.	13

3.1.3. La terminaison.	13
3.2. Au niveau des protéines.	
3.2.1. La fragmentation.	14
3.2.2. L'agrégation.	14
3.2.3. La susceptibilité à la protéolyse	15
3.3. Action sur les acides nucléiques.	15
3.4. Réaction avec les carbohydrates.	15
<b>4. Moyens de défense contre les radicaux libres :</b>	
<b>les antioxydants.</b>	
4.1. La superoxyde dismutase (SOD).	16
4.2. La glutathion peroxydase (Gpx).	17
4.3. La catalase.	18

## Chapitre III : LES CATALASES

<b>1. Les différents types de catalases.</b>	
- Groupe 1 : Les catalases typiques.	19
- Groupe 2 : Les catalases atypiques.	19
- Groupe 3 : Les catalases/ peroxydases ou hydroperoxydases.	19
- Groupe 4 : Les catalases à manganèse.	20
<b>2. Diversité des catalases</b>	
2.1. Structure des gènes.	20
2.2. Des enzymes de groupes différents dans un même organisme.	21
<b>3. Modifications post-traductionnelles et isoformes de l'enzyme.</b>	
3.1. Glycosylation.	21
3.2. Extrémité N-terminale bloquée.	21
3.3. Isoformes.	22
<b>4. Structure de l'enzyme.</b>	
4.1. Structure primaire.	
4.1.1. Catalases des groupes 1 et 2.	22
4.1.2. Catalases du groupe 3.	23
4.2. Groupement prosthétique.	
4.2.1. Protoporphyrine IX.	23
4.2.2. Groupement chlore.	23
4.2.3. Catalases à manganèse.	24
4.3. Organisation structurale des catalases	
4.3.1. Catalases du groupe I.	
4.3.1.1. Structure secondaire et tertiaire.	24
4.3.1.2. Structure quaternaire.	24
4.3.2. Catalases du groupe 2.	25
4.3.3. Catalases du groupe 3.	25
4.3.4. Catalase du groupe 4.	25
<b>5. Activité enzymatique</b>	
5.1. Mécanisme d'action	
5.1.1. Catalases du groupe 1.	
5.1.1.1. Réaction enzymatique.	26

5.1.1.2. Comportement cinétique.	27
5.1.1.3. Action des inhibiteurs.	
5.1.1.3.1. Le 3-Amino-1:2:4-triazole (AT).	28
5.1.1.3.2. L'anion superoxyde.	28
5.1.1.3.3. Les inhibiteurs classiques.	28
5.1.2. Catalases du groupe 3.	29
5.1.3. Catalases du groupe 4.	29
5.2. Stabilité de l'activité catalasique.	
5.2.1. Les catalases du groupe 1.	30
5.2.2. Les catalases du groupe 2.	30
5.2.3. Les catalases du groupe 3.	31
5.3. Catalase et NADPH.	
5.3.1. Mise en évidence de l'association NADPH et catalase.	31
5.3.2. Rôle du NADPH.	31
<b>6. Rôle de la catalase.</b>	
6.1 Au niveau des hématies et des peroxysomes.	
6.1.1. Les hématies.	32
6.1.2. Au niveau des peroxysomes.	33
6.2. Chez les procaryotes.	
6.2.1. Virulence des souches bactériennes.	33
6.2.2. Rôle au cours de la croissance bactérienne.	34
<b>7. Régulation de l'expression de la catalase.</b>	
7.1. Les inducteurs.	
7.1.1. Le peroxyde d'hydrogène.	
7.1.1.1. Chez les procaryotes.	35
7.1.1.2. Chez les eucaryotes.	35
7.1.2. Phase stationnaire et de privation.	36
7.1.3. Autres inducteurs.	
7.1.3.1. Le choc thermique.	36
7.1.3.2. L'hème.	36
7.1.3.3. Les conditions de culture.	37
<b>8. Localisation de la catalase.</b>	37
<b>9. La catalase chez les protozoaires.</b>	38

## Chapitre IV : STRESS OXYDANT ET PALUDISME.

<b>1. Origine du stress oxydant subi par <i>Plasmodium</i>.</b>	
1.1. Espèces activées de l'oxygène produites par le parasite.	39
1.2. Le système immunitaire de l'hôte.	40
1.3. Molécules antimalariques.	41
1.4. Modifications oxydatives de l'hématie induites par le parasite.	42
<b>2. Sensibilité de <i>Plasmodium</i> au stress oxydant.</b>	
2.1. Données épidémiologiques et expérimentation <i>in vivo</i> .	45
2.2. Action de l'oxygène et des oxydants <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .	46

<b>3. Système de défense de <i>Plasmodium</i> contre le stress oxydant.</b>	
3.1. La superoxyde dismutase.	47
3.2. La catalase.	48
3.3. Les enzymes liées au glutathion.	
3.3.1. La glutathion peroxydase	49
3.3.2. La glutathion réductase.	49
3.3.3. Le glutathion.	49
3.3.4. Enzymes impliquées dans la régénération du NADPH.	50
3.4. Autres systèmes de protection.	50

<b>CONCLUSION DES GENERALITES</b>	52
-----------------------------------	----

## **RESULTATS EXPERIMENTAUX.**

### **Chapitre I: ETUDE DES ACTIVITES CATALASIQUES GLOBALES PRESENTES DANS LES EXTRAITS PARASITAIRES.**

<b>1. Mesures des activités catalasiques globales.</b>	
1.1. Mise au point méthodologique.	53
1.2. Problèmes posés par le dosage de la catalase dans les extraits parasitaires.	58
1.3. Dosage de l'activité catalasique globale dans des populations de <i>Plasmodium</i> et <i>Babesia</i> .	58
1.4. Dosage de l'activité catalasique globale au cours du cycle cellulaire chez <i>P. falciparum</i> .	
1.4.1. Activité catalasique à différents stades du cycle cellulaire.	60
1.4.2. Activité catalasique chez les schizontes âgés.	60
1.5. Discussion.	66
<b>2. Evolution et rôle de la catalase de l'hématie.</b>	
2.1. Evolution de la catalase de l'hématie internalisée par le parasite.	68
2.1.1. Caractérisation des anticorps.	
2.1.1.1. Caractérisation des anticorps par les tests ELISA.	69
2.1.1.2. Caractérisation des anticorps par immunoempreinte.	69
2.1.1.3. Conclusion.	73
2.1.2. Etude de la catalase internalisée en immuno- fluorescence indirecte.	73
2.1.3. Immunolocalisation ultrastructurale.	76
2.1.4. Discussion.	83
2.2. Croissance de <i>P. falciparum</i> dans des hématies dont la catalase a été inactivée.	83
2.2.1. Protocole d'inhibition.	84
2.2.2. Résultats.	85



2.2.3. Discussion.	89
<b>3. Conclusions.</b>	91
 <b>Chapitre II: ESSAI DE CARACTERISATION DE LA CATALASE DE PLASMODIUM FALCIPARUM PAR APPROCHE BIOCHIMIQUE.</b>	
<b>1. Electrophorèses en gel de polyacrylamide.</b>	93
<b>2. Analyse chromatographique des extraits parasitaires.</b>	
2.1. Catalase de l'hématie humaine.	95
2.2. Extraits de <i>P. falciparum</i> en culture asynchrone.	95
2.3. Variation des profils chromatographiques en fonction du cycle cellulaire.	97
2.4. Essai de purification de la catalase éluée en DEAE- Trisacryl à 50 mM de phosphate.	97
<b>3. Analyse des extraits de <i>P. falciparum</i> par immunoempreinte.</b>	
3.1. Immunoempreinte réalisée à partir de gels non dénaturants.	102
3.2. Immunoempreintes réalisées à partir de SDS-PAGE.	
3.2.1. Extraits de cultures asynchrones.	102
3.2.2. Extraits préparés à différents stades du cycle cellulaire.	104
3.3. Discussion.	104
<b>4. Immunoprécipitation de la catalase de <i>P. falciparum</i>         après marquage radioactif des protéines parasitaires.</b>	106
<b>5. Discussion.</b>	106
 <b>Chapitre III : APPROCHE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE.</b>	
<b>1. Problèmes posés par l'approche en biologie moléculaire.</b>	110
<b>2. Essai d'amplification d'un fragment du gène de la         catalase par PCR chez <i>P. falciparum</i>.</b>	
2.1. Définition des amorces.	113
2.2. Résultats.	114
2.3. Recherche de l'expression de l'enzyme par RT-PCR.	119
<b>3. Discussion.</b>	119
 <b>DISCUSSION</b>	121
 <b>CONCLUSION GENERALE</b>	129
 <b>MATERIEL ET METHODES.</b>	
 <b>Chapitre I. : LE MATERIEL BIOLOGIQUE.</b>	
<b>1. Description des souches et infestation.</b>	
1.1. Les souches.	
1.1.1. <i>Plasmodium</i> de rongeur.	130

1.1.2. <i>Plasmodium</i> humain.	130
1.1.3. <i>Babesia</i> .	130
1.2. Entretien.	
1.2.1. Modèle <i>in vivo</i> .	130
1.2.2. Modèle <i>in vitro</i> .	131
1.3. Synchronisation des cultures de <i>P. falciparum</i> .	131
<b>2. Extraction des parasites par lyse à la saponine.</b>	
2.1. <i>Plasmodium</i> et <i>Babesia</i> murins.	131
2.2. Parasites provenant de culture.	132

## Chapitre II : ETUDE DE LA CATALASE.

<b>1. Préparation des homogénats parasitaires.</b>	
1.1 Lysat parasitaire.	133
1.2 Préparation des témoins hématies humaines et murines.	
1.2.1. Hématies murines.	133
1.2.2. Lyse des hématies.	133
1.3 Dosage des protéines.	134
1.4. Dosage de l'hémoglobine.	134
<b>2. Dosage des différentes activités enzymatiques.</b>	
2.1. Dosage de la Superoxyde Dismutase (SOD).	134
2.1.1. Protocole de dosage.	135
2.1.2. Préparation du témoin globule rouge humain.	136
2.2. Dosage de la L-glutamate deshydrogénase (NADPH).	136
2.2.1. Protocole de dosage	137
2.3. Dosage de la catalase.	138
2.3.1. Protocole de dosage	138
2.4. Action du pH sur l'activité de la catalase humaine.	139
<b>3. Mise en évidence de l'activité catalasique sur gel d'acrylamide.</b>	
3.1. Electrophorèse en condition non dénaturante.	139
3.2. Révélation de l'activité catalasique.	139
<b>4. Purification de la catalase retrouvée dans l'extrait de <i>Plasmodium falciparum</i></b>	
4.1 Chromatographie d'échange d'ions (DEAE-Trisacryl)	140
4.2. Chromatographie IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography).	140
4.3. Electrophorèse préparative et électroélution	141
4.4. Electrophorèse en SDS PAGE.	141
4.5. Coloration des protéines au nitrate d'argent.	142

## Chapitre III : ETUDE ET ROLE DE LA CATALASE DE L'HOTE INTERNALISEE PAR LE PARASITE.

<b>1. Production de l'anticorps polyclonal anti-catalase humaine.</b>	
1.1. Préparation de la solution antigénique.	143
1.2. Immunisation.	143
<b>2. Détection des anticorps spécifiques.</b>	

2.1. Tests E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	
2.1.1. Dissociation de la catalase humaine à pH basique.	144
2.1.2. ELISA.	144
2.2. Electrotransfert et immunoempreinte.	
2.2.1. Transfert des protéines.	
2.2.1.1. Gels dénaturants	144
2.2.1.2. Gels natifs	145
2.2.2. Immunodétection des protéines.	145
<b>3. Immunolocalisation de la catalase internalisée par le parasite.</b>	
3.1. Immunofluorescence indirecte.	
3.1.1. Préparation des échantillons.	146
3.1.2. Immunodétection.	146
3.1.3. Observation.	146
3.2. Immunolocalisation ultrastructurale.	
3.2.1. Préparation des échantillons.	147
3.2.2. Coupes ultrafines.	147
3.2.3. Immunolocalisation.	147
<b>4. Etude morphologique des parasites en microscopie électronique à transmission.</b>	
4.1. Préparation de l'échantillon.	
4.1.1. Fixation.	148
4.1.2. Déshydratation et précoloration.	148
4.1.3. Inclusion en Epon.	148
4.2. Observation des parasites.	149

**Chapitre IV : IMMUNOPRECIPITATION DE LA CATALASE ENDOGENE DE *P. FALCIPARUM*.**

<b>1. Préparation de l'immunoabsorbant.</b>	
1.1. Purification de l'anticorps polyclonal.	150
1.2. Couplage des immunoglobulines purifiées.	150
<b>2. Immunoprécipitation.</b>	
2.1. Lysat parasitaire.	
2.1.1. Marquage métabolique à l'isoleucine tritiée.	151
2.1.2. Extraction des parasites.	151
2.1.3. Comptage de la radioactivité.	151
2.2. Immunoprécipitation.	151
2.3 Analyse des protéines immunoprécipitées.	
2.3.1. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.	152
2.3.2. Fluorographie.	152

**Chapitre VI : APPROCHE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE.**

<b>1. Préparation de l'ADN génomique de <i>Plasmodium falciparum</i>.</b>	153
<b>2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).</b>	
2.1. Choix des amorces.	153
2.2. Réaction de polymérisation en chaîne.	154

2.3. Analyse des produits de PCR.	154
<b>3. Clonage.</b>	
3.1. Préparation du fragment à cloner.	154
3.2. Clonage.	155
3.3. Transformation.	155
3.4. Criblage.	155
3.5. Contrôle de l'insertion du fragment.	156
<b>4. Séquençage du fragment amplifié.</b>	
4.1. Préparation de l'échantillon.	156
4.2. Réaction de séquence.	157
4.3. Migration électrophorétique.	157
4.4. Révélation du gel.	157
4.5. Analyse des résultats obtenus.	158
<b>5. Réverse transcriptase suivie d'une PCR (RT-PCR)</b>	
5.1. Précautions relatives à la manipulation des ARN.	158
5.2. Extraction de l'ARN total de <i>P. falciparum</i> .	158
5.3. Etape de reverse transcriptase suivie d'une PCR (RT-PCR).	159

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	160
------------------------------------	-----

## ABREVIATIONS

ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNm	: Acide RiboNucléique messenger
AT	: 3-Amino-1:2:4-Triazole
BCIP	: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol-Phosphate
BSA	: Albumine Sérique Bovine
CAPS	: Acide 3-(Cyclohexylamino)-1-PropaneSulphonique
DAB	: 3,3' Diaminobenzidine
DDSA	: Anhydride Dodécényl succinique
DEAE	: DiEthylAminoEthyle
DEPC	: DiEthylPyroCarbonate
D.O	: Densité Optique
DMSO	: DiMéthylSulfOxide
DTPA	: Acide DiéthylèneTriamine Penta Acétique
DTT	: DiThioThréitol
E.A.O.	: Espèces Activées de l'Oxygène
EDTA	: Acide EthylèneDiamineTétraAcétique
ELISA	: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
FAD	: Flavine Adénine Dinucléotide
FMN	: Flavine MonoNucléotide
Glc	: Glucose
GO	: Glucose Oxydase
GPX	: Glutathion Peroxydase
GSH	: Glutathion
HEPES	: Acide N-2-HydroxyEthyl Pipérazine-N'-2-Ethane Sulfonique
IFN $\gamma$	: Interféron gamma
IgG	: Immunoglobuline de type G
IL -1,6	: Interleukine
IPTG	: Iso Propyl- $\beta$ -D-Thio Galactopyranoside
kb	: kilobase
kDa	: kiloDalton
KRT	: tampon Krebs-Ringer-TES
LB	: milieu de culture Luria Bertani
NADPH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBT	: Nitro Bleu Tétrazolium
MBq	: MégaBecquerel
MNA	: Methyl Nadic Anhydride
pb	: paire de base
PBS	: "Phosphate Buffered Salin"
PBSO	: PBS Ovalbumine
PBSTB	: PBS-Tween20-BSA
PCR	: "Polymerase Chain Reaction"
PMSF	: PhénylMéthylSulfonylFluoride
RPMI	: "Roswell Park Memorial Institute"
RT-PCR	: Réverse Transcriptase
SDS	: SodiumDodécylSulfate

SDS-PAGE : Electrophorèse en Gel de PolyAcrylamide-SDS  
SOD : SuperOxyde Dismutase  
TAE : Tris-Acétate-EDTA  
TBE : Tris-Borate-EDTA  
TE : Tris-EDTA  
Temed : N,N,N,N'-Tétraméthyléthylènediamine  
TES : Triéthanolamine-EDTA-Sucrose  
TNF $\alpha$  : "Tumor Necrosis Factor"  
TNT : Tris-NaCl-Tween 20  
Tris : Tris Hydroxyméthyl aminométhane  
TS : acide N-tris[hydroxyméthyl]-méthyl-2-aminoéthane-sulfonique]  
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES ACIDES AMINES

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

# INTRODUCTION



Le paludisme représente la première endémie mondiale avec chaque année plus de deux cent cinquante millions de cas recensés et une mortalité d'environ deux millions de personnes, principalement des enfants en bas âge. Cette parasitose est causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* dont l'espèce la plus redoutable pour l'homme, *P. falciparum* est aussi la plus répandue dans les zones tropicales et subtropicales.

La lutte contre le paludisme rencontre actuellement un certain nombre de difficultés: la vaccination, dont l'issue est incertaine, restera onéreuse pour une application en masse dans les pays en voie de développement; la chloroquine, qui reste le médicament de base, malgré l'extension de la résistance à toutes les zones endémiques; d'autres molécules antimalariques susceptibles de remplacer la chloroquine, comme les antifolates se heurtent aussi à une résistance.

De nouvelles molécules (artémisinine et dérivés), issues des plantes, utilisées depuis des siècles dans la pharmacopée traditionnelle chinoise se sont avérées très prometteuses pour la lutte contre le paludisme. Ces molécules se caractérisent par la possession d'un pont endoperoxyde, qui apparaît caractéristique des propriétés antimalariques des produits. Elles sont supposées agir en provoquant un choc oxydant chez le parasite.

Les possibilités d'adaptation de *Plasmodium* au choc oxydant ne sont pas encore bien connues. Or, la connaissance du système de défense de ce parasite contre les espèces activées de l'oxygène est indispensable pour estimer le risque d'apparition d'une résistance contre les endoperoxydes et pour découvrir éventuellement de nouvelles cibles médicamenteuses.

Pendant longtemps, on a admis que le parasite utilisait le système enzymatique de sa cellule hôte pour sa propre protection. Depuis peu, une SOD à fer a été caractérisée et séquencée chez *P. falciparum*. La découverte de cette enzyme posait alors le problème de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit lors de son fonctionnement. Deux enzymes pouvaient être impliquées dans cette détoxification : la glutathion peroxydase et la catalase.

Notre travail a consisté à rechercher s'il existait une catalase endogène chez *Plasmodium*, et à préciser si la catalase de l'hématie internalisée dans le système digestif pouvait réellement jouer un rôle dans la protection du parasite.

Notre approche a été réalisée par des techniques de biochimie et de biologie moléculaire. Nous avons ainsi mis en évidence à la fois la protéine et le gène de la catalase de *P. falciparum*. Nous avons également étudié, à l'aide de techniques immunologiques et par certaines conditions de culture, le devenir et le rôle de la catalase de l'hématie-hôte au cours du développement du

parasite. Nos résultats montrent que *P. falciparum* ne semble pas dépendre de la catalase de la cellule-hôte pour sa protection contre le choc oxydant mais qu'il possède son propre système de détoxification des espèces activées de l'oxygène.

# GENERALITES

## CHAPITRE I: *PLASMODIUM ET BABESIA*

### 1. TAXONOMIE DE *PLASMODIUM* ET *BABESIA*

*Plasmodium* et *Babesia* sont des Protistes parasites des vertébrés, appartenant au Phylum des Apicomplexa ou Sporozoaires. Ces deux genres sont classés dans l'ordre des Haemosporina, qui indique clairement que ce sont des parasites sanguicoles. En effet, presque tous (*P. lophurae* est une exception) ne peuvent se développer qu'à l'intérieur d'une cellule hôte (érythrocyte ou hématie), où se déroule la phase principale du cycle. Ceci implique également que l'agent vecteur sera hématophage. La classification de *Plasmodium* et *Babesia* est résumée dans la **figure I. 1**.

### 2. *PLASMODIUM*

#### 2.1. Présentation de *Plasmodium*

Il existe une centaine d'espèces de *Plasmodium* infectant reptiles, oiseaux et mammifères, mais seules quatre d'entre elles sont à l'origine d'infections chez l'homme : il s'agit de *Plasmodium ovale* (Strehpens 1922), *Plasmodium vivax* (Grassi et Feletti 1890), *Plasmodium malariae* (Laveran 1881) et *Plasmodium falciparum* (Welch 1897). Seul *P. falciparum* est à l'origine des accès graves et pernicioeux du paludisme. C'est également la seule espèce qui puisse être maintenue en culture *in vitro* pendant de longues périodes d'une façon reproductible.

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

Le cycle évolutif de *Plasmodium* se déroule en une phase sexuée chez un Diptère, l'anophèle femelle (vecteur et hôte définitif) et une phase asexuée chez un vertébré (hôte intermédiaire). La phase asexuée se déroule en deux étapes : hépatique ou exo-érythrocytaire et sanguine ou intra-érythrocytaire.

##### 2.2.1. La phase asexuée

###### 2.2.1.1. Etape hépatique

Lors d'un repas sanguin, l'anophèle femelle injecte dans le sang de l'hôte plusieurs centaines à plusieurs milliers de sporozoïtes. Ceux-ci gagnent en quelques minutes le foie et rentrent dans les hépatocytes grâce à un système de reconnaissance constitué par des récepteurs

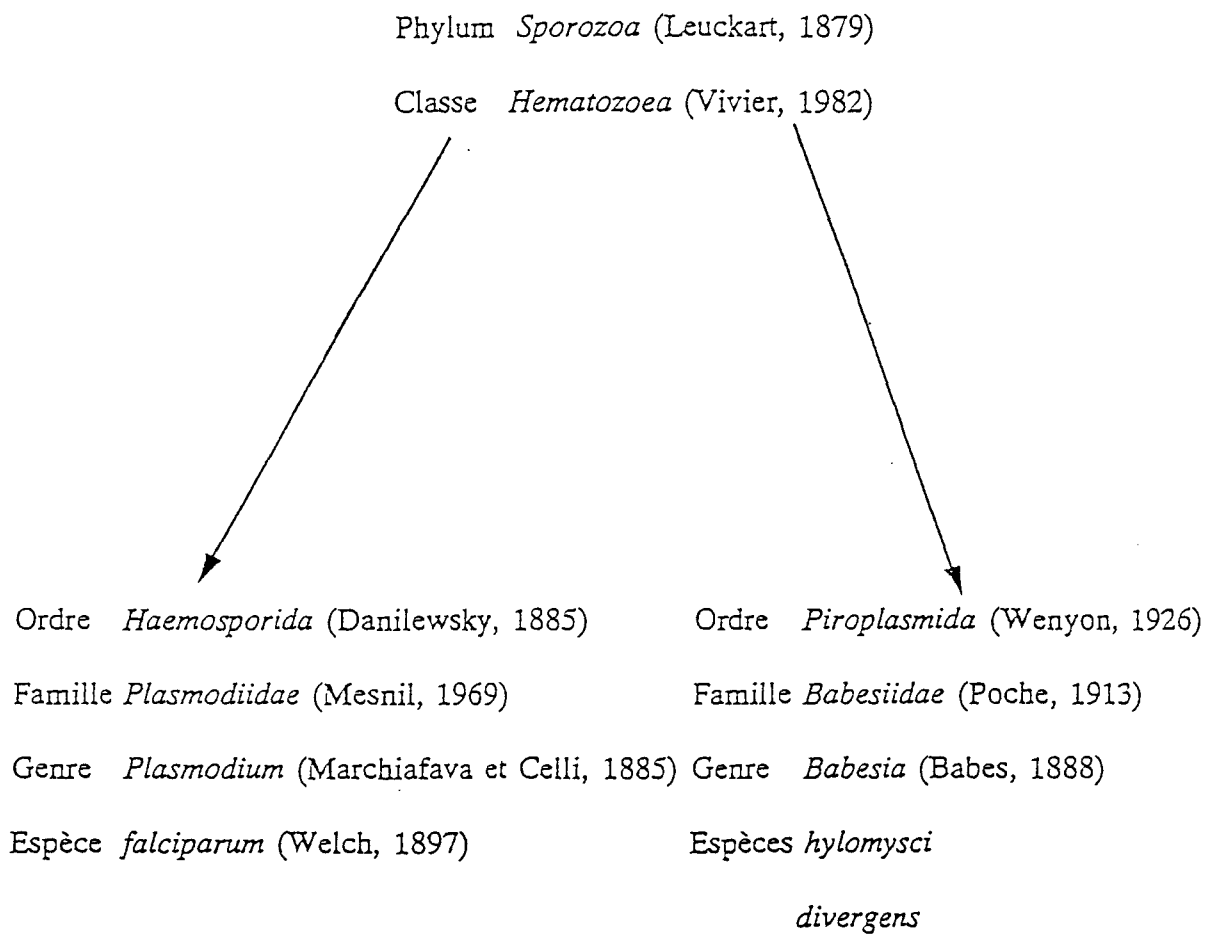


Figure I.1: Systématique de *Plasmodium* et *Babesia*.

localisés au niveau des microvillosités de la surface de l'hépatocyte et d'une protéine majoritaire de la surface cellulaire du sporozoïte: la "circumsporozoite protein" ou CSP (Schrével, 1994). A ce niveau, certains d'entre eux vont se multiplier : c'est la schizogonie exo-érythrocytaire. Après une schizogonie et une maturation de durée variable de 5 à 15 jours selon l'espèce plasmodiale, la cellule hépatique infectée libère dans la circulation sanguine plus de 2000 mérozoïtes qui vont pénétrer dans les hématies pour poursuivre leur cycle évolutif.

Chez *P.ovale* et *P.vivax*, une forme quiescente, ou latente, décrite sous le nom d'hypnozoïte, explique les rechutes tardives lors de reprises évolutives survenant, des mois ou des années après une première infection.

#### 2.2.1.2. Etape sanguine

Cette étape correspond à la période clinique de la maladie. Le mérozoïte pénètre dans l'hématie en moins de 30 secondes. L'invasion comprend trois phases : reconnaissance et attachement du mérozoïte à l'érythrocyte par l'intermédiaire de récepteurs membranaires; invasion rapide par invagination de la membrane plasmique de l'érythrocyte; fusion de la membrane du globule rouge au point de pénétration. Le mérozoïte est ainsi isolé dans une vacuole parasitophore. Le parasite évolue en passant par plusieurs stades : jeune trophozoïte ou forme en anneau, puis trophozoïte âgé. Cette phase de croissance cellulaire de durée variable selon l'espèce plasmodiale, est suivie par une phase de multiplication par un processus de division multiple (schizogonie). Le trophozoïte passe alors au stade schizonte où le noyau subit de 3 à 5 divisions mitotiques, donnant de 8 à 32 noyaux, selon les espèces. Ces schizontes, par fragmentation cytoplasmique, produisent des mérozoïtes mononucléés. La rupture des membranes érythrocytaire et parasitophore libère dans la circulation sanguine les mérozoïtes qui recolonisent, en un temps très court, de nouvelles hématies. Un nouveau cycle érythrocytaire commence. La lyse périodique des hématies, la libération simultanée des mérozoïtes et des déchets toxiques (pigments et débris cellulaires), sont à l'origine de la fièvre et des frissons caractéristiques de l'accès paludéen. Ce cycle intra-érythrocytaire peut être maintenu *in vitro* indéfiniment, alors qu'*in vivo*, le nombre de schizogonies est restreint, par la différenciation en gamétocytes et par la mort du sujet infesté.

Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains parasites vont se différencier en gamétocytes, formes sexuées mâles (microgamétocytes) et femelles (macrogamétocytes) qui vont permettre la transmission de la maladie.

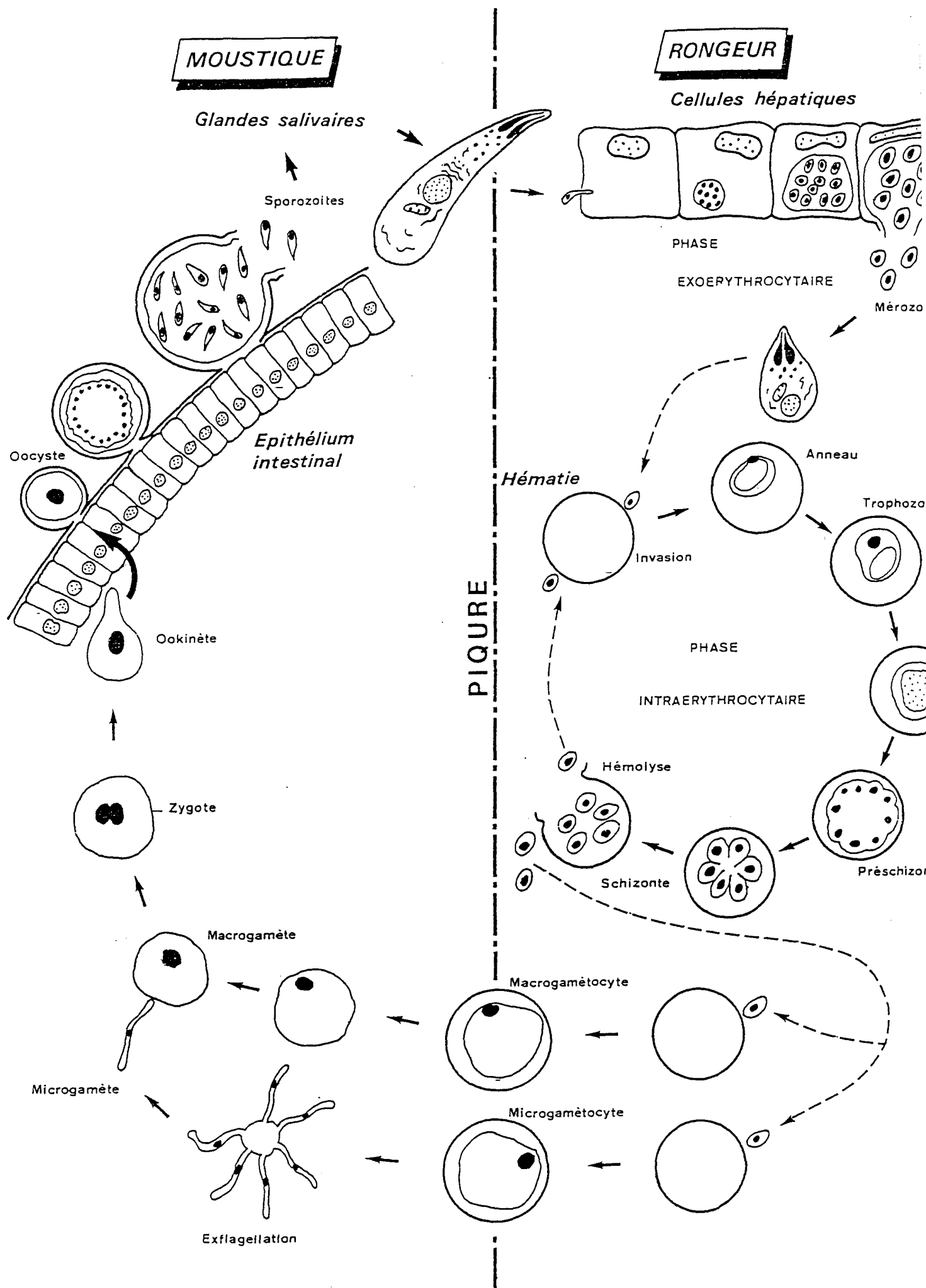


Figure I.2: Cycle biologique de *Plasmodium murin*.

### 2.2.2. La phase sexuée

Les gamétocytes circulant dans le sang sont puisés par l'anophèle femelle lors de son repas sanguin. Dans l'estomac du moustique, les gamétocytes achèvent leur maturation : les microgamètes subissent une exflagellation, tandis que les macrogamètes évoluent en gamètes femelles. La fécondation donne naissance à l'oocinète, diploïde, élément mobile qui, après avoir traversé la paroi de l'épithélium digestif, va s'enkyster sous la lame basale et se transforme en oocyste. Une méiose réductionnelle, suivie d'une phase de multiplication asexuée, donnent de nombreux sporozoïtes haploïdes. L'oocyste mûr, libère les sporozoïtes qui vont s'accumuler dans les glandes salivaires de l'insecte. Lors d'un nouveau repas sanguin, l'anophèle femelle injecte les sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte intermédiaire, perpétuant ainsi le cycle.

## 3. *BABESIA*

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

*Babesia* est l'agent de la Babésiose, parasitose distribuée largement à travers le monde. Elle affecte principalement les élevages de bovins et de nombreux autres mammifères comme le chien et le cheval. Cette infection peut être fatale pour l'homme dans des conditions particulières (individus splénectomisés).

Dans les conditions naturelles, le genre *Babesia* possède une haute spécificité pour son hôte, à l'exception de *B.microti*, qui infecte non seulement les rongeurs, mais aussi l'homme. *B.divergens*, qui est un parasite naturel des bovins, peut également infecter la gerbille, le chimpanzé et l'homme splénectomisé.

### 3.2. Cycle biologique de *Babesia* (Fig. I. 3)

Le cycle biologique des *Babesia* comporte une phase asexuée chez un vertébré (hôte intermédiaire). Les parasites sont transmis par un acarien spécifique de l'espèce (une tique), qui constitue le vecteur et hôte définitif où se déroule la phase sexuée (Mehlhorn et Schein, 1993).

#### 3.2.1 La phase asexuée

Contrairement à *Plasmodium*, la phase asexuée de *Babesia* ne passe pas par une phase de développement hépatique ou extra-érythrocytaire. Après l'inoculation par la tique, les sporozoïtes entrent directement dans les hématies où ils se développent rapidement. Les trophozoïtes ne sont pas emprisonnés dans une vacuole parasitophore. La schizogonie s'effectue par division binaire



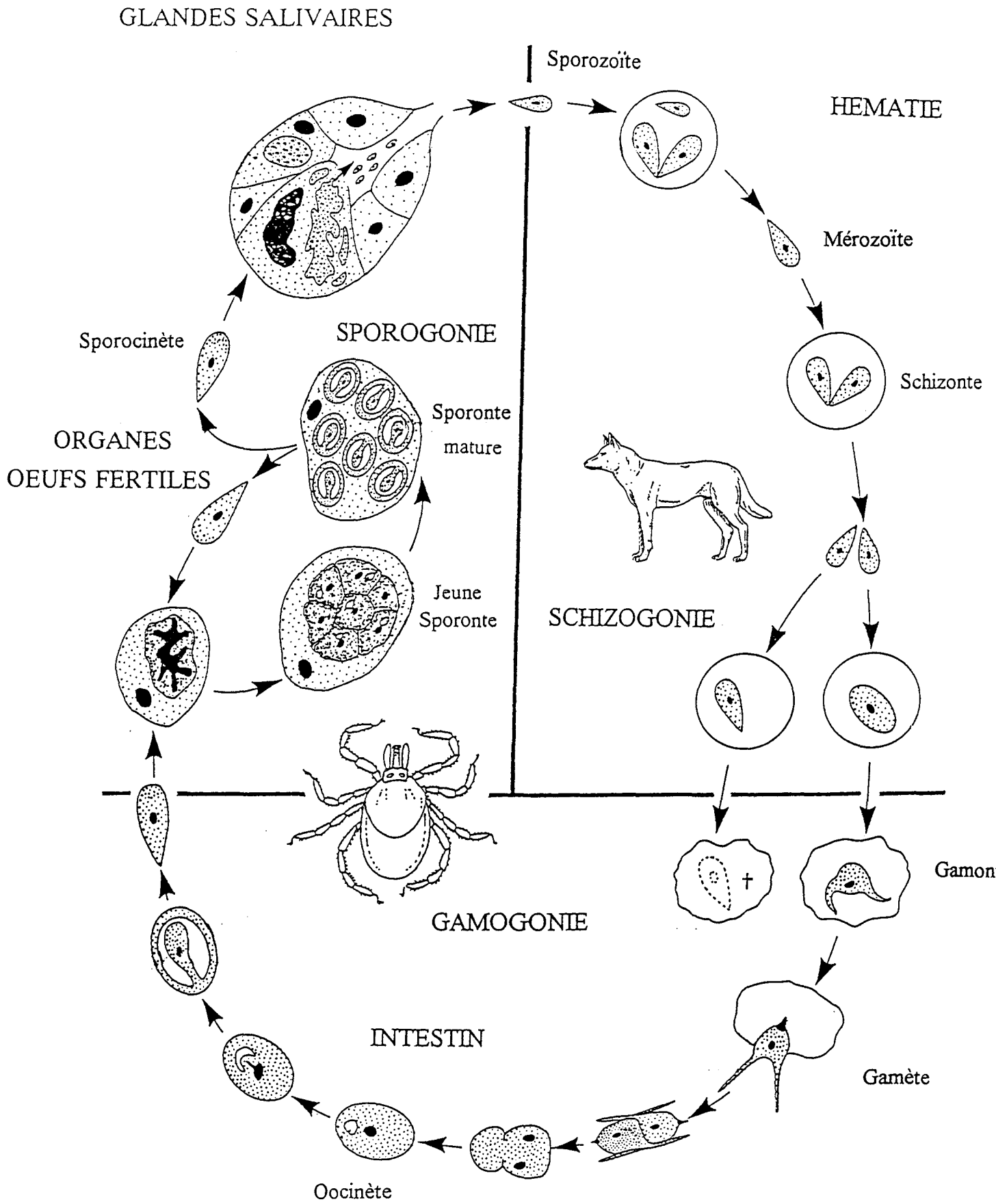


Figure I.3 : Cycle biologique de *Babesia canis*. D'après Mehlhorn et Schein (1993).

ou par bourgeonnement, conduisant, suivant l'espèce, à deux ou quatre (croix de Malte) cellules filles haploïdes. A maturité, les mérozoïtes sont libérés par l'éclatement de la cellule hôte et vont infester de nouvelles hématies. La multiplication rapide des parasites conduit à une anémie importante et une hémoglobinurie chez l'animal infesté (le cycle de *B.divergens* en gerbille est de 5 heures).

Certains mérozoïtes érythrocytaires ne vont pas se diviser mais vont se différencier en gamontes, de forme ovoïde, dont le développement se poursuit chez la tique, lorsque celle-ci les aura absorbés lors de son repas sanguin, perpétuant ainsi le cycle parasitaire.

### 3.2.2. La phase sexuée chez la tique

Elle se déroule chez *Ixodes ricinus* dans le cas de *B.divergens*. A l'intérieur de l'intestin, les gamontes acquièrent des flagelles, tandis que le noyau se divise deux fois, aboutissant à quatre gamètes (*gamogonie*). Deux d'entre eux vont fusionner pour donner naissance à un oocinète mobile, qui quitte l'intestin et pénètre dans les cellules d'autres organes comme les ovaires ou les oeufs de femelles fertiles. Dans ces cellules, l'oocinète se développe et se transforme en sporonte, qui subit une *sporogonie*. Celle-ci aboutit à la formation de sporocinètes (formes mobiles) qui gagnent les glandes salivaires ou restent dans les oeufs de la tique, infectant la génération suivante. Dans les cellules des glandes salivaires, les sporocinètes subissent une nouvelle sporogonie qui donne naissance aux sporozoïtes, forme infestante, transmise au vertébré lors d'une piqûre de l'insecte. Les sporocinètes infectant les oeufs des tiques se développent dans la larve de l'acarien et la rendent infectante.

## CHAPITRE II: LE CHOC OXYDANT

L'oxygène est indispensable à la vie aérobie. Chimiquement inerte, il participe à la production d'énergie par oxydation de molécules biologiques au cours de la respiration. Si l'oxygène est vital, il est aussi potentiellement toxique. Au cours du métabolisme cellulaire, des intermédiaires très réactifs sont formés: ce sont les espèces activées de l'oxygène (E.A.O.), rapidement éliminées par la cellule dans les conditions normales. Cependant, de nombreuses situations (facteurs extracellulaires ou diminution des systèmes de défense de la cellule) peuvent entraîner l'apparition d'un excès d' E.A.O.. Ainsi se crée une situation de stress oxydatif pouvant entraîner la mort cellulaire ou l'apparition de nombreuses pathologies. Après une présentation des E.A.O., nous nous intéresserons à leur origine dans les milieux biologiques, à leur action sur diverses cibles cellulaires pour décrire ensuite les systèmes mis en place par la cellule pour détruire ces espèces activées de l'oxygène.

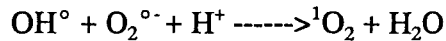
### 1. LES ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE (E.A.O.)

L'oxygène moléculaire ou dioxygène, se caractérise par la présence de deux électrons célibataires sur son orbitale externe. Il ne peut accepter qu'un électron ou des électrons de même spin et non une paire d'électrons lors de ses réactions. Les réactions de l'oxygène concerneront donc principalement des transferts à un électron avec des espèces chimiques paramagnétiques, ou le passage à l'état excité qui lève le principe d'exclusion (oxygène singulet). Le dioxygène peut donner naissance à des espèces beaucoup plus réactives : ce sont les espèces activées de l'oxygène qui comprennent l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ).

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

L'oxygène singulet est une molécule très réactive puisqu'elle se trouve sous un état excité. Elle peut accepter un doublet d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet est essentiellement formé lors de l'activation photochimique de l'oxygène. Certaines molécules comme les chromophores sont capables d'absorber des photons, passant ainsi à l'état excité. Ils retournent à l'état stable par libération de l'énergie captée, qui sera transférée sur l'oxygène. La molécule  $^1\text{O}_2$  peut également être formée par voie chimique par interaction radical-radical. C'est

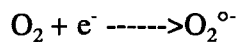
le cas de la réaction suivante:



L'oxygène singulet réagit avec les membranes biologiques, les acides nucléiques et les protéines.

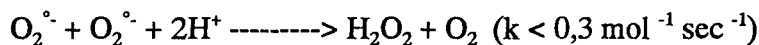
## 1.2. L'anion superoxyde

L'anion superoxyde est un monoradical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire par capture d'un électron au cours d'une réaction nécessitant de l'énergie:



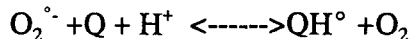
L'anion superoxyde est un bon réducteur, mais un faible oxydant. Réactif dans un environnement hydrophobe, il est peu actif en solution aqueuse (Halliwell et Gutteridge, 1986). Il diffuse faiblement au travers des membranes, sauf celle de l'hématie où il emprunterait un canal anionique (Lynch et Fridovich, 1978). Il conduit à la formation d'autres radicaux libres qui sont eux, très réactifs, incluant le radical perhydroxyle ( $\text{HO}_2^\circ$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ).

$\text{O}_2^{\circ-}$  tend spontanément à se dismuter en  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



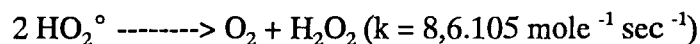
Ceci montre que  $\text{O}_2^{\circ-}$  ne peut se dismuter que par capture d'un proton.

L'anion superoxyde peut provoquer certaines réductions. Ainsi, il réagit sur le cytochrome c sous sa forme ferrique et sur la méthémoglobine. Il réduit diverses quinones (Q), réactions souvent limitées par la réaction inverse d'oxydation du radical semiquinone par  $\text{O}_2$  (Ferradini, 1986):



L'anion superoxyde réagit rapidement avec l'oxyde nitrique ( $\text{NO}^\circ$ ) en solution aqueuse pour donner le peroxynitrite ( $\text{OONO}^\circ$ ), oxydant très puissant.

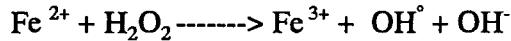
En milieu acide,  $\text{O}_2^{\circ-}$  se protone ( $\text{pKa} = 4,8$ ) pour former le radical perhydroxyle ( $\text{HO}_2^\circ$ ), beaucoup plus liposoluble que  $\text{O}_2^{\circ-}$ . Dans l'eau, sa dismutation est également plus rapide que  $\text{O}_2^{\circ-}$ :



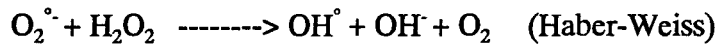
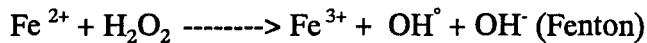
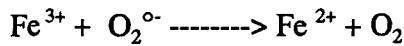
La molécule  $\text{HO}_2^\circ$  intervient dans la lipoperoxydation en arrachant un atome d'hydrogène d'un acide gras polyinsaturé. Il pourrait ainsi jouer un rôle spécifique dans les compartiments acides de la cellule (Morlière *et al.*, 1992).

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

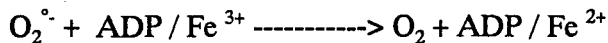
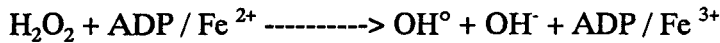
Le peroxyde d'hydrogène formé secondairement par dismutation de l'anion superoxyde est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. En présence de l'ion ferreux Fe<sup>2+</sup>, il se décompose selon la réaction de Fenton pour donner OH<sup>°</sup> inoffensif et un radical hydroxyle OH<sup>°</sup> très agressif :



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement de Fe<sup>2+</sup> sauf en présence de l'anion superoxyde qui le régénère en réduisant Fe<sup>3+</sup> selon la réaction d'Haber-Weiss:



Cette réaction se produit en présence de traces de fer ou de complexes de fer de faible masse moléculaire (ADP/Fe<sup>3+</sup> par exemple) présents dans le milieu intracellulaire. En effet, les formes chélatées protègent le fer d'une précipitation sous une forme hydroxyde inactive (Pré, 1991).



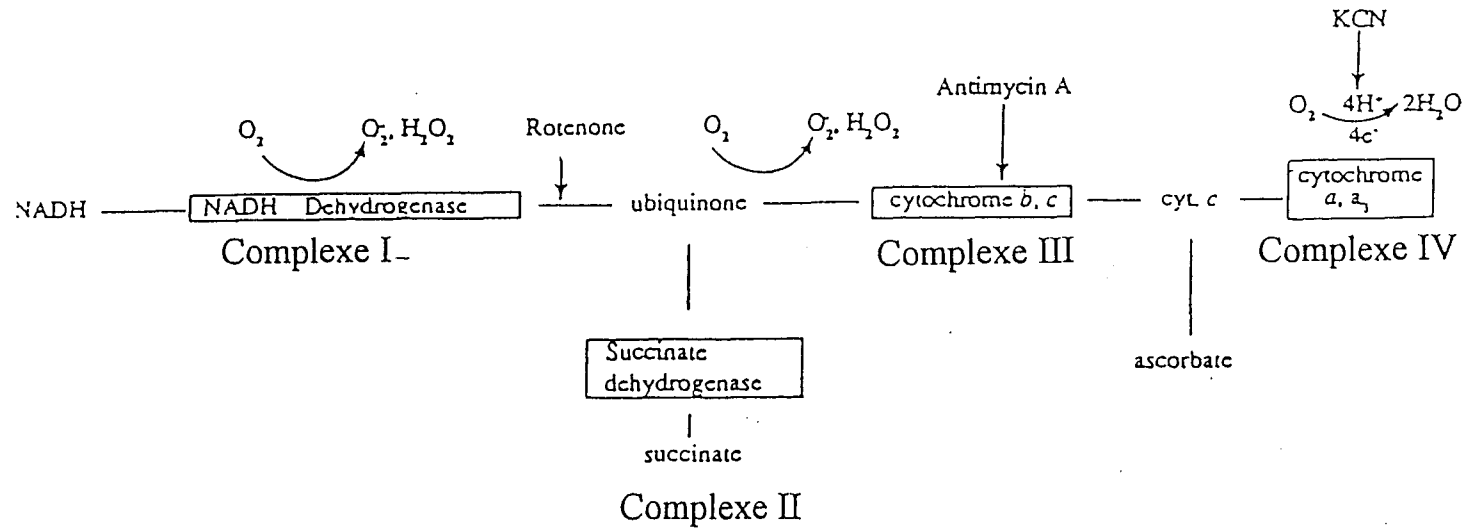
La réaction de Fenton peut également être amorcée par le cuivre Cu<sup>+</sup>, le cobalt Co<sup>2+</sup>, mais le meilleur catalyseur reste néanmoins Fe<sup>2+</sup>.

Molécule non chargée, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffuse facilement à travers les membranes permettant la formation de radicaux libres, loin de son lieu de formation.

### 1.4. Le radical hydroxyle (OH<sup>°</sup>)

Le radical hydroxyle est considéré comme le composé le plus actif vis à vis des systèmes biologiques. Sa demi-vie est de 10<sup>-9</sup> seconde à 37°C, limitant sa capacité à diffuser. Il agit immédiatement sur son lieu même de production sur les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les glucides. Il provoque la formation de nouveaux radicaux en arrachant un atome d'hydrogène.

OH<sup>°</sup> est formé à partir du peroxyde d'hydrogène selon la réaction d'Haber-Weiss ou par décomposition de l'eau sous l'action des radiations ionisantes (rayons X, rayonsγ).



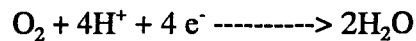
**Figure I. 4:** Représentation schématique de l'organisation de la chaîne respiratoire en quatre complexes liés par des transporteurs solubles d'électrons (ubiquinone et cytochrome c). Les sites de production de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ainsi que les sites d'actions des inhibiteurs (->) de la chaîne respiratoire sont indiqués. D'après Sohal et Salin, 1992.

## 2. SOURCES BIOLOGIQUES DES ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE

Dans les conditions physiologiques normales, différents processus produisent en permanence dans la cellule des radicaux libres par réduction de l'oxygène. Des xénobiotiques, des facteurs de l'environnement (les radiations ionisantes, les rayons ultraviolets ainsi que de nombreux polluants atmosphériques) sont également responsables de la production de nombreuses E.A.O.

### 2.1. Formation de $O_2^{\circ-}$ dans la mitochondrie et le chloroplaste

Il est actuellement admis que la chaîne respiratoire mitochondriale est le principal site de production de  $O_2^{\circ-}$ . Lors de la respiration cellulaire, les électrons circulent à travers les transporteurs membranaires, NADH déshydrogénase, coenzyme Q (ubiquinone), cytochromes b et c (Fig. I. 4). Ils atteignent finalement le système de la cytochrome c oxydase où quatre électrons sont transférés sur une molécule d'oxygène qui est directement réduite en eau selon l'équation:



98% de l'oxygène est réduit directement en eau par ce système, sans formation d'intermédiaires. Les 2% restants sont responsables de la formation de l'anion superoxyde au niveau de l'ubiquinone du coenzyme Q et de la NADH déshydrogénase. On assiste à une perte d'un électron de la chaîne respiratoire réduisant  $O_2$  en  $O_2^{\circ-}$  (Sohal et Brunk, 1992).

Lors d'une anoxie ou d'une hypoxie cellulaire, le transport des électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale s'arrête au niveau du coenzyme Q. Lors de la réoxygénation qui suit, le système des cytochromes ne fonctionne pas immédiatement, et l'oxygène diffuse jusqu'à l'ubiquinone du coenzyme Q où il sera réduit en  $O_2^{\circ-}$  électron par électron.

Chez les végétaux, l'anion superoxyde peut être libéré lors de la photosynthèse, qui produit  $O_2$  à partir d' $H_2O$  au niveau de la ferredoxine du photosystème I et de la plastoquinone du photosystème II (Salin, 1991). De plus, l'oxygène singulet peut être créé par photoactivation au niveau des chloroplastes.

### 2.2. Dans les microsomes et les peroxysomes

Les mono-oxygénases ou oxygénases à fonction mixte sont des enzymes assurant l'hydroxylation de molécules saturées. Elles dépendent du NADH ou du NADPH comme source d'électrons et produisent de l'anion superoxyde et de l' $H_2O_2$ . Le système le mieux décrit est sans

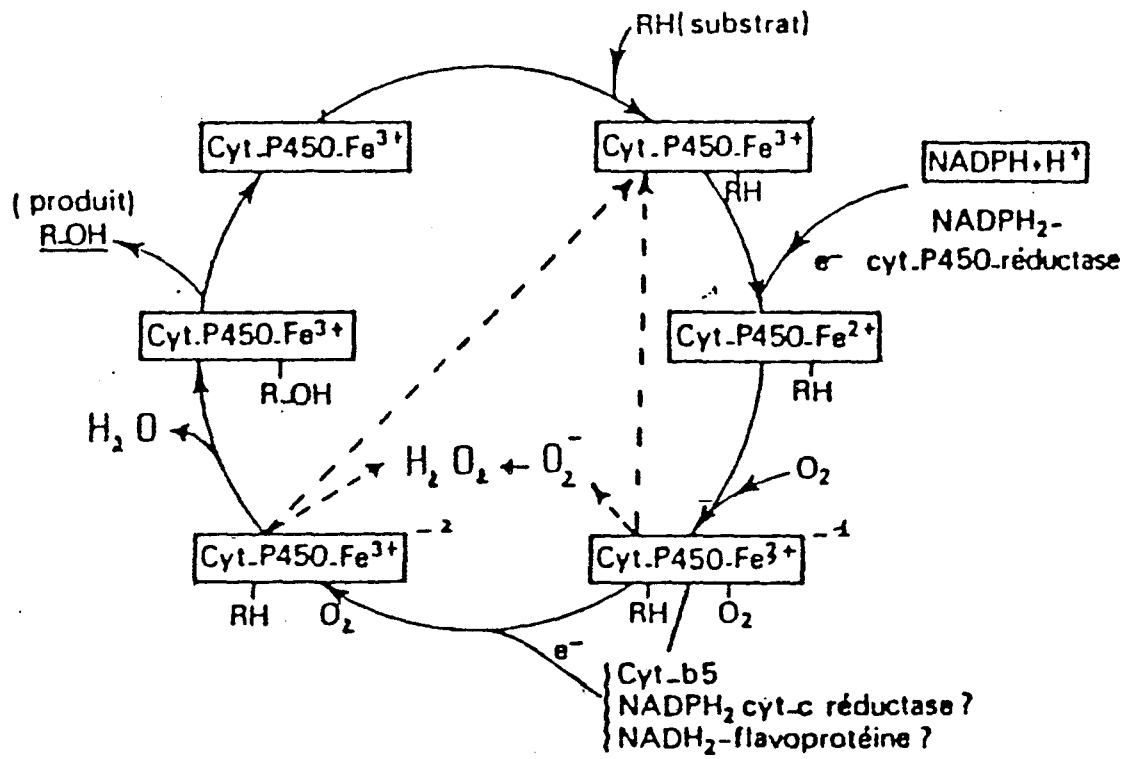


Figure I. 5: Mécanisme proposé du complexe cytochrome P-450.



conteste la NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> réductase, enzyme à fer dépendante du NADPH (Fig. I. 5). Ce complexe est localisé dans les membranes des microsomes des hépatocytes de mammifères. En présence d'oxygène, ce complexe greffe sur de nombreux xénobiotiques un groupement OH. Au cours de la réaction, des anions superoxydes sont produits.

Les oxydases, enzymes à FAD ou FMN utilisent O<sub>2</sub> comme accepteur final d'électron permettant l'oxydation de nombreuses substances comme les acides aminés, les amines (monoamineoxydase), le glucose (glucose oxydase) et la xanthine (xanthine oxydase) avec libération de O<sub>2</sub><sup>°</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les enzymes telles que l'aldéhyde oxydase, la flavine déshydrogénase et la dihydroorotate déshydrogénase libèrent O<sub>2</sub><sup>°</sup>, l'urate oxydase, la D-amino oxydase et la glycolate oxydase libèrent quant à elles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

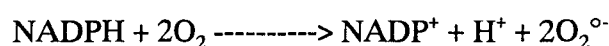
### 2.3. Dans le globule rouge

L'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine (Hb Fe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>) produit la méthémoglobine (Hb Fe<sup>3+</sup>OH) et l'anion superoxyde. Ce phénomène permanent convertit, par jour, 3% de l'hémoglobine totale en méthémoglobine, incapable de fixer l'oxygène. La méthémoglobine doit être éliminée puisqu'elle catalyse la réaction de Fenton et se dissocie rapidement en libérant l'hème dans la circulation. La régénération de l'hémoglobine s'effectue par la réduction de la méthémoglobine par la méthémoglobine réductase, enzyme nécessitant du NADH en provenance du cycle de la glycolyse (Carrell *et al.*, 1975). Chez les individus présentant des formes d'hémoglobine instable, on constate que la glycolyse est augmentée dans les hématies.

Les porphyrines libres peuvent, après passage du fer à l'état excité, transférer leur énergie à l'oxygène moléculaire formant ainsi l'oxygène singulet (Carrell *et al.*, 1975, Morlière *et al.*, 1992).

### 2.4. Lors de la phagocytose

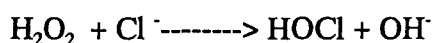
Dans les cellules phagocytaires actives (macrophages et polynucléaires neutrophiles), la production d'anion superoxyde, de radicaux hydroxyle et d'hypochlorite joue un rôle essentiel dans la défense contre les virus et les bactéries. Les cellules possèdent dans leur membrane un complexe enzymatique flavinique, la NADPH oxydase, qui réduit l'oxygène en anion superoxyde suivant l'équation :



$O_2^\circ$  sera transformé en  $H_2O_2$  qui lui même donnera  $OH^\circ$  en présence de métaux.

Ainsi, lorsque ces cellules sont stimulées par la présence d'antigènes, il se produit une "flambée respiratoire" consistant en une forte augmentation de la consommation d' $O_2$  de la part des phagocytes. Une accélération du cycle des pentoses-phosphates pourvoit alors à une demande accrue en équivalents réducteurs sous forme de NADPH (Morlière *et al.*, 1992).

Chez les polynucléaires neutrophiles stimulés, la dégranulation de particules cytoplasmiques azurophiles, libère la myéloperoxydase. Celle-ci va synthétiser à partir de  $H_2O_2$  et de chlore, de l'hypochlorite, un produit très oxydant, selon la formule :



L'hypochlorite peut réagir à son tour avec  $H_2O_2$  pour donner l'oxygène singulet. Il peut également former, avec des amines plasmatiques comme la taurine, des chloramines très bactéricides (Pré, 1991).

## 2.5. Dans le cytoplasme

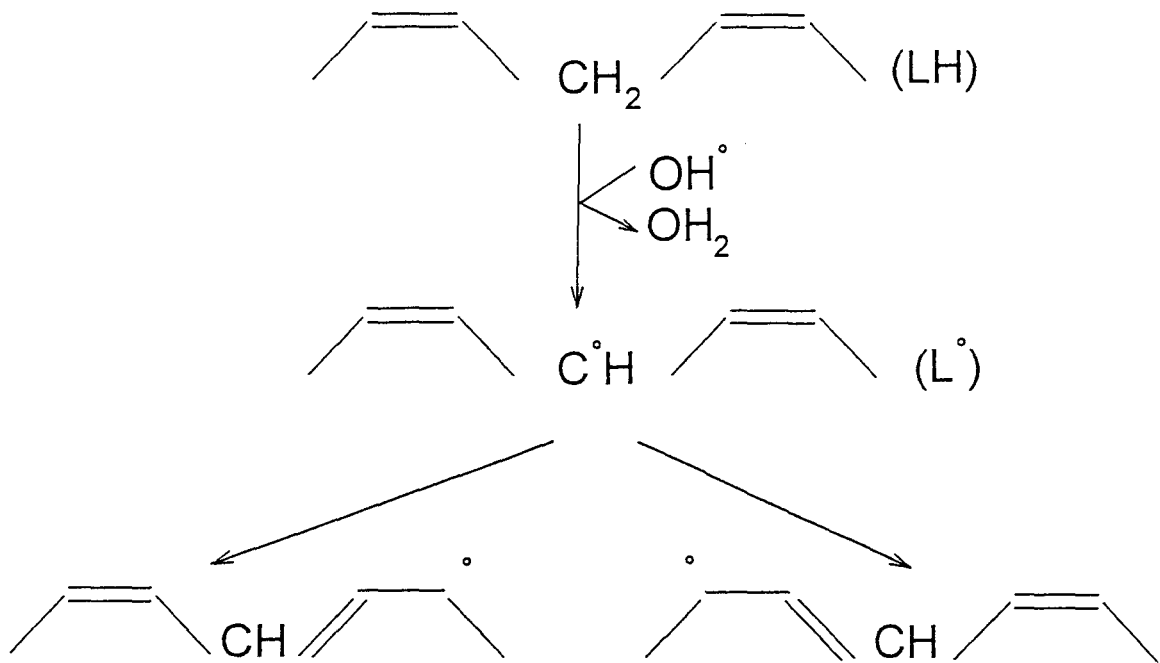
De nombreuses molécules réagissent spontanément avec l'oxygène : elles s'auto-oxydent, entraînant la formation de radicaux libres. C'est le cas des cathécholamines comme l'adrénaline, des hydroquinones, du glutathion et autres molécules à groupements thiol et des flavines réduites (Winterbourn, 1993). De même, les métaux de transition catalysent la production de radicaux libres par la réaction de Fenton.

## 2.6. Production de radicaux libres par des facteurs externes

De nombreuses molécules étrangères à l'organisme sont à l'origine d'une production directe ou indirecte d'espèces activées de l'oxygène. Le paraquat et l'adriamycine produisent l'anion superoxyde. Certains anticancéreux (anthracyclines et mitomycine C) sont efficaces sous formes radicalaires. L'antimycine A bloque le transfert d'électron de la chaîne respiratoire entre le cytochrome b et c, (Fig. I. 4) provoquant une production importante d'anions superoxydes.

## 3. LES CIBLES CELLULAIRES DES ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE

Les E.A.O attaquent les différentes molécules biologiques (lipides, protéines, acides nucléiques et les glucides) provoquant des lésions qui conduisent à la mort cellulaire en absence de réparation.



### PEROXYDATION DES LIPIDES

(Propagation explosive)

↓

FORMATION DE PEROXYDES CYCLIQUES

↓

FORMATION DE MALONDIALDEHYDE

(par hydrolyse des endoperoxydes)

↓

FORMATION DES PONTS AIP

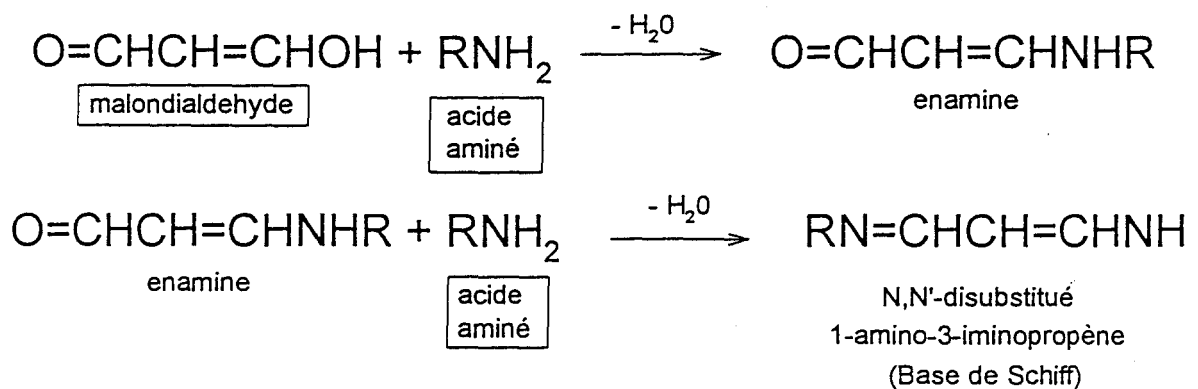


Figure I. 6: La lipoperoxydation.

### 3.1. Action sur les lipides

La lipoperoxydation est un processus permanent qui résulte d'une activité enzymatique ou d'un enchaînement de réactions radicalaires. La lipoperoxydation enzymatique conduit à la formation d'eicosanoïdes divers (prostaglandines, thromboxanes) biologiquement très actifs. La lipoperoxydation d'origine radicalaire, la seule qui nous intéresse ici, est un processus oxydatif d'altération portant essentiellement sur les acides gras polyinsaturés. Elle implique généralement 3 phases successives : l'initiation, la propagation, et la terminaison (**Fig. I. 6**).

#### 3.1.1. L'initiation

La phase d'initiation consiste en la soustraction d'un atome d'hydrogène à une molécule d'acide gras polyinsaturé par un radical provenant le plus souvent de l'oxygène ( $\text{OH}^\circ$ ). Elle aboutit à la formation d'un radical d'acide gras qui se stabilise par un remaniement électronique conduisant à la création de deux diènes conjugués.

#### 3.1.2. La propagation

La lipoperoxydation se poursuit par une étape d'amplification se développant en présence d'oxygène. On assiste ainsi à la formation de différents composés, dont les hydroperoxydes ( $\text{LOOH}$ ) instables. Leur décomposition implique la présence de métaux de transition (Fer, Cuivre), de structure hémique (hème, méthémoglobine et cytochrome). Ce phénomène complexe aboutit à la création de radicaux alkoxy ( $\text{LO}^\circ$ ) et alkyl peroxyde ( $\text{LOO}^\circ$ ). Ces composés, très réactifs, réagissent avec de nouveaux acides gras polyinsaturés, propageant la réaction. Cette phase ne peut donc exister qu'en présence d'ions métalliques.

#### 3.1.3. La terminaison

La réaction en chaîne s'arrête par la formation de composés stables issus de l'association de deux espèces radicalaires.

La phase de propagation peut également s'arrêter par l'intervention de la vitamine E ( $\alpha$  tocophérol), puissant capteur biologique de radicaux, tout particulièrement alkoxy et alkyl peroxyde. Hydrophobe, cette vitamine est localisée dans les membranes. Lors de la réaction, la vitamine E se transforme en radical ( $\text{TH}^\circ$ ), qui sera régénéré soit par le GSH, soit par la vitamine C ou acide ascorbique (**Fig. I. 7**). La réduction de la forme radicalaire de l'acide ascorbique issue de la régénération du tocophérol fait intervenir une réductase à NADH ou au GSH (Pré, 1991;

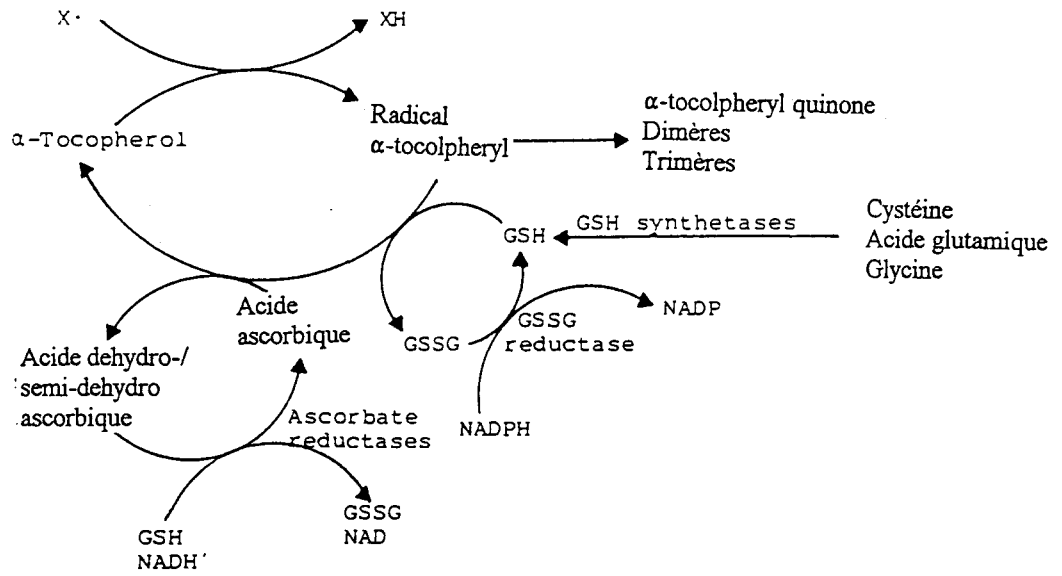


Figure I. 7: Système de régénération de l' $\alpha$ -tocophérol. D'après Chow, 1991.

Chow, 1991). Au sein des membranes, les carotènes et la vitamine A piègent également les radicaux hydroxyl et peroxy, stoppant la propagation de la lipoperoxydation.

Les produits finaux de la réaction de peroxydation des acides gras polyinsaturés sont essentiellement constitués d'alcanes, d'aldéhydes comme le malonaldéhyde (MDA), du 4-hydroxynonéal, tous issus de la coupure des hydroperoxydes instables qui sont extrêmement réactifs. Les aldéhydes peuvent agir sur les protéines et sur le génome.

La lipoperoxydation altère la structure et la fonction des membranes. Celles-ci deviennent rigides, perdent leur perméabilité. Les potentiels transmembranaires, les systèmes de transport, les flux ioniques sont altérés, ce qui aboutit inévitablement à la mort cellulaire (Pré, 1991).

### 3.2. Au niveau des protéines

L'attaque des acides aminés par les E.A.O peut aboutir à des modifications de structure et de fonction des protéines. L'oxydation peut être réversible au niveau des groupements thiols de la cystéine. L'oxydation de la cystéine et de la méthionine servent d'indicateurs de l'état redox de la cellule.

Les modifications au niveau des protéines peuvent être classées en 3 groupes : la fragmentation, l'agrégation et la susceptibilité à la protéolyse (Yu, 1994).

#### 3.2.1. La fragmentation

La fragmentation dans le cas du collagène ou de l'albumine, s'effectue par l'attaque des résidus de proline, hautement sensibles à l'oxydation (Borel *et al.*, 1988). Cette attaque aboutit à l'hydrolyse de la liaison peptidique (Sies, 1986). Des attaques sélectives par  $\text{OH}^\circ$  sur les résidus d'histidine ou d'arginine sont fréquentes du fait de l'association de ces acides aminés avec les métaux de transition pouvant catalyser la formation de  $\text{OH}^\circ$  par une réaction de type Fenton. Ce sont des attaques de type "site spécifique" (Powell *et al.*, 1992).

#### 3.2.2. L'agrégation

L'agrégation des protéines conduit à leur insolubilité et ainsi à la perte de toute activité. Ce phénomène survient:

- quand  $\text{OH}^\circ$  réagit sur les résidus thiols de la cystéine conduisant à la formation de ponts disulfures intra- et inter-chaînes polypeptidiques. Il se forme des agrégats de haut poids

moléculaire qui seront insolubles;

- quand le malonaldéhyde, issu de la lipoperoxydation, réagit avec les protéines membranaires formant des ponts amino-imino-propène (pont AIP) intra et inter-chaînes polypeptidiques. Ceci aboutit à l'agrégation des protéines sous forme de lipofuschine, qui s'accumule dans les lysosomes des cellules âgées ou ayant subi un stress oxydatif (Davies, 1988).

### 3.2.3. Susceptibilité à la protéolyse

L'oxydation des acides aminés comme le tryptophane et la tyrosine conduit à un changement de conformation des protéines rendant celles-ci sensibles à la protéolyse.

### 3.3. Action sur les acides nucléiques

Les acides ribo-et déoxyribonucléiques ne sont pas épargnés par les attaques des radicaux libres (Sies, 1986; Yu, 1994). Les altérations qui en découlent perturbent la transcription, la traduction et la réplication de l'ADN conduisant à des mutations, au vieillissement ou à la mort cellulaire. Les dommages oxydatifs peuvent être initialisés par l'oxygène singulet,  $\text{OH}^\circ$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou par des radicaux libres et des aldéhydes issus de la lipoperoxydation. Les bases nucléiques pyrimidiques, spécialement la thymidine, apparaissent extrêmement vulnérables à l'oxydation. La 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine, provenant de l'oxydation de la 2'-déoxyguanosine, est utilisée comme marqueur de l'oxydation de l'ADN.

Les altérations qui résultent de l'attaque sur les acides nucléiques consistent en : cassure des mono ou double brins, modification de bases nucléiques, création de sites abasiques, formation de dimères de pyrimidines, pontages entre ADN et protéines (Pacifci et Davies, 1991), attaque du déoxyribose qui forme avec le phosphate le squelette de la chaîne de l'ADN, et aboutit à des cassures de cette chaîne.

L'ADN mitochondrial est également exposé à des oxydations. En effet, cet organite est un site important de formation des radicaux libres, une cible pour les substances cancéreuses oxydantes et est doté de mécanismes de réparation limités (Yu, 1994).

### 3.4. Réaction avec les carbohydrates

Les sucres sont également sensibles à l'oxydation, comme nous l'avons vu pour le déoxyribose des chaînes de l'ADN. Les polysaccharides, comme l'acide hyaluronique, peuvent être dépolymérisés par les oxydants. Les glycoprotéines sont aussi sujettes à l'oxydation.

## MECANISMES ENZYMATIQUES DE DEFENSE CONTRE LE CHOC OXYDANT

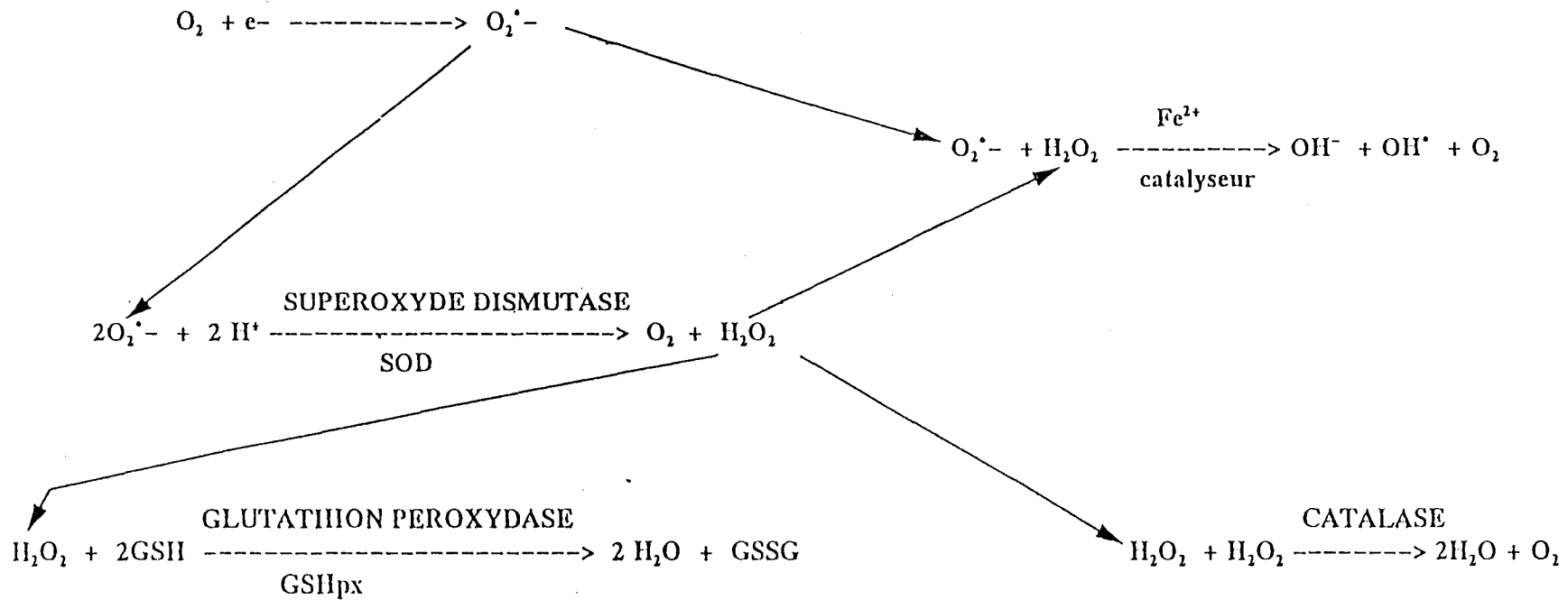


Figure 1.8: Chaîne enzymatique de détoxification des E.A.O.



#### 4. DEFENSE CONTRE LES RADICAUX LIBRES: LES ANTIOXYDANTS

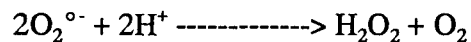
Le métabolisme cellulaire produit continuellement des radicaux libres qui doivent être inactivés pour les raisons décrites précédemment. Il existe donc un équilibre entre la production des E.A.O et leur élimination qui les maintient à des taux très bas. Un antioxydant, selon la définition de Halliwell et Gutteridge (1990), est une substance qui, à faible concentration comparée au substrat oxydable, diminue ou inhibe l'oxydation de ce substrat. Cette définition comprend aussi bien les enzymes que les molécules non enzymatiques. Les systèmes de défense antioxydants, intra- ou extra-cellulaires peuvent être classés en quatre catégories :

- les enzymes antioxydantes capables de détruire les E.A.O, principalement  $O_2^{\circ-}$  et  $H_2O_2$ ;
- des molécules piégeant les radicaux déjà formés;
- des molécules ayant une action préventive sur la formation des radicaux libres (particulièrement  $OH^{\circ}$ ) comme les protéines chélatant le fer ou le cuivre (transferrine, ferritine, ceruloplasmine et albumine), qui sont des catalyseurs de la réaction de Fenton;
- des enzymes permettant la réparation des constituants endommagés.

Nous aborderons ici seulement les enzymes antioxydantes: il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase. Ces enzymes agissent par complémentarité dans la destruction de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, renforçant l'action des piègeurs de radicaux (Fig. I. 8). Nous allons les décrire très succinctement, pour nous attarder dans le chapitre suivant sur la catalase, objet de notre travail.

##### 4.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée et en oxygène moléculaire :



Cette réaction est extrêmement rapide, elle accélère d'un facteur de  $10^4$  à  $10^5$  la dismutation naturelle de l'anion superoxyde au pH physiologique (Mc Cord *et al.*, 1969). Elle évite la coexistence de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène et prévient ainsi la formation de  $OH^{\circ}$ .

Il existe trois types de SOD, se différenciant par leur métal cofacteur (Cu/Zn, Mn et Fe).

- La SOD Cu/Zn est une enzyme retrouvée essentiellement dans le cytosol des cellules eucaryotes, mais également chez certaines bactéries comme *E. coli* (Benov et Fridovich, 1994).

L'enzyme est un homodimère de 32 à 36 kDa, dont les sous-unités sont associées par des interactions non covalentes. Chaque sous-unité possède un atome de cuivre et de zinc. Seul le cuivre participe à la réaction, le zinc contribue à la stabilité de l'enzyme. Chez les mammifères, il existe en plus une SOD Cu/Zn extracellulaire différente de la SOD cytosolique, localisée dans le plasma et les espaces extracellulaires des tissus (Marklund, 1984). Cette enzyme tétramérique, de poids moléculaire de 135 kDa, est constituée de quatre sous-unités identiques. Une SOD Cu/Zn a été retrouvée également dans les peroxysomes de mammifères (Keller *et al.*, 1991).

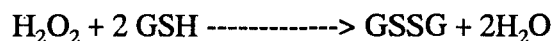
- La SOD Mn est présente dans la mitochondrie des eucaryotes supérieurs et chez certaines bactéries (bactéries aérobies strictes et chez *E.coli*). La SOD mitochondriale est constituée de quatre sous-unités identiques d'environ 20 kDa, possédant chacune un atome de manganèse (Hassan, 1989). Cette enzyme est inductible par différents agents provoquant un stress oxydant.

- La SOD Fe existe chez les bactéries, les plantes, mais également chez de nombreux protozoaires. Elle peut être dimérique ou tétramérique comme la SOD Mn avec un poids moléculaire par sous-unité compris entre 20 et 24 kDa. La structure primaire des SOD Fe et Mn montre une nette homologie. Certains résidus sont très conservés, en particulier ceux intervenant dans le site actif. Les sous-unités présentent également des similitudes de structure spatiale.

Le peroxyde d'hydrogène inactive faiblement la SOD Cu/Zn, beaucoup plus fortement la SOD Fe et n'a aucun effet sur la SOD Mn. La SOD Cu/Zn est très sensible au KCN qui n'agit pas sur les SOD Fe et Mn. L'utilisation de ces deux inhibiteurs permet de différencier ces enzymes.

#### 4.2. La glutathion peroxydase (GPx)

Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion réduit (GSH):



Le GSH est ensuite régénéré par la glutathion réductase, grâce au NADPH :



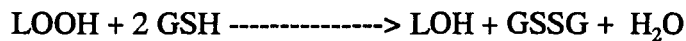
L'activité de la GPx est donc dépendante de la quantité de NADPH disponible. Ce dernier provient principalement du cycle des pentoses phosphate via la glucose-6-phosphate déshydrogénase, de l'activité de la glutamate déshydrogénase et de l'isocitrate déshydrogénase NADPH dépendante.

La GPx agit en présence de faibles concentrations de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Elle est relayée, à fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène, par la catalase.

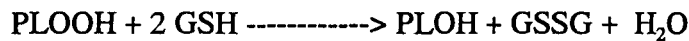
Présente dans le cytosol et la mitochondrie, la GPx est une enzyme à sélénium de 84 kDa,

formée de quatre sous-unités identiques, portant dans leur site actif, un atome de sélénium qui est intégré sous forme de sélénocystéine lors de la traduction de l'ARN messager (Flohé *et al.*, 1973). En cas de déficience en sélénium, la synthèse de la protéine s'arrête au codon correspondant (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1995).

A côté de sa réaction avec  $H_2O_2$ , la GPx décompose les hydroperoxydes d'acide gras (LOOH) libérés par la phospholipase  $A_2$ , à partir des phospholipides membranaires peroxydés (Van Kuijk *et al.*, 1987). Elle limite ainsi la lipoperoxydation :



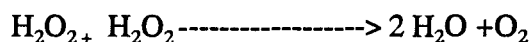
Un deuxième type de GPx, séléno-dépendante (HPGPx), de structure monomérique (20 kDa) associée aux membranes, permet la réduction des hydroperoxydes phospholipidiques (PLOOH), sans l'intervention de la phospholipase  $A_2$  (Ursini et Bindoli, 1987). Elle réduit également l'hydroperoxyde de cholestérol associé aux membranes. La réaction générale est la suivante (Krinsky, 1992) :



La glutathion transférase, séléno-indépendante, est une protéine monomérique de 47 kDa, localisée dans le cytosol, qui présente une activité peroxydase uniquement dirigée vers les hydroperoxydes organiques (Ketterer et Meyer, 1989).

### 4.3. La catalase

Cette enzyme, localisée essentiellement dans les peroxysomes, décompose  $H_2O_2$  lorsqu'il est abondant (Deisseroth et Dounce, 1970) :



Il s'agit d'une oxydation et d'une réduction à deux électrons par  $H_2O_2$ .

Elle peut également utiliser d'autres substrats peroxydes, qui sont des donneurs à deux électrons:



où ROOH est un acylhydroperoxyde comme le peréthanol et HXOH est un donneur de deux électrons tels l'hydroxylamine ( $NH_2OH$ ), le formiate ( $HCOOH$ ), une molécule d'alcool organique, ou encore le peroxyde d'hydrogène. Ce sont des réactions lentes ( $k = 10^2$  à  $10^3 \text{ M sec}^{-1}$ ) par rapport à la réaction principale utilisant  $H_2O_2$  ( $k = 10^7 \text{ M sec}^{-1}$ ).

L'action de ces enzymes cytosoliques est complétée par celle des différents réducteurs membranaires (vitamine E,  $\beta$  carotène) et cytosoliques (vitamine C, GSH, acide urique).

Catégories	Type	Sous-unité	PM des sous-unités kDa	PM global kDa	Pi	Groupelement prosthétique	Nombre d'hème	Métal	Localisation
Groupe I: Catalases typiques	<b>Mammifères</b> dont: - catalase de foie de boeuf <b>Plantes supérieures</b> <b>Levures:</b> - <i>Candida tropicalis</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (catT) <b>Certaines bactéries</b>	4	60	240	4 à 6	-protoporphyrine IX	4	Fe <sup>3+</sup>	- peroxyosome - hématies - cytoplasme (cat T)
Groupe II: Catalases atypiques	<b>Champignons:</b> - <i>Aspergillus niger</i> - <i>Penicillium vitae</i> - <i>Penicillium chrysogenum</i> <b>Levures:</b> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (catA) <b>Certaines bactéries</b> dont: - <i>Bacillus subtilis</i> (cat1) et (cat2) - <i>E. Coli</i> (HP II)	2,4 ou 6	40- 97	124-532	acide	-protoporphyrine IX - chlorine (cis-hème)	1, 4 ou 6	Fe <sup>3+</sup>	- cytoplasme (bactéries) - peroxyosome (cat A)
Groupe III: Catalase/ peroxydases	<b>Bactéries</b> dont: - <i>E. Coli</i> (HP I) - <i>Salmonella typhimurium</i> (HP I) - <i>Streptomyces</i>	2 ou 4	60-86	160-337	acide	-protoporphyrine IX	1 ou 2	Fe <sup>3+</sup>	- cytoplasme - périplasme (HPI de <i>E. Coli</i> )
Groupe IV: Catalases à manganèse	<b>Bactéries:</b> - <i>Thermoleophilum album</i> - <i>Thermus thermophilus</i> - <i>Lactobacillus plantarum</i>	4 ou 6	35	140-210				2Mn <sup>2+</sup>	

Tableau I. 1: Les différents groupes de catalase et leur caractérisation.

## CHAPITRE III: LES CATALASES

La catalase ( $H_2O_2:H_2O_2$  oxydoréductase, EC 1.11.1.6), est une enzyme héminique ubiquitaire, présente dans les cellules procaryotes et eucaryotes des organismes aérobies. Sa principale réaction est l'élimination du peroxyde d'hydrogène par dismutation. Au cours de cette réaction, la catalase utilise le peroxyde d'hydrogène comme accepteur et donneur d'électrons, contrairement aux peroxydases. La catalase de foie de boeuf est l'une des premières enzymes à avoir été cristallisée par Sumner et Dounce en 1937. Elle a été très largement étudiée. Elle est utilisée comme enzyme de référence.

### 1. LES DIFFERENTS TYPES DE CATALASE

Les catalases peuvent être classées en quatre groupes suivant leurs caractéristiques générales (**tableau I. 1**):

#### - Groupe 1: les catalases typiques

Elles sont constituées de quatre sous-unités identiques. Chaque sous-unité contient un groupement prosthétique composé de protoporphyrine IX chélatant un atome de fer sous une forme oxydée  $Fe^{3+}$ . Les sous-unités sont associées par des interactions principalement hydrophobes (Schonbaum et Chance, 1976).

#### - Groupe 2: les catalases atypiques

Elles sont constituées d'un nombre variable de sous-unités identiques (2,4 ou 6) à l'exception de la catalase de *Penicillium chrysogenum*, qui est un hétéro-tétramère de type  $\alpha_2\beta_2$  (Chaga *et al.*, 1992). Le groupement prosthétique à fer, en majorité protoporphyrine IX, peut être aussi un cis-hème d ou chlorine comme chez certaines bactéries et chez *Neurospora crassa*. La catalase de *Bacteroides fragilis* possède un seul groupement protoporphyrine IX pour le dimère (Rocha et Smith, 1995) alors que la catalase de *Halobacterium halobium* en contient un par tétramère (Brown-Peterson et Salin, 1995).

#### - Groupe 3: les catalases/peroxydases ou hydroperoxydases

Ce type de catalase a été découvert chez *E. coli* et appelé hydroperoxydase I ou HP I

(Claiborne et Fridovich, 1979). Ces catalases possèdent une activité catalasique mais également une activité peroxydasique à large spectre de substrats (pyrogallol, catéchol, guaiacol). Ces enzymes sont soit des homo-dimères, soit des homo-tétramères, à l'exception de l'enzyme de *Vitreoscilla*, qui est un hétéro-tétramère (Abrams et Webster, 1990). Elles contiennent un groupement protoporphyrine IX pour deux sous-unités, à l'exception de *Comamonas compransoris* (deux hèmes pour la molécule dimérique; Nies et Schlegel, 1982).

#### - Groupe 4: les catalases à manganèse

Découvertes chez *Lactobacillus plantarum* (Kono et Fridovich, 1983) et chez des bactéries thermophiles (Khangulov *et al.*, 1990; Allgood et Perry, 1986), ces catalases contiennent dans leur site actif deux atomes de manganèse. L'enzyme de *Thermus thermophilus*, de masse moléculaire de 210 kDa, est formée de 6 sous-unités identiques de 35 kDa chacune (Khangulov *et al.*, 1990).

## 2. DIVERSITE DES CATALASES

La recherche d'une catalase chez un nouvel organisme pose de nombreux problèmes. Ceux-ci sont dûs à l'existence des quatre types d'enzymes cités plus haut, dont plusieurs peuvent coexister, à la structure des gènes, à la présence de familles multigéniques ou à de nombreuses isoformes résultant de modifications post-traductionnelles. Tous ces facteurs peuvent entraîner des difficultés lors des essais de caractérisation, qu'ils se fassent par la biochimie ou la biologie moléculaire. Nous nous proposons de résumer ici ces principaux problèmes.

### 2.1. Structure des gènes

Les gènes de nombreuses catalases des groupes 1 et 2 sont morcelés par la présence d'introns de tailles variables. Le gène de la catalase humaine a une longueur de 34 kb pour une partie codante de 1600 bases environ. Il contient 13 exons et 12 introns, dont la taille varie de 400 bases à 10,5 kb (Quan *et al.*, 1986). Une organisation similaire est rencontrée dans le gène de la catalase de rat (Nakashima *et al.*, 1989). De même, les gènes des catalases du maïs, *cat-1* et *cat-3*, possèdent respectivement 6 et 2 introns de petite taille (Abler et Scandalios, 1993). Le gène *catR*, codant pour une catalase d'*Aspergillus niger*, possède 4 introns de petite taille (Fowler *et al.*, 1993). Ce morcellement n'est pas retrouvé chez *Candida tropicalis* (Okada *et al.*, 1987) ainsi que chez les deux gènes de *Saccharomyces cerevisiae* (Hartig et Ruis, 1986 ; Cohen *et al.*, 1988).

Organismes	Catalase du groupe 1	Catalase du groupe 2	Catalase du groupe 3	Références
<b>Levure</b>				
- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CatT	Cat A		Hartig et Ruis, 1986 Cohen <i>et al.</i> , 1988
<b>Bactéries</b>				
- <i>Escherichia coli</i>		HP II	HP I	Triggs-Raine <i>et al.</i> , 1988 von Ossowski <i>et al.</i> , 1991
- <i>Halobacterium halobium</i>	oui		oui	Brown-Peterson et Salin, 1995
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KpT	KpA	KpCP	Hochman et Goldberg, 1991
- <i>Bacillus firmus</i>	oui	oui	oui	Hicks, 1995
- <i>Mycobacterium intracellulare</i>		Cat M	Cat T	Morris <i>et al.</i> , 1992

**Tableau I. 2:** Catalases de groupes différents existant chez un même organisme.

## 2.2. Des enzymes de groupes différents dans un même organisme

Hormis les organismes supérieurs (Animaux et Végétaux) chez lesquels on ne trouve que des catalases du groupe 1, il est fréquent de rencontrer plusieurs catalases de types différents chez les champignons et les bactéries. Le **tableau I. 2** en donne des exemples.

## 3. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES ET ISOFORMES DE L'ENZYME

Aux diversités géniques, il faut ajouter des modifications post-traductionnelles qui ont pour conséquence d'apporter de nombreuses isoformes au sein d'un organisme.

### 3.1. Glycosylation

La catalase de souris existe *in vivo* sous de multiples isoformes de charges différentes, du à un taux variable d'acide N-acétyl neuraminique (Jones et Masters, 1975). La séquence protéique de la catalase de rat et de souris montre trois sites possibles de N-glycosylation (Asn-X-Thr) (Furuta et al., 1986; Shaffer et Preston, 1990).

La catalase atypique d'*Aspergillus niger* possède des résidus glycosylés contenant par sous-unité 41 résidus de mannose et 10 résidus de glucosamine (Kikuchi-Torii *et al.*, 1982). Il s'agirait de courtes chaînes sucrées branchées sur plusieurs sites de la chaîne peptidique. La glycosylation rendrait compte de la stabilité de l'enzyme à la chaleur, la protéolyse et les pH acides (Wasserman et Hultin, 1981). Chez cette même espèce, un gène a été séquencé et montre 9 sites potentiels de N-glycosylation par sous-unité (Asn-X-Ser/thr) (Fowler *et al.*, 1993). Les catalases atypiques de *Penicillium chrysogenum* (Chaga *et al.*, 1992) et de *Neurospora crassa* (Jacob et Orme-Johnson, 1979) sont elles aussi glycosylées.

### 3.2. Extrémité N-terminale bloquée

De nombreuses catalases possèdent leur extrémité N-terminale bloquée. C'est le cas des catalases typiques de rat, d'hématie humaine, de foie et d'hématie de boeuf (Furuta *et al.*, 1986; Bonnaventura *et al.*, 1972). Dans ce cas, l'acide aminé est une alanine bloquée par un groupement acétyl. On retrouve une extrémité N-terminale bloquée dans la catalase de la patate douce (Sakajo et Asahi, 1986), de la catalase catR d'*Aspergillus niger* (Fowler *et al.*, 1993), de la catalase atypique de *Halobacterium halobium* (Brown-Peterson et Salin, 1995) et la catalase/peroxydase de HP I de *E.coli* (Triggs-Raine *et al.*, 1988).



### 3.3. Isoformes

De nombreuses plantes supérieures possèdent de multiples isozymes de catalase comme chez le maïs (Chandlee *et al.*, 1983), la graine de coton (Ni *et al.*, 1990; Ni et Trelease, 1991), le pin (Mullen et Gifford, 1993), alors que la feuille de lentille ne contient qu'une seule isoforme (Schieffer *et al.*, 1976). Le coton possède deux gènes différents codant pour des sous-unités a et b. La combinaison de quatre sous-unités a et b, en proportions différentes, donne cinq isomères de même masse moléculaire pour le tétramère (230 kDa), mais possédant une hétérogénéité de charge (Ni *et al.*, 1990).

Chez le maïs, on retrouve cinq isoformes provenant de l'interaction de sous-unités issus de deux gènes: trois hybrides et deux homotétramères. Le produit du gène 3 ne génère qu'un homotétramère (Chandlee *et al.*, 1983).

Chez les mammifères, on peut observer la présence de plusieurs isozymes de tailles différentes résultant d'une coupure protéolytique du côté C-terminal qui survient au cours de la purification de la protéine (Furuta *et al.*, 1986, Schroeder *et al.*, 1982). Ces isozymes sont donc artéfactuels.

## 4. STRUCTURE DE L'ENZYME

Nous allons décrire ici la structure primaire et l'organisation spatiale des catalases. L'organisation structurale de la catalase de foie de boeuf et celle de *Penicillium vitale* ont été les plus étudiées.

### 4.1. Structure primaire

#### 4.1.1. Catalases des groupes 1 et 2

L'alignement des séquences protéiques de catalase de mammifères, de plantes et de champignons, montre des homologies entre les groupes 1 et 2. Elles dériveraient, ainsi que celles de *Bacillus subtilis* (Bol et Yasbin, 1994) et *Lactobacillus sake* (Knauf *et al.*, 1992), toutes deux du groupe 2, d'un ancêtre procaryotique commun. Les catalases bactériennes sont plus hétérogènes et présentent moins d'homologies avec les autres catalases (von Ossowski *et al.*, 1993). Les catalases de *Listeria seeligeri* et HP II de *E.coli* sont proches des catalases de plantes et forment une classe à part (von Ossowski *et al.*, 1993).

Ces enzymes possèdent en général un nombre réduit de tryptophanes et de cystéines: la catalase de foie de boeuf contient 4 résidus de cystéine par sous-unité (Schroeder *et al.*, 1982),

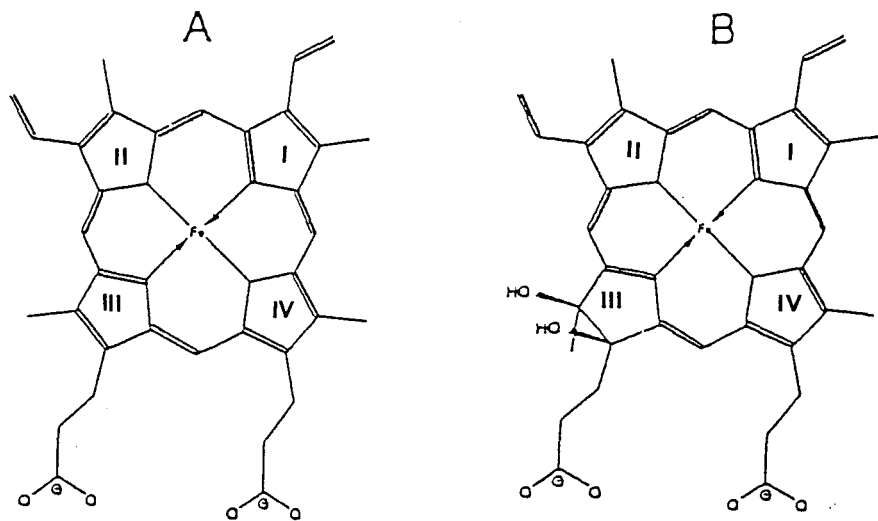


Figure 1.9: Structure de la protoporphyrine IX (A) et de la chlorine cis-d hème (B).  
D'après Loewen *et al.*, 1993.

les plantes entre 4 et 6 et les catalases atypiques de *Bacillus subtilis* 2 par sous-unité (Loewen et Switala, 1987 et 1988). Les résidus cystéines sont sensibles à l'oxydation et à la réduction, mais aucun n'est retrouvé dans le site actif de la catalase de foie de boeuf. Ils ne sont pas impliqués dans le mécanisme catalytique (Fita et Rossmann, 1985b).

#### 4.1.2. Catalases du groupe 3

La taille des sous-unités est en général supérieure à celle des catalases de mammifères. Les séquences d'acides aminés montrent de fortes homologues entre elles (50%), mais s'éloignent de celles des catalases du groupe 1. La séquence polypeptidique de *Salmonella typhimurium* ne montre pas d'homologie avec les catalases du groupe 1, mais plutôt avec les peroxydases (Loewen et Stauffer, 1990). L'analyse des séquences protéiques indique que les catalases/peroxydases bactériennes proviendraient d'une duplication d'un gène qui serait également à l'origine de la superfamille des peroxydases de plantes (Welinder, 1991).

### 4.2. Groupement prosthétique

Seuls les groupements prosthétiques à fer des catalases des trois premiers groupes ont été décrits. Il s'agit de la protoporphyrine IX et de la chlorine.

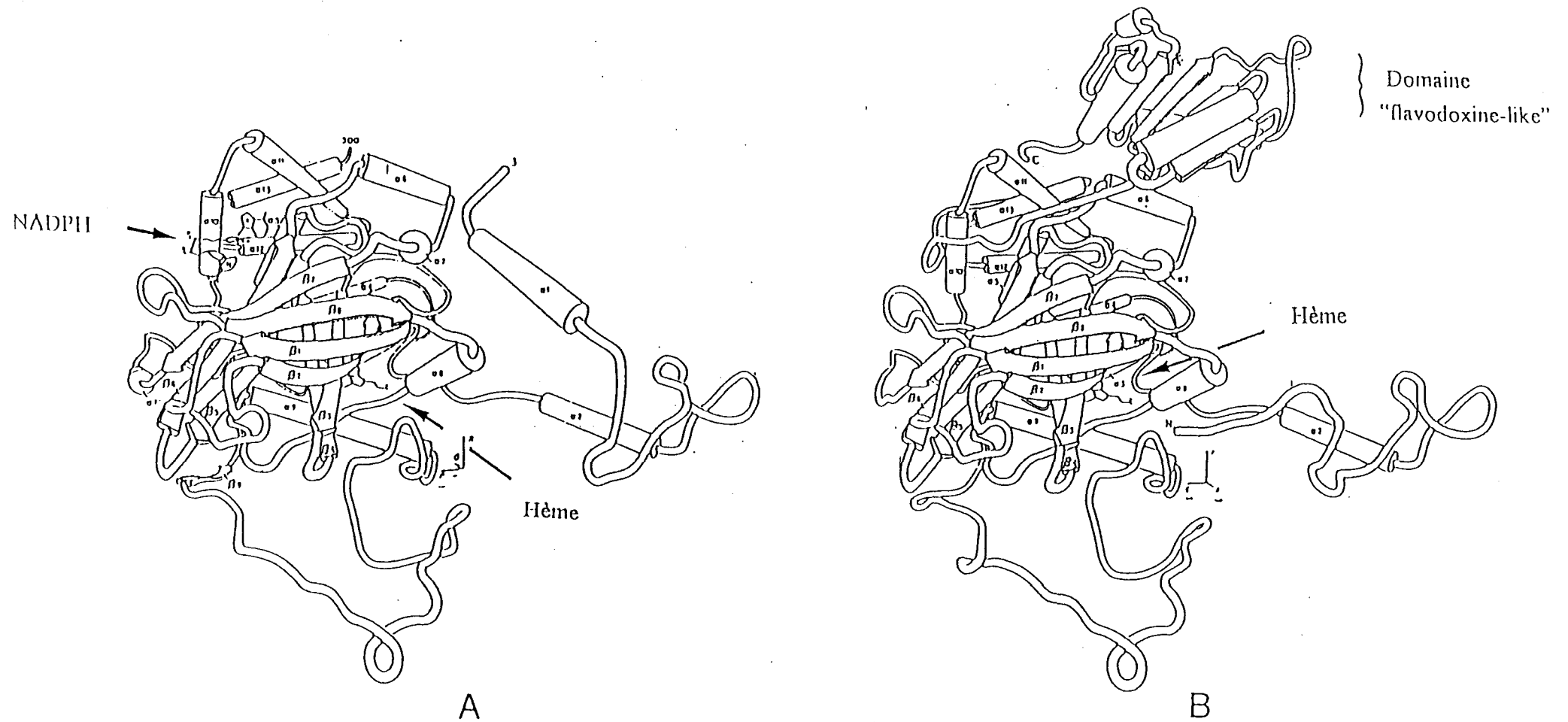
#### 4.2.1. Protoporphyrine IX

On trouve des protoporphyrines IX dans les catalases des groupes 1 et 2. Le fer y est sous forme oxydée  $Fe^{3+}$  (Fig. I. 9A). Ces groupements ne sont pas liés de façon covalente à la sous-unité, puisqu'ils peuvent être facilement extraits par un traitement acide/acétone (Deisseroth et Dounce, 1970), mais avec une perte de la stabilité de l'apoenzyme. Ces groupements sont, pour les catalases typiques et atypiques, non réduits par le dithionite à l'état natif, sauf si la protéine est dénaturée (Deisseroth et Dounce, 1970). La catalase d'hématie de porc fait exception, puisqu'elle peut être réduite sans dénaturation, le groupement héminique de cette enzyme serait ainsi proche de la surface de la molécule (Takeda et Samejima, 1977).

Le groupement héminique des catalases/peroxydases peut, quant à lui, être réduit par le dithionite, à l'exception de l'enzyme de *Halobacterium halobium* (Brown-Peterson et Salin, 1993). Un tel comportement s'apparente à celui des peroxydases.

#### 4.2.2. Groupement chlorine

Certaines catalases du groupe 2 possèdent un groupement protoporphyrine IX de type chlorine (Fig. I. 9B). L'hème possède alors le noyau pyrrole III hydroxylé en cis. C'est le cas de



**Figure I. 10:** Représentation schématique des sous-unités de la catalase de foie de boeuf (A) et de la catalase de *Penicillium vitale* (B). La nomenclature correspondante à la structure secondaire ( $\alpha_1, \dots, \alpha_{13}$ ) et ( $\beta_1, \dots, \beta_9$ ) est indiquée. D'après Melik-Adamyán *et al.*, 1986.

la catalase-2 de *Bacillus subtilis*. Ce groupement ne peut pas être extrait par un traitement acétone/HCl, ce qui indique une liaison covalente à la molécule (Loewen et Switala, 1988). Le groupement protoporphyrine de la catalase HP II de *E. coli* est aussi une chlorine. L'enzyme catalyse elle-même la conversion de la protoporphyrine IX en chlorine, utilisant une molécule d' $H_2O_2$ . L'histidine 128 du côté distal (histidine du site actif) est nécessaire pour la conversion (Loewen *et al.*, 1993). Celle-ci s'effectue lors du premier contact de l'enzyme avec  $H_2O_2$ .

#### 4.2.3. Catalases à manganèse

On ne connaît pas la structure moléculaire du site actif des catalases à manganèse.

### 4.3. Organisation structurale des catalases

Les études ont été réalisées essentiellement sur la catalase de foie de boeuf et sur celle de *Penicillium vitale*.

#### 4.3.1. Catalases du groupe 1

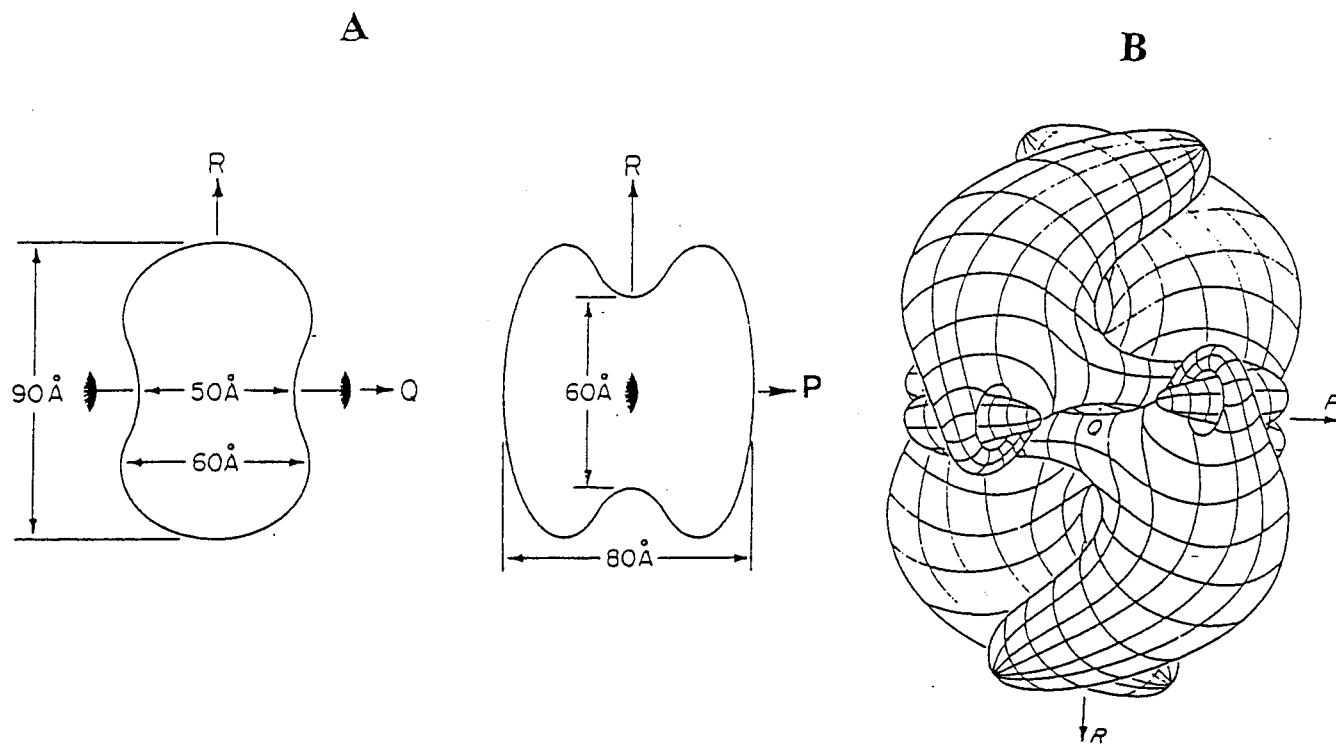
Nous prendrons la catalase de foie de boeuf pour exemple.

##### 4.3.1.1. Structure secondaire et tertiaire (Fig. I. 10A)

La structure de chaque sous-unité de la catalase de foie de boeuf est composée de quatre domaines. Le premier correspond à la section N-terminale, constituée de 70 résidus d'acides aminés. Ce domaine forme un bras sortant de la région globulaire de chaque sous-unité et interagit avec les sous-unités voisines. Lors de la formation de la structure quaternaire, ce bras permettra de verrouiller efficacement les sous-unités entre-elles. Le deuxième et le troisième domaines comprennent des acides aminés impliqués dans la cavité où est situé l'hème. Le quatrième domaine correspond à la partie C-terminale de la chaîne polypeptidique. C'est le site de liaison du NADPH (Kirkman et Gaetani, 1984; Fita et Rossmann, 1985a).

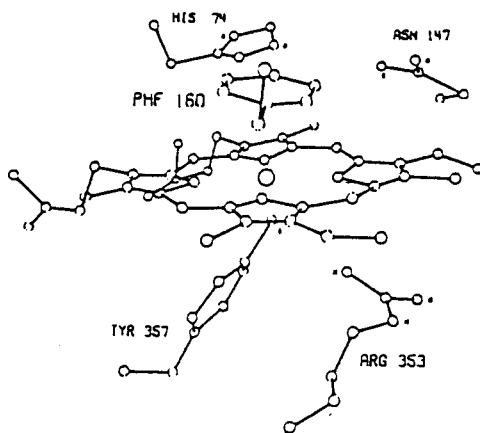
##### 4.3.1.2 Structure quaternaire

Des études par rayons X avec une résolution à 2,5 Å ont été réalisées sur la catalase de foie de boeuf (Reid *et al.*, 1981). Le tétramère (Fig. I. 11) (90 Å de long et 60 Å de diamètre) présente une constriction de 50 Å. Les groupements héminiques sont enfouis à 20 Å de la surface de chaque sous-unité et se trouvent à 23 Å du centre de symétrie du tétramère. Le substrat accède au site actif de l'enzyme par un canal hydrophobe de 30 Å de long et de 15 Å de diamètre, situé au niveau de la constriction.



**Figure I. 11A:** Représentation schématique de la forme tétramérique de la catalase de foie de boeuf. D'après Reid *et al.*, 1981.

**11B:** Schéma des interactions entre les quatre sous-unités de la catalase de *Penicillium vitale*. D'après Melik-Adamian *et al.*, 1986.



**Figure I. 12:** Stéréodiagramme de l'environnement de l'hème dans la catalase de foie de boeuf: les résidus essentiels sont la tyrosine 357 sur le côté proximal et l'asparagine 147 et l'histidine 74 du côté distal. D'après Reid *et al.*, 1981.

Les résidus aminés les plus importants impliqués dans le site actif sont l'acide aspartique 147, la phénylalanine 160 et surtout l'histidine 74, dont le noyau imidazole, situé à 3,5 Å du noyau pyrrole III est presque parallèle au plan de l'hème (Fig. I. 12). Le côté proximal de l'hème contient la tyrosine 357 occupant le cinquième site de coordination du fer avec l'oxygène du groupement phénolique situé à 1,5 Å du métal. La proximité de l'arginine 353 (à 3 Å environ) suggère une forme déprotonée de l'oxygène phénolique de la tyrosine. Ce groupement phénolate stabiliserait le fer sous forme ferrique, limiterait la formation d'un complexe  $O_2-Fe^{2+}$  inactif et enfin, favoriserait l'oxydation du fer  $Fe^{3+}$  en fer  $Fe^{4+}$  durant la catalyse (Fita et Rossmann, 1985b).

#### 4.3.2. Catalases du groupe 2

La structure de la catalase de *Penicillium vitale* (670 AA) est dans l'ensemble, proche de celle de la catalase de foie de boeuf (Fig. I. 10B). Le segment N-terminal de la catalase de *P. vitale* possède 13 acides aminés de plus que celui de la catalase de foie de boeuf et ne comporte qu'une seule hélice  $\alpha$ . Elle ne contient pas de site pour le NADPH et possède un cinquième domaine en C-terminal de la sous-unité ayant des similitudes avec la topologie des flavodoxines. Ce domaine est impliqué dans les interactions entre les sous-unités. Il est situé entre les résidus 520 et 670 et comporte cinq feuillets  $\beta$  parallèles et quatre hélices  $\alpha$ . Toutefois, malgré l'existence de cette structure, le FMN n'a jamais été observé associé à l'enzyme (Melik-Adamyan *et al.*, 1986).

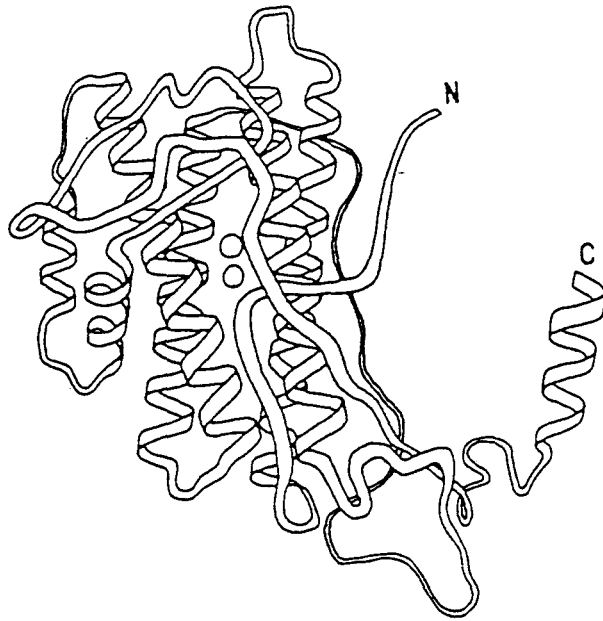
#### 4.3.3. Catalases du groupe 3

La structure n'est pas encore connue.

L'enzyme native peut être réduite par le dithionite, indiquant que l'hème n'est pas enfoui dans la protéine comme pour la catalase de foie de boeuf, mais reste proche de la surface de la molécule (Hochman et Shemesh, 1987). Par des études spectroscopiques de la catalase/peroxydase native de *Streptomyces*, il a été déduit que le résidu en 5<sup>ème</sup> position de coordination de l'hème n'est pas la tyrosine comme pour toutes les catalases, mais un résidu histidine, typique des peroxydases (Youn *et al.*, 1995).

#### 4.3.4. Catalases du groupe 4 (Fig. I. 13)

Peu de choses sont connues sur la structure de ces enzymes, qsi ce n'est qu'elles sont très différentes de celle des catalases des groupes 1 et 2. La structure secondaire comporte 4 hélices  $\alpha$  antiparallèles (Dismukes, 1992). Dans le site actif, les atomes de manganèse sont distants de 3,6



**Figure I. 13:** Structure secondaire de la sous-unité de la catalase de *Thermus thermophilus*.  
D'après Vainshtein *et al.*, 1985.



Å et proches du noyau imidazole d'une histidine.

## 5. ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'association en dimère ou en tétramère selon les cas, permet à l'enzyme d'acquérir son activité catalasique. Chaque sous-unité agit indépendamment des autres.

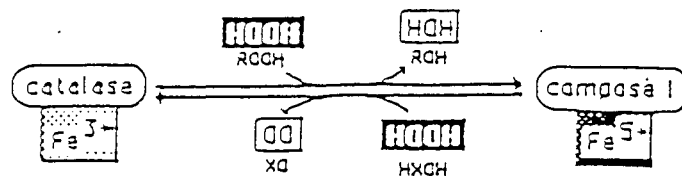
### 5.1. Mécanisme d'action

#### 5.1.1. Catalases du groupe 1

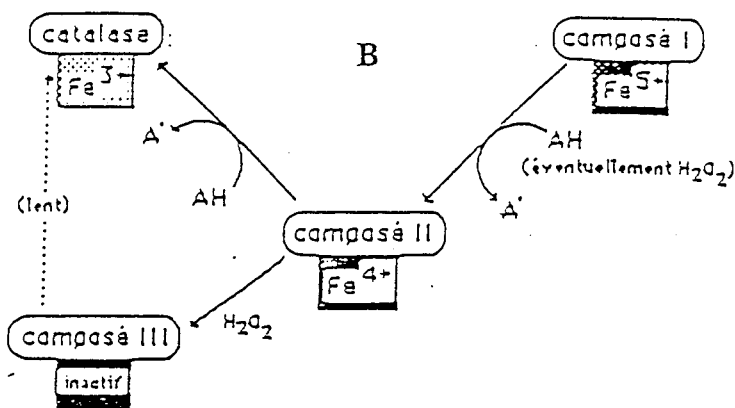
##### 5.1.1.1. Réaction enzymatique

Malgré une connaissance approfondie de la structure de l'enzyme, de nombreux points du mécanisme enzymatique des catalases restent présomptifs. La réaction essentielle est basée sur le va-et-vient entre la forme ferricatalase où le fer est au degré d'oxydation +3, et le composé I de degré d'oxydation +5 (**Fig.I. 14A**). Il s'agit d'une oxydation à 2 électrons par le peroxyde d'hydrogène, puis d'une réduction à 2 électrons du composé I par une autre molécule de  $H_2O_2$ . L'oxydation de la catalase en composé I peut se produire en présence d'alkyls ou d'acyls hydroperoxydes (ROOH) comme le peréthanol et l'acide peracétique. Le retour à la forme ferricatalase se fait en une étape par des donneurs de deux électrons comme le formiate (HCOOH) ou l'hydroxylamine ( $NH_2OH$ ). Ces réactions sont lentes par rapport à ce qui se passe pour l' $H_2O_2$ .

Au niveau moléculaire, la réaction peut s'expliquer de la façon suivante. La 5<sup>ème</sup> coordinance du fer est occupée par la tyrosine 357 tandis que la 6<sup>ème</sup> est libre ou occupée par une molécule d'eau (**Fig. I. 15, étape 1**). Cette liaison avec une molécule d'eau est controversée par certains auteurs, puisque la vacuité de ce site expliquerait la rapidité de la réaction (Fita et Rossmann, 1985b). Le peroxyde d'hydrogène pourrait se lier au fer sans déplacer aucune molécule. La première molécule d' $H_2O_2$  interagit avec le fer  $Fe^{3+}$  et l'histidine 74 (**Fig. I. 15, étape 2**). Des interactions avec les chaînes latérales d'acides aminés, en particulier l'asparagine 147 et la sérine 113, polarisent anormalement la liaison O-O, permettant sa rupture hétérolytique. Cette rupture aboutit au composé I (**Fig. I. 15, étape 3**). L'atome d'oxygène restant sur le fer lègue deux électrons à la molécule d'eau ainsi formée. L'espèce  $Fe=O$ , extrêmement oxydante, est prête à recevoir la deuxième molécule d' $H_2O_2$ , afin de l'oxyder. Lors de cette phase, les deux oxygènes du peroxyde vont former la molécule d'oxygène diatomique, qui sera libérée. L'ensemble



A



B

Figure I. 14: Les différents états et substrats possibles de la catalase pendant son cycle catalytique. D'après Pelmont, 1989.

A: réaction de type catalasique;

B: réaction de type peroxydasique, avec passage par le composé II.

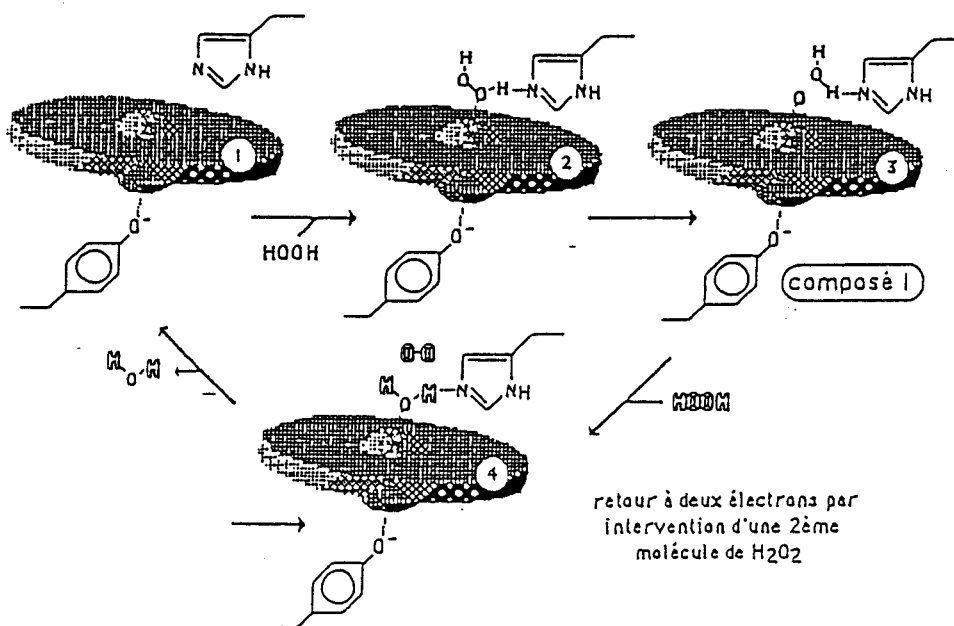


Figure I. 15: Mécanisme catalytique le plus probable avec le peroxyde d'hydrogène comme substrat. D'après Pelmont, 1989.

Fer-porphyrine se retrouve à l'état 3+ (**Fig. I. 15, étape 4**) (Fita et Rossman, 1985b).

La réduction du composé I en ferricatalase peut également se faire en deux étapes à l'aide de réducteurs monoélectroniques (AH). On passe ainsi de la forme  $Fe^{5+}$  (composé I) au composé II de degré d'oxydation +4 (**Fig. I. 14B**). Dans le cas de composés organiques, il s'agit d'une réaction de type peroxydasique. En absence de réducteurs à un électron, le composé II tend à s'accumuler, puisqu'il ne peut plus être réduit monoélectriquement par  $H_2O_2$ . Par contre, il peut l'oxyder et aboutir à la formation du composé III, inactif. La formation des composés II et III, correspond ainsi à des formes inactives de l'enzyme.

#### 5.1.1.2. Comportement cinétique

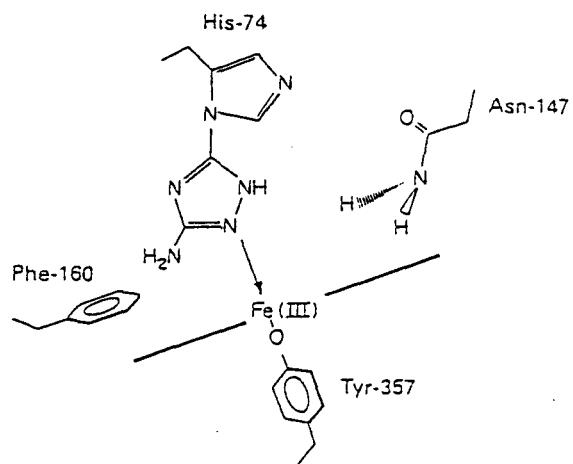
Le  $K_m$  de l'enzyme pour l'eau oxygénée est très élevé et difficile à déterminer, puisque la catalase subit une inactivation rapide par son propre substrat. Le  $K_m$  théorique dépasse 0.1 M pour l'enzyme de mammifère, et montre ainsi sa faible efficacité dans l'élimination des peroxydes à très faible dose, contrairement aux peroxydases.

L'activité catalasique est de l'ordre de 200 000 molécules de substrat par seconde et par centre catalytique, ce qui est à la limite de la vitesse de diffusion des substrats. De plus, la catalase n'est pas une enzyme de type Michaelienne, puisqu'elle réagit directement avec la première molécule de substrat S par une liaison covalente, formant le composé I. Ce composé est à son tour détruit par une seconde molécule de substrat, selon le schéma:



Si E est la concentration initiale en enzyme libre, le rapport  $E'/E$  a été mesuré et est compris entre 0,25 et 0,4, ce qui implique dans le cas d'un tétramère comme la catalase, que seule une à deux sous-unités réagit avec le substrat, alors que les quatre sous-unités sont à priori identiques. En effet, certains auteurs ont remarqué pour la catalase de foie de boeuf, que deux hèmes sur quatre étaient remplacés par des ferriprotoporphyrines oxydées (biliverdine liée à du fer), sans gêner l'activité enzymatique de la catalase (Fita et Rossmann, 1985b).

L'activité enzymatique est indépendante du pH, compris entre pH 4,7 et pH 10,5 (Deisseroth et Dounce, 1970).



**Figure I. 16:** Modèle de liaison du 3-amino-1,2,4, triazole au site actif de la catalase de foie d boeuf. D'après Reid *et al.*, 1981.

### 5.1.1.3. Action des inhibiteurs

#### 5.1.1.3.1. Le 3-Amino-1:2:4-triazole (AT)

L' amino-triazole est un inhibiteur irréversible et sélectif des catalases. Il permet de les distinguer des peroxydases. L'inhibition s'effectue lentement en présence d'une quantité faible mais continue d' $H_2O_2$  généré par un système du type glucose/glucose oxydase en présence de 20 mM d'AT. La catalase va réagir avec une molécule de  $H_2O_2$  donnant le composé I, qui sera inhibé par l'AT. L'efficacité de l'inhibition (93%) est identique de pH 5,5 à pH 9. La réaction entre l'hème et l'inhibiteur est stoechiométrique (Margoliash *et al.*, 1960; Nicholls, 1962). Ce composé va venir occuper du côté distal le 6<sup>ème</sup> site de coordination du fer hémique par fixation covalente sur l'histidine 74 (**Fig. I. 16**) (Reid *et al.*, 1981).

L' amino-triazole peut également inhiber réversiblement la catalase. Cette réaction est rapide; elle demande une quantité importante d'inhibiteur.

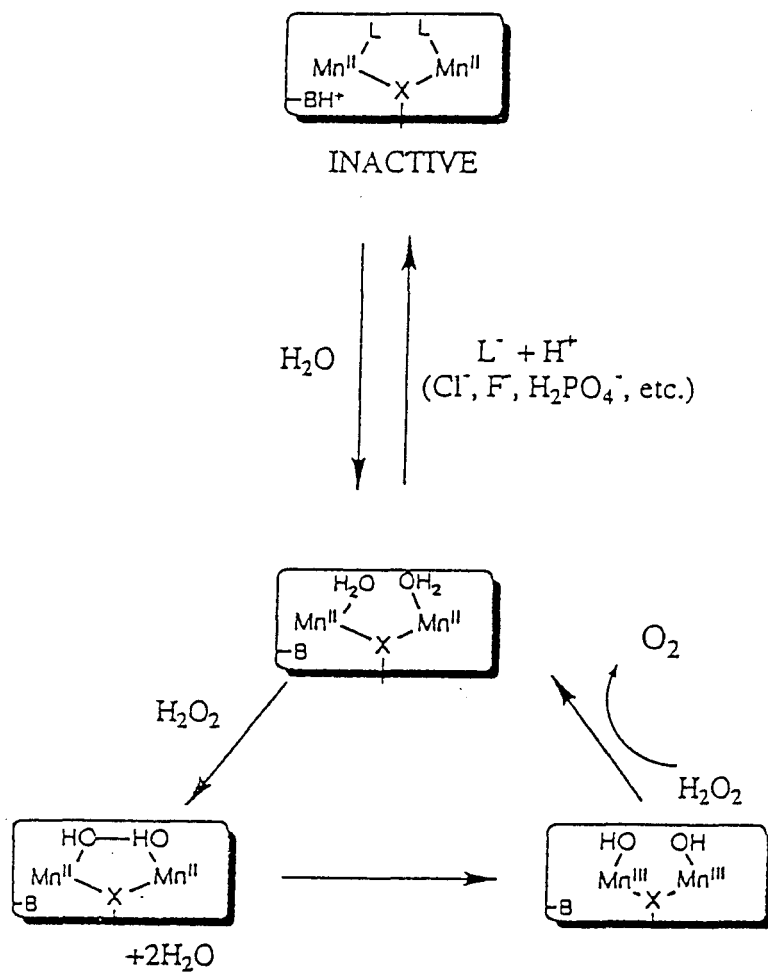
#### 5.1.1.3.2. L'anion superoxyde

La catalase est inhibée par un flux continu de  $O_2^{\circ-}$  généré par un système de type xanthine/xanthine-oxydase. Deux types d'inhibition peuvent être distingués pour la catalase de foie de boeuf. La première, rapide, peut être évitée ou levée par l'ajout de SOD, tandis que la seconde, plus lente, est empêchée et réversée par la présence d'éthanol et n'est pas influencée par la SOD (Kono et Fridovich, 1982).

Ces inhibitions montrent l'interaction qui peut exister entre la catalase et les SOD inhibées par  $H_2O_2$  (SOD à fer et à un moindre degré, la SOD Cu/Zn). Catalase et SOD constituent donc un système mutuel de protection.

#### 5.1.1.3.3. Les inhibiteurs classiques

Le bromure de cyanogène inhibe réversiblement et à pH indépendant (pH 4,5 à pH 7,5) la catalase native. Cette inhibition résulte de l'incorporation du  $CN^-$  dans chaque sous-unité de l'apoenzyme, au niveau du site actif, probablement au niveau de l'histidine 74. Des ligands potentiels de l'enzyme (acide formique, acide acétique ou acide fluorhydrique) réversent lentement l'inhibition causée par  $CN^-$  avec une restauration totale de l'activité (Schonbaum et Chance, 1976). Dans ce cas, on n'observe pas de modification du spectre de l'hème. Par contre, l'inhibition réversible avec ces acides faibles ( $HCN$ ,  $HN_3$ ,  $HF$ , acide formique, acide acétique) implique une interaction entre le fer et le composé du côté distal, modifiant le spectre de l'hème (Nicholls et Schonbaum, 1963; Schonbaum et Chance, 1976).



**Figure I .17:** Mécanisme d'action probable de la catalase à manganèse. D'après Pessiki et Dismukes, 1994.

Les groupements thiols inhibent réversiblement la catalase: c'est le cas du glutathion, de la cystéine, du dithiothréitol, mais les groupements SH titrables de la molécule ne sont pas affectés par ces composés (Takeda *et al.*, 1980). Le 2- $\beta$ -mercaptoéthanol inhibe irréversiblement la catalase.

La catalase peut réagir avec le *tert*-butylhydroperoxyde (t-BOOH) en présence de donneurs d'hydrogène comme le NADH et le réduire en tBOH par une réaction de type peroxydasique. Cette réaction passe par la formation du composé II. En absence de donneurs d'hydrogène, il conduit à la destruction des groupements protoporphyrines IX de l'enzyme et aboutit à son inactivation irréversible (Pichorner *et al.*, 1993).

### 5.1.2. Catalases du groupe 3

Le  $K_m$  apparent de ces enzymes est beaucoup plus faible que celui des catalases classiques (inférieur à 10 mM), indiquant une affinité plus importante pour son substrat. Les catalases-peroxydases sont, comme les catalases typiques, inhibées par l'azide et le cyanure, mais sont résistantes, comme les peroxydases, à l'inhibition par l'amino-triazole. Ces enzymes possèdent un pH d'activité restreint, compris entre pH 6-6,5. Les activités catalase et peroxydase n'ont pas les mêmes caractéristiques enzymatiques (pH maximum d'activité,  $K_m$ , sensibilité aux inhibiteurs). Ceci permet une protection efficace de l'organisme lors de modifications des conditions de culture.

La réaction enzymatique conduit à la formation du composé I comme la réaction catalysée par les catalases des groupes 1 et 2. La transition du composé I au composé II est par contre plus importante. En conséquence, la concentration en composé I est plus faible. Elle explique aussi la résistance de l'enzyme à l'amino-triazole, puisque cet inhibiteur se fixe sur le composé I (Hochman et Shemesh, 1987).

### 5.1.3. Catalases du groupe 4

Quatre états d'oxydation ont été identifiés chez *Lactobacillus plantarum* et *Thermus thermophilus*. Deux états sont impliqués dans la réaction enzymatique: l'état réduit  $Mn^{2+}/Mn^{2+}$  et l'état oxydé  $Mn^{3+}/Mn^{3+}$  (Pessiki et Dismukes, 1994). Deux états supplémentaires correspondent à des formes inactives de l'enzyme: une forme super-oxydée  $Mn^{3+}/Mn^{4+}$  et une forme semi-oxydée minoritaire  $Mn^{2+}/Mn^{3+}$ . Le mécanisme d'action supposé comprend le passage de l'état réduit à l'état oxydé suivant la **figure I. 17**. L'équation réactionnelle est identique à celle des catalases classiques. L'état réduit peut facilement être inhibé par liaison avec de petites molécules tel que  $Cl^-$ ,  $F^-$ ,  $N_3^-$ ,  $NO_3^-$ , qui se lient apparemment sur le  $Mn^{2+}$ . L'enzyme est faiblement

inhibée par l'amino-triazole. Par contre, il n'y a pas d'inhibition avec le  $\text{CN}^-$ , contrairement aux catalases à groupement héminique. L'enzyme est inhibée à 100% par l'hydroxylamine en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Pessiki et Dismukes, 1994; Dismukes, 1992). L'activité catalase de *L. plantarum* est inhibée à 50% par un flux continu de superoxyde. Cette inhibition est entièrement évitée par l'addition de SOD (Kono et Fridovich, 1982). L'activité enzymatique de *T. thermophilus* est indépendante du pH entre pH 6 et pH 10 (Khangulov *et al.*, 1990). La catalase de *Thermoleophilum album* présente un  $K_m$  apparent de 15 mM pour  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Allgood et Perry, 1986), contrairement à celle de *L. plantarum* où il est égal à 250 mM (Kono et Fridovich, 1983). L'enzyme de *T. album* montre une activité peroxydasique à l'encontre du p-phénylènediamine (Allgood et Perry, 1986).

## 5.2. Stabilité de l'activité catalasique

### 5.2.1. Les catalases du groupe 1

L'enzyme est stable à 50°C pendant 15 minutes, ainsi qu'en présence de 2 mM d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Yumoto *et al.*, 1990). Elle n'est pas dénaturée lors de la précipitation de l'hémoglobine par le traitement chloroforme/éthanol, sauf dans le cas de la catalase d'érythrocyte de boeuf (Deisseroth et Dounce, 1970).

L'enzyme est dissociée en sous-unités par un traitement acide (pH <3), basique (pH >12) ou par un traitement à 8 M d'urée. Dans ces conditions, elle se retrouve sous forme dimérique, l'activité catalasique s'estompant au profit d'une activité peroxydasique. L'enzyme est renaturée après neutralisation du pH ou lors de l'élimination de l'urée (Scherz *et al.*, 1976).

### 5.2.2. Catalases du groupe 2

Les catalases hexamériques (cat-1, cat-2 de *B. subtilis* et HP II de *E. coli*) semblent plus stables à la dénaturation par la chaleur que les catalases typiques tétramériques. Cat-2 est résistante au traitement SDS 1% - urée 7 M (Loewen et Switala, 1988) de même, HP II conserve son activité maximale dans le mélange SDS 0,1% - urée 7 M (Loewen et Switala, 1986). La catalase de *Klebsiella pneumoniae* présente également une grande stabilité à la chaleur (1 heure à 70°C) et à l'urée (stable à 8 M pendant 4 jours et à 30°C) selon Goldberg et Hochman, (1989). De plus, la catalase HP II de *E. coli* est moins sensible à l'inactivation irréversible par le 2- $\beta$ -mercaptoéthanol que la catalase de foie de boeuf et n'est pas inhibée par l'anion superoxyde (Sevinc *et al.*, 1995).



### 5.2.3. Catalases du groupe 3

Elles se différencient des catalases typiques par plusieurs aspects (Nadler *et al.*, 1986):

- une sensibilité plus grande à la température, puisqu'elles sont complètement inhibées à 50°C, contrairement à la catalase de foie de boeuf. Les catalases de *Bacillus stearothermophilus* (Loprasert *et al.*, 1989) et de *Halobacterium halobium* (Brown-Peterson et Salin, 1993) constituent des exceptions;

- une sensibilité aux solvants organiques (elles ne résistent pas au traitement chloroforme/éthanol) et à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 5.3. Catalase et NADPH

### 5.3.1. Mise en évidence de l'association catalase-NADPH

En 1984, Kirkman et Gaetani montrent l'association de la catalase de foie de boeuf et de la catalase de l'érythrocyte humain à quatre molécules de NADPH fermement liées au tétramère. La constante d'affinité est supérieure à 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> pour le NADPH et diminue pour les autres dinucléotides: NADPH > NADH > NADP<sup>+</sup> > NAD<sup>+</sup>. L'existence des quatre sites de liaison du NADPH de la catalase bovine a été confirmée par l'analyse structurale aux rayons X (Fita et Rossmann, 1985a). Ce groupement est situé dans la partie C-terminale de la sous-unité (quatrième domaine), à 13,7 Å de l'hème. Il ne semble pas participer au mécanisme catalytique.

Présent dans de nombreuses catalases de mammifères, le NADPH est absent chez les champignons comme *Penicillium vitale*, *Aspergillus niger* mais présent chez certaines catalases typiques bactériennes: *Proteus mirabilis* (Jouve *et al.*, 1989), *Halobacterium halobium* (1 NADPH/tétramère) (Brown-Peterson et Salin, 1995). Son existence est supposée dans la catalase de *Micrococcus lysodeikticus* (Murshudov *et al.*, 1992). Les résidus de liaison au NADPH sont retrouvés dans la séquence de la catalase de *Bacteroides fragilis* (Rocha et Smith, 1995). La comparaison de séquence d'acides aminés des catalases de *Candida tropicalis* avec la catalase de foie de boeuf montre que les résidus responsables de la liaison avec le NADPH sont faiblement conservés (Okada *et al.*, 1987).

### 5.3.2. Rôle du NADPH

Le rôle du NADPH est de régénérer le composé II inactif en ferricatalase, produit par la réduction à un électron du composé I, soit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lorsqu'il est en faible quantité, soit par un réducteur monoélectronique. Cette régénération, en absence de réducteur monoélectronique exogène, s'effectue grâce au NADPH, qui, une fois oxydé en NADP<sup>+</sup>, est remplacé par une

seconde molécule dans le site de liaison de la catalase. Le NADPH transfère un électron au composé II, le réduisant sous native, le second électron du NADPH serait transféré sur l'oxygène ou sur une petite molécule acceptrice (Almarsson *et al.*, 1993).

La présence du NADPH dans la catalase constitue un réservoir pour la cellule (Kirkman *et al.*, 1987).

Les catalases de champignons, qui ne contiennent pas de NADPH, forment d'ailleurs beaucoup plus difficilement le composé II. Elles n'ont donc pas besoin de ce réducteur endogène.

Les deux mécanismes enzymatiques de détoxification du peroxyde d'hydrogène à savoir la glutathion peroxydase et la catalase dépendent ainsi du NADPH. Cette liaison du dinucléotide à la catalase, met en évidence l'importance du NADPH et des enzymes qui le régénèrent (comme la G-6-PD) dans les mécanismes enzymatiques de détoxification du peroxyde d'hydrogène.

## 6. ROLE DE LA CATALASE

### 6.1. Au niveau des hématies et des peroxysomes

#### 6.1.1. Les hématies

L'anion superoxyde produit durant l'auto-oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine, est dismuté en  $H_2O_2$  par la SOD Cu/Zn. Le peroxyde d'hydrogène est ensuite éliminé soit par la catalase, soit par la GPx. En dépit d'une forte activité catalasique dans le globule rouge, la fonction de cette enzyme dans les conditions physiologiques reste discutée du fait de sa faible affinité pour  $H_2O_2$  par rapport à la GPx. La catalase aurait une réelle importance lorsqu'elle se trouve en présence de fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène (Cohen et Hochstein, 1963). Les hématies déficientes en G-6-PD, incapables de maintenir le GSH sous sa forme réduite, sont particulièrement sensibles à  $H_2O_2$  (Gerli *et al.*, 1982). Il en est de même pour les variants acatalasiques provenant du Japon et possédant 3% d'activité catalasique résiduelle (Takahara, 1968). Selon Scott *et al.*, (1991) l'addition ou la suppression du glutathion dans des hématies humaines déficientes en G-6-PD n'affecte pas la susceptibilité à l' $H_2O_2$ . La découverte et la fonction du NADPH au niveau de la catalase par Kirkman et Gaetanni (1984); Kirkman *et al.*, 1987, a permis de relier la dégradation de l' $H_2O_2$  dans l'hématie, à la présence de NADPH. L'équipe de Gaetani (1989; 1994) a montré que les deux voies de dégradation de l' $H_2O_2$  dans l'hématie humaine (catalase et GPx) sont équitablement impliquées.

La catalase des érythrocytes humains possède une activité de facteur de prolifération cellulaire à large spectre de cellules cibles. Son activité est associée à la destruction de  $H_2O_2$ . Ce

composé semble influencer la prolifération cellulaire, sa présence induisant la sénescence des cellules en culture (Takeuchi *et al.*, 1995).

### 6.1.2. Au niveau des peroxysomes

Les peroxysomes de mammifères sont définis comme possédant au moins une flavine oxydase qui produit de l' $H_2O_2$  et la catalase. Riches en oxydases (amino acide oxydases, urate oxydase et acyl-CoA oxydase), ils sont responsables du catabolisme oxydatif de différents composés, essentiellement les acides gras à très longue chaîne par  $\beta$ -oxydation. Au cours de cette réaction, l'acyl-CoA oxydase, une enzyme à FAD, génère du peroxyde d'hydrogène, qui sera détruit par la catalase.

Chez la levure méthylotrophe *Hanseluna polymorpha*, un mutant déficient en catalase ne peut croître sur un milieu contenant du méthanol comme seule source d'énergie et de carbone. En effet, il perd les fonctions enzymatiques peroxysomales, nécessaires à l'assimilation de ce substrat. La complémentation fonctionnelle par la catalase peroxysomale de *Saccharomyces cerevisiae* (CTA1), restaure ses fonctions peroxysomales et sa capacité de croître sur un milieu contenant du méthanol (Hansen et Roggenkamp, 1989).

## 6.2. Chez les procaryotes

### 6.2.1. Virulence des souches bactériennes

La catalase est importante pour la survie de plusieurs bactéries pathogènes dans l'intérieur des polynucléaires. Elle détruit l' $H_2O_2$  produit au cours de la flambée respiratoire. Par contre, la catalase typique de *Bordetella pertussis*, agent de la coqueluche ne semble pas jouer de rôle significatif dans la survie de cette bactérie à l'intérieur des phagosomes des polynucléaires (De-Shazer *et al.*, 1994). De même, la perte par mutation de l'activité catalasique chez *Listeria monocytogenes* ne réduit pas la virulence de ce mutant chez la souris (Leblond-Francillard *et al.*, 1989). Le mutant voit son activité SOD augmenter de deux fois par rapport au témoin. La catalase inductible de *Haemophilus influenzae*, protège bien la bactérie contre l'ajout *in vitro* de faibles quantités de peroxyde d'hydrogène, mais des mutants déficients en catalase sont capables de coloniser la région nasopharyngienne (Bishai *et al.*, 1994b).

La résistance de *Mycobacterium tuberculosis* à l'acide isonicotinique hydrazide (INH) est accompagnée d'une diminution de l'activité catalasique. Récemment, il a été montré que la résistance proviendrait d'une délétion complète du gène *katG* codant pour une catalase/peroxydase (Zhang *et al.*, 1992a). Sur un échantillonnage beaucoup plus important, une

autre équipe a montré que la délétion complète de *kaiG* n'est pas le mécanisme majeur de la résistance à l'INH (Stoeckle *et al.*, 1993).

La flambée respiratoire des neutrophiles détruit les bactéries par les radicaux libres. De nombreuses recherches ont suggéré que le gène *oxyR* devait jouer un rôle important dans la survie bactérienne après phagocytose. Ni une inactivation de *oxyR*, ni une surexpression constitutive des protéines régulées par *oxyR*, n'altèrent la résistance de *Salmonella typhimurium* aux neutrophiles *in vitro*. De même, une délétion du gène codant pour HPI, est sans effet sur la survie bactérienne après exposition aux polynucléaires neutrophiles (Papp-Szabo *et al.*, 1994).

### 6.2.2. Rôle au cours de la croissance bactérienne

La catalase/peroxydase de *Rhodobacterium capsulatus*, en condition aérobie, protégerait la cellule lorsqu'elle est en phase stationnaire. Durant la phase logarithmique, cette enzyme a peu de rôle et la protection contre l' $H_2O_2$  présent est assurée par une peroxydase (Hochman *et al.*, 1992). En phase stationnaire, les cellules sont sujettes à un stress oxydant, et la destruction de l' $H_2O_2$  est crucial pour leur survie (Hochman *et al.*, 1992).

Un mutant sans catalase (*KatG* et *KatE*) de *E.coli* présente une augmentation du taux des mutations spontanées par rapport au type sauvage (Loewen, 1984). De plus, une étude effectuée sur *E.coli*, indique que la catalase protège efficacement la colonie contre  $H_2O_2$ , mais pas la bactérie individuelle (Ma et Eaton, 1992).

Chez la bactérie aérobie stricte *Vitreoscilla*, la catalase/peroxydase permet de détruire l' $H_2O_2$  généré par l'auto-oxydation de l'hémoglobine bactérienne. Le contenu cellulaire en hémoglobine varie durant le cycle de croissance et suivant les conditions de culture, mais le rapport catalase/hémoglobine reste relativement constant. Ceci indique que les biosynthèses de l'hémoglobine et de la catalase doivent être coréglées (Abrams et Webster, 1990).

## 7. REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA CATALASE

Les mécanismes responsables de la régulation de l'expression des catalases sont en général peu connus. Ils dépendent de nombreux facteurs, qui sont essentiellement le peroxyde d'hydrogène et les conditions de culture en cas de privation. Les systèmes de régulation ont été les plus étudiés chez *E.coli*, mais également chez *Saccharomyces cerevisiae*.

## 7.1. Les inducteurs

### 7.1.1. Le peroxyde d'hydrogène

#### 7.1.1.1. Chez les procaryotes

Ces organismes répondent à une augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène par l'induction d'une catalase sous le contrôle du régulon *oxyR*. Cette catalase peut être du groupe 3 comme dans le cas de *E. coli*, du groupe 2, dans le cas de *Bacillus subtilis* (Bol et Yasbin, 1994), mais aussi du groupe 1 dans le cas de *Haemophilus influenzae* (Bishai *et al.*, 1994a). Ainsi, lorsque *E. coli* est traité par de faibles doses de  $H_2O_2$ , il induit la synthèse de HPI (*katG*) mais aussi de 33 autres protéines, rendant les cellules plus résistantes à des concentrations létales de peroxyde d'hydrogène. Des 34 protéines induites, 9 (dont HPI et l'alkylhydroperoxydase) sont directement sous le contrôle du produit du gène *oxyR*. La régulation se situe au niveau transcriptionnel. Par un changement de sa conformation, la protéine *oxyR* se fixe en amont du gène *katG*, mais aussi du gène *oxyR* où elle va interagir avec l'ARN polymérase pour activer la transcription (Loewen, 1992).

#### 7.1.1.2. Chez les eucaryotes

Les cellules d'eucaryotes répondent également à une augmentation de la quantité d' $H_2O_2$ . Chez *S. cerevisiae*, le cuivre, impliqué dans la réaction d'Haber-Weiss, induit spécifiquement la transcription du gène *CTT 1* (Lapinskas *et al.*, 1993).

Le contact du peroxyde d'hydrogène avec des cellules épithéliales de trachée de hamster (cellules HTE), provoque une augmentation dose-dépendante des ARNm de la catalase, qu'il s'agisse de cellules en phase de croissance exponentielle ou de cellules confluentes (Shull *et al.*, 1991).

Lors d'une diminution de l'activité GPx pour cause de carence en sélénium, des cellules murines leucémiques (cellules L1210) voient une augmentation de 1,5 à 2 fois de leur activité catalase. Lorsque la carence est prolongée, une activité catalase 100 fois supérieure aux cellules témoins est observée. Dans ce cas, l'activité ne diminue pas quand les cellules sont reconstituées en sélénium, suggérant la sélection d'un mutant à activité catalase hyperexprimée stable (Lin *et al.*, 1993).

Lors d'une surexpression de la SOD Cu/Zn humaine chez des souris transgéniques. Ces cellules présentent une activité catalasique beaucoup plus élevée que chez souris témoins, alors que l'activité GPx reste inchangée. La catalase serait plus inductible que la GPx en présence de fortes concentrations en  $H_2O_2$  (Przedborski *et al.*, 1992).

Des cellules myéloïdes humaines leucémiques (cellules HP50-2) beaucoup plus résistantes à  $H_2O_2$  que les cellules parentales (cellules HL-60), présentent une amplification intrachromosomique du gène de la catalase de 2 à 8 fois selon le degré de résistance. Le niveau d'activité SOD et GPx est faiblement augmenté dans ces cellules résistantes à  $H_2O_2$  (Yamada *et al.*, 1991).

### 7.1.2. Phase stationnaire et de privation

HPII, la catalase majoritaire de *E. coli* en condition aérobie, est codée par le gène *katE*. Elle est régulée au niveau transcriptionnel par KatF qui possède des homologies avec les facteurs de transcription  $\sigma$  ( $\sigma^s$ ). L'expression de HPII est maximale quand la cellule entre en phase stationnaire, dans des conditions de privation ou lorsque la culture contient des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques. Le gène *katF* est impliqué dans la régulation de l'expression d'un groupe de gènes ayant des fonctions diverses, mais son rôle principal réside dans l'adaptation de la cellule aux conditions de privation. Généralement, les facteurs qui induisent l'expression de *katE*, induisent également l'expression de *katF*. Bien que la protéine katF soit requise pour l'expression de *katE*, elle n'est pas à elle seule suffisante pour augmenter la transcription de *katE*, suggérant la présence d'un autre facteur impliqué dans le contrôle de l'expression de *katE* (Loewen, 1992).

### 7.1.3. Autres inducteurs

#### 7.1.3.1. Le choc thermique

Il semble exister une relation entre le choc thermique et le stress oxydatif. En effet, chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, la résistance au peroxyde d'hydrogène procure une résistance contre le choc thermique (Loewen, 1992).

Chez *S. cerevisiae*, l'expression de la catalase T est inductible par choc thermique (Wieser *et al.*, 1991). Le prétraitement des cellules à une température relativement élevée (37°C) protège ces cellules contre un apport d' $H_2O_2$  (Wieser *et al.*, 1991). De même, l'activité catalasique est augmentée chez *Candida albicans*, quand la température augmente de 28 à 37°C (Romandini *et al.*, 1994).

#### 7.1.3.2. L'hème

*Lactobacillus sake* LTH677 possède un gène pour une catalase atypique dont l'activité enzymatique s'exprime lorsque le milieu contient de l'hème. Il y a formation de l'apoenzyme en

attente de l'incorporation de l'hème (Knauf *et al.*, 1992).

L'activité catalasique de *Bacteroides distasonis* varie en fonction de la quantité d'hème présente dans le milieu. Il y a synthèse de l'apoenzyme lors de la croissance sur un milieu pauvre en hème. Lorsque celui-ci est ajouté à la culture, il s'associe à l'apoenzyme et l'activité augmente, puis il y a synthèse de nouvelles apoenzymes pour obtenir une activité maximale (Gregory et Fanning, 1983).

L'expression des deux gènes de catalase de *S. cerevisiae* est sous le contrôle positif de l'hème. Chez cette levure, la synthèse de l'hème demande de l'oxygène. L'hème signalerait la présence de l'oxygène aux régions de contrôle des gènes codant pour des hémoprotéines comme la catalase (Wieser *et al.*, 1991).

#### 7.1.3.3. Les conditions de culture

Chez les levures, les protéines des peroxysomes et les peroxysomes sont induits en présence d'acides gras. Cette induction concerne à la fois les protéines impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la catalase. C'est le cas de la catalase A de *S. cerevisiae* (Skoneczny *et al.*, 1988), mais aussi de la catalase de *Candida tropicalis*. De plus, celle-ci est induite lors de culture contenant des alcanes (Okada *et al.*, 1987).

Une large variété de molécules de nature lipophile induit la prolifération des peroxysomes, comme les molécules hypolipémiantes de la famille des fibrates. Cette prolifération est dépendante du tissu, de l'espèce. Mais bien souvent, la catalase est peu induite (Latruffe, 1992).

Les ARNm des catalases T et A de *S. cerevisiae* sont absents lorsque les cultures sont effectuées sur un milieu riche en glucose, la catalase A étant plus sensible à ce composé (Hörtner *et al.*, 1982). De plus, le gène de la catalase T (*CTT 1*) est dérprimé dans des conditions de carence de nutriments (azote, phosphore, soufre) selon Belazzi *et al.*, (1991).

## 8. LOCALISATION DE LA CATALASE

Dans les organes des mammifères, tels que le foie, la catalase du groupe 1 se localise principalement dans les peroxysomes, alors que dans les hématies matures, elle est libre dans le cytosol (Schonbaum et Chance, 1976). Chez les plantes supérieures, la catalase est également associée aux peroxysomes ou aux glyoxysomes de la cellule. Une exception concerne la catalase 3 du maïs localisée dans la mitochondrie (Abler et Scandalios, 1993).

Chez *C. tropicalis*, la catalase du groupe 1 est également rencontrée dans les peroxysomes (Okada *et al.*, 1987). Par contre, chez *S. cerevisiae*, la catalase du groupe 1 (catT) est localisée

PROTOZOAIRES	ACTIVITE U/mg de protéines	REFERENCE
- <i>Trypanosoma brucei</i>	0	Penketh et Klein, 1986
- <i>Trypanosoma cruzi</i>	0	Boveris <i>et al.</i> , 1980
- <i>Leishmania donovani</i> promastigote amastigote	0 0,062	Channon et Blackwell, 1985
- <i>Trichomonas vaginalis</i>	0	Ellis <i>et al.</i> , 1994
- <i>Tritrichomonas foetus</i>	0,0323 ± 0,0067	Muller, 1973
- <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoite, souche RH tachyzoite, souche C	16,9 ± 0,9 18,6 ± 1,7	Sibley <i>et al.</i> , 1986
- <i>P. falciparum</i> trophozoïte schizonte	24,1 ± 2,9 17 ± 6,4	Fairfield <i>et al.</i> , 1988
- <i>P. berghei</i>	0,33 ± 0,17	Fairfield <i>et al.</i> , 1986
- <i>Babesia</i>	non déterminé	
- <i>Entamoeba histolytica</i>	0	Mehlotra et Shukla, 1988

Tableau I. 3: Activité catalasique retrouvée chez les protozoaires.



dans le cytoplasme de la cellule (Seah et Kaplan, 1973), tandis que la catalase du groupe 2 (cat A) est retrouvée dans les peroxysomes (Cohen *et al.*, 1988).

Chez *E. coli*, la catalase du groupe 2 (HP II) se localise dans le cytoplasme, tandis que la catalase du groupe 3 (HP I) est située dans l'espace périplasmique et au niveau des fractions membranaires cytoplasmiques (Heimberger et Eisenstark, 1988).

## 9. LA CATALASE CHEZ LES PROTOZOAIRE

Aucune catalase n'a jusqu'à présent été caractérisée au niveau biochimique ou moléculaire chez les protozoaires. Les seuls résultats concernent des dosages d'activité enzymatique qui sont restés dans un certain nombre de cas négatifs (**tableau I. 3**). Chez certaines espèces, des enzymes ayant une activité équivalente à la catalase ont été caractérisées: une alkyl hydroperoxyde réductase (AHP) de type bactérien chez *Entamoeba histolytica* (Bruchhaus et Tannich, 1995) et une NADH peroxydase chez *Giardia* (Brown *et al.*, 1995). En ce qui concerne *Plasmodium*, les résultats sont peu nombreux et seront discutés dans le chapitre suivant où nous nous proposons d'examiner les relations entre *Plasmodium* et choc oxydant.

REACTION DE L'HOTE  
( $O_2^{\cdot-}$ ,  $ClO^-$ ,  $NO$ )

PHENOMENES D'OXYDATION  
DANS L'HEMATIE  
( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\circ$ )

METABOLISME DU PARASITE  
( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ )

MEDICAMENTS OXYDANTS  
( $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ )

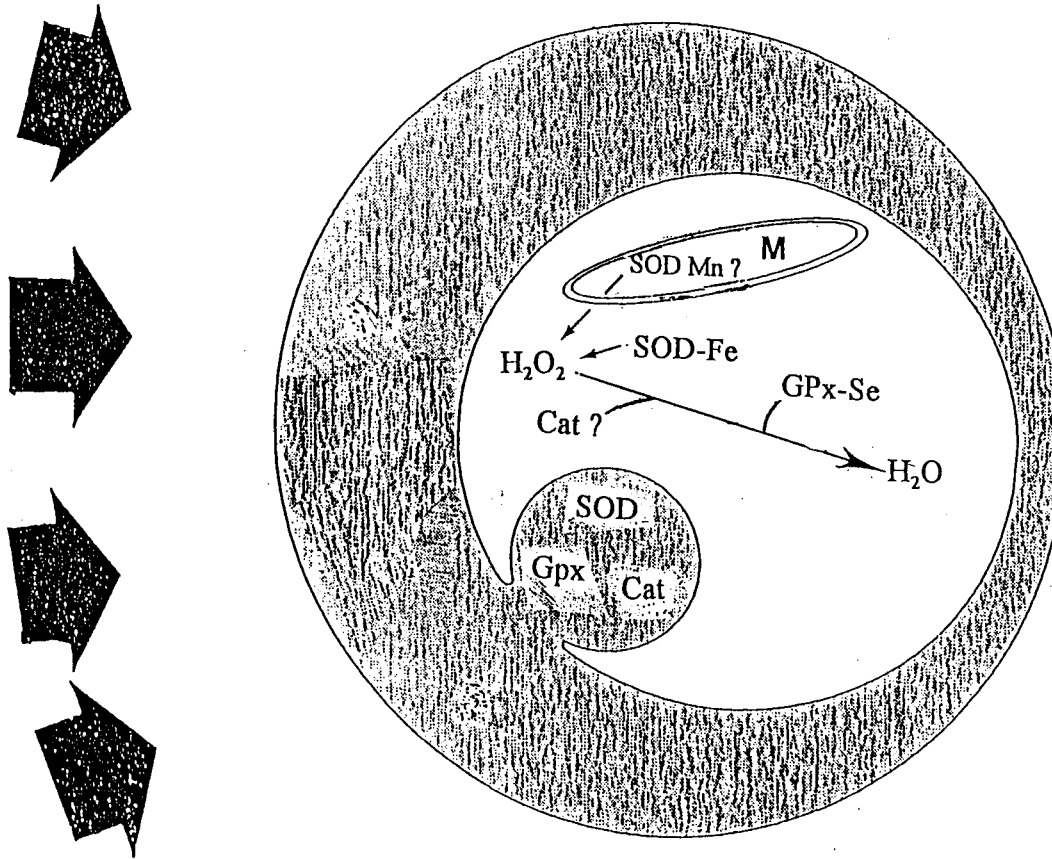


Figure I.18: Plasmodium et le choc oxydatif.  
SOD: superoxyde dismutase; Gpx: glutathion peroxydase; Cat: catalase; M: mitochondrie.

## CHAPITRE IV: *PLASMODIUM* ET STRESS OXYDANT

La sensibilité de *Plasmodium* au choc oxydant constitue actuellement un dogme qui s'est établi à partir d'études épidémiologiques et expérimentales. L'existence d'un système de défense propre au parasite a été même contesté par plusieurs auteurs. En fait, l'examen de la littérature montre que les résultats sont extrêmement variables d'un auteur à l'autre, en fonction des conditions expérimentales qui ont été utilisées. Aucune étude précise du système antioxydant de *Plasmodium* n'avait été réalisée, tant sur le plan biochimique que moléculaire, jusqu'à ces toutes dernières années. Nous examinerons successivement dans ce chapitre, les origines du choc oxydant subi par le parasite au cours de son développement dans son hôte, les arguments plaidant en faveur d'une sensibilité au choc oxydant chez *Plasmodium*, puis ceux montrant l'existence d'un système enzymatique de défense contre les E.A.O. chez ce parasite et ses potentialités d'adaptation.

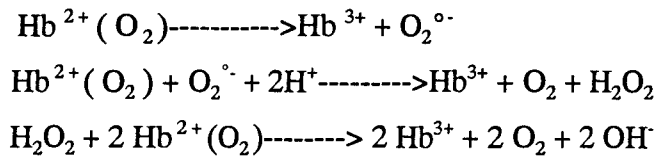
### 1. ORIGINE DU STRESS OXYDANT SUBI PAR *PLASMODIUM*

Lors de son développement dans l'hématie, *Plasmodium* est exposé à un stress oxydant d'origine endogène (produit par le parasite lors de sa croissance) et exogène (provenant de l'auto-oxydation de l'hémoglobine, du système immunitaire de l'hôte et de l'action de médicaments antimalariques spécifiques) (Fig. I. 18).

L'étude détaillée des différentes sources d'E.A.O est décrite dans ce chapitre afin d'examiner les conséquences du stress oxydant sur l'hématie parasitée.

#### 1.1. Espèces activées de l'oxygène produites par le parasite.

Il est admis qu'une partie importante des E.A.O produites par le parasite est formée lors du catabolisme de l'hémoglobine. Au cours de sa croissance, le parasite internalise le stroma du globule rouge, essentiellement de l'hémoglobine. La protéolyse de l'hémoglobine s'effectue dans la vacuole digestive où le pH est acide (pH 5, 5,5; Goldberg et Slater, 1992). L'hémoglobine (Hb), intacte ou partiellement dégradée, est ainsi exposée à un pH acide favorisant l'auto-oxydation spontanée de l'oxyHb en métHb avec production de  $O_2^{\circ-}$  (Misra et Fridovitch, 1972). L'anion produit va oxyder l'hémoglobine selon les réactions suivantes (Winterbourn, 1985):



En milieu acide,  $\text{O}_2^{\circ}$  se dismute rapidement en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Celui-ci peut réagir avec l'hème libéré lors de la protéolyse de l'hémoglobine pour libérer un atome de fer (Halliwell et Gutteridge, 1986; Gabay et Ginsburg, 1993). En présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , de fer ou d'hème libéré, le radical  $\text{OH}^{\circ}$  est produit par la réaction d'Haber-Weiss. Seul  $\text{OH}^{\circ}$ , hautement réactif, agit sur son lieu de formation et ne diffuse pas (Yu, 1994). Les autres composés ( $\text{O}_2^{\circ}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produits dans la vacuole digestive seraient capables de diffuser dans les différents compartiments du parasite, ainsi que dans le cytoplasme de la cellule hôte (Atamna et Ginsburg, 1993). La production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OH}^{\circ}$ , inexistante au stade anneau alors que la digestion de l'hémoglobine est minimale, augmente au cours de la maturation du parasite (Atamna et Ginsburg, 1993). La libération de fer varie également au cours du développement du parasite (Golenser *et al.*, 1991b; Har-El *et al.*, 1993). Celui-ci se protège de l'effet toxique de l'hème en le polymérisant et en l'associant à des protéines parasitaires pour former le pigment malarique ou hémozoïne grâce à l'hème polymérase (Slater et Cerami, 1992).

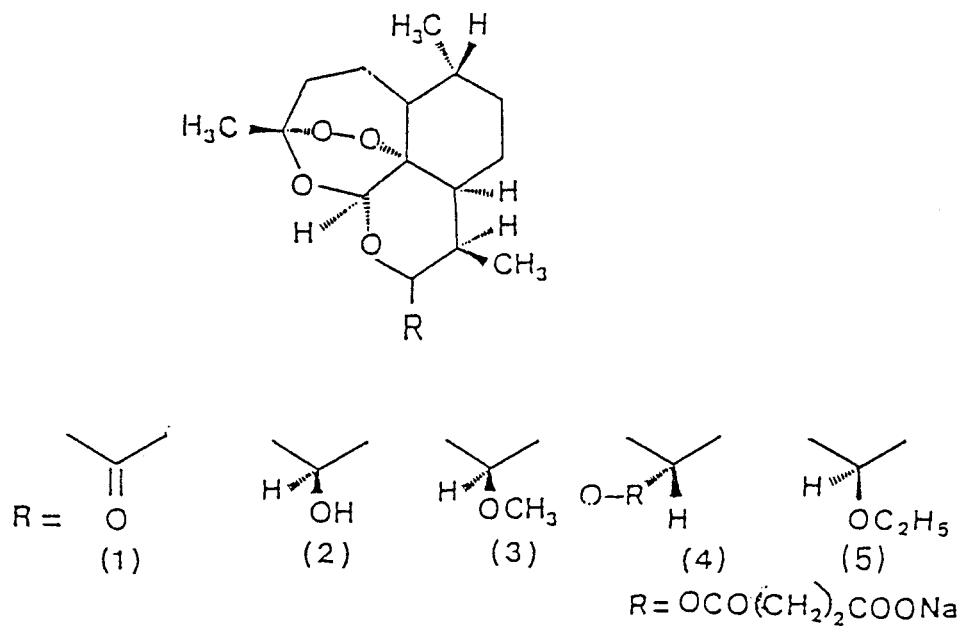
Certaines voies métaboliques du parasite créent également des E.A.O. La dihydro-orotate déshydrogénase mitochondriale libère des anions superoxydes lors de l'oxydation du dihydro-orotate en orotate au cours de la synthèse des bases pyrimidiques (Krungkrai, 1991). L'enzyme utilise l'ubiquinone comme accepteur d'électrons. Une L-amino-acide oxydase a été décrite chez *P. berghei* (Langer et Phisphumvidhi, 1971). Cette enzyme permet la désamination oxydative des aminoacides avec libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 1.2. Le système immunitaire de l'hôte.

L'infection par *Plasmodium* déclenche, de la part de l'hôte, une réponse immunitaire de type cellulaire et humorale. L'immunité humorale, stimulée par certains antigènes parasitaires libérés dans l'organisme, ne semble pas assurer une protection efficace.

L'implication des radicaux libres dans la destruction intraérythrocytaire des parasites a conduit certains auteurs à avancer l'hypothèse que les macrophages activés jouaient un rôle important dans la protection de l'hôte (Clark et Hunt, 1983; Dockrell et Playfair, 1984; Ockenhouse et Shear, 1984).

Lors de l'infection par *Plasmodium*, les cellules phagocytaires interviennent dans la



- 1 Qinghaosu (artémisinine)
- 2 Dihydro artémisinine (série  $\beta$ )
- 3 Artémèther (série  $\beta$ )
- 4 Artésunate (série  $\alpha$ )
- 5 Artéèther (série  $\beta$ )

Figure I.19: Structure de l'Artémisinine et de ses dérivés.

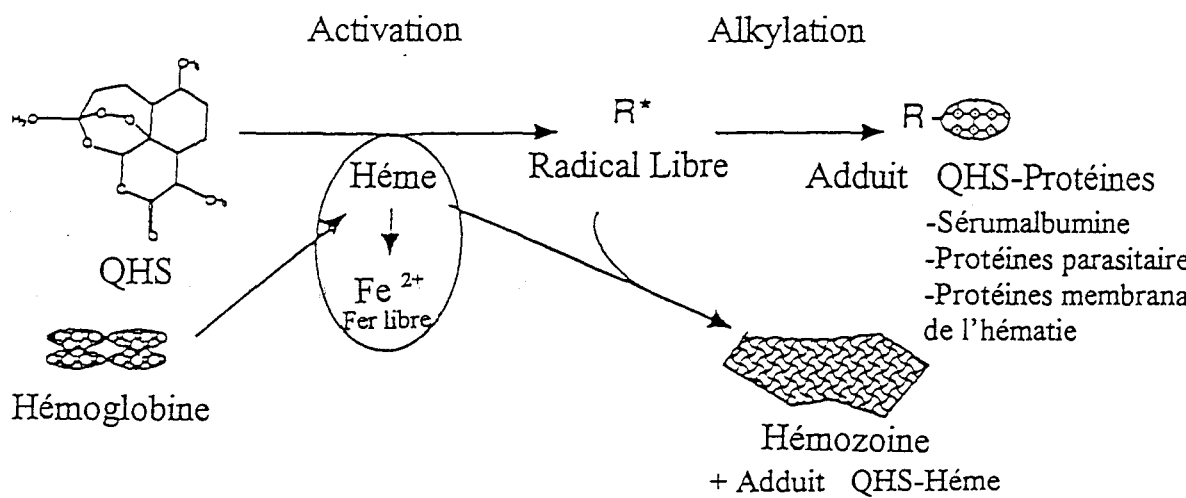
destruction des hématies parasitées et des mérozoïtes libres. Activées par des cytokines (Interféron  $\gamma$ , IFN  $\gamma$  ; Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF  $\alpha$  ; Interleukine 1, IL-1) ou par des protéines parasitaires, les cellules phagocytaires (macrophages et polynucléaires neutrophiles) vont phagocyter les hématies parasitées, produire des protéases et sécréter des radicaux nitrés et oxygénés toxiques pour le parasite. La libération d'une quantité importante d' $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$  et d' $HOCl$  fait partie de l'explosion respiratoire. Le pigment malarique induit les monocytes à libérer de fortes quantités de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (Pichyangkul *et al.*, 1994).

Une augmentation de la production des espèces activées de l'oxygène a été mise en évidence dans le sang de patients atteints par *P. falciparum* (Descamps-Latscha *et al.*, 1987) ainsi que chez des monocytes isolés de malades (Nielsen et Theander, 1989; Dubey *et al.*, 1991). Des études ont montré que des macrophages provenant de patients atteints par *P. falciparum* activés *in vitro* par l'IFN- $\gamma$  (Ockenhouse *et al.*, 1984) ou des endotoxines (Wozencraft *et al.*, 1984), produisent des radicaux libres pouvant détruire le parasite. L'ajout de catalase diminue la mortalité parasitaire (Ockenhouse *et al.*, 1984). L'effet direct de l'IFN- $\gamma$  sur les hématies parasitées est contradictoire (Jones *et al.*, 1989; Orago et Facer, 1993). Les macrophages activés par l'IFN- $\gamma$  entraînent *in vitro*, la dégénérescence de *P. falciparum* (Ockenhouse *et al.*, 1984). Le TNF- $\alpha$ , autre cytokine, pourrait avoir une action inhibitrice sur *P. falciparum in vitro* (Wozencraft *et al.*, 1984) seul ou *in vivo*, en synergie avec d'autres cytokines, par la libération de radicaux libres (Taverne *et al.*, 1987). Bien que le recombinant TNF- $\alpha$  soit actif *in vivo*, il n'a aucune activité *in vitro*, ce qui suggère qu'il n'a pas d'effet cytotoxique direct sur le parasite, mais doit activer d'autres cellules ou impliquer certaines molécules pour le détruire (Taverne *et al.*, 1987).

Les hématies infectées par *P. falciparum* provenant de sujets atteints d'hémoglobinopathies ou de déficience en G-6-PD sont plus sensibles à la phagocytose que les hématies normales (Yuthavong *et al.*, 1990).

### 1.3. Molécules antimalariques

La susceptibilité de *Plasmodium* au choc oxydant a ouvert de nouvelles perspectives pour la lutte contre le paludisme. De nouvelles molécules, issues de la pharmacopée traditionnelle chinoise, sont très prometteuses. C'est le cas du Qinghaosu ou artémisinine, extrait d'*Artemisia annua* et du Yingzhaosu, extrait d'*Artabotrys hexapetalus* et *A. uncinatus*. Ces composés sont des sesquiterpènes respectivement lactone et diol à partir desquels il a été possible d'obtenir des dérivés actifs comme l'artéether et l'artémether (Fig. I. 19). L'activité antimalarique de ces



**Figure I. 20:** Hypothèse du mécanisme d'action de l'artémisinine ou Qinghaosu (QHS). D'après Meshnick (1994).

molécules dépend de la présence dans la molécule d'un pont endoperoxyde, puisque des métabolites ayant perdu ce pont ne sont plus actifs (Gu *et al.*, 1980). Cette caractéristique suggère une action de type oxydant. La rapidité de leur action antimalarique (altération du parasite deux heures après son administration (Kawai *et al.*, 1993) rend ces molécules particulièrement intéressantes dans le cas des accès graves ou des accès pernecieux à *P. falciparum*. L'artémisinine et ses dérivés se sont montrés actifs contre les souches de *Plasmodium* résistantes à la chloroquine (Ye *et al.*, 1987). Cet endoperoxyde se concentre 300 fois plus dans les hématies parasitées par *P. falciparum* que dans les hématies saines (Gu *et al.*, 1984), et se localiserait dans la mitochondrie et la vacuole digestive du parasite (Maeno *et al.*, 1993). L'artémisinine a des effets toxiques sur les membranes parasitaires, affecte certaines activités enzymatiques comme la synthèse protéique et les acides nucléiques (Vennerstrom et Eaton, 1988; Woerdenbag *et al.*, 1990) et induit une prolifération des membranes (Maeno *et al.*, 1993). En effet, l'action de l'artémisinine est potentialisée par une élévation de la tension en oxygène, par l'addition de composés oxydants comme la doxorubicine (Krungkrai et Yuthavong, 1987) et les flavones (Elford *et al.*, 1987). L'activité est atténuée en présence d'agents antioxydants comme le dithiothréitol, l' $\alpha$ -tocophérol et la catalase (Krungkrai et Yuthavong, 1987). L'hème, localisé dans la vacuole digestive du parasite, catalyserait la formation d'un radical à partir de l'artémisinine et d'un adduit (Zhang *et al.*, 1992b). Celui-ci serait formé par la liaison entre la molécule d'artémisinine avec l'hème (Meshnick *et al.*, 1991). Le radical formé donne ensuite des adduits avec des protéines parasitaires (Asawamahasakda *et al.*, 1994a), des protéines membranaires de l'hématie (Asawamahasakda *et al.*, 1994b) et avec la sérumalbumine (Yang *et al.*, 1993). L'activité serait potentialisée par la présence de fer libre (Kamchonwongpaisan *et al.*, 1992) fourni par l'hème (Meshnick *et al.*, 1993) (Fig. I. 20).

La diminution de la sensibilité aux endoperoxydes a été signalée sur des isolats de *P. falciparum* provenant de l'Asie du Sud-Est, dans des régions où l'utilisation de ces molécules est importante (Gay *et al.*, 1993). Inselburg (1985) a isolé, par mutagènes, cinq mutants de *P. falciparum* moins sensibles à l'artémisinine. Des mutants ont été également obtenus chez des *Plasmodium* murins.

#### 1.4. Modifications oxydatives de l'hématie induites par le parasite

La sensibilité au stress oxydatif des hématies parasitées correspond à la production par le parasite d'oxydants mais aussi à la diminution des moyens de défense enzymatique de la cellule



hôte. En effet, le parasite, en internalisant le contenu de l'hématie, provoque la dégradation de l'hémoglobine mais peut aussi dégrader les enzymes de défense antioxydantes (SOD, GPx et catalase). Cette diminution du système de défense de l'hématie parasitée ne fait que renforcer sa sensibilité à l'oxydation. Ainsi, la lipoperoxydation (augmentation de malondialdéhyde) est signalée *in vivo* dans les membranes des hématies parasitées par *P. vinckei* (Buffinton *et al.*, 1988; Stocker *et al.*, 1985) ou *P. berghei* (Nair *et al.* 1984), mais aussi *in vitro* chez *P. falciparum*, c'est-à-dire en dehors de toute influence du système immunitaire pouvant créer des radicaux libres (Wozencraft, 1986). Cette lipoperoxydation est très nette au stade schizonte (Mohan *et al.*, 1992). Les produits issus de la lipoperoxydation présentent une demi-vie plus longue que les radicaux oxygénés. Ils peuvent agir à distance de leur source de production (Pré, 1991) et conduire à la mort du parasite (Clark *et al.*, 1987; Buffinton *et al.*, 1988). La croissance de *P. falciparum* cultivé en présence de sérum de lapin sensibilisé par des endotoxines est inhibée par les peroxydes lipidiques issus des lipoprotéines du sérum (Rockett *et al.*, 1988). Ainsi, le parasite, lors de son développement, rend l'hématie hôte de plus en plus sensible à l'hémolyse (Mohan *et al.*, 1992). Les hématies saines exposées aux produits parasitaires sont elles même altérées (Mohan *et al.*, 1994). Ainsi, chez des patients impaludés par *P. falciparum*, la destruction des hématies au cours du cycle intaérythrocytaire du parasite ne rend pas compte totalement de l'anémie observée (Mohan *et al.*, 1994).

La membrane de l'hématie parasitée par *P. falciparum* au stade âgé montre une diminution de la teneur en cholestérol (Maguire et Sherman, 1990), ainsi qu'une diminution des acides gras polyinsaturés notamment l'acide arachidonique (20:4) (Hsiao *et al.*, 1991).

Le contenu en vitamine E des hématies parasitées augmente graduellement avec le développement des parasites, qu'il s'agisse d'hématies parasitées par *P. falciparum* (Mohan *et al.*, 1994) ou par *P. vinckei* (Stocker *et al.*, 1985; Stocker *et al.*, 1986a). Cette augmentation se produit également dans les hématies non parasitées chez les souris impaludées (Stocker *et al.*, 1985). Cette dernière observation peut être interprétée comme une réponse de l'organisme au stress oxydant de l'hôte, puisqu'une injection intraveineuse de divicine, composé générant un stress oxydant, entraîne le même résultat (Stocker *et al.*, 1986a). La vitamine E est retrouvée dans les membranes de l'hématie plutôt que dans celles du parasite (Stocker *et al.*, 1985) et protège l'hématie parasitée de la lipoperoxydation et de l'hémolyse. Le parasite semble plus vulnérable que l'hématie hôte, puisque des générateurs de radicaux libres induisent l'apparition de formes parasitaires dégénérées dans des globules rouges apparemment non oxydés (Clark *et al.*, 1984a;

Ockenhouse *et al.*, 1984). Une déficience en vitamine E confère une plus grande sensibilité des hématies aux oxydants et apporte une protection à l'hôte vis-à-vis du parasite (Eaton *et al.*, 1976).

L'alpha-tocophérolquinone, produit d'oxydation de la vitamine E, n'est pas retrouvée dans les hématies de souris infestées (Stocker *et al.*, 1986a); les autres composés de la dégradation n'ont pas été étudiés. La vitamine C est capable de réduire la vitamine E. Le contenu en acide ascorbique de l'hématie parasitée par *P. vinckei* à un stade avancé de développement est 6 fois plus élevé que celui de l'hématie saine. Il n'est toutefois pas exclu que le parasite synthétise ce composé. De plus, il est suggéré que l'hématie parasitée possède une perméabilité plus importante pour le deshydroascorbate qu'une hématie saine (Stocker *et al.*, 1986b) ainsi qu'une grande capacité à réduire ce produit en acide ascorbique par l'intermédiaire du GSH. La vitamine E pourrait donc être protégée de l'oxydation, dans les hématies parasitées par *P. vinckei*, du fait de son contenu accru en vitamine C réduite (Stocker *et al.*, 1986a). En plus de ses effets indirects, l'acide ascorbique exerce une action antioxydante en piégeant des radicaux peroxydes ou alkoxydes.

Bien que l'activité de la mét-Hb réductase diminue en fonction de la charge parasitaire (Stocker *et al.*, 1985), le contenu des hématies parasitées en méthémoglobine n'est pas augmenté par rapport aux hématies saines (Stocker *et al.*, 1985; Hempelmann *et al.*, 1987).

L'action du parasite se développant chez l'hôte a un retentissement non seulement sur les hématies saines et sur les tissus (Garnham, 1987) mais aussi sur le plasma. Riche en composés antioxydants (albumine, vitamine C, ceruloplasmine, acide urique, glucose, transferrine, haptoglobine/hemopexine) (Halliwell et Gutteridge, 1990), le plasma est peu sensible au stress oxydant. Toutefois, on peut observer une lipoperoxydation plasmatique proportionnelle à la sévérité de la maladie chez des patients atteints par *P. falciparum* et une variation de la concentration des composés antioxydants (Das *et al.*, 1993). Le plasma de patients impaludés contient des prooxydants comme l'hémoglobine provenant de l'éclatement des hématies parasitées par des schizontes (Das et Thurnham, 1992). L'hémolyse globale observée est supérieure à celle dépendant de la parasitémie. L'hémolyse et la lipoperoxydation, en submergeant les défenses antioxydatives de l'organisme, entraînent alors des conséquences qui dépassent le cadre strict de la phase érythrocytaire du paludisme. De même, lors de la phase hépatique, Srivastava *et al.*, (1992) ont montré une élévation du stress oxydant chez les singes infectés par *P. knowlesi* avec une augmentation de la lipoperoxydation et une diminution concomitante des systèmes enzymatiques de défense.

## 2. SENSIBILITE DE *PLASMODIUM* AU STRESS OXYDANT

### 2.1. Données épidémiologiques et expérimentation *in vivo*.

Des études épidémiologiques ont permis de suggérer que des porteurs d'hémoglobinopathies telles que la drépanocytose, la thalassémie, la persistance de l'hémoglobine foetale (Hb F), ainsi que la déficience en G-6-PD de l'hématie, conféraient une protection contre les formes létales d'infection à *P. falciparum*. Le paludisme pourrait avoir favorisé, par pression de sélection, l'émergence de ces mutations. En effet, ces variants génétiques coïncident géographiquement avec les régions endémiques pour *P. falciparum* (Haldane, 1949). Pour chacune de ces mutations, le globule rouge subit un stress oxydant supérieur à celui des cellules normales (Golenser et Chevion, 1989).

Des hémoglobines anormales présentes dans les hématies s'auto-oxydent plus rapidement que les hémoglobines normales, processus générant de l'anion superoxyde (Misra et Fridovich, 1972). Dans le cas de la thalassémie, on peut observer également une quantité importante d'hème libre provenant de la dégradation des chaînes d'hémoglobine non appariées. Cet hème serait à l'origine de la formation de nombreux radicaux libres (Winterboum, 1990). Les résultats concernant les systèmes antioxydants des hématies sont contradictoires. Dans le cas de la drépanocytose, on observe une chute de la GPx, de la catalase et de l' $\alpha$ -tocophérol (Vennerstrom et Eaton, 1988) alors que dans le cas de la  $\beta$ -thalassémie, c'est au contraire une élévation de l'activité des enzymes antioxydantes qui est observée (Gerli *et al.*, 1980; Beutler *et al.*, 1977). Le glutathion a un rôle essentiel dans la protection de l'hématie contre le choc oxydatif. Sa régénération sous forme réduite demande du NADPH, fourni par la voie des pentoses monophosphates, cela principalement par la glucose-6-phosphate deshydrogénase. Une déficience en cette enzyme, rend les hématies sensibles à l'oxydation et aux métabolites issus de la fève *Vicia faba* (divicine, isouramil).

Les lignées de souris mutantes ou transgéniques portant des hémoglobinopathies constitue des modèles expérimentaux pour vérifier l'hypothèse de la protection apportée par ces maladies contre le paludisme (Shear, 1993). Si le stress oxydant est l'une des causes évoquées dans la protection, d'autres anomalies fréquemment présentées tel le déficit en spectrine dans le cas de la  $\beta$ -thalassémie, pourraient rendre compte des résultats observés : les souris porteuses d'hémoglobinopathies sont moins sensibles à certaines souches murines. Il faut constater enfin que la plupart des expériences ont été réalisées dans des conditions de primo infection, c'est à dire

par transfert mécanique d'hématies saines parasitées à des souris porteuses d'hémoglobinopathies. Parfois même, le rongeur fournissant les parasites était d'une espèce différente (hamster). Dans ces conditions, une protection due uniquement à la nécessité d'une adaptation par le parasite a pu être observée.

La vérification de l'effet protecteur des hémoglobinopathies a été tentée sur des cultures de *P. falciparum* réalisées avec des hématies anormales. Des résultats contradictoires ont été observés. Certains attribuent l'absence de protection observée *in vitro* à la composition du milieu et travaillent en milieu appauvri (Brockelman *et al.*, 1987). D'autres ont pu acclimater *P. falciparum* sur des hématies porteuses d'hémoglobinopathies (Nagel et Roth, 1989). Dans le cas d'une carence en G-6-PD, Usanga et Luzzato (1985) ont montré que le parasite était alors capable d'exprimer une G-6-PD endogène. Néanmoins, les parasites ainsi cultivés sont plus sensibles au choc oxydant que ceux cultivés dans des hématies normales (Golenser *et al.*, 1991a).

En définitive, l'effet protecteur des hémoglobinopathies vis à vis de *P. falciparum* se manifesterait principalement par une fréquence significative moins grande des accès pernicieux chez les malades porteurs d'hémoglobinopathies pour une morbidité identique du paludisme (Gendrel *et al.*, 1992). La cause peut être multifocale et peut faire intervenir des phénomènes immunitaires n'ayant aucune relation avec un stress oxydatif.

## 2.2. Action de l'oxygène et des oxydants *in vivo* et *in vitro*

*Plasmodium* montre une sensibilité importante face à l'oxygène. Sa croissance en culture est optimale en présence de 0,5 à 5 % d'oxygène alors qu'elle est inhibée en présence de 21% d'oxygène (Clark *et al.*, 1989). Il est toutefois possible de cultiver *P. falciparum* en présence de 17 % d'oxygène (Trager, 1994; Le Bras communication personnelle). Lors de cultures directes réalisées à partir de prélèvements sur des malades, les parasites semblent se développer plus facilement en présence de basses tensions en oxygène (Trager, 1994) mais il n'est pas sûr que ce soit exactement les mêmes souches qui se développent dans les deux conditions différentes de culture.

Chez des souris impaludées, l'injection d'alloxane, de divicine ou de dérivés de peroxydes, connus pour être des générateurs de radicaux libres, provoque une réduction de la parasitémie (Clark et Hunt, 1983; Clark *et al.*, 1984a; Clark *et al.*, 1984b). Une concentration micromolaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est létale *in vivo*, pour *P. vinckei* (Clark et Hunt, 1983), *P. yoelii* et pour *P. chabaudi* (Dockrell et Playfair, 1983). La desferrioxamine, agent chélatant du fer, est un antagoniste de ces

composés, ce qui implique le radical hydroxyle produit lors de la réaction de Fenton. Des souris carencées en vitamine E, deviennent résistantes contre *P. berghei* et *P. yoelii* (Eaton *et al.*, 1976; Hunt et Stocker, 1990). A l'inverse, une supplémentation restaure la virulence.

Toutes les molécules oxydantes déjà citées (divicine, isouramil, alloxane, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont toxiques *in vitro* pour *Plasmodium* (Clark *et al.*, 1989). Les systèmes générateurs d'anion superoxyde (xanthine/xanthine oxydase) ou le peroxyde d'hydrogène (glucose/glucose oxydase) ont le même effet (Dockrell et Playfair, 1984; Wozencraft *et al.*, 1984). L'addition de catalase empêche cette inhibition de croissance, impliquant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans cette réaction.

Une déficience en riboflavine réduit la croissance de *Plasmodium in vivo* et *in vitro* (Hunt et Stocker, 1990). La cause serait une diminution de la concentration du glutathion réduit dans les hématies, diminuant ainsi l'activité de la glutathion réductase (Vennerstrom et Eaton, 1988).

### 3. SYSTEME DE DEFENSE DE *PLASMODIUM* CONTRE LE STRESS OXYDANT

Le système enzymatique antioxydant présent chez *Plasmodium* n'est pas encore bien défini. On a considéré pendant longtemps que *Plasmodium* n'avait pas de système propre et utilisait le système de défense de l'hématie hôte pour sa propre protection. Des résultats récents ont montré qu'en fait, le parasite possède un équipement lui permettant de détruire les espèces activées de l'oxygène. Nous allons présenter ce qui est admis dans la littérature au sujet des systèmes enzymatiques de défense de *Plasmodium*.

#### 3.1. La Superoxyde dismutase (SOD)

Les dosages enzymatiques ont souvent été effectués par comparaison entre hématies saines et parasitées. Si des études ont montré une diminution de l'activité SOD globale en fonction de la charge parasitaire chez *P. vinckei* (Stocker *et al.*, 1985) et *P. berghei* (Nair *et al.*, 1984; Fairfield *et al.*, 1983), l'activité reste inchangée dans les hématies parasitées par *P. falciparum* (Wozencraft, 1986; Areekul *et al.*, 1988). Sur la base de ces études, aucune SOD endogène n'a pu être mise en évidence. Lors de dosages d'extraits parasitaires, une activité SOD présentant les mêmes caractéristiques que celle de la cellule hôte a été retrouvée chez *P. berghei* (Fairfield *et al.*, 1983) mais également chez les formes âgées de *P. falciparum* (Fairfield *et al.*, 1988). Par fractionnement cellulaire d'un extrait de *P. berghei*, l'activité SOD de la cellule hôte cosédimente avec les enzymes responsables de la dégradation de l'hémoglobine, ce qui la localiserait au niveau des

vésicules digestives (Fairfield *et al.*, 1986; 1988). Dans ce cas, l'enzyme adoptée serait résistante à la digestion et protégerait le parasite de l'anion superoxyde libéré lors de la digestion de l'hémoglobine. On peut s'interroger sur le rôle réel de cette enzyme dans la vacuole digestive, puisque le pH acide de ce compartiment permet la dismutation rapide de  $O_2^{\circ-}$  en  $H_2O_2$ .

Une SOD endogène se différenciant de celle de la cellule hôte par son point isoélectrique (pI 6.8 contre pI 5 de l'hématie) et sa résistance au KCN a été mise en évidence chez *P. falciparum* dans les formes parasitaires âgées (Fairfield *et al.*, 1988). Sur la base de l'action d'inhibiteurs spécifiques, cette activité proviendrait d'une SOD à manganèse, typique des mitochondries (Ranz et Meshnick, 1989). Des travaux récents au laboratoire ont également montré l'existence d'une SOD endogène chez *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. vinckei* (Bécuwe *et al.*, 1993), *P. falciparum* (Bécuwe *et al.*, 1995) mais également chez *Babesia divergens* et *B. hylomisci* (Bécuwe *et al.*, 1992). Dans tous les cas, le métal cofacteur, sur la base de l'action des inhibiteurs spécifiques, serait le fer. La purification et le microséquençage N-terminal de la SOD de *B. hylomisci* (Bécuwe *et al.*, 1994) et le séquençage de l'ADNc de la SOD de *P. falciparum* (Bécuwe *et al.*, 1995) ont confirmé la nature Fer-dépendante de ces enzymes.

### 3.2. La catalase.

L'activité catalase globale mesurée dans les hématies parasitées chute avec la charge parasitaire pour *P. berghei* (Seth *et al.*, 1985; Areekul et Bonme, 1992; Nair *et al.*, 1984) et pour *P. vinckei* (Stocker *et al.*, 1985) mais reste identique pour *P. falciparum* (Wozencraft, 1986; Areekul *et al.*, 1988). Aucune activité dépassant le seuil de contamination potentiel n'a été détectée dans les extraits de *P. berghei* (Areekul et Bonme, 1992; Fairfield *et al.*, 1986). L'enzyme de l'hématie serait ainsi, soit dégradée dans la vacuole digestive en même temps que l'hémoglobine, contrairement à la SOD de l'hôte (Stocker *et al.*, 1985; Fairfield *et al.*, 1986), soit inactivée par une production trop importante d' $H_2O_2$  (Areekul et Bonme, 1992) ou par l'anion superoxyde produit lors de la division du parasite (Seth *et al.*, 1985). Les dosages effectués sur des extraits parasitaires de *P. falciparum* au stade jeune ou âgé ont montré la présence d'une activité catalasique mais aucune preuve n'a été apportée quant à l'origine endogène de cette enzyme (Fairfield *et al.*, 1988; Atamna et Ginsburg, 1993).

### 3.3. Les enzymes liées au glutathion.

#### 3.3.1. La Glutathion Peroxydase (GPx).

Une activité GPx a été détectée chez *P. berghei* (Seth *et al.*, 1985) et chez les formes âgées de *P. falciparum* (Fairfield *et al.*, 1988). Cette enzyme serait séléno-indépendante (Fritsch *et al.*, 1987), présenterait une faible affinité pour l'eau oxygénée et utiliserait, comme substrat privilégié, les hydroperoxydes organiques tel l'hydroperoxyde de cumène.

Le parasite n'utilise pas la GPx séléno-dépendante de l'hôte dans sa protection, puisque des souris carencées en sélénium ne sont pas protégées contre *P. berghei* et *P. vinckei* (Fritsch *et al.*, 1987).

Des travaux récents au laboratoire ont démontré l'existence d'une GPx séléno-dépendante chez *P. falciparum* (Gamain *et al.*, sous presse). La protéine présente des homologies importantes avec les hydroperoxydes glutathion peroxydases (HPGPx) (peroxydase d'Ursini).

#### 3.3.2. La glutathion réductase

Eckman et Eaton (1979) ont montré, chez *P. berghei*, la présence d'une activité enzymatique présentant une migration différente de celle de l'hôte sur gel d'agarose. Hempelmann *et al.*, (1987) n'excluent pas la possibilité que l'enzyme de l'hématie puisse être stockée par *P. falciparum*. Müller *et al.*, (1995) ont cloné le gène de la glutathion réductase de *P. falciparum*. La séquence protéique déduite montre 40% d'homologie avec l'enzyme humaine et présente de nombreux acides aminés identiques, impliqués dans la fonction enzymatique.

#### 3.3.3. Le glutathion

Le rôle du glutathion réduit dans la protection de l'hématie a été le sujet de nombreux travaux. Le contenu en GSH augmente parallèlement à la charge parasitaire dans des souris infectées par *P. vinckei* (Stocker *et al.*, 1985) et *P. berghei* (Seth *et al.*, 1985; Nair *et al.*, 1984). De plus, il semble qu'une fraction soit associée au parasite lui-même (Stocker *et al.*, 1985; Eckman et Eaton, 1979). La même observation a été faite dans les hématies parasitées par *P. falciparum* essentiellement au stade schizonte (Mohan *et al.*, 1992; 1994). Roth *et al.*, (1982) n'observent pas, chez *P. falciparum*, cette augmentation du contenu en GSH de l'hématie parasitée, mais une plus grande stabilité de ce composé face à un stress oxydant corrélée à une augmentation de l'activité de la voie des hexoses monophosphates. Zhang *et al.*, (1988a; b) ont montré que la croissance de *P. falciparum in vitro* est dépendante de la teneur cellulaire en GSH

réduit. En effet, l'inhibition de la glutathion réductase dans des hématies saines ou parasitées diminue fortement la croissance, qui est restaurée par l'ajout de GSH.

#### 3.3.4. Enzymes impliquées dans la régénération du NADPH

Le NADPH est impliqué dans la régénération du GSH, mais également dans les processus de biosynthèse. Le parasite, dont la croissance est rapide, nécessite pour sa protection contre le stress oxydant une quantité importante de NADPH réduit. Actuellement, on connaît chez *P. falciparum* trois enzymes permettant la production de NADPH. La première, la glutamate déshydrogénase (GDH) (Walter *et al.*, 1974; Langer *et al.*, 1970; Sherman *et al.*, 1971; Roth *et al.*, 1982; Vander Jagt *et al.*, 1989), absente dans l'hématie et dont l'expression est constante au cours du cycle cellulaire chez *P. falciparum* (Vander Jagt *et al.*, 1989). La seconde est l'isocitrate déshydrogénase (IDH) (Sahni *et al.*, 1992; Vander Jagt *et al.*, 1989), dont l'expression augmente au cours du cycle cellulaire chez *P. falciparum* (Vander Jagt *et al.*, 1989). Elle existe en moindre quantité dans la cellule hôte. La part de l'IDH est beaucoup plus importante que celle de la GDH dans la réduction du NADP<sup>+</sup>. Une troisième enzyme, la G-6-PD de *P. falciparum* a été caractérisée (Kurdi-Haidar et Luzzatto, 1990) et séquencée (O'Brien *et al.*, 1994). Cette enzyme est induite lors de la croissance de *P. falciparum* dans des hématies déficientes en G-6-PD (Usanga et Luzzatto, 1985). Elle montre ainsi l'adaptation du parasite face au stress oxydant.

#### 3.4. Autres systèmes de protection

A côté de son système enzymatique de défense, *Plasmodium* possède un autre moyen de se protéger des espèces radicalaires. Les hématies parasitées peuvent former des rosettes, constituées d'un amas d'hématies parasitées entourées par des hématies saines. Cette formation pourrait être une échappatoire aux radicaux libres produits par les phagocytes. En effet, il est nécessaire qu'un contact étroit entre la cellule parasitée et les polynucléaires existe pour affecter le développement de *P. falciparum* (Golenser *et al.*, 1991a). Puisque ces E.A.O. sont hautement réactives et que leur durée de vie est très courte, leur effet est localisé à leur site de formation. Ainsi, la formation en rosette protégerait les hématies parasitées des effets destructeurs des E.A.O.

Les hématies, riches en éléments de défenses antioxydantes, peuvent protéger le parasite lors d'un choc oxydant (Golenser *et al.*, 1991a). Ainsi, les mérozoïtes envahissent



préférentiellement les hématies jeunes et normales (Mons, 1990). De plus, certains éléments de défense, internalisés par le parasite, lui sont bénéfiques lors de sa croissance tels que le NADPH et le GSH.

## CONCLUSION DES GENERALITES

Au cours de son développement dans l'organisme de son hôte, *Plasmodium* est exposé à des E.A.O. d'origine à la fois exogène et endogène, qui peuvent amener la mort du parasite par des lésions multiples des constituants cellulaires. Si tous les organismes possèdent des systèmes enzymatiques de défense contre les E.A.O., celui de *Plasmodium* reste encore très mal défini. La caractérisation au laboratoire, d'une SOD endogène chez ce parasite a posé immédiatement le problème de l'existence d'enzymes capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène. La glutathion peroxydase récemment mise en évidence par Gamain *et al.*, (sous presse) au laboratoire est une enzyme plus spécifique des hydroperoxydes d'acides gras (HPGPX d'Ursini). L'existence d'une catalase endogène au parasite devait donc être impérativement recherchée. Un tel travail s'avérait difficile, par le fait que l'extrait parasitaire est toujours contaminé par les enzymes de l'hôte, par les types multiples d'enzyme existants, par la complexité des gènes et par la présence de nombreuses isoformes de la protéine.

Nous avons abordé la recherche de la catalase endogène de *Plasmodium falciparum* par deux approches simultanées, en biochimie et en biologie moléculaire. Nous avons également recherché cette enzyme chez *Babesia*, qui n'internalise pas le contenu de l'hématie au cours de son développement.

En parallèle, nous avons étudié le devenir de la catalase internalisée dans la vésicule digestive de *Plasmodium*, afin de pouvoir préciser son rôle dans la protection éventuelle du parasite contre le choc oxydant.

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

**CHAPITRE I :**  
**ETUDE DES ACTIVITES CATALASIQUES GLOBALES**  
**PRESENTEES DANS LES EXTRAITS PARASITAIRES**

**1. MESURES DES ACTIVITES CATALASIQUES GLOBALES.**

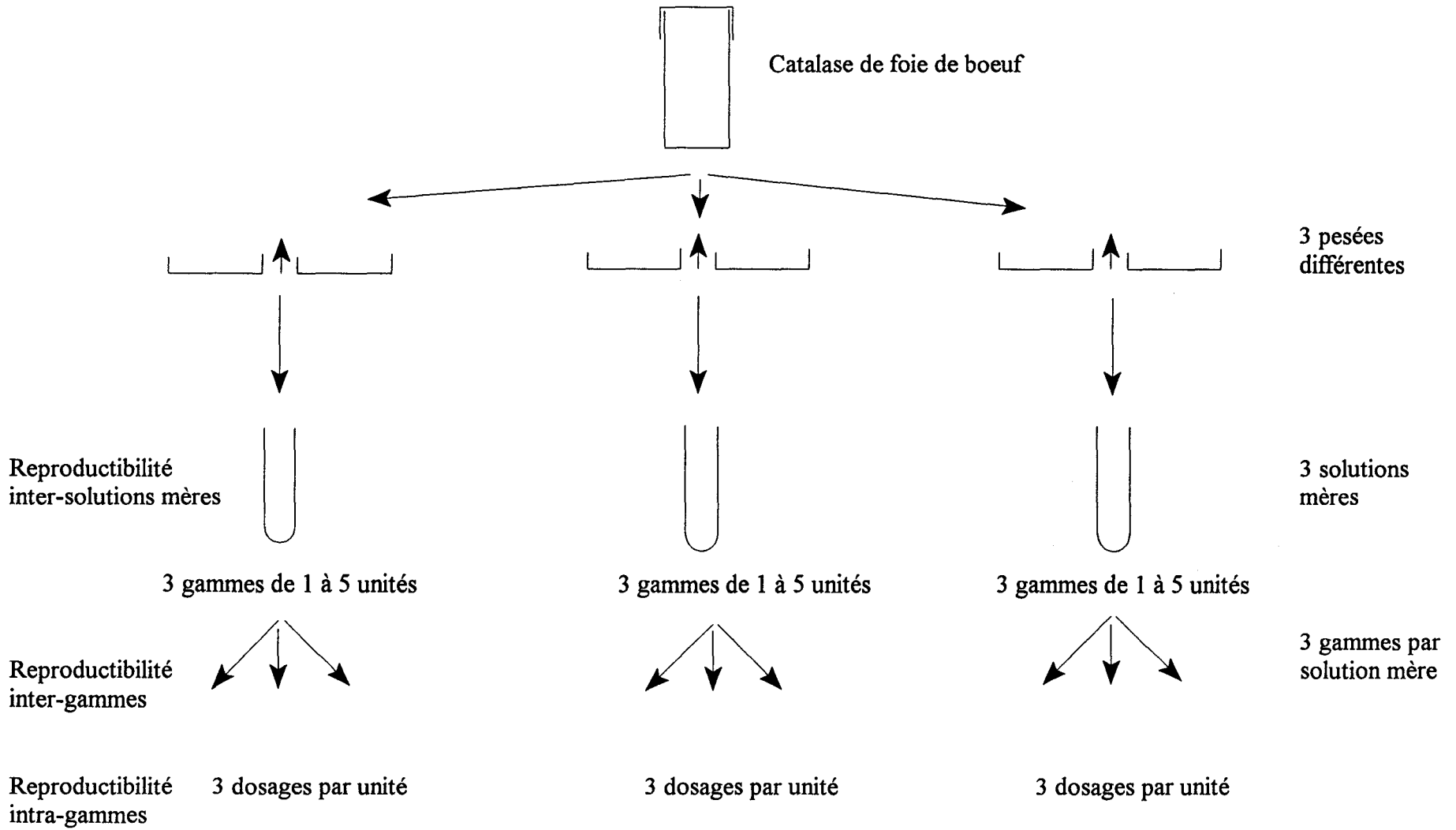
**1.1. Mise au point méthodologique.**

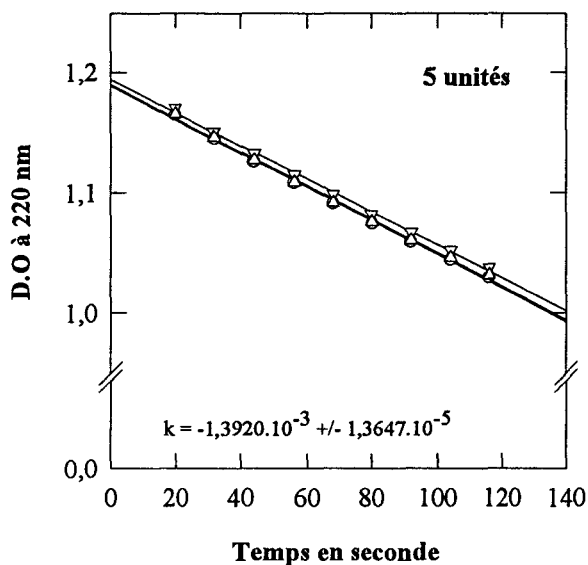
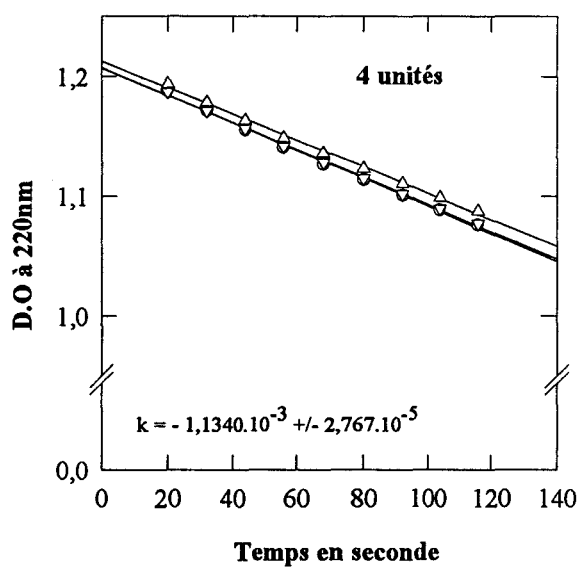
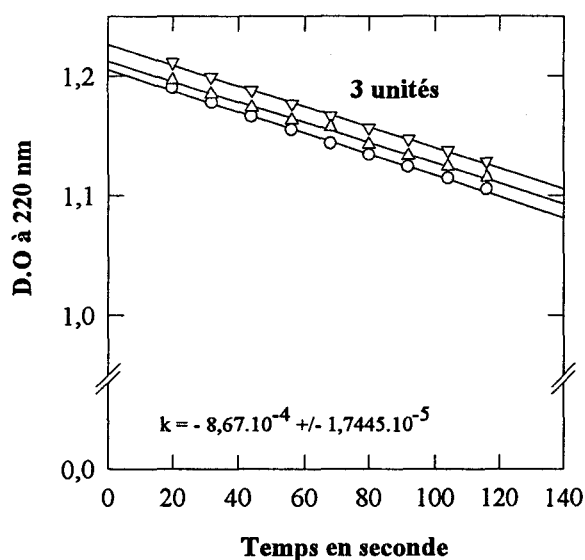
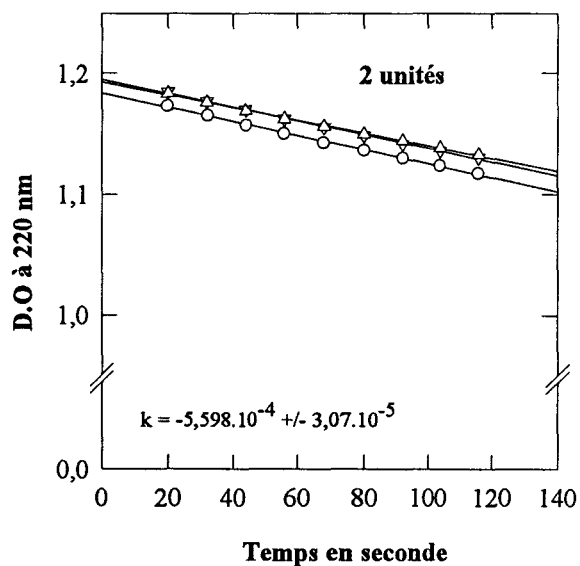
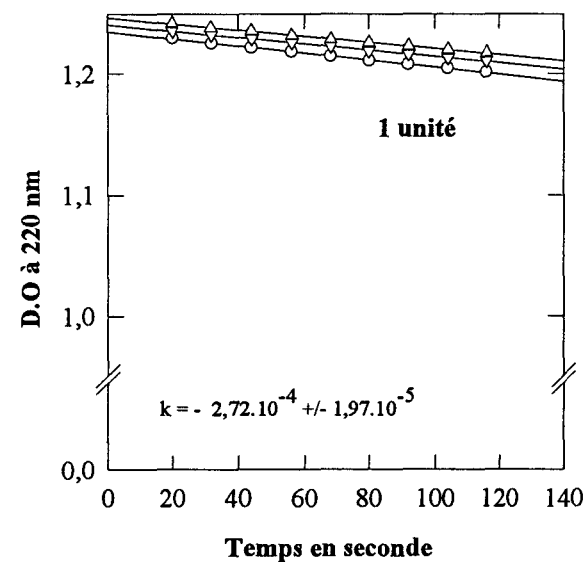
Deux méthodes de dosage spectrophotométrique ont été testées: la première mesurant directement la quantité d' $H_2O_2$  utilisée comme substrat (Beers et Sizer, 1952), la seconde utilisant comme substrat le trihydrate-monoperoxyhydrate de metaborate de sodium  $NaBO_2 \cdot 3H_2O$ ,  $H_2O_2$  (perborate de sodium, Thomson *et al.*, 1978). La catalase de foie de boeuf a été choisie pour réaliser ces essais. La méthode au perborate a donné des résultats plus stables lors des essais préliminaires. Nous avons examiné les conditions optimales du dosage et sa reproductibilité selon le protocole de la **figure II. 1**. Des exemples de courbes de consommation du perborate en présence de 1 à 5 unités (U) de catalase sont donnés dans la **figure II. 2**. La relation entre vitesse de consommation (K) et activité est donnée dans la **figure II. 3**.

Les résultats montrent que la disparition du perborate reste très proche d'une fonction linéaire entre 1 et 4 U et perd sa linéarité pour 5 U de catalase (**Fig.I I. 2**). La relation entre constante de vitesse et activité est une droite pour les activités comprises entre de 1 à 4 U. Nous avons étudié la reproductibilité obtenue pour chaque concentration en catalase (1 à 5 U), en examinant la dispersion des trois répétitions obtenues pour chaque concentration (3 gammes x 3 répétitions = 9 valeurs de coefficient de dispersion). Le **tableau II. 1** montre que la précision de la mesure augmente avec l'activité mesurée. La linéarité de la réponse n'étant plus assurée au delà de 4U, il est important de travailler sur des échantillons présentant une activité voisine de 3-4 U. Dans ces conditions, la reproductibilité des dosages est donnée dans le **tableau II. 2**.

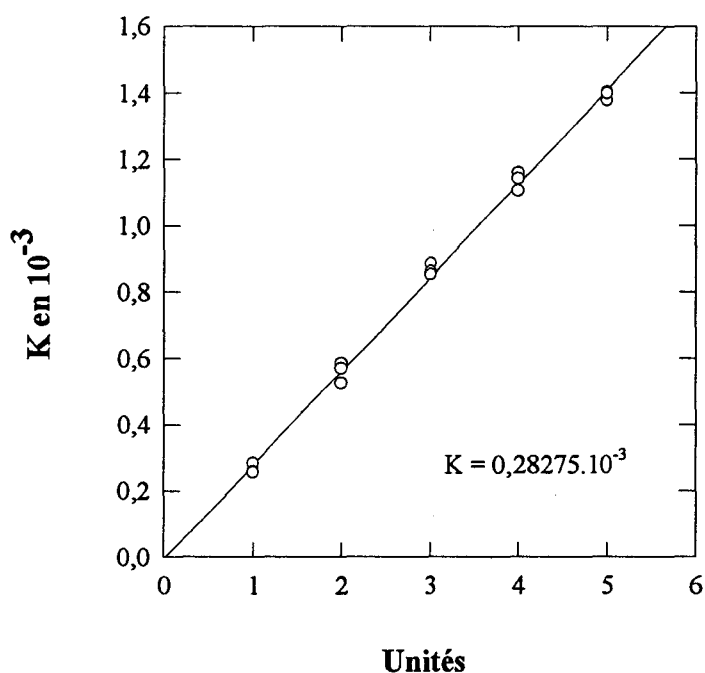
Nous avons également testé la stabilité de la solution de perborate en fonction du temps. La **figure. II. 4** montre une bonne stabilité de cette solution au moins pendant quatre jours. Au bout de huit jours, on observe une chute de 6% de l'activité. Les dosages effectués par la suite ont été réalisés avec une solution de perborate préparée extemporanément.

**Figure II.1:** Protocole opératoire suivi lors de la mise au point méthodologique du dosage de la catalase par le perborate de sodium

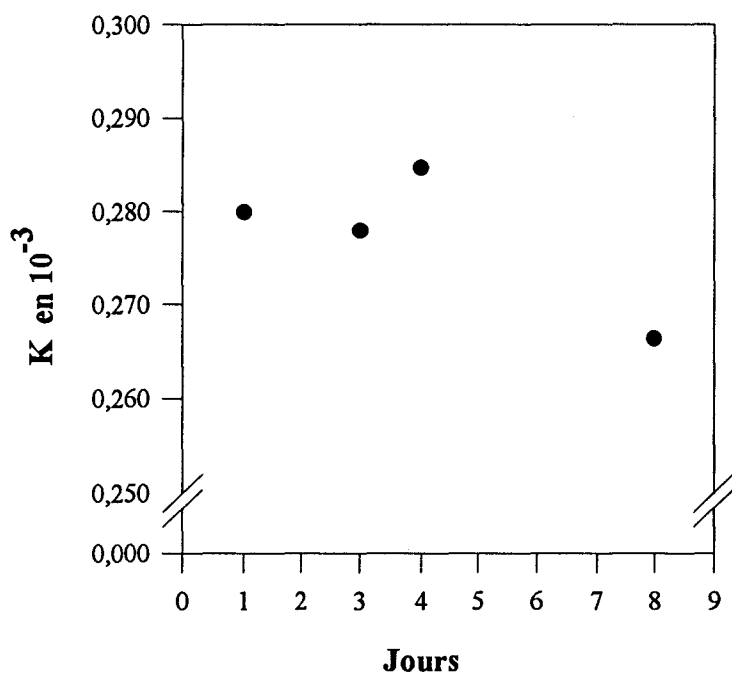




**Figure II. 2:** Gamme d'activité de la catalase de foie de boeuf utilisant le perborate de sodium comme substrat. Les dosages ont été réalisés en triple exemplaires pour chaque unité. La moyenne des pentes correspondante à chaque unité est indiquée.



**Figure II. 3:** Relation entre vitesse de consommation du substrat et activité enzymatique de la catalase de foie de boeuf. Les valeurs représentées correspondent aux pentes de la figure I. 2. A chaque unité correspond 3 valeurs de pente.



**Figure II. 4:** Stabilité de la solution de perborate. Chaque point correspond à la moyenne de deux pentes ( $k$ ) issus des dosages de deux gammes enzymatique effectuées de 1 à 5U de catal de foie de boeuf avec la même solution de perborate de sodium.

	1 U	2 U	3 U	4 U	5 U
Moyenne	5,82	4,05	2,09	2,40	1,75
Ecart-type	2,15	1,56	0,98	1,27	0,62
n	9	9	9	9	9

**Tableau II. 1:** Coefficient de dispersion moyen obtenu sur les pentes calculées en présence de 1 à 5 U de catalase de foie de boeuf.

Coefficient de dispersion =  $100 \times (\text{moyenne}/\text{écart-type})$ . Moyenne obtenue sur les trois pentes mesurées; écart-type sur la moyenne des trois pentes.

	Moyenne	Ecart-type	n
Reproductibilité entre les pesées	0,269	0,013	3
Reproductibilité entre les gammes d'une même pesée			
Pesée 1	0,27235	0,00961	3
Pesée 2	0,28028	0,00785	3
Pesée 3	0,25436	0,0443	3

**Tableau II. 2:** Reproductibilité du dosage de la catalase par le perborate de sodium. Les valeurs correspondent aux pentes des gammes enzymatiques effectuées en triple exemplaires pour chaque pesée de catalase de foie de boeuf.



## 1.2. Problèmes posés par le dosage de la catalase dans les extraits parasitaires.

Au cours de son développement dans l'hématie, *Plasmodium* internalise le contenu de sa cellule-hôte. Celle-ci est très riche en catalase (321 et 54 U/mg d'hémoglobine respectivement chez l'homme et la souris selon Guemouri *et al.*, 1991; Kuruta *et al.*, 1993). L'enzyme qui reste emprisonnée à l'état résiduel dans les fantômes d'hématies ou dans le système digestif du parasite peut apporter des contaminations importantes dans les extraits. Il est possible d'éliminer presque totalement la catalase présente dans les fantômes d'hématies par les lavages répétés des parasites dans un grand volume de tampon. En revanche, l'enzyme emprisonnée dans le système digestif du parasite reste inaccessible. Comme il n'est pas possible de distinguer la catalase humaine et celle du parasite lors des dosages d'activité, il a fallu recourir à divers témoins:

- le plus pratique est le dosage de l'hémoglobine dans les extraits parasitaires. Or, cette méthode n'est pas applicable quand le pigment malarique est abondant car il interfère dans la méthode de dosage par le réactif de Drabkin et amène à surestimer la contamination par l'hémoglobine (Roth *et al.*, 1986).

- il est intéressant de doser une protéine ou une activité enzymatique dont la quantité est proportionnelle à la biomasse parasitaire. La glutamate déshydrogénase répond à ce critère chez *Plasmodium* (Vander Jagt *et al.*, 1989). Elle a donc été utilisée comme index du taux de protéines parasitaires dans les protéines totales de l'extrait.

Nous avons également recherché la présence de la catalase chez *Babesia*, parasite voisin de *Plasmodium*, se développant également dans les hématies, mais qui n'en internalise pas le contenu. Il est possible d'isoler avec une grande pureté ces parasites. Les travaux de Bécuwe (1992, 1994) ont montré l'intérêt du modèle *Babesia* pour l'étude des enzymes antioxydantes chez les Haemosporida.

## 1.3. Dosage de l'activité catalasique globale dans des populations de *Plasmodium* et *Babesia*.

Nous avons dosé l'activité catalasique dans des extraits de *Plasmodium falciparum* cultivé sur des hématies humaines, et dans des extraits de *P. berghei* obtenu *in vivo* chez la souris. *Babesia divergens* (souche isolée d'un cas humain) a été produit *in vitro* en culture sur hématies humaines par E. Précigout, dans le laboratoire de A. Gorenflot (Université de Montpellier). *B. hylomysci* a été produit sur des souris. Chaque extrait a nécessité l'infestation de dix souris et les parasites ont été récoltés au cinquième jour (parasitémie d'environ 50% pour *P. berghei* et 80%

pour *B. hylomysci*). La réticulocytémie était toujours faible au moment du prélèvement des parasites.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau II.3** suivant:

	Catalase	Glutamate déshydrogénase	Hémoglobine
Hématies humaines	286,12 ± 6,53	0	0,8156 ± 0,0606
Hématies murines	76,146 ± 9,79	0	0,7355 ± 0,084
<i>P. falciparum</i> asynchrone	631,17 ± 30,4	0,0774 ± 0,011	0,0766 ± 0,0102
<i>P. berghei</i> N	9,11 ± 2,10	0,069 ± 0,0094	ND
<i>B. divergens</i>	41,95 ± 15,9	0,1459 ± 0,0069	ND
<i>B. hylomysci</i>	2,55 ± 1	0,0886 ± 0,01628	ND

**Tableau II.3:** Dosage des activités catalasique et glutamate déshydrogénase dans les extraits de *Plasmodium* (*P. falciparum* FCR3 en culture asynchrone et *P. berghei* N) et de *Babesia* (*B. divergens* et *B. hylomysci*) ainsi que dans les témoins hématies humaines et murines. Les activités sont exprimées en unité par mg de protéines. La concentration en hémoglobine est donnée en mg d'Hb/ mg de protéines. ND: hémoglobine non détectable par la méthode de Drabkin.

L'activité catalasique retrouvée dans les extraits de *P. falciparum* est 2,5 fois plus importante que celle retrouvée dans les hématies saines. En revanche, l'activité mesurée dans les extraits de *P. berghei* est beaucoup plus faible, mais reste significative. Elle est inférieure de 8 fois à l'activité catalasique des hématies murines.

L'activité glutamate déshydrogénase retrouvée dans les extraits de *P. falciparum* correspond à celle déjà citée dans la littérature (0,063 U/mg de protéines, souche CDC-1, Vander Jagt *et al.*, 1989). Par contre, l'activité mesurée chez *P. berghei* est inférieure à celle publiée par Langer *et al.*, (1970), qui est de l'ordre de 0,15 U/mg de protéines.

Les extraits de *Babesia* étant très purs, nous n'avons pas pu rapporter de résultats pour le contenu en hémoglobine, les valeurs étant inférieures au seuil de détection.

Une activité catalasique importante est présente dans les extraits de *B. divergens*. Par contre, elle est très faible, à la limite de la détection, dans les extraits de *B. hylomysci*.

Il existe une activité glutamate déshydrogénase chez *Babesia*. C'est, à notre connaissance, la première mise en évidence d'une telle activité chez ces parasites. L'activité mesurée chez *B. divergens* est supérieure à celle observée chez *B. hylomysci*.

#### **1.4. Dosage de l'activité catalasique globale au cours du cycle cellulaire chez *P. falciparum*.**

##### **1.4.1. Activité catalasique à différents stades du cycle cellulaire.**

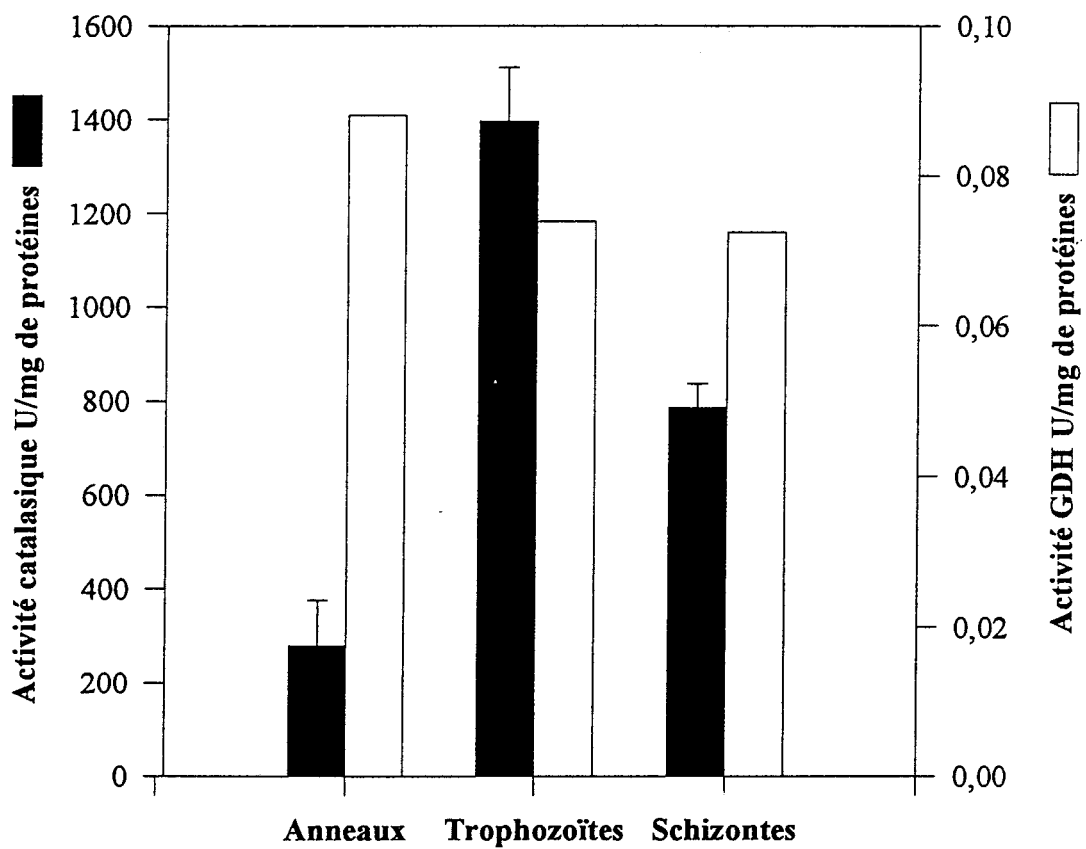
Les cultures ont subi deux traitements au sorbitol espacés de 30 heures pour assurer la synchronisation du cycle cellulaire. Les prélèvements sont effectués au cours du troisième cycle cellulaire, les stades anneaux, trophozoïtes et schizontes prédominant respectivement 5 heures, 27 heures et 40 heures après la réinvasion. Les parasites sont isolés par la méthode standard.

On constate que l'activité mesurée dans les extraits augmente entre le stade anneau et le stade trophozoïte, puis diminue au stade schizonte (**Fig.II. 5**). L'activité glutamate déshydrogénase quant à elle, reste relativement constante tout au long du cycle cellulaire (Vander Jagt *et al.*, 1989).

##### **1.4.2. Activité catalasique chez les schizontes âgés.**

Au cours de son cycle érythrocytaire, *Plasmodium* dégrade entre 25 et 75% de l'hémoglobine contenue dans une hématie (Goldberg *et al.*, 1992). Au stade schizonte, le processus de digestion se termine et les vésicules digestives se rassemblent pour former une vacuole résiduelle au centre du parasite. La contamination par les protéines de l'hématie est donc diminuée du fait de la dégradation du contenu des vésicules digestives d'une part, et de la destruction du contenu de l'hématie parasitée d'autre part. A ce stade, on doit donc observer une chute de la contamination par les protéines érythrocytaires et mettre en évidence plus aisément une éventuelle catalase endogène.

Des cultures synchronisées pour obtenir des schizontes âgés ont été récoltées 40 heures après la réinvasion. Un enrichissement des hématies parasitées par les schizontes a été effectué à partir de dix boîtes de culture synchronisée de 150 cm<sup>2</sup> (hématocrite 3%, parasitémie 10%) rassemblées pour obtenir une suspension globulaire à 20% d'hématocrite (milieu RPMI 1640, HEPES 25mM, sorbitol 6%). 5 ml de cette suspension sont déposés sur un gradient discontinu de



**Figure II. 5** : Activité de la catalase et de la glutamate déshydrogénase au cours du cycle cellulaire de *P. falciparum*. Les activités sont exprimées en U/mg de protéines. Les activités catalasiques correspondent à trois cultures synchrones différentes, tandis que les dosages de la glutamate déshydrogénase ont été réalisés sur une seule culture synchrone.

Percoll en tube Corex de 15 ml, constitué de 4 ml d'une solution à 90% de Percoll, 2 ml d'une solution à 70% de Percoll et 2 ml d'une solution à 40% de Percoll, le tout en milieu RPMI/HEPES/sorbitol. Après une centrifugation à 3500g pendant 20 min à 37°C, le deuxième anneau de couleur brune situé dans la partie supérieure du gradient est collecté délicatement. Après 2 lavages avec du milieu RPMI/HEPES (2x5 volumes appliqué lentement afin d'éviter une lyse osmotique), le culot globulaire, qui contient 90% d'hématies parasitées, est lysé par la saponine et les parasites sont purifiés classiquement.

L'activité catalasique présente dans les extraits de *P. falciparum* au stade schizonte a été mesurée et comparée à des marqueurs de l'hématie (contamination par l'hémoglobine, activité SOD Cu/Zn) et du parasite (activités glutamate déshydrogénase et SOD Fe). Dans le **tableau II.4** sont reportés les résultats bruts obtenus pour 4 cultures différentes (activités spécifiques des SOD Cu/Zn et Fe, de la catalase et de la glutamate déshydrogénase) ainsi que les rapports entre les activités de la catalase et celle des différents marqueurs. Nous constatons que:

1) la contamination par le contenu de l'hématie diminue de l'échantillon 1 à l'échantillon 4. Les principaux indices sont:

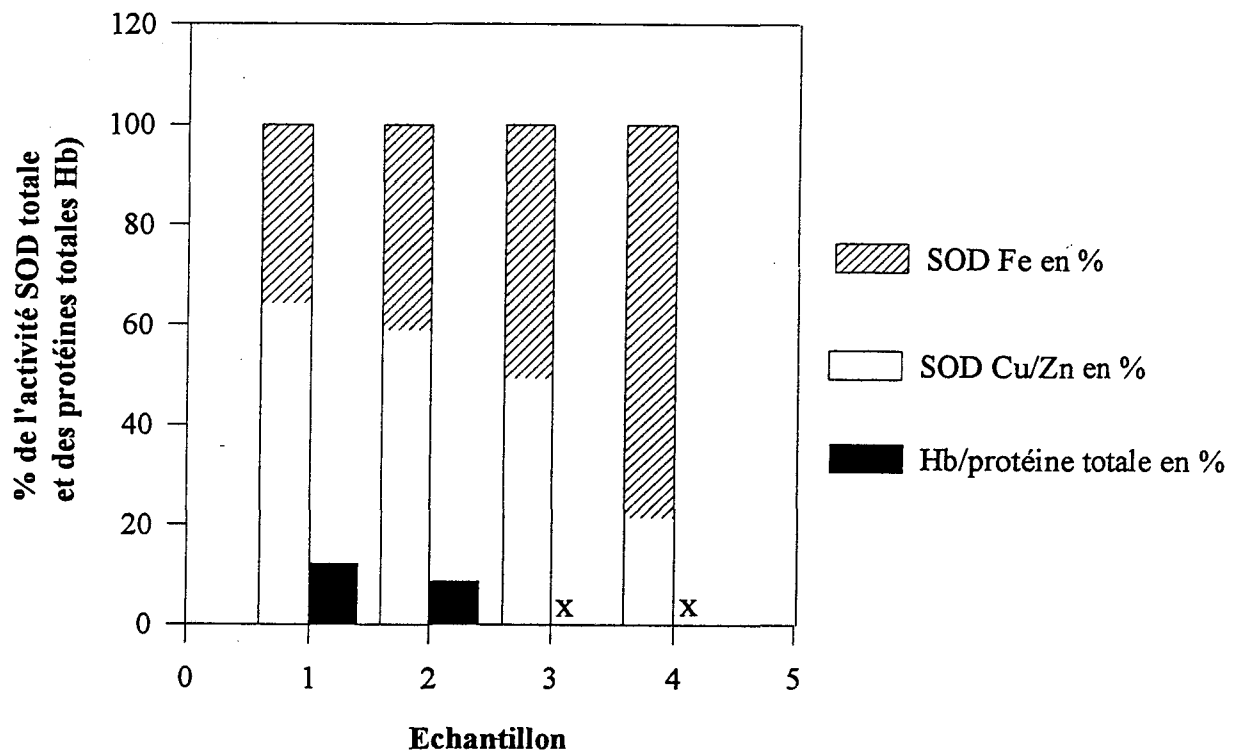
- l'hémoglobine, qui n'est pas détectable dans les échantillons 3 et 4.

- la part de l'activité SOD Cu/Zn dans l'activité totale, qui diminue en même temps que la contamination par l'hémoglobine, jusqu'à ne plus représenter que 20% de l'activité totale dans l'échantillon 4 (**Fig. II. 6**). Il est à noter que l'activité de la SOD globale des extraits est comprise entre 4,6 et 6,4 U/mg protéines. Elle est plus faible que celle observée par Bécuwe (thèse de doctorat, 1994) dans des cultures asynchrones de *P. falciparum* (12-13 U/mg protéines). Ceci s'explique aisément par le fait que dans les formes trophozoïtes jeunes et matures, la SOD internalisée représente une fraction importante de l'activité totale (75%) qui a pu faire croire à l'adoption de l'enzyme de l'hématie par le parasite (Fairfield *et al.*, 1983 ). Il est à noter que le rapport des activités SOD-Fe/GDH augmente entre les échantillons 1 et 4 (**Fig. II. 7A**).

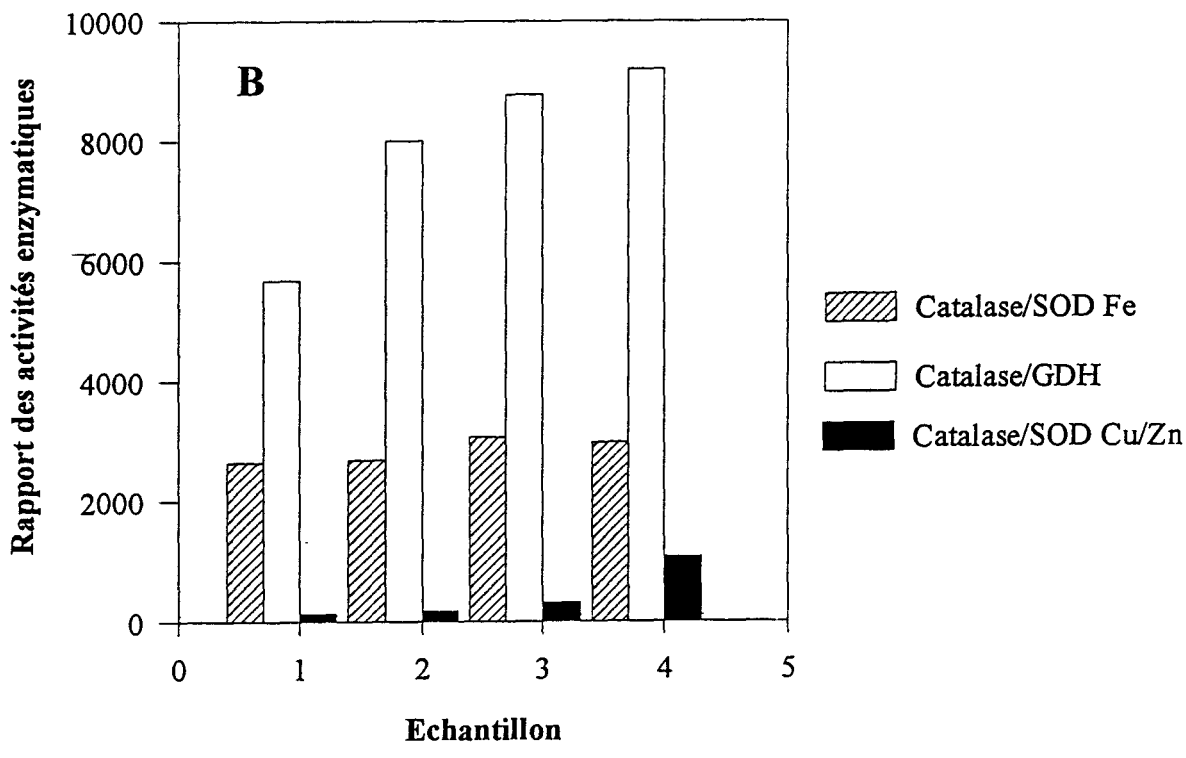
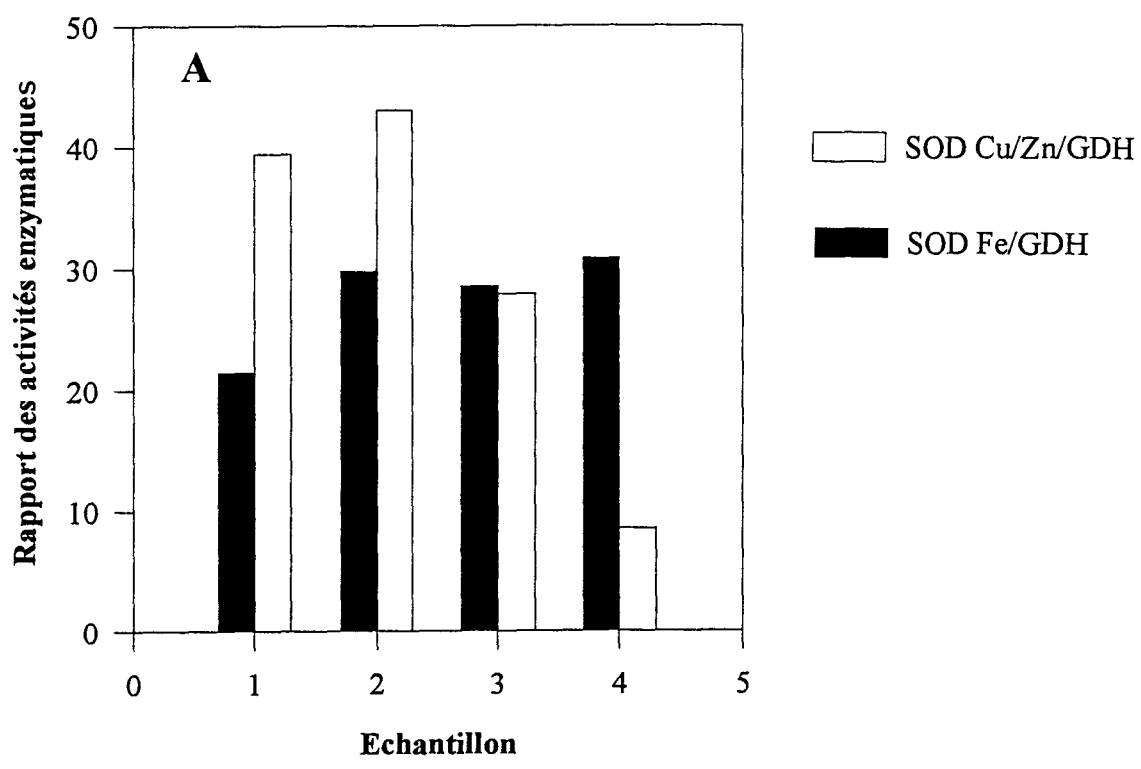
- l'augmentation de l'activité de la glutamate déshydrogénase, qui est normalement constante tout au long du cycle cellulaire. Elle traduit la diminution de la contamination des extraits par des protéines de l'hématie-hôte.

Expérience	1	2	3	4
Protéine mg/ml	4,31	16,44	1,062	2,54
Hémoglobine mg/ml	0,53	1,45	ND	ND
SOD Totale U/ml	22,7	107,3	6,818	11,9
SOD Cu/Zn U/ml	14,69	63,4	3,368	2,58
SOD Fe U/ml	8,01	43,9	3,45	9,32
Catalase U/ml	2120	11800	1060	2780
GDH U/ml	0,373	1,475	0,1208	0,302
Hb/protéine totale	0,123	0,088		
GDH/protéine	0,0865	0,0897	0,1137	0,1188
Cat/SOD Fe	264,7	268,8	307,2	298,3
Cat/GDH	5684	8000	8775	9205
Cat/SOD Cu/Zn	144,3	186,1	314,7	1077,5
Cat/protéine	492	718	998	1094
SOD Cu/Zn/ SODtotale en %	64,4	59,1	49,4	21,6
SOD Fe/ GDH	21,47	29,76	28,55	30,86
SOD Fe /protéine	1,86	2,67	3,24	3,66
SOD Cu/Zn /GDH	39,4	43	27,9	8,54
SOD Cu/Zn /protéine	3,4	3,85	3,17	1,01
SODtotale /protéine	5,26	6,52	6,41	4,68

**Tableau II. 4:** Activité de la catalase, SOD Cu/Zn, SOD Fe et de la glutamate déshydrogénase présentes dans quatre extraits de *P. falciparum* au stade schizonte (40 heures après la réinvasion). Les hématies parasitées ont été initialement purifiées sur un gradient discontinu de Percoll, avant d'être lysées par la saponine. Les parasites sont ensuite purifiés selon la technique classique. ND: hémoglobine non détectable par la méthode de Drabkin.



**Figure II. 6** : Représentation de la part de la SOD Cu/Zn dans l'activité SOD totale en pourcentage des quatre échantillons de *P. falciparum* au stade schizonte (40 heures après la réinvasion). La contamination par l'hémoglobine est également représentée en pourcentage des protéines totales des échantillons.  
 X : hémoglobine non détectable par la méthode de Drabkin.



**Figure II. 7:** Représentation des différents rapports d'activité enzymatiques des quatre échantillons de *P. falciparum* au stade schizonte (40 heures après la réinvasion).

A: rapport concernant les activités SOD

B: rapport concernant les activités catalasiques.

Le rapport catalase/SOD Fe a été multipliée par 10.



2) l'activité spécifique de la catalase augmente avec la pureté des extraits parasitaires. Le rapport des activités catalase/SOD-Fe reste très stable dans les 4 extraits alors qu'il augmente pour les rapports catalase/SOD Cu/Zn et catalase/GDH (Fig. II. 7B).

### 1.5. Discussion.

Les résultats obtenus mettent en évidence la présence d'une activité catalasique dans les extraits de *Plasmodium* et de *Babesia*. Areekul et Bonme (1992), Fairfield *et al.*, (1986) n'avaient pas trouvé d'activité catalasique chez *P. berghei*. Fairfield *et al.*, (1988) avaient mesuré dans les extraits de *P. falciparum*, une activité catalasique très faible par rapport à nos résultats (24,1 U/mg de protéine).

L'activité catalasique retrouvée dans les extraits parasitaires peut avoir plusieurs origines: catalase de l'hématie-hôte résiduelle contaminant les membranes ou internalisée dans les vacuoles digestives, catalase endogène spécifique du parasite.

L'évolution de l'activité catalasique globale observée chez *P. falciparum* au cours du cycle cellulaire, traduit parfaitement le phénomène d'internalisation du cytoplasme érythrocytaire dans les vacuoles digestives. En effet, l'endocytose est presque inexistante au stade anneau, elle est à son maximum au stade trophozoïte puis diminue au stade schizonte. Au cours de ce phénomène, le parasite dégrade le contenu de ces vacuoles digestives, en particulier l'hémoglobine. La catalase de l'hématie, internalisée dans ces vésicules, peut être soit dégradée, soit inactivée. L'activité retrouvée dans les schizontes est inférieure à celle mesurée chez les trophozoïtes. Ceci semble indiquer que la catalase internalisée est inactivée ou dégradée en partie ou en totalité au cours du cycle cellulaire. La chute de l'activité de la SOD Cu/Zn et de la teneur en hémoglobine (marqueurs de l'hématie) dans les stades schizontes est un argument en faveur de cette hypothèse. La catalase internalisée ne serait donc pas à proprement parler adoptée par le parasite, comme l'ont avancé certains auteurs (Fairfield *et al.*, 1983).

Au stade schizonte, nous observons une augmentation très importante des rapports catalase/hémoglobine et catalase/SOD Cu/Zn alors que le rapport catalase/SOD Fe varie très peu. Les valeurs du rapport catalase/GDH sont très proches dans les échantillons 2, 3 et 4, beaucoup plus faible dans l'échantillon 1 qui est le plus contaminé, au vu des valeurs observées pour

l'hémoglobine et la SOD Cu/Zn. Ces résultats indiquent la présence d'une forte activité catalasique dans les schizontes, assez bien corrélée avec les marqueurs du parasite et peu corrélée avec les marqueurs de l'hématie. Une telle observation est en faveur de l'existence d'une catalase endogène chez *Plasmodium*.

Chez *Babesia*, le phénomène d'internalisation du contenu de l'hématie est absent ou extrêmement réduit, contrairement à *Plasmodium*. De plus, la contamination par le cytoplasme érythrocytaire est très faible dans les extraits parasitaires (Bécuwe, thèse de troisième cycle, 1994). L'activité catalasique mesurée chez *Babesia* est donc très probablement d'origine endogène.

L'activité catalasique mesurée chez *P. falciparum* et *B. divergens* obtenus *in vitro* est largement supérieure à celle obtenue chez *P. berghei* et *B. hylomysci* obtenus *in vivo*. Il y a 69 fois plus d'activité catalasique chez *P. falciparum* que chez *P. berghei*. Cette différence est moins importante pour *Babesia*, avec 20 fois plus d'activité dans l'extrait de *B. divergens*. Les dosages enzymatiques de la glutathion peroxydase dans ces extraits (Gamain, communication personnelle) montrent des résultats inverses. En effet, l'activité GPx mesurée est beaucoup plus importante chez les parasites obtenus *in vivo* que chez ceux cultivés *in vitro*. Ces observations semblent indiquer l'existence d'une régulation entre l'activité catalasique et GPx dans la protection de *Plasmodium* et de *Babesia* contre le peroxyde d'hydrogène.

En conclusion, les résultats du dosage de l'activité catalasique chez *Plasmodium* et *Babesia* montrent donc l'existence probable d'une enzyme endogène chez ces deux parasites qui possèderaient, pour détoxifier les E.A.O., un système enzymatique complet (SOD, GPx et catalase) comparable à celui de nombreuses cellules eucaryotes, avec une régulation probable de la catalase et de la glutathion peroxydase de façon à sauvegarder le potentiel de défense du parasite contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

On peut alors s'interroger sur l'évolution et le rôle de la catalase de l'hématie internalisée dans le système digestif de *Plasmodium*. La démonstration de la dégradation de l'enzyme serait en effet un argument complémentaire pour l'existence d'une catalase endogène chez ce parasite. Cette approche a été effectuée de deux façons différentes:

1) l'étude du devenir de la catalase de l'hématie dans le système digestif de *P. falciparum* à l'aide d'anticorps dirigés contre la catalase humaine.

2) l'essai de culture de *P. falciparum* dans des hématies dont la catalase a été inactivée.

## 2. EVOLUTION ET ROLE DE LA CATALASE DE L'HEMATIE.

### 2.1. Evolution de la catalase de l'hématie internalisée par le parasite.

Pour suivre l'évolution de la catalase de l'hématie, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la catalase humaine:

- un anticorps polyclonal obtenu chez le rat après immunisation par de la catalase humaine native de commerce repurifiée au laboratoire;

- deux anticorps monoclonaux qui nous ont été fournis par E. Middelkoop (Amsterdam). Ces deux anticorps ont été caractérisés par Wiemer *et al.*, (1992). Ils ont été obtenus par immunisation de souris BALB/c par de la catalase humaine native ou dénaturée par chauffage en présence de 0,1% de SDS. Nous avons utilisé des surnageants de culture contenant les deux anticorps monoclonaux (IgG1).

Les deux anticorps monoclonaux ont été décrits comme spécifiques de la catalase humaine et ne croisant pas avec d'autres catalases de mammifères. L'anticorps monoclonal 17E10 est décrit comme reconnaissant principalement en test ELISA et par immunoprécipitation la catalase humaine native mais également l'enzyme dimérique et monomérique. L'anticorps monoclonal 10B12H9 reconnaît, en test ELISA et par immunoprécipitation, la catalase humaine sous forme dénaturée, monomérique et dimérique et très faiblement la catalase native. Il a été suggéré que l'anticorps 10B12H9 reconnaît un déterminant antigénique linéaire, masqué lorsque la protéine est sous la forme tétramérique. Ce déterminant serait exposé quand la protéine est sous la forme dénaturée ou désassemblée. L'anticorps 17E10 reconnaîtrait, quant à lui, un déterminant antigénique conformationnel qui est toujours présent quand l'enzyme est dissociée et disparaît quand l'enzyme est dénaturée.

#### 2.1.1. Caractérisation des Anticorps.

Avant d'utiliser les anticorps, nous avons voulu vérifier leur spécificité, grâce à des tests ELISA et par immunoempreinte sur la catalase humaine, la catalase bovine et la catalase murine.

### 2.1.1.1. Caractérisation des anticorps par les tests ELISA.

#### - L'anticorps polyclonal de rat

Les tests ELISA ont été réalisés contre de la catalase humaine et de foie de boeuf sous la forme native (tétramérique) ou dissociée (dimère ou monomère). La dissociation de la catalase en sous unité a été obtenue en milieu basique (pH= 11,2), grâce à l'utilisation de CAPS (acide 3-cyclohexylaminol-1-propanesulfonique). Sous la forme dissociée, l'enzyme perd son activité catalasique au profit d'une activité peroxydasique (Wiemer *et al.*, 1992).

L'anticorps polyclonal reconnaît aussi bien la catalase humaine (**Fig. II. 8A**) que celle de foie de boeuf (**Fig. II. 8B**), mais avec cependant une plus grande spécificité pour la première. Pour une dilution au 1/2000°, la réponse est encore très significative pour les deux catalases. L'anticorps reconnaît également les deux catalases sous forme dimérique ou monomérique. L'intensité de la réponse est néanmoins inférieure à celle obtenue pour les deux catalases natives pour les dilutions supérieures au 1/50°.

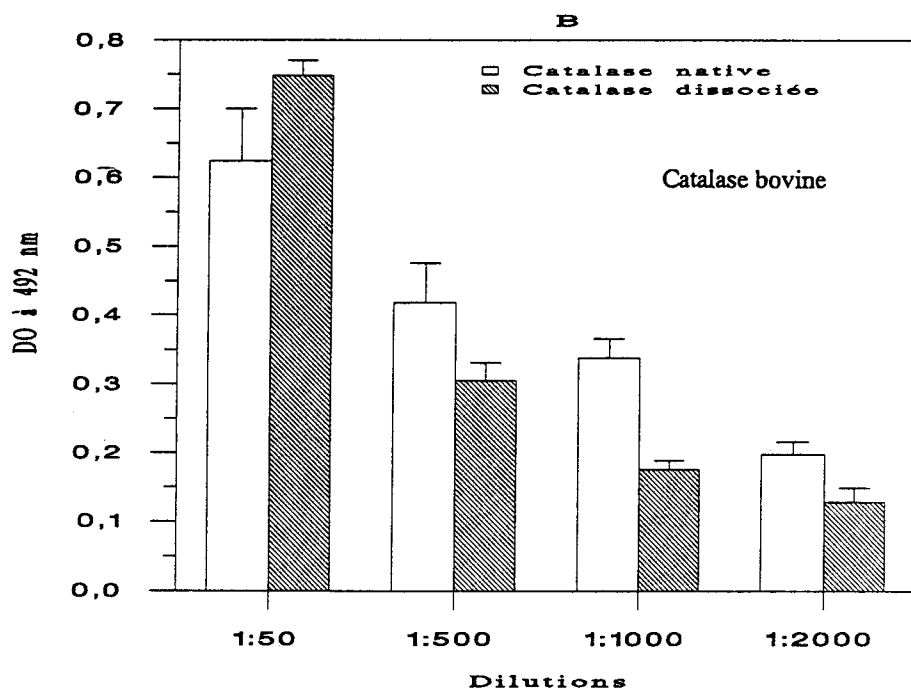
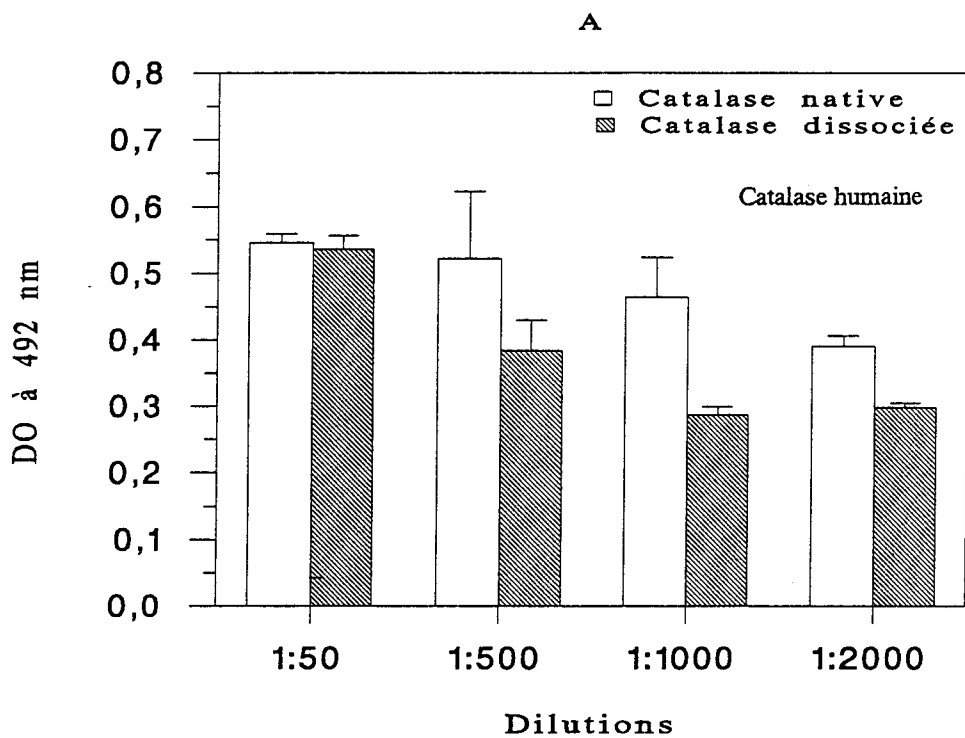
#### - Les anticorps monoclonaux

L'anticorps monoclonal 17E10 reconnaît effectivement la catalase humaine sous forme native, et plus faiblement sous forme monomérique ou dimérique (**Fig. II. 9A**). L'intensité de la réponse est significative pour les deux formes de catalase jusqu'au 1/200°. Contrairement à ce qui a été décrit, cet anticorps reconnaît également très bien la catalase de foie de boeuf native (**Fig. II. 9B**), mais plus faiblement ses formes monomérique ou dimérique.

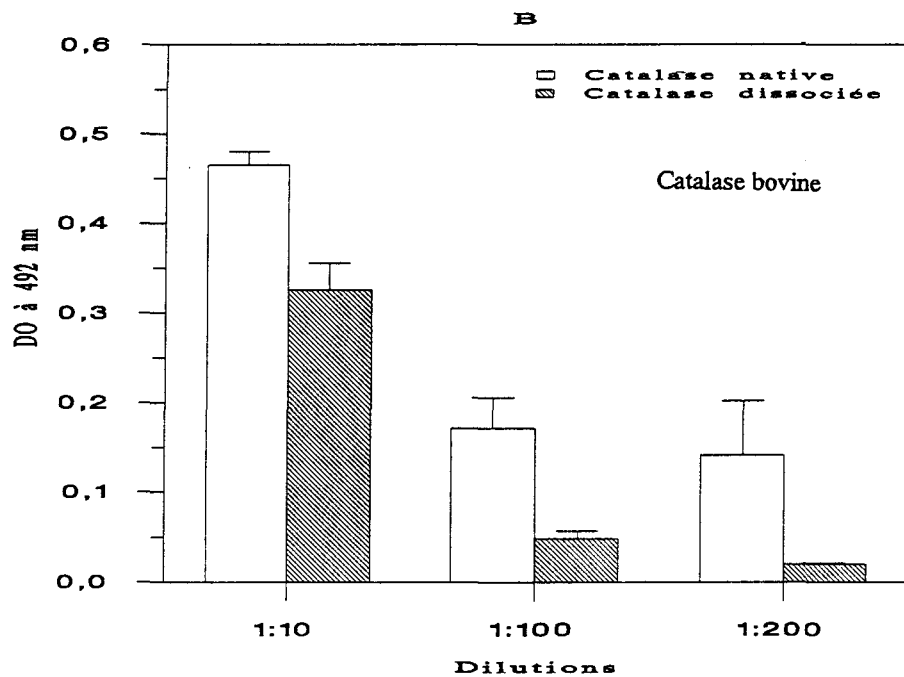
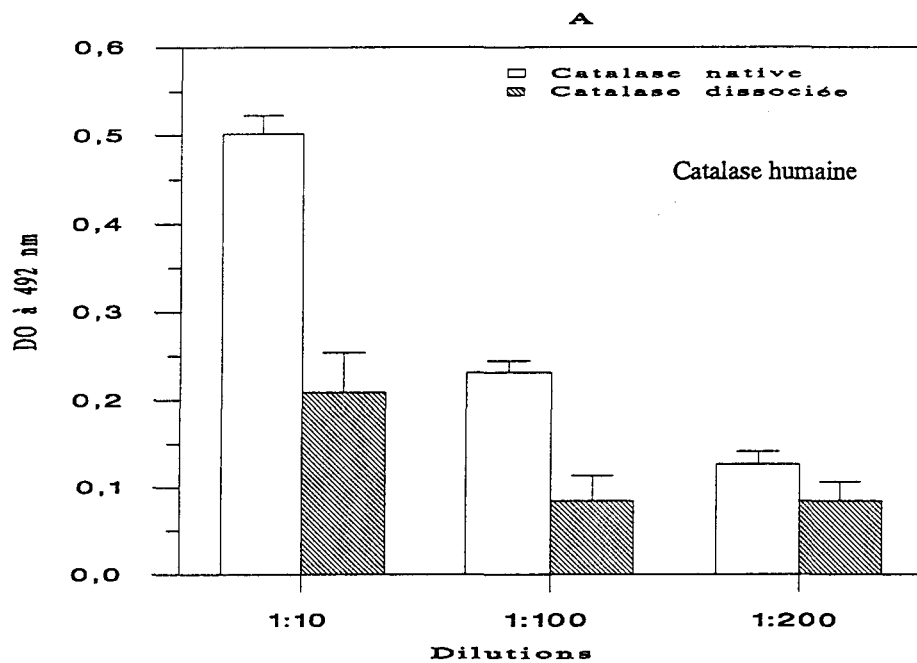
L'anticorps monoclonal 10B12H9 reconnaît quant à lui faiblement la catalase humaine native (**Fig. II. 10A**). La réponse est négligeable à partir de la dilution au 1/100°. L'intensité de la réponse est légèrement supérieure vis-à-vis de la catalase humaine sous forme monomérique ou dimérique. La réponse à la dilution au 1/100° devient négligeable. Cet anticorps ne reconnaît pas la catalase bovine, tant sous forme native que monomérique ou dimérique (**Fig. II.10B**).

### 2.1.1.2. Caractérisation des anticorps par immunoempreinte.

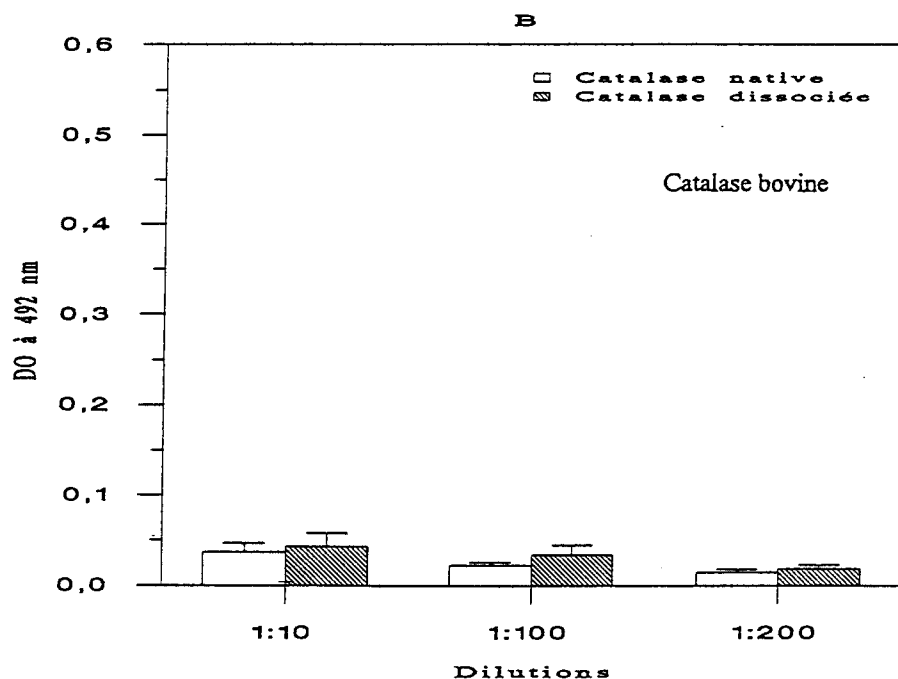
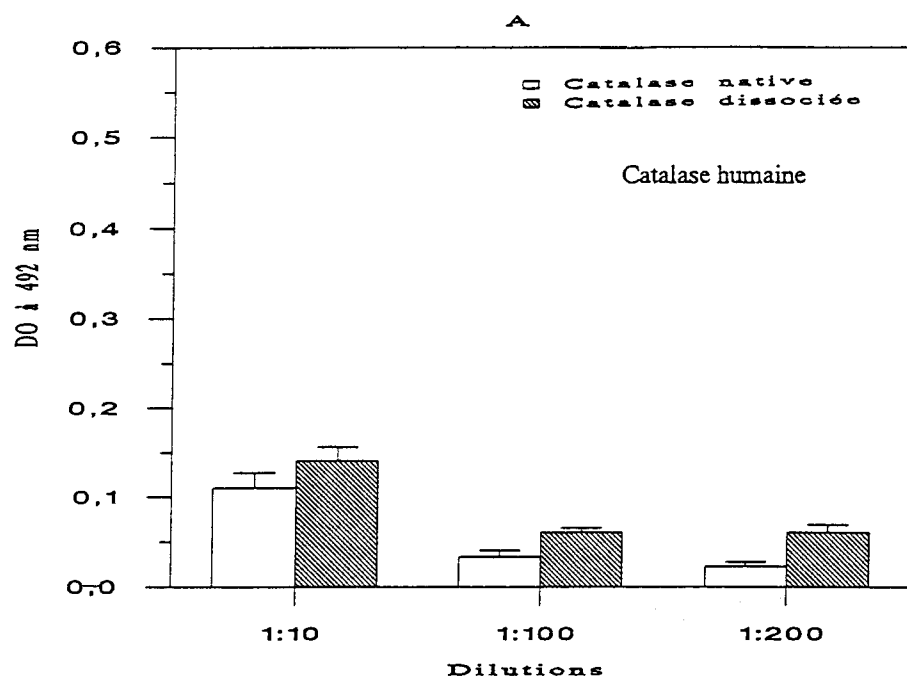
Les catalases humaine, bovine et murine ont été soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (gel à 10 % d'acrylamide) en présence de DTT. Les immunoempreintes ont été ensuite réalisées selon la méthode classique. Les masses moléculaires des sous-unités de ces catalases sont proches les unes des autres à 58 kDa. La protéine est ici sous forme dénaturée.



**Figure II. 8 :** Détection par ELISA de la catalase humaine (**graphe A**) et de la catalase de foie de boeuf (**graphe B**) par l'anticorps polyclonal. La plaque a été sensibilisée avec 0,1  $\mu$ g d'antigène par puits. L'antigène est sous forme natif ou dissocié en dimère ou monomère par un traitement basique (pH 11,2). La réactivité des anticorps est exprimée par trois mesures de DO à 492 nm pour chaque dilution.



**Figure II. 9 :** Détection par ELISA de la catalase humaine (**graphe A**) et de la catalase de foie de boeuf (**graphe B**) par l'anticorps monoclonal 17E10. La plaque a été sensibilisée avec  $0,1 \mu\text{g}$  d'antigène par puits. L'antigène est sous forme natif ou dissocié en dimère ou monomère par un traitement basique (pH 11,2). La réactivité des anticorps est exprimée par trois mesures de DO à 492 nm pour chaque dilution.



**Figure II. 10 :** Détection par ELISA de la catalase humaine (**graphe A**) et de la catalase de foie de boeuf (**graphe B**) par l'anticorps monoclonal 10B12H9. La plaque a été sensibilisée avec 0,1  $\mu\text{g}$  d'antigène par puits. L'antigène est sous forme natif ou dissocié en dimère ou monomère par un traitement basique (pH 11,2). La réactivité des anticorps est exprimée par trois mesures de DO à 492 nm pour chaque dilution.

- L'anticorps polyclonal

L'anticorps polyclonal reconnaît les trois catalases à la dilution au 1/50<sup>e</sup> (Fig. II. 11. bandes A1, B1, C1).

- Les anticorps monoclonaux

Dans les conditions utilisées, l'anticorps monoclonal 17E10 à la dilution au 1/4<sup>e</sup> reconnaît parfaitement ( Fig. II. 11.) la catalase humaine (A4), la catalase murine (B4) et faiblement la catalase de foie de boeuf (C4).

L'anticorps monoclonal 10B12H9 à la même dilution (Fig. II. 11. ), reconnaît la catalase humaine ( A6), murine ( B6) mais pas la catalase de foie de boeuf (C6) . La réponse vis-à-vis de la catalase humaine est plus intense que celle observée avec l'anticorps monoclonal 17E10 .

#### 2.1.1.3. Conclusion.

Aucun des anticorps utilisé n'est strictement spécifique de la catalase humaine, contrairement à ce qui avait été avancé, en particulier pour les anticorps monoclonaux. Les trois anticorps reconnaissent la catalase humaine sous forme native, dissociée et dénaturée. Le tableau II.5 résume les résultats obtenus.

#### 2.1.2. Etude de la catalase internalisée en immunofluorescence indirecte.

La détection de la catalase internalisée par le parasite n'a été possible qu'avec l'anticorps polyclonal de rat.

La détection a été effectuée sur des hématies parasitées perméabilisées par la saponine pour faciliter l'accessibilité à l'anticorps. En effet, ce dernier doit traverser quatre membranes avant d'atteindre la catalase présente dans la vésicule digestive.

Nous constatons ainsi que le marquage est localisé uniquement dans les vésicules digestives du parasite (Fig. II. 12. 1a, 2a et 3a), reconnaissables en contraste interférentiel chez les trophozoïtes et les formes âgées grâce à la présence du pigment malarique ( photos 2b et 3b).

Le marquage au stade anneau est faible et localisé dans des vésicules nutritives où aucun pigment n'est encore formé (photos 1a et 1b). Les schizontes visibles sur la photo sont faiblement marqués.



**Figure II. 11 :** Reconnaissance de la catalase humaine (A), murine (B) et de la catalase de foie de boeuf (C) par les différents anticorps, étudiée en immunoelectrotransfert en condition réductrice, après électrophorèse SDS-PAGE à 10% de polyacrylamide. Les dépôts de catalase correspondent à 20 unités enzymatiques.

**Piste 1:** polyclonal de rat à la dilution au 1/50°; **piste 2:** sérum pré-immun à la dilution au 1/50°; **piste 3:** témoin conjugué de l'anticorps polyclonal, marqué à la phosphatase alcaline; **piste 4:** anticorps monoclonal 17E10 dilué au 1/4; **piste 5:** témoin conjugué des anticorps monoclonaux, marqués à la phosphatase alcaline; **piste 6:** anticorps monoclonal 10B12H9 dilué au 1/4.

Les flèches (→) indique la présence des différentes catalases.

Les masses moléculaires (kDa) sont reportées en marge.



Anticorps	Immunisation par de la catalase humaine	Détection de la catalase par:				
		ELISA		Immunoempreinte (forme dénaturée)		
		Humaine	Bovine	Humaine	Murine	Bovine
Polyclonal	Native	Native et dissociée	Native et dissociée	+	+	+
Monoclonal 17E10	Native	Native et dissociée	Native et dissociée	+	+	±
Monoclonal 10B12H9	Dénaturée 0,1% SDS	Dissociée/ native faiblement	-	+	±	-

Tableau 5: Caractérisation des anticorps utilisés au cours de notre travail. Les anticorps ont été testés par ELISA et par immunoempreinte sur les catalase humaine, murine et la catalase de foie de boeuf.

Le marquage devient intense au stade trophozoïte (**photos 2a et 2b**), puis diminue au stade schizonte (**photos 3a et 3b**). Sur la **photo 3a**, on peut remarquer une faible fluorescence entourant certains schizontes. Cette fluorescence correspond à de la catalase humaine résiduelle emprisonnée dans le fantôme de l'hématie parasitée (flèche).

Nous avons réalisés une étude semi-quantitative en immunofluorescence indirecte du stade jeune trophozoïte (26 heures après la réinvasion) au stade schizonte précoce (38 heures après la réinvasion) en effectuant un prélèvement toutes les 3 heures (**Fig. II. 13**). Les résultats indiquent le nombre de cellules fluorescentes et le nombre total de cellules présentes dans le champ de vision ainsi que la proportion de cellules marquées.

Le marquage des cellules augmente au cours du stade trophozoïte, pour atteindre son maximum 29 heures après la réinvasion. C'est la résultante de deux phénomènes cinétiques qui se déroulent dans le parasite. A ce stade, l'internalisation du contenu de l'hématie est plus rapide que la digestion, ce qui entraîne un marquage intense.

Le nombre de cellules fluorescentes diminue ensuite au fur et à mesure que l'on avance vers le stade schizonte, entre la 32<sup>ème</sup> et la 38<sup>ème</sup> heure après la réinvasion. L'internalisation est alors ralentie alors que la digestion est extrêmement active.

Cette expérience confirme que la catalase de l'hématie-hôte est internalisée dans la vésicule digestive avec le contenu de l'érythrocyte. Cette catalase n'est pas simplement dissociée sous forme monomérique ou dimérique, ou même complètement dénaturée, car l'anticorps le reconnaît encore. Il se produit donc une dégradation probable de l'enzyme par digestion enzymatique qui apparaît être ultérieure à celle de l'hémoglobine. En effet, le pigment malarique est déjà bien formé, alors que le marquage est encore important.

### 2.1.3. Immunolocalisation ultrastructurale.

L'immunofluorescence indirecte ayant une résolution insuffisante pour détecter la catalase qui pourrait être adoptée par le parasite, c'est à dire passer de la vésicule digestive au cytoplasme parasitaire où elle serait active selon certains auteurs, nous avons effectué une étude en immunolocalisation ultrastructurale sur des coupes à congélation.

L'anticorps monoclonal 17E10 reconnaissant principalement la forme native de la catalase humaine, utilisé pur, marque strictement la vésicule digestive, identifiable par la présence du

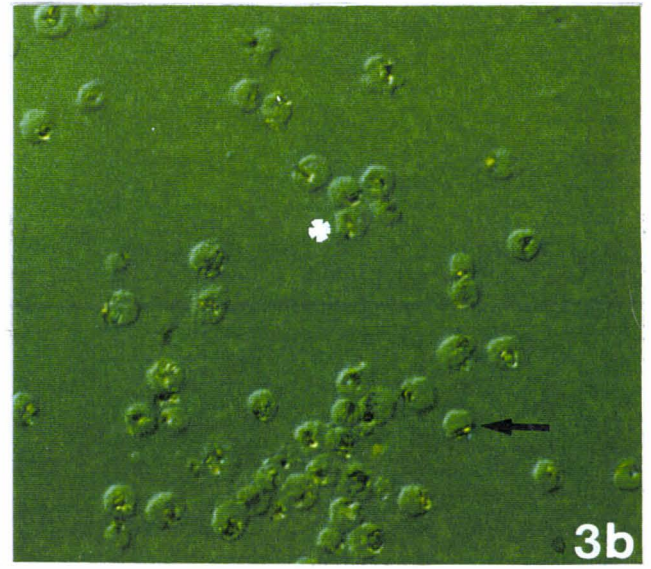
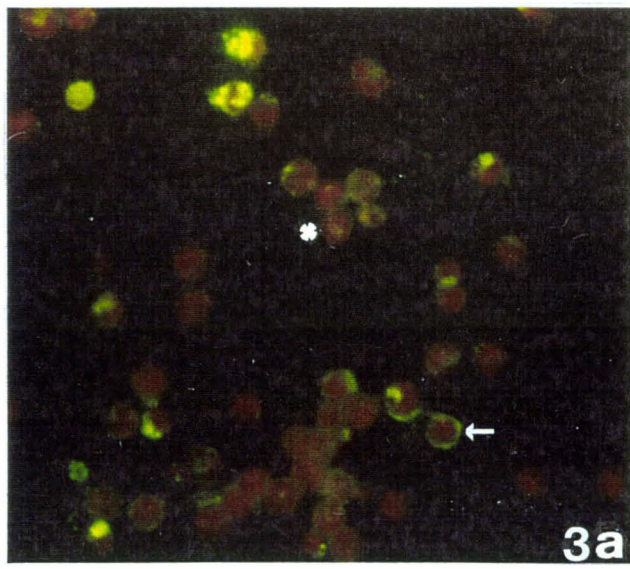
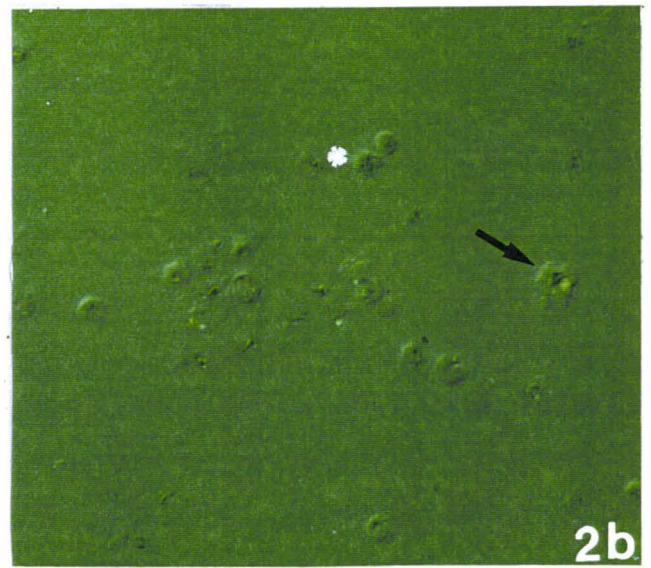
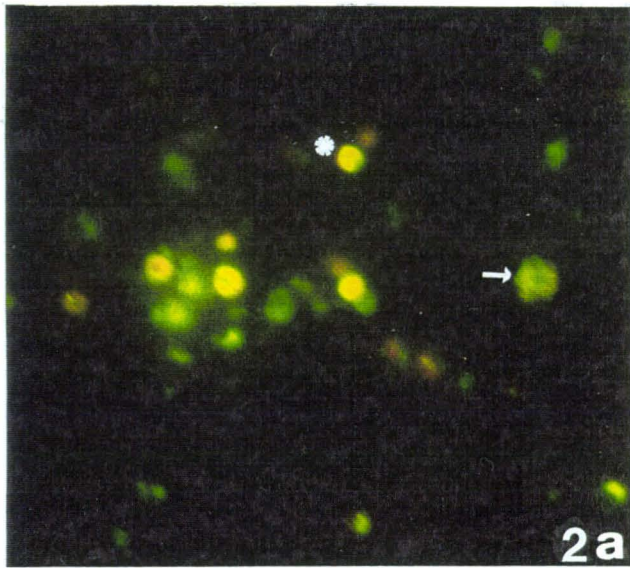
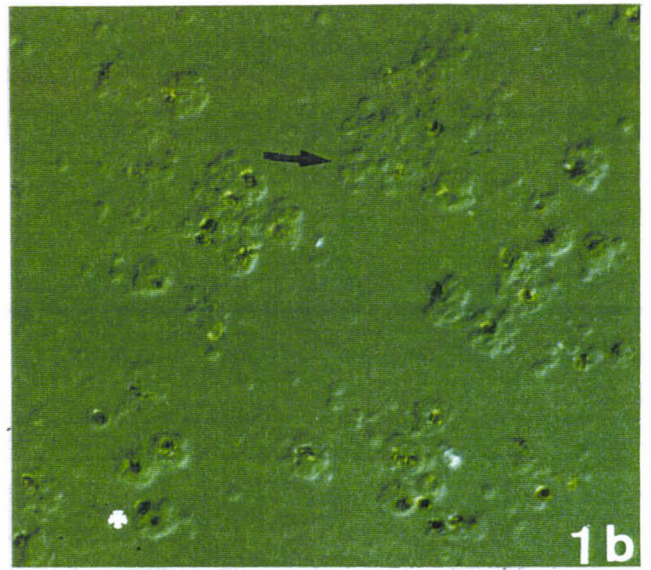
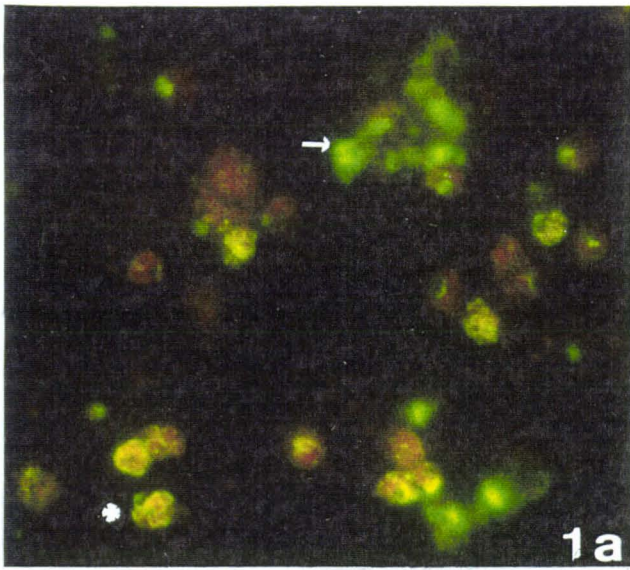
**Figure II. 12 :** Devenir de la catalase de hôte internalisée dans les vésicules digestives du parasite. Immunofluorescence indirecte sur des hématies humaines parasitées par *P. falciparum* à différents stades de développement. Les hématies parasitées ont été lysées par la saponine, puis fixées (mélange formol 2%, glutaraldéhyde 0,1%) avant d'être déposées sur des lames. L'immunofluorescence est réalisée avec l'anticorps polyclonal de rat dilué au 100°.

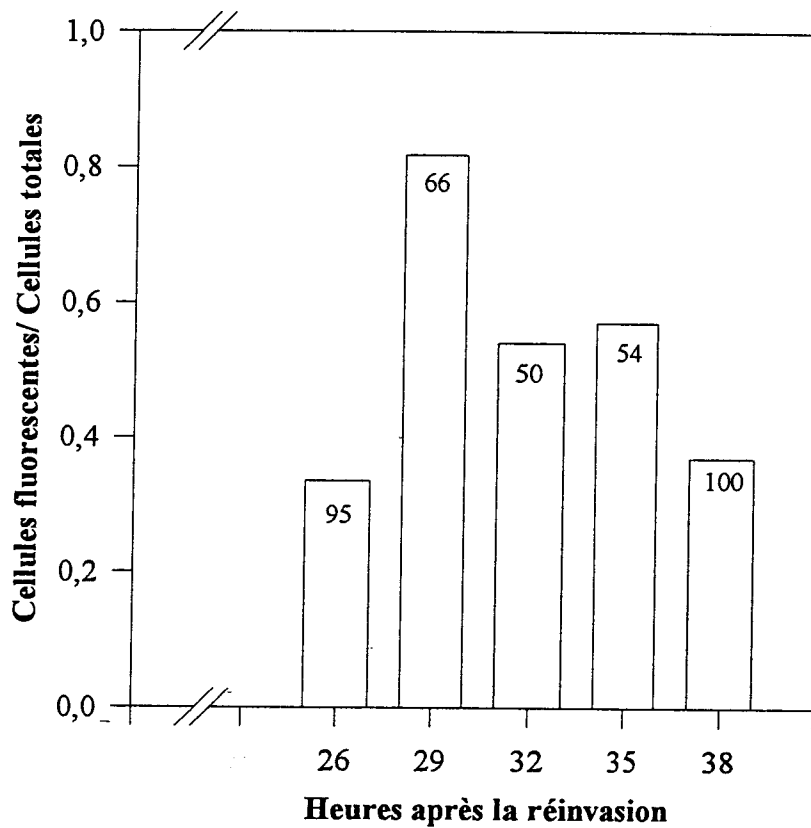
Les **photos a** correspondent à l'immunofluorescence, les **photos b** au contraste interférentiel.

**Photo 1:** jeune stade (→). Le marquage est localisé au niveau des vésicules nutritives du parasite. Le pigment malarique n'est pas encore formé. On peut observer quelques schizontes encore fluorescents (\*).

**Photo 2:** stade trophozoïte. Les parasites sont fortement marqués (\*). On peut observer la présence de vésicules digestives grâce au pigment malarique (→).

**Photo 3:** stade schizonte. Le marquage des cellules a fortement diminué (\*). La flèche (→) montre la catalase humaine résiduelle, emprisonnée dans le fantôme de l'hématie (3a).





**Figure II. 13 :** Immunofluorescence indirecte réalisée avec l'anticorps polyclonal sur une culture de *P. falciparum* synchrone. Les hématies parasitées sont perméabilisées par de la saponine. Le premier prélèvement est effectué 26 heures après la réinvasion au stade jeune trophozoïte, puis toutes les trois heures, jusqu'au stade schizonte (38 heures après la réinvasion). L'anticorps est utilisé à la dilution au 800<sup>e</sup>. Les chiffres indiquent le nombre de cellules totales présentes dans le champ de vision.

pigment malarique, chez le trophozoïte (Fig. II. 14A). Au stade schizonte, le marquage tend à diminuer dans la vésicule digestive, devenue résiduelle, mais certaines vésicules nutritives restent fortement marquées (flèche)(Fig. II. 14B).

L'anticorps monoclonal 10B12H9 (Fig. II. 14C et D), reconnaissant la forme dimérique ou monomérique de la protéine, utilisé pur également, marque la vésicule digestive au stade trophozoïte (Fig. II. 14C). Ceci indique qu'une partie de la catalase humaine se trouve déjà dissociée à ce stade. Au stade schizonte, un faible marquage est présent dans la vésicule digestive (Fig. II. 14D).

L'anticorps polyclonal qui reconnaît aussi bien la catalase native que dénaturée, utilisé à la dilution au 1/100<sup>e</sup> détecte la catalase humaine uniquement au niveau de la vésicule digestive du parasite (Fig. II. 15A, B et C). En fonction du cycle cellulaire, le marquage est important au stade trophozoïte (Fig. II. 15A), toujours présent au début de la shizogonie (Fig. II. 15B), dans un compartiment qui va devenir la vacuole résiduelle. A un stade plus avancé, le marquage de cette vacuole résiduelle devient très faible (Fig. II. 15C, flèche). La catalase internalisée serait ainsi dégradée au point de ne plus être reconnue par l'anticorps.

Il est à noter que le marquage des hématies par nos anticorps en immunolocalisation ultrastructurale est relativement faible par rapport à la quantité d'antigènes présents dans les érythrocytes. L'hémoglobine, par sa quantité, doit masquer les sites antigéniques de la catalase humaine, diminuant ainsi le marquage.

Pour vérifier si le pH de la vacuole digestive (compris entre 5 et 5,5 selon Goldberg et Slater 1992) pouvait rendre compte à lui seul de l'inactivation de l'enzyme, nous avons soumis la catalase humaine à pH 5 pendant 5 heures, temps largement supérieur à celui nécessaire pour la dégradation de l'hémoglobine dans le parasite (Salas *et al.*, 1995). L'activité catalase est constante entre pH 5 et pH 10 (Deisseroth et Dounce, 1970). Nous avons donc incubé la catalase humaine dans un tampon citrate 50 mM à pH 5 pendant cinq heures à 37°C. Les résultats montrent une diminution de l'activité de 14,7% à pH 7,4 et de 16,31% à pH 5 (Fig. II. 16). Le pH ne peut être à l'origine de la dénaturation de catalase humaine dans les vésicules digestives de *P. falciparum*. Une intervention enzymatique est donc probable.



**Figure II. 14 :** Immunolocalisation ultrastructurale de la catalase humaine internalisée par *P. falciparum*. Coupes ultrafines réalisées sur des trophozoïtes (photos A et C) et sur des schizontes (photos B et D). Le marquage est effectué par les anticorps monoclonaux anti-catalase humaine non dilués: le 17E10 (photos A et B) et le 10B12H9 (photos C et D).

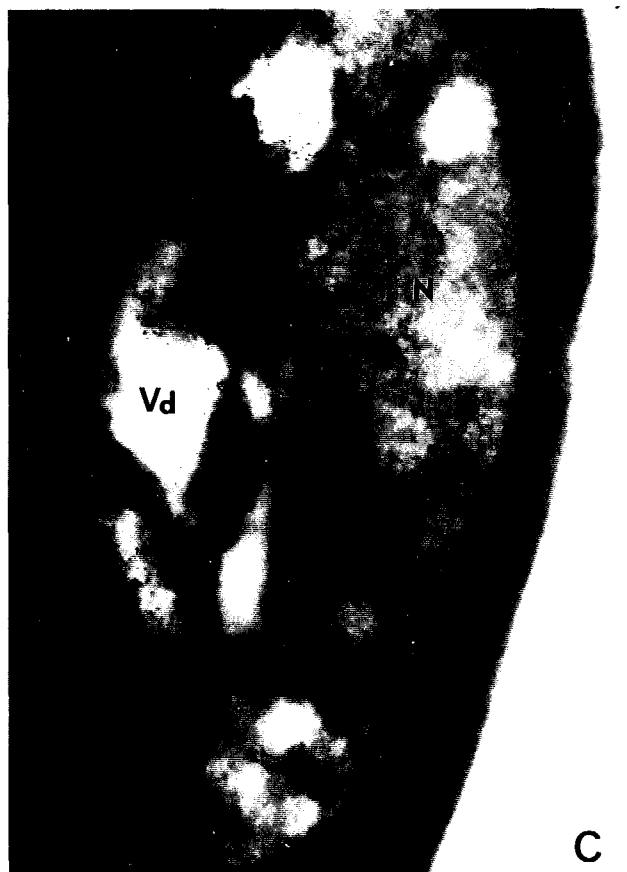
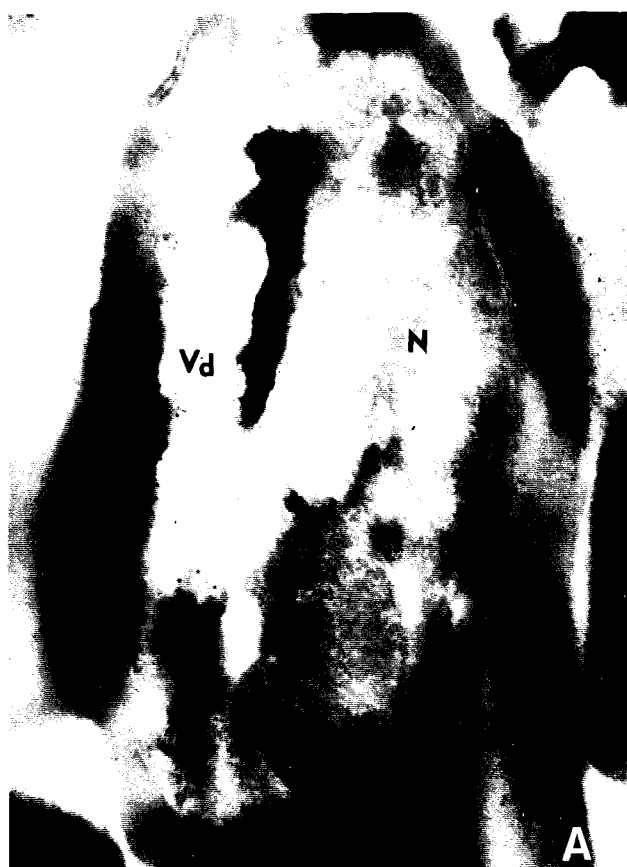
**Photo A :** stade trophozoïte (x 28 000). Le marquage est localisé dans la vésicule digestive du parasite.

**Photo B :** stade schizonte (x 36 000). Le marquage est devenu faible dans la vésicule digestive qui a évolué en vésicule résiduelle. On aperçoit une vésicule nutritive très marquée (flèche).

**Photo C :** stade trophozoïte (x 36 000). Marquage strictement localisé dans la vésicule digestive.

**Photo D :** stade schizonte (x 37 000). Le marquage devient inexistant dans la vésicule résiduelle. On observe toutefois quelques groupements de points, supportés par aucune structure visible.

N: Noyau; Rh: Rhoptrie; Vd: Vésicule digestive; Vr: Vésicule résiduelle; Vn: vésicule nutritive.



**Figure II. 15 :** Immunolocalisation ultrastructurale de la catalase humaine internalisée par *P. falciparum* au cours de son développement. Les coupes ultrafines ont été réalisées sur un jeune trophozoïte (**photo A**), un vieux trophozoïte (**photo B**) et sur un schizonte âgé (**photo C**). Le marquage a été effectué à l'aide de l'anticorps polyclonal de rat dilué au 100°.

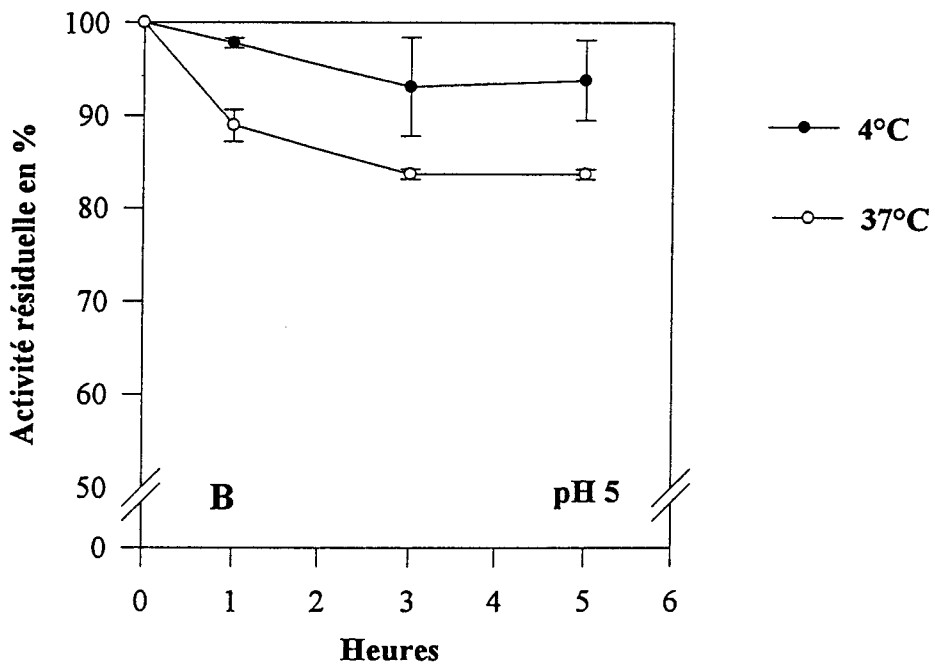
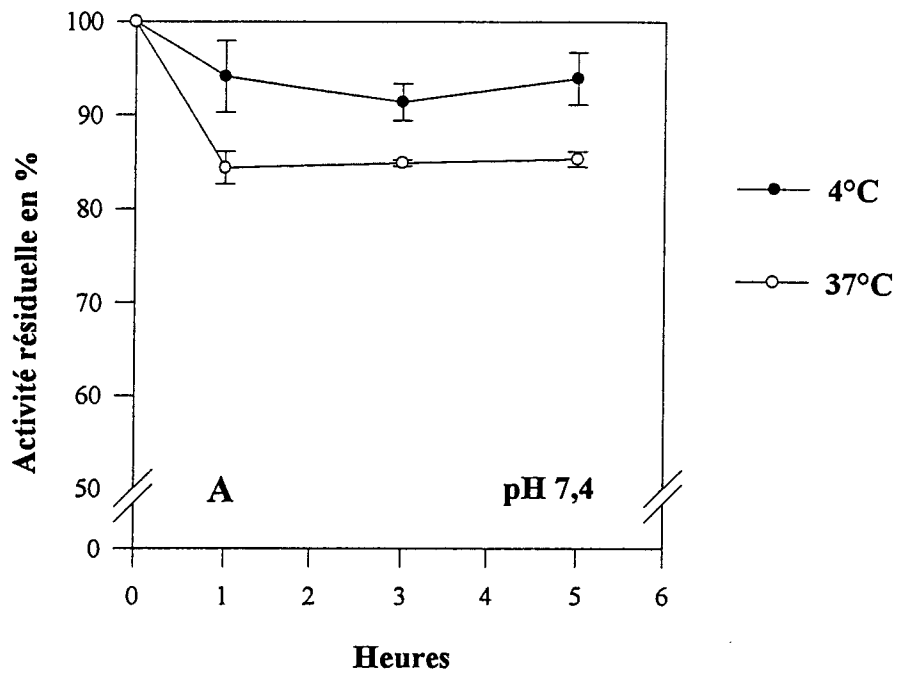
**Photo A:** stade trophozoïte (x 41 000). Le marquage est localisé dans la vésicule digestive du parasite.

**Photo B:** vieux trophozoïte (x 13 000). Le marquage, encore important se localise dans la vésicule devenue résiduelle. Le parasite se divise et on aperçoit les noyaux et rhoptries des futurs mérozoïtes.

**Photo C:** schizonte âgé (x 25 000). Le marquage est ici très faible dans la vésicule résiduelle (flèche). Les rhoptries et noyaux des mérozoïtes sont visibles.

**N:** Noyau; **Vd:** Vésicule digestive; **Vr:** Vésicule résiduelle; **Rh:** Rhoptrie;





**Figure II. 16 :** Activité de la catalase humaine à différents pH en fonction du temps. Trois unités de catalase sont incubées à différentes températures (4°C et 37°C) en tampon 50 mM de phosphate pH 7,4 (**graphe A**) et en tampon 50 mM de citrate pH 5 (**graphe B**).

#### 2.1.4. Discussion.

Nos études en immunofluorescence indirecte et en immunolocalisation ultrastructurale montrent clairement que la catalase est modifiée dans les vacuoles digestives de *P. falciparum* au point de ne plus être reconnue par les anticorps dirigés contre elle, au stade schizonte. Or, nous savons que l'enzyme sous forme dimérique ou monomérique n'est plus active. D'autre part, nos anticorps décèlent l'enzyme uniquement dans le système digestif du parasite, et jamais dans le compartiment cytoplasmique. Ceci amène à deux conclusions importantes:

- la catalase de l'hématie n'est pas adoptée à proprement parler par le parasite, mais reste confinée à l'intérieur de la vacuole digestive où elle finit par être digérée. Elle ne peut donc participer à la protection du parasite que d'une façon transitoire, et uniquement au niveau de la vésicule digestive. Le fait que l'enzyme reste active à pH 5 pendant un temps largement équivalent à celui de l'évolution des vésicules digestives peut constituer un argument à l'appui de ce rôle transitoire.

- la catalase de l'hématie internalisée par le parasite n'étant plus reconnue par les anticorps au stade schizonte, elle doit être au moins dissociée à ce stade, donc inactive. L'activité catalasique importante mesurée dans les extraits parasitaires à ce stade correspond donc à une activité endogène au parasite. Elle est d'ailleurs corrélée avec l'activité SOD-Fe présente dans les extraits, contrairement aux activités SOD Cu/Zn. En revanche, dans les stades anneaux et trophozoïtes, il est difficile de discerner l'activité endogène au parasite de celle adoptée par lui car les anticorps reconnaissent une catalase qui peut encore être parfaitement active.

#### 2.2. Croissance de *P. falciparum* dans des hématies dont la catalase a été inactivée.

Pour étudier le rôle éventuel de la catalase de l'hôte dans la protection de *Plasmodium* contre le choc oxydant, il était intéressant de cultiver le parasite dans des hématies dépourvues d'activité catalasique. Deux solutions étaient possibles:

- la culture de *Plasmodium* dans des hématies génétiquement dépourvues d'activité catalasique (hématies acatalasiques), expérience qui n'a jamais encore été réalisée à ce jour. Des sujets acatalasiques sont rares et deux types d'anomalies ont été décrits au Japon et en Suisse

(Göth 1992). Tous deux ont pour conséquence une activité catalasique très faible dans les hématies. Il existe un modèle murin acatalasique, décrit pour la première fois par l'équipe de Feinsten (1966). Ces souris possèdent dans les hématies une activité catalasique inférieure à 10 % de la normale.

Malgré plusieurs contacts, il n'a pas été possible d'obtenir des hématies humaines déficientes ou des souris acatalasiques. Il nous fallait donc trouver une autre solution. Nous avons donc tenté d'inhiber la catalase contenue dans les hématies humaines, puis de cultiver *P. falciparum* sur ces hématies.

### 2.2.1. Protocole d'inhibition.

Nous avons utilisé la technique décrite par Gaetanni *et al.*, (1994). La catalase, en présence d'un flux continu d' $H_2O_2$  (fourni par le système enzymatique glucose/glucose oxydase) est inhibée irréversiblement par 20 mM de 3-amino-1:2:4-triazole (AT). Lors de l'oxydation à deux électrons de la catalase par l' $H_2O_2$ , l'enzyme se trouve dans un état oxydé appelé composé I. L'aminotriazole va alors se fixer par une liaison covalente avec l'histidine du site actif. Dans ces conditions, la catalase est inhibée à 80-90%.

Il était impératif, pour pratiquer par la suite des cultures, de réaliser l'inhibition de la catalase des hématies dans des conditions stériles.

Les hématies saines sont incubées en milieu KRT, solution de Krebs-Ringer (NaCl 472 mM; KCl 18,8 mM;  $CaCl_2$  10 mM;  $KH_2PO_4$  4,8 mM;  $MgSO_4$  4,8 mM) contenant 20 mM de TS (acide N-tris[hydroxyméthyl]-méthyl-2-aminoéthane-sulfonique), 5 mM de glucose, 0,8U/ml de glucose oxydase et 20 mM d'AT. Le contact s'effectue pendant 20 min à 37°C, sous agitation (hématocrite de 10%). La réaction est arrêtée par 5 lavages en PBS exempt de glucose, ce qui arrête la production d' $H_2O_2$  par la glucose oxydase. Les hématies ainsi traitées ont un aspect plus foncé que les hématies non traitées. Ceci est dû à une production de méthémoglobine ( $Fe^{3+}$ ) provenant de la réaction de l'hémoglobine sous la forme  $Fe^{2+}$  avec le peroxyde d'hydrogène.

Différents témoins ont été effectués: hématies non traitées, hématies soumises au système glucose/glucose oxydase, hématies exposées à l'aminotriazole seul.

Avant d'ajouter les hématies parasitées, les différents lots d'hématies sont incubés une nuit en milieu RPMI complet à 37°C en atmosphère gazeuse contrôlée ( $O_{2,5\%}$ ;  $CO_2$  5%;  $N_2$  90%) en

boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (hématocrite de 6%). Ceci permet à la fois la réduction de la méthémoglobine en hémoglobine par la méthémoglobine réductase et le contrôle de la stérilité.

Les hématies parasitées proviennent d'une culture normale à 15% de parasitémie. Elles sont ajoutées aux différents lots afin d'obtenir une parasitémie finale de 0,5%, ce qui correspond à l'ajout de 3% d'hématies non inhibées. Les cultures sont alors incubées jusqu'à atteindre une parasitémie de 10%, puis sont repiquées dans des conditions identiques avec de nouvelles hématies fraîchement préparées, dans des boîtes de 150 cm<sup>2</sup>.

La parasitémie est suivie chaque jour au cours des deux cultures successives. Lorsqu'elle atteint 10% dans la seconde culture, des aliquots sont prélevés et fixés pour l'observation en microscopie électronique. Le reste de la culture est utilisée pour purifier les parasites selon la méthode classique. La croissance quotidienne (parasitémie du jour j / parasitémie du jour j-1) a été calculée pour les deux cultures successives en boîtes de 75 et 150 cm<sup>2</sup>. Elle est comparée par régression pour chaque condition de traitement des hématies à celle observée dans la culture témoin .

L'irréversibilité de l'inhibition de la catalase a été contrôlée par dosage de la catalase à la fin du traitement, après incubation d'une nuit à 37°C, juste avant l'inoculation des parasites, et sur des hématies non infectées incubées dans les mêmes conditions que les cultures.

### 2.2.2. Résultats.

Les dosages de l'activité catalasique dans les hématies sont reportés dans les tableaux suivants (tableaux II. 6 et II. 7) :

	Moyenne U/mg de protéines n = 7	Pourcentage du témoin
Témoin	274,70 ± 48,88	100 ± 21,8
Témoin Glc/GO	300,81 ± 40,36	104,3 ± 13,31
Témoin AT	291,55 ± 47	103,8 ± 7,08
Glc/GO/AT	41,64 ± 7,89	14,66 ± 2,43

**Tableau II. 6** : Activité catalasique résiduelle des hématies humaines obtenue après différents traitements. Les hématies sont incubées soit en présence de Glucose/ Glucose-oxydase (Glc/GO), un système générant du peroxyde d'hydrogène, soit en présence d'amino-triazole (AT), soit en présence de Glucose/Glucose-oxydase/AT.



	Moyenne U/mg de protéines n = 7	Pourcentage du témoin
Témoin	275,31 ± 36,80	100 ± 12,37
Témoin Glc/GO	291,3 ± 51,09	105,74 ± 10,56
Témoin AT	276,50 ± 43,81	100,4 ± 6,92
Glc/GO/AT	46,40 ± 7,56	17,04 ± 2,96

**Tableau II. 7:** Irréversibilité de l'inhibition de l'activité catalasique. Les hématies saines, préalablement incubées en présence soit de Glucose/Glucose-oxydase (Glc/GO), soit d'amino-triazole (AT), soit de Glucose/Glucose-oxydase/AT, sont placées à l'étuve le temps de la culture de *P. falciparum*. L'activité catalasique est ensuite mesurée.

Les résultats montrent:

- que l'inhibition de la catalase de l'hématie n'est effective qu'avec le système réactionnel complet. Le système glucose/glucose oxydase ou l'amino-triazole utilisés seuls n'ont pas d'influence,

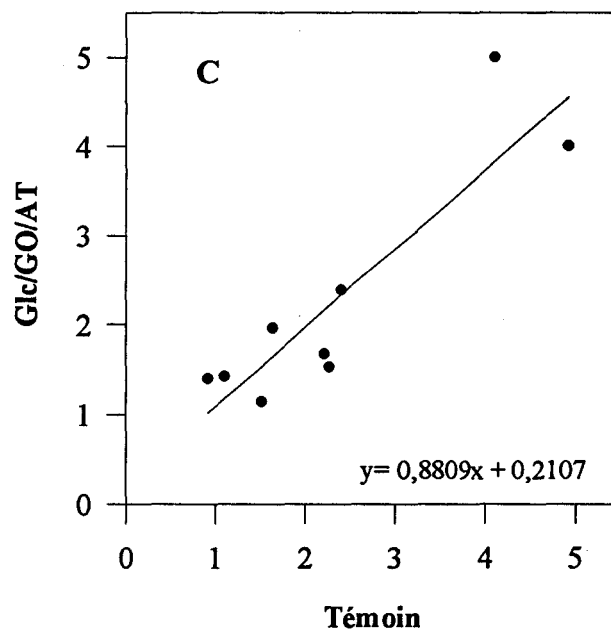
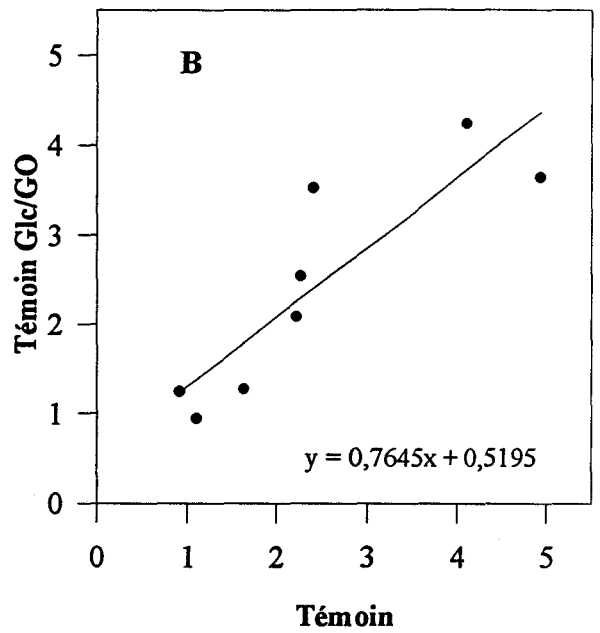
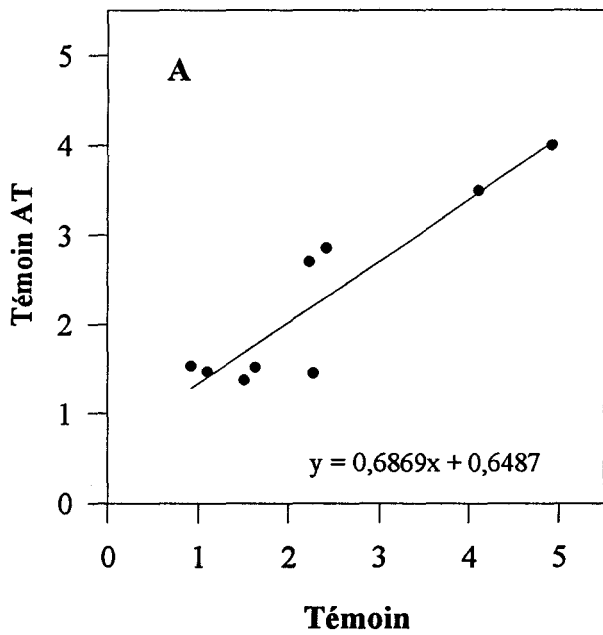
- l'inhibition obtenue est de 85% environ,

- elle est irréversible, car on n'observe pas de restauration de l'activité après un temps d'incubation identique à celui des hématies infectées.

L'étude de la croissance (**Fig. II. 17**) montre que:

- le traitement par l'amino-triazole seul diminue la vitesse de multiplication de *P. falciparum*. La vitesse de multiplication est 68% de celle observée dans le témoin (pente de la droite de régression **Fig. II. 17A**). Dans les hématies traitées par le système glucose/glucose oxydase, l'effet inhibiteur est plus faible, la croissance étant de 88% de celle du témoin (**Fig. II. 17B**). Dans les hématies ayant subi le traitement complet, la vitesse de multiplication est de 78% de celle du témoin (**Fig. II. 17C**). Ceci montre que l'effet d'une inhibition à 85% de l'activité catalasique de l'hématie ne perturbe que modérément la croissance du parasite.

L'observation des cellules en microscopie électronique (**Fig. II. 18A à D**) montre une intégrité totale des structures parasitaires. Seul le pigment se formant à l'intérieur des vésicules



**Figure II. 17 :** Représentation de la croissance journalière de *P. falciparum* cultivé dans des hématies témoins en fonction de la croissance dans des hématies traitées avec l'AT (A), avec le système Glc/GO (B) et avec le système Glc/GO/AT (C).

**Figure II. 18 :** Etude ultrastructurale de *P. falciparum* cultivé sur des hématies dont la catalase a été inhibée de façon irréversible. Les photos représentent des parasites au stade trophozoïte.

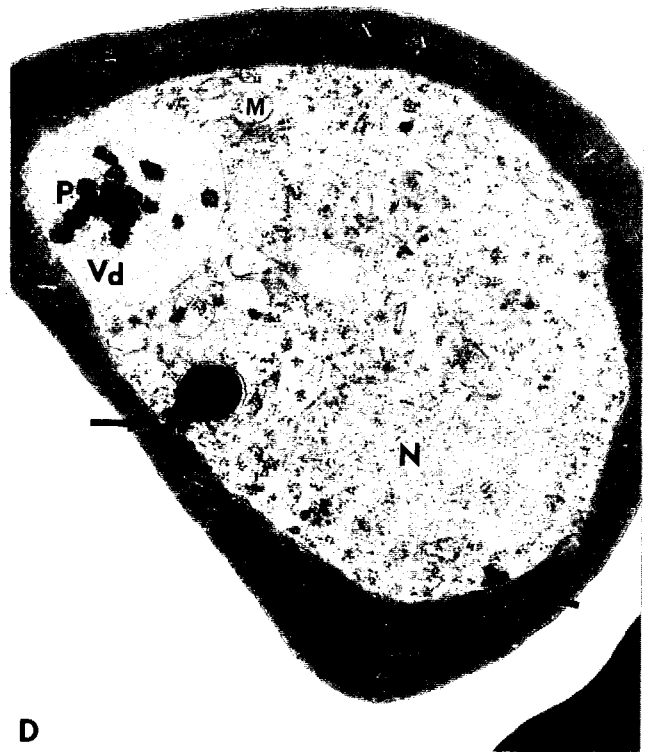
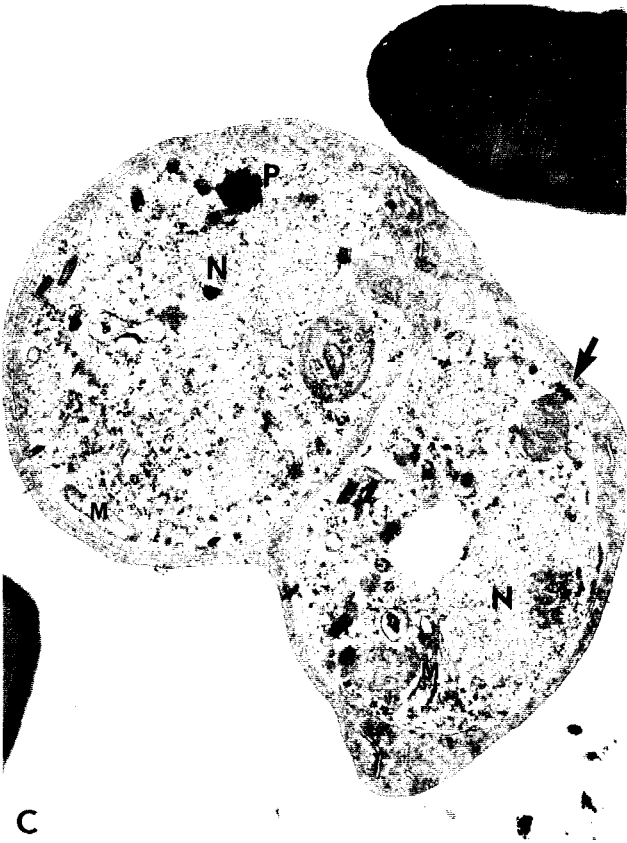
**Photo A :** (x 24 000) parasite obtenu sur des hématies témoins.

**Photo B :** (x 16 500) parasite obtenu sur des hématies traitées par l'amino-triazole (AT) seul. On aperçoit un cytotome (flèche).

**Photo C :** (x 20 000) parasite obtenu sur des hématies traitées par le système Glucose/Glucose-oxydase (Glc/GO). Un cytotome est présent (flèche).

**Photo D :** (x 16 800) parasite obtenu sur des hématies traitées par le système AT/Glc/GO. Dans ces conditions, la catalase de l'hématie est inhibée irréversiblement. Le parasite présente une intégrité totale des structures, en particulier au niveau des membranes. Le pigment malarique (P) semble être moins abondant. Deux cytotomes sont visibles (flèche).

**N:** Noyau; **P:** pigment malarique; **Vd:** Vésicule digestive; **Vn:** vésicule nutritive; **M:** mitochondrie.



digestives semble légèrement moins abondant, ce qui indiquerait une digestion un peu ralentie.

Les résultats des dosages de l'activité catalasique et de la glutamate déshydrogénase dans les extraits parasitaires sont reportés dans le **tableau II. 8**. On peut observer que le traitement Glc/GO + AT entraîne une inhibition de plus de 90% de l'activité présente dans les extraits alors que l'amino-triazole seul inhibe 13 % de l'activité. Le système Glc/GO a une action identique à celle de l'amino-triazole. L'activité de la glutamate déshydrogénase est faiblement augmentée dans les extraits provenant de cultures réalisées sur hématies traitées par l'amino-triazole seul ou par le système Glc/GO seul. Lorsque la catalase de l'hématie est inhibée par l'association AT/Glc/GO, on constate une augmentation de l'activité de la glutamate déshydrogénase.

### 2.2.3. Discussion.

Les résultats des expériences précédentes appellent plusieurs commentaires:

1) le fait que les parasites soient capables de se multiplier dans des hématies dont la catalase a été irréversiblement inhibée montre que le rôle protecteur de l'enzyme de la cellule-hôte dans la défense du parasite contre le choc oxydant est très limité. Cette conclusion s'appuie à la fois sur la diminution modérée de la croissance et sur l'intégrité ultrastructurale des parasites, qui ne présentent aucune lésion particulière au niveau membranaire pouvant correspondre à l'effet d'un choc oxydant. Ce résultat est en parfait accord avec les observations réalisées avec les anticorps, qui indiquaient que la catalase de l'hématie était modifiée dans la vésicule digestive et probablement inactivée.

2) l'activité observée dans les extraits parasitaires provenant de cultures effectuées sur des hématies dont la catalase a été inhibée est extrêmement faible. Ceci peut s'expliquer de deux façons différentes:

- il n'y a pas d'activité catalase endogène chez *Plasmodium* et les dosages mettent simplement en évidence l'inhibition de la catalase de l'hématie internalisée. Les résultats des dosages effectués dans la première partie de notre travail sur les stades schizontes vont à l'encontre de cette hypothèse.

- la catalase du parasite serait elle-même affectée par le traitement. Le mécanisme de cette inhibition reste obscur mais Atamna et Ginsburg (1993) ont mis en évidence une production

	Catalase U/mg de protéines n=4	Pourcentage du témoin pour l'activité catalase	GDH U/mg de protéines n=4	Pourcentage du témoin pour l'activité GDH
Témoin	591,3 ± 66,13	100 ± 11,88	0,0624 ± 6,9.10 <sup>-3</sup>	100 ± 9,58
Témoin Glc/GO	482,03 ± 89,74	86,54 ± 17,65	0,0687 ± 2,38.10 <sup>-3</sup>	110,3 ± 18,2
Témoin AT	514,78 ± 49,03	87,54 ± 9,91	0,0690 ± 8,8.10 <sup>-3</sup>	110,05 ± 13,80
Glc/GO/AT	46,19 ± 11,41	7,82 ± 1,87	0,089 ± 1,79.10 <sup>-2</sup>	146,9 ± 46,47

**Tableau II. 8:** Activité de la catalase et de la glutamate déshydrogénase dans les extraits de *P. falciparum* cultivé dans les différentes conditions: hématies humaines non traitées; hématies humaines traitées par le système Glucose/Glucose-Oxydase; hématies traitées par l'aminotriazole et hématies traitées par le système Glucose/Glucose-Oxydase/AT.

d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le parasite au cours de son développement dans l'hématie. On peut concevoir que le complexe amino-triazole/catalase de l'hématie soit dissocié dans la vésicule digestive du parasite par attaque de la catalase. L' amino-triazole pourrait diffuser dans le cytoplasme parasitaire et, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inhiber la catalase endogène. En effet, l' amino-triazole se fixe seulement sur la catalase lorsqu'elle est oxydée (composé I) en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'inhibition n'est pas observée dans le cas des hématies traitées par l' amino-triazole seul car il n'est pas resté fixé sur l'enzyme de l'hématie et a été éliminé totalement par les lavages. Nos expériences confirmeraient donc l'observation, par Atamna et Ginsburg (1993), d'une production endogène d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez *P. falciparum*.

- l'effet inhibiteur de l' amino-triazole ajouté seul est plus difficile à expliquer. En effet, on n'observe pas d'inhibition de l'activité catalase globale ni dans les hématies traitées, ni dans les extraits. La toxicité du produit ne serait donc pas en rapport avec l'inhibition de cette enzyme.

3) le parasite est apparemment capable de se développer dans l'hématie alors que son activité catalase est très affectée. Or, les observations en microscopie électronique suggèrent une intégrité parfaite du parasite, particulièrement au niveau des membranes. *Plasmodium* dispose donc de défenses contre le choc oxydant pouvant pallier à une carence en catalase dans les conditions de culture que nous avons utilisées (en atmosphère à 5% d'oxygène). Il faudrait considérer également le rôle de la glutathion peroxydase mise en évidence au laboratoire par Gamain *et al.*, (1995, soumis) ou d'une autre enzyme capable de détruire H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, nos expériences ont été réalisées dans le milieu de culture classique, où la Gpx sélénodépendante caractérisée par Gamain ne peut s'exprimer que faiblement.

### 3. CONCLUSIONS.

Cette première série d'expériences nous permet de tirer les quelques conclusions suivantes:

1) la catalase de l'hématie internalisée par *P. falciparum* est probablement dégradée au cours de l'évolution de la vacuole digestive, et ne participe pas de façon active à la protection du parasite contre le choc oxydant, car on peut l'inhiber sans conséquence fâcheuse pour la croissance de *Plasmodium* ou l'intégrité de son ultrastructure cellulaire;

2) il existe une catalase endogène chez *P. falciparum*, chez *Babesia divergens* et

probablement chez *P. berghei*. Si l'enzyme existe chez *B. hylomysci*, elle est très faiblement exprimée *in vivo* chez la souris. L'activité de l'enzyme est très différente selon que l'on s'adresse à des cellules cultivées *in vitro* ou à des cellules obtenues *in vivo*. La présence de sélénium disponible pour le parasite entraînerait une modulation respective de la glutathion peroxydase et de la catalase. Cette modulation pourrait également intervenir quand la catalase du parasite est inhibée, mais en absence de sélénium dans le milieu de culture, on ne peut pas exclure l'intervention d'une enzyme différente encore non caractérisée;

3) la mise en évidence de l'activité catalasique endogène de *Plasmodium* nous a incité à caractériser l'enzyme de façon plus précise, pour démontrer de façon irréfutable son existence. Pour cela, nous avons utilisé deux approches: l'une biochimique, l'autre en biologie moléculaire.



**CHAPITRE II:**  
**ESSAI DE CARACTERISATION DE LA CATALASE**  
**DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* PAR APPROCHE BIOCHIMIQUE**

**1. ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE.**

Pour pouvoir repérer la catalase par son activité après migration, nous avons opéré sur des gels de 7 à 20% de polyacrylamide en condition native (Fig.II.19). Les gels permettent de séparer les protéines aussi bien par leur masse moléculaire (effet du gradient de polyacrylamide) que par leur charge. De une à quatre unités d'activité catalasique ont été déposées par puits. Un dépôt plus important entraîne une mauvaise migration et une réduction de la résolution.

La catalase présente dans un extrait de *P. falciparum* asynchrone (piste 1) migre plus rapidement vers l'anode que la catalase du globule rouge humain (piste 2). En effet, lorsque nous déposons un mélange d'un extrait de globule rouge humain avec un extrait parasitaire, nous obtenons deux bandes d'activité distinctes (piste 3). En outre, dans l'extrait parasitaire, on observe une tâche d'activité migrant à la même vitesse que celle du témoin globule rouge humain. Cette activité augmente en fonction de la quantité d'activité catalasique déposée (pistes 4 et 5) et correspond probablement à de la catalase humaine résiduelle présente dans les fantômes d'hématies, ou qui vient juste d'être internalisée dans les jeunes vacuoles. En effet, lorsque l'extrait parasitaire est très pur (piste 6), ou provient de schizontes hautement purifiés (piste 7), cette bande d'activité disparaît.

Chez *P. berghei*, on observe également une catalase qui migre plus rapidement vers l'anode (piste 9) que la catalase du globule rouge murin (piste 8).

Les extraits parasitaires de *P. falciparum* et *P. berghei* contiennent donc une catalase dont la migration électrophorétique est différente de la catalase des hématies témoins. Les profils de migration chez *P. falciparum* sont identiques quel que soit le stade parasitaire et la pureté de l'extrait utilisé. Cette tâche d'activité catalasique représente-t-elle la seule catalase endogène du parasite, ou est-elle la somme de l'activité catalasique endogène et de l'activité catalasique de l'hématie hôte, ayant subi des modifications de charges ou une légère protéolyse ? Pour répondre à cette question, nous avons testé l'homogénéité de cette tâche d'activité par chromatographie en

**Figure II. 19:** Mise en évidence de l'activité catalasique sur gel d'acrylamide après électrophorèse en condition native. Le gel est un gradient continu de 7 à 20% d'acrylamide. La migration s'effectue à ampérage constant de 30 mA pendant 15 heures à 4°C. La révélation de l'activité catalasique est effectuée selon Clare *et al.*, (1984).

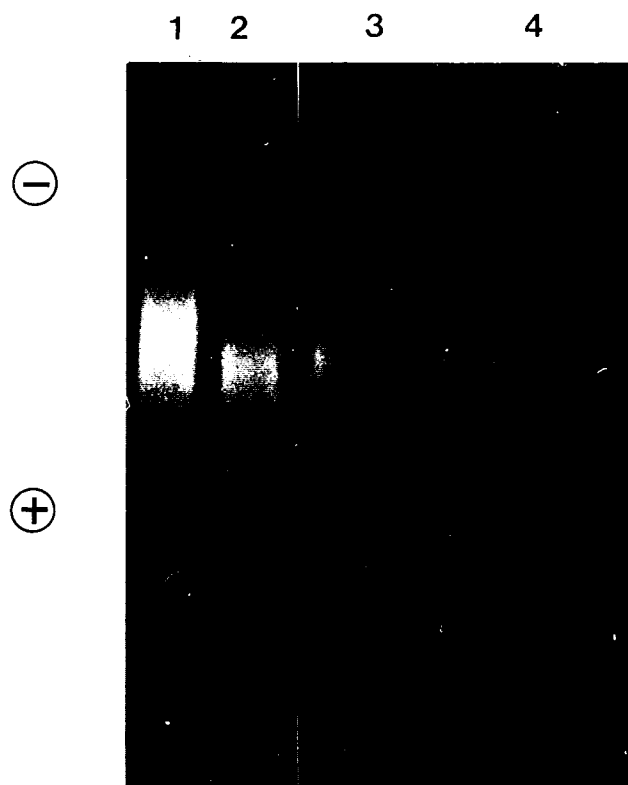
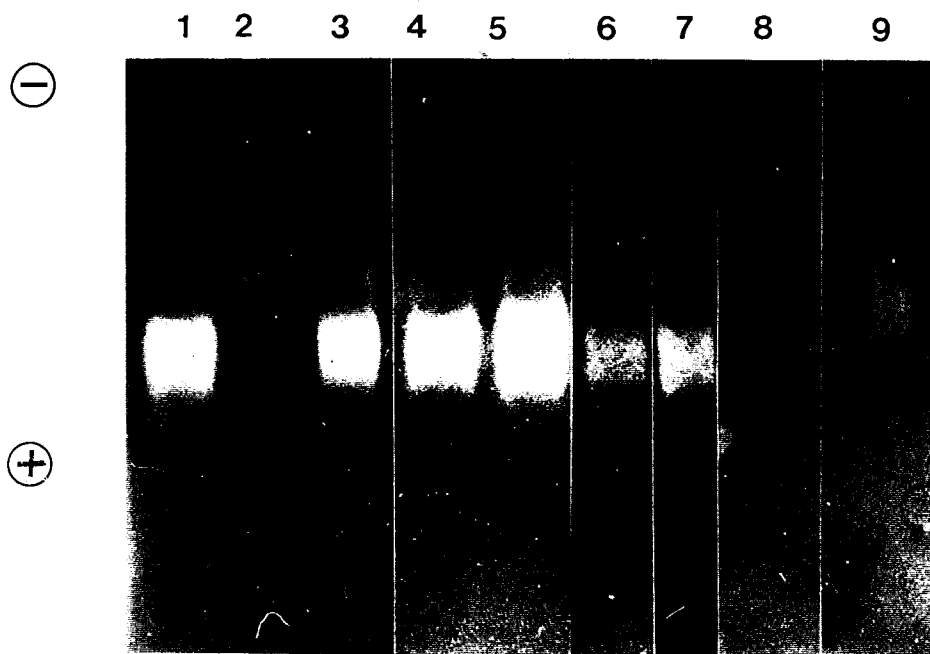
**Piste 1:** *P. falciparum* asynchrone (3U); **piste 2:** catalase d'hématie humaine (1U); **piste 3:** mélange d'un extrait de globule rouge humain (1U) avec un extrait de *P. falciparum* (3U); **piste 4:** *P. falciparum* asynchrone (3U); **piste 5:** *P. falciparum* asynchrone (4U); **piste 6:** *P. falciparum* asynchrone pur (2U); **piste 7:** *P. falciparum* au stade schizonte (2U); **piste 8:** catalase de globule rouge murin (2U); **piste 9:** *P. berghei* (2U).

Les signes + et - correspondent au sens de migration.

**Figure II. 22:** Mise en évidence de l'activité catalasique sur gel d'acrylamide après électrophorèse en condition native des protéines de *P. falciparum* éluées à 20 et 50 mM de phosphate en DEAE-Trisacryl. Le gel est un gradient continu de 7 à 20% d'acrylamide. La migration s'effectue à ampérage constant de 30 mA pendant 15 heures à 4°C. La révélation de l'activité catalasique est effectuée selon Clare *et al.*, (1984).

**Piste 1:** catalase de globule rouge humain (3U); **piste 2:** extrait brut de *P. falciparum* (2U); **piste 3:** fraction 20 mM de *P. falciparum* (2U); **piste 4:** fraction 50 mM de *P. falciparum* (2U).

Les signes (+) et (-) correspondent au sens de migration.



DEAE-Trisacryl.

## 2. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS PARASITAIRES.

Nous avons modifié légèrement la méthode de purification de la catalase humaine de Bonnaventura *et al.*, (1972) qui utilise une chromatographie d'échange d'anions (DEAE-cellulose, en tampon phosphate mono-disodique 1,5mM, pH 6,8). Dans ces conditions, la catalase exempte d'hémoglobine est éluée en un seul pic d'activité à 20 mM de phosphate. Nous avons modifié la concentration du tampon ainsi que son pH (5 mM de phosphate mono-disodique à pH 7) afin d'augmenter la stabilité du pH de la colonne.

### 2.1. Catalase de l'hématie humaine.

L'homogénat globulaire a été réalisé à partir d'hématies humaines stockées à 4°C.

5 mg de protéines, correspondant à 1300 unités de catalase ont été déposés sur la colonne de DEAE-Trisacryl, préalablement équilibrée en tampon phosphate de sodium 5 mM pH 7, ce qui empêche la rétention de l'hémoglobine par le gel. L'activité catalasique, exempte d'hémoglobine, est éluée par un tampon 20 mM de phosphate de sodium pH 7 (Fig. II. 20). Le rendement est de 80-90% de l'activité déposée sur la colonne. Aucun autre pic d'activité n'est élué à une concentration supérieure à 20 mM de phosphate.

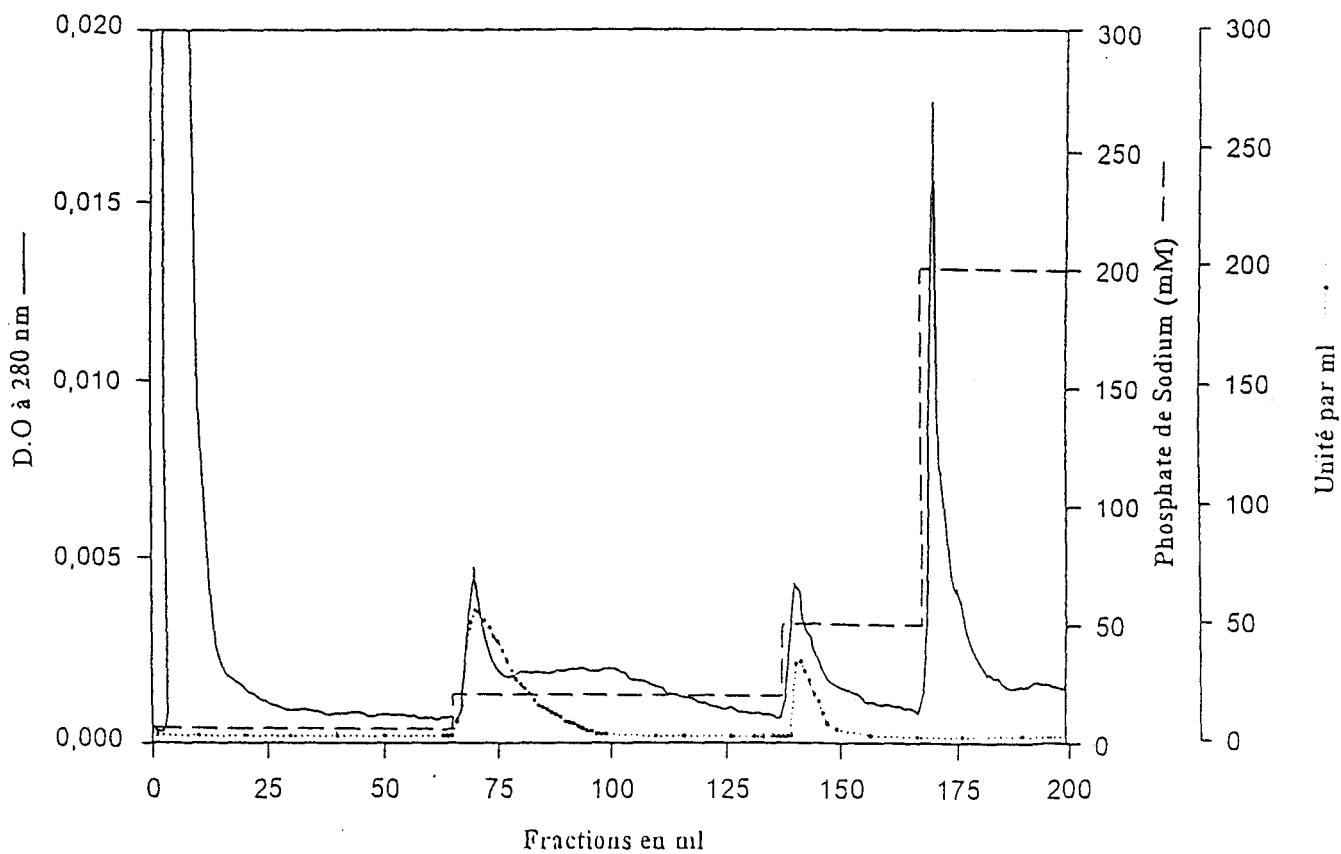
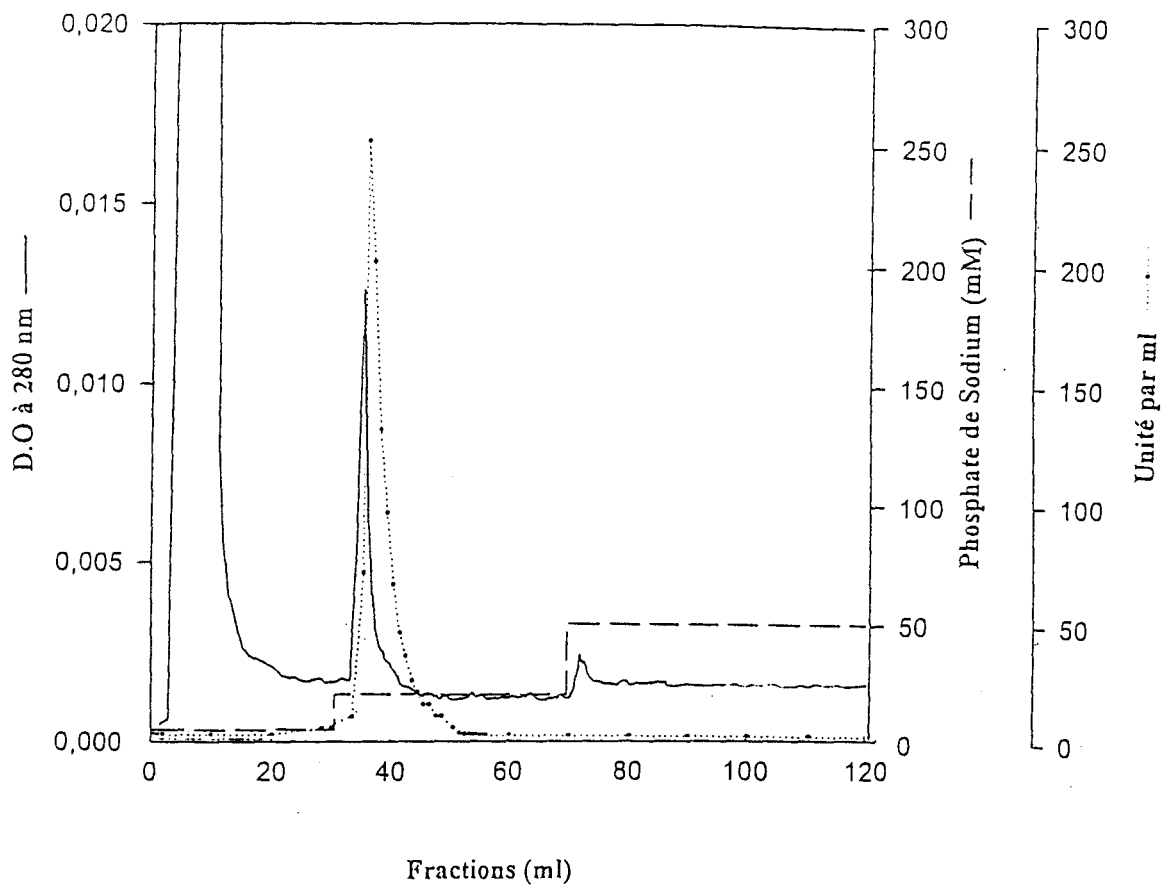
Nous avons étudié un extrait d'hématies saines ayant séjourné dans les conditions de culture de *P. falciparum* (incubation à 37°C en milieu RPMI complet, atmosphère contrôlée) pendant 5 jours, temps moyen d'obtention d'une culture de *P. falciparum*. La totalité de l'activité de la catalase humaine est éluée par le tampon 20 mM de phosphate de sodium pH 7, ce qui montre que la catalase de l'hématie n'est pas modifiée par les conditions de culture.

### 2.2. Extraits de *P. falciparum* en culture asynchrone.

2 mg de protéines parasitaires provenant d'une culture asynchrone, correspondant à 1300 unités de catalase ont été déposés sur la colonne. Deux pics d'activité sont élués: un pic majeur à 20 mM de phosphate de sodium et un pic mineur à 50 mM (Fig. II. 21). L'hémoglobine résiduelle contenue dans les extraits est éluée avec le tampon de départ. L'activité catalasique totale retrouvée est de l'ordre de 80-90 %. Dans ces 90 %, l'activité correspondante au pic de 50 mM est de l'ordre de 20 %. Aucun autre pic d'activité n'est détecté avec une concentration

**Figure II. 20 :** Chromatographie sur DEAE-Trisacryl d'un hémolysat d'hématies humaines. L'élution des protéines est suivie par la détection de l'absorbance à 280 nm (-). Les protéines sont éluées de la colonne par un palier de phosphate mono-disodique 5, 20 et 50 mM à pH 7 (- -). Activité catalasique (...).

**Figure II. 21 :** Chromatographie sur DEAE-Trisacryl d'un extrait de *P. falciparum*. L'élution des protéines est suivie par la détection de l'absorbance à 280 nm (-). Les protéines sont éluées de la colonne par un palier de phosphate mono-disodique 5, 20, 50 et 200 mM à pH 7 (- -). Activité catalasique (...).



supérieure à 50 mM de phosphate. Le pic d'activité à 20 mM de phosphate est très large, contrairement à celui de 50 mM de phosphate, où l'élué de la catalase se fait rapidement.

L'analyse des fractions éluées à 20 et 50 mM de phosphate sur un gel de 7-20% de polyacrylamide en condition native, montre une différence dans leur migration électrophorétique (Fig. II. 22). La fraction 20 mM (piste 1) migre plus lentement vers l'anode que la fraction 50 mM (piste 2). L'ensemble des deux taches d'activité correspond à la migration de l'activité totale d'un extrait de *P. falciparum* (piste 3).

### 2.3. Variation des profils chromatographiques en fonction du cycle cellulaire.

Une analyse chromatographique a été effectuée sur des extraits provenant de deux cultures synchrones à trois stades: anneaux, trophozoïtes et schizontes. Pour chaque stade, on observe une activité catalasique éluée à 50 mM de phosphate, et une activité éluée à 20 mM (Fig. II. 23). La fraction éluée à 50 mM de phosphate est très faible au stade anneau et représente 21% de l'activité catalasique totale des extraits. Au stade trophozoïte, l'activité éluée à 50 mM augmente, mais ne représente plus que 9 et 13% de l'activité totale des deux extraits analysés. Au stade schizonte, l'activité éluée à 50 mM est un peu plus faible qu'au stade trophozoïte, mais représente 17 et 23% des activités totales.

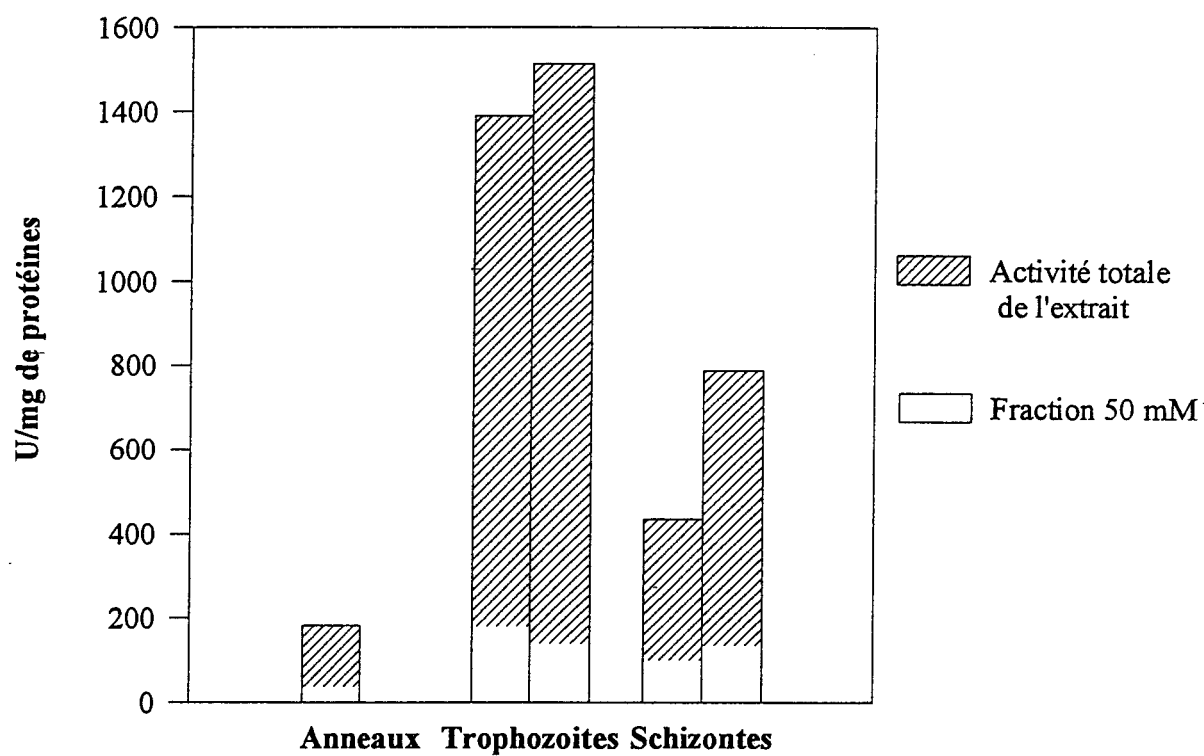
Cette variation de la proportion de l'activité de la fraction éluée à 50mM de phosphate dans l'activité totale des extraits est à rapprocher des études précédentes (dosage d'activité, étude immunologique de la catalase de l'hématie internalisée). Elle pouvait représenter la catalase endogène de *P. falciparum*. Nous avons essayé de la purifier.

### 2.4. Essai de purification de la catalase éluée en DEAE-Trisacryl à 50 mM de phosphate.

Nous avons poursuivi la purification de la fraction éluée à 50 mM de phosphate en déposant la fraction sur une colonne IMAC (Chromatographie d'affinité utilisant du métal immobilisé).

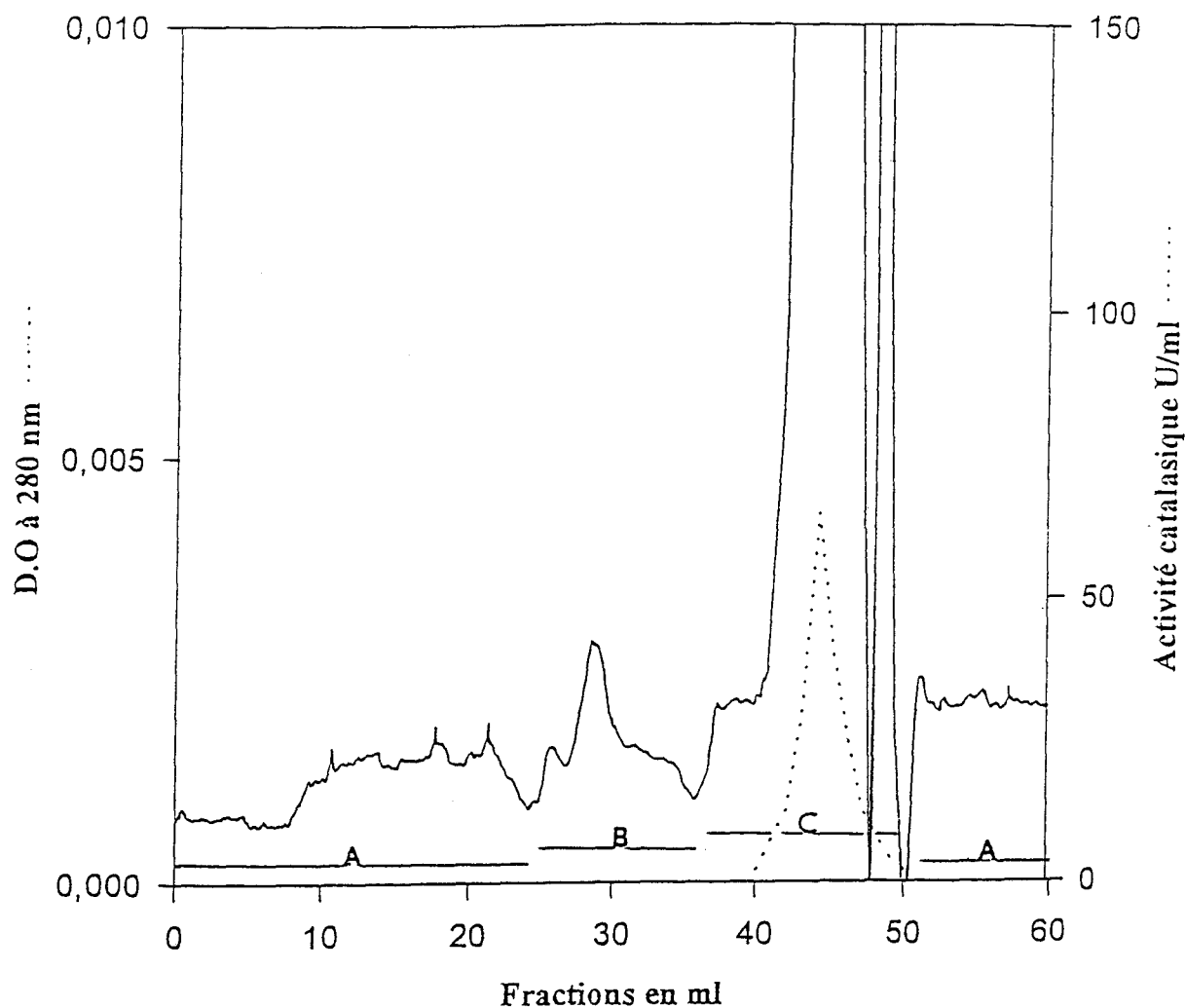
Un premier essai avec une colonne chargée en cuivre ne nous a pas permis d'élué correctement la protéine puisqu'une grande majorité reste fixée sur la colonne.

Une chromatographie sur une colonne chargée en zinc a permis, après élué par un tampon contenant 60 mM d'imidazole, d'obtenir une fraction contenant l'activité catalasique (Fig. II. 24). L'activité spécifique, après les deux étapes de chromatographie, a été multipliée par 41 fois, avec une perte de 84 % de l'activité initiale (Tableau II. 9).



**Figure II. 23 :** Représentation de la part de l'activité catalasique éluée à 50 mM de phosphate en chromatographie échangeuse d'ions (DEAE-Trisacryl), dans l'activité totale des extraits de *P. falciparum* au cours de son cycle cellulaire. Les résultats proviennent de deux cultures synchrones différentes. La manipulation a été réalisée une fois pour le stade anneau, deux fois pour les autres stades.





**Figure II. 24:** Chromatographie sur colonne IMAC de la fraction 50 mM d'un extrait de *P. falciparum*. Les protéines sont éluées de la colonne par un tampon 20 mM de phosphate mono-disodique pH 7, 1 M NaCl (**tampon A**), tampon 20 mM de phosphate mono-disodique pH 7, 0,5 M NH<sub>4</sub>Cl (**tampon B**) et par le tampon 20 mM de phosphate mono-disodique pH 7, 1 M NaCl contenant 60 mM d'imidazole (**tampon C**). L'activité catalasique est éluee par le tampon C (...). L'élution des protéines est suivie par la détection de l'absorbance à 280 nm (-). L'imidazole absorbe à 280 nm, ce qui explique le pic important retrouvé lors de l'élution des protéines avec le tampon C.

Etape de purification	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg pr.)
Homogénat brut	3,70	2400	631,57
Après échange d'ions	0,22	450	2045,45
Après IMAC	0,015	390	26000

**Tableau II. 9:** Bilan de la purification de l'activité catalasique de la fraction 50 mM de phosphate de *P. falciparum* obtenue en DEAE-Trisacryl.

La fraction obtenue après la chromatographie IMAC a été dialysée et concentrée. Elle a été ensuite soumise à une électrophorèse en conditions non dénaturantes. La bande correspondante à l'activité catalasique a été excisée et électroéluée.

L'éluat, analysé en SDS-PAGE, montre encore 8 bandes nettes très proches les unes des autres (Fig. II. 25). Aucune ne migre à la même hauteur que la catalase humaine de commerce.

Le matériel protéique obtenu après les différentes étapes de purification est très faible (0.1  $\mu\text{g}$ ). Il a donc été nécessaire de répéter plusieurs fois la purification à partir de quantités beaucoup plus importantes de protéines parasitaires pour tenter un séquençage N-terminal des bandes sensées correspondre à la catalase endogène.

La tentative de microséquençage N-terminal a été effectuée par J. van Beeumen et B. Samyn (Université de Gand). Elle a malheureusement échoué du fait du manque de matériel protéique disponible. Cette voie a été abandonnée puisqu'elle requiert une dépense trop importante de cultures et de temps exigent à la purification de la protéine. De plus, il existait un risque non négligeable de rencontrer une extrémité N-terminale bloquée empêchant toute détermination de séquence (cas souvent rencontré chez d'autres organismes).

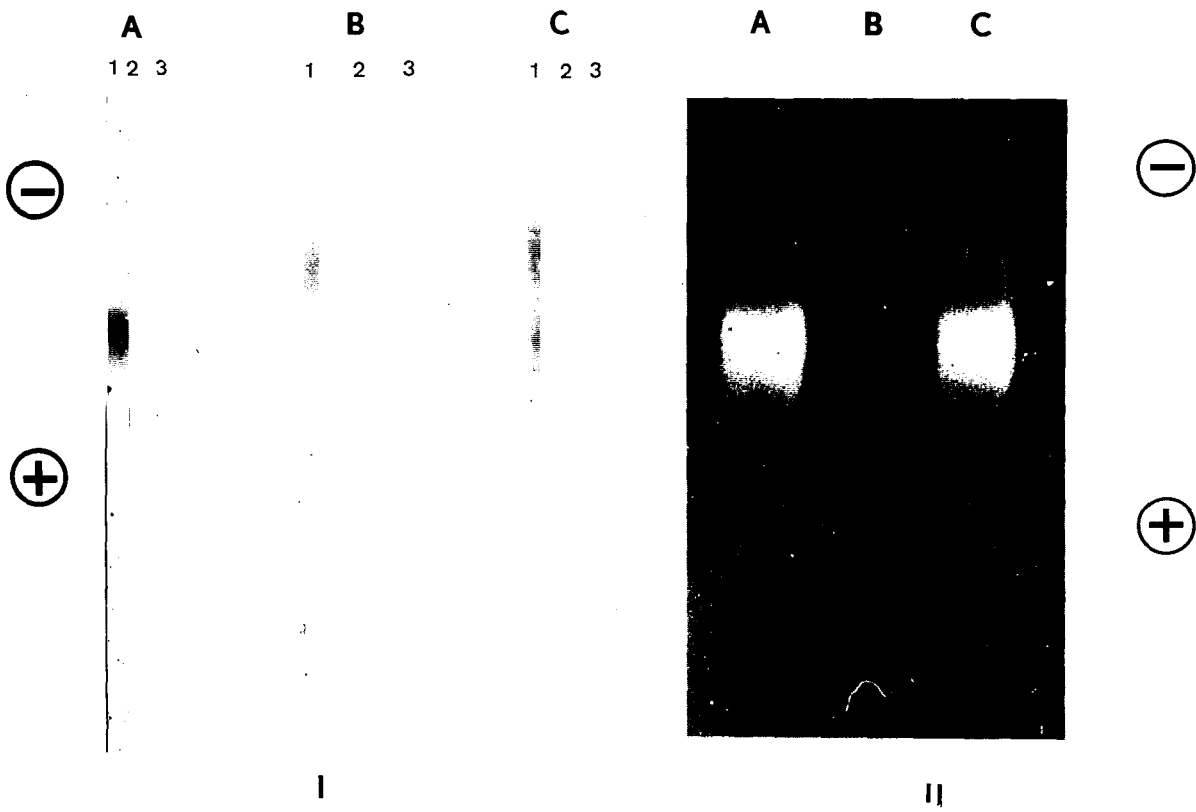
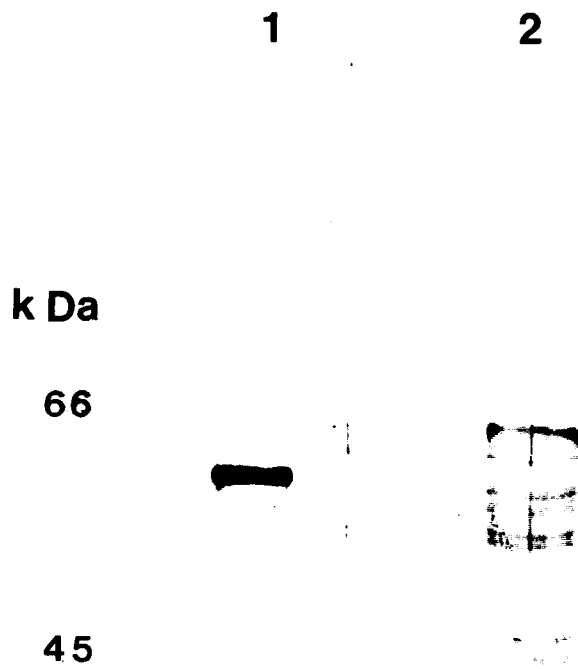
### 3. ANALYSE DES EXTRAITS DE *P. FALCIPARUM* PAR IMMUNOEMPREINTE.

Nous avons étudié les protéines reconnues en immunoempreinte par les anticorps anti-catalase utilisés précédemment.

**Figure II. 25 :** Analyse en SDS-PAGE en condition réductrice de la fraction 50 mM après deux étapes de purification: chromatographie sur une colonne IMAC et électroélution après séparation par électrophorèse en condition native (PAGE). Les protéines sont colorées au nitrate d'argent. **Piste 1:** témoin catalase humaine de commerce; **piste 2:** fraction 50 mM purifiée. Nous pouvons observer huit protéines possédant un poids moléculaire proche de celui de la catalase humaine.

**Figure II. 26 :** Immunoempreinte réalisée à partir d'un gel d'acrylamide non dénaturant à gradient continu (de 7 à 20% d'acrylamide). Après migration à 30 mA pendant 15 heures à 4°C, le gel est découpé en deux. Une partie du gel est utilisée pour l'immunoempreinte, révélée par l'anticorps polyclonal (**photo I**), la seconde est utilisée pour la mise en évidence de l'activité catalasique (**photo II**).

**Pistes A:** extrait de *P. falciparum* (5 U); **pistes B:** extrait de globule rouge humain (5 U); **pistes C:** mélange d'un extrait de globule rouge humain (5 U) avec un extrait de *P. falciparum* (5 U). **Bandes 1:** anticorps polyclonal dilué au 1/50 °; **bandes 2:** sérum préimmun dilué au 1/50 ; **bandes 3:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de rat, marquée à la phosphatase alcaline. Les signes (+) et (-) correspondent au sens de la migration.



### 3.1. Immunoempreinte réalisée à partir de gels non dénaturants.

Un transfert réalisé à partir d'une électrophorèse native d'un extrait parasitaire a été révélé par l'anticorps polyclonal de rat. Celui-ci reconnaît deux protéines correspondant aux deux taches d'activité distinctes observées avec la catalase de l'hématie et l'extrait parasitaire (Fig. II. 26).

### 3.2. Immunoempreintes réalisées à partir de SDS-PAGE.

#### 3.2.1. Extraits de cultures asynchrones.

30 unités d'activité catalasique, contenues dans un extrait parasitaire dénaturé par du DTT ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, après une séparation en SDS-PAGE à 10% d'acrylamide. Les trois anticorps utilisés reconnaissent quatre bandes d'intensités différentes, de poids moléculaire inférieur à celui de la catalase humaine (Fig. II. 27). La bande la plus intense est située à environ 1 kDa sous la bande de la catalase humaine dont le poids moléculaire est de 58 kDa. Les trois autres bandes de plus faibles intensités sont situées approximativement à 56, 55 et 54 kDa. Si nous ajoutons, dans l'extrait parasitaire, 10 unités de catalase humaine, nous révélons bien une cinquième bande située au dessus des quatre autres (►).

L'anticorps polyclonal reconnaît en outre une sixième bande située approximativement à 40 kDa (Fig. II. 27, →).

Nous avons vérifié que les conditions de préparation du lysat parasitaire ne sont pas la cause de la présence des quatre bandes retrouvées dans les extraits de *P. falciparum*. Nous avons ainsi lysé les hématies parasitées en présence de 10 mM d'EDTA, puis traité le culot parasitaire directement en tampon de reprise électrophorétique contenant 0,1 M de DTT. Après centrifugation, le surnageant séparé en SDS-PAGE (gradient de 10 à 15% d'acrylamide) et analysé par immunoempreinte, montre des bandes semblables à celles observées précédemment (Fig. II. 28) et reconnues par les trois anticorps. Ces anticorps ne révèlent pas de bandes de bas poids moléculaires à l'exception de celle à 40 kDa.

**Figure II. 27:** Analyse par immunoempreinte des extraits de *P. falciparum* provenant d'une culture asynchrone. L'immunoempreinte est réalisée après électrophorèse SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide en condition réductrice.

**Bandes A:** extrait de globule rouge humain (10U); **bandes B:** extrait de *P. falciparum* (10U); **bandes C:** mélange d'un extrait de globule rouge humain (10 U) avec un extrait de *P. falciparum* (10 U).

**Bandes 1:** anticorps polyclonal dilué au 1/50 °; **bandes 2:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de rat, marquée à la phosphatase alcaline; **bandes 3:** sérum préimmun dilué au 1/50 °; **bandes 4:** anticorps monoclonal 17E10 dilué au 1/4; **bandes 5:** anticorps monoclonal 10B12H9 dilué au 1/4; **bandes 6:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de souris, marquée à la phosphatase alcaline. La flèche (→) indique la présence d'un produit de dégradation de la catalase humaine.

La flèche (►) indique la présence de la catalase humaine dans l'extrait parasitaire.

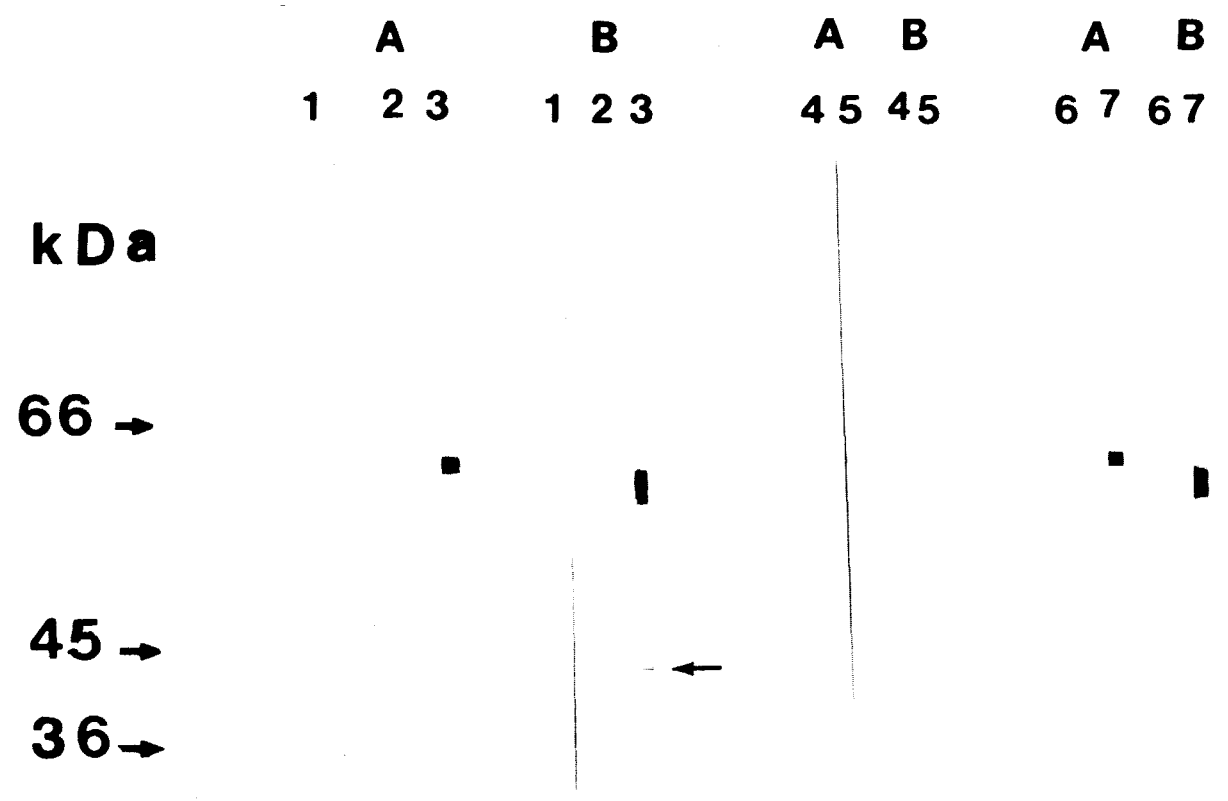
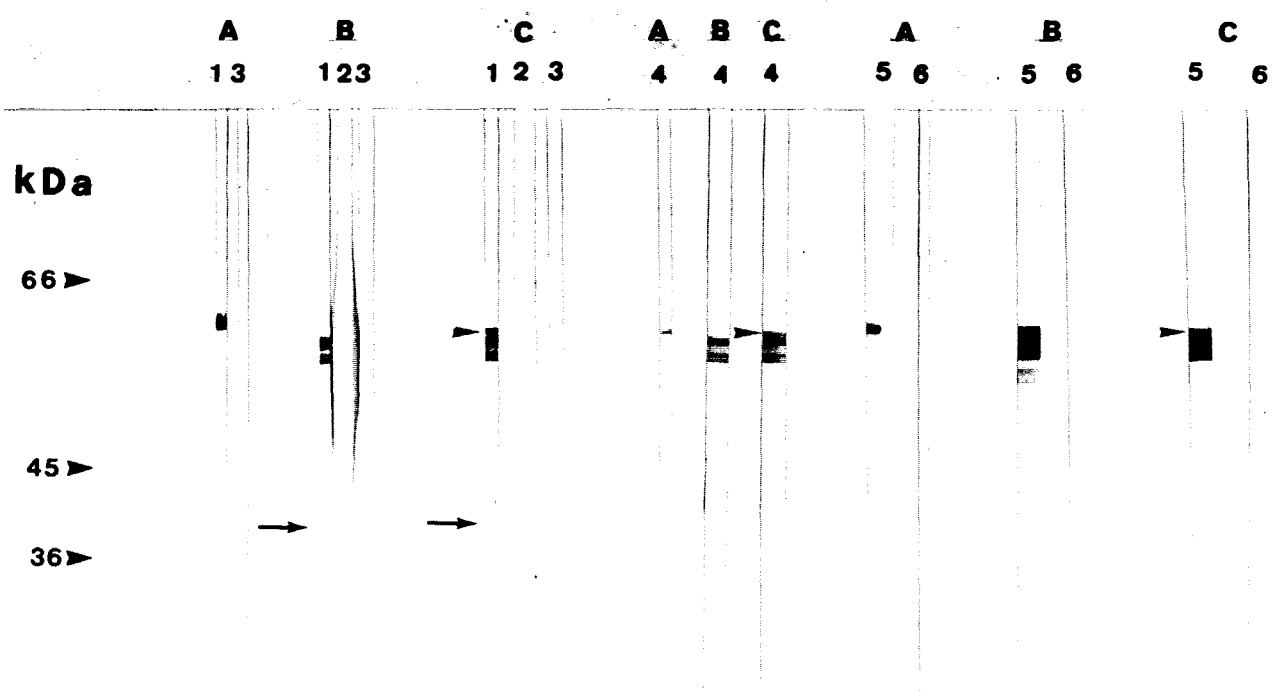
Les masses moléculaires (kDa) sont reportées en marge.

**Figure II. 28:** Immunoempreinte réalisée après électrophorèse SDS-PAGE en gradient continu de 10% à 15% d'acrylamide en condition réductrice. Les extraits parasitaires et humains ont été préparé en présence de 10 mM d'EDTA, puis traités directement en tampon de reprise électrophorétique contenant 0,1 M de DTT.

**Bandes A:** extrait de globule rouge humain; **bandes B:** extrait de *P. falciparum*.

**Bandes 1:** sérum préimmun dilué au 1/50 °; **bandes 2:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de rat, marquée à la phosphatase alcaline; **Bandes 3:** anticorps polyclonal dilué au 1/50 °; **bandes 4 et 6:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de souris, marquée à la phosphatase alcaline; **bandes 5:** anticorps monoclonal 17E10 dilué au 1/4; **bande 7:** anticorps monoclonal dilué au 1/4; La flèche (→) indique la présence d'un produit de dégradation de la catalase humaine.

Les masses moléculaires (kDa) sont reportées en marge.



Les trois anticorps reconnaissent par immunoempreinte dans la fraction éluée à 20 mM de phosphate lors de la chromatographie en DEAE-Trisacryl trois des quatre bandes reconnues dans les extraits bruts de *P. falciparum*, en particulier la bande à 57 kDa et plus faiblement la bande à 55 kDa (**Fig. II. 29**). Seul l'anticorps 10B12H9 reconnaît la bande à 54 kDa. La quantité de protéines recueillie dans la fraction 50 mM de phosphate n'a pas été suffisante pour pouvoir effectuer une immunoempreinte correcte.

### 3.2.2. Extraits préparés à différents stades du cycle cellulaire.

Pour mieux différencier les activités catalasiques présentes dans les extraits, nous avons travaillé à biomasse parasitaire constante. Pour ce faire, nous avons déposé une quantité d'activité glutamate déshydrogénase identique à partir d'extraits de *P. falciparum* provenant des trois stades parasitaires. Dans ces conditions l'activité catalasique déposée au stade anneau est de 20 unités, au stade trophozoïte 38 unités et au stade schizonte 22 unités.

Les trois anticorps utilisés mettent en évidence les quatre bandes, situées sous la catalase humaine (**Fig. II. 30**). Au stade anneau, l'anticorps polyclonal à la dilution au 1/50<sup>e</sup> reconnaît plus intensément la bande de 57 kDa, située juste en dessous de la catalase humaine (**Fig. II. 30A**). Les trois autres bandes sont faiblement reconnues. Au stade trophozoïte, cette bande de 57 kDa paraît plus intense qu'au stade anneau, de même que les trois autres bandes. L'anticorps polyclonal reconnaît la bande située à 40 kDa à partir du stade trophozoïte.

L'anticorps monoclonal 10B12H9 à la dilution au 1/4 reconnaît avec la même intensité et à tous les stades les quatre bandes (**Fig. II. 30**). L'anticorps monoclonal 17E10, à la même dilution reconnaît très faiblement les quatre bandes au stade anneau (**Fig. II. 30**). L'intensité du marquage augmente au stade trophozoïte avec essentiellement les bandes 57 et 55 kDa fortement reconnues. Au stade schizonte, l'intensité de la réponse est faible.

### 3.3. Discussion.

Nos trois anticorps mettent en évidence chez *P. falciparum* un groupe de quatre bandes dont les poids moléculaires sont inférieurs à celui de la catalase humaine (bandes à 57, 56, 55 et 54 kDa). Ces bandes ne résultent pas d'une dégradation de la catalase humaine lors de la préparation des extraits.

Dans les extraits parasitaires, au poids moléculaire correspondant à celui de la catalase humaine, les anticorps ne révèlent qu'une bande de faible intensité. L'activité catalasique présente



**Figure II. 29:** Analyse par immunoempreinte de la fraction 20 mM de phosphate de *P. falciparum*. L'immunoempreinte est réalisée après électrophorèse SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide en condition réductrice.

**Bandes A:** extrait de globule rouge humain; **bandes B:** extrait brut de *P. falciparum*; **bandes C:** fraction éluée à 20 mM de phosphate de sodium en DEAE-Trisacryl.

**Bandes 1:** anticorps polyclonal dilué au 1/50 °; **bandes 2:** sérum préimmun dilué au 1/50 ; **bandes 3:** anticorps monoclonal 17E10 dilué au 1/4; **bandes 4:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de souris, marquée à la phosphatase alcaline; **bandes 5:** anticorps monoclonal dilué au 1/4.

Les masses moléculaires (kDa) sont reportées en marge.

**Figure II. 31:** Immunoprécipitation de la catalase de *P. falciparum* à partir d'un extrait parasite marqué à l'isoleucine tritiée. Le marquage métabolique a été réalisé pendant 10 heures à partir d'une culture synchrone au stade jeune trophozoïte. L'immunoprécipitation a été effectuée à l'aide de l'anticorps polyclonal.

**Photo A:** autoradiographie;

**Photo B:** profils électrophorétiques des immunoprécipitations.

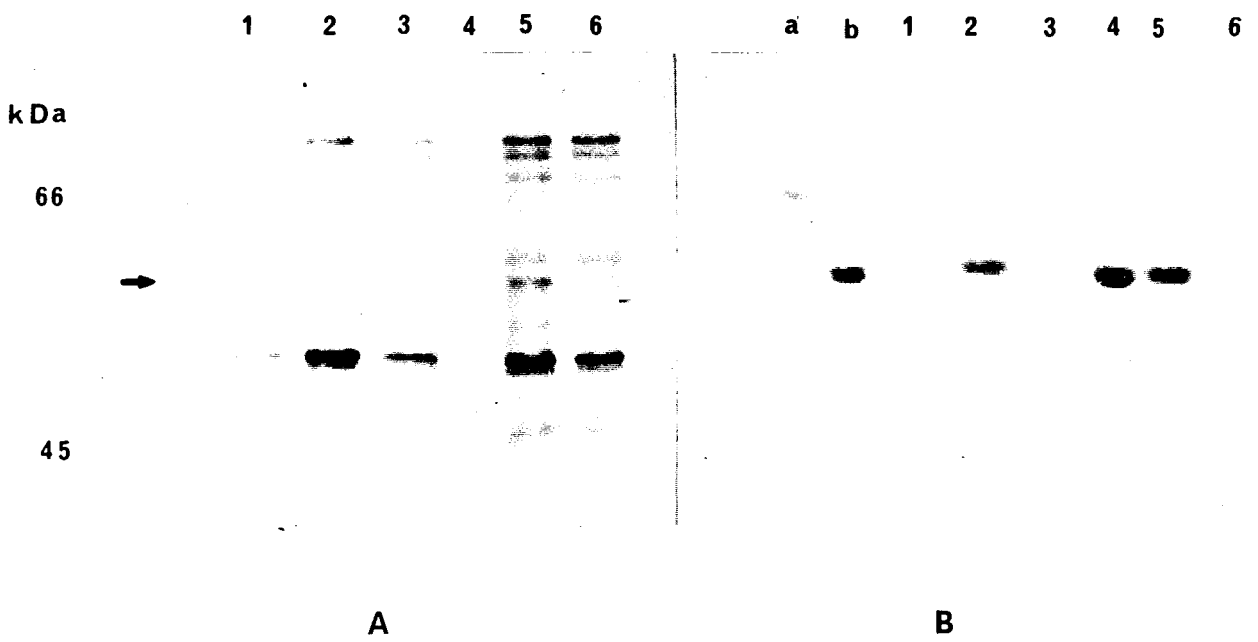
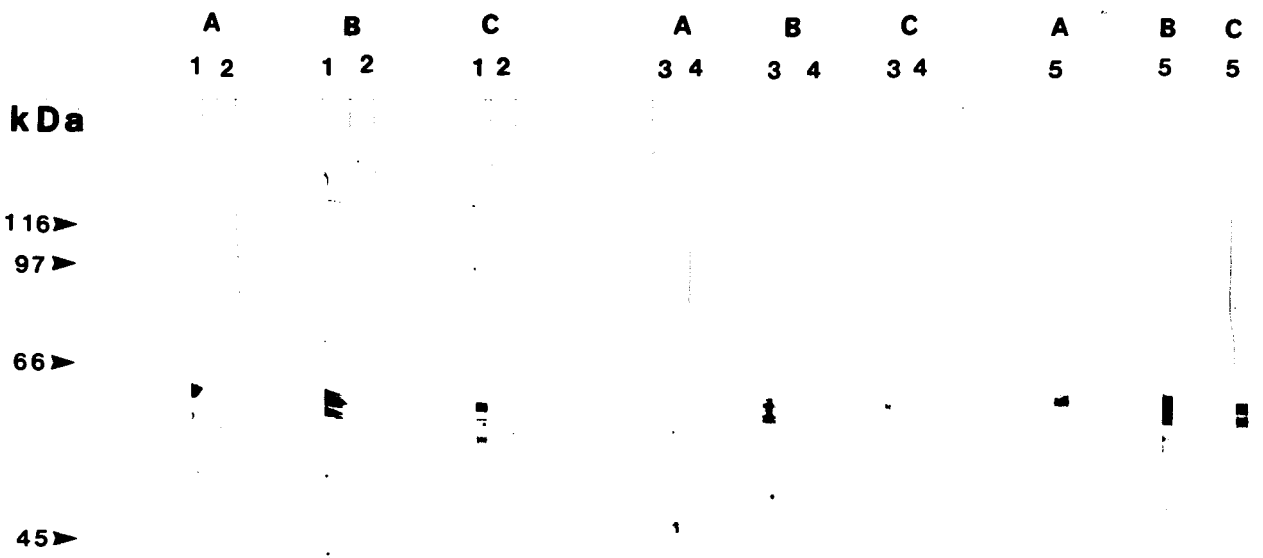
**Pistes 1:** sérum préimmun; **pistes 2:** sérum immun avec  $3 \cdot 10^6$  cpm; **pistes 3:** sérum immun avec  $3 \cdot 10^6$  cpm, en compétition avec de la catalase humaine de commerce; **pistes 4:** catalase humaine de commerce; **pistes 5:** sérum immun avec  $10^7$  cpm; **pistes 6:** sérum immun avec  $10^7$  cpm, en compétition avec de la catalase humaine de commerce. Nous pouvons remarquer que les bandes contaminantes visibles sur la photo A, ne sont pas atténuées par l'ajout de la catalase humaine (pistes 2,3, 5 et 6).

**Piste a:** témoin de masse moléculaire. Seul le témoin à 66 kDa est visible.

Nous avons introduit dans les dépôts des pistes 2 et 5 de la catalase humaine de commerce, visible sur la photo B, afin de mieux localiser la bande immunoprécipitée.

La flèche (→) indique la présence de la catalase de *P. falciparum* immunoprécipitée.

Les masses moléculaires (kDa) sont reportées en marge.



dans les extraits parasitaires correspondrait ainsi à des protéines de poids moléculaire différents de celui de la catalase humaine.

Parmi ces bandes, il est possible d'envisager la présence de la catalase endogène de *Plasmodium*, à condition qu'elle présente un déterminant antigénique commun avec la catalase de l'hématie (notre étude préalable nous a montré que les anticorps utilisés n'étaient pas rigoureusement spécifiques). L'anticorps polyclonal reconnaît dans un extrait de *P. falciparum* en immunoempreinte réalisée à partir d'une électrophorèse native la catalase dont la migration est différente de celle de l'hématie. Ceci nous a incité à tenter une immunoprécipitation de la catalase de *P. falciparum* à l'aide de cet anticorps polyclonal, après marquage des protéines parasitaires.

#### **4. IMMUNOPRECIPITATION DE LA CATALASE DE *P. FALCIPARUM* APRES MARQUAGE RADIOACTIF DES PROTEINES PARASITAIRES.**

A partir d'un extrait de *P. falciparum* marqué à l'isoleucine tritiée (deux aliquots contenant respectivement  $3.10^6$  et  $10^7$  cpm), nous avons réalisé l'immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps polyclonal en absence ou en présence de catalase humaine purifiée de commerce pour s'assurer de la spécificité de la bande immunoprécipitée. Le marquage métabolique a été réalisé pendant 10 heures sur une culture synchrone à partir du stade jeune trophozoite. Après lavage et élution, les échantillons ont été soumis à une électrophorèse en SDS-PAGE. Après autoradiographie (Fig.II. 31), on constate qu'une bande immunoprécipitée par l'anticorps en absence de catalase humaine disparaît quand on ajoute celle-ci en excès dans l'extrait. Cette bande a un poids moléculaire très proche, mais inférieur à celui de la catalase humaine. Elle correspond à la bande de 57 kDa reconnue par les anticorps en immunoempreinte et absente des extraits d'hématies saines. Il ne peut s'agir d'une protéine de l'hématie, car elle est marquée. Il s'agit donc probablement de la catalase endogène de *Plasmodium falciparum* qui a été reconnue par l'anticorps polyclonal de rat.

#### **5. DISCUSSION.**

L'activité catalasique contenue dans les extraits parasitaires de *P. falciparum* est éluée en chromatographie en DEAE-Trisacryl en deux pics d'activité, l'un à 20 mM de phosphate, comme pour la catalase humaine, et l'autre, absent dans l'extrait d'hématie humaine, à 50 mM de

**Figure II. 30:** Analyse par immunoempreinte des extraits de *P. falciparum* au cours de son cycle cellulaire. L'immunoempreinte est réalisée après électrophorèse SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide en condition réductrice. Les extraits parasitaires proviennent d'une même culture synchrone de *P. falciparum*.

**Bandes A:** extrait de globule rouge humain (10U); **bandes B:** stade anneau, 5 heures après la réinvasion (20U); **bandes C:** mélange d'un extrait d'hématie humaine (10 U) avec l'extrait de *P. falciparum* au stade anneau (20 U); **bandes D:** stade trophozoïte, 27 heures après la réinvasion (38 U); **bandes E:** mélange d'un extrait d'hématie humaine (10 U) avec l'extrait de *P. falciparum* au stade trophozoïte (38 U); **bandes F:** stade schizonte, 40 heures après la réinvasion (22 U); **bande F:** mélange d'un extrait d'hématie humaine (10 U) avec l'extrait de *P. falciparum* au stade schizonte (22 U).

**Photo I:** **Bandes 1:** anticorps polyclonal dilué au 1/50 °; **bandes 2:** sérum préimmun dilué au 1/50°.

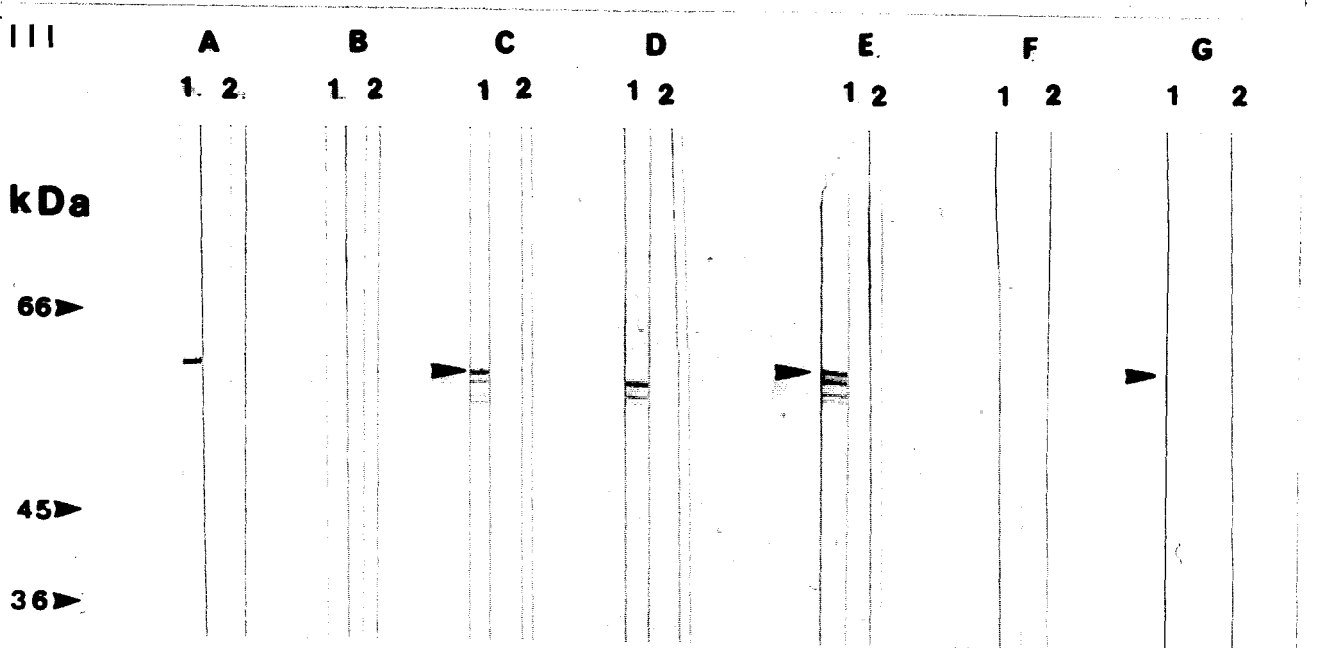
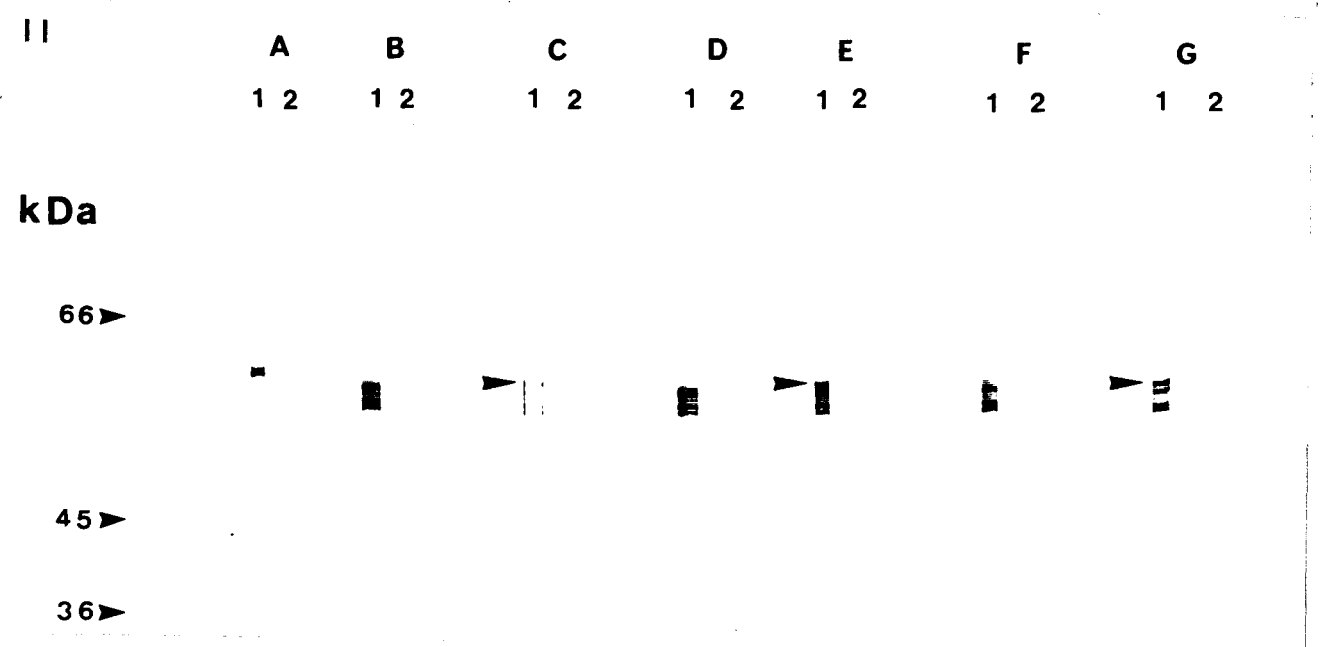
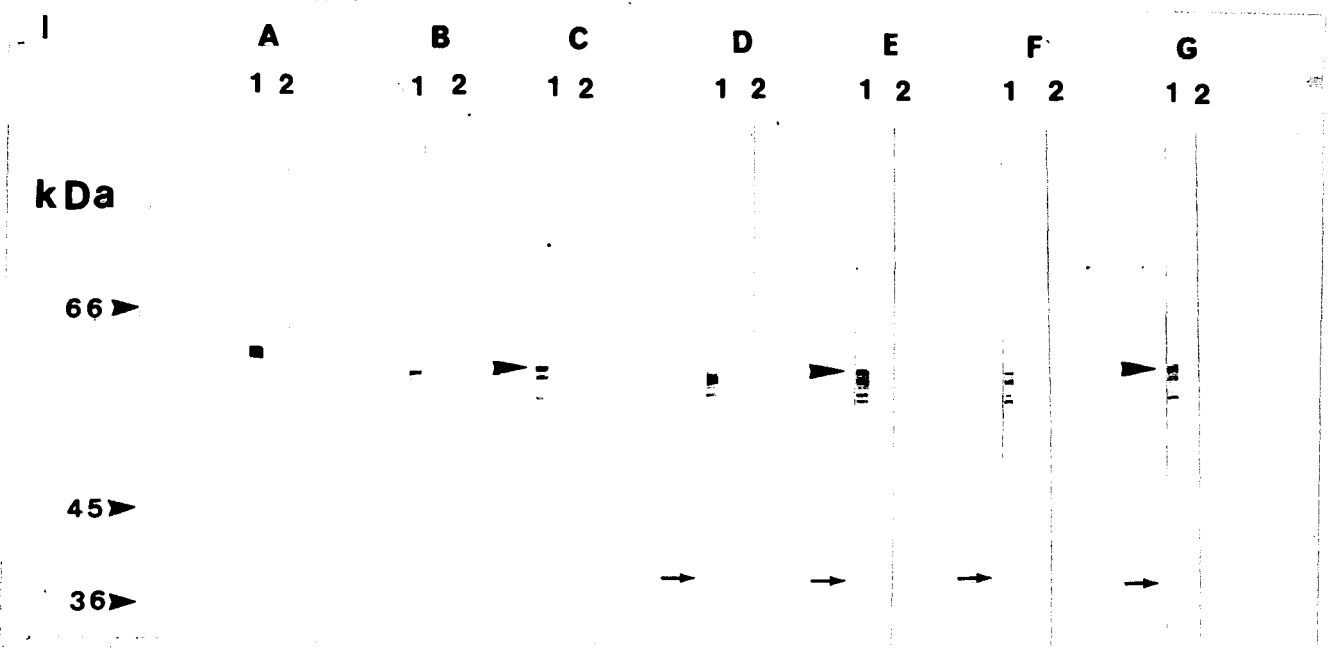
**Photo II:** **Bandes 1:** anticorps monoclonal 10B12H9 dilué au 1/4; **bandes 2:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de souris, marquée à la phosphatase alcaline.

**Photo III:** **Bandes 1:** anticorps monoclonal 17E10 dilué au 1/4; **bandes 2:** témoin conjugué anti-immunoglobuline de souris, marquée à la phosphatase alcaline.

La flèche (→) indique la présence d'un produit de dégradation de la catalase humaine.

La flèche (►) indique la présence de la catalase humaine dans l'extrait parasitaire.

Les masses moléculaires (kDa) sont reportées en marge.



phosphate. Mörikofer-Zwew *et al.*, (1969) ont purifié la catalase à partir d'hématies humaines en utilisant également une chromatographie d'échange d'anions (DEAE-cellulose) en tampon 1,5 mM de phosphate de sodium et potassium à pH 6,8. Dans ces conditions, ils éluent l'activité catalasique en deux pics à 12 mM de phosphate (fractions A et B). Un troisième pic d'activité est élué à 50 mM (fraction C). La quantité d'activité contenue dans le pic C est du même ordre de grandeur que celle contenue dans les deux autres fractions rassemblées. Lorsque la chromatographie est effectuée en absence d'oxygène (tampon saturé en azote, lyse des hématies en présence de 50 mM d'EDTA) la totalité de l'activité catalasique est élue à 12 mM en un seul pic d'activité (fraction A). Cette fraction est instable et tend spontanément à évoluer vers la fraction C. Quand la chromatographie est réalisée en condition oxydative (tampon saturé en oxygène), la totalité de l'activité catalasique est élue à 50 mM de phosphate (fraction C). Ces auteurs montrent également une forte différence dans la migration électrophorétique contenue dans les fractions A et C. La catalase contenue dans la fraction C migre ainsi plus rapidement vers l'anode que celle de la fraction A. Ces auteurs expliquent cette hétérogénéité de la catalase humaine par une oxydation des groupements SH de l'enzyme, qui contient 16 résidus de cystéine.

Cette hétérogénéité n'a pas été confirmée par Bonnaventura *et al.*, (1972) qui observent une faible élution (16%) de la quantité de la catalase humaine à 50 mM de phosphate monodisodique lorsque celle-ci a été stockée 9 semaines à 0°C après précipitation par le sulfate d'ammonium.

Dans nos conditions opératoires, la catalase humaine est éluee comme décrit par Bonnaventura *et al.*, (1972). Lorsque nous plaçons des hématies saines à 37°C sous 5% d'oxygène pendant 5 jours, l'activité catalasique est totalement éluee à 20 mM de phosphate. Nous ne détectons pas d'activité catalasique dans la fraction éluee à 50 mM. La présence d'une telle fraction dans l'extrait de *P. falciparum* peut correspondre soit à la présence d'une catalase endogène du parasite, soit à une modification de la catalase internalisée dans la vacuole digestive du parasite qui pourrait être semblable à celle proposée par Mörikofer-Zwew *et al.*, (1969). La vacuole étant le site de dégradation de l'hémoglobine, de la libération et de l'inactivation de la protoporphyrine IX dont on connaît les propriétés oxydantes, cette hypothèse n'est pas impossible à envisager.

La différence de migration électrophorétique de l'activité catalasique en condition native des fractions 20 et 50 mM confirme la présence chez *P. falciparum* de deux fractions catalasiques

en DEAE possédant des charges différentes. La différence dans la mobilité est toutefois inférieure à celle décrite par Mörikofer-Zwew *et al.*, (1969).

Les anticorps reconnaissent, tant dans l'extrait brut de *P. falciparum* que dans la fraction éluée à 20 mM, les mêmes bandes, à l'exception de celle de 56 kDa qui n'est pas reconnue dans l'éluat de 20 mM. Cette bande est, dans l'extrait brut parasitaire, faiblement représentée. Toutefois, les bandes reconnues se différencient nettement de la catalase de l'hématie. Certaines d'entre elles peuvent représenter des sous-unités de la catalase de l'hématie qui a été faiblement dégradée dans la vésicule digestive, sans que les déterminants antigéniques responsables de leur reconnaissance par les anticorps n'aient été détruits.

L'une d'entre elles (57 kDa), correspond probablement à la catalase parasitaire marquée et immunoprécipitée par l'anticorps polyclonal, et, dont l'immunoprécipitation est inhibée compétitivement par la catalase humaine.

Ce travail ne nous a pas permis de purifier et d'identifier par microséquençage N-terminal une protéine à activité catalasique qui pourrait être spécifique du parasite. Cependant, l'immunoprécipitation nous a permis de mettre en évidence une protéine parasitaire qui pourrait correspondre à une sous-unité de catalase, le poids moléculaire étant tout à fait compatible avec cette hypothèse.

Une approche en biologie moléculaire a été nécessaire pour confirmer définitivement la présence de la catalase chez *P. falciparum*.

### CHAPITRE III: APPROCHE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### 1. PROBLEMES POSES PAR L'APPROCHE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE.

La recherche du gène de la catalase de *P. falciparum* pouvait se heurter à deux difficultés majeures:

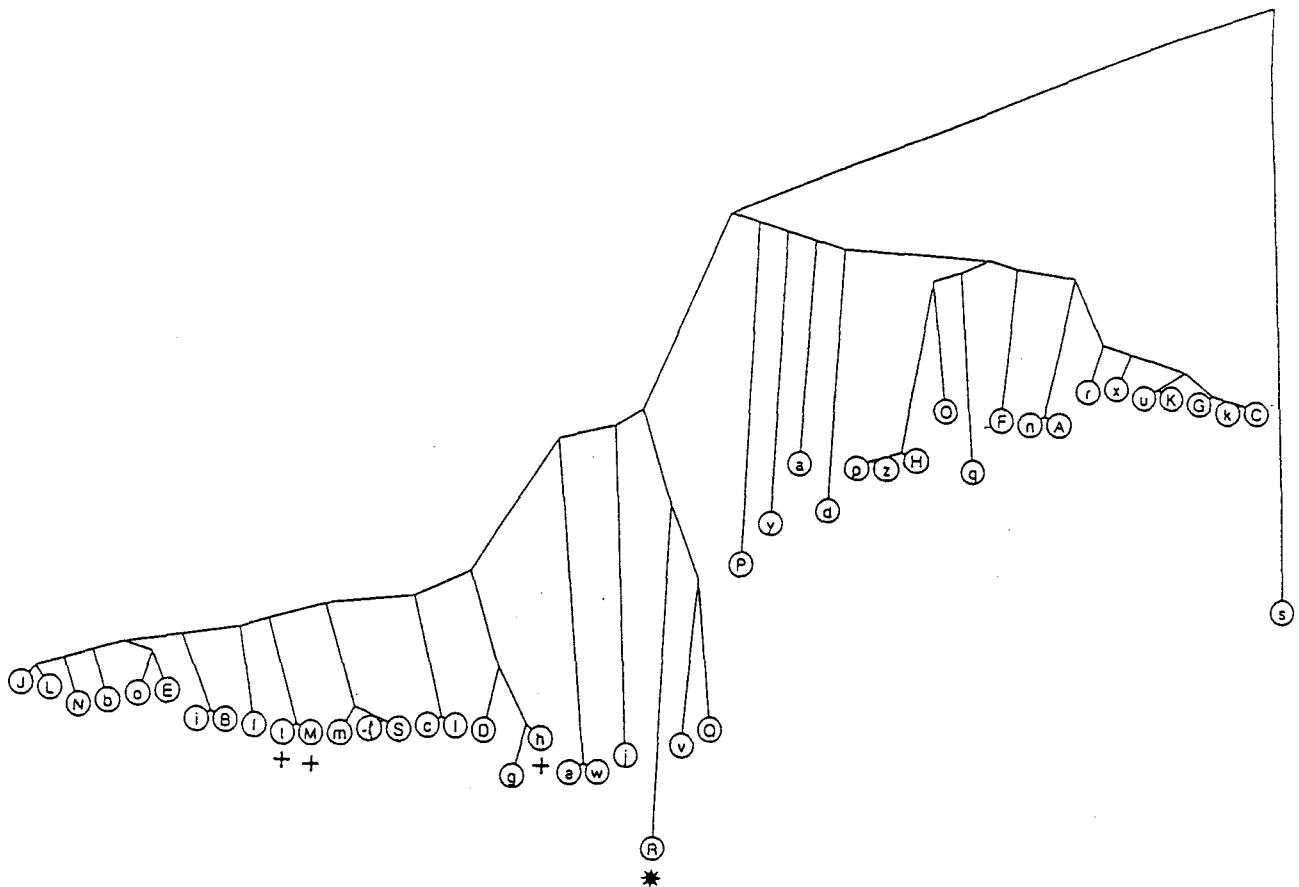
- la très grande variation de la séquence de l'enzyme, même chez des groupes vivants relativement proches sur le plan taxonomique;
- l'extrême morcellement du gène chez beaucoup d'espèces par la présence d'introns très longs pouvant représenter un obstacle à la réussite des amplifications lors de la PCR.

Nous avons pu collecter 45 séquences de catalase dans les différentes banques de données. Ces séquences ont été analysées grâce au logiciel DARWIN, selon Gonnet *et al.* (1992). Ce travail a été réalisé en collaboration avec J.P. Touzel (INRA Villeneuve d'Ascq). Les résultats montrent (Fig. II. 32) que les catalases s'individualisent en deux familles principales, mais les organismes n'apparaissent pas toujours regroupés dans chaque famille de façon cohérente d'après les données taxonomiques et phylogénétiques connues. Ainsi, on retrouve la catalase d'*Aspergillus niger* proche de celle des eubactéries (\*). Le maïs possède trois gènes différents de catalase, qui sont très dispersés (+). Seules les catalases de levure et de mammifères semblent former des groupes plus homogènes. Ceci peut s'expliquer par la présence de familles multigéniques chez plusieurs espèces (comme par exemple le maïs). Des phénomènes de saturation peuvent s'être également produits au cours de l'évolution et aboutir à une convergence de séquence entre les catalases d'organismes très différents.

Nous avons écarté les séquences appartenant à la famille regroupant les végétaux pour réaliser les alignements (Fig. II. 33). Ceux-ci révèlent un deuxième type de difficulté: il y a rarement plus de trois acides aminés conservés consécutifs sur l'ensemble des séquences, les résidus conservés étant plutôt séparés par des régions très variables.

De plus, le choix des séquences nucléiques pour la réalisation des amorces devait tenir compte de la présence possible d'introns. La plupart des gènes d'eucaryotes connus sont extrêmement morcelés (12 introns chez les mammifères), les introns pouvant atteindre une





**Figure II. 32:** Analyse comparative par le système DARWIN de 45 séquences protéiques de catalase. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR et GenBank sont indiquées.

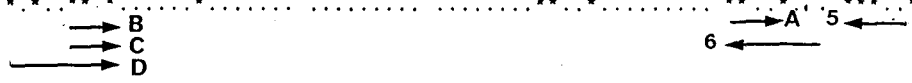
(\*): catalase d'*Aspergillus niger* regroupée parmi les séquences des eubactéries; (+): gènes de la catalase du maïs.

- a -- HTU02682 Haemophilus influenzae KW20 catalase (hktE)
- b -- HNNCATA Helianthus annuus
- c -- IBCATR Sweet potato
- d -- LBAKATA Lactobacillus sake
- e -- LISKAT Listeria seeligeri
- f -- MZECAT1 Z.mays catalase isozyyme 1 (CAT-1)
- g -- MZECAT3 Z.mays catalase isozyyme 3 (CAT-3)
- h -- MZECAT3GN Zea mays catalase (Cat3)
- i -- PSCATAL Pisum sativum
- j -- PSCATF Pseudomonas syringae pv. syringae 61 catalase isozyyme CatF
- k -- RATCATL Rat liver
- l -- SMCATSM Solanum melongena
- m -- TOMCAT1A Lycopersicon esculentum (cat1)
- n -- U00145 Drosophila melanogaster
- o -- VIRCAT Mung bean
- p -- YSACATPO Candida tropicalis peroxisomal
- q -- YSCCTA1A S.cerevisiae catalase A
- r -- A23646 Homo sapiens (man)
- s -- A25001-Penicillium sp.
- t -- A36062-maize
- u -- A36695-mouse
- v -- A39129HP11-Escherichia coli
- w -- A40367-Listeria seeligeri
- x -- CSBO-bovine
- y -- CSBYTT-yeast (Saccharomyces cerevisiae)
- z -- CSCKPT peroxisomal-yeast(Candida tropicalis)
- A -- CSFF-fruit fly (Drosophila melanogaster)
- B -- CSPM-garden pea
- C -- CSRT-rat
- D -- CSRZ-rice
- E -- CSSY-soybean
- F -- JH0532-Bacillus subtilis
- G -- JU0065-rat
- H -- S00231,peroxisomal-yeast(Candida tropicalis)
- I -- S07124-sweet potato
- J -- S10770-upland cotton
- K -- S13727-mouse
- L -- S17493-upland cotton
- M -- S18819-maize
- N -- S18972-Arabidopsis thaliana
- O -- S23422-yeast (Hansenula polymorpha)
- P -- S27264-Micrococcus luteus
- Q -- S27490-Bacillus firmus
- R -- S37384R-Aspergillus niger
- S -- S40265-eggplant

**Figure II. 33:** Alignement de 19 séquences protéiques de catalase après avoir écarté les séquences appartenant à la famille des végétaux et des catalases/peoxydases. Les références des séquences protéiques dans les bases de données PIR et GenBank sont indiquées. Les séquences, allant de 1 à 444 acides aminés sont montrées incomplètes dans leur partie C-terminale.

a -- HIU02682 Haemophilus influenzae KW20 catalase (hktE)  
b -- LBAKATA Lactobacillus sake  
c -- LISKAT Listeria seeligeri  
d -- PSCATF Pseudomonas syringae pv. syringae 61 catalase isozyme CatF  
e -- YSCCTA1A S.cerevisiae catalase A  
f -- A23646 Homo sapiens (man)  
g -- A39129HP11-Escherichia coli  
h -- A40367-Listeria seeligeri  
i -- CSBO-bovine  
j -- CSBYTT-yeast (Saccharomyces cerevisiae)  
k -- CSFF-fruit fly (Drosophila melanogaster)  
l -- JH0532-Bacillus subtilis  
m -- JU0065-rat  
n -- S00231,peroxisomal-yeast(Candida tropicalis)  
o -- S13727-mouse  
p -- S23422-yeast (Hansenula polymorpha)  
q -- S27264-Micrococcus luteus  
r -- S27490-Bacillus firmus  
s -- S37384R-Aspergillus niger

a - ----LTMGNGAPVADNQNLSLTAGPRGPLLAQDLWLNEKLAADFVREV I PERRMHAKGSGAGFTFTVTHDITKYTRAKI FSEVGGKKTMEFARFTTVAGERGAADAERDIRGFALKFYTEEGNWDLVGN
b - LTTNEGPWADNQHSQTAANAAPSLIQDYQLLEKLAHFNREI PERVHAKGAGRGYFKVTKDMSAYTAAVFSVGGKKTPLI TRFSQVAGEAGY P DTVRDRGFAVKFYTEEGNYDIVGN
e - ----GPLLQDYNLIDSLAHFNRENI PQRNPHAGSGAGFYFEVTDITDICSAMFSKIGKRTKCLTRFSTVGGDKGSADTVRDRGFAVKFYTEEGNLDWVYN
p - ----GPLLQDFKLIDTSHFDRERIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITDVCASAKFLDTVGGKTRIFTRFSTVGGEGKSADTARDPRGFATKFYTEDGNLDLVYN
n - ----GPLLQDFNLIDSLAHFDRERIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITDVCAAKFLDTVGGKTRIFTRFSTVGGELGSADTARDPRGFATKFYTEEGNLDLVYN
f - MADSRDPASDQMHWKEQRAAQKADVLTTGAGNVPVGDKNLITVGGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGADTVRDRGFAVKFYTEDGNWDLVGN
i - ADNRDPAASDQMKHWKEQRAAQKPDVLTGGGNPVGDKLNSLTVGGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGADTVRDRGFAVKFYTEDGNWDLVGN
m - MADSRDPASDQMKQWKEQRAAPQKPDVLTGGGNPVGDKLNIIMTAGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGADTVRDRGFAVKFYTEDGNWDLVGN
o - MSDSRDPASDQMKQWKEQRAASQRPDVLTTGGGNPVGDKLNIIMTAGSRGPLLVQDVVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGADTVRDRGFAVKFYTEDGNWDLVGN
k - RDAASNQLIDYKNSQTVS\_PGAITTTGNGAPIGIKDASQTVGPRGPLLVQDVVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITRYCAAKIFDKVKKRTPLAVRFSTVAGESGADTARDPRGFATKFYTEDGVWDLVGN
l - ----LTTSWGAPVGDNQNNSMTAGSRGPTLIQDVLHLEKLAHFNREIPERVVHAKGAGAGYFEVTDITRYCAAKIFDKVKKRTPLAVRFSTVAGESGADTARDPRGFATKFYTEEGNYDIVGN
j - ----PDGPILLQDFHLENIASFDRERIPERVVHAKGGCRLEFELTDSLSDITYAAPYQNVGKCPGLVRFSTVGGESGPTDARDPRGVSKFYTEWGNHWDVFN
q - ----NGAPAVSDRESLTVGSEGPVILHVDVHLETHQHFDRMNI PERRPHAKGSGAGYFEVTDVSSYTKALVFP\_EPGVETVELLRFSTVAGESGADTARDPRGFALRFYTEEGNYDIVGN
g - ----LTTNQGVRIADDQNSLRAGSRGPTLLEDFILREKITHFDHERI PERIVHARGSAAGHYFQVYKSLSDITKADFLSDPNKITPVFVRFSTVGGAGSADTARDPRGFATKFYTEEGIDLVGN
r - ----LTTNQGLKVSEDEFSLKAGERGPTLMEDFHFREKMTDFDHERI PERIVHARGFAAHGEFQVYDSMKEFTKAKFLQDPSVKTPVVFVRFSTVAGSKGSAETVRDARGFATKFYTEEGNYDLVGN
s - ----MTTDFGTPIS\_DQTSLKAGPRGPTLLEDFIFRQKLRQFDFHERVPERVHARGAGAGYFTKSYADNSNVTAAFLSANDKETPMFCRFTVVGFRGSVDTARDVHGHACRFYTEEGNYDIVGI
c - ----LTTNQGVPIGDNQNNSMTAGLKGPTLLEDFYVLEKLAHFDREIPERVVHARGAGAGHYFVTKSMKKTAKQFLQEGTETEVFAFSTVHGHQHSFETLRDPRGFATKFYTEEGNYDFVGN
h - ----LTTNQGVPIGDNQNNSMTAGLKGPTLLEDFYVLEKLAHFDREIPERVVHARGAGAGHYFVTKSMKKTAKQFLQEGTETEVFAFSTVHGHQHSFETLRDPRGFATKFYTEEGNYDFVGN
d - ----LTRDNGAVVGDNQNNSQTAGAQCPLVLLQDVLQKLRQFDRERIPERVVHARGAGHYFVTKSMKKTAKQFLQEGTETEVFAFSTVHGHQHSFETLRDPRGFATKFYTEDGNWDLVGN



a - NTPVFFLRDPRKFPDLNKAVKRDPRNTM\_\_RSA\_TNNWDFWTLFP\_\_EALHQVTVVMSDRGIPASRYRHMHGFGSHTYSFVNEAGERFVWKHFRTQQG IKNLTDAAEAEI IANDRESHQRDLVEA I ERGDFPKWTLFVQIMPEADA
b - NTPVFFVNDPLKFPDFIHSQKRDPRTHA\_\_RSQ\_DMQWDFWLSLP\_\_ESVHQVTILMSDRGIPASRYRHMHGFGSHTFKWVNAQGEQFVWIFHFKTNGIHNLSNELADELAGKDDTYLQNDLFDFAIETGDYPSWTVAVQLVLMKMA
e - NTPVFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_RDA\_DMFWDFLT\_TPENQVAIHQVMLFSDRGTTPANYSRHMHGFGSHTYKWSNKGNGYVQVHIFKTNLIEATK IAGSNPYCQDLFEA I QNGNYPSWTFYIQMTTERDA
p - NTPIFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_KDP\_NMFWDYLT\_A\_NDESLHQVMYLFSDRGTTPASRYRHMHGFGSHTYKWSNKGNGYVQVHIFANQGVHNLDEEAGRLAGEDPDHSTRDLWEA I KNGNYPSWTFYIQMTTERDA
n - NTPVFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_KDA\_NMFWDYLT\_T\_NEESVHQVMYLFSDRGTTPASRYRHMHGFGSHTYKWSNKGNGYVQVHIFISDQGIKTLTNEEAGSLAGSNPDYAQEDLFFKI I AAGNYPSWTFYIQMTTEAQA
f - NTPIFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_KDP\_DMVWDFWLSLRP\_\_ESLHQVSFLFSDRGIIPDGHRHMGYSGHTFKLNVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLQEDPDYGLRDLFNA I ATGNYPSWTFYIQMTTEAQA
i - NTPIFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_KDP\_DMVWDFWLSLRP\_\_ESLHQVSFLFSDRGIIPDGHRHMGYSGHTFKLNVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLQEDPDYGLRDLFNA I ATGNYPSWTFYIQMTTEAQA
m - NTPIFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_KDP\_DMVWDFWLSLRP\_\_ESLHQVSFLFSDRGIIPDGHRHMGYSGHTFKLNVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLQEDPDYGLRDLFNA I ASGNYPSWTFYIQMTTEAQA
o - NTPIFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_KDP\_DMVWDFWLSLRP\_\_ESLHQVSFLFSDRGIIPDGHRHMGYSGHTFKLNVNANGEAVYCKFHYKTDQGIKNLSVEDAARLQEDPDYGLRDLFNA I ANGNYPSWTFYIQMTTEAQA
k - NTPVFFIRDPKFPFPHIHTQKRNPTNL\_\_KDP\_DMFWDFLTLRP\_\_ESAHQVCILFSDRGTTPDGCHMNGYSGHTFKLINAKGEPYIYAKFHFKTDQGIKNLVDKVTADQLASTDPDYS I RDLVYR I KTKCFPSWTFYIQMTTEAQA
l - NTPVFFIRDAIKFPDFIHTQKRDPKTHL\_\_KNP\_TAVWDFWLSLP\_\_ESLHQVTILMSDRGIPATLRHMHGFGSHTFKWNAEPEGVWIKYHFKTEQGVKLDVNTAAKIAGENPDYHTEDLFNA I ENGDYPAWKLVYQIMPLEDA
j - NTPVFFLRDAIKFPVFIHSQKRDPSHLNQFDT\_TIYWDYLTLPN\_\_ESIHIYTMFGDRGTTPASWASMNAYSGHSFIMVNEKGDVTYVQFHVLSDTGFTLTDGKAAELSGSHPDYHTEDLFNA I ENGDYPAWKLVYQIMPLEDA
q - NTPIFFLRDPMKFTHFIRSQKRLPNSGL\_\_RDA\_TMEWDFWT\_\_NPNESAHQVTVYLMGPRGLPRTWREMDGYSGHTYLVVNAEGAKHVVKYHFIHQEGVHNLSDNEATQIAGENADPHRQDLFEV I AKGVFPKWNLY I QA I PYSQ
g - NTPIFFIQDAHKFPDFVHAVKPEPHWA I PQQSADHTFWDYVLSQP\_\_ETLHNVVMSDRGIPRSYRHMHGFGSHTFKWNAEPEGVWIKYHFKTEQGVKLDVNTAAKIAGENPDYHTEDLFNA I ENGDYPAWKLVYQIMPLEDA
r - NIPVFFIQDAIKFPDFVHAVKPEPHWEI PQAQSAHDTFWDYIANNQ\_\_ESAHMVVMSDRGIPRSYRHMHGFGSHTFKWNAEPEGVWIKYHFKTEQGVKLDVNTAAKIAGENPDYHTEDLFNA I ENGDYPAWKLVYQIMPLEDA
s - NFAPFFIQDAIQFVAVKPEPHWEI PQAATAHTSAWDFSSQS\_\_TALHSALWMSGNGIPRSYRHMNGYVHVSFRFVAANGTSKVVRTPWKSSQGVASLVWDEAQAAGKNSDYHRQDLVYAMPNGHY I KYELQAQIMDEADM
c - NTPVFFIRDAIKFPDFVHAVKPEPHWEI PQAATAHTSAWDFSSQS\_\_TALHSALWMSGNGIPRSYRHMNGYVHVSFRFVAANGTSKVVRTPWKSSQGVASLVWDEAQAAGKNSDYHRQDLVYAMPNGHY I KYELQAQIMDEADM
h - NTPVFFIRDAIKFPDFVHAVKPEPHWEI PQAATAHTSAWDFSSQS\_\_TALHSALWMSGNGIPRSYRHMNGYVHVSFRFVAANGTSKVVRTPWKSSQGVASLVWDEAQAAGKNSDYHRQDLVYAMPNGHY I KYELQAQIMDEADM
d - NTPVFFIRDAIKFPDFVHAVKPEPHWEI PQAATAHTSAWDFSSQS\_\_TALHSALWMSGNGIPRSYRHMNGYVHVSFRFVAANGTSKVVRTPWKSSQGVASLVWDEAQAAGKNSDYHRQDLVYAMPNGHY I KYELQAQIMDEADM

a - EKVPYHPFDLTKVWSKDYPLIEVGEFELNRPENFFADVEQSAFAPSNL\_VPGIGASPDRLQARLFNYADAQRYRL\_GVCYRQIPVN\_RPRC\_PVHSNQRDGGQVRDGTYG\_SLPHYEPNS
b - ELSPKDIFDVTKVISQKDYPLIEIQGMVLDENPTNFDIQLAFSPANL\_VPGIEASPDKLLQGRLFYKDAERYRL\_GANYEQLPVN\_RPKV\_PVHNYERDGM\_AQQA\_TGVNYPENS
e - KKLPFVFDLTKVWPQQCFPLRRVGKIVLNLNPLNFFAQVEQAAAFSPST\_VPYQEAADPVLQARLFYADAHRYRL\_GPNFHQIPVN\_CPYASKFFNPAI\_RDGPMNVNNGFN\_SEPTY----
p - KKLPFVFDLTKVWPQKDFPLRHFGRFTLNENPKNYAETEQIAFSPST\_VPGMEPSNDPQLQSRFLSYPDTHRHRL\_GPNYHQIPVN\_CPLKSGSFNPIN\_RDGPMNVNNGFN\_GTPNY----
n - KEAEFVFDLTKVWPQKDFPLRHFGRFTLNENPKNYAETEQIAFSPST\_VPHMEPSADPVLQSRFLSYPDTHRHRL\_GTNYTQIPVN\_CPVTVAVFNPHM\_RDGPMNVNNGFN\_NHPNY----
f - ETPFPNFDLTKVWPQKDYPLIPVGLVLRNRPVNYFAEVEQIAFDPSPM\_PPGIEASPDKMLQGRLFAYPDTHRHRL\_GPNYLHIIPVN\_CPYRAR\_VANYQRDGMCMQDNQG\_GAPNYYPNS
i - ETPFPNFDLTKVWPQKDYPLIPVGLVLRNRPVNYFAEVEQIAFDPSPM\_PPGIEASPDKMLQGRLFAYPDTHRHRL\_GPNYLQIPVN\_CPYRAR\_VANYQRDGMCMMDNQG\_GAPNYYPNS
m - ETPFPNFDLTKVWPQKDYPLIPVGLVLRNRPVNYFAEVEQIAFDPSPM\_PPGIEASPDKMLQGRLFAYPDTHRHRL\_GPNYLQIPVN\_CPYRAR\_VANYQRDGMCMMDNQG\_GAPNYYPNS
o - ETPFPNFDLTKVWPQKDYPLIPVGLVLRNRPVNYFAEVEQIAFDPSPM\_PPGIEASPDKMLQGRLFAYPDTHRHRL\_GPNYLQIPVN\_CPYRAR\_VANYQRDGMCMMDNQG\_GAPNYYPNS
k - KTKFYNFDVTKVWSQKEYPLIPVGMVLDNRNPKNYFAEVEQIAFSPAHL\_VPGVPEPSDKMLHGRFLSYSDTHRHRL\_GPNYLQIPVN\_CPYKVK\_IENFQRDGMNYTDNQG\_GAPNYYPNS
l - NTPVFFIRDAIKFPDFVHAVKPEPHWEI PQAATAHTSAWDFSSQS\_\_TALHSALWMSGNGIPRSYRHMNGYVHVSFRFVAANGTSKVVRTPWKSSQGVASLVWDEAQAAGKNSDYHRQDLVYAMPNGHY I KYELQAQIMDEADM
j - TKFRYSVMDLTKIWPHEKFLPKFGTITLTENVDNYFQIEQVAFSPTNTICIPGIKPSNDSVLQARLFYSDTHRHRL\_GANYQQLPVNRPRLGCPYSKSGSQYTAEQCFKAV\_NFQRDGM-----
q - KTYRFNFDLTKTISQANYPRIKVGVNTLNRNPKNFFAIESAASPSPN\_TVPGIGLSPDRMLGRAFAYHDAQLYR\_GAHVNLDPVNSP-----
g - KKFDFDLDPKTIPEELVPQVRGKMLNRPDNYFAEVEQIAFDPSPM\_VPGIDFTNDPDLQGRLFYSDTQI I SRLGPNFHEIPINRPTC\_PYHNFQRDGM\_M\_HRMGIDTNPANYEPNS
r - FNFDFDLDPTKIWPHEEVPVKIGKMTLNRNVDNYFAEVEQIAFDPSPM\_VPGIDFTNDPDLQGRLFYSDTQI I SRLGPNFHEIPINRPTC\_PYHNFQRDGM\_Y\_GROQINKGQVSYHKN
s - LRFGFDLDPKTIWPHEEVPVKIGKMTLNRNVDNYFAEVEQIAFDPSPM\_VPGIDFTNDPDLQGRLFYSDTQI I SRLGPNFHEIPINRPTC\_PYHNFQRDGM\_F\_QQQIPTNNWYTPNS
c - DNYDFNLDATKDFEDVFPYEHVGTMLNRPDNYFAEVEQIAFDPSPM\_VPGMLPSEDRVLQGRLFYSDTQI I SRLGPNFHEIPINRPTC\_PVDNNQRDGMFP\_KQQ\_TSSINYPENS
d - DNYDFNLDATKDFEDVFPYEHVGTMLNRPDNYFAEVEQIAFDPSPM\_VPGMLPSEDRVLQGRLFYSDTQI I SRLGPNFHEIPINRPTC\_PVDNNQRDGMFP\_KQQ\_TSSINYPENS

longueur de plusieurs kb. Nous savons que les introns sont en général peu nombreux et de petite taille chez *Plasmodium*. Toutefois, le risque d'avoir plusieurs introns dans une région du génôme à amplifier pouvait compromettre la réussite d'une amplification par PCR si la taille réelle de la partie à amplifier dépassait plusieurs kb.

Nous avons donc dû concevoir des amorces capables d'amplifier dans plusieurs régions du gène, et nous en avons dégénéré certaines, afin de nous assurer le maximum de chances de succès.

## 2. ESSAI D'AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT DU GÈNE DE LA CATALASE PAR PCR CHEZ *P. FALCIPARUM*.

### 2.1. Définition des amorces.

Amorces en extrémité 5' de l'ADN à amplifier

Nom	Séquence	Localisation
A	5'AGA GAT CCA AGA GG <sup>3'</sup> R D P R G	127-131
B	5'CAT GC(A,T) AGA GG <sup>3'</sup> H A R G	75-78
C	5'CAT GC(A,T) AAA GG <sup>3'</sup> H A K G	75-78
D	5'CC(T,A,C)GAA AGA GT(T,A)GT(T,A)CAT GC(T,A)A(A,G)A GG <sup>3'</sup> P E R V V H A (K,R) G	70-78

Amorces en extrémité 3' de l'ADN à amplifier

Nom	Séquence	Localisation
1	<sup>5'</sup> TGG TCC TAA TCT ATG <sup>3'</sup> H R L G P	372-376
2	<sup>5'</sup> ATC AGA GTA AGA AAA TAA <sup>3'</sup> L F S Y S D	363-368
3	<sup>5'</sup> ATC TCT (A,T)AT AAA AAA <sup>3'</sup> F F I R D	153-157
4	<sup>5'</sup> ATC TTG (A,T)AT AAA AAA <sup>3'</sup> F F I Q D	153-157
5	<sup>5'</sup> TC TTC (A,T,G)GT (A,G)TA AAA <sup>3'</sup> F Y T E (E,D)	136-140
6	<sup>5'</sup> GC AAA (A,T)CC TCT (T,A,G)GG ATC TCT <sup>3'</sup> R D P R G F A	127-133

## 2.2. Résultats.

Les amplifications ont été réalisées en modulant les conditions de cycle de température, la concentration en MgCl<sub>2</sub> et la quantité d'ADN de *P. falciparum* introduite dans les tubes de réaction. Les résultats globaux des essais d'amplification sont résumés dans le **tableau II. 10**: seules les combinaisons d'amorces D et 6 ont donné un résultat positif dans les conditions suivantes:

Quantité d'ADN: 500 ng

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM

concentration des amorces: 1 μM

t° d'hybridation des amorces: 50°C

nombre de cycles: 35

durée du cycle final: 5 mn

Amorces 5' 3'	A	B	C	D
1	-			
2	-			
3		-	-	
4		-	-	
5		-	-	
6		-	-	+

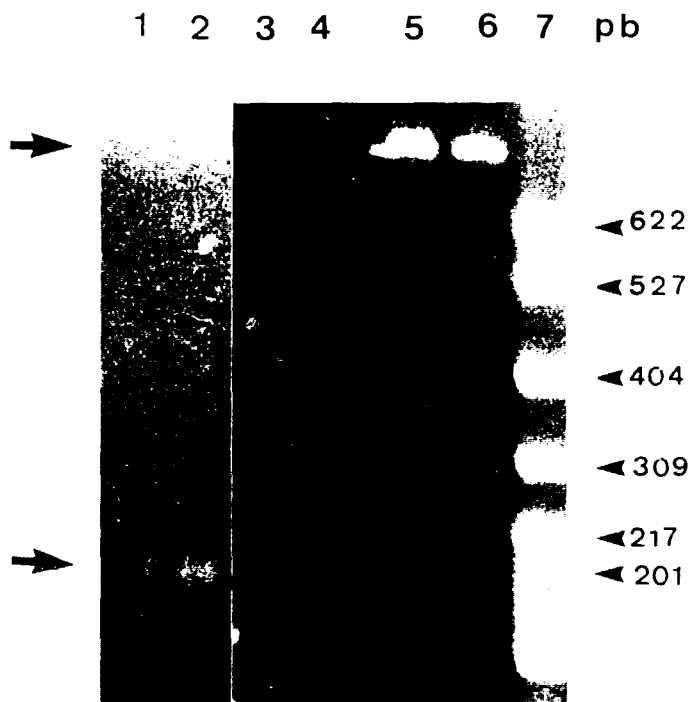
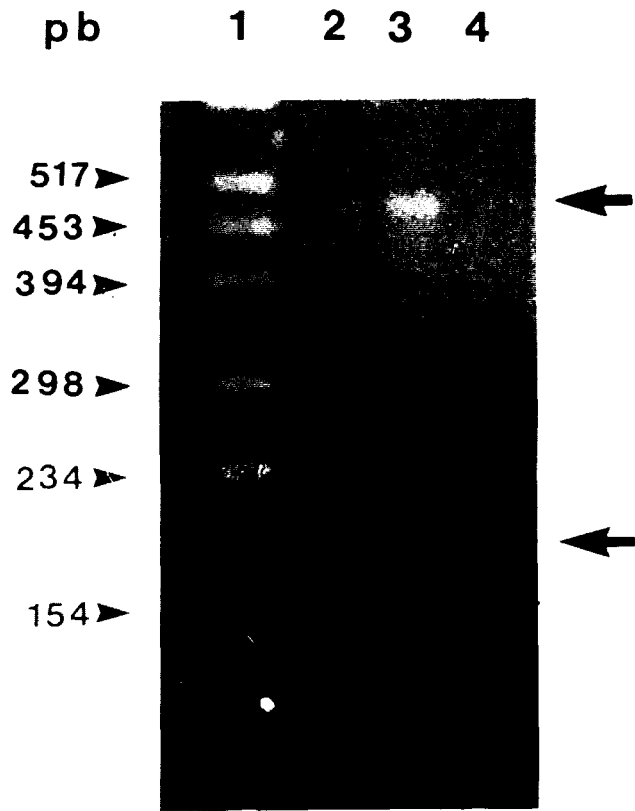
**Tableau II. 10:** Combinaisons des différentes amorces utilisées en PCR. Seule la combinaison de l'amorce D avec l'amorce 6, nous a permis d'amplifier un fragment du gène de la catalase de *P.falciparum*.

Dans ces conditions, on observe deux fragments amplifiés: le premier d'environ 500 pb et le second d'environ 200 pb (Fig. II. 34). Ce dernier correspond à la taille attendue s'il n'y a pas d'introns entre dans le fragment d'ADN génomique compris entre les amorces D et 6. Il a donc été cloné et séquencé en priorité. La séquence nucléotidique a été traduite en acides aminés (Fig. 35). La séquence peptidique (64 acides aminés) a été alignée avec 20 séquences de catalase (Fig. II. 36).

Les résultats montrent que le fragment amplifié présente 56 % de résidus AT, c'est à dire moins que ce qui est décrit classiquement pour *P. falciparum* (proche de 70%). Dans le gène humain, la partie du gène comprise entre les deux amorces présente deux introns de 1,6 et 1kb (Quan *et al.*, 1986). L'homologie entre la séquence en acides aminés du fragment de gène amplifié chez *P. falciparum* et la partie correspondante de la catalase humaine est de 74%. L'alignement montre plusieurs résidus homologues avec les diverses catalases et 16 résidus se trouvent alignés dans toutes les séquences, en particulier l'histidine qui est impliquée dans le site actif de l'enzyme (Fig. II. 36 flèche).

**Figure II. 34:** Amplification par PCR de deux fragments génomique de *P. falciparum* à partir des amorces Det 6. La réaction a été effectuée soit sans ADN (**piste 2**); soit avec 0,5 µg d'ADN (**piste 3**); soit avec 0,25 µg d'ADN (**piste 4**). La flèche (→) indique les deux fragments amplifiés: l'un de 200 pb, le second de 500 pb. Les marqueurs de poids moléculaires sont exprimés en paire de bases (pb) (**piste 1**).

**Figure II. 37:** Amplification par RT-PCR du fragment de 184 pb correspondant à une partie de l'ARN messenger de la catalase de *P. falciparum*. La réaction a été effectuée à l'aides de deux amorces définies à partir de la séquence nucléique obtenue précédemment. Les manipulations ont été réalisées à partir d'ARN total de culture asynchrone, préalablement digéré par la DNase I. Les réactions des pistes 4, 5 et 6 ont été réalisées à partir des amorces capables d'amplifier un fragment génomique de la Gpx de *P. falciparum*. Ce fragment contient un intron. La taille du fragment attendu est de 780 pb. La taille du fragment provenant de l'ARN messenger de la GPx est de 500 pb. Nous vérifions ainsi que l'ARN utilisé n'est pas contaminé par de l'ADN. **Piste 1:** 0,25 µg d'ARN total; **piste 2:** 0,5 µg d'ARN total; **piste 3:** témoin sans ARN total; **piste 4:** 0,5 µg d'ARN total; **piste 5:** 0,5 µg d'ADN; **piste 6:** 0,25 µg d'ADN. Les marqueurs de poids moléculaires sont exprimés en paire de bases (pb) (**piste 7**).





CCA GAA AGA GTT GTT CAT GCA AAA GGC TCC GGC GCT TTT GGA ACG TTT  
 P E R V V H A K G S G A F G T F  
  
 ACG GTA ACC AAC AAT ATT ACC CAA TAC ACC AAA GCA AAA GTA TTT AGT  
 T V T N N I T Q Y T K A K V F S  
  
 GAA ATA GGA AAG AAG ACA AAA GTG TTG CTG CGT TTT TCA ACA GTT GGA  
 E I G K K T K V L L R F S T V G  
  
 GGC GAG AAG GGT AGT GCC GAT ACG GAA AGA GAT CCC AGA GGT TTT GCG  
 G E K G S A D T E R D P R G F A

**Figure II. 35** : 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.

	↓		
PFCATALASE	-----PFRVVHAKGSGAFGTFTVTNNITQYTKA		28
CAT1_GOSHI	GQYLLEDYHLVEKLANFORERIPERVVHARGASAKGFFDVTHDISHLTCA		87
CATA_PHAUU	GPILLEDYHLVEKLANFORERIPERVVHARGASAKGFFEVTVDVSHLTCA		87
CATA_PEA	GPILLEDYHLVEKLAQFDRERIPERVVHARGASAKGFFEVTVDVSHLTCA		87
CAT1_MAIZE	GPILLEDYHLIEKLAQFDRERIPERVVHARGASAKGFFEVTVDVSHLTCA		87
CAT2_MAIZE	GPILLEDYH-CEKLANFDRERIPERVVHARGASAKGFFEVTVDIHTLTCA		86
CATA_ORYSA	GPILLEDYHLIEKVAHFARERIPERVVHARGASAKGFFECTHDVTDITCA		87
CATE_ECOLI	GPTLLEDFILREKITHFDHERIPERIVHARGSAAHGYFQPYKSLSDITKA		150
CAT_BACFI	GPTLMEDFHFREKMFHFOHERIPERIVHARGFAAHGEFQVYDSMKEFTKA		97
CATA_BOVIN	GPLLVDVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKA		96
CATA_HUMAN	GPLLVDVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKA		97
CATA_MOUSE	GPLLVDVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKA		97
CATA_RAT	GPLLVDVFTDEMAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKA		97
CATA_DROME	GPILLQDVNFLDEMASHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITQYCAA		95
CATA_LACSK	APSLIQDYQLLEKLAHFNRERIPERVVHAKGAGRKGYFKVTKDMSAYTKA		75
CATV_BACSU	GPTLIQDVHLLLEKLAHFNRERIPERVVHAKGAGAHGYFEVTNDVTKYTKA		76
CATA_CANTR	GPLLLQDFNLIIDSLAHFDRERIPERVVHAKGSGAYGVFEVTDITDVC		74
CATA_HANPO	GPLLLQDFKLIIDTSLHFDRERIPERVVHAKGAGAYGVFEVTDITDVC		87
CATA_YEAST	GPLLLQDYNLIIDSLAHFNRENIPQRNPHAHGSGAFGYFEVTDITD		92
CATA_MICLU	GPIVLHDVHLLLETHQHFDNRNIPERRPHAKGSGAFGVFEVTE		77
CATT_YEAST	GPILLQDFHLLNIASFDRERVPERVVHAKGGGRLEFELTDSLSDITYA		86
	*.* **.* . * . . . . .		
PFCATALASE	KVFSÉIGKKTQVLLRFSTVGGEEKGSADTERDPRGFA-----		64
CAT1_GOSHI	DFLRAPGVQTPVIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGNFOLVG		137
CATA_PHAUU	DFLRAPGVQTPVIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGNFOLVG		137
CATA_PEA	DFLRAPGVQTPVIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGNFOLVG		137
CAT1_MAIZE	DFLRAPGVQTPVIVRFSTVIVHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGNFOLVG		137
CAT2_MAIZE	DFLRAPGVQTPVIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGNWOLVG		136
CATA_ORYSA	DFLRSPGAQTPVIVRFSTVIHERGSPETLRDPRGFVAVKFYTREGNWOLVG		137
CATE_ECOLI	DFLSDPNKITPVFVRFSTVQGGAGSADTVRDIRGFATKIFYTEEGIFOLVG		200
CAT_BACFI	KFLQDPSVKTPVIVRFSTVAGSAGSADTVRDIRGFATKIFYTEEGNYDLVG		147
CATA_BOVIN	KVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDIRGFVAVKFYTEDGNWOLVG		146
CATA_HUMAN	KVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDIRGFVAVKFYTEDGNWOLVG		147
CATA_MOUSE	KVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDIRGFVAVKFYTEDGNWOLVG		147
CATA_RAT	KVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGESGSADTVRDIRGFVAVKFYTEDGNWOLVG		147
CATA_DROME	KIFDQVKKRTPLAIVRFSTVGGESGSADTARDPRGFVAVKFYTEDGNWOLVG		145
CATA_LACSK	AVFSGVGKKTPLITRFSTVAGEAGYPDTYRDVIRGFVAVKFYTEEGNYDIVG		125
CATV_BACSU	AFLSEVGKRTPLIFIRFSTVAGELGSADTVRDIRGFVAVKFYTEEGNYDIVG		126
CATA_CANTR	KFLDTVGGKTRIFTRFSTVGGELGSADTARDPRGFATKIFYTEEGNLDLVY		124
CATA_HANPO	KFLDTVGGKTRIFTRFSTVGGELGSADTARDPRGFATKIFYTEEGNLDLVY		137
CATA_YEAST	AMFSKIGKRTKCLTRFSTVGGDKGSADTVRDIRGFATKIFYTEEGNLDLVY		142
CATA_MICLU	LVFEP-GVETEVLRFSTVAGENGSPDTRDTRGFALRFYTEEGNYDLVG		126
CATT_YEAST	APYQNVGKCPGLVRFSTVGGESGTPDTRDTRGFVAVKIFYTEEGNLDLVY		136
	*** * . * ..* ** **		

**Figure II. 36:** Alignement de la séquence protéique partielle de la catalase de *P. falciparum* avec celles de 20 séquences de catalases. Les références des séquences protéiques proviennent de la bases de donnée GenBank.

Cat1 GOSHI: isozyme 1 de *Gossypium hirsutum*; Cat1 MAIZE: isozyme 1 de *Zea mays*; Cat2 MAIZE: isozyme 2 de *Zea mays*; Cata BOVIN: *Taurus*; Cata CANTR: *Candida tropicalis*; Cata DROME: *Drosophila melanogaster*; Cata HANPO: *Hanseluna polymorpha*; Cata HUMAN: *Homo sapiens*; Cata LACSK: *Lactobacillus sake*; Cata MICLU: *Micrococcus luteus*; Cata MOUSE: *Mus musculus*; Cata ORYSA: *Oryza sativa*; Cata PEA: *Pisum sativum*; Cata PHAAU: *Phaseolus aureus*; Cata RAT: *Rattus norvegicus*; Cata YEAST: catalase A de *Saccharomyces cerevisiae*; Cate ECOLI: catalase HPII de *Escherichia coli*; Catt YEAST: catalase T de *Saccharomyces cerevisiae*; Catv BACSU: catalase végétative de *Bacillus subtilis*; Cat BACFI: *Bacillus firmus*.

Les résidus conservés dans les 21 séquences sont indiqués par une étoile (\*).

La flèche (→) indique la présence de l'histidine impliquée dans le site actif de l'enzyme.

Les points indiquent une forte homologie entre les résidus des différentes séquences.

Nous pouvons donc conclure que nous avons amplifié un fragment du gène de la catalase endogène de *P. falciparum*.

A partir de ces résultats, de nouvelles amorces ont été sélectionnées:

Amorce en 5'                      codon  
<sup>5</sup>GA GTT GTT CAT GCA AAA GGC TCC GGC GC <sup>3</sup>

Amorce en 3'                      codon  
<sup>5</sup>CGC AAA ACC TCT GGG ATC TCT TCT CGT ATC GGC <sup>3</sup>

A l'aide de ces amorces, nous avons réalisé une nouvelle PCR sur l'ADN génomique de *P. falciparum*. Un fragment de la taille attendue (186 pb) a été amplifié, confirmant la présence du gène.

### 3. Recherche de l'expression de l'enzyme par RT-PCR.

Nous avons recherché si le gène était transcrit dans les conditions normales de culture de *P. falciparum*. Nous avons utilisé de l'ARN total de culture asynchrones, préalablement traité par une DNase. Un contrôle a été réalisé grâce à deux amorces capables d'amplifier un fragment du gène de la GPx de *P. falciparum*. Ce gène présentant un intron dans la partie amplifiée, la taille du fragment obtenu par PCR pouvait nous indiquer la présence d'ADN contaminant résiduel dans la préparation. Après rétrotranscription de l'ARN, l'amplification par PCR nous a permis de détecter une bande de taille attendue (**Fig. II. 37**), montrant que le gène de la catalase est transcrit chez *P. falciparum* en culture. Toutefois, un contrôle doit encore être effectué en séquençant ce fragment pour vérifier qu'il ne s'agit pas d'un artéfact. Le contrôle effectué en parallèle montre qu'il n'y avait plus d'ADN contaminant dans la préparation utilisée.

### 3. Discussion.

Nous avons amplifié et séquencé, après plusieurs tentatives en PCR, un fragment du gène de la catalase de *P. falciparum*. Le fragment amplifié présente de fortes homologues avec 21 séquences de catalase (74% avec la séquence humaine). Cette partie de séquence est relativement

bien conservée, contrairement aux extrémités N- et C-terminales des catalases.

Le fragment amplifié correspond à 64 acides aminés, localisé dans la partie N-terminale de la protéine, entre le premier et le deuxième domaine défini par Murthy et al., (1981) sur la catalase de foie de boeuf. Ce second domaine implique, dans la catalase bovine, les acides aminés 76 à 320. De nombreux résidus d'acides aminés de ce domaine sont impliqués dans la formation de la poche de l'hème du côté distal.

Ce fragment comprend un acide aminé essentiel dans le fonctionnement de l'enzyme: l'histidine 74, dont le noyau imidazole est à 3 Å de l'hème dans la catalase bovine. Cet acide aminé intervient dans le mécanisme réactionnel de l'enzyme.

Ce fragment ne contient pas d'introns. Ceux-ci sont rares et de petite taille chez *Plasmodium*. La gène humain codant pour la catalase comporte dans cette région deux introns de grandes tailles, l'un de 1,6 kb, l'autre de 1 kb. Notre fragment amplifié ne peut donc pas correspondre à une contamination par de l'ADN humain.

La taille des séquences peptidiques des catalases est variable, mais relativement longue: 527 pour la catalase humaine (Quan *et al.*, 1986), 670 résidus pour la catalase de *Penicillium vitale* (Vainshtein *et al.*, 1986) et 485 résidus pour l'enzyme de *Candida tropicalis* (Murray *et al.*, 1987). Notre séquence de 64 acides aminés correspondrait ainsi à environ 10% de la protéine totale.

La réussite de l'amplification de ce fragment par les amorces D et 6 est essentiellement due à la longueur de celles-ci. En effet, les deux amorces utilisées (D et 6) sont respectivement constituées de 26 et 20 bases. Les premiers essais avaient été réalisés avec des amorces de petites tailles (entre 11 et 18 bases). Ceci diminue la spécificité et la solidité de l'accrochage des amorces sur l'ADN à amplifier. Nous avons confirmé la présence d'un transcrite de l'enzyme par RT-PCR. Les résultats montrent la présence de ce transcrite chez *P. falciparum* en culture asynchrone. Le fragment obtenu a la taille attendue, mais il n'a pas encore été séquencé pour vérification définitive.

## DISCUSSION GENERALE



Notre travail nous a permis d'apporter des données nouvelles et originales concernant à la fois la catalase endogène et la catalase internalisée chez *Plasmodium*.

### **Présence d'une catalase endogène chez *Plasmodium falciparum*.**

Les travaux réalisés jusqu'à présent sur la catalase de *Plasmodium* concernent uniquement des dosages d'activité enzymatique (Fairfield *et al.*, 1986; Areekul et Bonme, 1992; Atamna et Ginsburg, 1993). La contamination inévitable des extraits par l'enzyme de l'hématie internalisée dans le système digestif du parasite rend la signification réelle de ces résultats assez limitée, en l'absence de marqueurs de la biomasse parasitaire et de la contamination par l'hématie (en dehors de l'hémoglobine). Il est d'ailleurs intéressant de constater que les activités que nous avons mesurées chez *Plasmodium falciparum* sont beaucoup plus élevées que celles relevées dans la littérature. Ces activités ne peuvent être attribuées, chez les schizontes âgés, qu'à de la catalase de l'hématie pour les raisons suivantes:

- l'activité de la catalase est en bonne corrélation avec les marqueurs parasitaires et non avec ceux du globule rouge;
- les études en immunofluorescence et en immunodétection ultrastructurale utilisant des anticorps anti-catalase humaine montrent à ce stade une forte diminution, voire une disparition du marquage.

Ce premier argument en faveur d'une catalase endogène a pu être renforcé dans un deuxième temps par l'étude chromatographique, montrant dans les extraits parasitaires une fraction absente des globules rouges sains, et surtout par l'immunoprécipitation qui a permis d'identifier une protéine marquée, donc parasitaire, reconnue par un anticorps polyclonal anti catalase. Le poids moléculaire de cette protéine marquée correspond à ce que l'on peut attendre d'une sous-unité de catalase.

Le travail effectué en biologie moléculaire a permis d'apporter la preuve de l'existence du gène chez le parasite. Un fragment amplifié codant pour une séquence de 64 acides aminés montre 74 % d'homologie avec la partie correspondante de la séquence de la catalase humaine, et contient 16 acides aminés homologues dans 20 séquences correspondantes de catalase. Ce

fragment ne contient pas d'intron, alors que dans cette région, le gène de la catalase humaine en contient deux de 1 et 1,6 kb. Le fragment amplifié correspond donc bien à une partie du gène de la catalase de *P. falciparum*.

Les expériences préliminaires effectuées par RT-PCR tendent à montrer que le gène est exprimé dans les conditions normales de culture chez *P. falciparum*.

Ce résultat est fondamental car aucune catalase n'avait été caractérisée auparavant avec précision sur le plan biochimique ou génomique chez les protozoaires.

Les données recueillies au cours des études biochimiques, ainsi que l'expérience menée sur les globules rouges traités par le système amino-triazole / lucose/glucose oxydase (montrant une sensibilité de l'enzyme parasitaire à l'amino-triazole) autorisent à émettre quelques hypothèses sur la nature de la catalase endogène de *P. falciparum*:

- le poids moléculaire des sous unité est de 57 kDa (immunoempreinte et immunoprécipitation);
- elle est probablement constituée de quatre sous-unités par molécule (gel natif à gradient, migration de très longue durée);
- elle est sensible à l'amino-triazole.

Toutes ces propriétés caractérisent les catalases du groupe 1, c'est-à-dire apparentées aux catalases de mammifères, de champignons, de plantes supérieures et de certaines bactéries.

Une telle information doit nous permettre de progresser plus rapidement pour identifier le gène lors du clonage, car l'alignement s'effectuera préférentiellement avec les séquences des catalases du groupe 1. On peut également envisager de refaire une amplification en reprenant une amorce du côté N-terminal, de façon à obtenir un fragment amplifié de plus grande taille.

Nous n'avons aucune information sur les modifications post-traductionnelles que peut subir l'enzyme du parasite. De nombreuses études biochimiques resteront donc à effectuer après que le gène de la catalase de *Plasmodium* aura été complètement séquencé.

### **Localisation de l'enzyme**

L'existence de la catalase chez *Plasmodium* et *Babesia* pose le problème de sa localisation



dans les cellules. Chez les eucaryotes supérieurs, la catalase est localisée essentiellement dans les peroxysomes. Elle peut également se localiser dans la mitochondrie (cat3 du maïs, Abler et Scandalios, 1993) ou rester soluble dans le cytoplasme (cat-T de *Saccharomyces cerevisiae*, Seah et Kaplan, 1973).

Chez les Apicomplexa (dont font partie *Plasmodium* et *Babesia*), l'existence de peroxysomes n'a jamais été démontrée car ces organites sont de petite taille (0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, Latruffe, 1992) et la mise en évidence de tels organites ne peut se faire par des techniques classiques d'histochimie en microscopie électronique chez *Plasmodium* (révélation par un précipité de 3,3' diaminobenzidine, opaque aux électrons). En effet, la présence de vésicules de micropinocytose DAB positif chez ce parasite peut induire en erreur. Cette technique peut toutefois être appliquée chez *Babesia* où le phénomène d'internalisation du contenu de l'hématie est inexistant. Mais la catalase de l'hématie entourant le parasite peut malgré tout amener un bruit de fond important.

L'existence de peroxysomes pourrait ouvrir des perspectives nouvelles sur l'étude du métabolisme de *Plasmodium*. En effet, ces organites sont impliqués dans la désamination oxydative des acides aminés (Latruffe, 1992). Une L-amino-acide oxydase a d'ailleurs été décrite chez *P. berghei* (Langer et Phisphumvidhi, 1971). Les peroxysomes sont également le siège du catabolisme oxydatif des acides gras à très longue chaîne par  $\beta$ -oxydation, le point de départ de plusieurs voies de biosynthèses comme celle du cholestérol ou des dolichols impliqués dans l'ancrage GP-I (glycosyl phosphatidyl inositol) d'antigènes de surface comme MSA-1 (Schrével, 1994).

La recherche des peroxysomes chez *Plasmodium* peut s'effectuer de plusieurs façons:

- grâce à une sonde immunologique spécifique de la catalase parasitaire qui permettrait son immunolocalisation ultrastructurale. Nous ne pouvons pas utiliser la séquence protéique correspondant au fragment d'ADN séquencé, car elle présente trop d'homologie avec la catalase humaine. Il faut alors obtenir une séquence protéique plus spécifique de la catalase parasitaire, puis produire des anticorps. La localisation de cet organite pourra ainsi être effectuée en microscopie électronique.

- grâce à des sondes immunologiques dirigées contre les protéines membranaires de peroxysomes. De tels anticorps sont disponibles chez plusieurs équipes, mais si ces protéines sont différentes chez *Plasmodium*, il est possible qu'aucun signal soit observé. Nous ne pourrions alors

conclure à l'absence de peroxyosomes dans le parasite.

La plupart des protéines de la matrice des peroxyosomes possèdent un signal d'adressage en C-terminal, constitué d'un tripeptide S/K/L et d'une façon générale S-,A-,C-/K-,H-,R/L,COOH, qui cible ces protéines dans les peroxyosomes. Cette séquence a été reportée chez les mammifères, les levures, les plantes et pour les protéines des glycosomes des trypanosomes (Subramani, 1993). En ce qui concerne les catalases, ceci est moins évident. Les catalases de mammifères ne possèdent pas le tripeptide S/K/L à leur extrémité C-terminale et chez les catalases des plantes supérieures, des variants S/H/L ou S/R/L sont retrouvés dans les neuf derniers acides aminés en C-terminal (Sakajo *et al.*, 1987; Isin et Allen, 1991; Ni et Trelease, 1991). Par contre chez *Hansenula polymorpha*, Didion et Roggenkamp (1992) ont montré la nécessité de la séquence S/K/ICOOH pour cibler la catalase dans les peroxyosomes.

La connaissance de la partie C-terminale de la catalase de *P. falciparum* est donc nécessaire pour rechercher la présence éventuelle de ce signal, mais son absence ne nous permettra pas de tirer de conclusions sur l'existence de peroxyosomes chez *Plasmodium*.

### **Expression de la catalase chez *Plasmodium***

D'après les premiers résultats obtenus en RT-PCR, le gène semble être exprimé dans les cultures asynchrones. Les mesures d'activité réalisées au stade schizonte semblent indiquer, en fonction du rapport des activités catalase/glutamate déshydrogénase, que la catalase se trouve en plus grande quantité à ce stade (l'activité glutamate déshydrogénase étant constante selon Vander Jagt., 1989). Toutefois seule une étude de la transcription des ARNm au cours du cycle cellulaire nous permettra de préciser comment la catalase est synthétisée par le parasite. La demi-vie des catalases est assez longue (3,5 jours pour la catalase de foie de hamster, Geerts *et al.*, 1984). Il n'est pas improbable que la synthèse de la catalase s'effectue dans les premiers stades parasitaires. Par immunoprécipitation à partir d'extraits marqués à l'isoleucine tritiée à différents stades parasitaires, il sera possible de relier la quantité d'ARNm transcrit avec la quantité de protéine traduite au cours du cycle cellulaire de *P. falciparum*.

Les activités catalasiques des parasites obtenus *in vivo* sont très faibles par rapport à celles mesurées chez des parasites cultivés *in vitro*. Gamain (communication personnelle) a montré que l'activité GPx séléno-dépendante variait de façon exactement inverse. Il a également montré que

les milieux de culture de *P. falciparum* et de *B. divergens* sont pauvres en sélénium, élément essentiel pour l'expression de cette enzyme (Gamain *et al.*, sous presse). L'expression de la catalase, chez *Plasmodium*, semble au moins en partie dépendante de l'expression de la GPx caractérisée par Gamain *et al.* (sous presse). Dans les conditions de culture où la GPx est très faiblement exprimée, une surexpression de la catalase compenserait son absence. Toutefois, il faut signaler que la GPx, dont le gène a été récemment caractérisé, est une hydroperoxyde glutathion peroxydase (HP-Gpx d'Ursini). Son substrat préférentiel est donc constitué par les hydroperoxydes d'acides gras et non par  $H_2O_2$ .

L'ajout de sélénium dans le milieu de culture permet une meilleure expression de la GPx sans affecter sensiblement l'activité catalasique. Il faut toutefois signaler que l'induction en présence de sélénium (de l'ordre de 4 fois l'activité GPx) reste très loin de la différence observée entre les cultures *in vitro* et les parasites obtenus *in vivo* (de l'ordre de 80 fois plus). Une surexpression de la catalase peut donc être encore indispensable au parasite tant que la GPx reste à un taux d'expression relativement modeste.

### **Rôle de la catalase parasitaire.**

Nous avons montré que *P. falciparum* se développe presque normalement dans des hématies dont la catalase a été irréversiblement inhibée. L'intégrité ultrastructurale des parasites, essentiellement au niveau des membranes, montre l'absence de choc oxydant dans ces conditions de culture. Nous n'avons pas observé de forme parasitaire en dégénérescence ("crisis forms"). Il semble simplement que le parasite limiterait son processus de digestion, puisque le pigment malarique retrouvé est moins important que chez les parasites témoins.

Dans ces conditions expérimentales, il apparaît qu'une partie importante de l'activité catalasique parasitaire est inhibée par l'amino-triazole puisque nous ne retrouvons environ que 5 à 10 % de l'activité mesurée dans les cultures non traitées. Cette inhibition ne peut s'expliquer que par la production de peroxyde d'hydrogène par le parasite. L'amino-triazole fixé sur la catalase de l'hématie serait remobilisé au niveau de la vacuole digestive et pourrait diffuser dans le cytoplasme parasitaire. Or l'amino-triazole n'exerce son action inhibitrice irréversible qu'en présence de peroxyde d'hydrogène. Nos résultats confortent donc les observations de Atamma et Ginsburg (1993). Une interprétation différente de la première serait l'absence d'une catalase

endogène chez *Plasmodium*; l'activité résiduelle observée proviendrait alors uniquement de la catalase contaminante de l'hématie. Or, nous disposons d'arguments qui montrent l'existence d'une catalase endogène chez ce parasite. Une expérience intéressante serait de synchroniser des cultures de *P. falciparum* dans des hématies dont la catalase a été inhibée, et de rechercher l'activité enzymatique dans les schizontes âgés, lorsque la contamination par les enzymes de l'hématie est très faible. Nous pourrions alors vérifier que la catalase du parasite est bien affectée par l'amino-triazole provenant de l'hématie traitée.

L'expérience d'inhibition de la catalase humaine et parasitaire montre que l'enzyme de *Plasmodium*, dans les conditions de culture normales (en particulier en présence de 5% d'O<sub>2</sub>) ne joue pas un rôle strictement indispensable. Comme ces cultures n'ont pas été effectuées en milieu enrichi en sélénium, le rôle de la GPx séléno-dépendante dans la destruction est également très limité.

Chez *P. falciparum* cultivé sur des hématies dont la catalase est inhibée, on observe une augmentation de l'activité de la glutamate déshydrogénase. Cette enzyme procure au parasite du NADPH, élément essentiel dans la régénération du glutathion. Une glutathion réductase endogène est présente chez *Plasmodium* (Müller *et al.*, 1995). Le NADPH est également un composé à fort pouvoir réducteur. Il pourrait exister chez *Plasmodium* une GPx séléno-indépendante comme cela a été supposé dans la littérature (Frisch *et al.*, 1987), ou une peroxydase dépendante du NADPH. Une alkyl hydroperoxyde réductase (AHP) a été mise en évidence chez *Entamoeba histolytica*. Elle réduit les alkyl hydroperoxydes et le peroxyde d'hydrogène en utilisant comme cofacteur du FAD, du NADH ou du NADPH (Bruchhaus et Tannich, 1995). Cette enzyme est homologue à celles retrouvées chez les procaryotes. Aucune catalase, peroxydase, glutathion transférase, glutathion peroxydase ou glutathion réductase n'a été trouvée chez *E. histolytica*. *Giardia duodenalis* possède une activité NADH peroxydase, mais ne semble avoir ni catalase, ni peroxydase classique (Brown *et al.*, 1995).

Il ne faudrait toutefois pas conclure trop rapidement à un rôle mineur de la catalase et de la GPx sélénodépendante de *Plasmodium* dans la protection du parasite contre le choc oxydant. En effet, dans les conditions de culture classiques, la Gpx ne peut pas s'exprimer de façon normale en absence de sélénium. D'autre part, ces cultures sont effectuées à des tensions d'oxygène beaucoup plus basses que celles rencontrées habituellement *in vivo* dans le sang des sujets infectés. Dans ces conditions de culture, l'intervention du système immunitaire n'a pas lieu. Il est

parfaitement possible de cultiver *P. falciparum* en présence de 15-17 % d'oxygène (Le Bras, communication personnelle). Dans ces conditions, et dans des conditions de choc oxydatif, la catalase doit jouer un rôle plus important du fait de son  $K_m$  plus élevé. Des expériences d'inhibition des catalases de l'hématie et du parasite à ces fortes concentrations en oxygène pourraient nous apporter des informations intéressantes sur le rôle protecteur de l'enzyme dans des conditions beaucoup plus proches des conditions physiologiques normales. Un enrichissement en sélénium du milieu, permettant également l'expression de la glutathion peroxydase sélénodépendante, permettrait de mieux préciser le rôle respectif de ces deux enzymes dans la protection de *Plasmodium* contre le peroxyde d'hydrogène.

### Rôle de la catalase de l'hématie

Il est admis depuis de nombreuses années que *Plasmodium* utilise les enzymes antioxydantes de la cellule hôte pour sa propre protection (Fairfield *et al.*, 1983; 1986; 1988). Dans le cas de la SOD Cu/Zn, Fairfield *et al.*, (1983; 1986) ont fractionné *P. berghei* et ont retrouvé l'activité enzymatique co-sédimentant avec des vésicules correspondant à des lysosomes, puisqu'elles contiennent des protéases responsables de la dégradation de l'hémoglobine. Bécuwe (thèse de doctorat, 1994) grâce à un anticorps monoclonal dirigé contre la SOD Cu/Zn humaine a montré qu'elle restait strictement confinée dans le système digestif du parasite, dans les vésicules digestives. Notre étude en immunofluorescence indirecte montre que la catalase de l'hématie est internalisée dans les vésicules digestives puis dégradée au cours du cycle cellulaire de *P. falciparum*. En immunolocalisation ultrastructurale, le marquage se limite aux vésicules digestives et aucun marquage supérieur au bruit de fond ne peut être détecté dans le cytoplasme parasitaire. La catalase humaine reste donc dans les vésicules digestives du parasite où elle se fait dégrader comme l'hémoglobine. Les immunoélectrotransferts, réalisés sur des extraits de *P. falciparum* et révélés par les différents anticorps anti-catalase humaine, montrent des bandes de dégradation de cette catalase.

Le rôle éventuel de la catalase de l'hématie dans la protection du parasite ne peut donc être que transitoire, et limité uniquement aux vésicules digestives. Il peut être même totalement remis en question par certains arguments. Dans le compartiment digestif, le pH est acide (pH 5; 5,5 d'après Goldberg et Slater, 1992) et cette acidité favorise la production d'anions superoxyde par l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine (Misra et Fridovich 1972). De plus, la dégradation de l'hémoglobine libère l'hème qui pourra réagir par la réaction de Fenton. La

catalase humaine reste active en milieu acide (perte de 16,3 % à pH 5, notre travail), mais est par contre inhibée en présence d'un flux continu d'anions superoxydes (Kono et Fridovich 1982, Lardinois et Rouxhet, 1994). Dans les conditions rencontrées dans les vésicules digestives (présence de protéases,  $O_2^{\circ}$ ,  $OH^{\circ}$ ), il est peu probable que la catalase humaine reste longtemps active dans ce compartiment et puisse le protéger durablement.

La mise en évidence d'une catalase endogène chez *Plasmodium* permet de mieux comprendre les mécanismes de détoxification des espèces activés de l'oxygène chez ce parasite. Celui-ci possède son propre système enzymatique de détoxification des E.A.O., comme les cellules eucaryotes. Il possède ainsi une SOD Fe, une GPx séléno-dépendante, une catalase et peut être encore d'autres enzymes de détoxification (Mn-SOD, enzymes de détoxification du peroxyde d'hydrogène). Nous avons souligné la régulation qui peut exister entre la catalase et la GPx séléno-dépendante dans la protection du parasite contre le choc oxydant. Le rôle de la catalase parasitaire *in vitro* dans les conditions normales de culture (5 % d' $O_2$ ) ne semble pas primordial, mais pourrait devenir plus important dans les conditions physiologiques normales. De plus, la catalase de l'hématie internalisée par le parasite est dégradée comme l'hémoglobine et n'intervient pas dans la protection de *Plasmodium* contre le choc oxydant comme cela avait été postulé dans la littérature.

## CONCLUSION GENERALE





Notre travail nous a permis de montrer que:

- *Plasmodium falciparum* possède une catalase endogène qui appartient probablement au groupe des catalases typiques, dont nous avons réussi à amplifier un fragment de gène qu'il reste à cloner dans sa totalité. Cette catalase est exprimée dans les conditions normales de culture mais l'étude de son expression au cours du cycle cellulaire devra être réalisée.

- La catalase de l'hématie internalisée dans le système digestif du parasite est inactivée et dégradée comme l'hémoglobine. Son rôle protecteur est limité dans le temps et strictement localisé à la vésicule digestive encore jeune.

- L'activité catalasique est couplée à celle de la glutathion peroxydase. Si le parasite ne peut pas exprimer cette enzyme par une carence en métal cofacteur, on observe une augmentation de l'activité de la catalase qui compense l'activité de la glutathion peroxydase.

- Dans les conditions normales de culture, en présence de 5% d'oxygène, la catalase de l'hématie et celle de *P. falciparum* peuvent être presque totalement inhibées sans entraîner de trop grandes perturbations dans la croissance parasitaire. La catalase, dans des conditions de faible oxygénation, ne joue donc pas un rôle prépondérant dans la protection de *Plasmodium*. Cependant, de nouvelles expériences doivent être réalisées dans des conditions normales d'oxygénation du sang, dans lesquelles la catalase rencontrerait de meilleures conditions de fonctionnement.

En démontrant l'existence de cette enzyme, nous complétons ainsi la caractérisation du système enzymatique de défense de *Plasmodium* contre le choc oxydant. En l'état actuel des recherches, les gènes d'une SOD à fer, d'une glutathion peroxydase séléno-dépendante et d'une catalase ont été trouvés. L'existence d'une SOD à manganèse reste encore à prouver. Il n'est pas exclu, au vu d'expériences d'inhibition de la catalase que nous avons effectuées, qu'il existe chez le parasite, d'autres enzymes capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, *Plasmodium* est équipé pour s'adapter à un choc oxydatif. Il faut à présent étudier en détail l'inductibilité de ces enzymes et leurs interrégulations afin de pouvoir mieux apprécier les capacités de défense de cet organisme contre les espèces activées de l'oxygène.

## MATERIELS ET METHODES



## CHAPITRE I: LE MATERIEL BIOLOGIQUE

### 1. DESCRIPTION DES SOUCHES ET INFESTATION

#### 1.1. Les souches

Au cours de notre travail, nous avons utilisé une espèce de *Plasmodium* de rongeur, entretenue *in vivo* sur souris, une espèce de *Plasmodium* humain cultivée *in vitro* sur des hématies humaines et deux espèces de *Babesia* provenant de souche *in vitro* et *in vivo*.

##### 1.1.1. *Plasmodium* de rongeur

L'espèce utilisée est *Plasmodium berghei* (Vincke et Lips, 1948), souche N (sensible à la chloroquine) mortelle chez la souris Swiss et asynchrone.

##### 1.1.2. *Plasmodium* humain

*Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), souche FCR3, originaire de Gambie (Jensen et Trager, 1978), présentant une résistance partielle à la chloroquine.

##### 1.1.3. *Babesia*

Deux souches de *Babesia* ont été utilisées :

- *Babesia hylomyisci* (souche fournie par le Dr Wery, Anvers), entretenue *in vivo* sur souris Swiss;
- *Babesia divergens* (isolat humain, Rouen, 1987 d'après Gorenflot *et al.*, 1990) cultivés *in vitro* sur des hématies humaines.

#### 1.2. Entretien

Le suivi des différentes espèces de Plasmodies est effectué grâce à des frottis (prélèvement d'une goutte de sang à la queue de la souris, ou d'une goutte de culture pour *P. falciparum*) fixés par du méthanol et colorés pendant 40 min par une solution de Giemsa (Merck n° 9204) à 2% dans un tampon à pH 7 de composition suivante :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,2 mM. La parasitémie est obtenue par dénombrement des parasites dans 1000 hématies.

##### 1.2.1. Modèle *in vivo*

*Plasmodium berghei* et *Babesia hylomyisci* sont entretenues par passage mécanique sur des

souris Swiss femelles âgées de 8 à 12 semaines et pesant entre 20 et 30g. L'infestation se fait artificiellement, à partir d'une souris impaludée, par injection intrapéritonéale de 500  $\mu$ l de tampon phosphate isotonique ou PBS (NaCl 136,9 mM; KCl 2,68 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,46 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  8 mM; pH 7,3) contenant  $1.10^6$  hématies parasitées. Ceci permet d'obtenir une parasitémie de 60% en 6 jours pour *P. berghei* N et 80 % en 5 jours pour *Babesia hylomysci*.

### 1.2.2. Modèle *in vitro*

La souche FCR3 de *P. falciparum* asynchrone, est cultivée sur des hématies humaines O<sup>+</sup> selon la technique de Trager & Jensen (1976) dans du RPMI 1640 (Boehringer) enrichi en HEPES (25mM),  $\text{NaHCO}_3$  (3,2% en volume final), gentamycine (10  $\mu$ g/ml) et sérum humain A<sup>+</sup> décomplémenté (10% v/v)(milieu complet), en atmosphère gazeuse contrôlée ( $\text{O}_2$  5%;  $\text{CO}_2$  5%;  $\text{N}_2$  90%). L'incubation a lieu à 37°C. Dans ces conditions, la parasitémie maximale atteinte est de 15% (hématocrite 2 à 6%) pour un taux de croissance de 10 toutes les 43 à 46 heures.

### 1.3. Synchronisation des cultures de *P. falciparum*

La technique utilisée est celle de la lyse au sorbitol décrite par Lambros et Vanderberg, (1979) et par Vernes *et al.*, (1984). Elle consiste en une lyse osmotique des stades trophozoïte et schizonte, épargnant les formes anneaux. Un culot d'hématies parasitées est traité par 3,3 volumes d'une solution de sorbitol à 15% (p/v en eau milliQ), glucose 0,1% (p/v en eau milliQ). Après mise en suspension, le mélange est placé au bain-marie à 37°C pendant 5 minutes, avant d'ajouter 6,65 volumes de glucose à 0,1% (p/v en eau milliQ). L'ensemble est mélangé délicatement, puis incubé à 37°C pendant 5 minutes. Après centrifugation (500 g, 5 min), le culot est transféré dans une boîte de culture et mis à l'étuve. Un deuxième traitement est effectué environ 30 heures après le premier, lorsque la parasitémie en stade anneau est de 1%. Le taux de croissance, dans ces conditions, est de 5 toutes les 43 heures. La durée des différents stades de cette souche est d'environ 20 heures entre le stade anneau et trophozoïte, 15 heures entre le stade trophozoïte et schizonte et 6 heures entre le stade schizonte et une nouvelle invasion.

## 2. EXTRACTION DES PARASITES PAR LYSE A LA SAPONINE

### 2.1. *Plasmodium* et *Babesia* murins

Lorsque les souris atteignent une parasitémie suffisante (60%), le sang extrait de la cavité sous brachiale à l'aide d'une pipette Pasteur héparinée est filtré sur billes de verre (0,25-0,30 mm

de diamètre; B.Braun Melsungen AG) et poudre de cellulose (DEAE 23 Whatman) afin d'éliminer respectivement les globules blancs et les plaquettes. Les lavages s'effectuent par du tampon PBS, suivis par des centrifugations (500g, 5 min) à 4°C. Le culot est repris par 10 volumes de PBS contenant 0,01% de saponine (Merck). Après 5 min de contact à température ambiante, les hématies sont centrifugées (8800g, 7 min) à 4°C puis lavées par du PBS. Le culot est repris par du TES (2,5 M de saccharose; 100 mM de EDTA pH 7,5; 500 mM de triéthanolamine; pH 7,5) puis déposé sur un gradient discontinu de Percoll (Pharmacia) de densité 1,04 et 1,09 (150 mM de NaCl pour celle de 1,04; 250 mM de saccharose pour celle de 1,09; le tout en TES) afin d'éliminer les hématies non lysées. Après une centrifugation 5 min à 4400g, les parasites purifiés sont recueillis à l'interphase du gradient. Ils sont lavés une fois par du TES puis par du PBS (centrifugation 10 min à 8800g). Le culot parasitaire est enfin stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

## 2.2. Parasites provenant de culture

Les cultures de *P. falciparum* (10% de parasitémie) et de *B. divergens* (30-40% de parasitémie) sont lavées plusieurs fois par du PBS avant de subir le traitement à la saponine, cité précédemment.

## **CHAPITRE II: ETUDE DE L'ACTIVITE CATALASIQUE**

### **1. PREPARATION DES HOMOGENATS PARASITAIRES**

#### **1.1. Lysat parasitaire**

Le culot parasitaire, après décongélation, est soumis pendant 30 secondes à une sonication douce (Sonics and Materials) sur glace pilée en tampon phosphate de sodium (mono/disodique) 50mM pH 7,4 contenant 1mM de PMSF, 0,5mM de leupeptine (Boehringer), 2 mM d'EDTA et 0,1 mg/ml d'aprotinine (Boehringer). Après s'être assuré de l'efficacité de la sonication par l'observation du lysat au microscope photonique, l'échantillon est centrifugé une heure à 100 000g (Beckman, rotor 50 Ti). Le surnageant est ensuite dialysé et concentré à 4°C une nuit (Microprodicon PM 15 000) contre du tampon phosphate de sodium (mono/disodique) 50 mM pH 7,4. Le lysat obtenu est stocké à -80°C avant son utilisation. Lorsque celui-ci est utilisé en chromatographie d'échange d'ions, le surnageant issu de la centrifugation est dialysé contre du tampon phosphate de sodium de 5 mM pH 7.

#### **1.2. Préparation des témoins hématies humaines et murines**

##### **1.2.1 Hématies murines**

Le sang murin, après extraction, est filtré sur billes de verre et poudre de cellulose. Il est ensuite lavé trois fois par du PBS.

##### **1.2.2. Lyse des hématies**

Les globules rouges humains et murins sont lysés à 4°C en tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,4, contenant les mêmes concentrations d'inhibiteurs que pour la lyse des parasites. Le lysat est ensuite soumis à une sonication douce (30 secondes à 4°C). L'échantillon est finalement centrifugé une heure à 100 000g, puis dialysé et concentré une nuit à 4°C (Microprodicon PM 15 000) contre du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,4.

### 1.3. Dosage des protéines

La méthode utilisée est celle mise au point par Bradford (1976). Elle utilise le bleu de Coomassie G250, qui s'associe aux protéines en particulier sur les groupements amines libres, notamment l'arginine, modifiant son spectre d'absorption dont le maximum est à 595 nm. Une gamme étalon (de 5 à 20  $\mu\text{g}$ ) est réalisée à partir d'une solution à 1 mg/ml d'albumine sérique bovine (Boehringer). Le colorant (Bio Rad), dilué au 1/5 dans de l'eau milliQ, est réparti par fraction de 2,5 ml. Après une incubation de 10 min à température ambiante, la gamme étalon est lue au spectrophotomètre (Uvikon) à 595 nm contre le témoin bleu de Coomassie à la même dilution. L'échantillon à doser (entre 10 et 20  $\mu\text{l}$ ) est dilué pour rester dans la gamme ainsi préparée. L'absorbance à 595 nm est reportée sur la courbe étalon permettant le calcul de la concentration protéique.

### 1.4. Dosage de l'hémoglobine

Ce dosage utilise la solution de Drabkin (Bessis, 1972), basé sur la transformation de l'hémoglobine en cyanométhémoglobine dont le maximum d'absorbance se situe entre 540 et 546 nm. La solution est constituée de :

- bicarbonate de sodium $\text{NaHCO}_3$	1g
- cyanure de potassium KCN	0,05g
- ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,2g
- eau milliQ qsp	1 litre

La réaction s'effectue en ajoutant à 2,5 ml de réactif, 20  $\mu\text{l}$  de la solution à doser. Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique est mesurée contre le réactif seul. La concentration en hémoglobine de l'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$\frac{\text{DO} \times 126}{0,70} = \text{mg d'hémoglobine par ml (Thèse de E. Aissi-Yehouessi, 1983).}$$

## 2. DOSAGES DES DIFFERENTES ACTIVITES ENZYMATIQUES

### 2.1. Dosage de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Le dosage utilise la technique au pyrogallol de Marklund et Marklund (1974). Le principe du dosage est basé sur une compétition en milieu alcalin entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par les radicaux  $\text{O}_2^{\circ-}$  et la dismutation de ces radicaux par la SOD, oxydation suivie à 420 nm. L'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de



la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol à 30°C.

### 2.1.1. Protocole de dosage

-Les réactifs

Le tampon A est constitué de :

-Tris 50 mM contenant 1 mM de DTPA (Diéthylène Triamine PentaAcétique, Sigma) ajusté à pH 8,2 par de l'acide cacodylique (Sigma).

Le tampon B :

-Pyrogallol (Sigma) 6mM en HCl 0,01N.

Ces solutions sont préparées extemporanément.

- Le témoin blanc (To)

Le volume de pyrogallol donnant une variation d'absorbance maximale à 420 nm de 0,020 +/- 0,005 Abs/min, est recherché initialement. Cette absorbance maximale correspond au 0% d'inhibition. Ainsi, 50 à 100 µl de la solution de pyrogallol sont ajoutés au tampon A afin d'obtenir un volume réactionnel final de 2 ml. La densité optique est suivie au spectrophotomètre (Uvikon) contre le tampon Tris-cacodylate-HCl pendant 3 min, 30 secondes après le démarrage de la réaction avec une lecture toutes les 30 secondes. Le calcul du delta D.O/min permet d'estimer le volume de pyrogallol à utiliser pour les dosages. Le pyrogallol étant peu stable, il est nécessaire de vérifier à chaque série de trois dosages, le delta de D.O/min de cette solution.

- Courbe étalon

Une gamme de SOD Cu/Zn d'hématie bovine (Sigma) diluée en tampon Tris-cacodylate va permettre de tracer la courbe du pourcentage d'inhibition du pyrogallol en fonction de la quantité de SOD ajoutée (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 µg de SOD bovine). Le dosage est ainsi réalisé en ajoutant à 1,8 ml du tampon Tris-cacodylate, 100 µl de prise d'essai et la quantité de pyrogallol définie précédemment. Le calcul du pourcentage d'inhibition du pyrogallol s'effectue par la formule suivante :

$$\frac{\delta \text{ D.O/min To} - \delta \text{ D.O/min de l'échantillon}}{\delta \text{ D.O/min To}} \times 100$$

La courbe étalon correspond à la variation du pourcentage d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol en fonction de la concentration de SOD. La gamme est linéaire jusque 65-75%

d'inhibition. L'unité enzymatique correspond à la quantité de SOD capable d'inhiber 50% de l'auto-oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage. D'après notre courbe étalon, une unité d'activité SOD correspond à 0,42  $\mu\text{g}$  de SOD bovine.

- Dosage de l'échantillon

Pour une prise d'essai de 50 à 100  $\mu\text{l}$  d'échantillon, le delta D.O/min est calculé puis le pourcentage d'inhibition est reporté sur la courbe étalon, ce qui permet de déduire la quantité de SOD en unité ou en  $\mu\text{g}$  contenue dans notre prise d'essai.

- Dosage en présence d'inhibiteur

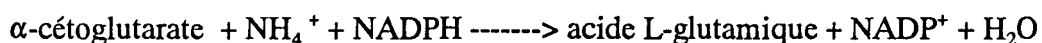
Afin de déterminer le pourcentage de la SOD Fe dans l'activité totale, la SOD Cu/Zn est inhibée par du KCN. L'échantillon à doser est incubé pendant 5 min à 30°C en présence de 4 mM de KCN avant de prélever 100  $\mu\text{l}$  pour le dosage. Nous obtenons ainsi dans 2 ml de volume réactionnel, la concentration de 0,2 mM de KCN, concentration qui n'a aucune influence sur l'auto-oxydation du pyrogallol.

### 2.1.2. Préparation du témoin globule rouge humain

La détermination de l'activité SOD Cu/Zn d'hématies humaines s'effectue après précipitation de l'hémoglobine selon la technique de Winterbourn *et al.*, (1975). A 200  $\mu\text{l}$  de culot d'hématies, est ajouté 1 ml d'eau milliQ. Le lysat est centrifugé à 4°C pendant 30 min à 12 000 rpm. A 1 ml de surnageant placé sur glace pilée est ajouté 0,4 ml d'éthanol et 0,4 ml de chloroforme froids (-20°C). Le mélange est agité vigoureusement au vortex pendant 1 min avant d'être centrifugé 20 min à 2500g (JA 20 Beckman). La phase éthanolique contenant la SOD Cu/Zn est recueillie puis dialysée contre du PBS à 4°C pendant une nuit.

## 2.2. Dosage de la L-glutamate deshydrogénase (NADPH)

Le dosage est effectué selon la méthode décrite par Shimizu *et al.*, (1979). L'enzyme catalyse l'interconversion de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarate en acide L-glutamique par amination ou déamination. Le dosage effectué ici favorise l'amination de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarate par la réaction suivante :



La diminution de l'absorbance du NADPH est suivie à 340 nm à 30°C et à pH 8,3. L'unité enzymatique est définie comme capable de réduire 1  $\mu$ mole d'acide  $\alpha$ -cétoglutarate en acide L-glutamique par minute à pH 8,3, à 30°C en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et de NADPH.

### 2.2.1. Protocole de dosage

-Les réactifs :

Tampon A : Tris-HCl 0,1M pH 8,3

Tampon B :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à 3,3 M en eau MilliQ

Tampon C : acide  $\alpha$ -cétoglutarate (Sigma) 0,225 M pH 8 ajusté avec de la soude 1 M

Tampon D : NADPH(Boehringer) 7,5 mM préparé extemporanément

Tampon E :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM; EDTA 50 mM pH 6,6

- Témoin NADPH ( $T_0$ ) :

Pour connaître la variation du coenzyme seul au cours de la réaction, un dosage à blanc est effectué en mélangeant 2,5 ml de tampon A, 0,2 ml de tampon B, 0,1 ml de tampon C et 0,05 ml de tampon E. La réaction est initiée par l'ajout de 0,1 ml de tampon D. La densité optique est suivie au spectrophotomètre pendant 5 min, 30 secondes après le début de la réaction, une mesure est effectuée toutes les 30 secondes. Le delta de D.O par minute du coenzyme seul ( $\delta$  D.O/min  $T_0$ ) est alors calculé.

- Courbe étalon

Elle est effectuée avec de la L-glutamate deshydrogénase (*Proteus spc*) (Sigma) et permet de connaître la zone de linéarité de ce dosage. Une gamme d'enzyme allant de 0,1 à 1 unité par ml est préparée dans le tampon E. Le dosage s'effectue sur 50  $\mu$ l de prise d'essai.

Le calcul des unités par ml est réalisé par la formule suivante :

$$\frac{\delta \text{ D.O/min de l'échantillon} - \delta \text{ D.O/min } T_0}{6,22} \times 2,95$$

6,22 étant le coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm et 2,95 le volume final en ml de la réaction.

La zone de linéarité du dosage est compris entre 0,1 et 0,7 U/ml.

- Dosage des échantillons

L'activité enzymatique des extraits est calculée sur 50  $\mu$ l de prise d'essai, dilué en tampon E pour avoir une activité enzymatique comprise dans la linéarité du dosage.

### 2.3. Dosage de la catalase

La méthode décrite par Thomson *et al.*, (1978) utilise le perborate de sodium (Sigma) comme substrat. Le choix de ce substrat est dû à sa grande stabilité contrairement au peroxyde d'hydrogène mais aussi à la reproductibilité des résultats. La décomposition du perborate de sodium est suivie à 220 nm à 30 °C en tampon phosphate de sodium de pH 7,4.

#### 2.3.1. Procotole de dosage

- Les réactifs

Tampon A: tampon phosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM pH 7,4;

Tampon B: solution de perborate de sodium à 0,2 M en tampon A, préparé extemporanément.

- Le témoin blanc  $T_0$

Pour connaître la variation du substrat seul au cours du dosage, un témoin réactionnel est effectué. Dans une cuve en quartz, 2,80 ml de tampon A sont introduits; la réaction débute lorsque l'on ajoute 0,2 ml de tampon B. La lecture de la densité optique s'effectue à 220 nm et à 30 °C contre le tampon A, 20 secondes après le début de la réaction, et ce, pendant 2 min, avec une mesure toutes les 12 secondes. Le  $\delta$  D.O./min de  $T_0$  est alors calculé.

- Courbe étalon

La courbe étalon est établie avec de la catalase de foie de boeuf (Sigma). Les dosages s'effectuent sur 20  $\mu$ l d'une gamme de catalase comprise entre 50 et 250 U/ml diluée en tampon A. Les unités correspondent à la quantité d'enzyme pouvant détruire 1  $\mu$ mole de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par minute. Le calcul suivant est ensuite effectué :

$$k = \delta \text{ de D.O./min de l'échantillon} - \delta \text{ de D.O./min } T_0$$

La courbe des unités enzymatiques déposées en fonction de k est alors tracée.

#### - Dosage des échantillons

Les échantillons sont dilués en tampon A afin de se situer dans la zone de linéarité du dosage. Les résultats obtenus sont reportés sur la courbe étalon donnant l'activité enzymatique contenue dans l'échantillon.

### 2.4. Action du pH sur l'activité de la catalase humaine

La catalase humaine utilisée est à 90 % de pureté. Elle provient de chez Calbiochem. Une solution de catalase est préparée en tampon 50 mM de citrate pH 5, contenant 150 unités de catalase par ml. Après homogénéisation, cette solution est aliquotée par 100  $\mu$ l et placée à 37°C pendant différents temps d'incubation (1, 3 et 5 heures). Les témoins réalisés sont: une incubation de l'enzyme en tampon citrate à 4°C et une incubation de l'enzyme en tampon phosphate 50 mM pH 7,4 à 37°C et à 4°C durant la même période.

## 3. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE CATALASIQUE SUR GEL D'ACRYLAMIDE (PAGE)

### 3.1. Electrophorèse en condition non dénaturante

Cette méthode découle de celle décrite par Laemmli en 1970, mais sans SDS.

Le gel de séparation, d'une épaisseur de 0,75 mm est un gradient continu de 7 à 20% d'acrylamide dans un tampon Tris-HCl 375 mM pH 8,8. Le gel 20% contient en plus 10% de saccharose. Le gel de concentration, de 5% en acrylamide, est préparé dans un tampon Tris-HCl 125 mM pH 6,8. Les échantillons contenant 2 unités de catalase sont repris dans un tampon Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, 10% de saccharose et 0,2 % de bleu de bromophénol. La séparation électrophorétique s'effectue à ampérage constant de 30 mA pendant 15 heures à 4°C en tampon Tris 25 mM et glycine 192 mM, pH 8,3.

### 3.2. Révélation de l'activité catalasique

La méthode utilisée est décrite par Clare *et al.*, (1984). Elle est basée sur la peroxydation du DAB (3,3' diaminobenzidine, Sigma), catalysée par la peroxydase de raifort en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'oxydation et la polymérisation du DAB produisent une coloration brune uniforme dans le gel. L'absence de coloration traduit la décomposition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la catalase à l'origine d'une

zone incolore dans le gel. Après migration, le gel est rincé 2 fois 10 min à 4 °C dans de l'eau milliQ afin d'éliminer le tampon Tris. Il est ensuite placé dans 50 ml de tampon phosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM pH 7,4, contenant 660 U de peroxydase de raifort (Sigma) pendant 45 min à température ambiante, sous agitation. Puis, 50 ml de tampon phosphate à 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont ajoutés et incubés pendant 10 min, sous agitation. Le gel est alors rincé 2 fois rapidement dans de l'eau milliQ, avant d'être immergé dans la solution de révélation en tampon phosphate possédant 0,5 mg/ml de DAB. La révélation s'effectue jusqu'à obtenir un contraste suffisant entre le fond brun du gel et les zones non colorées correspondant à l'activité catalase.

#### **4. PURIFICATION DE LA CATALASE RETROUVEE DANS L'EXTRAIT DE *P. FALCIPARUM***

##### **4.1. Chromatographie d'échange d'anions (DEAE-Trisacryl)**

La purification utilise une chromatographie échangeuse d'ions (DEAE) selon la méthode simplifiée de Bonaventura *et al.*, (1972). L'extrait, dialysé contre le tampon phosphate de sodium (mono/disodique) à 5 mM, pH 7, est déposé en haut d'une colonne de 1,5 cm de diamètre contenant 5 ml de gel de DEAE-Trisacryl (IBF) équilibré avec le même tampon à 4 °C. Après un lavage du gel par 5 volumes de colonne avec le tampon phosphate, un premier pic d'activité catalasique est élué à 20 mM de phosphate, le second sortant à 50 mM. Le profil de sortie des protéines est contrôlé à 280 nm (lecteur LKB). Les fractions 20 et 50 mM de phosphate contenant l'activité catalasique sont respectivement concentrées à 4 °C (Microprodicon PM 15 000) contre de l'eau distillée avant d'être analysées par immunoempreinte (voir plus loin).

##### **4.2. Chromatographie IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography)**

L'activité catalasique élue de la DEAE-Trisacryl par 50 mM de phosphate est repurifiée grâce à une chromatographie d'affinité à ions métalliques immobilisés (chromatographie IMAC, Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia). La matrice de sépharose chélate les ions métalliques divalents tels que  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Ni}^{2+}$ . Ces ions vont interagir avec les résidus des acides aminés histidine des protéines et plus faiblement avec le tryptophane et la cystéine, si ces acides aminés impliqués dans ces interactions, sont exposés à la surface de la protéine. L'élution des protéines est réalisée, soit par une variation de pH, soit par élimination du métal par un agent chélateur tel l'EDTA, soit par compétition avec de l'imidazole.

Une colonne de 1 cm de diamètre, contenant 2 ml de gel est chargée en zinc par 6 volumes

de colonne d'une solution de  $ZnSO_4$  20 mM. La colonne est ensuite rincée par plusieurs volumes de colonne par de l'eau milliQ, afin d'éliminer les ions métalliques en excès. La colonne est équilibrée à 4°C en tampon 20 mM de phosphate de sodium (mono/disodique) pH 7, contenant 1 M de NaCl. Le chlorure de sodium élimine tous les effets possibles d'échange d'ions.

La fraction 50 mM de phosphate est diluée 1,5 fois par de l'eau milliQ contenant 1,6 M de NaCl, puis déposée à la surface de la colonne. Après un lavage par un tampon 20 mM de phosphate de sodium contenant 1 M de chlorure d'ammonium pH 7, l'activité catalasique est éluée de la colonne par le tampon 20 mM de phosphate, 60 mM d'imidazole et 1 M de NaCl pH 7. Les fractions contenant l'activité catalasique sont rassemblées et concentrées comme précédemment, avant d'être soumises à une électrophorèse en condition non dénaturantes.

#### 4.3. Electrophorèse préparative et électroélution

Les protéines sont soumises à une électrophorèse préparative en condition non dénaturantes (voir paragraphe 3). L'activité catalasique est révélée selon la technique de Clare *et al.*, (1984) décrite précédemment. La bande non colorée révélant la présence de la catalase est découpée. L'enzyme est ensuite électroéluee du gel dans une cuve ISCO (ISCO electroelution cup, ISCO Inc, Lincoln, Ne 68 505) en tampon Tris 120 mM, glycine 40 mM, pH 9,2 sous une puissance constante de 3 watts par cuve pendant 4 heures. L'éluat est alors analysé en électrophorèse SDS-PAGE, par une coloration des protéines au nitrate d'argent.

#### 4.4. Electrophorèse en SDS-PAGE (Laemmli 1970)

Le gel de séparation de 0,75 mm d'épaisseur est à 10 % d'acrylamide en tampon Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; 0,1% SDS. Le gel de concentration à 5 % d'acrylamide, est préparé dans le tampon Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; 0,1 %SDS. Les échantillons sont repris par du tampon électrophorétique (62,5 mM de Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 10% de saccharose; 0,2 % de bleu de bromophénol; en présence ou non de 0,1 M de DTT selon les cas), dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min avant d'être déposés pour la migration. Celle-ci s'effectue sous ampérage constant de 30 mA pendant 2 heures en tampon Tris-HCl 25 mM; glycine 192 mM; SDS 0,1%. Des marqueurs de poids moléculaire (LMW et HMW Sigma) traités parallèlement aux échantillons permettent de calibrer le gel.

#### 4.5. Coloration des protéines au nitrate d'argent

Cette coloration des protéines est réalisée selon la technique de Morrissey (1981). Après électrophorèse en SDS-PAGE, les protéines sont fixées dans le gel successivement par trois bains de 30 min: un bain contenant 50% de méthanol et 10% d'acide acétique, un bain de méthanol à 5%, acide acétique à 10% et enfin un bain de glutaraldéhyde à 10%. Le gel est ensuite lavé abondamment à l'eau milliQ pendant deux à trois heures, puis il est incubé 30 min en DTT à 5  $\mu\text{g/ml}$ , avant d'être incubé pendant 30 min dans une solution de nitrate d'argent à 0,1% dans l'eau milliQ. Après deux rinçages rapides à l'eau, la révélation est effectuée par une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 0,3% et formaldéhyde 0,0185%, jusqu'à visualisation des bandes. La coloration est arrêtée par addition d'acide citrique à 2,3 M. Le gel est rincé à l'eau milliQ plusieurs fois avant d'être séché.



**CHAPITRE III:**  
**ETUDE ET ROLE DE LA CATALASE DE L'HOTE INTERNALISEE PAR LE**  
**PARASITE**

Cette étude a été réalisée grâce à trois outils immunologiques : un anticorps polyclonal de rat monospécifique, produit au laboratoire et deux surnageants de cultures renfermant des anticorps monoclonaux anti catalase humaine : le 17E10 reconnaissant préférentiellement la forme native de la protéine et le 10B12H9 reconnaissant la forme dénaturée. Les anticorps monoclonaux ont été généreusement fournis par le Dr Middelkoop (Hollande).

## **1. PRODUCTION DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-CATALASE HUMAINE**

### **1.1. Préparation de la solution antigénique**

Avant de procéder à l'immunisation, la catalase humaine de commerce (Calbiochem, à 90% de pureté) a été purifiée par tamisage moléculaire à l'aide d'une colonne de Sephadex G100 (Pharmacia) de 1,5 cm de diamètre et 50 cm de haut. La colonne est équilibrée en tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contenant 0,1 M de NaCl. L'éluion des protéines, suivie à 280 nm est faite à 4°C dans le tampon d'équilibration (12 ml/heure). Les protéines sont collectées par fractions de 1 ml. Les fractions contenant l'activité catalase sont concentrées et dialysées en Microprodicon (PM 15 000) contre de l'eau milliQ à 4°C. La qualité de la purification est contrôlée en électrophorèse dénaturante SDS-PAGE.

### **1.2. Immunisation**

Un rat Fisher 344 mâle, âgé de 4 semaines et élevé en atmosphère protégée a été immunisé. Avant de commencer l'immunisation, du sérum est prélevé, constituant le Jo. Les injections, au nombre de 3, ont été réalisées en zone dorsale sous cutanée toutes les deux semaines. La première est effectuée en adjuvant complet de Freund avec 25 µg de protéine, les suivantes en adjuvant incomplet, renfermant 10 µg de protéine.

## 2. DETECTION DES ANTICORPS SPECIFIQUES

### 2.1. Tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

#### 2.1.1. Dissociation de la catalase humaine à pH basique

La catalase native est dissociée en dimère ou monomère par un traitement basique, selon la méthode de Wiemer *et al.*, (1992). L'enzyme est incubée à 25°C pendant 90 min en présence de 200 mM de CAPS (acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulphonique, Sigma). Pour vérifier l'efficacité de la dissociation, des dosages d'activité catalasique sont réalisés.

#### 2.1.2. ELISA

Le titre du sérum obtenu est déterminé par un test ELISA en microplaque de 96 puits. La plaque est sensibilisée par 0,1 µg/puits d'antigène à 4°C pendant une nuit, soit par de la catalase native diluée en tampon carbonate/bicarbonate 50 mM pH 9,6, soit par de la catalase dissociée diluée en tampon CAPS (Sigma). Après un lavage par du Tween 20 (0,05%), les puits sont saturés 1 heure à 37°C en PBS contenant 4% de BSA (sérum albumine bovine), 0,05% de Tween 20. Deux lavages sont alors effectués par de l'eau milliQ-Tween 20, avant de déposer le sérum ou les surnageants de culture à tester dilués en PBS, 0,05% Tween 20, 1% BSA (PBSTB) pour une incubation d'une heure à 37°C. La plaque est ensuite lavée plusieurs fois par de l'eau milliQ-Tween 20 puis incubée avec les anticorps spécifiques couplés à une peroxydase dilués au 1/3000 dans le tampon PBSTB. Après 1 heure d'incubation à 37°C et 5 lavages en eau milliQ-Tween 20, l'activité peroxydasique est révélée par le substrat (o-phénylènediamine 0,4 mg/ml en tampon citrate 0,02 M/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M pH 5 contenant 1,5 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%) à l'obscurité pendant 15 min. La réaction est arrêtée par l'ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, 50 µl/puits. La densité optique est lue à 492 nm pour chaque puits par un lecteur ELISA automatique (J Bio). Plusieurs témoins sont réalisés : témoin de lecture ne contenant ni antigène ni anticorps, témoin conjugué dépourvu d'anticorps et témoin substrat ne possédant que l'antigène (ni anticorps, ni conjugué) et témoin Jo. Les résultats prennent en compte tous ces témoins.

### 2.2. Electrotransfert et immunoempreinte (Western-Blot)

#### 2.2.1. Transfert des protéines

##### 2.2.1.1. Gels dénaturants

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Céra-Labo) selon la technique de Towbin 1978 à l'aide d'un appareil de

transfert semi-sec (LKB). Le gel de séparation, appliqué sur la feuille de nitrocellulose (pore 0,45  $\mu\text{m}$ ), est inséré entre deux séries de papier Whatman 3M imbibé de tampon glycine 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375%, méthanol 20%. Le transfert est réalisé à ampérage constant (0,8 mA/cm<sup>2</sup>) pendant une heure. La qualité du transfert des protéines est vérifiée par coloration au rouge Ponceau (0,2% de rouge Ponceau; acide trichloroacétique 3%) pendant 10 min, suivie d'un rinçage à l'eau distillée (15 min).

#### 2.2.1.2. Gels natifs

La manipulation est la même que pour les gels dénaturants à l'exception du tampon tampon de transfert. Celui-ci est constitué de Tris 0,12 M/glycine 0,04 M pH 9,2; méthanol 20%. Le transfert est réalisé à ampérage constant (0,8 mA/cm<sup>2</sup>) pendant deux heures.

#### 2.2.2. Immunodétection des protéines

La détection des protéines spécifiques s'effectue par révélation immuno-chimique. Les bandes de nitrocellulose sont placées 30 min à température ambiante dans du tampon TNT (Tris HCl 15 mM; NaCl 140 mM; Tween 20 0,05%; pH 8) contenant 5% de lait écrémé (Gloria), permettant la saturation des sites antigéniques afin d'éviter toute adsorption non spécifique sur la nitrocellulose. Chaque sérum, dilué dans du TNT, est ajouté et les bandelettes de nitrocellulose sont incubées sous agitation pendant une heure à température ambiante. Après une série de lavages avec le TNT, les bandes sont mises en contact une heure à température ambiante avec des IgG de lapin anti-immunoglobulines de rat ou des IgG de lapin anti-immunoglobulines de souris, marqués à la phosphatase alcaline (Promega) dilués au 1/7500 ou à la peroxydase de raifort (Zymed, Californie, USA), dilués au 1/500. Après lavage par le TNT, la phosphatase alcaline est mise en évidence par le tampon de révélation (Tris HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O 5 mM) contenant le substrat: 0,165% de BCIP (50mg/ml) et le colorant: 0,33% de NBT (50 mg/ml), tous deux en solution dans du diméthylformamide à 70% (Promega). La réaction s'effectue à l'obscurité. Elle est arrêtée par rinçage à l'eau déminéralisée.

### 3. IMMUNOLOCALISATION DE LA CATALASE INTERNALISEE PAR LE PARASITE

Cette étude est effectuée par immunofluorescence indirecte et par immunolocalisation ultrastructurale.

### 3.1. Immunofluorescence indirecte

#### 3.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons proviennent de cultures synchronisées ou non (10-15% de parasitémie). Les hématies saines et parasitées sont lysées par la saponine à 0,01 % dans le PBS pendant 5 min à température ambiante. Après une centrifugation à 8800 g pendant 5 min à 4°C, le culot est repris par du TES, qui évite l'agrégation des parasites libérés. La suspension est centrifugée 5 min à 8800g. Les cellules sont ensuite fixées (formol 2%, glutaraldéhyde 0,1% en PBS), 10 min à 4°C. Après plusieurs lavages par le PBS, les cellules sont étalées sur des lames d'immunofluorescence (Biomérieux) et séchées rapidement. Les lames peuvent être stockées à -20°C. Lors de l'analyse, les cellules sont perméabilisées par un mélange acétone/méthanol (7v/3v) à -20°C pendant 5 min avant traitement.

#### 3.1.2. Immunodétection

Les lames sont placées en atmosphère humide. Les sites antigéniques sont saturés par du PBSO (PBS contenant 1% d'ovalbumine). Les lames sont ensuite incubées en présence du sérum à différentes dilutions dans du PBSO pendant une heure à 37°C. Après une série de lavages par le PBSO, le sérum de lapin anti-immunoglobulines de rat couplées à la fluorescéine (Zymed) dilué au 1/50 est incubé pendant 1 heure à 37°C dans du PBSO contenant du Bleu Evans au 1/50000. Les lames sont ensuite lavées par du PBSO puis par du PBS. Elles sont finalement montées dans le milieu constitué de 90% de glycérol et 9,24 mM de 1,4 phénylènediamine dans le PBS. La lamelle recouvrant la lame est lutée au vernis à ongles. Deux témoins sont réalisés à chaque expérience: un témoin Jo (sérum préimmum) et un témoin conjugué (absence de l'anticorps primaire)

#### 3.1.3. Observation

Elle se fait au grossissement 800 (filtre d'excitation 495 nm) sur un microscope à épifluorescence de marque Zeiss Axiophot. Les préparations sont photographiées à l'aide d'un film Kodak Ektachrome 1600 ISO.

### 3.2. Immunolocalisation ultrastructurale

La technique à congélation a été choisie puisqu'elle permet de préserver dans les meilleures conditions la structure antigénique recherchée dans nos échantillons.

#### 3.2.1. Préparation des échantillons

Une culture de *Plasmodium falciparum* asynchrone de forte parasitémie (20 % à 3 % d'hématocrite) est fixée 10 min à 4°C (paraformaldéhyde 2%, glutaraldéhyde 0,1% en PBS pH 7,4). Après 3 lavages en PBS à 4°C, le culot cellulaire est imprégné une nuit à 4°C dans le préservateur de composition suivante: polyvinylpyrrolidone à 20% en tampon phosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM pH 7,4 contenant 2,3M de sucrose. Il est ensuite déposé sur un support d'aluminium et plongé dans de l'azote pâteux à -196°C. Il est enfin conservé dans des cryules à -180°C jusqu'à utilisation.

#### 3.2.2. Coupes ultrafines

Les coupes sont effectuées sur un ultracryotome (Ultracut E Reichert) à -100°C à l'aide de couteaux de verre. Elles sont récupérées sur du saccharose 2,3 M dans le PBS puis déposées sur des grilles de nickel membranées (Formvar à 0,7% dans du chloroforme) selon la technique de Tokoyasu (1980). Les grilles sont ensuite placées sur des gouttes de PBSO afin d'éliminer le saccharose et de saturer les sites d'adsorption non spécifiques.

#### 3.2.3. Immunolocalisation

Les grilles sont déposées sur des gouttes contenant le sérum de rat dilué au 1/100 avec du PBSO ou en présence des anticorps monoclonaux purs pendant une heure à 37°C. Après une série de lavages par le PBSO, les grilles sont incubées avec l'anticorps de lapin anti-rat (Miles) ou anti-souris au 1/100 pendant une heure à 37°C. Les grilles sont ensuite lavées plusieurs fois par le PBSO puis mises en contact une heure à 37°C avec la protéine A couplée à de l'or colloïdal de 5 nm de diamètre diluée au 1/50. Les grilles sont lavées plusieurs fois par du PBS, avant d'être rapidement rincées dans de l'eau distillée. Les coupes sont alors contrastées et protégées par un mélange d'acétate d'uranyle aqueux et de méthylcellulose (0,2 ml d'acétate d'uranyle 4% aqueux et 1,8 ml de méthylcellulose à 25 centipoise de chez Fluka AG, (Buchs Switzerland), selon la méthode de Griffiths (1984). Les grilles sont mises en contact d'abord avec la méthylcellulose seule à 2%, puis avec le mélange décrit ci-dessus, 5 min par bain, sur un lit de glace pilée. Les

observations sont réalisées au microscope électronique à transmission Hitachi H 600. Chaque expérience est complétée par les témoins suivants: Jo (sérum préimmum); témoin conjugué (anticorps lapin anti-rat ou anti-souris et protéine A-or seulement); témoin protéine A-or seule.

#### **4. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES PARASITES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION**

Les hématies humaines parasitées dont la catalase est inhibée ainsi que les témoins correspondants sont fixées puis incluses en Epon (résine hydrophobe).

##### **4.1. Préparation de l'échantillon**

###### **4.1.1 Fixation**

Le sang est fixé 30 min à température ambiante en tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2 contenant 2,5% de glutaraldéhyde (1 à 2 gouttes de sang/ml de fixateur). Après 3 lavages par le tampon cacodylate de sodium, le sang est post-fixé une heure à température ambiante par 1% d'acide osmique dans le tampon cacodylate de sodium.

###### **4.1.2. Déshydratation et précoloration**

L'échantillon, après un contact de 5 min avec de l'éthanol à 70°, subit une précoloration par l'acétate d'uranyle à 2 % en solution alcoolique à 50°, 10 min à l'obscurité. Suit une série de lavages de 5 min chacun avec des teneurs croissantes en alcool (70°, 90° puis 100°) avant d'effectuer deux bains de 30 min chacun dans l'oxyde de propylène.

###### **4.1.3. Inclusion en Epon**

La technique d'inclusion comporte deux étapes: une imprégnation des cellules par le milieu d'inclusion et une polymérisation à la chaleur. La préparation de l'Epon comporte le mélange à 50/50 des solutions A et B auquel est ajouté 1,5% d'accélérateur, le DMP 30 (2-4-6-Tridiméthylaminométhyl phénol). Les solutions A et B sont constituées de monomères, l'Epikote 812 et de durcisseurs, le DDSA (Dodeceny succinic anhydride) et le MNA (Methyl nadic anhydride) dans les proportions suivantes:

solution A : Epikote 812 : 62 ml, DDSA : 100ml

solution B : Epitoke 812 : 100 ml, MNA : 89 ml.

L'imprégnation des cellules débute par deux bains de 30 min dans un mélange Epon/oxyde de propylène (v/v) puis se prolonge par trois bains d'Epon pur de durée variable (3 heures, une nuit puis une heure). La polymérisation s'effectue dans un nouveau bain d'Epon 72 heures à 60°C.

#### **4.2. Observation des parasites**

Des coupes ultrafines sont réalisées sur un ultramicrotome (Ultracut E Reichert) à l'aide d'un couteau en diamant. Les coupes sont récupérées sur des grilles en cuivre avant d'être contrastées 5 min par l'acétate d'uranyle 2% dans l'alcool éthylique à 50° à l'obscurité. Cette coloration est suivie par un contraste au citrate de plomb selon la technique de Reynolds (1963) 5 min à l'abri de l'air et en présence de potasse. Les observations sont réalisées au microscope électronique à transmission.

## CHAPITRE IV:

### IMMUNOPRECIPITATION DE LA CATALASE ENDOGENE DE *P.FALCIPARUM*

#### 1. PREPARATION DE L'IMMUNOADSORBANT

##### 1.1. Purification de l'anticorps polyclonal

Les immunoglobulines de rat sont purifiées par chromatographie d'échange d'ions. 200  $\mu$ l de sérum de rat, dilués par du tampon Tris-Hcl 10 mM pH 8,5 sont déposés sur une colonne de DEAE-Trisacryl équilibrée avec le même tampon. Les immunoglobulines sont éluées par le tampon Tris-Hcl 10 mM pH 8,5 contenant 50 mM de NaCl. Une fraction de l'éluat est analysée en SDS-PAGE afin de visualiser la pureté des immunoglobulines. L'ensemble des fractions obtenues est dialysé et concentré à 4°C (Microprodicon PM 15 000) pendant 48 heures contre du tampon bicarbonate salin (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6; 0,5 M NaCl). Le dosage de la quantité d'immunoglobulines est réalisé grâce au kit Bio Rad précédemment cité.

##### 1.2. Couplage des immunoglobulines purifiées

Les immunoglobulines sont couplées au gel Sépharose-4B- CNBr (Pharmacia), suivant la proportion de 10 mg de protéines pour 1 ml de gel. Ce dernier, pré-activé par le bromure de cyanogène, est préalablement gonflé par 1 mM de HCl, puis rincé par le tampon bicarbonate salin. Les immunoglobulines sont mises en contact avec le gel activé en tampon bicarbonate salin et agitées pendant 3 heures à température ambiante. Les protéines non couplées sont éliminées par lavage (1 nuit à 4°C) dans un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8. Le tampon permet également de bloquer les sites actifs libres du gel. Suivent 3 séries de lavage combinant un lavage par un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4 contenant 0,5 M de NaCl et un lavage par le tampon bicarbonate salin à température ambiante. Après lavage par du PBS, l'immunoabsorbant ainsi préparé est conservé au 1/5<sup>ème</sup> dans du PBS à 4°C.



## 2. IMMUNOPRECIPITATION

### 2.1. Lysat parasitaire

#### 2.1.1. Marquage métabolique à l'isoleucine tritiée

Le marquage est réalisé par incorporation métabolique de l'isoleucine tritiée ( $^3\text{H}$ -Ile, Amersham: activité spécifique 96 Ci/mmol) par les parasites *in vitro*. Une culture de *P. falciparum* synchronisée (3% d'hématocrite, 15 % de parasitémie) au stade jeune trophozoïte est utilisée pour le marquage. Les hématies sont préalablement lavées en milieu RPMI 1640 (Boehringer) enrichi en HEPES (25 mM),  $\text{NaHCO}_3$  (3,2% en volume final) exempt d'isoleucine, puis placées en milieu de culture de composition :

- 9 volumes de milieu de culture complet exempt d'isoleucine
- 1 volume de milieu de culture complet

L'isoleucine tritiée est ajoutée à la concentration de 50  $\mu\text{Ci/ml}$ . Le marquage dure 10 heures.

#### 2.1.2. Extraction des parasites

Le marquage terminé, les parasites sont extraits à la saponine, puis lysés par sonication, selon les techniques décrites précédemment.

#### 2.1.3. Comptage de la radioactivité

Une fraction du lysat parasitaire radiomarké (10  $\mu\text{l}$ ) est précipitée par l'acide trichloroacétique (TCA) 10%, filtrée sur fibre de verre et insérée dans une fiole contenant le cocktail scintillant (Beckman). L'incorporation des acides aminés radioactifs est alors mesurée par scintillation en phase liquide.

## 2.2. Immunoprécipitation

60  $\mu\text{l}$  d'immunoabsorbant sont placés en tube Eppendorf de 1,5 ml contenant du PBS, 0,1 M de NaCl et 2,5% d'albumine sérique bovine (Boehringer) pendant 3 heures à température ambiante sous agitation. Après avoir remplacé le tampon, le gel est mis en contact avec l'échantillon contenant 3,5 millions de cpm (coups par minute) une nuit à 4°C sous agitation. Le gel est ensuite lavé sous agitation par 7 lavages de 10 minutes chacun dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,5; 1 M de NaCl; NP-40 (Nonidet P-40) 0,5%; isoleucine froide 20 mM à température ambiante. Le gel est ensuite rapidement lavé par du tampon Tris-HCl 5 mM pH 6,8. Les protéines sont finalement éluées du gel par le tampon de reprise électrophorétique (Tris-HCl

62,5 mM pH 6,8; SDS 2%; saccharose 20%) contenant 0,1 M de DTT et chauffé 5 min à 95°C puis centrifugé. L'éluat est analysé en électrophorèse SDS-PAGE, sur un gel de 1,5 mm d'épaisseur à 10 % d'acrylamide.

### **2.3. Analyse des protéines immunoprécipitées**

#### **2.3.1. Coloration des protéines au bleu de Coomassie**

Après démoulage, le gel est fixé et coloré pendant 1 heure, sous agitation douce, par une solution de bleu de Coomassie (Merck) à 0,02%, contenant de l'acide acétique à 10 % et de l'isopropanol à 25%. Il est ensuite décoloré par une solution d'acide acétique à 10%.

#### **2.3.2. Fluorographie**

Le gel est traité par un agent scintillant (EnHance, NEN) pour pallier le faible pouvoir pénétrant des particules émises. L'incubation dure 1 heure puis l'agent scintillant est précipité par de l'eau milliQ durant une demi-heure. Le gel est séché sous vide sur un papier Whatman N°3, puis exposé sur un film X-OMAT AR Kodak à -70°C.

## CHAPITRE V: APPROCHE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

### 1. PREPARATION DE L'ADN GENOMIQUE DE *P. FALCIPARUM*

Un culot d'hématies parasitées (4 ml d'hématies à 12 % de parasitémie), est lavé deux fois par du PBS, puis lysé par la saponine à 0,01 % dans du PBS pendant 5 min à température ambiante. Deux lavages en PBS sont effectués par centrifugation à 8800 g pendant 5 min à 4°C, puis le culot parasitaire est repris par 5 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 7,5 mM pH 8; EDTA 7,5 mM pH 8; SDS 1%) contenant 0,4 mg/ml de protéinase K (Interchim). L'ensemble est incubé une nuit à 50°C sous agitation. Les acides nucléiques sont déprotéinisés par une extraction au phénol, suivie d'une extraction phénol/chloroforme (v/v) et enfin deux extractions par chloroforme/alcool isoamylique (24v/1v). Ce dernier mélange achève la déprotéinisation et élimine le phénol dissout dans la phase aqueuse. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est alors précipité par un mélange acétate de sodium 3M pH 6 (0,1v), éthanol absolu (2v) glacé (-20°C). Il est ensuite enroulé sur une baguette de verre stérile, puis lavé dans de l'alcool à 70° (-20°C). La baguette est séchée à température ambiante puis l'ADN est redissout dans le tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1mM). La concentration de l'ADN est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm, sachant que 1 D.O correspond à 50 µg d'ADN par ml. La qualité de la préparation est contrôlée par le calcul du rapport D.O 260 nm/D.O 280 nm. Celui-ci doit être proche de 2.

### 2. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)

#### 2.1. Choix des amorces

Le choix des amorces a été effectué par comparaison de 19 séquences protéiques de catalase (mammifère, levure, bactérie) permettant de mettre en évidence des régions fortement conservées entre toutes ces séquences. La séquence nucléotidique correspondante a été déterminée selon la fréquence d'apparition des codons chez *Plasmodium falciparum* (Hyde *et al.*, 1989). Le choix d'amorces dégénérées s'est imposé du fait de la dégénérescence du code génétique et de quelques acides aminés peu conservés. Ces amorces ont été synthétisées par la firme Eurogentec et diluées à la concentration de 100 µM en eau milliQ.

## 2.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est réalisée grâce au kit de chez Eurogentec comprenant la GoldStar DNA polymérase et les tampons réactionnels correspondants. La réaction s'effectue sur 500 ng d'ADN génomique de *P.falciparum*, 0,5 U de polymérase, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chaque nucléotide (Boehringer), 1 μM de chaque amorce en tampon Tris-HCl 75 mM pH 9; 0,01% Tween 20; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM. La réaction correspond à 35 cycles d'amplification et débute par une dénaturation de l'ADN pendant 5 min à 94°C. Chaque cycle comprend 3 étapes de 1 min 30. La première à 94°C permet de dénaturer l'ADN, la seconde permet l'hybridation des amorces (50°C) sur l'ADN et la troisième est une étape d'extension par la DNA polymérase à 72 °C. La réaction se termine par 5 min de polymérisation à 72 °C. Un témoin négatif dépourvu d'ADN est effectué en parallèle.

## 2.3. Analyse des produits de PCR.

Après amplification, les produits de la PCR sont analysés sur un minigel d'agarose à 2% contenant 0,5 μg/ml de bromure d'éthidium (Sigma) dans un tampon TBE (Tris 90 mM/Borate 90 mM pH 8; EDTA 2 mM). Après solidification de l'agarose, le gel est immergé dans le tampon de migration (TBE). 10 μl de chaque échantillon additionnés de 2 μl du tampon de dépôt (glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,25%) sont déposés. La séparation électrophorétique est réalisée en ampérage constant, 100 mA pendant 2 heures. Des témoins de poids moléculaires (Boehringer) sont déposés en parallèle. Le résultat obtenu est visualisé sous U.V grâce au bromure d'éthidium intercalé dans l'ADN.

## 3. CLONAGE

### 3.1. Préparation du fragment à cloner

Un gel préparatif de 2 % d'agarose en tampon TAE (Tris 40 mM/Acétate 40 mM pH 8; EDTA 1 mM) est effectué. Après migration, le fragment à cloner est excisé, puis élué du gel grâce au kit Qiaex (Qiagen) comprenant les tampons d'extractions et le gel Qiaex permettant de retenir l'ADN. Celui-ci sera élué de la matrice par le tampon TE.

### 3.2. Clonage

Il est réalisé grâce au kit de clonage pCR-Script™ SK(+) de chez Stratagene selon la technique de Bauer *et al.*, (1992). Ce kit utilise comme vecteur le plasmide Bluescript II SK (+) qui possède le gène de la résistance à l'ampicilline, l'opéron lactose et le site de restriction SrfI à coupure franche. L'efficacité de ligation du fragment d'ADN à bout franc est basé sur les réactions simultanées de l'enzyme de restriction SrfI et celle de la T4 DNA ligase, qui va permettre de refermer le vecteur ayant ou non inséré le fragment. La réaction utilise 10 ng du vecteur pour 30 ng du produit de la PCR, 5 U de l'enzyme de restriction et 4 U de T4 ligase. L'ensemble est laissé à température ambiante pendant une heure, avant d'être chauffé 10 min à 65°C pour inactiver les enzymes. Le tout est placé sur la glace jusqu'à utilisation pour la transformation.

### 3.3. Transformation

Elle est réalisée grâce aux bactéries supercompétentes Epicurian Coli XL1-Blue MRF' Kan fournies avec le kit de clonage. Les bactéries sont placées dans 25 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol (ce composé améliore le rendement de la transformation) et mises pendant 10 min sur la glace. 10 ng d'ADN issus de la ligation sont ajoutés aux bactéries et laissés sur glace pendant 30 min supplémentaires, avant de subir un choc thermique de 45 secondes à 42 °C. Les bactéries sont ensuite remises sur la glace 2 minutes puis incubées en milieu SOC (20 g/l Tryptone; 5 g/l d'extrait de levure; 0,5 g/l NaCl; 2 g/l MgCl<sub>2</sub>; 1,2 g/l MgSO<sub>4</sub>; 3,6 g/l glucose) 1 heure à 37°C sous agitation afin de restaurer la résistance à l'antibiotique exprimé par le plasmide. Les bactéries sont finalement étalées sur le milieu LB agar (milieu Luria Bertani constitué de 10 g/l Tryptone; 5 g/l d'extrait de levure; 5 g/l de NaCl; 20 g/l Bactoagar pH 7,4) contenant 20  $\mu$ g/ml d'ampicilline, 40  $\mu$ l d'IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiol-galactopyranoside) à 100 mM et 20  $\mu$ l de X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) à 20 mg/ml. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C.

### 3.4. Criblage

Le criblage est basé sur l'expression de la  $\beta$ -galactosidase. En effet, le site SrfI est placé dans l'opéron lactose et lorsqu'il y a insertion d'un fragment, celui-ci devient non fonctionnel. En présence d'un inducteur de l'opéron lactose (IPTG), les bactéries transformées par le plasmide portant l'insert, ne vont pas pouvoir exprimer la  $\beta$ -galactosidase et ainsi métaboliser le substrat coloré (X-gal). Elles vont former des colonies blanches contrairement aux bactéries possédant le

plasmide sans insert qui seront bleues. Les bactéries n'ayant pas le plasmide ne peuvent pousser en présence d'antibiotique. Après examen des boîtes de Pétri, les colonies blanches sont prélevées et mises en milieu LB contenant l'antibiotique sur la nuit à 37°C sous agitation.

### 3.5. Contrôle de l'insertion du fragment

Afin de contrôler la présence de l'insert dans le plasmide, une extraction et une purification de plasmide sont réalisées. Cette technique utilise le kit Miniprep de chez Promega. Ce kit comprend tous les tampons ainsi que la résine permettant de fixer l'ADN plasmidique. Les bactéries, provenant d'une culture de 3 ml sont centrifugées 20 min à 3000g, puis remises en suspension dans un tampon contenant de la RNase A à 100 µg/ml avant d'être lysées par 0,5 % SDS, 0,1M NaOH final. La lyse alcaline en présence de SDS permet de dénaturer les protéines, l'ADN bactérien ainsi que l'ADN plasmidique. La neutralisation du lysat à haute force ionique par un tampon acétate de potassium 1,32 M pH 4,8 permet de précipiter l'ADN chromosomique bactérien de haut poids moléculaire qui ne se renature pas, par rapport à l'ADN plasmidique de faible poids moléculaire qui se renature rapidement et reste en solution. Après plusieurs centrifugations de 5 min à 13 000g, le surnageant est déposé sur la résine. L'ADN plasmidique est élué par 50 µl de TE après quelques lavages par le tampon contenant de l'éthanol (47°). Le plasmide obtenu est soumis à une digestion par deux enzymes de restrictions Pst1 et Not1 (10 U/µg d'ADN) 2 heures à 37°C. Le produit de la digestion est analysé sur un minigel à 2% d'agarose.

## 4. SEQUENCAGE DU FRAGMENT AMPLIFIÉ

### 4.1. Préparation de l'échantillon

Le plasmide contenant l'insert est purifié comme précédemment à partir de 50 ml de milieu de culture. 5 µg d'ADN sont prélevés et dénaturés en simple brin par de la soude 0,5 M et EDTA 0,2 mM final, pH 8 pendant 30 min à 37°C. L'ADN est ensuite précipité, afin d'éliminer le tampon de dénaturation, à -20°C pendant 2 heures par l'ajout de 1/10 d'acétate de sodium pH 4,5 et de 3 volumes d'éthanol 100°. Le culot obtenu après centrifugation 30 min à 12 000g est lavé par de l'éthanol à 70° puis séché sous vide. Il est enfin repris par 10 µl de TE.

#### 4.2. Réaction de séquence

Elle est réalisée selon la technique de Sanger et Nicklen (1977) avec le kit Sequenase (USB) version 2.0 contenant la DNA polymérase du phage T7. Cette enzyme permet d'allonger une séquence nucléotidique à partir d'une amorce fixée sur l'ADN à séquencer. L'utilisation de didésoxynucléotides (ddNTP) et de désoxynucléotides marqués ( $^{33}\text{P}$  dATP) a pour résultat la synthèse d'un ADN radioactif, dont la taille correspond à l'arrêt de synthèse dû à l'incorporation d'un didéoxynucléotide. Nous réalisons le séquençage des 2 brins de l'insert en utilisant comme amorce les promoteurs T3 et T7 (USB) qui vont s'hybrider respectivement sur le brin codant et non codant du vecteur. Ainsi, deux réactions de séquence sont réalisées par insert. Le plasmide, en présence d'une des amorces (0,5 pmol), est dénaturé 2 min à 70 °C puis laissé à refroidir jusqu'à 35 °C permettant à l'amorce de se fixer sur l'ADN lorsqu'elle rencontre sa température d'hybridation. Puis, sont ajoutés 1  $\mu\text{l}$  de DTT 0,1M; 0,2 MBq de  $^{33}\text{P}$ dATP, les nucléotides et tampons permettant la réaction ainsi que la polymérase du phage T7. L'ensemble est placé 5 min à 45 °C, puis le mélange est distribué dans 4 tubes contenant un didéoxynucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) et laissé 8 min à 70 °C. La réaction est stoppée par l'ajout du tampon d'arrêt.

#### 4.3. Migration électrophorétique

Un gel dénaturant de 0,4 mm d'épaisseur à 6 % d'acrylamide en tampon TBE, contenant 420 g/l d'urée, est coulé entre 2 plaques de verre. Avant dépôt, les échantillons sont chauffés 5 min à 95 °C pour permettre la dénaturation de l'ADN, puis mis sur la glace. Afin d'obtenir un maximum de renseignements sur la séquence recherchée, deux dépôts à deux heures d'intervalle des 4 tubes réactionnels (un puits par didéoxynucléotide) sont effectués. La migration se déroule à 75 watts, en tampon TBE. Le gel est ensuite démoulé, fixé 20 min dans une solution d'acide acétique 10%, méthanol 20%, puis séché sous vide 1 heure à 75 °C entre une feuille de papier Whatman et un film plastique.

#### 4.4. Révélation du gel

Après séchage, le gel est mis en contact avec un film autoradiographique X-OMAT (Kodak) une nuit dans une cassette hermétique à la lumière avant d'être développé. La séquence nucléotidique est analysée à l'aide du programme PC Gene (programme 6.7, Intelligenetics Inc.) puis traduite en séquence peptidique.

#### 4.5. Analyse des résultats obtenus

La séquence partielle est 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 compare la séquence peptidique obtenue, acide aminé par acide aminé, avec toutes les protéines répertoriées dans la banque de données (EMBL, Heidelberg). Les "gaps" consécutifs aux alignements sont considérés comme des différences. Cette analyse permet ainsi de rechercher les protéines ayant le plus d'homologie avec celle dont nous avons déterminé la séquence.

### 5. REVERSE TRANSCRIPTASE SUIVIE D'UNE PCR (RT-PCR)

#### 5.1. Précautions relatives à la manipulation des ARN

Le matériel utilisé (tubes Eppendorf et cônes siliconés) ainsi que les solutions sont, respectivement, autoclavés 20 min à 120°C, trois fois consécutivement ou traitées au Diéthylpyrocarbonate (DEPC, Fluka) afin d'inhiber les RNAses.

#### 5.2. Extraction de l'ARN total de *P. falciparum*

La préparation de l'ARN total a été effectuée selon la méthode décrite par Bonnefoy *et al.*, (1992). Un culot d'hématies parasitées (5 ml à 12% de parasitémie) est lavé deux fois en RPMI, puis lysé par de la saponine à 0,01% en RPMI, 5 min à température ambiante. La lyse est arrêtée par une centrifugation, 8800g pendant 5 min à 4°C, puis le culot est lavé de nouveau en RPMI. Le culot parasitaire est repris par un volume de tampon A (acétate de sodium 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM) contenant 3% de SDS. Cette solution permet, par la présence du SDS, la lyse complète des parasites. Les acides nucléiques sont ensuite extraits par un volume de phénol saturé en tampon A, suivie d'une extraction au phénol/chloroforme (v/v), puis d'une extraction au chloroforme seul (1v). Les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse sont précipités par de l'acétate de sodium 0,3 M final pH 5,2 et par deux volumes d'éthanol absolu glacé. L'ADN formant un précipité gélatineux est éliminé. L'ARN soluble est précipité par une centrifugation de 20 min à 10000g. Il est ensuite lavé par de l'éthanol à 70° (glacé), puis séché. L'ARN est repris par 50 µl d'eau contenant du DEPC. La qualité de la préparation d'ARN est visualisée par électrophorèse en gel de 1% d'agarose contenant du bromure d'éthidium.



### 5.3. Etape de Réverse transcriptase suivie d'une PCR (RT-PCR)

Afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique, l'ARN total est soumis avant RT-PCR à l'action de la DNAase I (Boehringer). 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total sont traités par 10 U de DNAase, exempte de RNAse en présence de 2 mM de  $\text{MnCl}_2$ . Après une incubation d'une heure à 37°C, l'enzyme est inactivée par chauffage 5 min à 95°C. L'ARN total est prêt pour la RT-PCR. La réaction de RT-PCR est réalisée avec le kit "Eurobio" contenant les tampons réactionnels et la Tth ADN polymérase. Cette enzyme est capable de polymériser de l'ADN aussi bien à partir d'une matrice d'ARNm que d'une matrice d'ADN; ceci étant fonction de la présence du métal cofacteur. En présence de  $\text{MnCl}_2$ , elle agit en tant que reverse transcriptase, alors qu'en présence de  $\text{MgCl}_2$ , elle travaille comme une ADN polymérase classique.

La transcription inverse est réalisée avec 1  $\mu\text{M}$  de l'amorce en 3', 0,25  $\mu\text{g}$  d'ARN total traité par la DNAase, 1 mM de  $\text{MnCl}_2$  et 5 unités de Tth ADN polymérase. Un témoin négatif ne contenant pas d'ARN total est effectué en parallèle. La réaction débute par 10 min à 50°C, étape permettant l'hybridation de l'amorce sur l'ARN puis la transcription inverse s'effectue à 70°C pendant 20 min. L'amplification de l'ADN complémentaire obtenu est réalisé par PCR en présence de 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Un mélange d'amplification contenant 1  $\mu\text{M}$  de l'amorce en 5', 0,75mM d'EGTA qui va complexer le  $\text{MnCl}_2$ , est ajouté au produit de transcription inverse. L'échantillon va subir le protocole d'amplification cité précédemment.

L'analyse des fragments amplifiés est réalisée en électrophorèse sur gel à 2% d'agarose.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## A

Abler, M.L. et Scandalios, J.G. (1993). "Isolation and characterization of a genomic sequence encoding the maize cat 3 catalase gene." *Plant Mol. Biol.* **22**: 1031-1038.

Abrams, J.J. et Webster, D.A. (1990). "Purification, partial characterization and possible role of catalase in the bacterium *Vitreoscilla*." *Arch. Biochem. Biophys.* **279**: 54-59.

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*.

Allgood, G.S. et Perry, J.J. (1986). "Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album*." *J. Bact.* **168**: 563-567.

Almarsson, O., Sinha, A., Gopinath, E. et Bruice, T.C. (1993). "Mechanism of one-electron oxidation of NAD(P)H and function of NADPH bound to catalase." *J. Am. Chem. Soc.* **G 115**: 7093-7102.

Areekul, S., Churdchu, K., Thanomsak, W., Pattanamatum, S., Suphadtanaphongs, V. et Pojjiaroenanant, C. (1988). "Superoxide dismutase and catalase activities of cultured erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*." *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.* **19**: 601-607.

Areekul, S. et Boonme, Y. (1992). "Catalase activity in red cell and liver of mice infected with *Plasmodium berghei*." *Lipid-soluble antioxidants : Biochemistry and Clinical Applications*. A.S.H. ONG et L.PACKER (eds), 416-423.

Asawamahesakda, W., Ittarat, I., Pu, Y.-M., Ziffer, H. et Meshnick, S.R. (1994a). "Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38**: 1854-1858.

Asawamahesakda, W., Benakis, A. et Meshnick, S.R. (1994b). "The interaction of artemisinin with red cell membranes." *J. Clin. Lab. Med.* **123**: 757-762.

Atamna, H. et Ginsburg, H. (1993). "Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*." *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 231-242.

## B

Bauer, J., Deely, D., Braman, J., Viola, J. et Weiner, M. (1992). "pCR-Script SK(+) cloning system: a simple and fast method for PCR cloning." *Strategies in Mol. Biol.* **5**: 62-64.

Bécuwe, P., Slomianny, C., Valentin, A., Schrevel, J., Camus, D. et Dive, D. (1992). "Endogenous superoxide dismutase activity in two *Babesia* species." *Parasitol.* **105**: 177-182.

Bécuwe, P., Slomianny, D., Camus, D. et Dive, D. (1993). "Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species." *Parasitol. Res.* **79**: 349-352.

Bécuwe, P., van Beeumen, J., Samyn, B., Touzel, J.P., Slomianny, C., Camus, D. et Dive, D. (1994). "Purification, characterization and amino terminal sequence of the superoxide dismutase from *Babesia hylomysci*." *Comp. Biochem. Physiol.* **109**: 637-645.

Bécuwe, P. (1994). "Les superoxyde dismutases de *Plasmodium* et *Babesia* : contribution à leur caractérisation." *Thèse de doctorat de Lille I*.

Bécuwe, P., Gratepanche, S., Fourmaux, M.N., Van Beeumen, J., Samyn, B., Mercereau-Puijalon, O., Touzel, J.P., Slomianny, C., Camus, D. et Dive, D. (1995). "Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*." *Mol. Biochem. Parasitol.* sous presse.

Beers, R.F. et Sizer, I.W. (1952). "A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase." *J. Biol. Chem.* **196**: 133-140.

Belazzi, T., Wagner, A., Wieser, R., Schanz, M., Adam, G., Hartig, A. et Ruis, H. (1991). "Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (*CTT1*) gene by AMPc is mediated by a positive control element." *EMBO J.* **10**: 585-592.

Benov, L.T et Fridovich, I. (1994). "*Escherichia coli* expresses a copper-and zinc-containing superoxide dismutase." *J. Biol. Chem.* **269**: 25310-25314.

Bessis, M. (ed) (1972). "Cellules du sang normal et pathologique." *Masson, Paris*, pp31-32.

Beutler, E., Matsumoto, F., Powors, D. et Warner, J (1977). "Increased glutathione peroxidase activity in alpha thalassemia." *Blood* **50**: 647-655.

Bishai, W.R., Smith, H.O. et Barcak, G.J. (1994a). "A peroxide/ascorbate-inducible catalase from *Haemophilus influenzae* is homologous to the *Escherichia coli* *katE* gene product." *J. Bacteriol.* **176**: 2914-2921.

Bishai, W.R., Howard, N.S., Winkelstein, J.A. et Smith, H.O. (1994b). "Characterization and virulence analysis of catalase mutants of *Haemophilus influenzae*." *Infect. Immun.* **62**: 4855-4860.

Bol, D.K. et Yasbin, R.E. (1994). "Analysis of the dual regulatory mechanisms controlling expression of the vegetative catalase gene of *Bacillus subtilis*." *J. Bacteriol.* **176**: 6744-6748.

Bonaventura, J., Schroeder, W.A. et Fang, S. (1972). "Human erythrocyte catalase : an improved method of isolation and a reevaluation of reported properties." *Arch. Biochem. Biophys.* **150**: 606-617.

Bonnefoy, S., Guillotte, M., Langsley, G. et Mercereau-Puijalon, O. (1992). "*Plasmodium falciparum*: characterization of gene R45 encoding a trophozoite antigen containing a central block of six amino acid repeats." *Exp. Parasitol.* **74**: 441-451

Borel, J-P, Monboisse, J-C et Bellon, G. (1988). "Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés." *M/S* 5: 304-310.

Boveris, A., Sies, H., Martino, E.E., Docampo, R., Turrens, J.F. et Stoppani, A.O.M. (1980). "Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*." *Biochem. J.* 188: 643-648.

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.

Brockelman, C.R., Wongsattayanont, B., Tan-Ariya, P. et Fucharoen, S. (1987). "Thalassemic erythrocytes inhibit *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*." *J. Clin. Microbiol.* 25: 56-60.

Brown, D.M., Upcroft, J.A. et Upcroft, P. (1995). "Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*." *Mol. Biochem. Parasitol.* 72: 47-56.

Brown-Peterson, N.J et Salin, M.L. (1993). "Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: characterization of some unique properties of the Halophilic enzyme." *J. Bacteriol.* 175: 4197-4202.

Brown-Peterson, N.J et Salin, M.L. (1995). "Purification and characterization of a mesohalic catalase from the Halophilic bacterium *Halobacterium halobium*." *J. Bacteriol.* 177: 378-384.

Bruchhaus, I et Tannich, E. (1995). "Identification of an *Entamoeba histolytica* gene encoding a protein homologous to prokaryotic disulphide oxidoreductases." *Mol. Biochem. Parasitol.* 70: 187-191.

Buffinton, G.D., Hunt, N.H., Cowden, W.B. et Clark, I.A. (1988). "Detection of short-chain carbonyl products of lipid peroxidation from malaria-parasite (*Plasmodium vinckei*)-infected red blood cells exposed to oxidative stress." *Biochem. J.* 249: 63-68.

## C

Carrell, R.W., Winterbourn, C.C. et Rachmilewitz, E.A. (1975). "Activated oxygen and haemolysis." *Br. J. Haem.* 30: 259-264.

Chaga, G.S., Medin, A.S., Chaga, S.G. et Porath, J.O. (1992). "Isolation and characterization of catalase from *Penicillium chrysogenum*." *J. Chromat.* 604: 177-183.

Chandlee, J.M., Tsafaris, A.S. et Scandalios, J.G. (1983). "Purification and partial characterization of three genetically defined catalases of maize." *Plant Science Letters.* 29: 117-131.

Channon, J.Y. et Blackwell, J.N. (1985). "A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide." *Parasitol.* 91: 197-206.

- Chow, C.K. (1991). "Vitamin E and oxidative stress." *Free. Rad. Biol. Med.* **11**: 215-232.
- Claiborne, A. et Fridovich, I. (1979). "Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B." *J. Biol. Chem.* **254**: 4245-4252.
- Clare, D.A., Duong, M.N., Darr, D., Archibald, F. et Fridovich, I. (1984). "Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase." *Anal. Biochem.* **140**: 532-537.
- Clark, I.A. et 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. et Mackie, E.J. (1984a). "Activity of divicine in *Plasmodium vinckei*-infected mice has implications for treatment of favism and epidemiology of G-6-PD deficiency." *Br. J. Haem.* **57**: 479-487.
- Clark, I.A., Hunt, N.H., Cowden, W.B., Maxwell, L.E. et Mackie, E.J. (1984b). "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., Butcher, G.A., Buffinton, G.D., Hunt, N.H. et Cowden, W.B. (1987). "Toxicity of certain products of lipid peroxidation to the Human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Biochem. Pharmac.* **36**: 543-546.
- Clark, I.A., Chaudhri, G. et Cowden, W.B. (1989). "Some roles of free radicals in malaria." *Free Rad. Biol. Med.* **6**: 315-321.
- Cohen, G. et Hochstein, P. (1963). "Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes." *Biochemistry* **6**: 1420-1428.
- Cohen, G., Rapatz, W. et Ruis, H. (1988). "Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it." *Eur. J. Biochem.* **176**: 159-163.

## D

- Das, B.S. et 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.
- Das, B.S., Patnaik, J.K., Mohanty, S., Mishra, S.K., Mohanty, D., Satpathy, S.K. et Bose, T.K. (1993). "Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in *P. falciparum* malaria." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 720-725.
- 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).

De Shazer, D., Wood, G.E. et Friedman, R.L. (1994). "Molecular characterization of catalase from *Bordetella pertussis* : identification of the *katA* promoter in an upstream insertion sequence." *Mol. Microbio.* **14**: 123-130.

Deisseroth, A. et Dounce, A.L. (1970). "Catalase : physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role." *Physiol. Reviews* **50**: 319-375.

Descamps-Latscha, B., Lunel-Fabiani, F., Kara-Binis, A. et Druilhe, P. (1987). "Generation of reactive oxygen species in whole blood from patients with acute *falciparum* malaria." *Parasite Immunol.* **9**: 275-279.

Didion, T. et Roggenkamp, R. (1992). "Targeting signal of the peroxisomal catalase in the methylotrophic yeast *Hanseluna polymorpha*." *FEBS* **303**: 113-116.

Dismukes, G.C. (1992). "Polynuclear manganese enzymes." in Bioinorganic catalysis. Reedijk, J. Ed.; Dekker, M. Amsterdam chap. **10**: 317-346.

Dockrell, H.M. et Playfair, J.H.L. (1983). "Killing of blood-stage murine malaria parasites by hydrogen peroxide." *Infect. Immun.* **39**: 456-459.

Dockrell, H.M. et Playfair, J.H.L. (1984). "Killing of *Plasmodium yoelii* by enzyme-induced products of the oxidative burst." *Infect. Immun.* **43**: 451-456.

Dubey, M.L., Rai, S.K., Ganguly, N.K., Kalra, A., Varma, S.C. et Mahajan, R.C. (1991). "Generation of reactive oxygen species by blood monocytes in human *Plasmodium falciparum* and *P.vivax*." *APMIS* **99**: 201-212.

## E

Eaton, J.W., Eckman, J.R., Berger, E. et Jacob, H.S. (1976). "Suppression of malaria infection by oxidant-sensitive host erythrocytes." *Nature* **264**: 758-760.

Eckman, J.R. et Eaton, J.W. (1979). "Dependence of plasmodial glutathione metabolism on the host cell." *Nature* **278**: 754-756.

Elford, B.C., Roberts, M.F., Phillipson, J.D. et Wilson, J.M. (1987). "Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 434-436.

Ellis, J.E., Yarlett, N., Cole, D., Humphreys, M.J. et Lloyd, D. (1994). "Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis* : comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains." *Microbiology* **140**: 2489-2494.



## F

Fairfield, A.S., Meshnick, S.R. et Eaton, J.W. (1983). "Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase." *Science* **221**: 764-766.

Fairfield, A.S., Eaton, J.W. et 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. et Meshnick, S.R. (1988). "Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*." *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**: 77-82.

Feinstein, R.N., Howard, J.B., Braun, J.T. et Seaholm, J.E. (1996). "Acatlasemic and hypocatalasemic mouse mutants." *Genetics* **53**: 923-933.

Ferradini, C. (1986). "Espèces activées radicalaires de l'oxygène" *Biochimie* **68**: 779-785.

Fita, I. et Rossmann, M.G. (1985a). "The NADPH binding site on beef liver catalase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1604-1608.

Fita, I. et Rossmann, M.G. (1985b). "The active center of catalase." *J. Mol. Biol.* **185**: 21-37.

Flohé, L., Gunzler, W. et Schock, H. (1973). "Glutathione peroxidase : a seleno enzyme". *FEBS Lett.* **32**: 132-134.

Fowler, T., Rey. M.W., Vähävahe, P., Power, S.D. et Berka, R.M. (1993). "The *catR* gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*: primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter." *Mol. Microbio.* **9**: 989-998.

Fritsch, B., Dieckmann, A., Menz, B., Hempelmann, E., Fritsch, K.-G., Fritsch, G. et Jung, A. (1987). "Glutathione and peroxide metabolism in malaria-parasitized erythrocytes." *Parasitol. Res.* **73**: 515-517.

Furuta, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Miyazawa, S., Osumi, T. et Hashimoto, T. (1986). "Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver catalase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 313-317.

## G

Gabay, T. et 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.

Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M. et Kirkman, H.N. (1989). "Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes". *Blood* **73**: 334-339.

Gaetani, G.F., Kirkman, H.N., Mangerini, R. et Ferraris, A.M. (1994). "Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes." *Blood*. **84**: 325-330.

Gamain, B., Arnaud, J., Favier, A., Camus, D., Dive, D. et Slomianny, C. (1995). "Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation." Soumis à publication

Garnham, P.C.C. (1987). "The liver in malaria with special reference to the erythrocytic phase." *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **81**: 531-537.

Gay, F., Bustos, D.G., Venturin, C., Ciceron, L., Counali, J.B., Sampang, J., Nadire, M., Saniel, M.C. et 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.

Geerts, A., Prest, B.D. et Roels, F. (1984). "On the topology of the catalase biosynthesis and degradation in the guinea pig liver." *Histochem.* **80**: 339-345.

Gendrel, D., Kombila, M., Nardou, M., Gendrel, C., Djouba, F., Martz, M. et Richard-Lenoble, D. (1992). "Paludisme et hémoglobine S ; interactions chez l'enfant africain." *Presse Méd.* **21**: 887-890.

Gerli, G.C., Beretta, L., Bianchi, M., Pellegatta, A. et Agostini, A. (1980). "Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in  $\beta$ -thalassaemia (major and minor)." *Scand. J. Haematol.* **25**: 87-92.

Gerli, G.C., Beretta, L., Bianchi, M., Agostini, A., Gualandri, V. et Orsini, G.B. (1982). "Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." *Scand. J. Haematol.* **29**: 135-140.

Goldberg, I. et Hochman, A. (1989). "Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*." *Biochem. Biophysic. Acta.* **991**: 330-336.

Goldberg, D.E. et Slater, A.F.G., Cerami, A. et Henderson, G.B. (1992). "Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 2931-2935.

Goldberg, D.E. et Slater, A.F.G. (1992). "The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites." *Parasitol. Today* **8**: 280-286.

Golenser, J. et Chevion, M. (1989). "Oxidant stress and malaria : host-parasite interrelationships in normal and abnormal erythrocytes." *Seminars in Haematol.* **26**: 313-325.

Golenser, J., Marva, E. et Chevion, M. (1991a). "The survival of *Plasmodium* under oxidant stress." *Parasitol. Today* **7**: 142-146.

- Golenser, J., Marva, E., Har-El, R. et Chevion, M. (1991b). "Induction of oxidant stress by iron available in advanced forms of *Plasmodium falciparum*." *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 639-643.
- Gonnet, G.H., Cohen, M.A. et Benner, S.A. (1992). "Exhaustive matching of the entire protein sequence database." *Science* **256**: 1443-1445.
- Gorenflot, A., Brasseur, P., Bonmarchand, G., Laneelle, D. et Simonin, D. (1990). "Deux cas de babésioses humaines graves traités avec succès." *Presse Méd.* **19**: 335.
- Göth, L. (1992). "Characterization of acatalasemia detected in two hungarian sisters." *Enzyme* **46**: 252-258.
- Gregory, E.M. et Fanning, D.D. (1983). "Effect of heme on *Bacteroides distasonis* catalase and aerotolerance." *J. Bact.* **156**: 1012-1018.
- Griffiths, G. (1984). "On the preparation of cryosections for immunocytochemistry." *J. Ultrastruct. Res.* **89**: 65-78.
- Gu, H.M., Lu, B.F. et Qu, Z.X. (1980). "Activities of 25 derivatives of artemisinin against chloroquine-resistant *Plasmodium berghei*." *Acta Pharmacol. Sinica.* **1**: 48-50.
- Gu, H.M., Warhurst, D.C. et Peters, W. (1984). "Uptake of (3H) dihydroartemisinin by erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* in vitro." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 265-270.
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G. et Siest, G. (1991). "Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood." *Clinical Chemistry* **37**: 1932-1937.

## H

- Haldane, J.B.S. (1949). "The rate of mutation of human genes." *Proceedings of the VIII International Congress on Genetics and Heredity* (supplément 35), 367.
- Halliwell, B. et Gutteridge J.M.C. (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts." *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 501-514.
- Halliwell, B. et Gutteridge J.M.C. (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." *Arch. Biochem. Biophys.* **280**: 1-8.
- Hansen, H. et Roggenkamp, R. (1989). "Functional complementation of catalase-defective peroxisomes in a methylotrophic yeast by import of the catalase A from *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur. J. Biochem.* **184**: 173-179.

- Har-El, R., Marva, E., Chevion, M. et Golenser, J. (1993). "Is hemin responsible for the susceptibility of *Plasmodia* to oxidant stress?" *Free Rad. Res. Comms.* **18**: 279-290.
- Hartig, A. et Ruis, H. (1986). "Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T." *Eur. J. Biochem.* **160**: 487-490.
- Hassan, H.M. (1989). "Microbial superoxide dismutase". *Adv.in Genetics* **26**: 65-97.
- Heimberger, A. et Eisenstark, A. (1988). "Compartmentalization of catalases in *Escherichia coli*." *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **154**: 392-397.
- Hempelmann, E., Schirmer, R.H., Fritsch, G., Hundt, E. et Gröschel-Stewart, U. (1987). "Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*." *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**: 19-24.
- Hicks, D.B. (1995) "Purification of three catalase isozymes from facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4." *Biochim. Biophys. Acta* **1229**: 347-355.
- Hochman, A. et Shemesh, A. (1987). "Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*." *J. Biol. Chem.* **262**: 6871-6876.
- Hochman, A. et Goldberg, I. (1991). "Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*." *Biochim. Biophys. Acta.* **1077**: 299-307.
- Hochman, A., Figueredo, A. et Wall, J.D. (1992). "Physiological functions of hydroperoxidases in *Rhodobacter capsulatus*." *J. Bacteriol.* **174**: 3386-3391.
- Hörtner, H., Ammerer, G., Hartter, E., Hamilton, B., Rykta, J., Bilinski, T. et Ruis, H. (1982). "Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme." *Eur. J. Biochem.* **128**: 179-184.
- Hsiao, L.L., Howard, R.J., Aikawa, M. et Taraschi, T.F. (1991). "Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Biochem. J.* **274**: 121-132.
- Hunt, N.H. et 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. et 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**: 247-26.

## I

Inselburg, J. (1985). "Induction and isolation of artemisinin-resistant mutants of *Plasmodium falciparum*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 417-418.

Isin, S.H. et Allen, R.D. (1991). "Isolation and characterization of a pea catalase cDNA." *Plant Mol. Biol.* **17**: 1263-1265.

## J

Jacob, G.S. et Orme-Johnson, W.H. (1979). "Catalase of *Neurospora crassa*. Induction, purification and physical properties." *Biochemistry* **18**: 2967-2975.

Jones, G.L. et Masters, C.J. (1975). "On the nature and characteristics of the multiple forms of catalase in mouse liver." *Arch. Biochem. Biophys.* **169**: 7-21.

Jones, K.R., Cottrell, B.J., Targett, G.A.T. et Playfair, J.H.L. (1989). "Killing of *Plasmodium falciparum* by human monocyte-derived macrophages." *Parasite Immunol.* **11**: 585-592.

Jouve, H.M., Beaumont, F., Léger, I., Foray, J. et Pelmont, J. (1989). "Tightly bound NADPH in *Proteus mirabilis* PR catalase." *Biochem. Cell Biol.* **67**: 271-277.

## K

Kamchonwongpaisan, S., Vanitchareon, N. et Yuthavong, Y. (1992). "The mechanism of antimalarial action of artemisinin (qinghaosu)." *Lipid-soluble antioxidants : biochemistry and clinical applications*, 363-372.

Kawai, S., Kano, S. et Suzuki, M. (1993). "Morphologic effects of artemether on *Plasmodium falciparum* in *Aotus trivirgatus*." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 812-818.

Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S. et 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.

Ketterer, B. et Meyer, D.J. (1989). "Glutathione transferases: a possible role in the detoxification and repair of DNA and lipid hydroperoxides." *Mutat. Res.* **214**: 33-40.

Khangulov, S.V., Barynin, V.V. et Antonyuk-Barynina, S.V. (1990). "Manganese-containing catalase from *Thermus thermophilus* peroxide-induced redox transformation of manganese ions in presence of specific inhibitors of catalase activity." *Biochem. Biophys. Acta* **1020**: 25-33.

Kikuchi-Torii, K., Hayashi, S., Nakamoto, H. et Nakamura, S. (1982). "Properties of *Aspergillus niger* catalase." *J. Biochem.* **92**: 1449-1456.

Kirkman, H.N. et Gaetani, G.F. (1984). "Catalase : a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4343-4347.

Kirkman, H.N., Galiano, S. et Gaetani, G.F. (1987). "The function of catalase-bound NADPH." *J. Biol. Chem.* **262**: 660-666.

Knauf, H.J., Vogel, R.F. et Hammes, W.P. (1992). "Cloning sequence and phenotypic expression of *KatA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677." *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 832-839.

Kono, Y. et Fridovich, I. (1982). "Superoxide radical inhibits catalase." *J. Biol. Chem.* **257**: 5751-5754.

Kono, Y. et Fridovich, I. (1983). "Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. A new manganese-containing enzyme." *J. Biol. Chem.* **258**: 6015-6019.

Krinski, N.I. (1992). "Mechanism of action of biological antioxidants". *P.S.E.B.M.* **200**: 248-254.

Krungkrai, S. R. et 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.

Kurdi-Haidar, B. et Luzzatto, L. (1990). "Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*." *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**: 83-92.

Kuruta, M., Suzuki, M. et Agar, N. (1993). "Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals." *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**: 477-487.

## L

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

Lambros, C. et Vanderberg, J.P. (1979). "Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture." *J. Parasitol.* **65**: 418-420.

Langer, B.W., Phisphumvidhi, P. et Jiampermpoon, D. (1970). "Malarial parasite metabolism: the glutamic acid dehydrogenase of *Plasmodium berghei*." *Exp. Parasitol.* **28**: 298-303.

Langer, B.W. et Phisphumvidhi, P. (1971). "The amino acid oxydases of *Plasmodium berghei*" *J. Parasitol.* **57**: 677-678.

- Lapinskas, P., Ruis, H. et Culotta, V. (1993). "Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* catalase gene expression by copper." *Curr. Genet.* **24**: 388-393.
- Lardinois, O.M. et Rouxhet, P.G. (1994). "Characterization of hydrogen peroxide and superoxide degrading pathways of *Aspergillus niger* catalase : a steady-state analysis." *Free Rad. Res.* **20** : 29-50.
- Latruffe, N. (1992). "Les peroxysomes et la prolifération cellulaire ou la prise en considération d'un organite méconnu." *M/S* **8**: 239-248.
- Leblond-Francillard, M., Gaillard, J.L. et Berche, P. (1989). "Loss of catalase activity in Tn 1545-induced mutants does not reduce growth of *Listeria monocytogenes* in vivo." *Infect. Immun.* **57**: 2569-2573.
- Lin, F., Thomas, J.P. et Girotti, A.W. (1993). "Hyperexpression of catalase in selenium-deprived murine L1210 cells." *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 176-185.
- Loewen, P.C. (1984). "Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of *KatE*, a locus that affects catalase activity." *J. Bacteriol.* **157**: 622-626.
- Loewen, P.C. et Switala, J. (1986). "Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12." *Biochem. Cell. Biol.* **64**: 638-646.
- Loewen, P.C. et Switala, J. (1987). "Purification and characterization of catalase-1 from *Bacillus subtilis*." *Biochem. Cell. Biol.* **65**: 939-947.
- Loewen, P.C. et Switala, J. (1988). "Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*." *Biochem. Cell. Biol.* **66**: 707-714.
- Loewen, P.C. et Stauffer, G.V. (1990). "Nucleotide sequence of *KatG* of *Salmonella typhimurium* LT2 and characterization of its product, hydroperoxidase I." *Mol. Gen Genet.* **224**: 147-151.
- Loewen, P.C. (1992). "Regulation of bacterial catalase synthesis." *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems. Cold Spring Harbor Laboratory Press pages* 97-115.
- Loewen, P.C., Switala, J., von Ossowski, I., Hillar, A., Christie, A., Tattrie, B. et Nicholls, P. (1993). "Catalase HPII of *Escherichia coli* catalyses the conversion of protoheme to cis-heme d." *Biochemistry* **32**: 10159-10164.
- Loprasert, S., Negoro, S. et Okada, H. (1989). "Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus stearothermophilus* peroxidase gene (*perA*)." *J. Bacteriol.* **171**: 4871-4875.
- Lynch, R.E. et Fridovich, I. (1978). "Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical." *J. Biol. Chem.* **253**: 4697-4699.

## M

Ma, M. et Eaton, J.W. (1992). "Multicellular oxidant defense in unicellular organisms." *Proc. Natl. Sci.* **89**: 7924-7928.

Mac Cord, J.M. et Fridovich, I. (1969). "Superoxide dismutase; an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.

Maeno, Y., Toyoshima, T., Fujioka, H., Ito, Y., Meshnick, S.R., Benakis, A., Milhous, W.K. et Aikawa, M. (1993). "Morphologic effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*." *Am. J. Trop. Hyg.* **49**: 485-491.

Maguire, P.A. et Sherman, I.W. (1990). "Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells." *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**: 105-112.

Margoliash, E., Novogrodsky, A. et Schejter, A. (1960). "Irreversible reaction of 3-amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase." *Biochem. J.* **74**: 339-348.

Marklund, S. et Marklund, G. (1974). "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase." *Euro. J. Biochem.* **47**: 469-474.

Marklund, S.L. (1984). "Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species." *Biochem. J.* **222**: 649-655.

Mehlhorn, H. et Schein, E. (1993). "The Piroplasms: a long story in short or Robert Koch has seen it." *Europ. J. Protistol.* **29**: 279-293.

Melik-Adamyanyan, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A., Borisov, V.V. et Vainshtein, B.K. (1986). "Comparison of Beef Liver and *Penicillium vitale* catalases." *J. Mol. Biol.* **188**: 63-72.

Mehlotra, R.K. et Shukla, O.P. (1988). "Reducing agents and *Entamoeba histolytica*." *Parasitol. Today* **4**: 82-83.

Meshnick, S.R., Thomas, A., Ranz, A., Xu, C.M. et Pan H.Z. (1991). "Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular heme in its mechanism of antimalarial action." *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 181-190.

Meshnick, S.R., Yang, Y.Z., Lima, V., Kuypers, F., Kamchonwongpaisan, S. et Yuthavong, Y. (1993). "Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu)." *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 1108-1114.

Meshnick, S.R. (1994). "The mode of action of antimalarial endoperoxides." *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: (supplement 1) 31-32.



Misra, H.P. et Fridovich, I. (1972). "The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin." *J. Biol. Chem.* **247**: 6960-6962.

Mohan, K., Ganguly, N.K., Dubey, M.L. et Mahajan, R.C. (1992). "Oxidative damage of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* : an *in vitro* study." *Ann. Hematol.* **65**: 131-134.

Mohan, K., Dubey, M.L., Ganguly, N.K., Nain, C.K. et Mahajan, R.C. (1994). "Increased glutathione cycling and vitamin E of *P. falciparum* infected erythrocytes fail to prevent spontaneous haemolysis." *Indian J. Biochem. Biophys.* **31**: 476-479.

Mons, B. (1990). "Preferential invasion of malaria merozoites into young red blood cells." *Blood Cells* **16**: 299-312.

Mörkofer-Zwez, S., Cantz, M., Kaufmann, H., von Wartburg, J.P. et Aebi, H. (1969). "Heterogeneity of erythrocyte catalase. Correlations between sulfhydryl group content, chromatographic and electrophoretic properties." *Eur. J. Biochem.* **11**: 49-57.

Morlière, P., Moysan, A., Gaboriau, F., Santus, R., Mazière, J.C et Dubertret. L. (1992). "Ultraviolet A et peau: implications d'espèces activées de l'oxygène. Tendances actuelles et résultats récents." *Pathol. Biol.* **40**: 160-168.

Morris, S.L., Nair, J. et Rouse, D.A. (1992). "The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intracellulare*: nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*." *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2363-2370.

Morrissey, J.H. (1981). "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity." *Anal. Biochem.* **117**: 307-310.

Mullen, R.T. et Gifford, D.J. (1993). "Purification and characterization of catalase from Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) megagametophytes." *Plant Physiol.* **103**: 477-483.

Müller, M. (1973). "Biochemical cytology of trichomonad flagellates. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases and catalase in *Tritrichomonas foetus*." *J. Cell Biol.* **57**: 453-474.

Müller, S., Becker, K., Bergmann, B., Schirmer, R.H. et Walter, R.D. (1995). "Glutathione reductase of *Plasmodium falciparum* : a possible target for chemotherapy of malaria." *Second European Congress of Protistology and Eighth European Conference on Ciliate Biology. 21-26 July 1995, Clermont-Ferrand.*

Murray, W.W et Rachubinski, R.A. (1987). "The nucleotide sequence of complementary DNA and the deduced amino acid sequence of peroxisomal catalase of the *Candida tropicalis*." *Gene* **61**: 401-413.

Murshudov, G.N., Melik-Adamyanyan, W.R., Grebenko, A.I., Barynin, V.V., Vagin, A.A., Vainshtein, B.K., Dauter, Z. et Wilson, K.S. "Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1,5 Å resolution." *FEBS* **312**: 127-131.

## N

Nakashima, Yamamoto, et Endo, Y. (1989). "Isolation and characterization of the rat catalase encoding gene." *Gene* **79**: 279-288.

Nadler, V., Goldberg, I. et Hochman, A. (1986). "Comparative study of bacterial catalases." *Biochim. Biophys. Acta* **882**: 234-231.

Nagel, R.L. et Roth, E.F. (1989). "Malaria and red cell genetic defects." *Blood* **74**: 1213-1221.

Nair, C.R., Gupta, P.H., Chauhan, D.P. et Vinayak, V.K. (1984). "Peroxidative changes in erythrocytic enzymes in *Plasmodium berghei* induced malaria in mice." *Indian. J. Med. Res.* **80**: 627-631.

Ni, W., Trelease, R.N. et Eising, R. (1990). "Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase." *Biochem. J.* **269**: 233-238.

Ni, W. et Trelease, R.N. (1991). "Two genes encode the two subunits of cottonseed catalase" *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 237-243.

Nicholls, P. (1962). "The reaction between aminotriazole and catalase." *Biochim. Biophys. Acta* **59**: 414-420.

Nicholls, P. et Schonbaum, G.R. (1963). "Catalases." *The Enzymes*. 2nd ed. vol 8. Edited by P.D. Boyer, H.A. Lardy, et K. Myrbäck. Academic Press, New York. pp 147-225.

Nielsen, H. et Theander, T.G. (1989). "Blood monocyte oxidative burst activity in acute *P. falciparum* malaria." *APMIS* **79**: 469-471.

Nies, D. et Schlegel, H.G (1982). "Catalase from *Comamonas compransoris*." *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**: 311-319.

## O

O'Brien, E., Kurdi-Haidar, B., Wanachiwanawin, W., Carvajal, J-L., Vulliamy, T.J., Cappadoro, M., Mason, P.J. et Luzzatto, L. (1994). "Cloning of the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene from *Plasmodium falciparum*." *Mol. Biochem. Parasitol.* **64**: 313-326.

Ockenhouse, C.F., Schulman, S. et Shear, H.L. (1984). "Induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by gamma-interferon-activated, monocytes derived macrophages." *J. Immunol.* **133**: 1601-1608.

Ockenhouse, C.F. et Shear, H.L. (1984). "Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium yoelii* by activated macrophages." *J. Immunol.* **132**: 424-431.

Okada, H., Ueda, M., Sugaya, T., Atomi, H., Mozaffar, S., Hishida, T., Teranishi, Y., Okazaki, K., Takechi, T., Kamiryo, T. et Tanaka, A. (1987). "Catalase gene of the yeast *Candida tropicalis*. Sequence analysis and comparison with peroxisomal and cytosolic catalases from other sources." *Eur. J. Biochem.* **170**: 105-110.

Orago, A.S.S. et Facer, C.A. (1993). "Cytokine-induced inhibition of *Plasmodium falciparum* erythrocytic growth *in vitro*." *Clin. Exp. Immunol.* **91**: 287-294.

## P

Pacifici, R.E. et 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.

Papp-Szabo, E., Firtel, M. et Josephy, P.D. (1994). "Comparison of the sensitivities of *Salmonella typhimurium oxyR* and *katG* mutants to killing by human neutrophils." *Infect. Immun.* **62**: 2662-2668.

Pelmont, J. (1989). "Les sous-produits de l'oxygène." *Enzymes, collection Grenoble Sciences. Presse Universitaire de Grenoble*, 515-5544.

Penketh, P.G. et Klein, R.A. (1986). "Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*." *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**: 111-121.

Pessiki, P.J. et Dismukes, G.C. (1994). "Structural and functional models of the dimanganese catalase enzymes. 3. Kinetics and mechanism of hydrogen peroxide dismutation." *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 898-903.

Pichorner, H., Jessner, G. et Ebermann, R. (1993). "tBOOH acts as a suicide substrate for catalase." *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 258-264.

Pichyangkul, S., Saengkrai, P. et Webster, H.K. (1994). "*Plasmodium falciparum* pigment induces monocytes to release high levels of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$ ." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 430-435.

Powell, S.R. et Tortolani, A.J. (1992). "Recent advances in the role of reactive oxygen intermediates in ischemic injury." *J. Surg. Res.* **53**: 417-429.

Pré, J. (1991). "La lipoperoxydation." *Pathol. Biol.* **39**: 716-736.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Kostic, V., Carlson, E., Epstein, C.J. et Cadet, J.L. (1992). "Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice." *J. Neurochem.* **58**: 1760-1767.

## Q

Quan, F., Korneluk, R.G., Tropak, M.B. et Gravel, R.A. (1986). "Isolation and characterization of the human catalase gene." *Nucleic Acids Research* **14**: 5321-5335.

## R

Ranz, A. et Meshnick, S.R. (1989). "*Plasmodium falciparum*: inhibitor sensitivity of the endogenous superoxide dismutase." *Exp. Parasitol.* **69**: 125-128.

Reid III, T.J., Murthy, M.R.N., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W.D.L. et Rossmann, M.G. (1981). "Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 4767-4771.

Reynolds, E.S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy." *J. Cell. Biol.* **17**: 208-212.

Rocha, E.D. et Smith, C.J. (1995). "Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*." *J. Bacteriol.* **177**: 3111-3119.

Rockett, K.A., Targett, G.E.A. et Playfair, J.H.L. (1988). "Killing of blood-stage *Plasmodium falciparum* by lipid peroxydes from tumor necrosis serum." *Infec. Immun.* **56**: 3180-3183.

Romandini, P., Bonotto, C., Bertoloni, G., Beltramini, M. et Salvato, B. (1994) "Superoxide dismutase, catalase and cell dimorphism in *Candida albicans* cells exposed to methanol and different temperatures." *Comp. Biochem. Physiol.* **108**: 53-57.

Roth, E.F., Raventos-Suarez, C., Perkins M. et Nagel, R.L. (1982). "Glutathione stability and oxidative stress in *P. falciparum* infection *in vitro* : responses of normal and G6PD deficient cells." *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **109**: 355-362.

Roth, E.F.JR., Brotman, D.S., Vanderberg, J.P. et Schulman, S. (1986). "Malarial pigment-dependent error in the estimation of hemoglobin content in *Plasmodium falciparum*-infected red cells: implications for metabolic and biochemical studies of the erythrocytic phases of malaria." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 906-911.

## S

Sahni, S.K., Saxena, N., Puri, S.K., Dutta, G.P. et Pandey, V.C. (1992). "NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* : partial purification and characterization." *J. Protozool.* **39**: 338-342.

Sakajo, S. et Asahi, T. (1986). "In vitro synthesis of catalase protein in sweet potato root microbodies." *FEBS. Lett.* **205**: 337-340.

- Sakajo, S., Nakamura, K. et Asahi, T. (1987). "Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for sweet potato catalase mRNA." *Euro J. Biochem.* **165**: 437-442.
- Salas, F., Frichmann, J., Lee, G.K., Scott, M.D. et Rosenthal, P.J. (1995). "Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its role as a malarial hemoglobinase." *Infect. Immun.* **63**: 2120-2115.
- Salin, M.L. (1991). "Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity". *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 851-858.
- Sanger, F.S. et Nicklen (1977). "DNA sequencing with chain terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Scherz, B., Kuchinskas, E.J., Wyss, S.R. et Aebi, H. (1976). "Heterogeneity of erythrocyte catalase. Dissociation, recombination and hybridization of human erythrocyte catalases." *Eur. J. Biochem.* **69**: 603-613.
- Schieffer, S., Teifel, W. et Kindl, H. (1976). "Plant microbody proteins, I. Purification and characterization of catalase from leaves of *Lens culinaris*." *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**: 163-175.
- Schonbaum, G.R. et Chance, B. (1976). "Catalase" in The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) *2nd ed., Academic Press, New York.* vol.13 : 363-408.
- Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Robberson, B., Apell, G., Fang, R.S. et Bonaventura, J. (1982). "The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase." *Arch. Biochem. Biophys.* **214**: 397-421.
- Scott, M.D., Zuo, L., Lubin, B.H. et Chiu, D.T.Y. (1991). "NADPH, not glutathione, status modulates oxidant susceptibility of hemoglobin in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes." *Blood* **77**: 2059-2064.
- Schrével, J. (1994). "Les cibles hépatiques et érythrocytaires du *Plasmodium* au cours du paludisme." *Regard sur la Biochimie* février 1994 13-23.
- Seah, T.C.M. et Kaplan, J.G. (1973). "Purification and properties of the catalase of bakers' yeast." *J. Biol. Chem.* **248**: 2889-2893.
- Seth, R.K., Saini, A.S. et Jaswal, T.S. (1985). "*Plasmodium berghei* : oxidant defense system." *Exp. Parasitol.* **60**: 414-416.
- Sevinc, M.S., Ens, W. et Loewen, P.C. (1995). "The cysteines of catalase HP II of *Escherichia coli*, including Cys-438 which is blocked, do not have a catalytic role." *Eur. J. Biochem.* **230**: 127-132.
- Shaffer, J.B. et Preston, K.E. (1990). "Molecular analysis of an acatalasemic mouse mutant." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **173**: 1043-1050.

Shear, H.L. (1993). "Transgenic and mutant animal models to study mechanisms of protection of red cell genetic defects against malaria." *Experientia* **49**: 37-42.

Sherman, I.W., Peterson, I., Tanigoshi, L. et Ting, I.P. (1971). "The glutamate dehydrogenase of *Plasmodium lophurae* (avian malarial)." *Exp. Parasitol.* **29**: 433-439.

Shimizu, H., Kuratsu, T. et Hirata, F. (1979). "Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from *Proteus inconstans*." *J. Ferment. Technol.* **57**: 428-433.

Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y.M.W., Marsh, J.P. et Mossman, B.T. (1991). "Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants." *J. Biol. Chem.* **266**: 24398-24403.

Sibley, L.D., Lawson, R. et Weidner, E. (1986). "Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*." *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 83-87.

Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxydative stress ." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23**: 1058-1071.

Skoneczny, M., Chelstowska, A. et Rytka, J. (1988). "Study of the coinduction by fatty acids of catalase A and acyl-CoA oxidase in standard and mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Eur. J. Biochem.* **174**: 297-302.

Slater, A.F.G. et Cerami, A. (1992). "Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites." *Nature* **355**: 167-169.

Smith, T.F. et Waterman, M.S. (1981). "" *J. Mol. Biol.* **147**: 195-197.

Sohal, R.S. et Brunk, U.T (1992). "Mitochondrial production of pro-oxydants and cellular senescence". *Mutation Research* **275**: 295-304.

Srivastava, P., Puri, S.K., Dutta, G.P. et Pandey, V.C. (1992). "Status of oxidative stress and oxidant defences during *Plasmodium knowlesi* infection and chloroquine treatment in *Macaca mulata*." *Int. J. Parasitol.* **22**: 243-245.

Stocker, R., Hunt, N.H., Buffinton, G.D., Weidemann, M.J., Lewis-Hughes, P.H. et 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., Hunt, N.H., Weidemann, M.J. et Clark, I.A. (1986a). "Protection of vitamin E from oxidation by increased ascorbic acid content within *Plasmodium vinckei*-infected erythrocytes." *Biochem. Biophys. Acta* **876**: 294-299.

Stocker, R., Weidemann, M.J. et Hunt, N.H. (1986b). "Possible mechanisms responsible for the increased ascorbic acid content of *Plasmodium vinckei*-infected mouse erythrocytes." *Biochem. Biophys. Acta* **881**: 391-397.

Stoeckle, M.Y., Guan, L., Riegler, N., Weitzman, I., Kreiswirth, B., Kornblum, J., Laraque, F. et Riley, L.W. (1993). "Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City." *J. Infectious Diseases*. **168**: 1063-1065.

Sturchler-Pierrat, C., Carbon, P. et Krol, A. (1995). "Sélénium, sélénoprotéines: une autre lecture du code génétique." *M/S* **11**: 1081-1088.

Sturrock, S.S. et Collins, J.F. (1993). MPsrch version 1.3., *Biocomputing Research Unit, University of Edimburgh, U.K.*

Subramani, S. (1993). "Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle." *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**: 445-478

## T

Takahara, S. (1968). "Acatlasemia in Japon". Beutler, E ed. *Hereditary disorders of erythrocyte metabolism*. New York: Grune and Stratton, 21-40.

Takeda, A. et Samejima, T. (1977). "On the characterization of porcine erythrocyte catalase and its disulfide-linked dimer." *J. Biochem.* **82**: 1025-1033.

Takeda, A., Miyahara, T., Hachimori, A. et Samejima, T. (1980.) "The interactions of thiol compounds with porcine erythrocyte catalase." *J. Biochem.* **87**: 429-439.

Takeuchi, A., Miyamoto, T., Yamaji, K., Masuho, Y., Hayashi, M., Hayashi, H. et Onozaki, K. (1995). "A human erythrocyte-derived growth-promoting factor with a wide target cell spectrum: identification as catalase." *Cancer Research*, **55**: 1586-1589.

Taverne, J., Tavernier, J., Fiers, W. et Playfair, J.H.L. (1987). "Recombinant tumor necrosis factor inhibits malaria parasites *in vivo* but not *in vitro*." *Clin. Exp. Immunol.* **67**: 1-4.

Thomson, J.F., Nance, S.L. et Tollaksen, S.L. (1978). "Spectrophotometric assay of catalase with perborate as substrate." *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* **157**: 33-35.

Tokuyasu, K.T. (1980). "Immunocytochemistry on ultrathin frozen section." *Histochem. J.* **12**: 381-403.

Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.

Trager, W. et Jensen, J.B. (1976). "Human malaria parasites in continous culture." *Science* **193**: 673-675.

Trager, W. (1994). "Cultivation of malaria parasites." *Methods in Cell Biology* **45**: 7-26.

Triggs-Raine, B.L., Doble, B.W., Mulvey, M.R., Sorby, P.A. et Loewen, P.C. (1988). "Nucleotide sequence of *katG* encoding catalase HPI of *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* **170**: 4415-4419.

## U

Ursini, F. et Bindoli, A. (1987). "The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes". *Chem. Phys. Lipids.* **44**: 255-276.

Usanga, E.A. et Luzzatto, L. (1985). "Adaptation of *Plasmodium falciparum* to glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient host red cell by production of parasite-encoded enzyme." *Nature* **313**: 793-795.

## V

Vainshtein, B.K., Melik-Adamyan, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A. et Grebenko, A.I. (1985). "Spatial organization of catalase proteins." *Proc. Int. Symp. Biomol. Struc. Interactions, Suppl. J. Biosci.* **8**: 471-479.

Vainshtein, B.K., Melik-Adamyan, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A., Grebenko, A.I. et Borisov, V.V. (1986). "Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution." *J. Mol. Biol.* **188** : 49-61.

Van Kuijk, F., Sevanian, A., Handelman, G. et Dratz, E. (1987). "A new role for phospholipase A2: protection of membranes from lipid peroxidation damage." *Trends. Biochem. Sciences.* **12**: 31-34.

Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Kibiridge, M. et Campos, N.M. (1989). "NADPH production by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*." *Blood* **74**: 471-474.

Vennerstrom, J.L. et Eaton, J.W. (1988). "Oxidants, oxidant drugs and malaria." *J. Med. Chem.* **31**: 1269-1277.

Vernes, A., Haynes, J.P., Tapchaisri, P., Williams, J.L., Dutoit, E. et Diggs, C.L. (1984). "*Plasmodium falciparum* strain-specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 197-203.

Von Ossowski, I., Mulvey, M.R., Leco, P.A., Borys, A. et Loewen, P.C. (1991) "Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE* which encodes catalase HPII." *J. Bacteriol.* **173**: 514-520.

Von Ossowski, I., Hausner, G. et Loewen, P.C. (1993). "Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase." *J. Mol. Evol.* **37**: 71-76.



## W

Wasserman, B.P. et Hultin, H.O. (1981). "Effect of deglycosylation on the stability of *Aspergillus niger* catalase." *Arch. Biochem. Biophys.* **212**: 385-392.

Walter, R.D., Nordmeyer, J.P. et König, E. (1974). "NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Plasmodium chabaudi*." *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**: 495-500.

Welinder, K.G. (1991). "Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily." *Biochem. Biophys. Acta* **1080**: 215-220.

Wiemer, E.A.C., Ofman, R., Middelkoop, E., de Boer, M., Wanders, R.J.A. et Tager, J.M. (1992). "Production and characterisation of monoclonal antibodies against native and disassembled human catalase." *J. Immunol. Methods* **151**: 165-175.

Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schüller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krawiec, Z. et Bilinski, T. (1991). "Heat shock factor-independent heat control to transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **266** : 12406-12411.

Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M. et Carewell, R.W. (1975). "The estimation of red cell superoxide dismutase activity." *J. Lab. Clin. Med.* **85**: 337-341.

Winterbourn, C.C. (1985). "Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin." *Environmental Health Perspectives* **64**: 321-330.

Winterbourn, C.C. (1990). "Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins." *Semin. Hematol.* **27**: 41-50.

Winterbourn, C.C. (1993). "Superoxide as an intracellular radical sink." *Free Rad. Biol. Med.* **14**: 85-90.

Woerdenbag, H.J., Lugt, C.B. et Pras, N. (1990). "*Artemisia annua* L. : a source of novel antimalarial drugs." *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition* **12**: 169-181.

Wozencraft, A.O., Dockrell, H.M., Taverne, J., Targett, G.A.T. et Playfair, J.H.L. (1984). "Killing of human malaria parasites by macrophage secretory products." *Infec. Immun* **43**: 664-669.

Wozencraft, A.O. (1986). "Damage to malaria-infected erythrocytes following exposure oxidant-generating systems." *Parasitol.* **92**: 559-567.

## Y

Yamada, M., Hashinaka, K., Inazawa, J. et Abe, T. (1991). "Expression of catalase and myeloperoxidase genes in hydrogen peroxide-resistant HL-60 cells." *DNA and Cell Biology* **10**: 735-742.

Yang, Y.Z., Asawamahasakda, W. et Meshnick, S.R. (1993). "Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin." *Biochem. Pharmacol.* **46**: 336-339.

Ye, Z.-G., Van Dyke, K. et Wimmer, M. (1987). "Effect of artemisinin (qinghaosu) and chloroquine on drug-sensitive and drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum* malaria : use of (2,8 <sup>3</sup>H) adenosine as an alternative to (G-<sup>3</sup> H) hypoxanthine in the assessment of *in vitro* antimalarial activity." *Exp. Parasitol.* **64**: 418-423.

Youn, H-D., Yim, Y-I., Kim, K., Hah, Y.C. et Kang, S-O. (1995). "Spectral characterization and chemical modification of catalase-peroxidase from *Streptomyces* sp." *J. Biol. Chem.* **270**: 13740-13747.

Yu, B.P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." *Physiol. Rev.* **74**: 139-162.

Yumoto, I., Fukumori, Y. et Yamanaka, T. (1990). "Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus*." *J. Biochem.* **108**: 583-587.

Yuthavong, Y., Bunyaratvej, A. et Kamchonwongpaisan, S. (1990). "Increased sensibility of malaria-infected variant erythrocytes to the mononuclear phagocyte system." *Blood cells* **16**: 591-507.

## Z

Zhang, Y., Hempelmann, E. et Schirmer, R.H. (1988a). "Glutathione reductase inhibitors as potential antimalarial drugs. Effects of nitrosoureas on *Plasmodium falciparum* *in vitro*." *Biochem. Pharmacol.* **37**: 855-860.

Zhang, Y., König, I. et Schirmer, H. (1988b). "Glutathione reductase-deficient erythrocytes as host cells of malarial parasites." *Biochem. Pharmacol.* **37**: 861-865.

Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. et Cole, S. (1992a). "The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*." *Nature* **358**: 591-593.

Zhang, F., Gosser, D.K. et Meshnick, S.R. (1992b). "Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu)." *Biochem. Pharmacol.* **48**: 1805-1809.

