

143 427

50376  
1997  
483

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE**

**THESE**

**présentée par**

**SYLVIE GRATEPANCHE**

**pour l'obtention du**

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

**LA SUPEROXYDE DISMUTASE A FER  
DE *PLASMODIUM FALCIPARUM***

**Soutenue le 28 Novembre 1997**



**Composition du jury :**

<b>Pr D. Camus</b>	<b>Président</b>
<b>Pr M. Fontecave</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr D. Touati</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr JL. Bernier</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr D. Dive</b>	<b>Examineur</b>

**I.N.S.E.R.M. Unité 42  
Biologie et Biochimie Parasitaires et Fongiques  
Directeur : Daniel CAMUS  
369, rue J. Guesde, BP 39, 59651 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX**

*Je dédie cette thèse*

*A Julien*

*A ma famille*

## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Daniel Camus,**

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir offert la possibilité de travailler au sein de votre laboratoire afin de participer à un programme de recherche de grande qualité. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury.

### **Au Docteur Daniel Dive**

Je tiens à vous remercier de la confiance que vous m'avez témoigné durant ces quelques années. Je vous remercie également pour votre enthousiasme à accueillir les résultats, votre disponibilité et vos encouragements que vous m'avez prodigué durant tout le long de ce travail. Que cette thèse soit pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma reconnaissance et mon respect.

### **Aux Docteur Danièle Touati et Professeur Marc Fontecave**

C'est un honneur d'avoir travaillé avec vous et de vous compter parmi les membres de mon jury en tant que rapporteurs. Veuillez recevoir mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

### **Au Professeur Jean Luc Bernier**

Je vous remercie pour avoir accepté de participer à la soutenance de cette thèse, c'est un grand plaisir pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury.

### **Aux Docteurs Stéphane Ménage, Carmen Odberg-Ferragut et Manuel Dauchez**

Que ce soit pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma sympathie et ma reconnaissance pour avoir accepté de collaborer à ce travail.

### **Au Docteur Christian Slommiany**

Je te remercie pour ta gentillesse, ta grande disponibilité, tes remarques scientifiques pertinentes et pour la patience dont tu as fait preuve pour m'initier au monde toujours aussi obscur de l'informatique.

### **A Annick Masset**

Je te remercie pour ta gentillesse, ton soutien et pour ton aide technique que tu m'as apporté durant ces quelques années.

### **A Etienne Dewailly**

Je te remercie pour ta grande disponibilité, pour la lecture attentive de ce manuscrit et pour ta sympathie.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres de l'unité 42 qui ont su créer une ambiance chaleureuse et sympathique.

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
CHAPITRE I : PRESENTATION DE L'ORGANISME ETUDIE .....	5
I. SYSTEMATIQUE DE <i>PLASMODIUM</i> .....	5
II. CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>PLASMODIUM</i> .....	6
II.1 Cycle asexué chez le vertébré .....	6
II.1.1 Phase hépatique .....	6
II.1.2 Phase érythrocytaire .....	6
II.2 Cycle sexué chez l'anophèle .....	7
III. ORGANISATION DU PARASITE AU STADE INTRAERYTHROCYTAIRE .....	8
III.1. Ultrastructure du parasite .....	8
III.1.1 Le système d'endocytose .....	8
III.1.2. Le noyau .....	8
III.1.3 La mitochondrie .....	8
III.1.4 Le réticulum endoplasmique .....	8
III.1.5 L'appareil de Golgi .....	10
III.2. Organisation de l'hématie parasitée .....	11
III.2.1 Les knobs .....	11
III.2.2 Les corpuscules de Maurer .....	12
III.2.3 Le matériel dense au microscope électronique (EDM) .....	12
III.2.4 Le canal parasitophore ou "duct" .....	12
III.2.5 Le système tubulovésiculaire (TVM: Tubo Vesicular Membrane network) .....	12
III.3. Transport des protéines dans l'hématie parasitée .....	13
III.3.1 Le transport des antigènes implique un trafic membranaire entre le parasite et sa cellule hôte .. . . .	13
III.3.2 Un modèle simplifié de sécrétion .....	14
III.3.3 Le "TVM" est-il impliqué dans le transport des antigènes ? .....	15
CHAPITRE II : LE CHOC OXYDATIF .....	16
I. INTRODUCTION .....	16
II. LES ESPECES ACTIVEES DE L'OXYGENE (E.A.O) .....	16
II.1 L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) .....	17
II.2 Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) .....	18
II.3 Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) .....	19
II.4 L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) .....	20

<b>III. ORIGINES DES E.A.O</b> .....	20
<b>III.1 Dans la mitochondrie et le chloroplaste</b> .....	21
<b>III.2 Dans les microsomes et les peroxysomes</b> .....	21
<b>III.3 Dans le cytoplasme</b> .....	22
<b>III.4 Production des E.A.O par le système</b> <b>Hypoxanthine/xanthine, xanthine oxydase</b> .....	23
<b>III.5 Production des E.A.O par les leucocytes</b> .....	24
<b>III.6 Production des E.A.O par différents types cellulaires</b> ....	25
<b>III.7 Production des E.A.O par des facteurs externes</b> .....	25
<b>IV. IMPLICATION DE LA FORMATION DES E.A.O</b> <b>AU NIVEAU CELLULAIRE</b> .....	25
<b>IV.1 Peroxydation des lipides</b> .....	26
<b>IV.2 Dégradation des protéines</b> .....	27
<b>IV.3 Altérations de l'ADN</b> .....	28
<b>IV.4 Action sur d'autres molécules biologiques</b> .....	29
<b>V. LE SYSTEME ANTIOXYDANT</b> .....	29
<b>V.1 Les piègeurs de radicaux</b> .....	30
<b>V.2 Les protéines chélatant le fer et le cuivre</b> .....	31
<b>V.3 Les enzymes antioxydantes</b> .....	32
<b>VI. INDUCTION DE CERTAINS GENES EN REPONSE</b> <b>AU STRESS OXYDANT</b> .....	35
<b>CHAPITRE III : LES SUPEROXYDE DISMUTASES.</b> .....	36
<b>I. LES SOD Cu/Zn</b> .....	36
<b>I.1. Distribution chez les êtres vivants, localisation cellulaire</b> ..	36
<b>I.2 Caractéristiques des SOD Cu/Zn</b> .....	37
<b>I.2.1 Caractéristiques biochimiques</b> .....	37
<b>I.2.2 Action des inhibiteurs</b> .....	38
<b>I.2.3 Considérations structurales</b> .....	39
<b>I.2.4 Activité catalytique</b> .....	40
<b>I.2.5 Considérations phylogéniques</b> .....	41
<b>II. LES SOD-Fe et -Mn</b> .....	42
<b>II.1 Distribution chez les êtres vivants, localisation cellulaire</b> ..	42
<b>II.2 Caractéristiques des SOD-Fe et -Mn</b> .....	44
<b>II.2.1 Caractéristiques biochimiques</b> .....	44
<b>II.2.2 Action des inhibiteurs</b> .....	45
<b>II.2.3 Considérations structurales des SOD-Fe</b> <b>et SOD-Mn</b> .....	45
<b>II.2.4 Activité catalytique</b> .....	47
<b>II.2.5 Considérations phylogéniques</b> .....	48
<b>III. AUTRES TYPES DE SOD: SOD-Ni</b> .....	50

IV. IMPORTANCE DES SUPEROXYDES DISMUTASES .....	50
IV.1 Rôle des SOD .....	51
IV.2 Régulation de l'expression des SOD .....	52
<b>CHAPITRE IV : <i>PLASMODIUM</i> ET CHOC OXYDANT .....</b>	<b>55</b>
<b>I. SENSIBILITE DE <i>PLASMODIUM</i> VIS-A-VIS D'UN CHOC OXYDANT .....</b>	<b>55</b>
I.1 Données épidémiologiques .....	55
I.2 Données expérimentales .....	56
<b>II. ORIGINE DU STRESS OXYDANT CHEZ <i>PLASMODIUM</i> .....</b>	<b>57</b>
II.1 Espèces activées de l'oxygène produites par le parasite ...	57
II.2 Le système immunitaire de l'hôte .....	59
II.3 Les drogues antimalariques .....	60
II.4 Fragilisation de l'hématie parasitée .....	62
<b>III. LE SYSTEME DE DEFENSE DE <i>PLASMODIUM</i> CONTRE LE STRESS OXYDANT .....</b>	<b>64</b>
III.1 La Superoxyde Dismutase .....	64
III.2 La catalase .....	65
III.3 Les systèmes de défense liés au glutathion .....	65
-a) Le glutathion .....	65
-b) La glutathion peroxydase .....	66
-c) La glutathion réductase .....	67
-d) La thioredoxine réductase .....	67
-e) Les enzymes impliquées dans la régénération du NADPH (H <sup>+</sup> ) .....	67
III.4 Autres systèmes de protection .....	68
<b>RESULTATS .....</b>	<b>69</b>
<b>CHAPITRE V : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE LA SOD-FE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>I. RESULTATS .....</b>	<b>70</b>
I.1 Résumé et commentaires du premier article .....	70
I.2 Résultats complémentaires .....	71
I.2.1 Etude du gène codant pour la SOD à fer de <i>P. falciparum</i> .....	71
I.2.2 Etude de la structure primaire et secondaire de la protéine .....	72
I.2.3 Etude de la structure tridimensionnelle .....	73
I.2.4 Analyse phylogénique de la SOD-Fe de <i>P. falciparum</i> .....	75
<b>II. DISCUSSION .....</b>	<b>75</b>
<b>III. CONCLUSION .....</b>	<b>77</b>

**CHAPITRE VI : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE DE LA SOD A FER RECOMBINANTE DE *P. FALCIPARUM*. ROLE DU TRP 72 DANS CETTE ENZYME . . . . . 88**

<b>I. RESULTATS ET COMMENTAIRES DE L'ARTICLE 2. . . . .</b>	<b>89</b>
<b>I.1 Construction des plasmides . . . . .</b>	<b>89</b>
<b>I.1.1 Amplification par PCR de la région codante et du 3' UTR . . . . .</b>	<b>89</b>
<b>I.1.2 Mutagénèses dirigées . . . . .</b>	<b>90</b>
<b>I.2 Construction des souches . . . . .</b>	<b>90</b>
<b>I.3 Surproduction des protéines recombinantes sauvage et mutée . . . . .</b>	<b>90</b>
<b>I.4 Purification des deux protéines recombinantes . . . . .</b>	<b>90</b>
a) <b>La SOD-Fe recombinante sauvage . . . . .</b>	<b>90</b>
b) <b>La SOD-Fe recombinante mutée W72V . . . . .</b>	<b>91</b>
<b>I.5 Analyse électrophorétique des échantillons obtenus après purification . . . . .</b>	<b>92</b>
<b>I.6 Caractérisation biochimique et biophysique des SOD-Fe recombinantes sauvage et mutée . . . . .</b>	<b>93</b>
<b>I.6.1 Identification du métal par spectrométrie d'absorption atomique . . . . .</b>	<b>93</b>
<b>I.6.2 Caractéristiques biochimiques des SOD sauvage et mutée . . . . .</b>	<b>93</b>
<b>I.6.3 Etude en RPE des SOD recombinantes sauvage et mutée . . . . .</b>	<b>93</b>
<b>I.7 Mise en évidence de la sensibilité des deux protéines vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène . . . . .</b>	<b>94</b>
<b>I.7.1 Tests d'activité en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . . . . .</b>	<b>94</b>
<b>I.7.2 Mesure de l'oxydation des tryptophanes en spectrophotométrie . . . . .</b>	<b>94</b>
<b>I.7.3 Dosage du fer libéré dans le milieu lors de l'inactivation des deux SOD recombinantes sauvage et mutée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . . . . .</b>	<b>95</b>
<b>I.7.4 Etude des spectres RPE en présence du peroxyde d'hydrogène . . . . .</b>	<b>95</b>
<b>II RESULTATS COMPLEMENTAIRES . . . . .</b>	<b>95</b>
<b>II.1 Etude en spectroscopie optique : Dichroïsme circulaire . . . . .</b>	<b>95</b>
<b>III DISCUSSION . . . . .</b>	<b>96</b>
1- <b>La SOD à fer de <i>Plasmodium falciparum</i>. . . . .</b>	<b>97</b>
2- <b>L'état du fer dans le site actif de la SOD-Fe de <i>Plasmodium</i>. . . . .</b>	<b>98</b>
3- <b>Inactivation de la SOD-Fe de <i>Plasmodium</i> par le peroxyde d'hydrogène et rôle du résidu Trp72. . . . .</b>	<b>99</b>
<b>IV. CONCLUSION . . . . .</b>	<b>101</b>

**CHAPITRE VII : IMMUNOLOCALISATION ET EXPRESSION  
DE LA SOD-FE PARASITAIRE AU COURS DU CYCLE**

<b>INTRAERYTHROCYTAIRE</b> .....	125
<b>I. RESULTATS</b> .....	125
<b>I.1 Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la     SOD-Fe de <i>P. falciparum</i></b> .....	125
<b>I.2 Etude de l'expression de la SOD-Fe parasitaire au cours     du cycle intraérythrocytaire</b> .....	126
<b>I.3 Immunolocalisation de la SOD-Fe de <i>P. falciparum</i></b> .....	128
<b>I.4 Production d'un anticorps monoclonal dirigé contre     la SOD-Fe</b> .....	129
<b>I.5 Devenir de la SOD-Fe au sein du parasite</b> .....	129
<b>II. DISCUSSION</b> .....	130
<b>DISCUSSION GENERALE</b> .....	134
<b>CONCLUSIONS - PERSPECTIVES</b> .....	142
<b>ANNEXE TECHNIQUE</b> .....	145
<b>PRODUCTION ET ISOLEMENT DES PARASITES</b> .....	146
<b>I. SOUCHE DE PARASITE UTILISEE</b> .....	146
<b>II. CULTURE DE <i>P. FALCIPARUM</i> IN VITRO</b> .....	146
<b>III. SYNCHRONISATION DES CULTURES DE <i>P. FALCIPARUM</i></b> .....	146
<b>IV. ISOLEMENT DES PARASITES</b> .....	147
<b>APPROCHE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE</b> .....	148
<b>I. CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADNc</b> .....	148
<b>I.1 Etalement des colonies</b> .....	148
<b>I.2 Transfert des colonies sur filtres</b> .....	148
<b>I.3 Marquage de la sonde de 424 pb</b> .....	149
<b>I.4 Etapes de préhybridation et d'hybridation</b> .....	149
<b>II. VERIFICATION DE LA NATURE DE L'INSERT</b> .....	149
<b>II.1 Purification des plasmides</b> .....	149
<b>II. 2 Séquençage de l'insert</b> .....	150
<b>III. HYBRIDATION AVEC L'ADN GENOMIQUE DE     <i>P. FALCIPARUM</i></b> .....	151
<b>III.1 Préparation de l'ADN génomique</b> .....	151
<b>III. 2 Digestion de l'ADN génomique</b> .....	151
<b>III. 3 Electrophorèse et transfert (Southern Blot)</b> .....	151
<b>III. 4 Réaction d'hybridation</b> .....	152
<b>IV. RECHERCHE DU CHROMOSOME PORTANT LE GENE     CODANT POUR LA SOD-FE DE <i>P. FALCIPARUM</i></b> .....	152
<b>V. HYBRIDATION AVEC L'ARN TOTAL de <i>P. FALCIPARUM</i></b> .....	153
<b>V.1 Extraction de l'ARN total de <i>P. falciparum</i></b> .....	153
<b>V. 2 Electrophorèse et transfert (Northern Blot)</b> .....	153
<b>V. 3 Réaction d'hybridation</b> .....	154



<b>PRODUCTION DANS UN SYSTEME HETEROLOGUE DES SOD-FE RECOMBINANTES SAUVAGE ET MUTEE</b> .....	155
<b>I. CONSTRUCTION DES PLASMIDES</b> .....	155
<b>I.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</b> .....	155
<b>I.1.1 Choix des amorces de PCR</b> .....	155
<b>I.1.2. Réaction d'amplification</b> .....	155
<b>I.2 Clonage du fragment amplifié</b> .....	156
<b>I.2.1. Préparation du fragment amplifié</b> .....	156
<b>I.2.2. Insertion dans un vecteur d'expression pT7-7</b> ...	156
<b>I.2.3. Préparation des bactéries compétentes DH5<math>\alpha</math></b> ....	156
<b>I.2.4. Transformation des bactéries compétentes</b> .....	156
<b>I.3 Mutagénèses dirigées</b> .....	156
<b>II. CONSTRUCTION DE LA SOUCHE SODA<sup>-</sup> SODB<sup>-</sup></b> .....	158
<b>II.1 Transduction de la souche sauvage K38/pGp1-2 par un lysat P1 portant la mutation sodB Cm<sup>R</sup></b> .....	158
<b>II.1.1 Lysat du phage P1</b> .....	158
<b>II.1.2 Transduction généralisée</b> .....	158
<b>II.2 Transduction généralisée de la souche K38/ pGp1-2 sodB Cm<sup>R</sup> par le lysat du phage P1 contenant la mutation sodA Cm<sup>R</sup> et Tet<sup>R</sup></b> .....	159
<b>II.3 Transformation de la souche QC2449 par les différents plasmides</b> .....	159
<b>II.3.1 Préparation des bactéries compétentes QC2449</b> ..	159
<b>II.3.2 Tranformation des bactéries QC2549</b> .....	159
<b>III. PRODUCTION DES PROTEINES RECOMBINANTES SAUVAGE ET MUTEE</b> .....	159
<b>III.1 Production de la protéine recombinante sauvage</b> .....	159
<b>III.2 Production de la protéine recombinante mutée W72V</b> ...	160
<b>PURIFICATION DES SOD-FE RECOMBINANTES SAUVAGE ET MUTEE</b> .....	161
<b>I. PURIFICATION DE LA SOD-FE RECOMBINANTE SAUVAGE.</b> 161	
<b>I.1 Lyse du culot bactérien</b> .....	161
<b>I.2 Dénaturation à la chaleur</b> .....	161
<b>I.3 Précipitation au sulfate d'ammonium</b> .....	161
<b>I.4 Chromatographie gel filtration, ACA 44</b> .....	161
<b>I.5 Chromatographie échangeuse d'ions</b> .....	162
<b>II. PURIFICATION DE LA PROTEINE MUTEE</b> .....	162
<b>III. CONTROLE DE LA PURIFICATION</b> .....	162
<b>III.1 Electroforèse en SDS-PAGE (Laemmli, 1970)</b> .....	162
<b>III.2 Coloration des protéines</b> .....	163
<b>III.2.1 Coloration au nitrate d'argent (Merril et coll. 1981)</b> .....	163
<b>III.2.2 Coloration au bleu de Coomassie</b> .....	163
<b>IV. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE SOD SUR GEL</b> .....	163
<b>IV.1 L'électrophorèse verticale en conditions non dénaturantes</b> 163	
<b>IV.2 Révélation de l'activité SOD</b> .....	164
<b>V. DOSAGE DE L'ACTIVITE SOD.</b> .....	164

V.1 Méthode au pyrogallol (Marklund et Marklund, 1974) . . .	164
V.1.1 Réactifs . . . . .	164
V.1.2. Protocole de dosage . . . . .	165
VI. MESURE DE L'OXYDATION DES TRYPTOPHANES . . . . .	166
VII. DOSAGE DU FER LIBERE DANS LE MILIEU . . . . .	167

<b>PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX</b>	
<b>IMMUNOLOCALISATION DE LA SOD-FE DE <i>P. FALCIPARUM</i></b> . . . . .	168
I. ELECTROELUTION DE LA SOD-FE . . . . .	168
II. PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX ANTI-SOD DE <i>PLASMODIUM</i> . . . . .	168
II.1 Immunisation des lapins . . . . .	168
II.2 Immunisation des souris . . . . .	168
II.3 Production d'un anticorps monoclonal . . . . .	169
III. DETECTION DES ANTICORPS SPECIFIQUES . . . . .	170
III.1 Elisa . . . . .	170
III.2 Electrotransfert et Immunoempreinte (Western Blot) . . .	170
IV. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE . . . . .	171
IV.1 Préparation des échantillons . . . . .	171
IV.2 Immunodétection . . . . .	171
IV.3 Observation . . . . .	172

<b>IMMUNOPRECIPITATION DE LA SOD-FE ENDOGENE DE <i>P. FALCIPARUM</i></b> . . . . .	173
I. LYSAT PARASITAIRE . . . . .	173
I.1 Marquage métabolique à la méthionine <sup>35</sup> S . . . . .	173
I.2 Comptage de la radioactivité: Précipitation au T.C.A (Acide-Trichloro acétique) . . . . .	173
II. PREPARATION DE L'IMMUNOADSORBANT . . . . .	174
II.1 Couplage d'immunoglobulines sur protéine A-sépharose 4B . . . . .	174
III. IMMUNOPRECIPITATION . . . . .	174
III.1 Immunoabsorption de la SOD-Fe parasitaire . . . . .	174
III.2 Elution des protéines adsorbées . . . . .	174
IV. ANALYSE DES PROTEINES IMMUNOPRECIPITEES . . . . .	174
IV.1 Coloration des protéines au bleu de Coomassie . . . . .	174
IV.2 Fluorographie . . . . .	175

<b>BIBLIOGRAPHIE</b> . . . . .	176
--------------------------------	-----

## ABREVIATIONS

3' UTR / 5' UTR	3' / 5' untranslated region
ADN / ADNc	Acide désoxyribonucléique / complémentaire
AIP	Amino-imino-propène
Arc A / B	Aérobic respiration control A / B
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BFA	Bréfeldine A
BiP	Immunoglobulin Binding Protein
DAPI	4',6 diamino-2-phenylindole
DFO	Desferrioxamine
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.A.O.	Espèces activées de l'oxygène
EDM	Electron Dense Material
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
FMN	Flavine mononucléotide
Fur	Ferric uptake regulation
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GDH	Glutamate déshydrogénase
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Globule rouge
GSH / GSSG	Glutathion réduit / oxydé
GST	Glutathion-S-transférase
GTP	Guanosine triphosphate
Hb	Hémoglobine
Hb-F	Hémoglobine foetale
HIF	Facteur d'intégration de l'hôte
HRP	Histidin Rich Protein
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IL-1/6	Interleukine I / 6
INF $\gamma$	Interféron $\gamma$
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
mét-Hb	Méthémoglobine
MPO	Macroxyprotéinase
NAD / NADH	Nicotinamide-adénine dinucléotide / réduit
NADP / NADPH	Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate /réduit
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PDI	Protein disulfide isomerase
PHGPx	Phospholipide hydroperoxyde GPx
PLMN	Leucocytes polymorphonucléaires
PPE	Protéine parasitaire exportée
RE	Réticulum endoplasmique
RPE	Résonance paramagnétique électronique
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superoxyde dismutase
SOD-Cu-Zn/Fe/Mn/Ni	Superoxyde dismutase à cuivre-zinc / fer / manganèse ou nickel
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TVM	Tubovesicular Membrane Network
XDH	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxydase

## NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES ACIDES AMINES

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

# **INTRODUCTION**

Le paludisme ou malaria constitue la première endémie parasitaire mondiale. Cette maladie est causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium* qui est transmis à l'homme par un moustique du genre *Anopheles*. *Plasmodium falciparum* qui prédomine en Afrique tropicale, en Asie orientale, en Océanie et dans la région amazonienne représente l'espèce la plus redoutable, puisqu'il peut être responsable d'accès pernicieux mortels.

Un rapport de l'OMS estime que près de 43% de la population mondiale, soit 2240 millions de personnes sont exposées à la transmission. En 1993, l'incidence du paludisme était de l'ordre de 300 à 500 millions de cas cliniques par an, avec une mortalité comprise entre 1,5 et 2,7 millions d'individus, dont la grande majorité en Afrique. Environ un million de décès d'enfants de moins de cinq ans sont à imputer au paludisme, même si dans certains cas, ce dernier n'est pas seul en cause.

Devant l'incidence considérable du paludisme sur la population et l'économie de nombreux pays en voie de développement, l'OMS a mis en place, un programme d'éradication à l'échelle mondiale. L'emploi d'insecticide (DDT) contre les anophèles, ainsi que l'introduction de la chloroquine en chimioprophylaxie et en chimiothérapie ont permis dans un premier temps de faire reculer ce fléau. Cependant, dans les années 60, l'apparition d'une résistance des moustiques aux insecticides d'une part, des parasites à la chloroquine d'autre part ont contribué pour une large part à ruiner les progrès réalisés auparavant et ont même conduit à une recrudescence de la maladie dans certains pays où les conditions socio-économiques n'avaient pas permis le maintien des réseaux de surveillance et de prévention.

A l'heure actuelle, la lutte contre le paludisme reste encore très difficile. En effet, la vaccination, dont l'efficacité est encore insuffisante, restera longtemps encore onéreuse pour une application en masse dans les pays en voie de développement. La chloroquine représente toujours le médicament de base bien que l'extension croissante de la résistance tend à se généraliser à toute la zone d'endémie: seuls les pays d'Amérique centrale ne sont pas concernés. L'utilisation d'autres molécules antimalariques telles que les antifolates et la méfloquine a entraîné rapidement l'apparition de résistances et conduit à des situations critiques, notamment en Asie du Sud-Est. Il est donc impératif de rechercher de nouvelles cibles spécifiques, basées sur une connaissance approfondie de la biologie et du métabolisme du parasite.

Depuis quelques années, il a été clairement établi que *Plasmodium* est sensible aux espèces activées de l'oxygène ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ) qui sont formées au cours de son développement dans l'hématie, ou lors de la réaction immune de l'hôte. Pendant longtemps, il a été admis que le parasite internalisait les enzymes antioxydantes de sa cellule hôte et les utilisait pour sa propre protection. La découverte récente, chez *Plasmodium*, de gènes codant pour des enzymes de défense contre le choc oxydant, montre que cet organisme possède un système de défense qui lui est propre. En effet, la superoxyde dismutase à fer (Fe-SOD) et la glutathion peroxydase (GPx), enzymes capables de détoxifier respectivement, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, ont été caractérisées et séquencées chez *Plasmodium falciparum*. Par ailleurs, de nombreux indices laissent supposer la présence d'une catalase endogène (Clarebout, 1996).

La SOD-Fe de *P. falciparum* étant distincte de celles de l'hôte qui sont respectivement Cu/Zn et Mn dépendantes, l'étude approfondie de cette enzyme a été réalisée dans l'optique de la valider en tant que cible potentielle pour la réalisation de nouveaux antimalariques. Une étude antérieure réalisée par Philippe Bécuwe (Thèse, 1994) avait montré l'existence d'une SOD endogène probablement fer dépendante chez *P. falciparum*. Le microséquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine purifiée et l'amplification d'un fragment d'ADN génomique de 423 pb avaient été réalisés. L'objectif de notre travail a été d'étudier de façon plus précise, l'expression, la localisation et les caractéristiques biochimiques de l'enzyme. Pour cela, nous disposons d'un fragment d'ADN génomique qui nous a permis d'une part, d'étudier l'expression de la protéine au cours du cycle cellulaire et, d'autre part, nous a servi de sonde pour rechercher l'ADN complémentaire (ADNc) dans le but de produire une protéine recombinante. L'obtention de la protéine recombinante purifiée a permis, par l'utilisation de méthodes immunologiques, de localiser l'enzyme dans le parasite et de caractériser ses propriétés par des méthodes biochimiques et biophysiques.

# **ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**



## CHAPITRE I : PRESENTATION DE L'ORGANISME ETUDIE

Sur une centaine d'espèces répertoriées de *Plasmodium* infectant des hôtes aussi variés que les reptiles, les oiseaux ou les mammifères, quatre espèces infectent l'homme: *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. vivax* (Grassi et Feletti, 1890), *P. falciparum* (Welch, 1897) et *P. ovale* (Stephens, 1922). *Plasmodium falciparum* représente à la fois l'espèce la plus redoutable, et aussi la seule qui puisse être maintenue en culture *in vitro* pendant des périodes prolongées d'une façon reproductible.

### I. SYSTEMATIQUE DE *PLASMODIUM*

Les Sporozoaires ou Apicomplexa ont un cycle biologique qui comporte une alternance régulière de reproduction sexuée et asexuée. Ce sont tous des parasites intracellulaires. Leurs formes invasives possèdent un appareil de pénétration, le complexe apical, comportant différents organites tels que les anneaux polaires, les rhoptries et les micronèmes, éventuellement un conoïde. La présence de ce complexe a donné son nom au groupe.

Nous ne parlerons dans cette étude que d'une seule espèce qui est *P. falciparum*, dont la classification est présentée ci-dessous:

Embranchement:	Protozoa Goldfus, 1818
Sous-embranchement:	Apicomplexa Lévine, 1970
Classe:	Sporozoea Leuckart, 1879
Sous-classe:	Coccidia Leuckart, 1879
Ordre:	Eucoccidiida Léger et Duboscq, 1910
Sous-ordre:	Haemosporina Danilewsky, 1885
Famille:	Plasmodiidae Mesnil, 1903
Genre:	<i>Plasmodium</i> Marchiafava et Celli, 1885
Espèce:	<i>falciparum</i> Welch, 1897

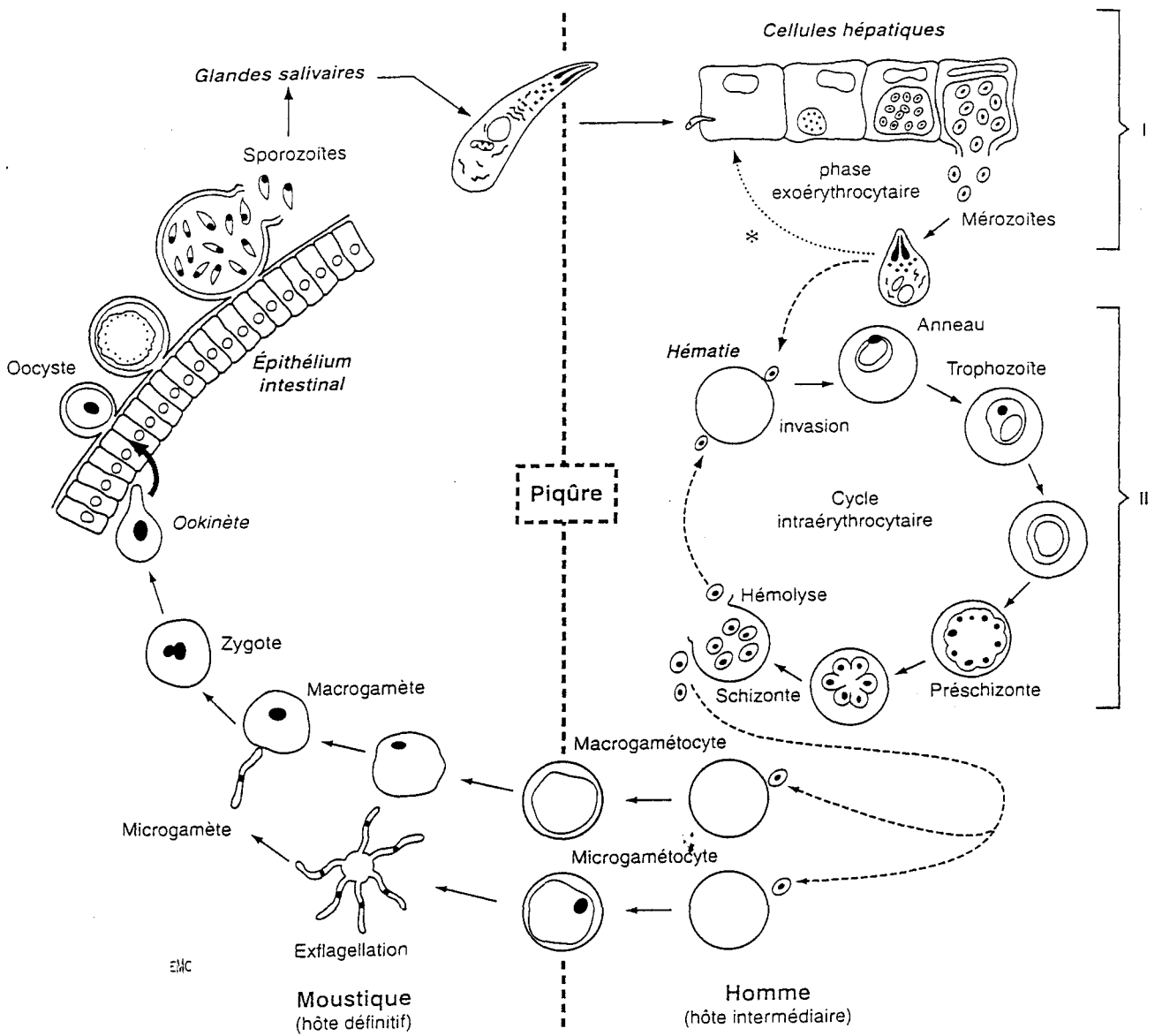


Fig 1: Cycle biologique de *Plasmodium human*

## II. CYCLE BIOLOGIQUE DE *PLASMODIUM* (Fig.1)

Le cycle évolutif de *Plasmodium* est hétéroxène et comprend deux hôtes: le vertébré où s'accomplit la phase de multiplication asexuée et un insecte diptère du genre *Anopheles* où se déroule la phase de multiplication sexuée. La phase asexuée se déroule en deux étapes: hépatique ou exo-érythrocytaire et sanguine ou intra-érythrocytaire.

### II.1 Cycle asexué chez le vertébré

#### II.1.1 Phase hépatique

Les sporozoïtes sont inoculés à l'homme lors de la piqûre d'une femelle d'anophèle infestée et gagnent rapidement le foie par le biais de la circulation sanguine. Dans les hépatocytes, le parasite subit un premier cycle de multiplication pour former le schizonte hépatique. Ce stade hépatique dure 6 à 7 jours à l'issue desquels l'hépatocyte infecté éclate, libérant une dizaine de milliers de mérozoïtes qui vont envahir les hématies, initiant ainsi le cycle érythrocytaire. Cette première phase asymptomatique chez l'homme est appelée période prépatente. Contrairement à *P. vivax* et *P. ovale*, *P. falciparum* ne présente pas de formes hépatiques dormantes (hypnozoïtes), qui peuvent être à l'origine d'une rechute survenant des mois ou des années après la première infection.

#### II.1.2 Phase érythrocytaire

Les mérozoïtes pénètrent dans les hématies en moins de 30 secondes. Ce processus d'invasion est complexe, il se décompose en trois étapes: la reconnaissance, la réorientation du mérozoïte par rapport au globule rouge (GR) et la pénétration qui s'accompagne de la libération du contenu des organites apicaux du mérozoïte (rhoptries et micronèmes). L'invasion s'accompagne de la formation d'une vacuole parasitophore. Celle-ci se formerait dans un premier temps par l'invagination de la membrane du GR infecté. Du matériel membranaire d'origine parasitaire déchargé par les rhoptries viendrait ensuite s'intégrer dans la membrane de la vacuole qui s'agrandit progressivement au fur et à mesure que le parasite se développe (Bannister et Dluzewski, 1990; Pouvelle et al., 1994). Au sein de la vacuole parasitophore, le parasite se

différencie en forme anneau puis en trophozoïte. Il internalise le contenu de l'hématie et le digère en formant l'hémozoïne aux dépens de la protoporphyrine IX de l'hémoglobine. Un cycle de multiplication (schizogonie) conduit alors à une forme schizonte où 8 à 32 mérozoïtes s'individualisent pour former, juste avant l'éclatement du GR infecté, la forme dite en rosace. La rupture des GR infectés conduit à la libération de mérozoïtes qui réenvahissent rapidement d'autres GR.

La durée du cycle intraérythrocytaire est d'environ 48 heures chez *P. falciparum*. Seuls les stades érythrocytaires sont associés à la pathologie et à la mortalité. La fièvre coïncide avec la rupture synchrone des schizontes.

Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains parasites vont se différencier en gamétocytes, seules formes infectantes pour le moustique, qui initieront le cycle sporogonique chez l'anophèle. Toutefois, il a été montré que chez certaines espèces de *Plasmodium* murins, les gamétocytes pouvaient être issus directement des formes hépatiques.

## **II.2 Cycle sexué chez l'anophèle**

Lors du repas sanguin, l'anophèle femelle ingère les formes érythrocytaires. Seuls les gamétocytes mâles (microgamétocytes) et femelles (macrogamétocytes) poursuivent leur développement alors que les autres formes dégèrent. Les gamétocytes se transforment en gamètes dans l'intestin moyen du moustique. La gamétogénèse mâle, ou exflagellation, conduit, après une rapide série de divisions mitotiques produisant 8 noyaux, à la libération de gamètes mâles flagellés. Ces gamètes mâles fertilisent les macrogamètes femelles pour former un oeuf diploïde (zygote). En moins de 24 heures, ce zygote se transforme en oocinète mobile qui après avoir traversé l'épithélium de l'intestin du moustique, s'entoure d'une paroi épaisse pour former l'oocyste (Alano et Carter, 1990). La méiose survient alors très rapidement et est suivie d'un grand nombre de divisions mitotiques à l'issue desquelles l'oocyste finit par se rompre pour libérer plusieurs milliers de sporozoïtes haploïdes qui envahissent l'hémocoel avant de coloniser les glandes salivaires. Lors d'un repas sanguin, l'anophèle femelle inocule les sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte intermédiaire, perpétuant ainsi le cycle.

### III. ORGANISATION DU PARASITE AU STADE INTRAERYTHROCYTAIRE

#### III.1. Ultrastructure du parasite

*Plasmodium* possède une structure typique de cellule eucaryote, mais présente également de nombreuses particularités.

##### III.1.1 Le système d'endocytose

Il constitue la particularité majeure de *Plasmodium*. Ce système de digestion complexe comprend à la fois des vésicules d'endocytose et de micropynocytose formées sur le pourtour du parasite, et un cytostome à partir duquel se forme une vacuole d'endocytose dans laquelle le contenu de l'hématie est internalisé (Slomianny, 1990). A partir de ce système cytotomal s'individualisent les vacuoles digestives où s'effectue la digestion du contenu internalisé de l'hématie. On considère que 25 à 75 % de l'hémoglobine contenue dans l'hématie est dégradée au cours du développement intraérythrocytaire (Roth et coll., 1986). La digestion de cette protéine implique de nombreuses enzymes vacuolaires, en particulier trois protéases aspartiques (Gluzman et coll., 1994) et une protéase à cystéine appelée falcipaine (Goldberg, 1992; Rosenthal et coll., 1992). L'hème résiduelle est une molécule très réactive qui doit être détoxifiée. La protoporphyrine IX est polymérisée par un mécanisme encore très discuté et associée à des protéines et des lipides pour former le pigment malarique inerte (hémozoïne).

##### III.1.2. Le noyau

Il ne montre jamais, dans les conditions normales, de chromatine en amas. Le nucléole est difficilement visible. Aucun chromosome individualisé n'est observé au cours du cycle cellulaire, mais seulement des cinétochores au moment de la schizogonie (Prensier et Slomianny, 1986).

##### III.1.3 La mitochondrie

Elle est unique mais multilobée, ce qui peut donner l'illusion d'organites multiples en ultrastructure (Slomianny et Prensier, 1986).

### III.1.4 Le réticulum endoplasmique (RE)

Il a été mis en évidence à la fois en ultrastructure mais également par la caractérisation de marqueurs biochimiques spécifiques. En effet, des modifications post-traductionnelles de protéines caractéristiques de ce compartiment et notamment la formation de ponts disulfures ou la N-glycosylation ont été recherchées. Un certain nombre de protéines de rhoptries possèdent des ponts disulfures suggérant que l'enzyme ("PDI, protein disulfide isomerase") nécessaire à cette modification est présente (Howard et Reese, 1990; Ridley et coll., 1990). Le fait que les protéines adressées aux rhoptries possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale (Ridley et coll., 1990; Brown et Coppel, 1991; Saul et coll., 1992) suggère que la formation de ces ponts disulfures a lieu dans le RE ou dans un équivalent.

Une protéine spécifique du RE, la protéine BiP ("immunoglobulin binding protein") qui aurait un rôle de chaperone permettant le repliement correct des protéines après leur translocation dans le réticulum, a été identifiée chez *P. falciparum* (Mattei et coll., 1988; Kumar et coll., 1991; Kumar et Zheng, 1992). Cette protéine contiendrait une séquence tétrapeptidique dans la région C-terminale similaire à celles des protéines résidentes dans le réticulum endoplasmique des cellules de mammifères. D'autre part, un homologue de ERD2, le récepteur qui reconnaît ce tétrapeptide, a été mis en évidence chez *P. falciparum* (Elmendorf et Haldar, 1993a).

Depuis peu, la N-glycosylation, une des principales fonctions de biosynthèse du RE, a été caractérisée chez *P. falciparum* (Gowda et coll., 1997). Par ailleurs, des protéines parasitaires présenteraient des sites potentiels de N-glycosylation. (Hirtzlin, 1995).

Un certain nombre d'antigènes sécrétés par le parasite dans la vacuole parasitophore ou dans l'érythrocyte infecté possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale (Braun-Breton et coll., 1990). Ces antigènes parasitaires comportent donc dans leur séquence primaire le signal nécessaire pour être reconnus par la machinerie moléculaire du RE suggérant que la première étape d'adressage des protéines sécrétées au RE est conservée chez *P. falciparum* (Ragge et coll., 1990; Günther et coll., 1991).

Toutes ces données morphologiques et biochimiques laissent supposer qu'un compartiment analogue au RE existe chez le parasite et que les antigènes sécrétés par le parasite transitent par ce compartiment.

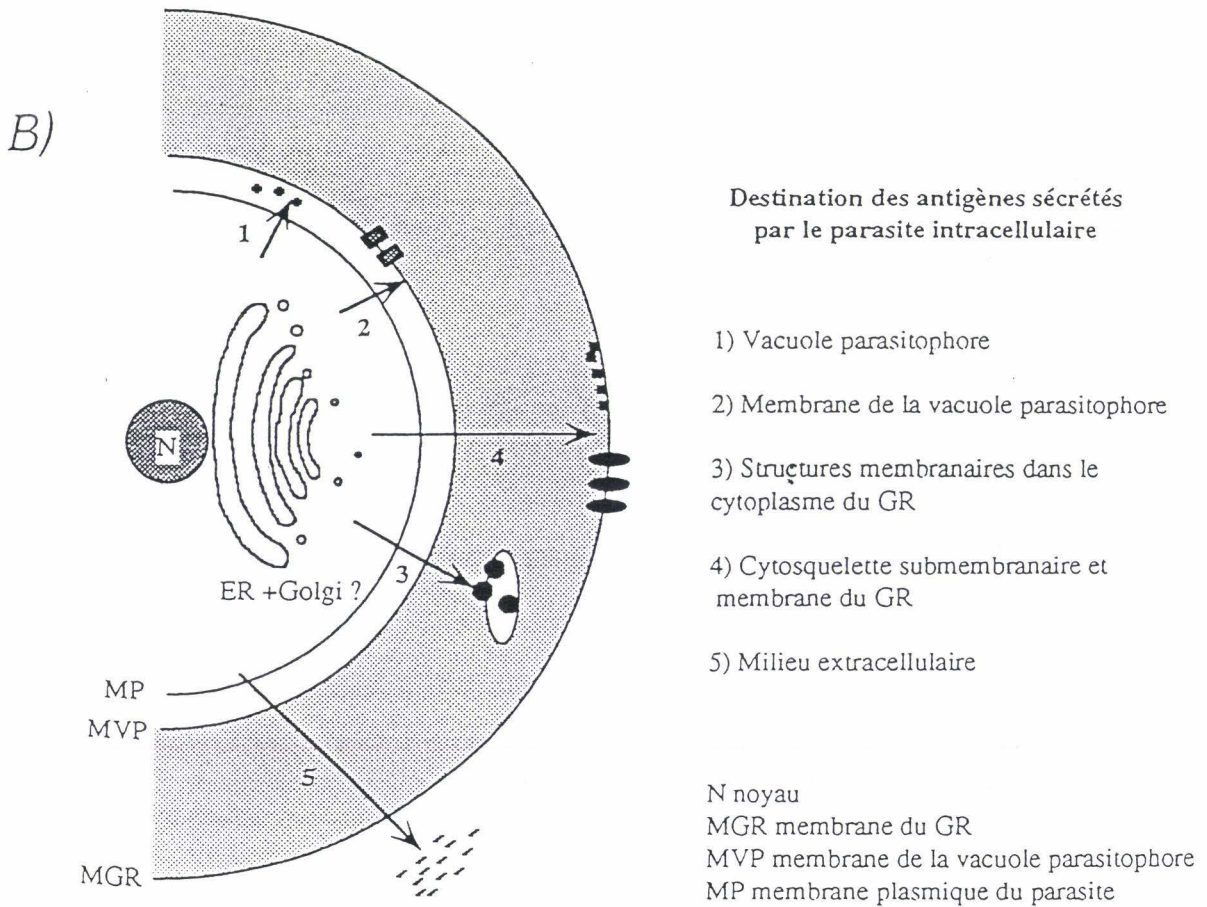
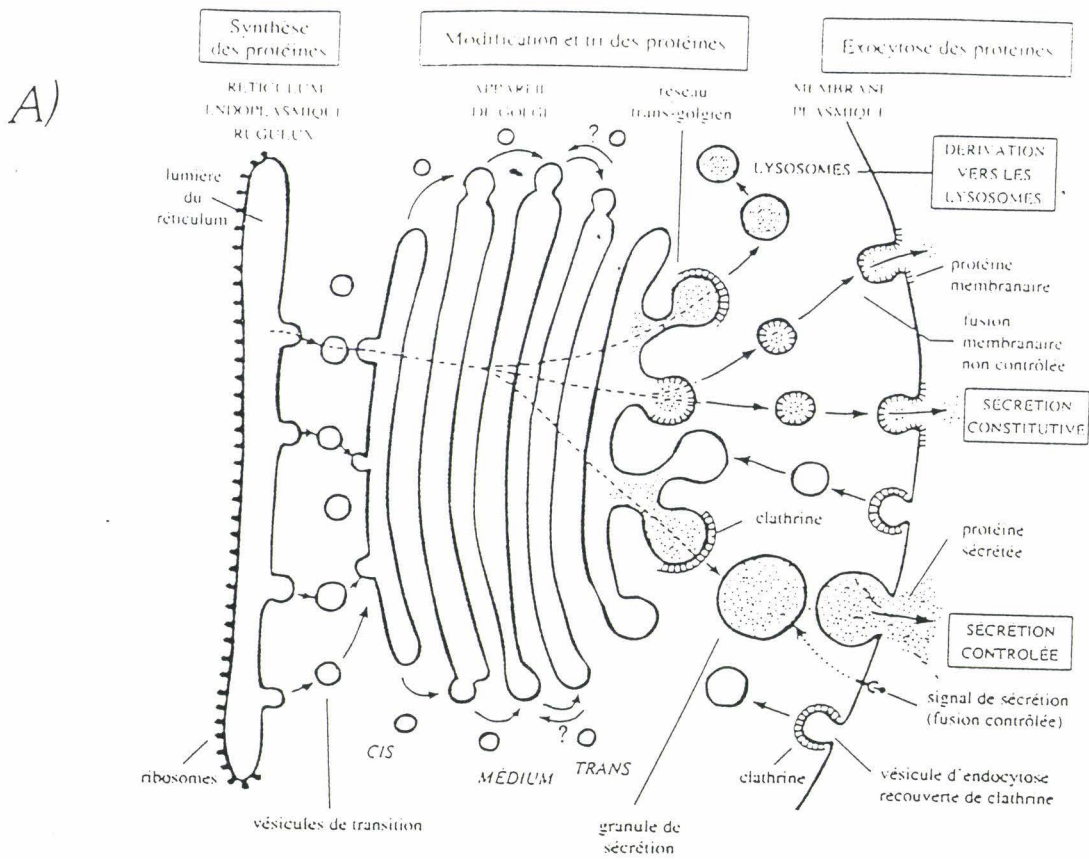


Fig 2: Sécrétion des protéines dans une cellule eucaryote (A) et dans un globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum* (B) (Hinterberg K, Thèse, 1995)

### III.1.5 L'appareil de Golgi

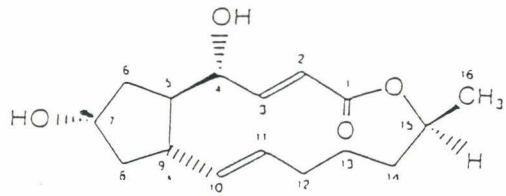
Il est difficile à distinguer et n'est pas organisé en dictyosomes, mais en groupe de vésicules (Slomianny et Prensier, 1990). Le seul marqueur bien caractérisé, trouvé dans le cis-Golgi des cellules eucaryotes, est la protéine ERD2. Malheureusement, cette protéine n'a pas encore été bien localisée au niveau ultrastructural chez *P. falciparum* (Elmendorf et Haldar, 1993a). D'autres marqueurs spécifiques des différents compartiments impliqués dans la voie de sécrétion dans les cellules eucaryotes ont été identifiés chez *P. falciparum* (Ward et coll., 1997). Les protéines Rab sont des petites protéines fixant le GTP dont la fonction est de réguler la cinétique d'ancrage des vésicules de transport et la fusion avec les membranes cibles (Rybin et coll., 1996). Ces protéines marqueurs seraient donc de bons outils pour définir les différents compartiments équivalents à ceux des eucaryotes (**Fig.2**), qui seraient fonctionnels dans le parasite.

Le passage des protéines par le Golgi peut être bloqué par un abaissement de la température à 15°C ou par l'action de la bréfeldine A (BFA) qui provoque le gonflement, suivi de la fragmentation de l'appareil de Golgi (**Fig.3**) avec redistribution de ses constituants vers le RE (Griffiths et coll., 1985; Misumi et coll., 1986; Lippincott-Schwartz et coll., 1989). Un abaissement de la température ou le traitement par la BFA entraînent une inhibition de la sécrétion de certaines protéines chez *P. falciparum*, suggérant l'existence d'un appareil de Golgi fonctionnel (Crary et Haldar, 1992; Benting et coll., 1994). Pourtant, des protéines parasitaires sécrétées, insensibles à la BFA, ont été mises en évidence. Il semblerait donc que, dans le cytoplasme du parasite, les protéines sécrétées appartiennent à des compartiments différents, que l'on peut distinguer par leur différence de sensibilité à la BFA.

Comme pour le RE, toutes ces données suggèrent l'existence d'un appareil de Golgi fonctionnel tout en soulignant les particularités du parasite. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer quelles fonctions sont associées à cette organisation particulière de l'appareil sécrétoire chez le parasite.

Certaines protéines, ne possédant pas de séquences signal typiques, ne sont pas transloquées dans un système de microsomes *in vitro* (Lingelbach, 1993). Ce phénomène peut s'expliquer soit par le manque de spécificité de la machinerie de translocation du modèle utilisé, soit par l'existence d'une autre voie de sécrétion qui n'inclurait pas la translocation à travers la





BFA

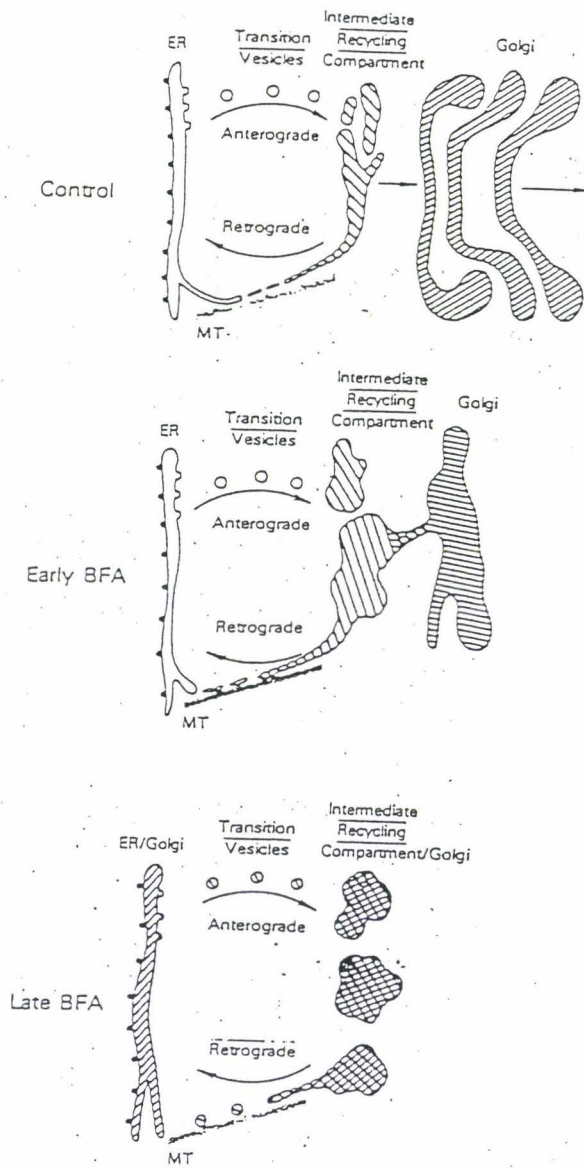


Fig 3: Mécanisme d'action de la bréfeldine A (BFA) sur le système RE/Golgi

membrane du RE. La protéine RESA/pf 155, protéine associée à la membrane des érythrocytes infectés par les jeunes parasites est relarguée par les mérozoïtes après l'invasion (Foley et coll., 1991). A l'intérieur du mérozoïte, RESA est localisée dans les granules denses (Aikawa et coll., 1990) qui sont des organites impliqués dans la sécrétion protéique (Bannister et coll., 1975). PfHPRT est également trouvé dans ces granules denses (Shahabuddin et coll., 1992). Ces deux protéines ne contiennent pas de séquences signal typiques du RE et il a été proposé que les granules denses représentent un compartiment de la voie de sécrétion des protéines, indépendante de la voie classique de sécrétion des Eucaryotes.

### III.2. Organisation de l'hématie parasitée (Fig.4)

Au cours de son développement intracellulaire, *P. falciparum* entraîne, au niveau de la membrane du GR, des modifications morphologiques, biochimiques, et fonctionnelles. L'érythrocyte ne se présente plus comme un disque biconcave à surface lisse mais comme une sphère crénelée. La déformabilité de la cellule infectée est réduite (Cranston et coll., 1984) alors que sa perméabilité pour certaines molécules est accrue (Tanabe, 1990). De plus, l'érythrocyte infecté présente de nouveaux déterminants antigéniques à sa surface (Hommel et coll., 1983). Des protéines nouvellement synthétisées sont détectées dans le cytoplasme, au niveau de la membrane de l'érythrocyte infecté ainsi que dans différents compartiments membranaires se mettant en place dans la cellule hôte alors que le parasite se développe (Knapp et coll., 1991). Ces protéines peuvent être marquées métaboliquement et sont donc d'origine parasitaire.

Les nouvelles structures apparaissant dans l'hématie infectée sont observables en microscopie électronique: les knobs, les caveolae, les corpuscules de Maurer, le matériel dense en microscopie électronique (EDM) et le canal parasitophore. Ces structures n'apparaissent pas chez toutes les espèces de *Plasmodium* humains: les caveolae ne sont pas observées chez *P. falciparum*. De nombreuses informations ont déjà été réunies sur ces structures (Atkinson et coll., 1990).

#### III.2.1 Les knobs

Ce sont des structures nouvelles apparaissant à la surface des hématies parasitées. Ces structures coniques, denses aux électrons contiennent des antigènes parasitaires, en particulier PfHRP1 et pfEMP2/MESA, associés au cytosquelette de l'hématie. Toutes les souches ne

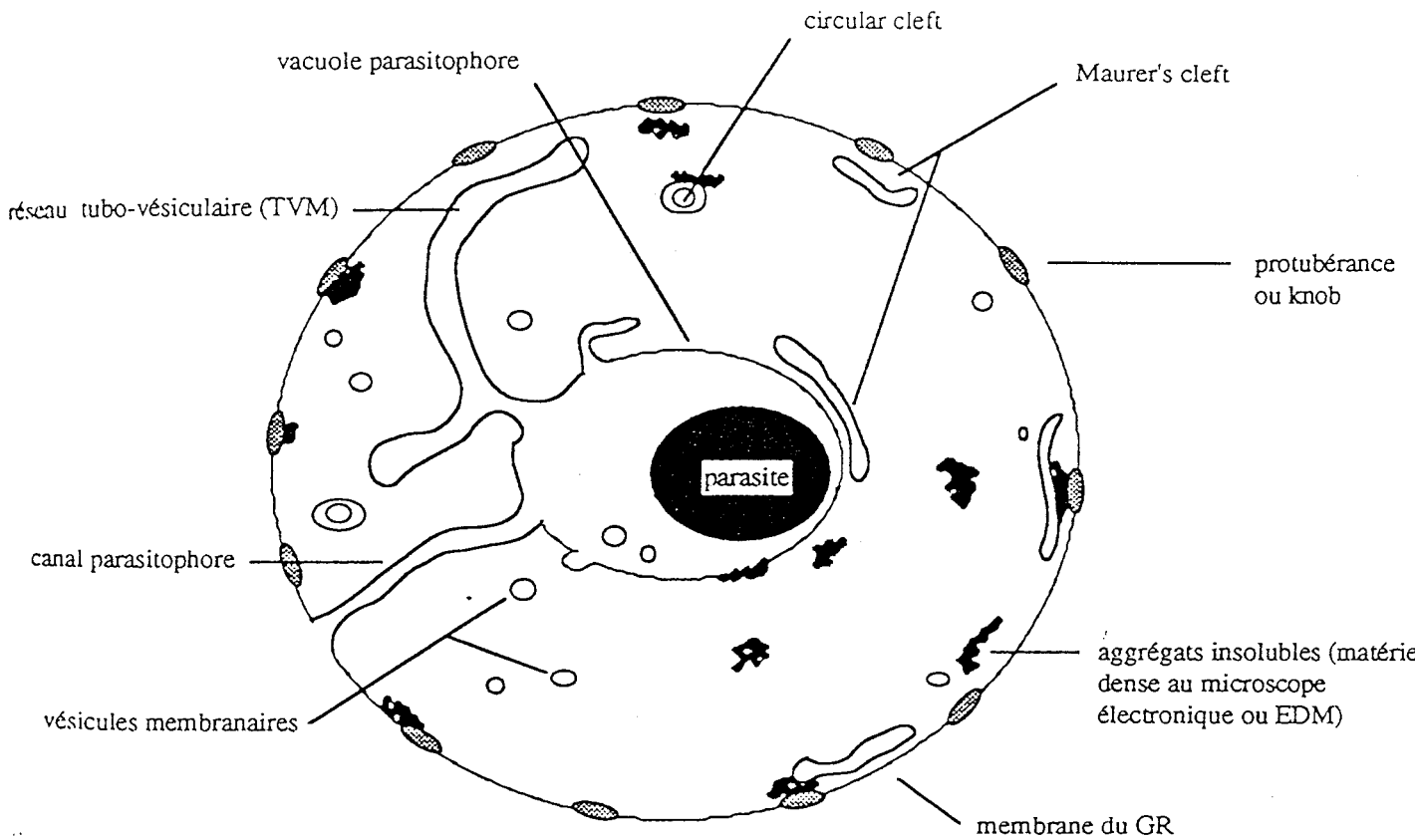


Fig 4: Structures, compartiments et vésicules membranaires d'origine parasitaire dans le globule rouge infecté par *Plasmodium falciparum* (Hinterberg K, Thèse, 1995)

produisent pas de knobs. En culture *in vitro*, le parasite peut perdre la faculté de les induire. Ces structures seraient impliquées dans les phénomènes d'adhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire mais cette hypothèse est discutée .

### III.2.2 Les corpuscules de Maurer: "Maurer's clefts"

Ils apparaissent soit comme des vésicules, soit comme des systèmes tubulaires ou sacculaires présents dans le cytoplasme de l'hématie parasitée. Ces structures semblent en continuité avec la vacuole parasitophore et contiennent de nombreux antigènes propres au parasite. Il existe manifestement plusieurs types de corpuscules que l'on peut distinguer par leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques, mais l'organisation de ces corpuscules et leur interconnexion éventuelle est encore mal connue.

### III.2.3 Le matériel dense aux électrons (EDM)

Il est rencontré dans le cytoplasme de l'hématie et au niveau des knobs et contient des protéines parasitaires. Il apparaît souvent non pas limité par une membrane, mais par une zone plus transparente aux électrons. Ces amas semblent résulter du bourgeonnement des corpuscules de Maurer ou de la vacuole parasitophore et migrent ensuite vers la membrane de l'hématie sur laquelle ils s'adsorbent pour former les caveolae.

### III.2.4 Le canal parasitophore ou "duct"

Une structure membranaire continue entre la vacuole parasitophore et la membrane du GR a été décrite (Pouvelle et coll., 1991). Ce canal parasitophore permettrait un accès direct du parasite aux macromolécules provenant du milieu extérieur mais celui-ci n'a pas été impliqué dans le transport d'antigènes. L'existence d'une telle structure est discutée (Fujioka et Aikawa, 1993).

### III.2.5 Le système tubulovésiculaire (TVM: Tubo Vesicular Membrane network)

L'analyse en microscopie électronique à balayage de trophozoïtes libérés de la cellule hôte par un choc osmotique a permis de mettre en évidence un véritable réseau de tubules et de saccules membranaires reliés à la membrane de la vacuole parasitophore (Elford et Ferguson, 1993). Ces structures formant des extensions tubulaires dans le cytoplasme du GR infecté ont été

qualifiées de “TVM” (Elmendorf et Haldar, 1993b; 1994). Un marqueur de ces structures serait l’antigène Exp-1 (Elmendorf et Haldar, 1993b) qui est également détecté au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore et des corpuscules circulaires: “circular clefts” (Simmons et coll., 1987; Kara et coll., 1988). Une activité sphingomyéline synthétase (marqueur de l’appareil de Golgi) est également trouvée dans ce “TVM”. La présence de cette enzyme servirait à accumuler la sphingomyéline dans ces structures permettant ainsi la synthèse *de novo* de la membrane et indiquerait un rôle possible dans le transport lipidique.

Toutes les structures nouvelles apparaissant dans l’hématie parasitée contiennent des protéines qui ont donc été exportées vers l’extérieur du parasite. Il a été avancé que les antigènes sont transportés, au-delà de la membrane plasmique du parasite, empaquetés dans des vésicules membranaires (Barnwell, 1990; Braun-Breton et coll., 1990). Différents antigènes sont associés à des structures membranaires distinctes dans le cytoplasme du GR infecté ce qui suggère l’existence d’un mécanisme de tri et de ségrégation des antigènes dans les différents compartiments intraérythrocytaires (Kara et coll., 1988; Gormley et coll., 1992).

### **III.3. Transport des protéines dans l’hématie parasitée**

III.3.1 Le transport des antigènes implique un trafic membranaire entre le parasite et sa cellule hôte.

La dynamique des vésicules et structures membranaires localisées dans le GR suggère qu’elles pourraient être impliquées dans le transport des antigènes (Howard et coll., 1987; Howard, 1988; Günther et coll., 1991; Lingelbach, 1993). Un certain nombre d’antigènes tels que MESA, HRPII et Pf41-2, sont détectés au niveau de diverses structures membranaires dans le cytoplasme de l’érythrocyte (Howard et coll., 1986; Howard et coll., 1987; Knapp et coll., 1989). Les vésicules et compartiments membranaires interviendraient donc dans l’acheminement de ces antigènes depuis leur lieu de synthèse dans le cytosol du parasite jusqu’à leur destination finale à la membrane de la cellule hôte.

L’hypothèse d’un trafic vésiculaire suppose une série de bourgeonnements et de fusions de vésicules membranaires depuis le parasite jusqu’à la membrane du GR infecté.

Plusieurs études tendent à prouver que les compartiments membranaires présents dans le

cytoplasme du GR se forment à partir de la vacuole parasitophore. Les corpuscules de Maurer semblent pouvoir former des extensions membranaires à partir de la vacuole parasitophore ou bourgeonner pour former de nouveaux compartiments dans le cytoplasme du GR infecté (Kara et coll., 1988).

Pouvelle et coll.(1994) ont étudié la biogénèse des membranes détectées dans le cytoplasme de l'érythrocyte infecté en utilisant des marqueurs fluorescents. Ces auteurs démontrent que ces compartiments comportent tous des membranes dérivées de la vacuole parasitophore. Le bourgeonnement de vésicules à partir de la vacuole parasitophore suggère que celle-ci pourrait avoir une fonction de tri et d'emballage des protéines sécrétées dans le GR infecté.

Toutefois, en utilisant des marqueurs fluorescents pour étudier la dynamique des structures membranaires intraérythrocytaires, Haldar et Uyetake (1992) ont montré qu'il n'existe pas d'échanges vésiculaires entre la membrane du GR infecté et les membranes parasitaires. Des résultats comparables ont été obtenus par Pouvelle et coll. (1994) dans une étude de biogénèse et de la dynamique des membranes dans le GR infecté. Le GR a perdu les fonctions d'endocytose des cellules eucaryotes et les vésicules détectées dans le cytoplasme ne semblent pas fusionner avec la membrane de la cellule hôte. Le fait que la membrane du GR infecté soit donc exclue comme compartiment donneur ou receveur de vésicules membranaires dans le trafic vésiculaire ne manque pas de soulever un certain nombre d'interrogations quant aux mécanismes permettant la sécrétion d'antigènes parasitaires dans le milieu extérieur et l'intégration d'antigènes dans la membrane de la cellule hôte.

### III.3.2 Un modèle simplifié de sécrétion

La membrane plasmique du parasite et la membrane de la vacuole parasitophore sont étroitement accolées et il a donc été avancé que des points de contacts entre ces membranes pourraient représenter des lieux de passage privilégiés pour les antigènes adressés à la cellule hôte (Elmendorf et Haldar, 1993b). Après leur sécrétion dans le GR, ces antigènes peuvent s'associer au cytosquelette ou à la membrane érythrocytaire. Les antigènes adressés à la vacuole parasitophore seraient, eux, sécrétés en dehors de ces domaines de contacts entre les deux membranes, la ségrégation s'opérant donc au niveau de la membrane plasmique du parasite. Plusieurs études indiquent que les antigènes ayant pour destination finale la membrane de l'hématie ne sont pas transportés emballés dans des vésicules, mais sous forme d'agrégats non délimités

par des membranes (Gormley et coll., 1992).

En effet, Gormley et ses collaborateurs (1992) ont étudié simultanément la dynamique des vésicules membranaires dans le cytoplasme du GR infecté et leur association avec des antigènes exportés par le parasite par des méthodes d'immunofluorescence. Pour la majorité des antigènes adressés à la membrane de la cellule hôte (HRPI, HRPII et MESA par exemple), seule une fraction des molécules est associée à des membranes dans le cytoplasme de l'hématie.

L'acheminement des antigènes ne nécessite donc pas forcément un transport vésiculaire complexe. Ce modèle simplifié ne rend cependant pas compte des antigènes possédant des domaines transmembranaires transportés insérés dans une membrane.

### III.3.3 Le "TVM" est-il impliqué dans le transport des antigènes ?

Certains domaines du TVM sont étroitement apposés à la membrane du GR et on peut donc penser que les antigènes adressés à la membrane de l'érythrocyte pourraient transiter par ce réticulum membranaire. Peu d'antigènes ont été localisés au niveau du TVM et la dynamique de ce compartiment est encore mal connue. Des études supplémentaires seront donc nécessaires pour mettre en évidence une éventuelle implication de ce compartiment dans le transport des antigènes.

D'autre part, ce TVM pourrait être impliqué dans l'importation des nutriments importants tels que l'adrénosine, le glutamate et l'acide orotique au stade tardif de la croissance (Lauer et coll., 1997).

## **CHAPITRE II : LE CHOC OXYDATIF**

### **I. INTRODUCTION**

Pour la majorité des organismes vivants, la vie sans oxygène est impossible. Les animaux, les plantes et un nombre considérable de microorganismes dépendent de l'oxygène pour produire de façon efficace l'énergie sous la forme d'ATP. Comme l'oxygène est potentiellement toxique à forte concentration, l'apparition puis l'augmentation du taux atmosphérique d'oxygène moléculaire a entraîné une importante pression de sélection sur la biosphère primitive. Cette pression de sélection a amené non seulement une évolution dans les mécanismes permettant l'utilisation de l'oxygène ( $O_2$  comme accepteur d'électron terminal dans la chaîne respiratoire) mais également dans le développement de défenses protégeant les cellules contre les espèces activées de l'oxygène (E.A.O) qui peuvent apparaître au cours du métabolisme cellulaire. Il est en effet à noter que la molécule d' $O_2$  présente une faible réactivité et que sa toxicité semble provenir de son état excité (oxygène singulet) ou de sa forme radicalaire semi réductrice. Lorsque les E.A.O augmentent de façon trop importante, à cause de facteurs extracellulaires ou lors d'une déficience du système de défense, les dommages causés sont souvent irréversibles. Ce phénomène appelé "choc oxydatif" peut alors conduire à la mort de la cellule.

Gerschman et al. (1954) ont été les premiers à élaborer une théorie sur les effets toxiques de l'oxygène, basée sur la formation de radicaux libres. Par la suite, Mc Cord et Fridovich (1969) ont supposé que la formation des radicaux libres faisait partie intégrante du métabolisme normal de la cellule. Cette hypothèse n'a été acceptée qu'après de nombreuses recherches confirmant la participation des E.A.O dans des processus physiologiques et pathologiques.

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

L'oxygène moléculaire ou dioxygène constitue un biradical, c'est-à-dire qu'il possède deux électrons célibataires sur son orbitale externe. Cette molécule est très peu réactive (Halliwell et Gutteridge, 1990a). L'oxygène peut être activé par un processus photodynamique qui donne



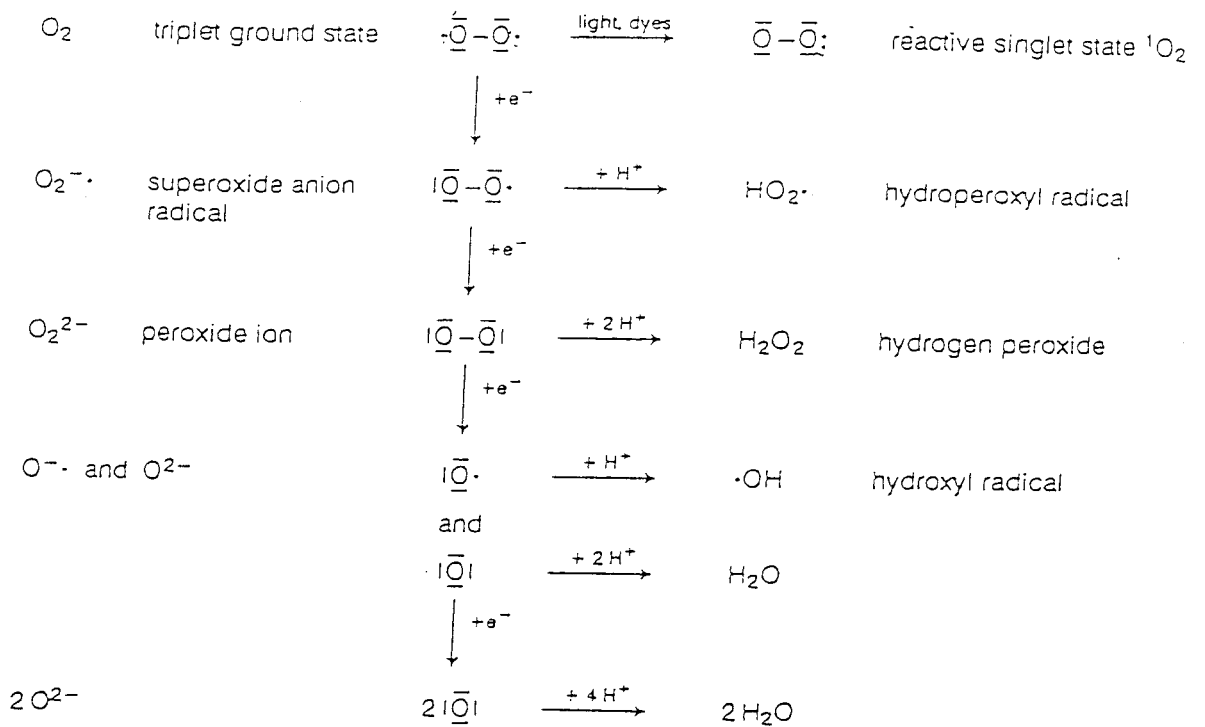


Fig 5: Activation de la molécule d'oxygène en oxygène singulet ( $^1O_2$ ), production des espèces activées de l'oxygène (E.A.O) par réductions successives d'un électron mais également par protonation de la molécule d'oxygène. (Gille et Sigler, 1995)

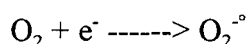
l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) ou peut subir une succession de réduction d'un électron.

La **Fig.5** montre la formation de l'oxygène singulet et les intermédiaires protonés ou déprotonés qui surviennent lors de l'étape de réduction de l' $\text{O}_2$ .

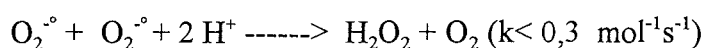
Des transferts d'électrons et de protons donnent successivement l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le radical hydroxyl ( $\text{OH}^\circ$ ) et éventuellement l'eau. La réactivité de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en solution aqueuse est limitée. Ils contribuent surtout à la formation de puissants oxydants tel  $\text{OH}^\circ$  (Youngman, 1984).

## II.1 L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

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:

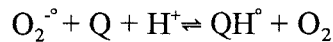


La réactivité de l'anion superoxyde dépend fortement des propriétés du milieu ambiant. Le radical est relativement réactif et sa demi vie est importante dans un environnement hydrophobe tandis que dans un environnement hydrophile, il présente une réactivité plus faible et disparaît rapidement (Halliwell et Gutteridge, 1986). Dans les solvants organiques,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se comporte comme une base forte et est nucléophile, tandis que dans les solutions aqueuses, il possède des propriétés réductrices et faiblement oxydantes (Halliwell et Gutteridge, 1990a). Il diffuse peu à travers les membranes, sauf celle de l'hématie où il emprunterait un canal anionique (Lynch et Fridovich, 1978). En solution aqueuse, l'anion superoxyde tend à se dismuter spontanément selon la réaction suivante:



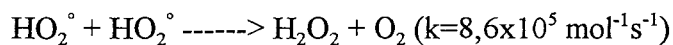
Par ses propriétés réductrices, l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  peut réagir sur le cytochrome C situé dans la chaîne respiratoire (McCord et coll., 1977), sur la plastocyanine localisée dans la chaîne de transport d'électrons produits au cours de la photosynthèse et sur la méthémoglobine. Il réduit également diverses quinones (Q), réactions souvent limitées par la réaction inverse d'oxydation du radical

semiquinone par  $O_2$  (Ferradini, 1986):



Par ailleurs, l'anion superoxyde peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO), facteur vasodilatateur libéré par les cellules endothéliales et les macrophages activés, pour former un puissant oxydant, le peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ). Cet agent, très cytotoxique par son action oxydante sur les groupements thiols, intervient également dans la peroxydation des lipides.

Par ses propriétés faiblement oxydantes, l'anion superoxyde est capable d'oxyder des polyphénols, la catécholamine, l' $\alpha$ -tocophérol, l'ascorbate, la lactate déshydrogénase NADH dépendante et de nombreux thiols (Bielski et Chan, 1973; Fridovich, 1989). Il peut inactiver des enzymes comme la créatine phosphokinase (McCord et Russell, 1988) ou la catalase (Pigeolet et coll., 1990). En milieu acide, l'anion superoxyde se protone pour donner le radical hydroperoxyde ( $HO_2^{\cdot}$ , pKa 4,8; Fridovich, 1978) plus liposoluble que  $O_2^{\cdot-}$ . Dans l'eau, sa dismutation est également plus rapide que  $O_2^{\cdot-}$ :

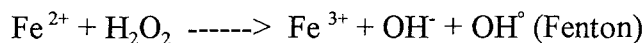


Le radical hydroperoxyde présente des propriétés oxydantes et réductrices, mais son rôle est restreint car il n'est produit qu'en faible quantité à pH physiologique. Néanmoins, ce radical n'est pas sans signification puisque la production importante d'anions superoxyde est localisée au niveau de la membrane dont l'environnement est à un pH beaucoup plus faible que celle du cytosol. La formation du radical  $HO_2^{\cdot}$  est favorisée dans ces conditions et il peut facilement pénétrer la membrane, du fait de sa structure non ionique, et intervenir dans la lipoperoxydation en arrachant un atome d'hydrogène d'un acide gras polyinsaturé.

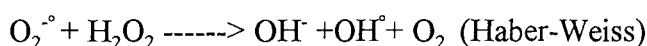
## II.2 Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Le peroxyde d'hydrogène ne présente pas d'électrons non appariés et ne constitue pas un radical (**Fig.5**). Il est formé secondairement par dismutation de l'anion superoxyde. Comme lui, il peut se comporter comme un agent oxydant ou réducteur, mais il diffuse plus facilement à travers toutes les membranes biologiques (Halliwell, 1990), permettant ainsi la formation de radicaux libres

loin de son lieu de formation. L'importance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tient dans son aptitude à participer à la formation du radical hydroxyle OH° qui est extrêmement réactif. Le fer sous forme Fe<sup>2+</sup> est essentiel dans cette réaction (Fenton, 1894).

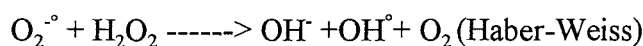
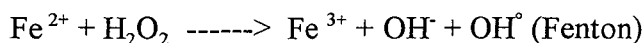
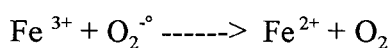


En 1934, Haber et Weiss ont démontré que la présence simultanée d'O<sub>2</sub>° et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était indispensable à la formation de radical OH° :



En fait, la vitesse de cette réaction est négligeable exceptée en présence de traces de métaux de transition (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>) qui peuvent accélérer de plusieurs milliers de fois la vitesse de réaction.

O<sub>2</sub>° intervient en réduisant Fe<sup>3+</sup> et Cu<sup>2+</sup> pour redonner les formes réactives Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup>. Le bilan total de la réaction peut s'établir comme suit:



La réaction de Fenton peut être également amorcée par le cobalt Co<sup>2+</sup>, mais les meilleurs catalyseurs restent néanmoins Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup>.

### II.3 Le radical hydroxyle (OH°)

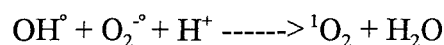
Il est reconnu que les dommages cellulaires causés par l'O<sub>2</sub>° et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dérivent de leur aptitude à produire une espèce beaucoup plus réactive, le radical hydroxyle (Halliwell et Gutteridge, 1988; Sutton et Winterbourn, 1989; Aruoma et coll., 1989). Ce radical réagit avec toute une série de molécules telles que les sucres, les acides aminés, les phospholipides, les nucléotides et les acides organiques. OH° possède un potentiel redox de +2V (Elstner, 1991) et une demi-vie de 10<sup>-9</sup> s à 37°C (Pryor, 1986). Dans les milieux biologiques, sa vitesse de réaction étant

très grande, il réagit à l'endroit même où il est produit. Il peut provoquer la lipoperoxydation des lipides, des lésions au niveau de l'ADN et l'oxydation des protéines. Au contraire de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, il n'existe pas de protection enzymatique contre  $\text{OH}^\circ$ . Comme il réagit avec de nombreuses molécules dans la cellule, il faut empêcher sa formation en contrôlant de façon stricte le métabolisme du fer. Mais ceci n'empêche pas complètement la formation de ce radical, car il peut être produit par des facteurs exogènes ou des processus pathologiques. Il existe certaines molécules, appelées molécules antioxydantes, capables de piéger les radicaux et de stopper les réactions en chaîne provoquées par  $\text{OH}^\circ$ .

#### **II.4 L'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )**

La molécule d'oxygène présente deux électrons non appariés de spin parallèles. Lorsqu'un des électrons est excité, son spin change d'orientation et les deux électrons ont alors des spins antiparallèles, ce qui entraîne la formation d'une molécule très réactive, l'oxygène singulet.

$^1\text{O}_2$  peut accepter un doublet d'électrons pour produire des peroxydes. Il apparaît au cours de réactions photochimiques, soit par l'action de rayonnements ultraviolets lointains, soit par l'action de la lumière sur divers pigments biologiques comme les chlorophylles, les flavines, les porphyrines ou le rétinol. Ces pigments capables d'absorber des photons passent à l'état excité, puis transfèrent leur énergie à l'oxygène. La molécule d'oxygène singulet peut être également formée lors de réactions chimiques par interaction radical-radical. C'est le cas de la réaction suivante:



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

### **III. ORIGINES DES E.A.O**

Dans les conditions physiologiques normales, des espèces activées de l'oxygène sont créées en permanence dans la cellule. Les réactions d'oxydoréduction biochimiques faisant intervenir l'oxygène, mais également les phagocytes intervenant au cours des réactions inflammatoires, constituent les principales sources de production de ces E.A.O. D'autres facteurs occasionnels, tels

que des xénobiotiques, des facteurs de l'environnement (exposition à des rayonnements ionisants, aux UV, à la pollution ambiante, à la fumée de cigarettes), l'hyperoxie, des exercices excessifs et l'ischémie-reperfusion peuvent également induire la formation de ces E.A.O.

### **III.1 Dans la mitochondrie et le chloroplaste**

Les sources les plus importantes d'anion superoxyde *in vivo* sont les chaînes de transport d'électrons de la mitochondrie et du chloroplaste. Dans la mitochondrie, l'oxygène est réduit en eau à la fin de la chaîne respiratoire. La molécule d'oxygène reste fixée au ferrocyclochrome c: cytochrome oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire de la mitochondrie) jusqu'à ce qu'elle soit complètement réduite en eau par le transfert de 4 électrons et de 2 protons. Cependant, en amont de cette chaîne (complexes I, II, et/ou III), une fuite d'électrons peut survenir à partir de protéines à centre fer-soufre non hémiques, entraînant la réduction partielle de l' $O_2$  en  $O_2^{\cdot-}$ . Cette perte d'électrons produisant ainsi l'anion superoxyde a lieu continuellement lors du métabolisme normal de la cellule. 1 à 2% des électrons qui parcourent la chaîne respiratoire n'arrivent jamais au complexe IV mais réduisent la molécule d'oxygène en anion superoxyde au niveau de l'ubiquinone du coenzyme Q et de la NADH déshydrogénase (Sohal et Brunk, 1992). Il est généralement admis que le peroxyde d'hydrogène mitochondrial dérive entièrement de la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ .

Lors d'une anoxie ou d'une hypoxie tissulaire, le transport des électrons 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  $O_2^{\cdot-}$  électron par électron.

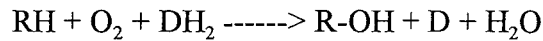
Chez les plantes supérieures, l'anion superoxyde peut être formé lors de la photosynthèse, qui produit  $O_2$  à partir d' $H_2O$  au niveau de la ferredoxine du photosystème I et de la plastoquinone du photosystème II (Salin, 1991). Par ailleurs, l'oxygène singulet peut également être produit par photoactivation au niveau des chloroplastes.

### **III.2 Dans les microsomes et les peroxysomes**

Les membranes du réticulum endoplasmique de nombreuses cellules animales et végétales possèdent, au niveau de la chaîne de transferts d'électrons des microsomes, un système enzymatique composé du complexe cytochrome  $P_{450}$  et de la NADPH-cytochrome  $P_{450}$  réductase (une flavoprotéine). Ce système enzymatique est impliqué dans la production de l' $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$  et

dans l'oxydation de plusieurs substrats.

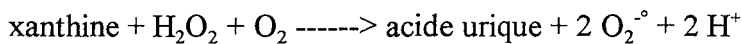
Ces enzymes fonctionnent comme une mono-oxygénase et entraînent l'hydroxylation de xénobiotiques, tels que des drogues, des agents carcinogènes et des pesticides, mais également de substrats cellulaires comme les acides gras et les stéroïdes.



(RH: substrat; DH<sub>2</sub>: donneur d'hydrogène, le plus souvent NADPH + H<sup>+</sup>)

La flavoprotéine NADPH-cytochrome-P<sub>450</sub> réductase fournit les électrons nécessaires au cytochrome P<sub>450</sub> via NADPH + H<sup>+</sup>. La forme réduite de la réductase et la forme oxydée du cytochrome P<sub>450</sub> peuvent être la source du transfert d'électrons à la molécule d'oxygène entraînant ainsi la formation de l'O<sub>2</sub><sup>-°</sup>. Une autre source d'O<sub>2</sub><sup>-°</sup>, localisée dans le réticulum endoplasmique, est le cytochrome *b*<sub>5</sub>, couplé à la NAD(P)H-cytochrome-*b*<sub>5</sub> réductase correspondante, qui participe également à l'introduction de doubles liaisons dans les acides gras (Jones, 1985).

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>. Par exemple, la xanthine oxydase de la matrice peroxysomale produit de l'O<sub>2</sub><sup>-°</sup> en catalysant la réaction:



Les enzymes telles que l'aldéhyde oxydase, la flavine déshydrogénase et la dihydroorotate déshydrogénase libèrent O<sub>2</sub><sup>-°</sup>, tandis que Acyl-CoA oxydase, l'urate oxydase, la D-amino acide oxydase et la glycolate oxydase produisent plutôt de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### III.3 Dans le cytoplasme

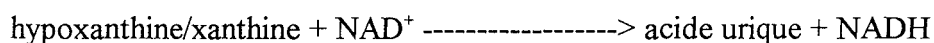
Dans la cellule, beaucoup de molécules telles que les catécholamines (adrénaline), les flavines réduites, l'ascorbate, le glutathion et d'autres molécules à groupements thiols peuvent réagir spontanément avec l'oxygène. L'autooxydation de ces molécules provoque la formation d'anion superoxyde qui peut être augmentée par la présence de métaux de transition tels que le fer

et le cuivre (réaction de Fenton). La réaction d'autooxydation la plus importante survient dans l'érythrocyte, lors de la conversion de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine inactive, avec un relargage concomittant de  $O_2^{\circ}$ . La méthémoglobine contient un fer héminique sous la forme  $Fe^{3+}$ , ce qui l'empêche de fixer l'oxygène. La méthémoglobine est dangereuse car elle catalyse la réaction de Fenton et se dissocie rapidement en libérant l'hème dans la circulation. Les porphyrines libres peuvent, après passage du fer à l'état excité, transférer leur énergie à l'oxygène moléculaire formant ainsi l'oxygène singulet (Carell et coll., 1975; Morlière et coll., 1992). L'érythrocyte possède donc une méthémoglobine réductase qui convertit la méthémoglobine en oxyhémoglobine, en utilisant le NADH comme cofacteur, celui-ci provenant du cycle de la glycolyse (Carell et coll., 1975).

### **III.4 Production des E.A.O par le système Hypoxanthine/xanthine, xanthine oxydase**

L'enzyme qui transforme l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique existe sous deux formes qui diffèrent essentiellement par leur accepteur d'électrons. La première est une xanthine déshydrogénase ou XDH : l'enzyme réduite par le substrat est réoxydée par le  $NAD^+$ . Cette enzyme, sous cette forme, est largement distribuée dans plusieurs tissus, mais elle est particulièrement abondante dans les cellules endothéliales.

#### **Xanthine déshydrogénase**



La seconde ou xanthine oxydase utilise l' $O_2$  comme accepteur et fonctionne comme une oxydase proprement dite. Cette réaction d'oxydation entraîne la formation de  $O_2^{\circ}$ :

#### **Xanthine oxydase**



La transformation  $XDH \text{ -----} > XO$  s'effectue de deux manières. Dans le premier cas, le passage à l'oxydase résulte d'une oxydation des groupements thiols. La transformation en XDH est alors réversible sous l'action d'un réducteur. Dans le second cas, la transformation est irréversible, car

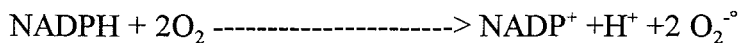


elle accompagne une action protéolytique.

### III.5 Production des E.A.O par les leucocytes

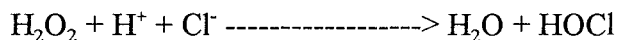
Les phagocytes (granulocytes, neutrophiles et macrophages) possèdent un système enzymatique flavinique, le NADPH oxydase, capable de produire de l' $O_2^{\cdot -}$  en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. L'enzyme se trouve à l'état de dormance dans les phagocytes non activés. Sous l'effet de stimuli comme la présence de microorganismes ou de molécules telles que le complément C5a ou le leucotriène B<sub>4</sub>, le cytochrome b<sub>558</sub> lié à la membrane et le complexe oxydase cytosolique s'assemblent rapidement dans la membrane plasmique et commencent à générer de l' $O_2^{\cdot -}$  selon la réaction suivante:

#### NADPH oxydase

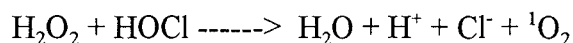


Cette réaction accompagne la phagocytose réalisée par les leucocytes polymorphonucléaires (PLMN) ou par d'autres cellules phagocytaires et entraîne une forte surconsommation d'oxygène (flambée respiratoire). L' $O_2^{\cdot -}$  produit joue donc un rôle dans la défense de l'hôte contre les microorganismes et possède donc une activité bactéricide. Un autre système concomitant avec le relargage d'anion superoxyde est le processus de dégranulation qui se déroule chez les neutrophiles et les monocytes. Lors de la dégranulation, une myéloperoxydase est sécrétée. En présence de cette enzyme, le peroxyde d'hydrogène qui est généré lors de la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ , réagit avec les ions chlorures pour former un oxydant bactéricide très puissant, l'acide hypochloreux :

#### Myéloperoxydase



Le système myéloperoxydase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HOCl présent dans les éosinophiles, peut également générer l'oxygène singulet selon la réaction suivante:



### **III.6 Production des E.A.O par différents types cellulaires**

En tant que molécules signal,  $O_2^\circ$  et  $H_2O_2$  sont produites par des cellules, incluant les fibroblastes, les cellules endothéliales, les neurones, l'oeuf, et les spermatozoïdes. Tous ces types tissulaires utiliseraient une NAD(P)H oxydase similaire à celle trouvée dans les leucocytes pour produire ces oxydants. Les stimuli varient selon le type cellulaire. Par exemple, les fibroblastes libèrent une petite quantité d' $O_2^\circ$  en réponse à des médiateurs inflammatoires tels que l'interleukine-1, des peptides N-formylés (Meier et coll., 1989; 1991). Les cellules endothéliales produisent de l' $O_2^\circ$  en réponse à l'angiotensine II, une hormone peptidique qui augmente la pression sanguine. Cette augmentation de pression est due à la consommation par  $O_2^\circ$  du  $NO^\circ$ , qui est généré de façon continue par les cellules endothéliales (Griendling et coll., 1994; Rajagopalan et coll., 1996). Juste après la fécondation, l'oeuf d'oursin va générer du peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire d'une NADPH oxydase membranaire. Cet oxydant va réagir avec les protéines de la membrane de fécondation en formant des ponts dityrosyl, rendant imperméable cette membrane aux autres spermatozoïdes et empêchant la polyspermie (Heinecke et Shapiro, 1989).

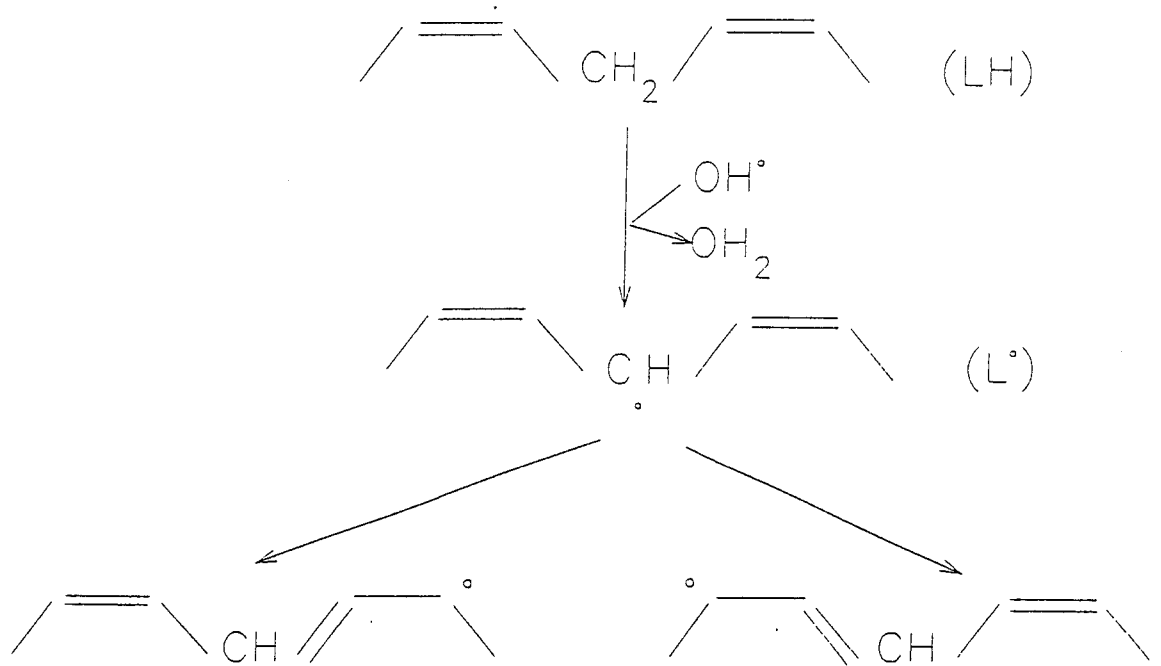
### **III.7 Production des E.A.O par des facteurs externes**

De nombreuses molécules exogènes tels le paraquat, l'antimycine qui bloque la chaîne respiratoire, ou encore des carcinogènes chimiques sont à l'origine d'une production directe ou indirecte d'espèces activées de l'oxygène.

De même, les rayonnements comme les ultraviolets, les rayons X ou gamma, agissent sur certaines molécules intracellulaires, comme les porphyrines, les flavoprotéines, les quinones, le NADH et le NADPH, entraînant une photooxydation qui libère des E.A.O, en particulier de l'anion superoxyde et de l'oxygène singulet (Morlière et coll., 1992).

## **IV. IMPLICATION DE LA FORMATION DES E.A.O AU NIVEAU CELLULAIRE**

Les E.A.O formées dans la cellule réagissent sur plusieurs cibles biologiques (lipides, protéines et acides nucléiques). Un niveau de radicaux libres excédant les possibilités de défense de la cellule a pour conséquence la formation de lésions qui peut conduire 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

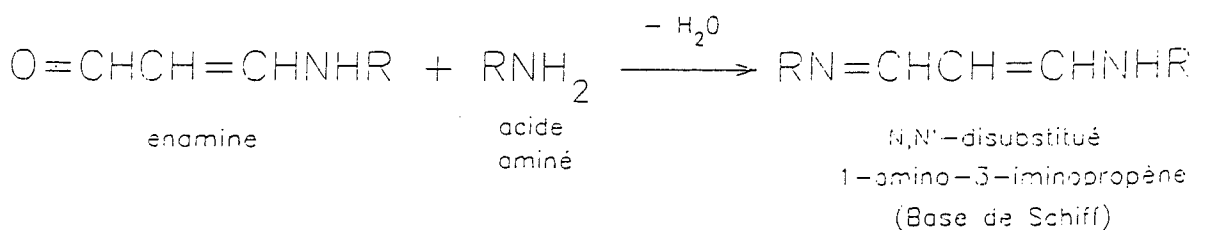
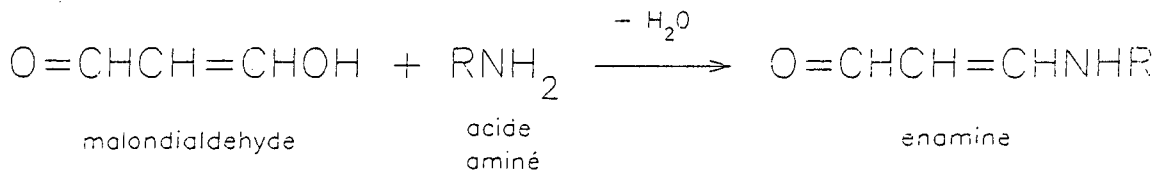


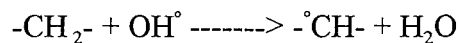
Fig 6: La lipoperoxydation lipidique

#### IV.1 Peroxydation des lipides (Fig.6)

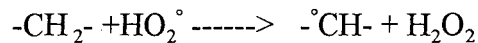
La lipoperoxydation est un processus oxydatif d'altération qui porte essentiellement sur les acides gras polyinsaturés. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois phases successives: initiation, propagation et terminaison.

##### -initiation:

Ce processus est provoqué par l'attaque d'oxydants suffisamment réactifs pour arracher un atome d'hydrogène à un carbone d'une chaîne aliphatique (-CH<sub>2</sub>-) d'un acide gras polyinsaturé (en particulier l'acide arachidonique, mais aussi l'acide eicosapentaénoïque, l'acide linoléique et linoléique). Le radical hydroxyl ainsi que le complexe Fer-oxygène peuvent initier cette réaction:



La forme protonée de l'anion superoxyde, HO<sub>2</sub><sup>°</sup> semble également capable d'initier cette peroxydation:

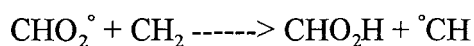


HO<sub>2</sub><sup>°</sup>, étant non chargé, peut facilement diffuser dans les membranes, cependant aucune preuve n'a permis d'affirmer que HO<sub>2</sub><sup>°</sup> initiait la peroxydation des membranes cellulaires.

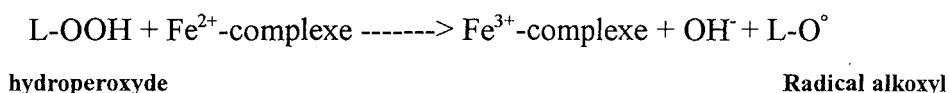
La soustraction d'un atome d'hydrogène à un carbone saturé entraîne l'apparition d'un électron non apparié. La présence d'une double liaison dans les acides gras polyinsaturés affaiblit les liaisons C-H de l'atome de carbone adjacent à la double liaison, ce qui permet une élimination plus facile de l'atome d'hydrogène. L'atome de carbone tend à se stabiliser par réarrangement moléculaire pour former un composé diène conjugué.

##### -propagation

La lipoperoxydation se poursuit par une étape d'amplification se développant en présence d'oxygène. En effet, le composé diène conjugué va réagir avec une molécule d'oxygène pour donner un radical peroxy (LOO<sup>°</sup>). Ce radical peut propager la réaction en chaîne de peroxydation en soustrayant un atome d'hydrogène à des acides gras voisins:

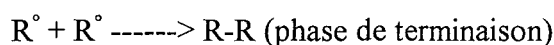


On assiste ainsi à la formation de différents composés, dont les hydroperoxydes (LOOH) instables. En présence de métaux de transition, en particulier du fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ), la décomposition des hydroperoxydes aboutit à la création de radical alkoxy ( $\text{LO}^\circ$ ) :



### **-terminaison**

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



La phase de propagation peut également être arrêtée grâce à la vitamine E ou  $\alpha$ -tocophérol, puissant piègeur de radicaux libres (voir paragraphe 5.1).

La peroxydation lipidique provoque des dommages cellulaires selon deux types de mécanismes:

- la désorganisation membranaire entraîne une inactivation des systèmes enzymatiques, une diminution de la fluidité, une perte de la perméabilité sélective, aboutissant à une perte d'intégrité de la membrane et donc à la mort de la cellule (Pré, 1991).

- la production de substances toxiques comme des alcanes, des aldéhydes, en particulier le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonéal, issus de la décomposition des hydroperoxydes. Le malondialdéhyde (MDA) peut réagir avec les protéines en bloquant les groupes  $-\text{NH}_2$  mais également avec l'ADN en produisant des cassures.

## **IV.2 Dégradation des protéines**

L'attaque des acides aminés par les E.A.O peut provoquer une modification de charges, la formation de ponts disulfures à partir des groupements thiols et la formation d'associations intermoléculaires. Les modifications au niveau des protéines peuvent être classées en 3 groupes:

la fragmentation, l'agrégation et la susceptibilité à la protéolyse (Yu, 1994).

#### **- fragmentation**

Certains acides aminés comme la méthionine, la cystéine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine et la proline sont facilement oxydés (Sies, 1986). La fragmentation dans le cas du collagène ou de l'albumine, s'effectue par l'attaque des résidus proline, aboutissant à l'hydrolyse de la liaison peptidique (Borel et coll., 1988). Des attaques sélectives par le radical hydroxyl 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 Tortolani, 1992).

#### **- agrégation**

Ce phénomène conduit à l'insolubilité des protéines, donc à la perte de toute activité. Il survient lors de la réaction de  $\text{OH}^\circ$  avec les résidus thiols conduisant à la formation de ponts disulfures intra- et inter-chaînes polypeptidiques.

Le malondialdéhyde, issu de la peroxydation lipidique, peut réagir avec les protéines membranaires en créant 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).

#### **-susceptibilité à la protéolyse**

Les protéines modifiées oxydativement activent les enzymes protéolytiques et deviennent elles-mêmes sensibles à la protéolyse. Un complexe protéolytique de 670 kDa, la macroxy protéinase (MPO), reconnaît et dégrade spécifiquement les protéines dénaturées oxydativement afin d'éviter leur accumulation et leur agrégation (Salo et coll., 1990). Ce processus fournit également des acides aminés pour la synthèse *de novo* de nouvelles protéines.

### **IV.3 Altérations de l'ADN**

Les acides ribo- et déoxyribonucléiques sont des cibles pour les E.A.O. Chez les bactéries, l'anion superoxyde intracellulaire peut oxyder une famille de protéines contenant un centre fer-soufre au niveau du site actif entraînant un relargage du  $\text{Fe}^{2+}$  (Kuo et coll., 1987; Gardner, 1991; Gardner et Fridovich, 1991; Liochev et Fridovich, 1992; Flint et coll., 1992; 1993). Ce  $\text{Fe}^{2+}$  libre va réagir avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour donner  $\text{OH}^\circ$  selon la réaction de Fenton. Ce puissant oxydant pourra alors attaquer les molécules d'ADN. Les altérations de l'ADN qui en découlent consistent en des

cassures des mono ou doubles brins, en échanges de chromatides soeurs, en pontages entre molécules d'ADN ou ADN-protéines et en des modifications de bases (Teebor et coll., 1988). En effet, l'oxydation des bases nucléiques, en particulier la thymine et la guanine, peut produire la thymine glycol et le 8-hydroxyguanine qui seront éliminés ultérieurement dans les urines (Richter et coll., 1988). Toutes ces altérations perturbent le fonctionnement de la cellule, au niveau de la réplication, de la transcription et de la traduction conduisant à des mutations, au vieillissement ou à la mort de la cellule.

#### **IV.4 Action sur d'autres molécules biologiques**

Les sucres, l'adrénaline, la riboflavine, les quinones sont également sensibles à l'action des E.A.O. Les polysaccharides, comme l'acide hyaluronique, peuvent être dépolymérisés par les oxydants.

### **V. LE SYSTEME ANTIOXYDANT**

Le système antioxydant protège les tissus contre les effets des radicaux libres. Il est composé de trois groupes principaux d'antioxydants:

-**les piègeurs de radicaux** qui empêchent les réactions en chaîne. Parmi les exemples, on peut citer la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), le  $\beta$ -carotène, l'acide urique, la bilirubine et l'albumine;

-**le système enzymatique antioxydant** qui agit en empêchant la formation de nouvelles espèces de radicaux libres soit par la conversion de ces radicaux en molécules moins nocives avant qu'ils aient pu réagir, soit en empêchant la naissance de radicaux libres à partir d'autres molécules.

- la superoxyde dismutase (SOD) convertit  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ ;

- la glutathion peroxydase (GPx) convertit  $H_2O_2$  en molécules inoffensives;

- la catalase convertit  $H_2O_2$  en eau;

- les protéines fixant le fer (ferritine ou ceruléoplasmine) limitent la disponibilité du  $Fe^{2+}$  nécessaire à la formation du radical  $OH^{\cdot}$ ;

-**le système de réparation** comprend les enzymes réparatrices de l'ADN, mais également la phospholipase A2 activée lors de la lipoperoxydation, qui clive les chaînes peroxydées, les complexes protéolytiques qui dégradent les protéines altérées oxydativement et la méthionine

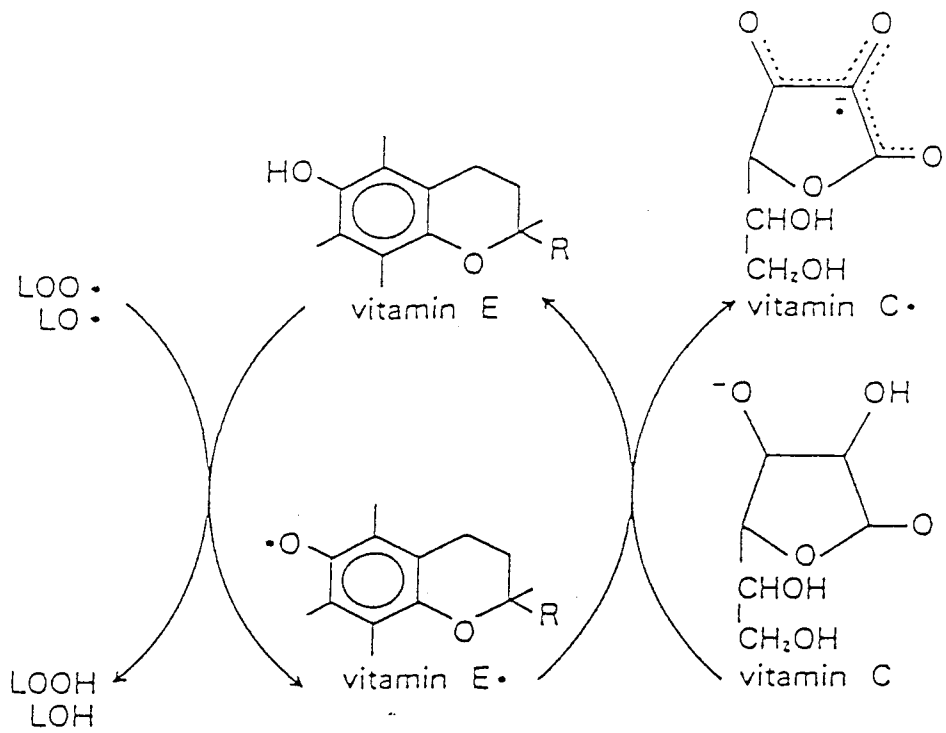


Fig 7: Protection de la vitamine E contre la lipoperoxydation, régénération de la vitamine E par la vitamine C. (Nakazawa et coll., 1996).



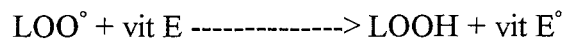
sulfoxyde réductase.

Dans ce paragraphe, nous n'aborderons pas les systèmes de réparation.

### V.1 Les piègeurs de radicaux

- La vitamine E, l'ubiquinone et le  $\beta$ -carotène

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est une molécule hydrophobe, liposoluble, qui est localisée à l'intérieur des membranes (une molécule de vitamine E toutes les 2100 molécules de phospholipides dans la membrane mitochondriale) et dans les lipoprotéines du sang (Wasserman et Murray, 1979). La vitamine E protège contre la lipoperoxydation en interrompant la réaction en chaîne de propagation. Cette molécule réagit avec les radicaux peroxy et alkoxy en leur donnant un atome d'hydrogène. Durant ces réactions, la vitamine E est convertie en un radical tocophéryl (vit E $^{\circ}$ ) qui reste énergétiquement stable.



Le radical tocophéryl est ensuite réduit par l'acide ascorbique (Fig.7).

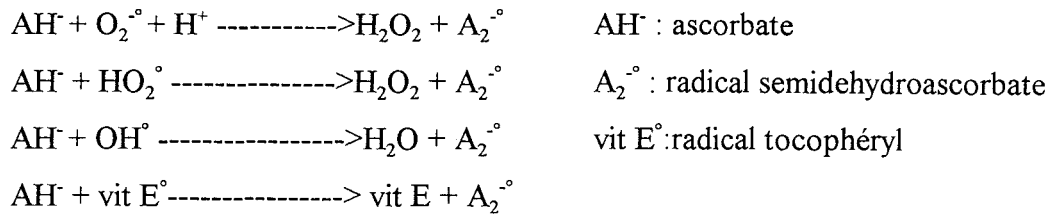
La vitamine E est également capable d'inhiber l'activité 5-lipoxygénase et donc de réduire la formation de leucotriènes.

L'ubiquinone est une autre molécule située à l'intérieur de certaines membranes, en particulier dans la membrane interne mitochondriale. Son activité antioxydante provient de sa capacité à interrompre la réaction de propagation de la lipoperoxydation, en donnant des atomes d'hydrogènes à LOO $^{\circ}$  et LO $^{\circ}$  (Frei et coll., 1990).

Le  $\beta$ -carotène est une provitamine A qui est dans la cellule associée à un complexe protéique membranaire. Il intervient dans le piègeage de l'oxygène singulet (Foote et Denny, 1968).

- L'acide ascorbique, le glutathion, l'acide urique et la bilirubine

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble localisée dans le cytosol et le plasma. Elle présente des propriétés antioxydantes par son aptitude à piéger l'O $_2^{\circ}$ , HO $_2^{\circ}$ , et OH $^{\circ}$  (Turrens et coll., 1985) et à régénérer la vitamine E.



Lors de ces réactions, l'acide ascorbique est converti en radical semidehydroascorbate qui, par réaction de dismutation, donne de l'ascorbate et du dihydroascorbate ou qui est réduit en acide ascorbique avec consommation de GSH (Frei et coll., 1990). Il faut signaler qu'à côté de son rôle antioxydant, l'acide ascorbique, en présence d'ions cuivre ou fer, peut générer OH<sup>•</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le glutathion est un tripeptide, hydrosoluble, trouvé dans le cytosol et les mitochondries (Halliwell et Gutteridge, 1989). Il sert de cofacteur à de nombreuses enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la glutathion transférase ou la déhydroascorbate réductase. Il présente un effet tampon redox cellulaire et agit directement en piégeant les radicaux OH<sup>•</sup> et l'oxygène singulet.

L'acide urique et la bilirubine sont présents dans le plasma et représentent les produits terminaux du métabolisme des purines et de l'hémoglobine, respectivement. Tous les deux peuvent piéger O<sub>2</sub><sup>• -</sup> et OH<sup>•</sup> à des concentrations physiologiques (Ames et coll., 1981).

## V.2 Les protéines chélatant le fer et le cuivre

Ces deux métaux étant impliqués dans la production du radical hydroxyl lors de la réaction de Fenton, ils ne doivent pas être présents sous forme libre dans le milieu. Un certain nombre de protéines plasmatiques et cytoplasmiques ont donc pour rôle de les chélater et de les stocker.

### -La transferrine et la lactoferrine

La transferrine est une protéine de 75 kDa, essentiellement localisée dans l'espace interstitiel alors que la lactoferrine (88 kDa) est trouvée à la fois dans l'espace interstitiel et dans le cytosol. La lactoferrine peut être également excrétée à l'extérieur de la cellule ou sécrétée dans les vacuoles phagocytaires des neutrophiles activés. Ces protéines présentent une haute affinité pour le fer, ce qui leur confère une activité antioxydante. En effet, en chélatant le fer libre, elles empêchent la formation de OH<sup>•</sup> *via* la réaction de Fenton. Cependant, le fer peut être relargué lors de réactions inflammatoires ou lors d'une ischémie et promouvoir la génération de OH<sup>•</sup>. Ce

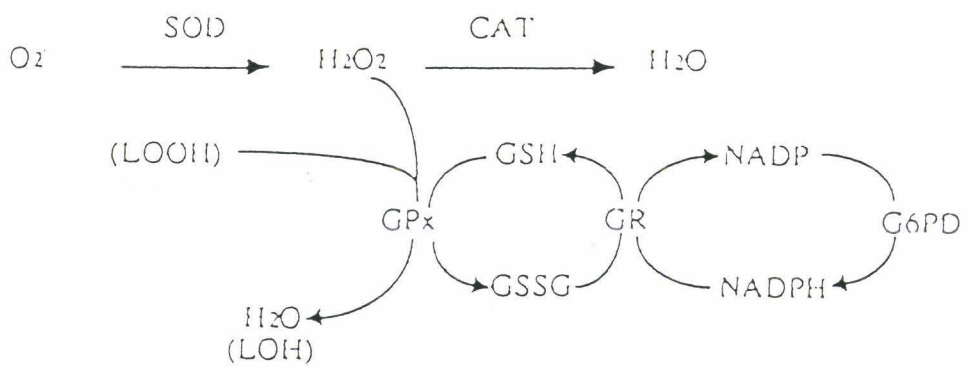


Fig 8: Enzymes impliquées dans la défense contre le choc oxydant

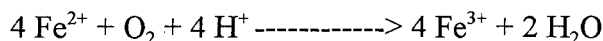
phénomène est provoqué par une diminution de l'affinité de ces protéines, à pH acide.

- La ferritine

La ferritine est une protéine cytosolique qui a pour fonction de stocker le fer. Elle peut fixer jusqu'à 4500 atomes de fer par molécule. Le  $Fe^{2+}$  est capté par la ferritine, mais le stockage de ce métal se fait sous la forme  $Fe^{3+}$ . Cette protéine protège le cytosol de la réaction de Fenton provoquée par le fer libre.

- La ceruloplasmine

C'est une glycoprotéine de 160 kDa qui peut fixer 6 à 7 atomes de cuivre par molécule. La ceruloplasmine est présente dans le plasma humain à des concentrations de 200-400 mg/l. Cette protéine protège de la lipoperoxydation dépendante du cuivre. Mais sa fonction antioxydante la plus importante est représentée par son activité ferroxidase, qui catalyse l'oxydation du  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  avec une réduction simultanée de l'oxygène en eau:



Cette réaction permet la fixation du fer sous forme  $Fe^{3+}$  à la transferrine ( la transferrine ne chélate que  $Fe^{3+}$ ).

La ceruloplasmine aurait également une activité SOD en dismutant les anions superoxyde (Goldstein et coll., 1979).

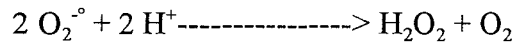
### V.3 Les enzymes antioxydantes (Fig.8)

La superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase constituent le système enzymatique antioxydant typique de nombreuses cellules.

- La superoxyde dismutase (SOD)

Cette métalloenzyme a pour fonction d'accélérer la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (McCord et coll., 1969)

### SOD



En absence de SOD, la vitesse de cette réaction est de  $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  à pH physiologique. Par contre, la vitesse augmente jusqu'à  $1,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , lorsque la réaction est catalysée par la SOD. Les SOD sont présentes dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes incluant les levures, les plantes et les animaux. Il existe trois types de SOD qui diffèrent par leur métal cofacteur (Cu/Zn, Mn ou Fe) et par leur localisation. Nous reviendrons en détail sur ces enzymes dans un chapitre ultérieur.

#### - La glutathion peroxydase (GPx)

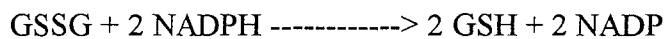
Cette enzyme intervient à la suite de la SOD pour éliminer le peroxyde d'hydrogène en présence de glutathion réduit (GSH):

#### GPx



Le retour du glutathion oxydé (GSSG) à l'état réduit est assuré par la glutathion réductase:

#### Glutathion Réductase



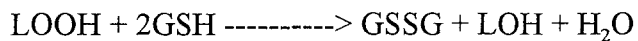
L'activité de la glutathion réductase est dépendante de la quantité de NADPH disponible. Dans la cellule, les enzymes participant de façon essentielle à la régénération du NADPH sont la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la glutamate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase. La GPx est efficace à de faibles concentrations en  $\text{H}_2\text{O}_2$  alors que la catalase n'est efficace qu'à des concentrations plus élevées. La GPx est distribuée dans le cytosol ainsi que dans la matrice mitochondriale (Flohe et Schlegel, 1971), ce qui la rend plus accessible à l'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , par rapport à la catalase qui est surtout localisée dans les peroxysomes. Elle est abondante dans le foie, alors que son activité dans le poumon, le coeur et le cerveau est plutôt modérée (Jones et coll., 1981). Les muscles squelettiques présentent une activité GPx faible.

La GPx est une enzyme de 84 kDa, constituée de quatre sous-unités, chacune d'elles contenant au niveau du site actif un atome de sélénium (Se) sous la forme de sélénocystéine. Cette sélénocystéine est codée par un codon UGA qui introduit généralement un codon stop, mais de par

la structure de l'ARN messenger, celui-ci sera reconnu par un ARN de transfert transportant la sélénocystéine (Chambers et Harrison, 1987).

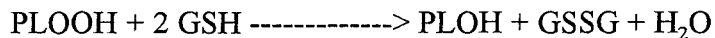
A côté de sa réaction avec le peroxyde d'hydrogène, la GPx peut détoxifier les hydroperoxydes d'acides gras (LOOH) provenant du clivage des phospholipides membranaires peroxydés par la phospholipase A2.

**GPx**



Un autre type de glutathion peroxydase, désigné sous le nom de phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) a été caractérisé comme une protéine séléno dépendante, monomérique (20kDa) associée aux membranes. Cette protéine diminue la lipoperoxydation membranaire en réduisant les hydroperoxydes phospholipidique sans intervention de la phospholipase A2 (Ursini et Bindoli, 1987). Elle réduit également l'hydroperoxyde de cholestérol associé aux membranes. La réaction générale est la suivante ( Krinsky, 1992) :

**PHGPx**

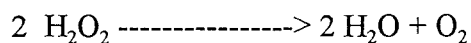


La glutathion-S-transférase (GST) n'exerce une réaction de peroxydation que sur les hydroperoxydes organiques et non sur  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette protéine sélénoindépendante est surtout localisée dans le cytosol mais également en quantité restreinte dans les membranes de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique. La glutathion transférase cytosolique présente deux sous-unités de masse moléculaire de 48 à 58 kDa, tandis que l'enzyme mitochondriale a une masse moléculaire de 15 kDa.

- La catalase

Cette enzyme peroxysomale décompose  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lorsqu'il est abondant (Deisseroth et Dounce, 1970):

**CAT**



La catalase est trouvée dans tous les organes majeurs. Elle est toutefois plus abondante dans le foie et l'érythrocyte. Son activité est faible dans le cerveau, le coeur, le poumon et les muscles squelettiques. Cette enzyme est un tétramère de 200 à 240 kDa, chaque sous-unité contient un groupement héminique dans le site actif, le fer étant sous forme ferrique.

## **VI. INDUCTION DE CERTAINS GENES EN REPOSE AU STRESS OXYDANT**

Cette régulation a été particulièrement bien étudiée chez les bactéries. En effet, lorsque ces dernières sont exposées à un choc oxydatif, plus de 80 protéines sont induites. A lui seul, le peroxyde d'hydrogène induit la transcription d'une trentaine de gènes, dont neuf d'entre eux sont sous la dépendance du facteur de transcription OxyR (Christman et coll., 1985). Parmi ceux ci figurent la catalase, la glutathion réductase et l'alkyl hydroperoxyde réductase (Demple, 1991; Lee et coll., 1993). En présence d'anion superoxyde, un autre régulon, appelé SoxRS, code l'expression d'environ 40 protéines, dont la SOD, une endonucléase et la glucose 6-phosphate déshydrogénase (Demple, 1991; Harris, 1992).

Chez les Eucaryotes supérieurs, certains stimuli entraînent un stress oxydant dans la cellule. Ils proviennent soit de la fixation des cytokines aux récepteurs de surface, soit de l'exposition à des drogues oxydantes ou à des radiations ionisantes. Les E.A.O agiraient comme second messager en transduisant un signal aux facteurs de transcription, qui en retour activent l'expression de certains gènes. C'est le cas de NF- $\kappa$ B qui peut être activé par la présence de radicaux oxygénés (Schreck et coll., 1992) et qui régule les gènes impliqués dans la réaction inflammatoire (Sies, 1993). Un autre facteur de transcription, AP-1 (homodimère de c-jun, ou hétérodimère de c-jun et c-fos), répond à une concentration d'E.A.O intracellulaire en induisant la transcription de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la défense contre le stress oxydant telles que la NAD(P) quinone réductase et la sous-unité de la glutathion-S-transférase (Meyer et coll, 1993; Rushmore et coll., 1991).

D'autre part, une diminution de la concentration extracellulaire d'oxygène (hypoxie) est contrebalancée par l'action d'une hormone, l'érythropoïétine qui stimule la production de globules rouges (Krantz, 1991). La transcription de cette hormone serait sous la dépendance d'un facteur de transcription HIF-1 qui est activé sous des conditions d'hypoxie (Wang et Semenz, 1993).

## **CHAPITRE III : LES SUPEROXYDE DISMUTASES**

Les superoxyde dismutases (SOD) sont des métalloprotéines ubiquitaires, capables de dismuter deux anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Trois types de SOD ont été mis en évidence et classés selon la nature du métal cofacteur présent dans le site actif : la SOD Cu/Zn décrite la première par McCord et Fridovich (1969), la SOD dépendante du manganèse (SOD-Mn) mise en évidence par Keele et coll. (1970) et la SOD dépendante du fer (SOD-Fe) caractérisée par Yost et Fridovich (1973).

Ces trois classes de SOD constituent deux groupes phylogénétiquement distincts: les SOD-Mn et les SOD-Fe qui sont structurellement proches et les SOD Cu/Zn, distinctes des deux précédentes. La distribution des SOD dans les différents organites et organismes indique que les SOD-Mn et les SOD-Fe proviendraient d'un gène ancestral commun, alors que les SOD Cu/Zn auraient évoluées indépendamment, ce qui explique les grandes différences de séquence et de structure entre les deux familles (Steinman, 1982).

### **I. LES SOD Cu/Zn.**

#### **I.1. Distribution chez les êtres vivants, localisation cellulaire**

Les SOD Cu/Zn sont les premières enzymes à avoir été caractérisées en tant que telles, dans l'érythrocyte de boeuf. Par la suite, elles ont été répertoriées chez de nombreux organismes eucaryotes animaux et végétaux et même chez les bactéries. Selon leur localisation, les SOD Cu/Zn peuvent être dimériques ou tétramériques.

##### **-Procaryotes**

Les SOD Cu/Zn considérées jusqu'à une date récente comme très inhabituelles chez les bactéries, ont été découvertes dans l'espace périplasmique, de nombreuses espèces Gram-négatives (Steinman, 1985; 1987; Bricker et coll. 1990; Steinman et Ely, 1990; Kroll et al., 1991, Stabel et coll., 1994; Benov et Fridovich, 1994; Benov et coll., 1995; Langford et coll., 1996).



### -Eucaryotes animaux

Chez les eucaryotes animaux, les SOD Cu/Zn dimériques sont surtout cytoplasmiques, mais elles peuvent être également trouvées dans le noyau (Slot et coll., 1986; Chang et coll., 1988; Dhaunsi et coll., 1992), dans les mitochondries au niveau de la membrane externe (Chang et coll., 1988; Dhaunsi et coll., 1992), dans les lysosomes (Geller et Winge, 1982) et les peroxysomes (Chang et coll., 1988; Dhaunsi et coll., 1992). Chez les mammifères, une SOD Cu/Zn tétramérique a été découverte dans le milieu extracellulaire comme le plasma, la lymphe et le liquide synovial (Fridovich, 1995; Marklund, 1982, 1984).

Chez les protozoaires, la majorité des SOD caractérisées sont dépendantes du fer, à l'exception de *Leishmania donovani* (Dey et Datta, 1994) et *Tetrahymena pyriformis* (Favero et coll., 1992) où une activité SOD Cu/Zn dépendante a été également mise en évidence. La SOD Cu/Zn de *L. donovani* serait localisée dans les glycosomes, organites où ont lieu la  $\beta$ -oxydation des acides gras et la biosynthèse des pyrimidines.

### -Eucaryotes végétaux

Chez les plantes vertes, des isoenzymes distinctes ont été détectées dans les chloroplastes, le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes et même dans l'espace extracellulaires (Bannister et coll., 1987; Sandalio et del Rio, 1987, 1988; Streller et Wingsle, 1994). Par ailleurs, la présence d'une SOD Cu/Zn a été également mise en évidence chez des organismes unicellulaires tels que les levures (Goscin et Fridovich, 1972; Misra et Fridovich, 1972a; Henry et coll., 1980; Chary et coll., 1990) et une algue verte (Kanematsu et Asada, 1989). Deux formes de SOD Cu/Zn, cytosolique et extracellulaire, ont été découvertes chez des champignons pathogènes (Holdom et coll., 1995, 1996).

## I.2 Caractéristiques des SOD Cu/Zn

### I.2.1 Caractéristiques biochimiques (Tableau 2, fin du chapitre)

La purification de la SOD Cu/Zn périplasmique d'*E. coli* montre que cette enzyme est active sous forme monomérique (Battistoni et Rotilio, 1995; Battistoni et coll., 1996). Son activité catalytique est comparable à celle des SOD dimériques eucaryotiques, indiquant que la structure dimérique n'est pas essentielle pour assurer la fonction catalytique (Battistoni et Rotilio, 1995).

En règle générale, les enzymes cytosoliques purifiées chez différentes espèces sont des protéines homodimériques, non glycosylées, dont la masse moléculaire varie de 32 kDa à 36kDa. Les deux sous-unités sont associées par des liaisons non covalentes et ont un poids moléculaire de 15 à 17 kDa. Chaque site actif contient un atome de cuivre et un atome de zinc, excepté chez *Citrullus vulgaris* où seulement un atome de cuivre et un atome de zinc sont présents par mole d'enzyme dimérique (Palma et coll., 1996).

Il existe une forme extracellulaire, présente dans le plasma des mammifères, qui est une enzyme tétramérique, N- glycosylée, de masse moléculaire de 135 kDa à 155 kDa, constituée de quatre sous-unités identiques liées de façon non covalente et possédant chacune un atome de cuivre et de zinc (Marklund, 1982). Cette protéine présente une séquence signal de 18 acides aminés hydrophobes, caractéristique des protéines sécrétées (Hjalmarsson et coll., 1987).

Chez les mammifères, les SOD Cu/Zn sont généralement des protéines acides dont le point isoélectrique ou pI est compris entre 4 et 6. Chez le rat et la souris, il existe plusieurs isoformes trouvées spécifiquement dans différents tissus (Fridovich, 1986). Ces isoformes peuvent résulter de modifications post-traductionnelles (Fridovich, 1986) ou de l'oxydation de certains acides aminés (Sharonov et Churilova, 1992).

Les SOD Cu/Zn sont généralement très stables en présence de solvants, tels le chloroforme ou l'acétone (Fridovich, 1986), qui peuvent être utilisés pour la purification de ces enzymes (Mc Cord et Fridovich, 1969). De plus leur activité subsiste en présence d'urée 8 M ou de détergents, tels le SDS à 2% (Fridovich, 1986) ou le lubrol à 0,1% (Mailer et Maestro, 1991).

Le spectre d'absorption des SOD Cu/Zn de couleur bleu-vert présente un pic à 258 nm dans l'ultraviolet, caractéristique de ces protéines qui ne possèdent pas de tryptophane et peu de tyrosines (Mc Cord et Fridovich, 1969; Keele et coll., 1971; Sawada et coll., 1972; Misra et Fridovich, 1972a). Elles montrent une absorbance dans le spectre visible aux alentours de 670 nm, provoquée par la présence du groupe prosthétique cuivre.

### I.2.2 Action des inhibiteurs

Il existe des inhibiteurs tels que le cyanure, le peroxyde d'hydrogène et l'azide qui permettent de distinguer les trois types de SOD.

Les SOD Cu/Zn sont inhibées de façon réversible par le cyanure (Rotilio et coll., 1972).

L'azide est également un inhibiteur réversible, mais non spécifique puisque les trois types

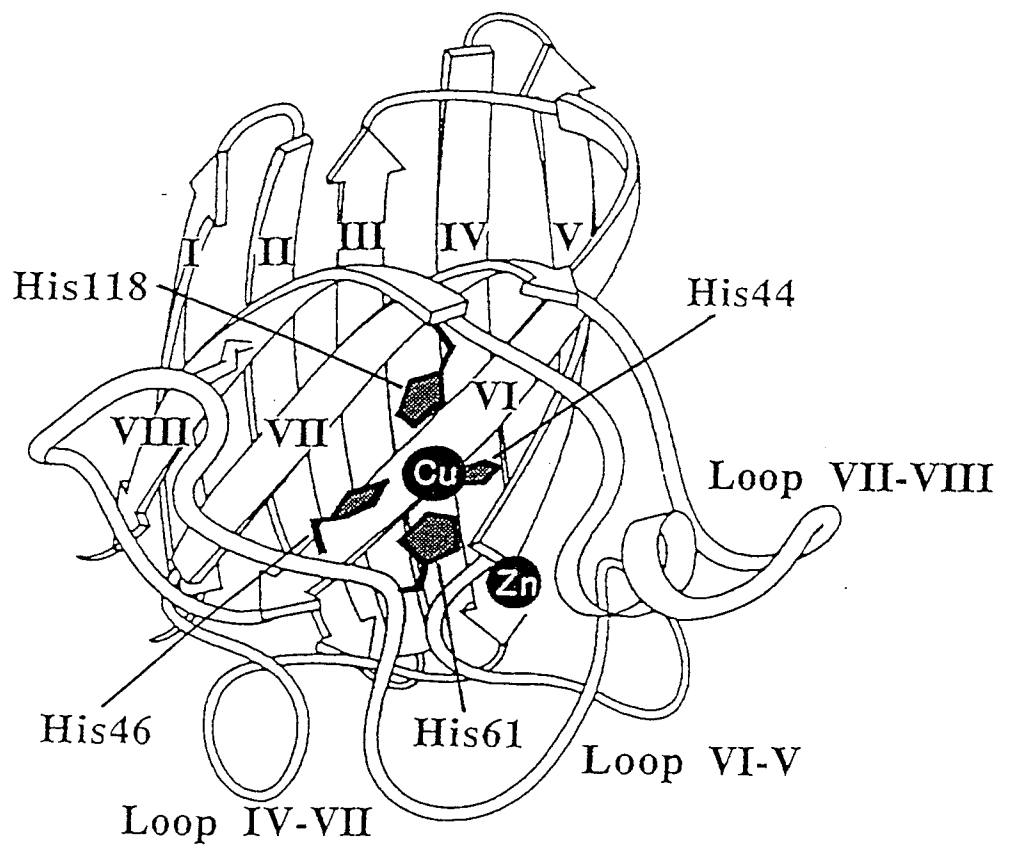


Fig 9: Représentation de la structure tridimensionnelle de la sous-unité de la SOD Cu/Zn bovine sous la forme oxydée. (Dong et coll., 1995)

de SOD sont inactivés à des degrés divers (CI 50 respectives de 30 mM, 4 mM et 20 mM pour les SOD Cu/Zn, Fe et Mn) (Misra et Fridovich, 1978).

Le peroxyde d'hydrogène inactive irréversiblement la SOD Cu/Zn à pH alcalin. L'inactivation de la SOD Cu/Zn bovine (Bray et coll., 1974) et de levure serait due à la complexation de l'anion peroxyde d'hydrogène ( $\text{HO}_2^-$ ) à l'ion cuivre, suivie de la modification d'un résidu histidine par sous-unité de la protéine dimérique.

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

### I.2.3 Considérations structurales

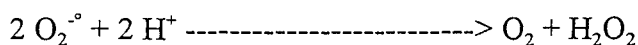
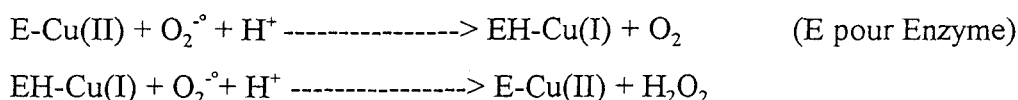
Malgré des localisations et des structures quaternaires différentes, les SOD Cu/Zn constituent une famille à part entière, car elles présentent de fortes homologues de séquences protéiques entre monomères et des similitudes structurales. En effet, les études en cristallographie et les alignements de séquences des SOD ont montré la présence d'un canal allant jusqu'au site actif, où l'arginine 141 conservée dans toutes les SOD Cu/Zn, guiderait le substrat vers le site catalytique  $\text{Cu}^{2+}$ , en stabilisant la liaison de l'anion superoxyde (Getzoff et coll., 1983). Un unique pont disulfure intrachaîne, formé par deux résidus cystéines invariants en position 55 et 144, a été mis en évidence. Cette liaison covalente est supposée contribuer à la stabilité de la structure tertiaire des SOD.

Les analyses des structures de cristaux de SOD Cu/Zn oxydée de boeuf (Tainer et coll., 1982), d'épinard (Kitagawa et coll., 1991), de levure (Djinovic et coll., 1992a), humaine (Parge et coll., 1992), et de Xénopé (Djinovic-Carugo et coll., 1996), ainsi que de la SOD Cu/Co bovine semi-synthétique (Djinovic et coll., 1992b) et la forme réduite provenant de la même source (Rypniewski et coll., 1995), démontrent que toutes ces enzymes eucaryotiques possèdent une structure tridimensionnelle très proche, basée sur la présence de 8 feuillets  $\beta$ -antiparallèles qui forment un cylindre aplati, plus trois boucles externes (**Fig.9**). Dans le site actif, l'ion cuivre est coordonné par quatre résidus histidine (positions 44, 46, 61, 118 pour la SOD Cu/Zn de foie de boeuf) et par une molécule d'eau, dans une géométrie représentant un carré déformé, où l'ion cuivre est coplanaire avec les atomes des ligands. Un des résidus histidine (His 61) forme une liaison à la fois avec le cuivre et avec le zinc. La coordination du zinc est complétée par deux autres

résidus histidine (positions 69, 78) et un résidu aspartate (position 81) dans une géométrie formant un tétraèdre.

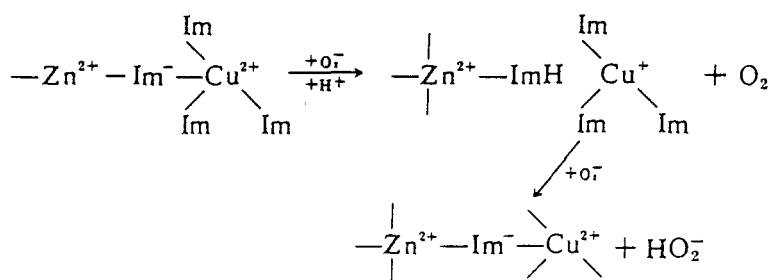
### I.2.4 Activité catalytique

Le mécanisme enzymatique de la SOD Cu/Zn a été déterminé par radiolyse pulsée (Rotilio et coll., 1972). L'activité catalytique de la SOD Cu/Zn résulte d'une réduction, suivie d'une oxydation, de l'ion cuivre présent dans le site actif:



Pendant la réaction catalytique, la liaison entre l'histidine 61 et l'ion cuivre serait rompue puis rétablie au cours de la réduction et l'oxydation successive de l'ion cuivrique par  $\text{O}_2^{\circ-}$ . Par sa nature basique, le noyau imidazole de l'His 61 serait capable de soustraire un proton provenant d'une molécule de solvant pour ensuite le transférer au deuxième anion superoxyde lors de la seconde moitié de la réaction catalytique, formant ainsi le produit  $\text{HO}_2^-$ . Cet hydroperoxyde, libéré du site actif, capterait ensuite un proton en solution pour donner le peroxyde d'hydrogène.

Le mécanisme de cette réaction est illustré par le schéma suivant:



Ce mécanisme suggère un rôle catalytique du zinc qui est également lié à l'histidine 61 (Tainer et coll., 1983), en plus de son rôle structural déjà proposé (Valentine et Pantoliano, 1981). En effet, dans la première phase de la réaction il stabiliserait l'enzyme, tandis que dans la seconde phase, son rôle serait d'assurer la protonation de l'His 61 et le transfert de ce proton au second

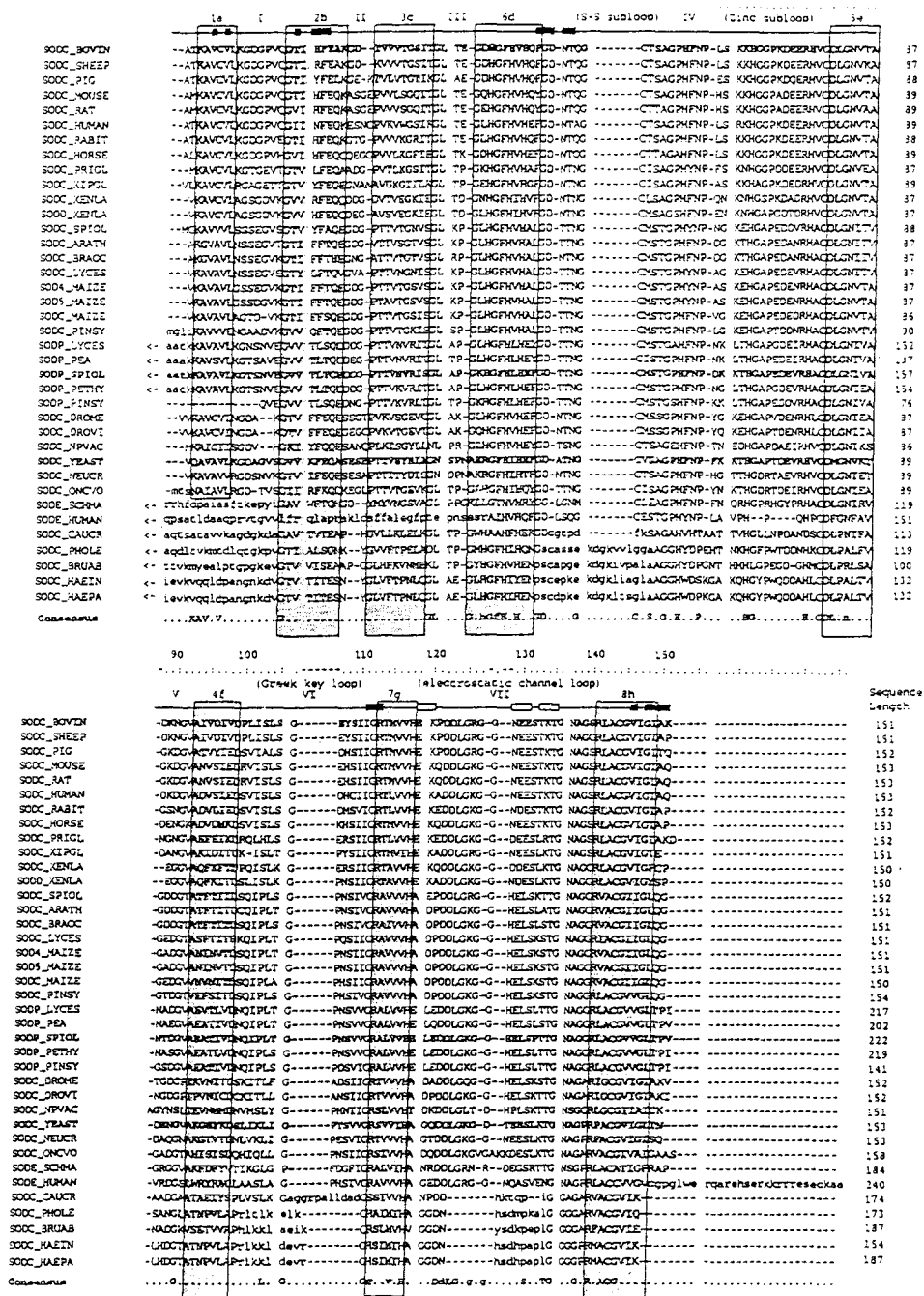


Fig 10: Alignement de 38 séquences de SOD Cu/Zn. La SOD Cu/Zn bovine a servi de référence pour aligner les autres séquences. Les régions représentant les brins  $\beta$  sont ombrées. Les extensions N-terminales sont représentées par le symbole -. (Bordo et coll., 1994).

O<sub>2</sub><sup>•</sup>. Le Zn augmenterait l'activité enzymatique sans être essentiel. La rupture de la liaison entre His 61 et l'atome de cuivre lors de la réaction catalytique a été très discutée (Banci et coll., 1994; Rypniewski et coll., 1995). De récents travaux ont confirmé cette hypothèse (Murphy et coll., 1997).

D'autre part, la vitesse de réaction serait limitée par la diffusion de l'anion superoxyde jusqu'au site actif (Fielden et coll., 1974; Cudd et Fridovich, 1982; Argese et coll., 1987). Pour ce type de SOD, la rencontre de l'anion superoxyde avec l'ion cuivre est limitante. Ceci est en accord avec le fait qu'aucune saturation n'est observée à de fortes concentrations de substrats et avec l'hypothèse de la présence du canal électrostatique, chargé positivement, conduisant l'anion superoxyde au niveau du site actif (Koppenol et coll., 1981; Cudd et Fridovich, 1982; Argese et coll., 1987).

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

### I.2.5 Considérations phylogéniques

Bordo et ses collaborateurs (1994) ont sélectionné et aligné 38 séquences protéiques de SOD Cu/Zn. Parmi celles-ci, 33 représentent des séquences eucaryotes (deux séquences de SOD extracellulaires et cinq séquences de SOD chloroplastidiques), et cinq constituent des séquences bactériennes (**Fig.10**).

La longueur d'insertion ou de délétion observée dans les SOD cytoplasmiques n'excède pas deux acides aminés, confirmant la forte conservation de l'architecture protéique. De nombreuses régions sont conservées dans beaucoup de SOD Cu/Zn au niveau des acides aminés ligands, de l'interface entre les sous-unités et des résidus impliqués dans la formation du canal pour le substrat.

Dans la région du premier brin-β, les deux protéines extracellulaires eucaryotes (Hjalmarsson et coll., 1987; Simurda et coll., 1988) ne montrent pas de similitude significative avec les séquences des autres enzymes eucaryotes. Cette observation est basée sur le fait que les segments N-terminaux des protéines extracellulaires humaine et de nématode sont plus longs d'environ 45 et 10 acides aminés respectivement, correspondant aux séquences signal caractéristiques des protéines sécrétées.

Les cinq protéines bactériennes présentent une grande divergence évolutive par rapport aux

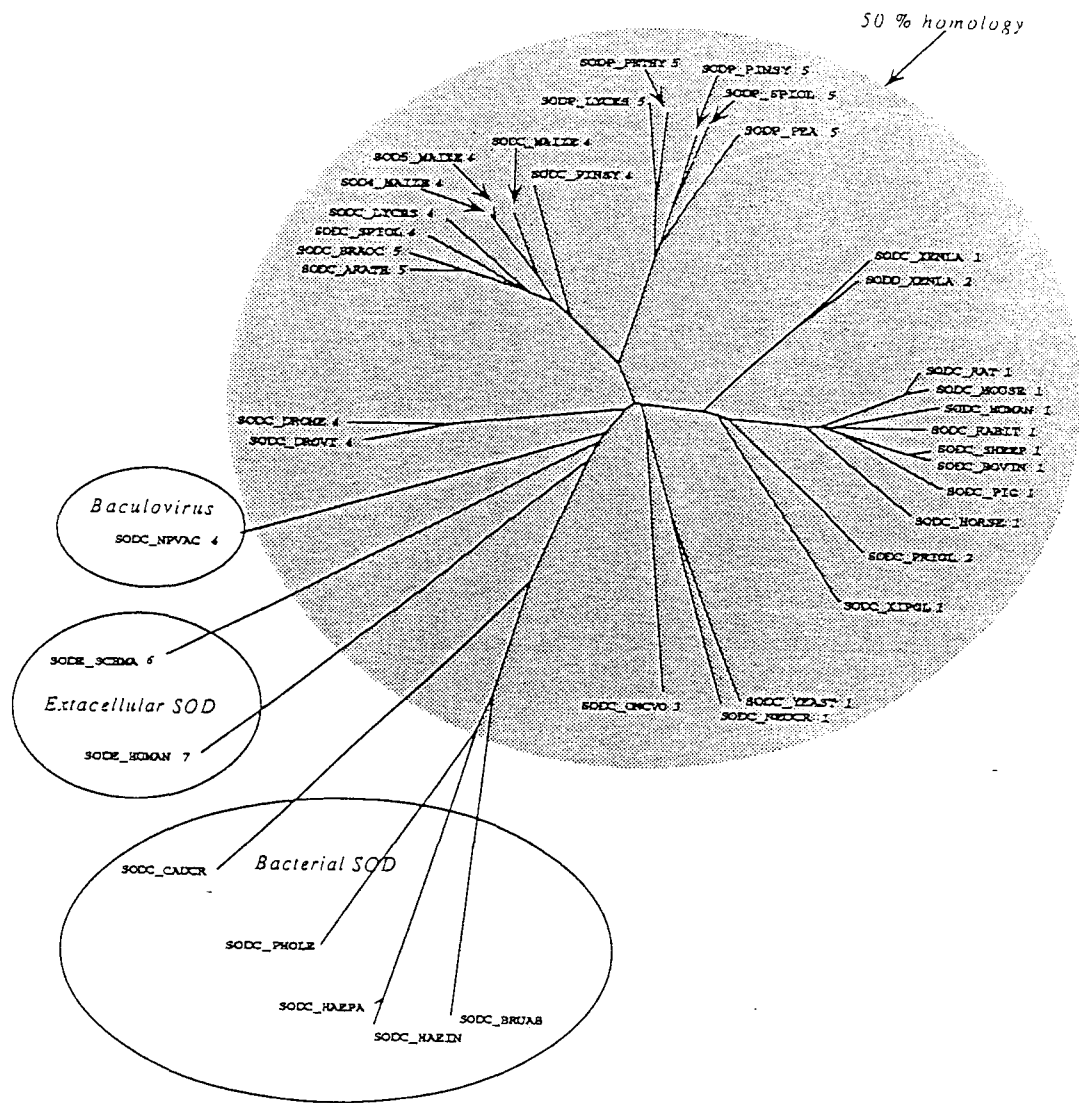


Fig 11: Arbre évolutif des SOD Cu/Zn. Les protéines partageant plus de 50% de résidus identiques sont incluses dans la zone ombrée. (Bordo et coll., 1994)



séquences eucaryotiques. Premièrement, il n'existe pas de similitude entre les parties N-terminales des protéines bactériennes et celles des SOD cytoplasmiques. Deuxièmement, les acides aminés impliqués dans les interactions de sous-unités ont subi des substitutions dans les protéines bactériennes par rapport aux séquences eucaryotiques, suggérant une agrégation différente des sous-unités. Troisièmement, la boucle VII qui forme le canal électrostatique du substrat et la boucle IV qui fournit la cystéine pour former l'unique pont disulfure intrachaîne, ont subi des modifications dans la longueur et le type d'acides aminés.

A partir des alignements de séquences, un arbre phylogénique a été réalisé (Bordo et coll., 1994), ne prenant pas en compte les régions qui présentaient un manque d'homologie, des insertions ou des délétions produisant ainsi des déviations structurales substantielles.

L'analyse de cet arbre (**Fig.11**) montre que les enzymes de mammifères, de poissons et d'amphibiens sont réunies en un seul groupe. Les SOD de plantes sont divisées en deux sous groupes, dû au fait de leur localisation cytoplasmique ou chloroplastique. Il semblerait que les SOD chloroplastiques dont une seule isoforme a été détectée, auraient moins divergées que les SOD cytoplasmiques (Palmer, 1985; Oseki et coll., 1989; Karpinski et coll., 1992 ).

Les SOD bactériennes auraient une origine commune qui serait survenue avant la différenciation phylogénique des procaryotes et des eucaryotes.

L'origine phylogénique des SOD extracellulaires serait primitive, ce type de SOD serait apparu avant la différenciation des champignons, des plantes et des métazoaires ou aurait subi un haut taux de mutations, provoquées par une adaptation à l'environnement extracellulaire.

## **II. LES SOD-Fe et -Mn**

Comme nous l'avons précisé au début du chapitre, les SOD-Fe et -Mn constituent un seul groupe phylogénique, car ces enzymes présentent une grande homologie de structures primaires et tridimensionnelles.

### **II.1 Distribution chez les êtres vivants, localisation cellulaire**

#### **- Procaryotes**

En général, les procaryotes contiennent la SOD-Fe , la SOD-Mn ou la combinaison des

deux enzymes. Les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives possèdent souvent une SOD-Mn et/ou une SOD-Fe alors que les bactéries anaérobies ont plutôt une SOD-Fe.

Les SOD dépendantes du fer ont été découvertes chez les Archea anaérobies strictes (Kirby et coll., 1981; Takao et coll., 1990, 1991), chez des bactéries anaérobies strictes (Hatchikian et Henry, 1977; Nakayama, 1994), chez des photobactéries marines (Puget et Michelson, 1974) et chez des cyanobactéries (Lumsden et Hall, 1974; Asada et coll., 1975; Cseke et coll., 1979; Stowers et Elkan, 1981; Caiola et coll., 1991; Canini et coll., 1992; Chadd et coll., 1996). Certaines Archea aérobies possèdent une SOD-Fe, comme *Thermoplasma acidophilum* (Searcy et Searcy, 1981), *Sulfolobus acidocaldarius* (Kardinahl et coll., 1996), ou une SOD-Mn comme *Halobacterium halobium* et *Halobacterium cutirubum* (Salin et coll., 1988; May et Dennis, 1989; Takao et coll., 1989).

Des études de substitution du métal cofacteur des SOD-Fe et Mn produites par plusieurs espèces de bactéries ont le plus souvent montré une spécificité stricte du métal cofacteur. Néanmoins, certaines bactéries comme *Propionibacterium shermanii* (Meier et coll., 1982), *Streptococcus mutans* (Martin et coll., 1986), des espèces de *Bacteroides* (Pennington et Gregory, 1986; Martin et coll., 1986; Amano et coll., 1990) possèdent une SOD dite "cambialistique" qui est capable de fixer le fer ou le manganèse dans le site actif, tout en conservant son activité, et ceci selon la disponibilité du métal dans le milieu. Les SOD cambialistiques ont été d'abord trouvées chez les bactéries anaérobies facultatives mais sont maintenant connues chez les bactéries méthylophiles aérobies telles que *Methylomonas sp.* (Matsumoto et coll., 1991) et chez *Mycobacterium smegmatis* (Yamakura et coll., 1995). Chez les espèces vivant en aérobiose, l'activité de la SOD-Fe est plus faible que celle de la SOD-Mn. Cependant chez *Mycobacterium smegmatis*, la SOD-Mn est prédominante à pH 7,8 mais à pH acide les deux types de SOD sont en même quantité.

Par contre, la croissance des bactéries en aérobiose est souvent associée avec l'induction d'une SOD-Mn. *Escherichia coli*, une bactérie anaérobie facultative, contient seulement une SOD-Fe quand elle croît dans des conditions anaérobies, alors qu'en présence d'oxygène, elle contient trois types de SOD : SOD-Fe, SOD-Mn et une SOD hybride qui est constituée d'une sous-unité de la SOD-Fe et d'une sous-unité de SOD-Mn (Dougherty et coll., 1978).

ESPECE	METAL	PM	sU	pI	CN.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	REF
<i>Entamoeba histolytica</i>	Fe	ND	ND	ND	ND	ND	Tannich (1991)
<i>Crithidia fasciculata</i>	Fe	43	2	5,0 - 5,2	-	+	Le Trant (1983)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Fe	35	2	4,8	-	+	Entrala (1996)
<i>Tritrichomonas foetus</i>	Fe	ND	ND	6,0 à 6,9	-	+	Kitchener (1984)
<i>Monocercomonas</i> sp.	Fe	38	2	ND	-	+	Lindmark (1974)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Ellis (1994)
<i>Leishmania tropica</i>	Fe	ND	ND	4,9	-	+	Meshnick (1981)
<i>Leishmania chagasi</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Ismail (1995)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Temperton (1996)
<i>Trypanosoma brucei</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Meshnick (1983)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Fe	85	4	7,0	-	+	Barra (1990)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Cu/Zn	ND	ND	ND	+	±	Favero (1992)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Fe	ND	ND	ND	-	+	Sibley (1986)
<i>Eimeria tenella</i>	Cu/Zn	ND	ND	ND	+	±	Michalski (1991)
	Mn	ND	ND	ND	-	-	Michalski (1991)
	Fe	ND	ND	ND	-	+	Michalski (1991)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Mn	ND	ND	6,8	-	-	Ranz (1989)
<i>Plasmodium berghei</i>	Fe	ND	ND	6,2-6,8	-	+	Becuwe (1993)
<i>Plasmodium vinckei</i>	Fe	ND	ND	6,2-6,8	-	+	Becuwe (1993)
<i>Plasmodium yoelii</i>	Fe	ND	ND	6,2-6,8	-	+	Becuwe (1993)
<i>Babesia hylomysci</i>	Fe	45-47	2	4,9-5,2	-	+	Becuwe (1994)
<i>Babesia divergens</i>	Fe	ND	ND	4,6	-	+	Becuwe (1992)

Tableau 1: SOD de protozoaires

### -Eucaryotes animaux

Les SOD-Fe sont caractéristiques des protozoaires libres ou parasites (**Tableau 1**). Par contre chez les animaux les plus évolués, on ne trouve pas de SOD dépendante du fer mais des SOD-Mn mitochondriales (Weisiger et Fridovich, 1973a; b) et des SOD Cu/Zn cytoplasmiques ou extracellulaires (voir chap I.1).

### - Eucaryotes végétaux

La première SOD-Fe découverte chez un eucaryote est celle d'une algue *Euglena gracilis* (Kanematsu et Asada, 1979). Depuis, cette SOD-Fe a été découverte chez plusieurs familles de plantes supérieures. Elle est surtout associée aux chloroplastes (Salin et Bridges, 1980; Kwiatowski et coll., 1985; Bowler et coll., 1992), mais elle est parfois trouvée dans les peroxyosomes (Droillard et Paulin, 1990) ou dans la fraction cytosolique (Becana et Salin., 1989).

Une SOD-Mn a été trouvée chez une algue rouge unicellulaire *Porphyridium cruentum* (Misra et Fridovich, 1977), et chez les levures (Misra et Fridovich, 1972a; Ravindranath et Fridovich, 1975; Henry et coll., 1980; Bjerrum, 1987; Tesfa-Selase et Hay, 1995). La SOD-Mn est également présente chez les plantes supérieures au niveau des mitochondries et des peroxyosomes (del Rio et coll., 1992).

## II.2 Caractéristiques des SOD-Fe et -Mn

### II.2.1 Caractéristiques biochimiques (**Tableau 2**, fin du chapitre)

Les SOD-Fe et -Mn des eubactéries et des protistes sont en général des enzymes homodimériques de masse moléculaire comprise entre 37,5 kDa et 45k Da, mais certaines SOD-Fe (Searcy et Searcy, 1981; Kirby et coll., 1981; Takao et coll., 1991) et SOD- Mn (Sato et Harris, 1977; Sato et coll., 1987) existent sous forme tétramérique. Chez les eucaryotes, les SOD-Mn mitochondriales ainsi que la SOD-Fe de *Tetrahymena pyriformis* (Barra et coll., 1990) sont tétramériques, de masse moléculaire d'environ 80 kDa. Dans l'enzyme native, les sous-unités ne sont pas reliées par un pont disulfure mais par des interactions ioniques. Toutes les SOD à fer décrites contiennent 1 à 2 atomes de fer par dimère, sous la forme de fer ferrique  $Fe^{3+}$  haut spin. La SOD-Mn de *E. coli* contient 0,6 à 0,9 atome de manganèse par sous-unité sous la forme  $Mn^{3+}$  (Beyer et coll., 1991) alors que la SOD-Mn tétramérique de *Thermus aquaticus* ne contient que

2 atomes de  $Mn^{3+}$  par protéine (Sato et Harris, 1977). Le point isoélectrique de ces enzymes varie de 4 à 8.

Les SOD-Fe et -Mn sont très sensibles aux détergents, elles sont inactivées par le SDS et par un traitement au chloroforme/éthanol (Weisiger et Fridovich, 1973b), exceptées la SOD-Mn de *Thermus aquaticus* (Sato et Harris, 1977) et la SOD-Fe de *Thermoplasma acidophilum* (Searcy et Searcy, 1981).

## II.2.2 Action des inhibiteurs

La SOD-Mn est résistante aux inhibiteurs tels que le cyanure et le peroxyde d'hydrogène. Par contre, la SOD-Fe reste active en présence de cyanure mais est rapidement inactivée de façon irréversible en présence de peroxyde d'hydrogène. L'inactivation de la SOD-Fe de *Pseudomonas ovalis* par le peroxyde d'hydrogène est accompagnée par la modification de 1 à 2 résidus tryptophane, 1 résidu histidine et 1 résidu cystéine par sous-unité (Yamakura, 1984; Yamakura et Suzuki, 1986) alors que l'inactivation de la SOD-Fe de *E.coli* entraîne essentiellement la perte de résidus tryptophane et le relargage du fer dans le milieu (Beyer et Fridovich, 1987). Dans tous les cas, le fer présent dans le site actif joue un rôle critique dans ce processus d'inactivation (Yamakura et Suzuki, 1986; Beyer et Fridovich, 1987). Il a été proposé que  $H_2O_2$  réduit d'abord  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  au niveau du site actif. Le  $Fe^{2+}$  réagirait ensuite avec  $H_2O_2$  selon un processus proche de celui de la réaction de Fenton produisant un oxydant potentiel. Cet oxydant généré au niveau du centre actif prend un électron provenant d'un des ligands histidine, qui en retour capte un électron d'un des résidus tryptophane situés aux alentours du site actif. L'effet net résultant est l'oxydation de résidus tryptophane plutôt que de l'histidine (Beyer et coll., 1991).

L'étude de la SOD cambialistique de *Propionibacterium shermanii* montre que la protéine reste très résistante même à de fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène, malgré la présence de fer dans le site actif (Meier et coll., 1994). L'hypothèse concernant ce phénomène sera examinée plus loin.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'azide inhibe plus fortement les SOD-Fe que les SOD-Mn, ce qui peut permettre également de les distinguer. Cette différence de sensibilité semble dépendre du groupe métallique prosthétique sur lequel l'azide peut se lier de façon réversible, supprimant ainsi l'activité catalytique (Misra et Fridovich, 1978).

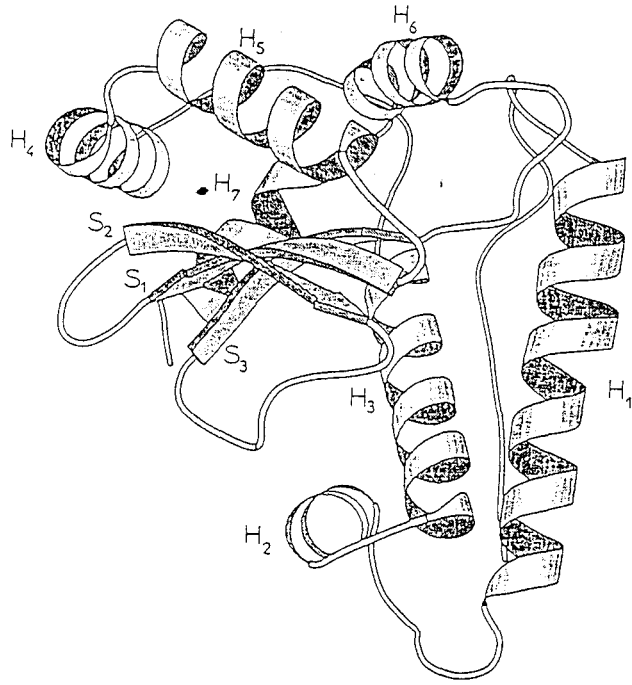
### II.2.3 Considérations structurales des SOD-Fe et SOD-Mn

Les structures obtenues par cristallographie aux rayons X sont maintenant disponibles pour un certain nombre de SOD tels la SOD-Mn mitochondriale humaine (Borgstahl et coll., 1992; Wagner et coll., 1993), la SOD-Mn de *Bacillus stearothermophilus* (Parker et Blake, 1988), la SOD-Fe de *Escherichia coli* (Stallings et coll., 1983), la SOD-Fe de *Pseudomonas ovalis* (Stoddard et coll., 1990), la SOD-Mn de *Thermus thermophilus* (Ludwig et coll., 1991) et de *Mycobacterium tuberculosis* (Cooper et coll., 1995). Toutes ces études ont confirmé que ces enzymes étaient proches d'un point de vue structural.

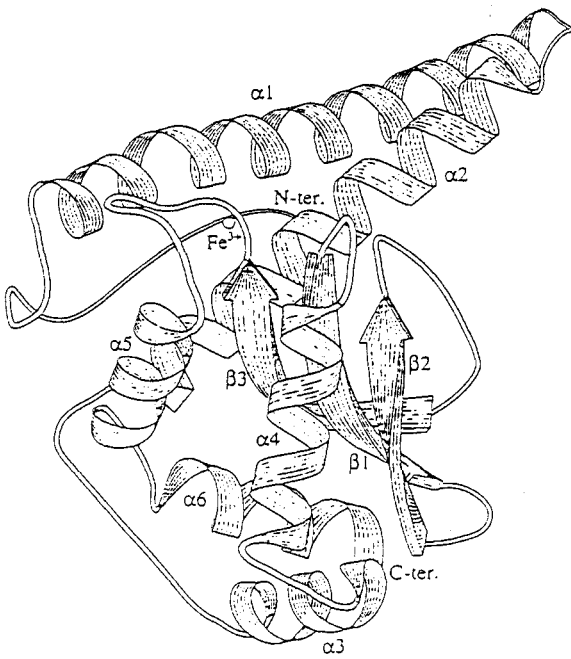
Au niveau du site actif, les résidus des SOD-Fe et -Mn sont très conservés, le métal est lié à trois noyaux imidazoles provenant d'histidines (His 26, His 74, His 160 chez la SOD-Fe de *E.coli*) et à un groupement carboxyl d'un résidu aspartate (Asp 156 chez la SOD-Fe de *E.coli*). Une molécule d'eau a été parfois mise en évidence comme cinquième ligand chez la SOD-Fe de *E.coli* et chez la SOD-Mn de *T.thermophilus* mais pas chez la SOD-Mn de *B.stearothermophilus* (Parker et Blake, 1988; Carlioz et coll., 1988). La géométrie formée par la coordination du métal avec ses ligands est décrite comme une bipyramide trigonale (Stallings et coll., 1985, Carlioz et coll., 1988) ou une pyramide trigonale (Parker et Blake, 1988).

Au niveau structural, les sous-unités des SOD-Fe et -Mn présentent deux domaines dans lesquels le domaine N-terminal contient surtout des hélices- $\alpha$  tandis que la partie C-terminale est composée d'hélices- $\alpha$  et de feuillets- $\beta$  (**Fig.12A**). Le site de fixation du métal se trouve entre ces deux régions. Les principaux contacts monomère-monomère sont réalisés par des résidus situés à l'extrémité du troisième feuillet- $\beta$  et par des résidus de l'hélice- $\alpha$ 1. Les résidus proches du site actif dans l'une des sous-unités interagissent avec les résidus ligands de l'autre monomère maintenant les ions métalliques à une distance approximative de 18 angströms. Par ailleurs, la dimérisation de la protéine génère la formation d'un tunnel rendant accessibles aux ions métalliques les solvants. Au sommet du tunnel, les résidus His30 et Tyr34 de la SOD-Fe de *E.coli* bloquent l'accès au métal. L'élimination de la Tyr34 permet l'accès du substrat au métal suggérant que le cycle aromatique peut pivoter pour permettre le passage au niveau de la sphère interne des ligands (Sines et coll., 1990).

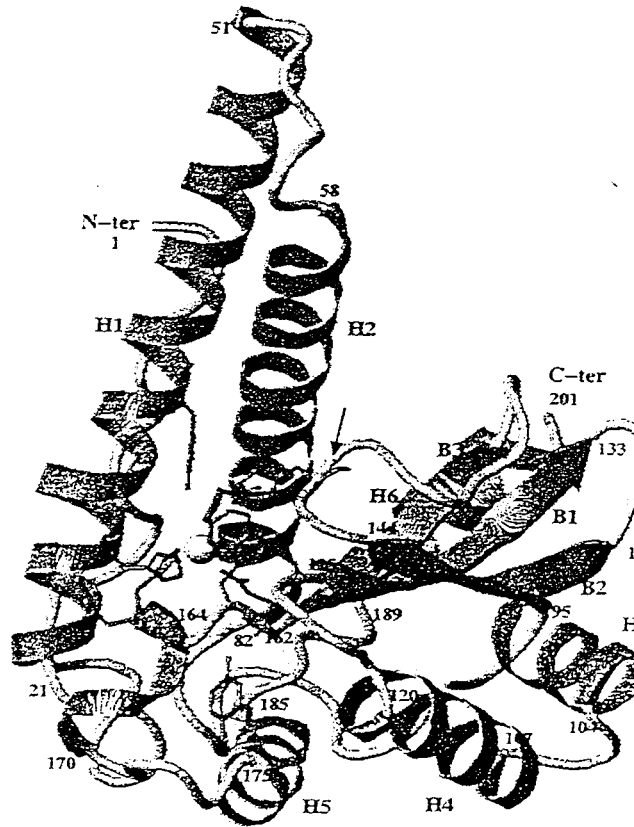
La structure de la SOD de *Mycobacterium tuberculosis* (Cooper et coll., 1995) a permis d'établir la présence d'interactions extensives dimère-dimère, impliquant une épingle à cheveux hélicoïdale située dans le domaine N-terminal et une boucle (résidus 144-152) qui interagit avec les



A



B



C

Fig 12 : Représentation de la structure tridimensionnelle d'une sous-unité :

A: de la SOD-Fe dimérique de *E. coli* (Viscogliosi et coll., soumis)

B: de la SOD-Fe tétramérique de *Mycobacterium tuberculosis* (Cooper et coll., 1996)

C: de la SOD cambialistique de *Propionibacterium shermanii* (Schmidt et coll., 1996)

trois feuillets- $\beta$  situés dans le domaine C-terminal (**Fig.12B**).

La première étude en cristallographie d'une SOD cambialistique (Schmidt et coll., 1996) a montré que la structure de cette enzyme est comparable aux SOD-Fe et Mn classiques. Aucune différence n'est observée entre les SOD classiques et la SOD cambialistique dans les résidus formant la première sphère de coordination du métal. Par contre, dans la deuxième sphère de coordination, des différences sont visibles entre les SOD-Fe et Mn spécifiques du métal cofacteur. La structure de la SOD de *P.shermanii* montre un ensemble de résidus caractéristiques des SOD-Mn et des SOD-Fe, ce qui pourrait être une des raisons pour lesquelles cette SOD est active avec le fer ou le Mn. Néanmoins, toutes ces différences ne donnent pas de véritables raisons pour expliquer le comportement cambialistique de cette enzyme (Schmidt et coll., 1996). Par ailleurs, les SOD cambialistiques utilisant le fer comme métal cofacteur sont toujours résistantes à de fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène. Meier et ses collaborateurs (1994) ont suggéré que le tryptophane 73 proche du ligand His 75 était responsable de l'inactivation des SOD-Fe par  $H_2O_2$ . Cet acide aminé est remplacé par un résidu aliphatique dans les SOD-Mn et les SOD cambialistiques. Cependant, dans certaines SOD-Fe sensibles à l' $H_2O_2$ , le tryptophane 73 est substitué par une phénylalanine ou une tyrosine (Viscogliosi et coll., soumis). Ce résidu est toujours remplacé par un acide aminé aromatique, ce qui peut expliquer que ces SOD-Fe restent toujours sensibles à l' $H_2O_2$ . Comme nous pouvons le constater sur la **Fig.12C**, la structure monomérique de la SOD cambialistique de *P.shermanii* est très proche de celle de *M.tuberculosis*. Ces deux SOD partageraient des régions caractéristiques impliquées dans la tétramérisation de ces enzymes.

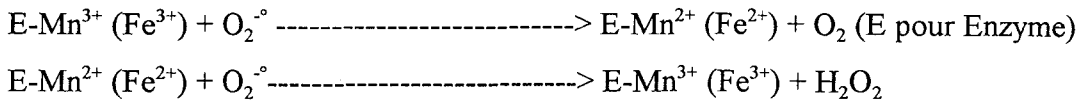
A l'heure actuelle, l'hypothèse émise pour expliquer la spécificité du métal cofacteur des SOD est encore assez floue. L'étude des séquences de SOD-Fe et Mn montre un nombre de résidus qui sont strictement conservés chez les enzymes ayant le même métal, mais différents entre les deux classes de SOD. Ces résidus conservés pour un type de SOD joueraient un rôle chimique, structural, ou dynamique dans la catalyse de la réaction et pourraient contribuer à la spécificité du métal de l'enzyme.

#### II.2.4 Activité catalytique

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







Les SOD-Fe et Mn présentent une forte homologie aussi bien au point de vue séquences en acides aminés que structurellement. Il semble donc que le mécanisme catalytique de ces deux classes d'enzymes soit semblable. Comme pour la SOD Cu/Zn, la première étape constitue la fixation de l'anion superoxyde au métal, suivie de phases intermédiaires impliquant une redistribution des électrons et des échanges de protons et la dernière phase étant la libération des produits finaux. Contrairement aux SOD Cu/Zn, l'activité des SOD-Fe et Mn diminue à pH alcalin, définissant une ionisation avec un pKa d'environ 9. Les études de la SOD-Fe de *E. coli* indiquent un rôle de la tyrosine en position 34 dans la conduction du proton. La réduction de cette enzyme est associée à l'entrée d'un proton par site actif, dans une gamme de pH compris entre 6 et 10. La Tyr 34 est totalement conservée, et l'hydroxyl phénolique est dirigé vers le centre métallique à seulement 5 angströms de celui-ci. De plus, le remplacement de H<sub>2</sub>O par D<sub>2</sub>O ralentit le processus catalytique et indique que la vitesse de transfert de protons est limitante.

## II.2.5 Considérations phylogéniques

Malgré leurs fortes homologies structurales et la présence de résidus très conservés, les SOD-Fe et SOD-Mn présentent des différences dans le microenvironnement de leur site actif, ce qui leur confère une spécificité du métal cofacteur (Isobe et coll., 1988). Ces deux types de SOD peuvent être distingués sur la base de plusieurs substitutions d'acides aminés, spécialement dans la proximité du second résidu ligand (Parker et Blake, 1988; Stoddard et coll., 1990). Plusieurs études basées sur les alignements de séquences connues et les structures tridimensionnelles des SOD-Fe et -Mn (Carlioz et coll., 1988; Chan et coll., 1990; Ludwig et coll., 1991) indiquent que des insertions et des variations sont limitées à quelques régions de la chaîne localisées entre les hélices H1 et H3, H3 et H4 et les feuillets-β S2 et S3. Ces régions sont variables entre les SOD-Mn, les SOD cambialistiques et les SOD-Fe, mais aussi parmi les SOD-Fe elles-mêmes (**Fig.13**). Entre les hélices H1 et H3, un insert de 7 résidus est présent dans les SOD-Mn. Cette insertion est absente dans les SOD-Fe, excepté dans celles des cyanobactéries et celles provenant des chloroplastes.

En ce qui concerne l'évolution des SOD, un arbre phylogénique a été construit à partir d'un

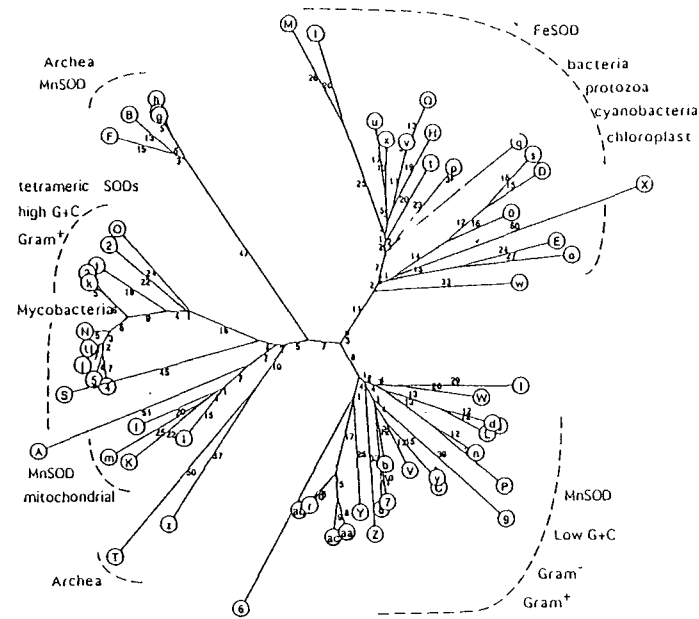


Fig 14 : Arbre phylogénique non enraciné montrant des relations entre les séquences peptidiques des SOD-Fe et Mn (D. Dive, E. Viscogliosi et D. Touati). L'arbre était construit en utilisant le programme "phylotree, unrooted, multialignment DARWIN". Les nombres indiquent la distance PAM (Gonnet 1992, 1994). Les séquences sont récupérées dans la banque de données. Le métal présent dans le site actif ainsi que le numéro d'accès sont indiqués entre parenthèses. (Camb) indique SOD cambialistique. (b) *Bacillus caldotenax* (Mn, S22053); (c) *Bacillus stearothermophilus* (Mn, A35134); (d) *Escherichia coli* (Mn, A24141); (e) *E. coli B* (Mn, DSECN); (f) *Bronchiostoma florida* (Mn, S23658); (g) *Halobacterium cutirubrum* (Mn, A34319); (h) *Halobacterium halobium* (Mn, DSHSNH); (i) human (Mn, S13162); (j) *Mycobacterium leprae* (Mn; S06599); (k) *Mycobacterium tuberculosis* (Fe, S10908); (l) *Thermus aquaticus* (Mn, S07147); (m) *Caenorhabditis elegans* (Mn, JS0750); (n) *Methylomonas* sp. (Camb, A38461); (o) *Porphyromonas gingivalis* (Camb, A43585); (p) *Coxellia burnettii* (Fe, A45552); (q) *Entamoeba histolytica* (Fe, A45552); (r) *Streptococcus mutans* (Camb, A42710); (s) *Arabidopsis thaliana* (Fe, B39267); (t) *Legionella pneumophila*, (Fe, JS0749); (u) *Photobacterium leiognathi* (Fe, A26707); (v) *Pseudomonas* sp. (Fe, S00157); (w) *Synechococcus* sp. (Fe, S04423); (x) *Escherichia coli* (Fe, A29940); (y) *Listeria monocytogenes* (Mn, JC1272); (z) *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Fe, S13271); (A) *Tetrahyena pyriformis* (Fe, A39223); (B) *Haloferax volcanii* (Mn, M97486); (C) *Listeria ivanovii* (Mn, X64011); (D) soja (Fe, M64267); (E) *Bacteroides fragilis* (Camb, M96560); (m) *Haloarcula marismortui* (Mn, M97485); (G) *Halobacterium* sp. (Mn, M97484); (H) *Bordetella pertussis* (Fe, X63055); (I) *Campylobacter coli* (Fe, X76693); (J) *Campylobacter jejuni* (Fe, U08132); (K) *Drosophila melanogaster* (Mn, L18947); (L) *Haemophilus influenzae* (Mn, X73832); (M) *Helicobacter pylori* (Fe, X72618); (N) *Nocardia asteroides* (Fe, U02341); (O) *Propionibacterium shermanii* (Camb, P80293); (P) *Pseudomonas aeruginosa* (Mn, L25672); (Q) *Pseudomonas aeruginosa* (Fe, L25675); (R) *Pseudomonas ovalis* (Mn); (S) *Saccharomyces cerevisiae* (Mn); (T) *Sulfolobus acidocaldarius* (Fe, S34616); (U) *Mycobacterium avium* (U11550); (V) *Bacillus circulans* (Mn, PN0614); (W) *Enterobacter aerogenes* (PN0615); (X) *Trichomonas vaginalis* (Fe, E. Viscogliosi); (Y) *Lactococcus lactis* (Mn, U17388); (Z) *Plectonema boryanum* (Mn, U17609); (0) *Chlamydomonas reinhardtii* (Fe, U22416); (1) *Actinomyces viscosus* (X81381); (2) *Corynebacterium diphtheriae* (X81382); (3) *Mycobacter xenopi* (X81391); (4) *Mycobacter phlei* (Z48211); (5) *Mycobacter chelonae* (Z48216); (6) *Clostridium perfringens* (Z49062); (7) *Enterococcus faecalis* (Z49243); (8) *Enterococcus faecium* (Z49244); (9) *Staphylococcus aureus* (Z49245); (aa) *Streptococcus pneumoniae* (Z49246); (ah) *Streptococcus pyogenes* (Z49247); (ac) *Streptococcus agalactiae* (Z49249).

alignement de séquences des SOD-Fe et Mn provenant de bactéries et d'eucaryotes, en utilisant le programme Darwin (Fig.14). Une première famille (I) comprend exclusivement des SOD à fer (protistes, bactéries, cyanobactéries, chloroplastes). Une deuxième famille (II) contient essentiellement les SOD à manganèse des bactéries à bas rapport G+C. Les Archea (III) forment deux petits groupes distincts mais proches. On retrouve ensuite, très proches l'une de l'autre, les SOD mitochondriales (essentiellement Mn, IV) et les SOD des bactéries primitives (à haut rapport G+C, V). On trouve à la fois des SOD à fer et à manganèse dans les familles III, IV et V. La SOD de *Tetrahymena pyriformis* est regroupée avec les SOD mitochondriales (SOD-Mn), alors qu'elle utilise le fer comme métal cofacteur. Ceci pourrait suggérer une conversion du métal cofacteur qui se serait effectuée durant l'évolution des SOD à fer et à manganèse (Smith et Doolittle, 1992).

Les SOD cambialistiques ne représentent pas un groupe intermédiaire comme l'avait suggéré Hassan (1989). En effet, les SOD de *Porphyromonas gingivalis* et de *Bacteroides fragilis* sont regroupées avec les SOD-Fe classiques (famille I), alors que les SOD de *S.mutans*, *Methylomonas sp.* font partie des SOD-Mn (famille II), la SOD de *P.shermanii* étant quant à elle, classée dans la famille V.

Par ailleurs, plusieurs études phylogéniques ont montré que la SOD-Fe du chloroplaste était d'origine bactérienne (Van Camp et coll., 1990; Smith et Doolittle, 1992). Le regroupement des SOD de *Plectonema*, de *Chlamydomonas* et d'*Arabidopsis* dans notre arbre va dans le même sens que cette hypothèse. Il a été également proposé que le gène des SOD-Mn mitochondriales n'avait pas été acquis comme un résultat d'endosymbiose (Smith et Doolittle, 1992). En effet, les SOD d' $\alpha$ -protéobactéries, qui sont les organismes les plus proches des endosymbiontes supposés être à l'origine des mitochondries, sont très distinctes (famille II) des SOD mitochondriales (famille IV).

L'arbre montré ci-contre montre en fait que la séparation entre les familles de Mn- et Fe-SOD s'effectue beaucoup plus nettement sur la base de la structure dimérique ou tétramérique de l'enzyme, que sur celle du métal cofacteur. Les familles I et II ne contiennent en effet que des SOD dimériques (à l'exception de *Thermus* dont la SOD tétramérique est classée dans la famille II). Les autres familles comprennent des SOD tétramériques. Dans ces conditions, la position apparemment paradoxale des SOD de *Tetrahymena* et de *Propionibacterium* est beaucoup plus cohérente. Des travaux sont encore actuellement en cours au laboratoire pour mieux comprendre la relation entre la structure des sous-unités des SOD et leur phylogénie.

En ce qui concerne les SOD de protistes pathogènes, qui sont groupées dans la famille I, une

TYPE DE SOD	PM (kDa)	STRUCTURE	pI	INHIBITEURS		
				CN <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NaN <sub>3</sub>
<b>SOD-Fe</b>						
(bactéries, protozoaires, plantes)	40-46	homodimère, 1 Fe /ss-unité	4-8	-	+	+
(bactéries, protozoaires)	80	hétérodimère, Fe,Mn	4-8	-	+	+
<b>SOD-Mn</b>						
(bactéries)	40-43	homodimère, 1 Mn / ss-unité	4-8	-	-	+
(bactéries, mitochondrie)	80	homotétramère, 1 Mn / ss-unité	4-8	-	-	+
<b>SOD-Cu/Zn</b>						
cytosolique	32-36	homodimère, 1 Cu + 1 Zn / ss-unité	4-6	+	+/-	+
extracellulaire	135	homotétramère, 1 Cu + 1 Zn / ss-unité	4-6	+	+/-	+
périplasmique	33	monomère ou homodimère 1 Cu + 1 Zn / ss-unité	4,8	+	+/-	+
<b>SOD-Ni</b>						
cytosolique	60	homotétramère, 1 Ni / ss-unité	4-8	+	+/-	+

Tableau 2: Caractéristiques générales des SOD.

étude récente montre que les SOD des trichomonadines, des kinétoplastidés, des apicomplexa et d'*Entamoeba* formeraient un groupe monophylétique (Viscogliosi et coll., communication personnelle).

### III. AUTRES TYPES DE SOD: SOD-Ni

Depuis peu, une SOD contenant du nickel a été purifiée à partir de fractions cytosoliques de *Streptomyces sp.*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* (Youn et coll., 1996 a,b). Cette enzyme est constituée de quatre sous-unités identiques de 13,4 kDa. Elle est stable à pH compris entre 4 et 8 et reste active jusqu'à 70°C. Elle présente une activité spécifique de 3030 U/mg de protéines. Comme la SOD Cu/Zn, elle est inhibée par le cyanure et le peroxyde d'hydrogène et faiblement affectée par l'azide. Les analyses en spectrométrie d'absorption atomique ont révélé que cette enzyme contenait 0,74 atome de nickel par sous-unité. La comparaison de séquences de l'extrémité N-terminale de cette enzyme avec celles de la SOD-Fe et de la SOD-Mn de *E.coli* et des SOD Cu/Zn de *S.cerevisiae* et de l'érythrocyte bovin montre que cette protéine est totalement différente. Ce nouveau type de SOD n'a été trouvé pour l'instant que chez les actinomycètes du genre *Streptomyces*. Le clonage du gène de cette SOD pourra nous apporter plus d'informations sur sa structure et son fonctionnement.

Un tableau récapitulatif des caractéristiques générales des SOD est donné ci-joint (**Tableau 2**).

### IV. IMPORTANCE DES SUPEROXYDES DISMUTASES

Tous les organismes aérobies ou aérotolérants possèdent au moins une superoxyde dismutase, ce qui laisse penser que cette enzyme répond effectivement à un impératif physiologique important. En effet, elle joue un rôle central dans la protection contre le stress oxydant, en dismutant deux anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en molécule d'oxygène.

La comparaison du taux de dismutation spontanée avec celui de la réaction enzymatique indique qu'à pH physiologique, les SOD augmentent le taux de dismutation de l'anion superoxyde d'environ 10000 fois.

## IV.1 Rôle des SOD

La présence de différentes SOD dans le même organisme peut s'expliquer par un besoin de cette enzyme dans différents compartiments cellulaires. Pour agir, la SOD doit être présente dans le compartiment cellulaire où l'anion superoxyde est généré. C'est le cas pour les mammifères qui possèdent une SOD Cu/Zn cytoplasmique, une SOD Cu/Zn extracellulaire et une SOD-Mn mitochondriale.

Chez plusieurs espèces de bactéries, y compris *E.coli*, l'existence de deux SOD présentes dans le cytoplasme, est assez intrigante. Au vu de leur expression, ces SOD auraient le même rôle mais n'agiraient pas au même moment. Chez *E.coli*, la SOD-Fe qui est constitutive assurerait la protection de base de la cellule alors que la SOD-Mn qui est multiinductible, permettrait à la bactérie de s'adapter à des changements environnementaux générant un stress oxydatif (Touati, 1997a). Au vu de leur localisation, elles ne protégeraient pas les mêmes cibles. La SOD-Fe localisée dans le cytosol et proche de la membrane interne serait plus susceptible de protéger les enzymes cytoplasmiques comportant des clusters fer-soufre comme l'aconitase alors que la SOD-Mn située au niveau de l'ADN serait plus apte à prévenir les lésions du matériel génétique (Steinman et coll., 1994).

Chez les bactéries anaérobies strictes et facultatives, la présence de SOD en anaérobiose semble assez surprenante. Pour certains auteurs, la SOD jouerait un autre rôle non suspecté pour l'instant, et qui ne dépendrait pas de la présence de l'oxygène. Mais l'idée la plus répandue est que la bactérie utilise cette enzyme pour faire face à un stress oxydant lors du passage du milieu anaérobie au milieu aérobie. En effet, la synthèse de la SOD-Fe en anaérobiose permettrait une transition vers la condition aérobie, laissant le temps à la bactérie de produire la SOD-Mn qui est inductible par l'anion superoxyde.

En ce qui concerne les SOD Cu/Zn périplasmiques des bactéries Gram<sup>-</sup>, leur rôle potentiel est assez controversé. Comme l'anion superoxyde est incapable de traverser les membranes internes, la SOD Cu/Zn serait présente dans ce compartiment pour éliminer l'anion superoxyde provenant de l'extérieur ou produit par une source périplasmique encore inconnue. Par ailleurs, la SOD Cu/Zn semblerait essentielle pour la survie de la bactérie durant la phase stationnaire puisqu'elle est induite lors de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Schnell et Steinman, 1995; St John et Steinman, 1996; Imlay et Imlay, 1996). Ces bactéries produiraient une SOD Cu/Zn extracytosolique pour faire face à un stress oxydant, dont l'origine reste encore inconnue, qui

surviendrait seulement lors de la phase stationnaire.

La relation entre SOD et virulence chez les microorganismes pathogènes est très discutée. En fait, elle semblerait dépendre de la localisation des SOD concernées. Chez plusieurs espèces bactériennes, la contribution des SOD cytoplasmiques dans la pathogénicité de ces souches a été montrée. L'inactivation de la SOD-Fe de *Shigella flexneri* rend cette souche extrêmement sensible à l'attaque des phagocytes (Franzon et coll., 1990). Pour d'autres souches, les mutants déficients en SOD sont toujours viables même en présence d'espèces activées de l'oxygène produites par les phagocytes. Dans le cas de *Bordetella pertussis*, l'absence de SOD pourrait affecter la virulence par une augmentation de l'anion superoxyde intracellulaire, entraînant une inhibition de croissance et une production réduite de facteurs de virulence. Le rôle des SOD cytoplasmiques comme facteur de virulence n'est donc pas encore bien établi.

La SOD Cu/Zn périplasmique aiderait la bactérie à échapper aux mécanismes de défense des cellules phagocytaires de l'hôte. L'idée de départ est que la SOD Cu/Zn serait un facteur de virulence (Tatum et coll., 1992). Or, plusieurs études réfutent cette hypothèse (Latimer et coll., 1992).

Toutefois, les SOD-Fe sécrétées dans le milieu de culture sont considérées comme un facteur de virulence. En effet, *Mycobacterium tuberculosis* et *Nocardia asteroides*, qui sécrètent une SOD-Fe lors de la phase de croissance logarithmique, sont plus résistants à l'attaque phagocytaire, alors que les souches non sécrétices sont moins virulentes (Andersen et coll., 1991).

En ce qui concerne les protistes pathogènes, la localisation cellulaire de la SOD-Fe n'est pas encore bien connue et les mutants ne sont pas encore disponibles, mais il est possible de penser que ce système de défense contre le choc oxydant pourrait jouer un rôle dans la pathogénicité.

## **IV.2 Régulation de l'expression des SOD**

Le taux de biosynthèse des SOD augmente en présence d'une tension élevée en oxygène chez beaucoup d'organismes comme les bactéries, les levures, les plantes et les mammifères (Diguisepi et Fridovich, 1984). Dans ce paragraphe, nous parlerons surtout de la régulation de la SOD-Mn chez *E. coli*, mécanisme le plus étudié jusqu'à ce jour.

L'expression de la SOD-Fe est indépendante de l'oxygène et ne semble pas affectée par des perturbations environnementales. Néanmoins, Niederhoffer et ses collaborateurs (1990) ont suggéré que le gène *sodB* (SOD-Fe) était régulé de façon positive par Fur (Ferric uptake regulation), protéine



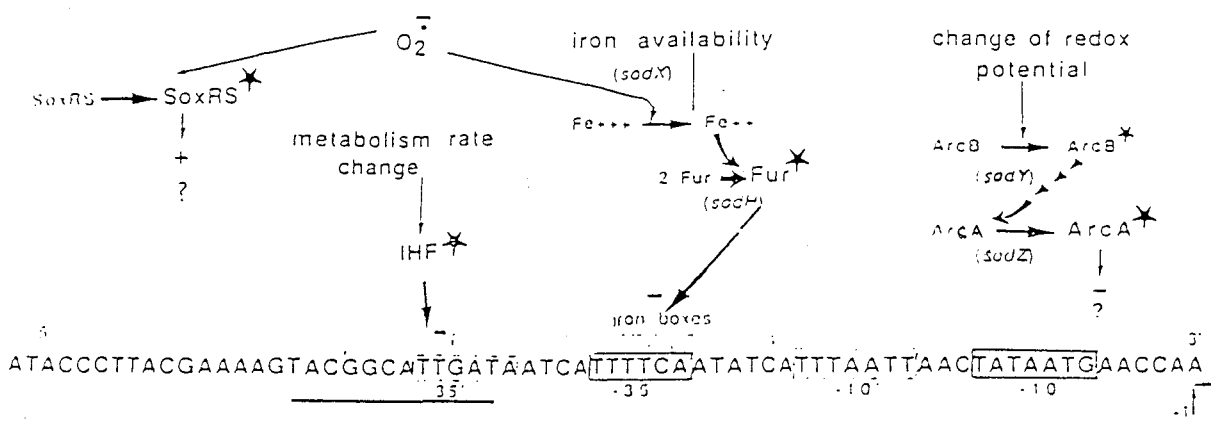


Fig 15: Régulation hypothétique de la transcription du gène *sodA*. Les deux séquences putatives reconnues par Fur, "iron boxe" sont encadrées. Une séquence consensus IHF est soulignée. (Touati, 1997 b)

responsable de la régulation du métabolisme du fer qui contrôle négativement tous les gènes impliqués dans l'acquisition du fer (Hantke, 1982).

En revanche, l'activité de la SOD-Mn varie beaucoup selon les différents stimuli environnementaux. L'expression de l'enzyme est régulée au niveau transcriptionnel, et l'activité est régulée posttraductionnellement de façon métal dépendante. Comme montré sur la figure simplifiée (Fig.15), l'expression de *sodA* (SOD-Mn) est soumise à trois systèmes de régulation: *soxR soxS*, *ArcA ArcB* et *Fur*.

En condition aérobie, la SOD-Mn va être régulée de façon positive par le système *soxR soxS*. En effet, sous l'influence d'un stress oxydant provoqué par l'anion superoxyde (Greenberg et coll., 1990; Tsaneva et Weiss, 1990) ou par l'oxyde nitrique (Nunoshiba et coll., 1993), la réponse *soxRS* est stimulée, activant toute une série de gènes, incluant *sodA*, qui contribuent à lutter contre ce stress. La protéine régulatrice SoxS, sous le contrôle de SoxR, va se fixer dans la partie promotrice du gène *sodA*, déréprimant l'expression de la SOD-Mn.

En condition anaérobie, le gène *sodA* est réprimé par ArcA-ArcB. Ce système de répression est constitué de deux protéines, dans lequel ArcA agit comme un régulateur et ArcB comme un senseur (Iuchi et coll., 1990). Lors du passage en anaérobiose, ArcB s'autophosphoryle et transfère un groupe phosphorylé à ArcA (Iuchi et Lin, 1992), qui va alors réprimer un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme aérobie (Iuchi et Lin, 1993), incluant *sodA* (Tardat et Touati, 1991).

La régulation de la SOD-Mn par le fer et la protéine Fur s'effectue aussi bien en aérobie qu'en anaérobiose. Dans un environnement riche en fer qui favorise la formation du radical hydroxyl, l'activité SOD-Mn diminue, d'une part, car le gène *sodA* est réprimé au niveau transcriptionnel par Fur qui se fixe au niveau du promoteur sous la forme d'un dimère avec  $Fe^{2+}$  comme cofacteur (Bagg et Neilands, 1987) et d'autre part, par l'inactivation de l'holoenzyme provoquée par le remplacement du Mn par le fer dans le site actif. Lorsque le milieu est carencé en fer, l'expression de la SOD-Mn est augmentée pour que celle-ci puisse relayer la SOD-Fe qui devient inactive dans ces conditions. En condition anaérobie, la répression de ArcA est suffisante pour empêcher l'expression de la SOD-Mn, ce qui suggère que le rôle majeur de Fur est de contrôler le taux du fer plutôt que l'état redox de la cellule, bien que la balance  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  dépende de ces deux conditions (Touati, 1997b)

La répression de *sodA* en anaérobiose est également couplée au métabolisme anaérobie *via* Fnr, qui est activé en réponse à une anoxie. Celui-ci régule de façon négative *sodA* qui possède dans

sa région promotrice deux séquences consensus reconnues par Fnr. Il a été postulé que l'effet de Fnr sur *sodA* soit médié par l'activation de la transcription de *ArcA* (Compan et Touati, 1994). D'autre part, plusieurs sites de fixation potentiels HIF (facteurs d'intégration de l'hôte) ont été trouvés dans la région promotrice du gène *sodA*. Ces HIF sont des protéines qui se fixent sur l'ADN et qui influencent la fonction des régulateurs primaires. HIF augmenterait la répression médiée par Fur en condition aérobie et en absence de Fur, il augmenterait la répression anaérobie médiée par *ArcA*, certainement en se fixant sur les différents sites présents dans le promoteur (Compan et Touati, 1993).

La régulation de l'expression des SOD par Fur n'est pas un fait unique chez les bactéries. La SOD-Fe du protozoaire *Entamoeba histolytica* est induite par un chélateur de fer (Bruchhaus et Tannich, 1994). La région 5' non traduite possède une séquence similaire à celle reconnue par Fur. De plus, cette SOD serait induite par une source d'anions superoxydes externe. Le mécanisme de cette induction et la relation entre les deux régulations sont encore inconnus.

Nous ne disposons que de données fragmentaires en ce qui concerne la régulation des SOD chez les Eucaryotes supérieurs.

Chez les plantes, qui contiennent typiquement une SOD Cu/Zn cytosolique, une SOD-Mn mitochondriale et une SOD-Fe associée aux chloroplastes, chaque type de SOD est régulé de façon différentielle selon le site de production des E.A.O. La production de la SOD-Fe chloroplastique est spécifiquement augmentée par une exposition à la lumière alors que le traitement avec le paraquat, qui cible les enzymes mitochondriales, augmente la production de SOD-Mn.

Chez les mammifères, l'anion superoxyde est capable d'induire l'expression de la SOD. Des composés générant de l'anion superoxyde tels que le paraquat ou la ménadione induisent l'expression de la SOD Cu/Zn et Mn (St Clair et coll., 1991). Les cytokines telles que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), le Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine I (IL-I) protègent les cellules contre la toxicité de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et des E.A.O libérées lors de la réponse immune, en stimulant l'expression de la SOD-Mn de la mitochondrie dans diverses cellules normales ou cancéreuses (Pang et coll., 1992). Une étude a montré que le TNF- $\alpha$  induisait la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, *via* le Ca<sup>2+</sup> comme messenger, dans la mitochondrie (Henneth et coll., 1993). Ce résultat expliquerait la stimulation de l'expression de SOD mitochondriale par le TNF- $\alpha$ , *via* les O<sub>2</sub><sup>-</sup> qu'il induit.

## CHAPITRE IV : *PLASMODIUM* ET CHOC OXYDANT

Des études expérimentales et épidémiologiques ont établi que *Plasmodium* était sensible à l'oxygène et à ses dérivés plus réactifs. En effet, lors de sa croissance dans l'hématie, le parasite est soumis à un stress oxydatif provoqué par son propre métabolisme, mais aussi par une réaction immune de l'hôte. Pendant de nombreuses années, l'idée de l'existence d'un système antioxydant du parasite a été plutôt controversée. A l'heure actuelle, certaines enzymes parasitaires impliquées dans la défense contre le choc oxydant ont été caractérisées aussi bien sur le plan biochimique que moléculaire. Dans ce chapitre, nous aborderons tout d'abord les arguments émis en faveur d'une sensibilité du parasite au choc oxydant puis l'origine des E.A.O produites lors du développement du parasite dans la cellule hôte et enfin la présence d'un système antioxydant du parasite et ses capacités d'adaptation.

### I. SENSIBILITE DE *PLASMODIUM* VIS-A-VIS D'UN CHOC OXYDANT

#### I.1 Données épidémiologiques

Des études épidémiologiques ont montré, dans des populations vivant en zones d'endémie palustre, de nombreux individus présentant soit des maladies héréditaires affectant le globule rouge, telles que la drépanocytose, l' $\alpha$  et  $\beta$ -thalassémie et la persistance de l'hémoglobine foetale (Hb F), soit des déficiences en enzyme telle que la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que la présence de ce parasite dans les zones d'endémie aurait créé une pression de sélection, favorisant ainsi l'émergence de ces populations dont la caractéristique serait d'être plus résistante à cette parasitose.

En effet, pour chacune de ces mutations, les globules rouges présentent une sensibilité accrue vis-à-vis du stress oxydant par rapport aux globules rouges sains (Golenser et Chevion, 1989). Dans le cas de la drépanocytose, l'augmentation du stress oxydant dans les globules rouges est provoquée par un niveau élevé en fer libre intraérythrocytaire et par une instabilité de l'hémoglobine (Scott et coll., 1995). Dans le cas de la thalassémie, on peut également observer une quantité importante d'hème libre provenant de la dégradation des chaînes d'hémoglobine non appariées (Repka et coll.,

1993). Cet hème serait à l'origine de la formation de nombreux radicaux libres (Winterbourn, 1990). Ce taux plus élevé des E.A.O dans ces types d'hématies apparaît compromettant pour la survie du parasite (Wozencraft, 1986; Clark et coll., 1989).

La G6PDH est une enzyme capable de générer, par la voie des pentoses phosphates, le NADPH indispensable pour maintenir dans l'hématie le glutathion sous forme réduite. La déficience de cette enzyme favorise un environnement oxydant dans la cellule. Il a tout d'abord été montré que le développement du parasite dans ce type d'hématie était perturbé. En effet, un stress oxydant provoqué par le parasite lui-même entraîne la lyse des globules rouges déficients en G6PDH avant que le parasite atteigne sa maturité (Eaton et Eckman, 1979). Néanmoins, d'autres études indiquent que des individus déficients en G6PDH ne présentent pas toujours une résistance plus importante face à *P. falciparum* que ceux ayant une activité G6PDH (Willcox et coll., 1985).

L'effet protecteur des hémoglobinopathies a été vérifié sur des cultures de *P. falciparum* réalisées avec des hématies anormales. Des résultats contradictoires ont été obtenus. Des données épidémiologiques suggèrent que le mode de protection contre le paludisme chez les individus porteurs de drépanocytose ne peut pas être expliqué seulement par la sensibilité du parasite vis-à-vis d'un stress oxydant plus important dans ce type d'hématie (Guggenmoos-Holzmann et coll., 1981). Une hypothèse a été émise suggérant que l'effet protecteur contre *P. falciparum* serait associé à une modification de la réponse immune (Bayoumi, 1987). Des études réalisées sur le terrain ont montré que la fréquence du paludisme dans des populations où l'hémoglobine S persiste dans les hématies, était identique à celle observée dans des populations normales. Les parasitémies observées sont légèrement plus faibles mais la différence n'est pas significative (Gendrel et coll., 1992). Dans le cas d'une carence en G6PDH, le parasite est capable d'exprimer une G6PDH endogène (Usanga et Luzzatto, 1985). Néanmoins, les parasites ainsi cultivés sont plus sensibles au choc oxydatif que ceux cultivés dans les hématies normales (Golenser et coll., 1991a).

En conclusion, l'effet protecteur des hémoglobinopathies vis-à-vis de *P. falciparum* n'est pas encore bien défini. La cause peut être multiple et peut faire intervenir des phénomènes autres que le stress oxydant.

## **I.2 Données expérimentales**

*Plasmodium* est très sensible au choc oxydant. Des études montrent qu'en atmosphère normale (21% d'oxygène), la survie du parasite est précaire. La croissance optimale du parasite serait

obtenue lorsque celui-ci est cultivé en présence de 0,5 à 5% d'oxygène (Clark et coll., 1989).

La destruction de parasites cultivés *in vitro* par des composés produisant un stress oxydant a été démontrée dans plusieurs études. En effet, l'utilisation de systèmes enzymatiques libérant l'anion superoxyde (xanthine-xanthine oxydase) ou du peroxyde d'hydrogène (glucose-glucose oxydase) a permis d'observer une diminution de la croissance parasitaire.

De même, l'injection d'agents générant des E.A.O tels que la phénylhydrazine, l'alloxane, le *tert*-butylhydroperoxyde ou la divicine, entraîne une réduction de la parasitémie chez des souris infectées par *P. vinckei* (Clark et Hunt, 1983; Clark et coll., 1984a, 1984b). La desferrioxamine, agent chélatant le fer, restaure l'aptitude des parasites à croître en présence de ces composés, suggérant l'implication du radical hydroxyl produit lors de la réaction de Fenton. Par ailleurs, 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 *P. chabaudi* (Dockrell et Playfair, 1983).

D'autre part, *P. berghei* a été utilisé comme modèle pour établir une corrélation entre l'état nutritionnel de la souris et son aptitude à résister à l'infection provoquée par le parasite. Il a été montré qu'une diète pro-oxydante contenant l'huile de poisson riche en acides gras polyinsaturés et une déficience en vitamine E protège fortement la souris contre le parasite (Levander et coll., 1989).

Une carence en riboflavine ralentirait le développement de *Plasmodium* aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Hunt et Stocker, 1990). Celle-ci serait liée à une diminution du glutathion réduit dans les hématies, diminuant ainsi l'activité de la glutathion réductase (Vennerstrom et Eaton, 1988).

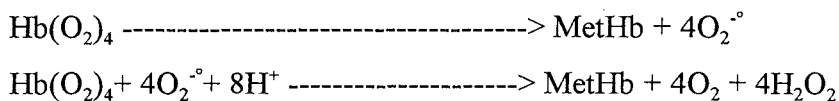
## **II. ORIGINE DU STRESS OXYDANT CHEZ PLASMODIUM**

Au cours de son développement dans la cellule hôte, *Plasmodium* est exposé à un stress oxydatif, dont l'origine peut être multiple. Ce stress peut être produit de façon endogène, résultant de l'action du parasite sur l'hématie, ou de façon exogène, provenant de l'autooxydation de l'hémoglobine, de la réponse du système immunitaire de l'hôte ou de l'action de molécules antimalariques oxydantes.

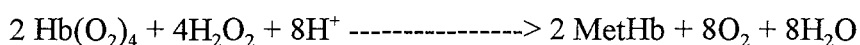
### **II.1 Espèces activées de l'oxygène produites par le parasite**

Au cours de son développement intraérythrocytaire, *P. falciparum* internalise et dégrade 25 à 75% d'hémoglobine (Hb) de l'hématie hôte dans une vacuole digestive. La dégradation de l'Hb

entraîne la libération de l'hème qui sera séquestré sous forme de pigment malarique, appelé hémozoïne. La conversion de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine est favorisée au pH acide caractéristique de ce compartiment. L'oxydation spontanée de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine est accompagnée par la libération d'anions superoxydes (Misra et Fridovich, 1972b), qui peuvent eux-mêmes réagir avec l'oxyhémoglobine en donnant de la méthémoglobine et du peroxyde d'hydrogène:



En milieu acide, les anions superoxydes se dismutent spontanément, produisant du peroxyde d'hydrogène qui à son tour réagit avec l'oxyhémoglobine:



En fait, de nombreuses études ont montré que le parasite était soumis à un stress oxydant au cours de l'internalisation du contenu du globule rouge. En effet, il a été mis en évidence la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $\text{OH}^\circ$  aux stades trophozoïte et schizonte, alors que cette production est inexistante au stade anneau où la digestion de l'hémoglobine est minimale (Atamna et Ginsburg, 1993). Au cours de la digestion de l'Hb dans la vacuole digestive, du fer peut être libéré de l'hème. La libération de ce fer augmente au cours du développement du parasite (Golenser et coll., 1991b). En présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le fer et l'hème lui-même peuvent générer des radicaux hydroxyls *via* la réaction de Fenton (Golenser et coll., 1991b; Gabay et Ginsburg, 1993). Seul  $\text{OH}^\circ$  agit sur son lieu de formation et ne diffuse pas (Yu, 1994) alors que les autres composés ( $\text{O}_2^{\circ}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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).

En dehors de la digestion du contenu de l'hématie, des E.A.O peuvent également être produites dans le parasite. 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

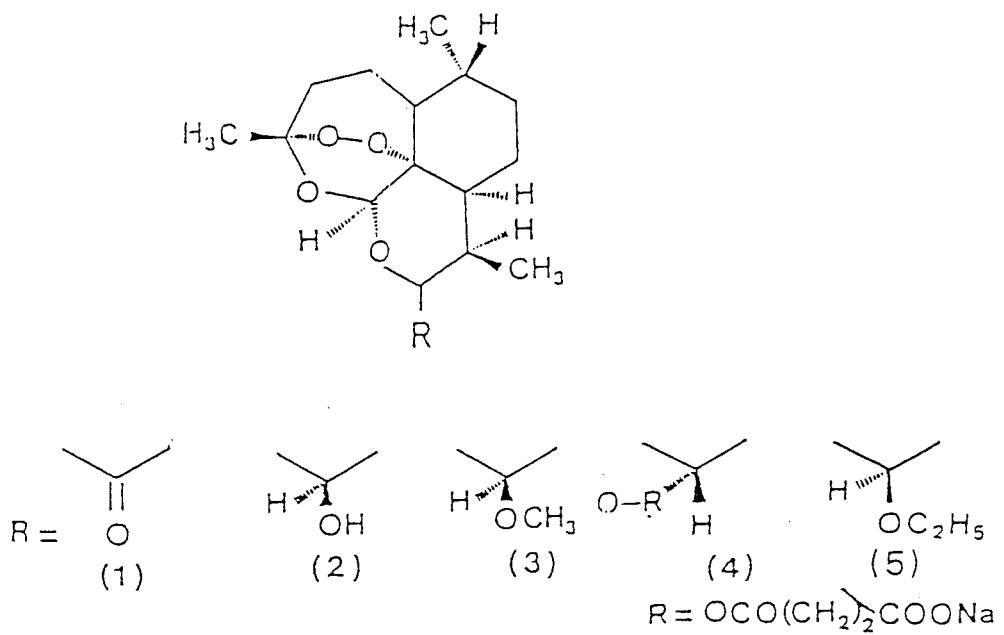
permet la désamination oxydative des acides aminés avec libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Une activité cytochrome P450 a été également mise en évidence chez *Plasmodium* (Ndifor et coll, 1990; Surolia et coll., 1993).

## II.2 Le système immunitaire de l'hôte

L'infection par *P. falciparum* induit rapidement une grande variété de réponses immunes qu'elles soient humorales ou cellulaires. L'immunité humorale, stimulée par certains antigènes parasitaires libérés dans l'organisme, ne semble pas assurer une protection efficace. Par contre, les leucocytes, les macrophages et les cytokines sont connus pour jouer un rôle essentiel dans l'élimination des parasites intraérythrocytaires. Des E.A.O peuvent être produites par les cellules phagocytaires (les macrophages et les polynucléaires neutrophiles) lors de l'infection par *Plasmodium*. Ces cellules seraient activées soit par des cytokines (interféron- $\gamma$ : IFN- $\gamma$ ; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$  ; Interleukine 1: IL-1), soit par des antigènes parasitaires solubles et produiraient de l'anion superoxyde (Kharazmi et coll., 1987). La participation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène dans la mort de *Plasmodium* a été montrée par Dockrell et Playfair (1983). Ces deux espèces entraîneraient la formation du radical hydroxyl, molécule extrêmement toxique, impliquée également dans l'élimination du parasite (Golenser et coll., 1991b). Ces E.A.O agirait directement en tuant le parasite ou induiraient un changement morphologique de l'hématie infectée de telle façon qu'elle soit éliminée de la circulation par phagocytose. Par contre, l'hémozoïne de *P. falciparum*, libérée après éclatement des schizontes, inhiberait "l'explosion oxydative" et la phagocytose des parasites par les macrophages humains (Schwarzer et coll., 1992). De plus, Prada et coll.(1995) ont montré que l'hémozoïne produite par *P. vinckei* modulerait différenciellement la production de cytokines telles que le TNF et l'IL-6.

Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les macrophages activés peuvent tuer les parasites intraérythrocytaires (Ockenhouse et coll., 1984; Shear et coll., 1989; Shear et Zhao, 1990). L'effet direct de l'IFN- $\gamma$  sur les hématies parasitées a été étudié mais les résultats obtenus sont contradictoires (Jones et coll., 1989; Orago et Facer, 1993). L'IFN- $\gamma$  induirait la production de radicaux nitrés par les macrophages (Green et coll., 1990; Liew et Cox, 1991), ce qui inhiberait la croissance des parasites intraérythrocytaires (Gyan et coll., 1994). Les mécanismes par lesquels ces espèces activées affectent le parasite restent encore inconnus. Il a été proposé que la mitochondrie du parasite pourrait être la cible de ces radicaux. Cependant, un travail récent (Stevenson et coll.,





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

Fig 16: Structure de l'artémisinine et de ses dérivés

1995) suggère que l'infection par *P. chabaudi* stimule la production de NO dans la souris, mais celui-ci apparaît jouer un rôle dans la pathologie observée chez l'hôte plutôt que dans le contrôle de la parasitémie.

Le TNF- $\alpha$ , autre cytokine, aurait une action inhibitrice sur la croissance de *P. falciparum* *in vitro* seul (Wozencraft et coll., 1984), ou *in vivo*, en synergie avec d'autres cytokines, par la libération de radicaux libres (Taverne et coll., 1987). Bien que le TNF- $\alpha$  recombinant 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 coll., 1987). Comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  stimulerait la production de radicaux nitrés par les macrophages (Green et coll., 1990; Liew et Cox, 1991).

De façon à répondre à une infection provoquée par *P. falciparum*, l'hôte utilise un système immunitaire complexe, employant de nombreuses alternatives pour éliminer le parasite. Comme nous l'avons vu dans ce paragraphe, un des mécanismes protecteurs implique le stress oxydant.

### II.3 Les drogues antimalariques

La survie du parasite et de l'érythrocyte dépend de la balance entre le stress oxydant et les mécanismes de défense. La sensibilité de *Plasmodium* au choc oxydant a ouvert de nouvelles perspectives pour la lutte contre le paludisme, ce qui laisse espérer qu'en interférant avec cette balance, il soit possible d'affecter le développement du parasite. Certains composés exercent leurs effets soit en créant un stress oxydant, soit en générant des E.A.O, soit en neutralisant le système antioxydant. L'utilisation de nouvelles molécules issues de la pharmacopée traditionnelle chinoise est très prometteuse. C'est le cas de l'artémisinine (Qinghaosu), agent antimalarique isolé à partir de *Artemisia annua* et du Yingzhaosu, issu d'*Artabotrys hexapetalus* et *A. uncinatus*. Qinghaosu et Yingzhaosu sont des sesquiterpènes lactones, appartenant respectivement à la famille des trioxanes et des dioxanes. L'artémisinine étant très peu soluble, des dérivés tels que l'artemether, l'arteether et l'artesunate ont été synthétisés (**Fig.16**). Le mécanisme d'action de ces molécules reste encore mal connu. L'activité antimalarique de ces molécules dépendrait de la présence du pont endoperoxyde qui serait impliqué dans la production de radicaux oxygénés, entraînant ainsi des lésions membranaires parasitaires. En effet, l'élévation de la tension en oxygène et l'addition de drogues oxydantes stimulent l'effet de l'artémisinine alors que des antioxydants tels que la catalase, le DTT, et l' $\alpha$ -tocophérol ont un rôle antagoniste à celui de cette drogue (Krungkrai et Yuthavong, 1987).

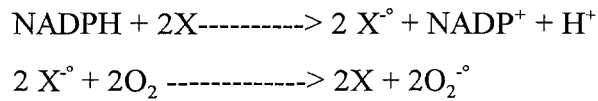
L'hème jouerait un rôle dans cette activité antimalarique car il catalyse la décomposition de l'artémisinine (Zhang et coll., 1992; Muhia et coll., 1994) et peut interagir avec celui-ci en causant l'oxydation des groupements thiols des protéines (Meshnick et coll., 1991; Wei et Sadrzadem, 1994). La drogue interagit avec l'hème intraparasitaire qui catalyse la conversion en une molécule radicalaire *via* l'ouverture du pont endoperoxyde, formant ainsi un adduit hème-artémisinine. La forme radicalaire donne ensuite des adduits avec des protéines parasitaires (Asawamahasakda et coll., 1994a), des protéines membranaires de l'hématie (Asawamahasakda et coll., 1994b) et avec la sérumalbumine (Yang et coll., 1993). L'activité serait potentialisée par le fer libre (Kamchonwongpaisan et coll., 1992) fourni par l'hème (Meshnick et coll., 1993) car les chélateurs de fer comme la desferrioxamine (DFO) inhibent l'action de ce médicament. Pourtant, des études réalisées *in vivo* sur des souris n'ont pas montré d'effets antagonistes entre la drogue et le chélateur de fer (Agar et Meshnick, résultats non publiés, cité par Looareesuwan et coll., 1996). C'est pourquoi l'artémisinine et la DFO ont été coadministrés à des patients atteints de malaria cérébrale (Looareesuwan et coll., 1996). L'addition de ces deux molécules serait bénéfique car elles combindraient leur action. En effet, l'artémisinine ou ses dérivés agiraient en éliminant les parasites alors que la DFO agirait en protégeant le système nerveux central. Cette étude préliminaire n'a pas montré de toxicité liée à la présence de ces deux composés dans le traitement.

D'autre part, les études de Berman et Adams (1997) ont montré que la première cible de l'artémisinine serait en fait la membrane de la vacuole digestive. En effet, l'adduit hème-artémisinine, extrêmement hydrophobe, se localiserait dans la membrane de la vacuole où il catalyserait la peroxydation des lipides membranaires. Des résultats contraires à ceux obtenus précédemment (Krungrai et Yuthavong, 1987; Levander et coll., 1989) montrent que la vitamine E augmenterait la lipoperoxydation en présence de l'adduit hème-artémisinine (Berman et Adams, 1997).

Les cas de résistance à l'artémisinine et à ses dérivés étaient inexistantes jusqu'à une date récente. Toutefois, Inselburg (1985) a produit par mutagenèse cinq mutants de *P. falciparum* moins sensibles à l'artémisinine. De plus, une diminution de la sensibilité aux endoperoxydes a été signalée sur des isolats de *P. falciparum* provenant d'Asie du Sud-Est, dans des régions où l'utilisation de ces molécules est importante (Gay et coll., 1993).

D'autres composés (X), ayant une activité antimalarique, sont capables de catalyser la réduction d'un électron de  $O_2$  en  $O_2^{\cdot -}$  à travers un cycle redox. Ce cycle dépend de la présence

d'équivalents réducteurs comme le NADPH.



Cette catégorie de molécules inclut les naphtoquinones, la ménadione, la ménoctone et l'atovaquone ainsi que des composés possédant un noyau catéchol comme la quercétine, le RC-12 et le gossypol ou avec un noyau pyrimidine comme la divicine et l'isouramyl (Vennerstrom et Eaton, 1988; Schirmer et coll., 1995).

#### II.4 Fragilisation de l'hématie parasitée

La sensibilité au stress oxydatif des hématies parasitées provient de la production d'E.A.O par le parasite mais également de la diminution du système enzymatique antioxydant de la cellule hôte. En effet, au cours de son développement dans l'hématie, *Plasmodium* internalise le contenu du globule rouge qui est constitué en grande majorité d'hémoglobine. Les enzymes de défense (SOD, catalase et GPx) et des molécules antioxydantes (acide ascorbique, GSH et NADPH) sont également internalisées lors de la maturation du parasite (Hunt et Stocker, 1990). Cette diminution du système de défense de l'hématie parasitée ne fait que renforcer sa sensibilité à l'oxydation qui est visible par une augmentation de la lipoperoxydation. En effet, la lipoperoxydation (augmentation de malondialdéhyde) est signalée *in vivo* dans les membranes des hématies parasitées par *P. vinckei* (Stocker et coll., 1985; Buffinton et coll., 1988) ou *P. berghei* (Nair et coll., 1984), mais aussi *in vitro* chez *P. falciparum* ce qui signifie qu'aucune intervention du système immunitaire n'est nécessaire pour expliquer ces résultats (Wozencraft, 1986). Les produits issus de la lipoperoxydation présentent une demi-vie plus longue que les radicaux oxygénés et peuvent agir à distance de leur source de production (Pré, 1991), entraînant la mort du parasite (Clark et coll., 1987; Buffinton et coll., 1988).

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 coll., 1991).

Le contenu en vitamine E des hématies parasitées soit par *P. falciparum* (Mohan et coll., 1994) soit par *P. vinckei* (Stocker et coll., 1985; 1986a) augmente graduellement avec le

développement des parasites. Cette augmentation se produit également dans les hématies non parasitées chez des souris impaludées (Stocker et coll., 1985). Cette dernière observation peut être interprétée comme une réponse de l'organisme au stress oxydant de l'hôte, car une injection intraveineuse de divicine, composé générant un stress oxydant, entraîne le même résultat (Stocker et coll., 1986a). La vitamine E est surtout présente dans les membranes de l'hématie plutôt que dans celles du parasite (Stocker et coll., 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 les globules rouges apparemment non oxydés (Clark et coll., 1984a; Ockenhouse et coll., 1984). Une déficience en vitamine E confère une plus grande sensibilité des hématies aux oxydants et apporte une protection de l'hôte vis-à-vis du parasite (Eaton et coll., 1976).

L' $\alpha$ -tocophérolquinone, produit d'oxydation de la vitamine E, n'est pas retrouvée dans les hématies de souris infestées (Stocker et coll., 1986a). Le contenu en vitamine C, molécule capable de réduire la vitamine E, est 6 fois plus élevé dans les hématies matures parasitées par *P. vinckei* que dans les hématies saines. Il n'est toutefois pas exclu que le parasite puisse synthétiser ce composé. De plus, il est suggéré que l'hématie parasitée possède une perméabilité plus importante pour le deshydroascorbate que l'hématie saine (Stocker et coll., 1986b) ainsi qu'une grande capacité à réduire ce produit en acide ascorbique par l'intermédiaire du glutathion. La vitamine E pourrait donc être facilement régénérée dans les hématies parasitées par *P. vinckei*, du fait de son contenu accru en vitamine C réduite (Stocker et coll., 1986a). En plus de ces 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 coll., 1985), le contenu en méthémoglobine des hématies parasitées n'est pas augmenté par rapport aux hématies saines (Stocker et coll., 1985; Hempelmann et coll., 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) (Halliwell et Gutteridge, 1990b), 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 coll., 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 coll. (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.

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

Comment le parasite fait-il face au stress oxydant? Deux possibilités se présentent à lui, soit il développe son propre système de défense, soit il stimule celui de la cellule hôte pour sa propre protection. Dans ce chapitre, nous essayerons de répondre à cette question en nous appuyant sur les résultats obtenus dans la littérature et dans le laboratoire.

#### **III.1 La Superoxyde Dismutase**

Il a tout d'abord été admis que le parasite utilisait les enzymes antioxydantes internalisées de la cellule hôte pour sa propre défense contre le choc oxydant. En effet, il a été mis en évidence une activité SOD qui présente les mêmes caractéristiques que celles de la cellule hôte chez *P. berghei* (Fairfield et coll., 1983; Fairfield et coll., 1984) et chez *P. falciparum* (Fairfield et coll., 1988). Lors de la maturation du parasite, celui-ci internaliserait le contenu du globule rouge comprenant l'hémoglobine mais également la SOD. 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 (Fairfield et coll., 1983; Stocker et coll., 1985; Fairfield et coll., 1988). Cependant, la présence de cette SOD dans la vacuole digestive semble superflue, puisqu'elle se trouve dans un compartiment où la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène se fait de façon spontanée.

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 par sa résistance au KCN a été mise en évidence chez *P. falciparum* dans les formes parasitaires âgées (Fairfield et coll., 1988). Sur la base de l'action des inhibiteurs spécifiques, cette activité proviendrait d'une SOD à manganèse, caractéristique des mitochondries

(Ranz et Meshnick, 1989).

D'autre part, des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré la présence d'une activité SOD endogène chez *P. falciparum* (Bécuwe et coll., 1996), chez trois espèces plasmodiales de rongeurs: *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. vinckei* (Bécuwe et coll., 1993) et chez deux espèces de *Babesia*: *B. hylomyisci* et *B. divergens* (Bécuwe et coll., 1992). Dans tous les cas, les tests basés sur l'inhibition de l'activité SOD indiquent que cette SOD endogène est fer-dépendante. La purification et le microséquençage N-terminal de la SOD de *B. hylomyisci* (Bécuwe et coll., 1994) et le clonage d'un fragment du gène de la SOD de *P. falciparum* (Bécuwe, Thèse, 1994) ont confirmé la nature fer-dépendante probable de ces enzymes.

### III.2 La catalase

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le parasite exprime sa propre SOD qui représente la première enzyme de détoxification des E.A.O. Cette découverte laisse à penser qu'il posséderait également les deux autres enzymes (catalase et/ou glutathion peroxydase) impliquées dans la défense contre le stress oxydant. A ce jour, aucune étude n'a pu démontrer avec certitude la présence d'une catalase endogène chez *Plasmodium*. Les études basées sur le dosage d'activité montrent une chute de l'activité catalasique globale dans les hématies parasitées par *P. berghei* (Nair et coll., 1984; Seth et coll., 1985; Areekul et Boonme, 1992) et par *P. vinckei* (Stocker et coll., 1985). Cette diminution de l'activité catalase dans les globules rouges infectés peut s'expliquer soit par l'internalisation puis la dégradation de l'enzyme de l'hématie (Stocker et coll., 1985; Fairfield et coll., 1986), soit par l'inactivation de cette protéine provoquée par la présence massive d' $H_2O_2$  (Areekul et Boonme, 1992) ou par la présence d'anion superoxyde produit lors de la division du parasite (Seth et coll., 1985). Les dosages effectués sur les extraits parasitaires de *P. falciparum* à tous les stades du cycle ont montré la présence d'une activité catalasique non négligeable mais aucune preuve n'a été apportée quant à l'origine endogène de cette enzyme (Fairfield et coll., 1988; Atamna et Ginsburg, 1993).

### III.3 Les systèmes de défense liés au glutathion

#### -a) Le glutathion

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'implication du glutathion réduit dans la protection

de l'hématie. Le contenu en GSH augmente parallèlement à la charge parasitaire dans des souris infectées par *P. vinckei* (Stocker et coll., 1985) et *P. berghei* (Seth et coll., 1985; Nair et coll., 1984). De plus, il semble qu'une fraction de GSH soit associée au parasite lui-même (Eckman et Eaton, 1979; Stocker et coll., 1985). La même observation a été faite dans les hématies parasitées par *P. falciparum* essentiellement au stade schizonte (Mohan et coll., 1992,1994). Roth et coll., (1982) n'observent pas, chez *P. falciparum*, d'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. De plus, la croissance de *P. falciparum in vitro* semble dépendre de la teneur cellulaire en glutathion réduit (Zhang et coll., 1988a,b). En effet, l'inhibition de la glutathion réductase dans les hématies saines ou parasitées diminue fortement la parasitémie qui est restaurée par l'ajout de GSH.

#### -b) La glutathion peroxydase

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

Le parasite n'utilise pas la GPx sélénodépendante de l'hôte dans sa protection puisque des souris carencées en sélénium ne sont pas protégées contre *P. berghei* et *P. vinckei* (Fritsch et coll., 1987). Une activité glutathion peroxydase sélénodépendante a été mise en évidence dans différentes souches de *P. berghei*, résistantes ou non à la chloroquine. Contrairement à l'activité glutathion S-transférase augmentant dans les souches résistantes, l'activité GPx sélénodépendante est identique dans les différentes souches (Dubois et coll., 1995).

Des travaux récents dans le laboratoire ont mis en évidence la présence d'une ou plusieurs glutathion peroxydases. Premièrement, une activité glutathion peroxydase sélénodépendante a été détectée dans des extraits parasitaires de *P. falciparum* et *P. yoelii* (Gamain et coll., 1996a). Deuxièmement, un gène codant pour une glutathion peroxydase a été cloné puis séquencé chez *P. falciparum* (Gamain et coll., 1996b). La protéine déduite présente d'importantes homologies avec les glutathion peroxydases d'Ursini (PHGPx). Par contre, les caractéristiques moléculaires de ce gène ne nous apportent pas la preuve de la présence de sélénium dans le site actif. En effet, l'absence du codon d'incorporation de la sélénocystéine et la présence de la structure en épingle à cheveux



localisée dans l'extrémité 3' non traduite (3' UTR), caractéristique des glutathion peroxydases sélénodépendantes, laissent planer un doute quant à la nature exacte de cette protéine (Gamain et coll., 1996b).

#### -c) 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 coll. (1987) n'excluent pas la possibilité que l'enzyme de l'hématie puisse être stockée par *P. falciparum*. Färber et coll. (1996) ont cloné le gène de la glutathion réductase de *P. falciparum* qui serait exprimée aux stades trophozoïtes et schizontes. La séquence protéique déduite montre 40% d'homologie avec l'enzyme humaine et présente de nombreux acides aminés identiques, impliqués dans la fonction enzymatique.

#### -d) La thioredoxine réductase

Récemment, le gène codant pour une thioredoxine réductase a été cloné chez *P. falciparum* (Müller et coll., 1995, 1996). Cette enzyme présente 43% d'identité avec la thioredoxine réductase humaine, mais ne présente que 25% d'identité avec l'enzyme retrouvée chez *E. coli*. Cette protéine, homodimérique, de masse moléculaire de 128 kDa, serait impliquée dans la régénération de la thioredoxine oxydée. Cette molécule servirait de cosubstrat à la thioredoxine peroxydase afin de réduire le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes alkyliques (Cha et Kim, 1995; Kim et coll., 1996).

#### -e) Les enzymes impliquées dans la régénération du NADPH (H<sup>+</sup>)

Le NADPH(H<sup>+</sup>) 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. L'activité de la voie des hexoses monophosphates qui fournit le NADPH est augmentée dans les érythrocytes infectés (Ginsburg et Atamna, 1994). Actuellement, on connaît chez *P. falciparum* trois enzymes impliquées dans la régénération du NADP<sup>+</sup> en NADPH. La première est la glutamate déshydrogénase (GDH) (Langer et coll., 1970; Sherman et coll., 1971; Walter et coll., 1974; Roth et coll., 1982; Vander-Jagt et coll., 1989), absente dans l'hématie et dont l'expression est constante au cours du cycle cellulaire chez *P. falciparum* (Vander-Jagt et coll., 1989). La seconde est l'isocitrate déshydrogénase (IDH) (Vander-

Jagt et coll., 1989; Sahni et coll., 1992) dont l'expression augmente au cours du cycle cellulaire chez *P. falciparum* (Vander-Jagt et coll., 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 G6PDH a été caractérisée (Kurdi-Haidar et Luzzatto, 1990) et séquencée (O'Brien et coll., 1994). Cette enzyme est induite lors de la croissance de *P. falciparum* dans les hématies déficientes en G6PDH (Usanga et Luzzatto, 1985). Elle montre ainsi la possibilité d'adaptation du parasite face au stress oxydant.

### III.4 Autres systèmes de protection

Les protéines riches en histidine (HRP) peuvent jouer un rôle dans la défense contre le stress oxydant chez *Plasmodium* (Kilejian, 1974; Ravetch et coll., 1984; Howard et coll., 1986 a,b). Ces HRP sont localisées dans les knobs à la surface des érythrocytes infectés par *P. falciparum* et sont impliquées dans la cytoadhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales. Une fonction antioxydante de ces protéines a été proposée (Golenser et coll., 1991a). En effet, le résidu histidine constitue un bon piègeur du radical OH<sup>•</sup> ainsi qu'un chélateur efficace du cuivre et du fer (Chevion, 1988). De plus, l'histidine peut former un complexe avec le peroxyde d'hydrogène (Schubert et coll., 1968).

D'autre part, le processus de "rosetting" peut être un moyen pour le parasite d'échapper aux espèces radicalaires produites par les phagocytes. Les hématies parasitées peuvent être protégées grâce à l'agglutination des hématies saines autour de celles-ci, formant ainsi des rosettes. Un contact étroit entre la cellule parasitée et les polynucléaires semble nécessaire pour affecter le développement de *P. falciparum* (Golenser et coll., 1991a). En effet, l'effet des E.A.O est localisé à leur site de formation car ces molécules sont hautement réactives et présentent une durée de vie très courte.

# **RESULTATS**

# CHAPITRE V :

## CARACTERISATION MOLECULAIRE

### DE LA SOD-FE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

#### I. RESULTATS

##### I.1 Résumé et commentaires du premier article

Dans cet article, intitulé “Characterization of iron-dependant endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*”, P. Bécuwe et ses collaborateurs démontrent l’existence d’une SOD endogène chez *P. falciparum*. La nature fer-dépendante de cette enzyme a été basée sur des tests d’activité en isoélectrofocalisation, mais aussi sur l’amplification d’un fragment d’ADN génomique de 424 pb, dont la séquence protéique déduite présentait de fortes homologies avec les SOD à fer.

Notre contribution à cet article a consisté à cribler une banque d’ADNc (ADN complémentaire) à l’aide du fragment de 424 pb. Cette banque fournie par O. Mercereau-Puijalon a été construite à partir de la souche HB3 de *P. falciparum*. A la suite de trois criblages successifs, nous avons obtenu 5 clones positifs dont un seul a retenu notre attention car la taille de l’insert était la plus importante.

Le séquençage de ce fragment de 1 kb a donné un ADNc constitué d’un cadre de lecture ouvert de 594 bp, d’un codon d’initiation AUG, de deux codons stop et des régions 5' et 3' non traduites, riches en AT, d’environ 300 et 60 pb respectivement. Une identité absolue entre la séquence nucléotidique de la sonde et celle de l’ADNc a été obtenue.

D’autre part, les 29 premiers acides aminés obtenus par microséquençage de la SOD parasitaire purifiée correspondent exactement aux 29 acides aminés N-terminaux déduits de l’ADNc. Les estimations de la masse moléculaire (21670 daltons pour la sous-unité) et du point isoélectrique (pI= 6,54) réalisées sur la base de la séquence primaire de la protéine sont également en accord avec les résultats obtenus lors de la purification de la protéine parasitaire.

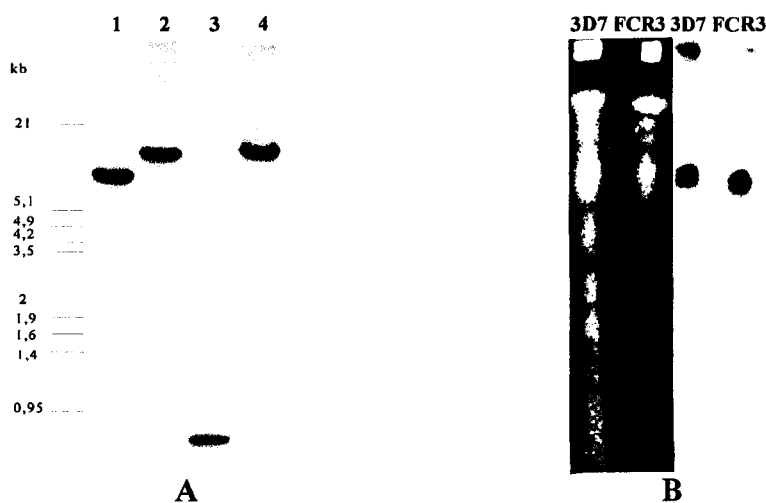
## I.2 Résultats complémentaires

### I.2.1 Etude du gène codant pour la SOD à fer de *P. falciparum*

Des amorces spécifiques des extrémités 5' et 3' de la région codante de l'ADNc ont été utilisées afin de rechercher la présence d'introns dans ce gène par PCR (Polymerase Chain Reaction). Après amplification à partir d'ADN génomique de *P. falciparum*, un seul fragment d'environ 600pb, migrant à la même hauteur que l'ADNc, est visualisé sur gel d'agarose indiquant l'absence d'intron dans le gène codant pour la SOD à fer de *P. falciparum*.

Afin d'évaluer le nombre de copies du gène de la SOD-Fe, l'ADN génomique de *P. falciparum* a été digéré par différentes enzymes de restriction et hybridé en Southern-blot avec le fragment de 424pb. L'autoradiographie (**Fig. 17A**) révèle la présence d'une seule bande pour les pistes 1, 2 et 4. Dans la piste 3, on observe deux bandes dont l'intensité diffère. Ce résultat s'explique par le fait que le gène de la SOD possède dans sa séquence le site palindromique reconnu par *NdeI*. Le gène codant pour la SOD-Fe de *P. falciparum* est donc présent en une seule copie dans le génome parasite.

Ce résultat est d'ailleurs confirmé par celui obtenu lors de l'hybridation du blot de chromosomes avec notre sonde radiomarquée de 424 pb. Le gène codant pour la SOD-Fe semble localisé sur le chromosome 9 ou 10 des souches 3D7 et FCR3 de *P. falciparum* (**Fig. 17B**).



**Fig. 17A :** Recherche du nombre de copies du gène de la SOD-Fe. L'ADN génomique de la souche FCR3 de *P. falciparum* est digéré par différentes enzymes de restriction (1: *ClaI*, 2: *Hind III*, 3: *Nde I*, 4: *XbaI*) et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Le Southern-blot est ensuite hybridé avec la sonde de 424 pb marquée au  $^{32}\text{P}$ .

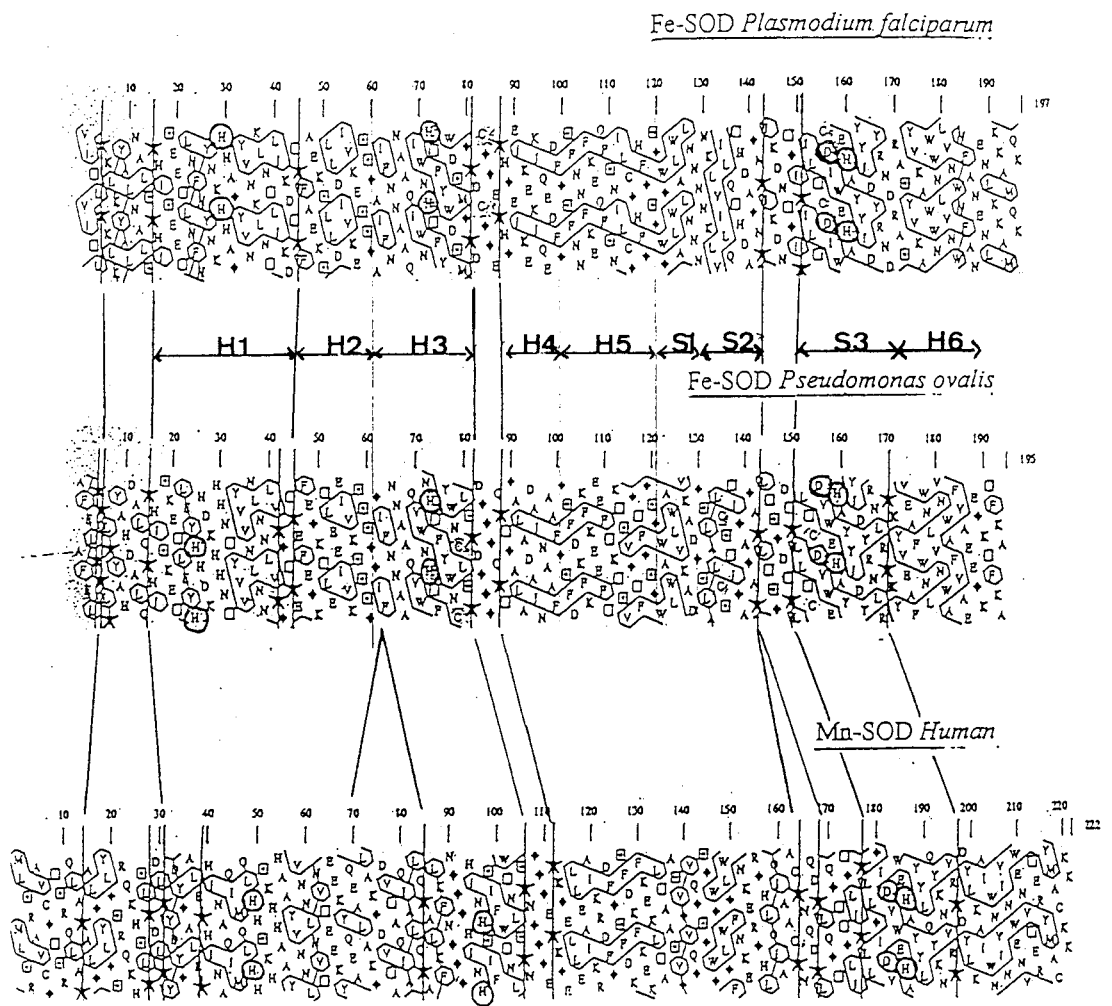
**B:** Localisation chromosomique du gène codant pour la SOD-Fe chez deux souches de *P. falciparum* (3D7 et FCR3). A gauche, électrophorèse de chromosomes en champ pulsé colorés au bromure d'éthidium. A droite, autoradiographie du blot de chromosomes après hybridation avec la sonde de 424 pb.

I.2.2 Etude de la structure primaire et secondaire de la protéine (réalisée en collaboration avec M. Dauchez, INSERM U314, Reims)

Une analyse de la séquence en acides aminés, basée sur la méthode de Von Heijne (1986), a révélé la présence d'un site potentiel de clivage d'une séquence signal situé entre la sérine 19 et l'acide glutamique 20. Une analyse effectuée à l'aide du programme PC GENE ne distingue pas de site de clivage dans la séquence. D'autre part, un site potentiel de N-glycosylation a été mis en évidence sur l'asparagine 73.

Les prédictions de la structure secondaire de la protéine ont été réalisées selon les paramètres de Garnier, Osgurthorpe et Robson (GORII, GORIII) et de Chou et Fasman (CF29, CF64). Celles-ci révèlent la présence de différentes hélices- $\alpha$  et de feuillets- $\beta$  positionnés différemment selon la méthode utilisée:

<b>PFSOD</b>	<b>MVITLPKLYALNALSPHISEETLNFHYNKHHAGYVNKLNTLIKDTPF</b>	<b>50</b>
GORII	BBB HHHHHHHH            HH HHHHHHHH    H    BB            BB            HHH	
GORIII	HHHHHHHHHHHHHHHH            HHHHHHHHHHHHHHHH    BHHHHHHHHHH    HHHH	
CF29	BB HHHHHHHHHH            HHHHHHHHHH    H    BBBB    BBBBHH    HHHH	
CF64	BB HHHHHHHHHH            HHHHHHHH B    HH    BBBHHHHBBBHH    HHHH	
<b>PFSOD</b>	<b>KSLLDIVKESSGAI FNNAAQIWNHTFYWDSMGPD CGGEPHGEI KEKI QED</b>	<b>100</b>
GORII	HHHHHHHHHH    HBHHHHHHHHHHHHHHHH            HHHHHHHHHHH	
GORIII	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH    B            HHHHHHHHH	
CF29	HHBBBHHH    BBB HHHBBBBBBBBBBH            HHHHHHHHHHH	
CF64	HHHBBHHH    BBHBBHHHHHHHHHHHHHHHH            HHHHHHHHHHH	
<b>PFSOD</b>	<b>FGSFNNFKEQFSNILCGHFGSGWGLALNNNNKLVILQTHDAGNPIKDNT</b>	<b>150</b>
GORII	HHHH HHHHHH    HBBBBB    BBBBHH    HBBBBBB	
GORIII	HH    HHHHH BBBBHH    BBBBHH    HHHHHBBBHH	
CF29	B    B HHHHHBBBBBB            BBHHH    BBBBBB    H            B	
CF64	B    HHHH BBBBH            BBHHHH    HHBBBBHHH            B	
<b>PFSOD</b>	<b>GIPILTCDIWEHAYYIDYRNDRASVYKAWWNLVNWNFANENLKKAMQK</b>	<b>198</b>
GORII	BBBBBHHHHHHHHBH            HHBBBBBBHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
GORIII	BBBBBBHHHHH B    BB H HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
CF29	BBBBBBHHHHHHHHHH            H BBBHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
CF64	BBBBBBHHHHHHHHHH            H BBBHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	



**Figure 18:** Comparaison des profils HCA (Hydrophobic Clusters Analysis) des SOD à fer de *P. falciparum*, de *P. ovalis* et de la SOD à manganèse humaine. H: hélice- $\alpha$  S: feuillet- $\beta$ .

Le pourcentage d'hélices- $\alpha$  et de feuillets- $\beta$  présents dans la protéine a été calculé dans chaque cas:

	Hélices- $\alpha$	Feuillets- $\beta$
GORII	46,2%	20,3%
GORIII	60,4%	14,2%
CF29	31%	36%
CF64	40,1%	28,9%

Les résultats obtenus étant discordants, nous avons comparé la séquence de SOD de *P. falciparum* à celles de SOD dont la structure avait été déterminée en cristallographie aux rayons X, en utilisant la méthode des clusters hydrophobes (Lemesle-Varloot et Coll., 1990). Cette analyse permet de caractériser l'environnement hydrophobe d'un résidu donné et, par l'alternance des résidus, donne des indications sur la structure secondaire. Parmi les SOD à fer étudiées en cristallographie, celle de *P. ovalis* est celle qui présente la plus grande homologie avec celle de *P. falciparum*. La SOD à manganèse de l'homme constituait un point de comparaison (Fig.18).

Les profils HCA montrent une grande similitude générale entre les SOD de *P. falciparum* et de *P. ovalis*, avec 6 hélices- $\alpha$  et 3 feuillets- $\beta$  positionnés de façon identique. On peut noter toutefois une différence entre ces deux profils qui est la présence d'une septième hélice dans le monomère de la SOD-Fe de *P. ovalis*.

En revanche, de nettes différences peuvent être notées avec la SOD à manganèse humaine qui présente une partie N-terminale plus longue, une absence d'hélice H2 et les hélices correspondant à H1 et H3 plus grandes. La moitié C-terminale est quant à elle beaucoup plus conservée.

La présence de l'hélice H2 dans le monomère de la SOD-Fe de *P. falciparum* confirme donc que cette protéine est bien dimérique puisque cette hélice est absente chez les SOD tétramériques (Lah et coll., 1995).

### I.2.3 Etude de la structure tridimensionnelle (réalisée par M. Dauchez)

L'obtention de la séquence protéique entière de la SOD-Fe de *P. falciparum* a permis de réaliser la modélisation moléculaire de notre protéine afin de connaître sa structure tridimensionnelle. Le principe de cette technique est d'étudier les homologies structurales de



protéines proches phylogénétiquement de la protéine d'intérêt. Dans le cas présent, les informations structurales des SOD-Fe et -Mn disponibles ont été utilisées pour modéliser notre enzyme. Seule la modélisation de la sous-unité a pu être réalisée jusqu'à présent.

Les analyses d'homologies des différentes SOD vont s'effectuer en trois étapes:

- homologie des séquences peptidiques (1D),
- homologie des clusters hydrophobes et des prédictions des structures secondaires (2D), (vu dans le paragraphe précédent),
- homologie des régions conservées structurellement (3D),

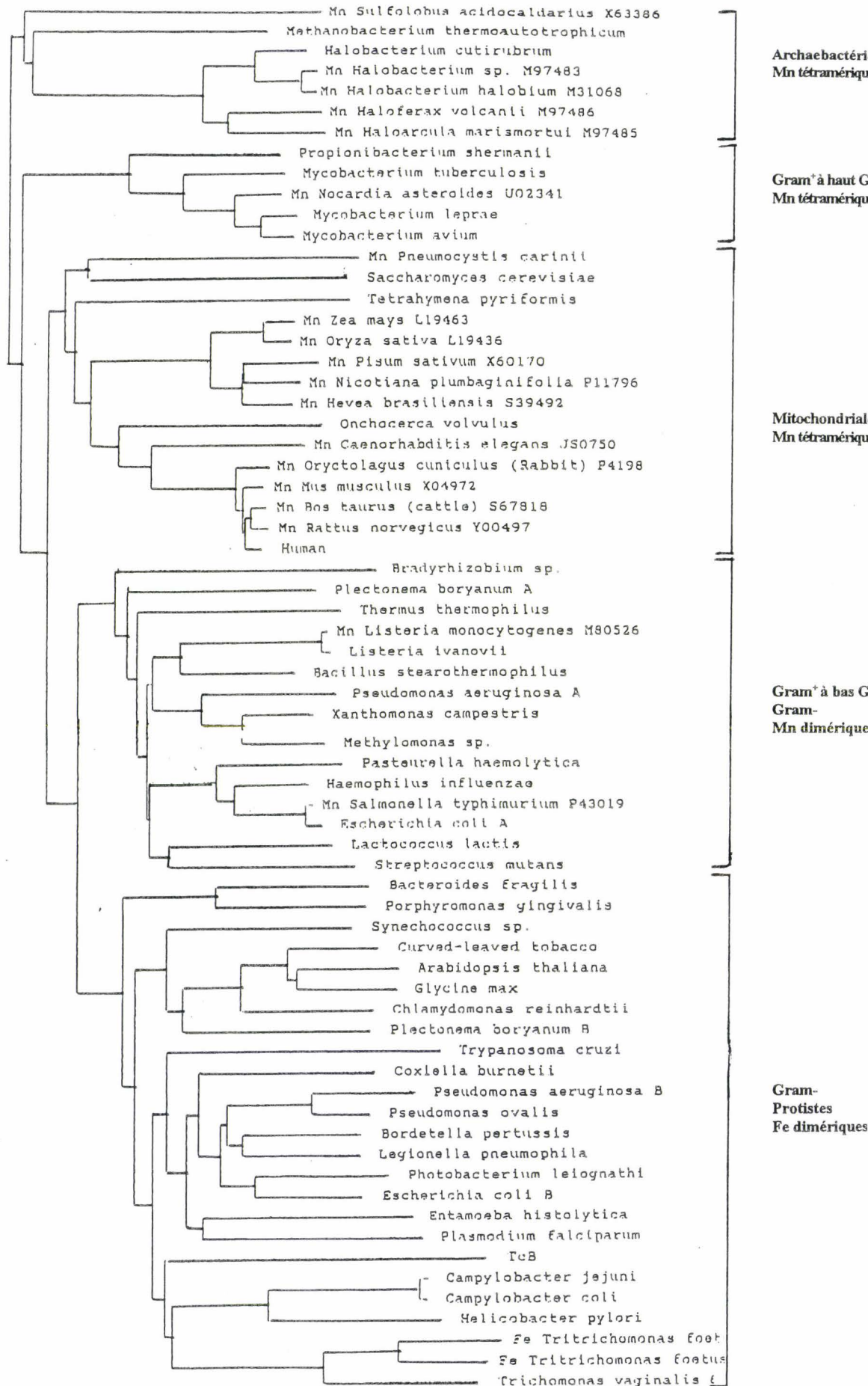
La superposition des structures 3D de SOD étudiées en cristallographie a permis ensuite de construire un modèle par homologie à partir de la séquence de la SOD de *P. falciparum*. Un premier modèle en 3D de la sous-unité de la SOD de *P. falciparum* est montré ci-dessous.



**Fig. 19** : Représentation en 3D du monomère de *P. falciparum*, utilisant le programme MOLSCRIPT.

La première remarque que l'on peut faire sur ce modèle est que les extrémités N-terminales et C-terminales de ce monomère ne sont pas bien définies. La résolution de ces extrémités en cristallographie aux rayons X chez les SOD utilisées pour cette étude (*E. coli*, *P. ovalis*) était insuffisante ou nulle et n'apportait aucune information pour la prédiction de notre modèle.

Les caractéristiques structurales conservées chez les SOD-Fe et -Mn sont parfaitement illustrées dans cette figure. En effet, nous observons bien deux domaines: le domaine N-terminal comprenant surtout des hélices- $\alpha$  et le domaine C-terminal composé d'hélices- $\alpha$  et de 3 feuillets- $\beta$ .



**Figure 20:** Arbre phylogénique des SOD à fer et à manganèse. Cet arbre a été construit selon la méthode des matrices de distances "Neighbor-joining method". En fonction de l'homologie de séquence, les SOD ont été regroupées en 5 familles.

Entre ces deux régions, nous trouvons les acides aminés ligands, conservés dans toutes les SOD-Fe et -Mn, impliqués dans la chélation du fer au niveau du site actif. D'autre part, les acides aminés ayant un rôle clef dans la fonction de l'enzyme (Trp 72, Tyr 34) et dans l'association des sous-unités en dimère (Trp 158, Phe 118) sont retrouvés dans la position attendue.

La présence de l'hélice H2 et par conséquent l'absence de la structure en épingle à cheveux hélicoïdale, impliquée dans les interactions dimère-dimère chez les SOD tétramériques, montrent bien que la SOD de *P. falciparum* est dimérique.

#### I.2.4 Analyse phylogénique de la SOD-Fe de *P. falciparum* (Fig. 20)

La protéine déduite de la séquence nucléotidique a permis de replacer notre SOD parmi toutes les SOD à Mn et à Fe connues. A partir d'un alignement de séquences des SOD-Fe et Mn provenant de bactéries et d'Eucaryotes, un arbre phylogénique a été construit en utilisant le programme MUST. Cet arbre distingue cinq grandes familles de SOD: la première famille comprend les SOD à fer (protistes, bactéries, cyanobactéries et chloroplastes). La deuxième famille contient essentiellement les SOD-Mn de bactéries à bas GC. Les Archea forment deux petits groupes associés (famille 3). Et enfin, très proches l'une de l'autre, on retrouve les SOD mitochondriales (essentiellement Mn, famille 4) et les SOD des bactéries primitives (à haut rapport GC, famille 5).

La SOD de *P. falciparum* est clairement associée au groupe des SOD-Fe bactériennes et chloroplastiques. Elle est située à côté de la séquence d'un autre protozoaire *Entamoeba histolytica*.

Ce résultat, en corrélation avec ceux obtenus lors des tests d'inhibition, indique une nature fer dépendante probable de l'enzyme.

## II. DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent par des techniques de biochimie et de biologie moléculaire, la présence d'une SOD endogène fer-dépendante chez *P. falciparum*. La présence de cette SOD parasitaire, différente de celles de l'hôte (SOD Cu/Zn, SOD-Mn) peut donc ouvrir de nouvelles perspectives en chimiothérapie du paludisme. Une étude approfondie de cette molécule est donc indispensable si on veut l'utiliser comme cible spécifique pour le développement d'antimalariques.

Les résultats préliminaires obtenus à partir de l'analyse de la séquence primaire permettent de nous donner des renseignements sur la structure de notre enzyme.

#### -Etude du gène

Le gène codant pour la SOD-Fe de *P. falciparum* ne possède aucun intron et se trouve en simple copie sur le chromosome 9 ou 10 dans le génome du parasite. Des familles multigéniques de SOD à fer ont été identifiées chez *Trypanosoma cruzi* (Ismail et coll., 1997) et chez *Trichomonas vaginalis* (Viscogliosi et coll., soumis) alors qu'il n'existe qu'un gène chez *Entamoeba histolytica* (Bruchhaus et Tannich, 1994).

#### -Structure primaire

L'analyse de la structure primaire de la protéine a permis de déterminer la masse moléculaire (21670 daltons) et le pI (pI= 6,54) du monomère de 198 acides aminés. Ces résultats sont proches de ceux obtenus lors de la purification de l'enzyme parasitaire. De plus, cette protéine semble posséder un site potentiel de clivage entre la sérine 19 et l'acide glutamique 20, ce qui pourrait impliquer une maturation de la protéine. Pourtant, le microséquençage des 29 premiers acides aminés N-terminaux de l'enzyme parasitaire purifiée correspond à la séquence N-terminale déduite du gène et infirme cette hypothèse (Becuwe et coll., 1996). Cette séquence N-terminale peut également correspondre à un adressage bien particulier de la protéine dans le parasite. En effet, certaines SOD-Fe possèdent un peptide signal à l'extrémité N-terminale, entraînant une localisation de la protéine dans des organites particuliers, tels que le chloroplaste chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Chen et coll., 1996) ou la mitochondrie chez *Trypanosoma cruzi* (Ismail et coll., 1997). La présence potentielle d'une séquence signal à l'extrémité N-terminale de la SOD-Fe de *P. falciparum* ne semble donc pas un fait exceptionnel. Cet aspect sera discuté plus loin au sujet de la localisation de l'enzyme que nous avons effectué à l'aide d'anticorps spécifiques.

#### -Structures secondaire et tridimensionnelle

Les prédictions de la structure secondaire montrent que la SOD de *P. falciparum* est aussi riche en hélices- $\alpha$  qu'en feuillets- $\beta$ , à l'exception de GORIII qui indique que la protéine contiendrait 60% d'hélices- $\alpha$  et 14% de feuillets- $\beta$ . Les comparaisons des profils HCA ainsi que la modélisation de la sous-unité montrent que la molécule contient des hélices- $\alpha$  et des feuillets- $\beta$

en proportions proches de celles obtenues avec GORIII. Il ne nous a pas été possible de confirmer ce résultat par l'analyse directe de la protéine parasitaire en dichroïsme circulaire, mais nous avons pu le faire sur la protéine recombinante purifiée (voir plus loin). Cette analyse a confirmé la richesse en hélices- $\alpha$  (58%) et le faible pourcentage de feuillets- $\beta$  (6%). D'autre part, le profil obtenu en HCA et la modélisation 3D nous montrent que le monomère de la SOD-Fe de *P. falciparum* est composé de 6 hélices- $\alpha$  et 3 feuillets- $\beta$ , caractéristiques des SOD-Fe.

L'analyse phylogénique, celle des clusters hydrophobes et la modélisation 3D sont toutes en accord avec la chromatographie gel filtration pour assigner à l'enzyme native parasitaire une structure dimérique. Elles indiquent également que la SOD de *P. falciparum* est certainement une SOD à fer, confirmant le résultat obtenu lors des tests d'inhibition spécifique réalisés sur des extraits parasitaires.

D'autre part, le modèle 3D nous permet de focaliser notre attention sur les résidus critiques qui peuvent être impliqués dans le ciblage de la SOD-Fe de *P. falciparum* comme les résidus ligands chélatant le fer dans le site actif, les résidus contrôlant l'accès au métal (Tyr34 et His30) et les résidus impliqués dans la sensibilité des SOD-Fe au peroxyde d'hydrogène (Trp72).

### III. CONCLUSION

Le travail effectué à partir de la séquence peptidique déduite du gène a permis une caractérisation plus précise de la SOD endogène de *P. falciparum*. C'est une protéine homodimérique proche des SOD à fer procaryotiques et eucaryotiques.

Toutefois, les tests d'activité réalisés en isoélectrofocalisation en présence d'inhibiteurs spécifiques, les homologies de séquence et de structure avec les autres SOD-Fe ne constituent pas des preuves formelles pour démontrer la présence du fer dans le site actif de notre protéine. En effet, si on ne tient compte que de ces critères, la SOD de *Tetrahymena pyriformis* serait classée comme une SOD à Mn, alors qu'elle contient du fer dans son site actif. Il est donc indispensable de réaliser des études biochimiques et biophysiques afin de confirmer la présence de ce métal dans le site actif de la SOD parasitaire. Une protéine recombinante a été produite dans cette optique.



## Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*<sup>1</sup>

Philippe Bécuwe<sup>a</sup>, Sylvie Gratepanche<sup>a</sup>, Marie-Noëlle Fourmaux<sup>a</sup>,  
Jozef Van Beeumen<sup>b</sup>, Bart Samyn<sup>b</sup>, Odile Mercereau-Puijalon<sup>c</sup>, Jean Pierre Touzel<sup>d</sup>,  
Christian Slomianny<sup>a</sup>, Daniel Camus<sup>a</sup>, Daniel Dive<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>INSERM U42, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, France

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

<sup>c</sup>Unité de Parasitologie expérimentale, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

<sup>d</sup>INRA, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Received 19 June 1995; revised 28 November 1995; accepted 11 December 1995

### Abstract

Two main superoxide dismutase activities at isoelectric points (pI) 6.2 and 6.8 and two minor at pI 5.6 and 6.4 were found in crude extracts of *Plasmodium falciparum*. These activities were cyanide-resistant and hydrogen peroxide-sensitive and represented 20–30% of the total SOD activity found in the crude extract. A fragment of 424 bp, amplified from genomic DNA from *P. falciparum*, was cloned and sequenced. The deduced amino acid sequence identified this fragment as a coding region of an SOD gene. A cDNA corresponding to SOD was then isolated from a *P. falciparum* DNA library and sequenced. The deduced amino acid sequence of SOD (197 aa) was compared with 32 known Fe- or Mn-SODs by the 'DARWIN' system. This analysis showed that the parasitic enzyme was related to typical Fe-SODs. The SOD subunit was purified and the N-terminal sequence, determined up to 29 residues, corresponded to that of cDNA isolated. The iron-dependent SOD activity found in *Plasmodium falciparum* represents the first level of the antioxidant defence system of the parasite. It is also the first SOD characterized in the parasitic *Apicomplexa* whose sequence can be compared to equivalent iron-dependent enzymes known in other protozoa and bacteria.

**Keywords:** Fe-SOD; Purification; cDNA; Sequence; *Plasmodium falciparum*; Apicomplexa; Oxidant stress

**Abbreviations:** NBT, nitro blue tetrazolium; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; pI, isoelectric point; SDS, sodium dodecyl sulphate; SOD, superoxide dismutase

\* Corresponding author. Tel.: +33 20 472397, ext. 15; Fax: 33 20 059172.

<sup>1</sup> Note: Nucleotide sequences data reported in this paper are available in the EMBL data bank under the accession number Z49819.

### 1. Introduction

Malaria is the most common parasitic disease, affecting about 40% of the world population living in transmission areas, and approximately 500 million clinical cases. Among them, more than 2 million deaths a year are due to *Plasmod-*

*ium falciparum* [1]. In many regions, the situation is degenerating, and the rapid spread of chloroquine resistance in infected areas is complicating treatment. As the use of other antimalarial drugs in prophylaxis results in a rapid emergence of resistance, the development of new approaches in malarial chemotherapy is a major challenge in control programs.

Among the different metabolic pathways present in *P. falciparum*, the antioxidant defence system is not very well defined. Many experiments have shown that malaria parasites are affected by oxidant stress both during the intra-erythrocytic [2,3] and the hepatic [4] stages of the parasite cycle. During malaria infection, reactive oxygen species produced by activated phagocytes [5–9] but also in parasitized erythrocytes [10,11] can cause various cellular damage leading to irreversible injury. In vitro, *P. falciparum* fails to grow under normal oxygen tension [12] and must be cultured in the presence of 3–5% oxygen.

None of the antioxidant defence enzymes of *Plasmodium* have been characterized precisely, and most of the results concern activity measurements in parasite extracts which are always contaminated to some extent by erythrocyte enzymes. Only superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) has been studied in any detail in *P. falciparum* and in rodent malaria species, but results are controversial. Fairfield et al. [13] and Ranz et al. [14] claimed the existence of a manganese-dependent SOD in *P. falciparum* whose specific activity was not estimated, and so considered negligible. These authors postulated that rodent malaria parasites had no endogenous SOD activity and adopted the RBC enzyme for their own use [15]. Bécuwe et al. [16] found an endogenous iron-dependent SOD activity in three rodent malaria species and in two *Babesia* species [17,18]. In rodent malaria species, this endogenous activity represented 25–30% of the total SOD activity. The remaining activity may correspond to the internalized RBC Cu/Zn SOD. As Fe, Mn and cambialistic (equally active both with Mn or Fe as metal cofactors present in their active site) SODs exhibit different sensitivities to  $H_2O_2$  which can be related with peculiarities in their amino acid sequence [19], this led us to reinvestigate the prob-

lem of the endogenous SOD of *P. falciparum*. In the present paper, we report the presence of a gene coding for an Fe-SOD in *P. falciparum*. The N-terminal sequence of the purified protein corresponding to the SOD activity found in parasite extracts is identical to the amino acid sequence deduced from the isolated cDNA. This result shows that an Fe-SOD gene is expressed during the normal intra-erythrocytic cycle of *P. falciparum*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Material

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

### 2.2. Preparation of parasites

Strain FCR3 of *P. falciparum* was cultured in general culture conditions defined by Trager and Jensen [20], but in a controlled atmosphere (90%  $N_2$ , 5%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ ). Mass cultures were routinely carried out in Doubletray culture vessels (Nunc).

The purification of parasites (by saponin lysis of parasitized red blood cells and Percoll separation of parasites) and preparation of homogenates were performed as described previously [16], only the parasite lysate was dialysed at 4°C against 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, and then concentrated.

### 2.3. Protein determination

Protein concentration was measured according to Bradford [21]. Hemoglobin content of the lysates was determined using Drabkin's reagent [22].

### 2.4. Isoelectrofocusing

IEF was performed as described previously [16]. The gels were stained for SOD specific activity by incubation in nitro blue tetrazolium [23]. To assess the effects of inhibitors, the staining for SOD activity was also carried out in the presence of 2 mM potassium cyanide (which inhibits Cu-Zn SOD) or 2 mM hydrogen peroxide (which inhibits Fe-SOD). Control human erythrocyte extracts containing Cu-Zn SOD were prepared by hemoglobin precipitation [24].

### 2.5. Enzyme assays

SOD activity present in extracts was measured by determination of the rate of reduction of cytochrome *c* in presence of the xanthine-xanthine oxidase system as proposed by McCord and Fridovich [25] with bovine erythrocyte SOD as the standard. To estimate the proportion of the endogenous *P. falciparum* SOD, enzyme assays were carried out on 1 U of total enzymatic activity in the presence of 1 mM KCN or 2 mM hydrogen peroxide [16]. During the purification of the *P. falciparum* SOD, we used the pyrogallol method proposed by Marklund [26] to analyse SOD activity in the fractions; 1 U of SOD activity corresponds to 50% inhibition of the pyrogallol autooxidation observed in control in absence of the enzyme.

### 2.6. PCR and screening of *P. falciparum* cDNA library

*P. falciparum* genomic DNA was prepared by treatment of parasites at 50°C with proteinase K (0.4 mg ml<sup>-1</sup>) in 7.5 mM Tris buffer, pH 8, 7.5 mM EDTA, 1% SDS) overnight, and then by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation.

The polymerase chain reaction (PCR) was performed with two oligonucleotide primers: a 22 mer-sense oligonucleotide AM1 (5'-GAA TTC CAT CAT GAT AAA CAT C-3') and a 23-mer antisense oligonucleotide AM2 (5'-ATC GAT ATA ATA TGC ATG TTC CC-3'), provided by the Oligonucleotide Department of Institut Pasteur (Paris, France). The sequences of the primers were deduced from two regions found to be highly conserved in the amino acid sequences of Mn, Fe and cambialistic (active with both Fe or Mn) SODs from several organisms. The nucleotide sequences of the two primers were selected according to the relative codon frequencies in *P. falciparum* [27]. A restriction site was added to each primer in order to use it in cloning experiments (*Eco*RI for AM1 and *Cla*I for AM2).

PCR amplification was performed with a Geneamp kit (Cetus) using the manufacturer's buffers and the AM1 and AM2 oligonucleotides (1 μM each) in an automated thermal cycler (Prem, Andover, Hampshire, UK). The genomic DNA was first denaturated and then amplified for 30 cycles (1.5 min at 94°C, 1.5 min at 50°C and 1.5 min at 72°C) and the final extension step continued for an additional 5 min.

The amplified *P. falciparum* DNA fragment (424 bp) was cloned with PCR-Script SK(+) cloning system (Stratagene) according to Bauer [28] and sequenced by the dideoxy chain-termination method [29] (USB). This fragment was subsequently used as a DNA probe.

To check for the presence of SOD cDNA in the *P. falciparum* HB3 strain library, an aliquot of the plasmid (pCDNAII) cDNA library was heated at 94°C for 3 min to denature the plasmid and a PCR amplification using the two primers described above was done to confirm the presence of the SOD cDNA in the library. Then, 7 × 10<sup>4</sup> cfu were plated and duplicate filters were lifted. Screening was done with the 424-bp probe labeled to a specific activity of > 10<sup>9</sup> cpm μg<sup>-1</sup> with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham) using the random priming DNA labeling kit (Boehringer). Of 22 positive clones, five were subjected to further rounds of colony screening to isolate single clones. The size of the inserts, after digestion with *Bam*HI and *Xho*I, were approximately 2, 1, 0.8, 0.7 and 0.6



kb. The 2-kb insert was not positive after hybridization. The clone containing the 1-kb insert was selected and sequenced as described above.

### 2.7. SOD purification

A Sephadex G-75 column (2.5 × 90 cm) was equilibrated at 4°C with 10 mM Tris/HCl, pH 7.8. The crude extract of *P. falciparum* (14.5 mg) was applied to Sephadex G-75 (flow rate 12 ml h<sup>-1</sup>). Absorbance was monitored at 280 nm and SOD activity of each fraction was assayed in the presence or in the absence of 1 mM KCN. The fractions exhibiting a KCN-resistant SOD activity (different from the Cu/Zn of the erythrocyte SOD) were pooled and concentrated at 4°C.

The concentrated fractions from gel filtration were applied to a DEAE Trisacryl M column (1.5 × 8 cm) equilibrated at 4°C with 10 mM Tris/HCl, pH 7.8. Proteins were eluted with a linear gradient of sodium chloride (0–250 mM, flow rate: 18 ml h<sup>-1</sup>). Absorbance was monitored at 280 nm and the fractions containing SOD activity were pooled and concentrated (Microprodicon).

The concentrated fractions from DEAE Trisacryl M were submitted to non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% acrylamide). SOD activity resistant to 2 mM KCN was detected in the gel with the nitro-blue tetrazolium reagent. The band was excised and the protein(s) electroeluted in 0.12 M Tris/0.04 M glycine, pH 9.2, for 4 h at 3 W. The concentrated sample was analysed on a 12% SDS-polyacrylamide gel [30] and visualized after silver staining [31].

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

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

phenyl thiohydantoin amino acids (Applied Biosystems, Foster City, USA).

### 2.9. Analysis of the amino acids sequence of *P. falciparum* SOD

The deduced protein sequence of parasitic enzyme was compared to 32 known Mn- or Fe-SODs after alignment and a tree was constructed, using the DARWIN (Data Analysis and Retrieval With Indexed Nucleotide/Peptide Sequences) system according to Gonnet et al. [32]. To show alignment and homologies, we selected 10 Fe-SOD sequences.

## 3. Results

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

IEF of *P. falciparum* extracts showed two main parasite-derived activities (Fig. 1) at pI 6.2 and 6.8 (lane 4), cyanide-resistant (lane 8) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive (lane 12). The band at pI 6.2 is less sensitive to hydrogen peroxide than those at pI 6.8. Two minor activities at pI 5.6 and 6.4 were also detected in parasite extract, and the band at pI 6.4 seemed to be more resistant to KCN and more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than the one at pI 5.6 (lanes 4, 8 and 12).

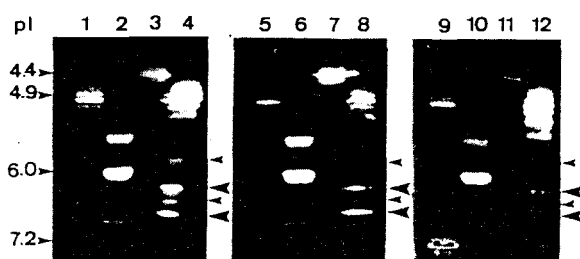


Fig. 1. Isoelectrofocusing of extract. The gel was stained for SOD activity without inhibitor (lanes 1–4), in the presence of 2 mM KCN (lanes 5–8) or in presence of 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lanes 9–12). Lanes 1, 5 and 9, Human RBC extract (120 µg); lanes 2, 6 and 10, *E. coli* Mn-SOD (3 U); lanes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

The total SOD activities, estimated in two different extracts of purified parasites were respectively  $11.98 \pm 0.59$  and  $12.90 \pm 0.34$  U (mg protein)<sup>-1</sup>. Inhibition tests were done in the presence of 1 mM KCN or 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, on 1 unit of SOD activity from purified parasites or from extracts of uninfected human RBC representing the control Cu/Zn SOD (two different extracts with measurements in triplicate). The Cu/Zn SOD activity of human RBC was very sensitive to KCN ( $87.1 \pm 3.2$  and  $92.2 \pm 1.4\%$  inhibition, respectively, in the two experiments), whereas the SOD activity of parasite extracts exhibited less inhibition ( $64.1 \pm 7.1$  and  $67.5 \pm 4.1\%$ ). In presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the Cu/Zn SOD activity of human RBC was less inhibited ( $36.9 \pm 5.8$  and  $36.4 \pm 3.0\%$ ) than the SOD activity of parasite extracts ( $55.2 \pm 8.2$  and  $57.0 \pm 6.2\%$ ). These results suggest the presence in the extracts of a parasite-specific KCN-resistant and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive SOD activity, different to the Cu/Zn SOD specific for the host cell. Based on the results of the inhibition tests with KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, part of the parasite SOD activity can be estimated around 20% of the total activity detected in extracts of asynchronized parasites.

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

PCR showed only one amplified fragment of the size expected if no intron occurred in the targeted gene portion. This fragment was sequenced (424 bp) and the deduced amino acid sequence showed the presence of highly conserved Fe-SOD regions (Fig. 2, double underlined sequence).

### 3.3. Isolation and sequencing of *P. falciparum* SOD cDNA

The largest positive clone (954 bp) selected with a 424-bp probe was sequenced. This cDNA was composed of an open reading frame of 594 bp with AUG initiation and two stop codons, and 5'- and 3'-untranslated parts of 300 and 60 bp, respectively, which are very rich in AT. The nucleotide sequence of the probe and the

corresponding part of the cDNA were identical. The complete protein subunit was composed of 197 residues, with a predicted molecular mass of 21 670 in accordance with that estimated during the purification of the protein (23 kDa, see below).

The sequence of *P. falciparum* SOD was compared to known Fe-SODs. The alignment of the sequence with 10 known Fe-SODs (Fig. 2) showed the presence, in the SOD from *P. falciparum*, of all the highly conserved SOD motifs and all characteristic residues known in Fe-SODs: aliphatic amino acids L/I/V-23 (versus M/N in Mn-SODs), aromatic residues F/Y-25 for Fe and cambialistic SODs (versus L/I in Mn-SODs), T-45, N-182 and the region 65–69 (respectively NNAAQ, NNAGQ and FNLGG for typical Fe-SODs, cambialistic SODs and the SOD from *Tetrahymena* versus FNGGG, NNGGG or NNAGG for Mn-SODs) flanking the second ligand H-73.

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

The cyanide-resistant SOD was eluted by gel filtration of a *P. falciparum* homogenate (Fig. 3A) at an estimated  $M_r$  43 000, in comparison with the  $M_r$  36 000 of the human RBC SOD (second peak). The fractions corresponding to the peak containing the parasite SOD were pooled and concentrated. The specific activity was increased approximately 6-fold, but 65% of the remaining SOD activity was cyanide-sensitive (Table 1), probably corresponding to the part of the overlapping peak of human RBC Cu/Zn SOD.

With DEAE Trisacryl, three peaks of SOD activity were separated in the concentrated fractions from gel filtration. The two first peaks contained the cyanide-resistant parasite enzyme which eluted from the column at 30 and 40 mM sodium chloride, respectively (Fig. 3B) and the corresponding fractions were pooled. The specific activity was increased approximately 3-fold and only 10% of the cyanide-sensitive SOD activity was detectable by enzyme assay (Table 1).

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

5' ++++++3' primer AM1	
P.f. : <u>VITLPKLYALNALSPHISEETLNHFHYNKHHAGYVNKLNKLIKDT</u> - <u>FAEKSLLDI-VK</u> - <u>-----ESSGAI</u> <u>FNNAAQVWNHTT</u>	75
C.b. : AFELPDLFPYKLNALPHISQETLEYHHGKHHRAYVNKLNKLIETP- <u>FEKEPLEEI-IR</u> - <u>-----KSDGGIF</u> <u>NNAAQHWNHTT</u>	75
L.p. : TPTLPQLPYALDALAPHVSKETLEYHYGKHHNTYVNLNKLIPGT- <u>EFESMTLEEI-IM</u> - <u>-----KAKGGIF</u> <u>NNAAQVWNHTT</u>	75
P.l. : AFELPALPFAMNALEPHISQETLEYHYGKHHNTYVVKLNGLVEGT- <u>ELAEXSLEEI-IK</u> - <u>-----TSTGGVF</u> <u>NNAAQVWNHTT</u>	75
E.c. : SFELPALPYAKDALAPHISAETIEYHYGKHHQTYVNLNKLKGT- <u>AFEGKSLEEI-IR</u> - <u>-----SSEGGVF</u> <u>NNAAQVWNHTT</u>	75
P.o. : AFELPPLPYAHDALQPHISKETLEYHHDKHHNTYVNLNKLVPGTPEFEGKTLEEI- <u>VK</u> - <u>-----SSSGGIF</u> <u>NNAAQVWNHTT</u>	76
E.h. : SFQLPQLPYAYNALEPHISKETLEFHHDKHHATYVVKLNGLVKGT- <u>EQEHKLEEL-IK</u> - <u>-----QKPTQAI</u> <u>YNNAAQAWNHTT</u>	76
P.g. : THELISLPYAVYALAPVISKETVEFHGKHKLKTYVDNLNKLIIGT- <u>EFENADLN</u> - <u>-----TIVQKS</u> - <u>EGGIF</u> <u>NAGQTLNHNCG</u>	75
B.f. : TYEMPKLPYANNALPEVSIQOTLDYHYGKHLQTYVNNKLSLVPGT- <u>EYEGKTVE</u> - <u>-----AIVASAP</u> <u>DGAIFNNAQVWNHTT</u>	76
T.p. : LNYEYSDLEPVLSAHLFSFHGKHHQAYVNNLNATYE- <u>---QIAAATK</u> <u>ENDA</u> <u>AHKIATLQSA</u> - <u>---LRFNL</u> <u>GGHVNHWT</u>	71
* * * * *	
P.f. : <u>FYWDSMGPD</u> - <u>---CGG EP</u> - <u>---HGEI</u> <u>KEIKQEDFGS</u> <u>FNNFKEQFSN</u> <u>ILCGHFGSGWGLALN</u> - <u>---NNKLV</u> <u>ILQTHDAGNP</u> <u>IKDNT</u>	150
C.b. : FYWHCMSPD- <u>---GGG DP</u> - <u>---SGELASA</u> <u>IDKTFGS</u> <u>LEKFKALF</u> <u>TDSANNHFGSGW</u> <u>AWLVKD</u> - <u>---NNGK</u> <u>LEVLSTV</u> <u>NARNPMT</u> - <u>EG</u>	149
L.p. : FYWHSMPN- <u>---GGG EP</u> - <u>---KGR</u> <u>LAEA</u> <u>INKSFGS</u> <u>FAAFKEQFSQ</u> <u>TAAATTFGSGW</u> <u>AWLVQD</u> - <u>---QSGAL</u> <u>KIINTS</u> <u>NAGT</u> <u>PMT</u> - <u>EG</u>	149
P.l. : FYWNCLAPN- <u>---AGG EP</u> - <u>---TGE</u> <u>VAAA</u> <u>EKA</u> <u>FGSFAEF</u> <u>KAKFTD</u> <u>SAI</u> <u>NNFGSS</u> <u>TWLVKN</u> - <u>---ANG</u> <u>SLA</u> <u>IVNTS</u> <u>NAGCP</u> <u>ITEEG</u>	150
E.c. : FYWNCLAPN- <u>---AGG EP</u> - <u>---TKG</u> <u>VAEA</u> <u>IAAS</u> <u>FGSFAD</u> <u>FKAQ</u> <u>TDAAI</u> <u>KNFGSG</u> <u>TWLVKN</u> - <u>---SDG</u> <u>KLA</u> <u>IVSTS</u> <u>NAGT</u> <u>PLTTD</u> -	149
P.o. : FYWNCLSPD- <u>---GGG QP</u> - <u>---TGA</u> <u>LADA</u> <u>INAAP</u> <u>GSFDK</u> <u>FKEEF</u> <u>TKTSV</u> <u>GTFGSGW</u> <u>AWLVK</u> - <u>---ADG</u> <u>SLALC</u> <u>STIG</u> <u>AGAP</u> <u>PLTS</u> - <u>G</u>	148
E.h. : FYWKCMC- <u>---CGG VKP</u> - <u>---SE</u> <u>QLA</u> <u>KLTA</u> <u>APG</u> <u>GLEEF</u> <u>KKKP</u> <u>TEKAV</u> <u>GHFGSGW</u> <u>CWLV</u> - <u>E---HDG</u> <u>KLEI</u> <u>ID</u> <u>THD</u> <u>AVN</u> <u>PMTN</u> - <u>G</u>	147
P.g. : LYFTQF- <u>---RPG</u> <u>KGA</u> - <u>P---K</u> <u>GK</u> <u>GEA</u> <u>IDK</u> <u>QF</u> <u>GS</u> <u>FEK</u> <u>FKEE</u> <u>FD</u> <u>TAGT</u> <u>TLF</u> <u>GSGW</u> <u>WLASD</u> - <u>---ANG</u> <u>KLS</u> <u>IEKE</u> <u>P</u> <u>NAG</u> <u>N</u> <u>PVR</u> <u>K</u> - <u>G</u>	149
B.f. : LYFLQFAPKPAK- <u>NE-P</u> - <u>---AK</u> <u>LGEA</u> <u>IKR</u> <u>DFG</u> <u>SFEN</u> <u>FKKE</u> <u>FN</u> <u>ASV</u> <u>GLF</u> <u>GSGW</u> <u>AWLSV</u> <u>D</u> - <u>---KDG</u> <u>KL</u> <u>HIT</u> <u>KE</u> <u>P</u> <u>NS</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>A</u> - <u>G</u>	150
T.p. : IYWDNLAPVKS <del>GGG</del> VLPDEHSPLTKAIKEK <del>W</del> GSYENFITL <del>N</del> TRTAAIQ <del>S</del> GSGW <del>L</del> GYD <del>T</del> VS <del>K</del> S- <u>LRF</u> <u>FEL</u> <u>GNQ</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>P</u> <u>EWS</u> - <u>S</u>	151
* * * * *	
3' ++++++5' primer AM2	
P.f. : <u>GIPILCDI</u> <u>WEHAYYID</u> <u>YRNR</u> <u>D</u> <u>RA</u> <u>S</u> <u>YV</u> <u>KAW</u> <u>N</u> <u>LN</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>K</u> <u>K</u>	197
C.b. : KKPLMCDVWEHAYYIDTRNDRPKYVNNFWQVNVWDFVMKNFKS	192
L.p. : LNALLCDVWEHAYYIDYRNRDPYIEAFWSLVNWDVFASNLK	191
P.l. : VTPLLVDLWEHAYYIDYRNLRPSYMDGFALVNVWDFVSKNLAA	193
E.c. : ATPLLVDVWEHAYYIDYRNARPGYLEHFWALVNVWDFVAKNLAA	192
P.o. : DTPLLCDVWEHAYYIDYRNLRPKYVEAFWNLVNVWAFVAEEGKTFKA	194
E.h. : MKPLLCDVWEHAYYIDTRNNRAAYLEHWWNVNVWKFVEEQ	188
P.g. : LNPLLFDVWEHAYYLYQNRADHLKDLWSIVDWDIVESRY	190
B.f. : LKPLLFDVWEHAYYLDYQNRADDVNKLWEI IDWDVVEKRL	191
T.p. : IVPLLLDVWEHAYYLDYQNLRPKYLTEVWKIVNVWREVEKRYLQAI	197
* * * * *	

Fig. 2. Alignment of *P. falciparum* SOD sequence (197 residues) with other Fe-SODs. Reference of proteins sequences in PIR2 and EMBL databases are given in brackets. Fe-SODs: P.f., SOD from *Plasmodium falciparum*; L.p., *Legionella pneumophila* (JS0749); P.l., *Photobacterium leiognathi* (A26707); C.b., *Coxiella burnetii* (A44791); E.c.(Fe), *Escherichia coli* (A29940); P.o., *Pseudomonas ovalis* (SOD FPSEOV); E.h., *Entamoeba histolytica* (A45552); T.p., *Tetrahymena pyriformis* (SGC5) (A39223). Cambialistic SODs: P.g., *Porphyrromonas gingivalis* (S12882); B.f., *Bacteroides fragilis* (BNRFESOD). The sequence of SOD from *P. falciparum* determined both by cDNA sequencing and N-terminal analysis of the purified protein is underlined. The sequence corresponding to PCR-amplified genomic DNA is double underlined. The conserved residues in all SODs are indicated by an asterisk. Gaps were introduced into the sequences for optimal alignment. Amino acid residues used to design the primers used in PCR are indicated by + + + + + + 3'.

After non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of DEAE eluted fraction, only one band of SOD activity, which was cyanide-resistant, was observed. The part of the gel corresponding to this band was excised. Eluted proteins were analysed on 12% SDS-PAGE (Fig. 1B). Two protein bands (23 and 28 kDa) were detected after silver staining. The main protein band (23 kDa) which corresponded to the theoret-

ical molecular mass deduced from the primary sequence of the SOD subunit was submitted to N-terminal microsequence analysis with the following result: V I T L P K L K Y A L N A L S P H I S E E T L N F H Y N K. The initial output of V-1 was 27 pmol, the amount of the last detectable residue K-29 was 0.6 pmol. The sample also contained a second polypeptide chain which differed from the first one by the presence of an

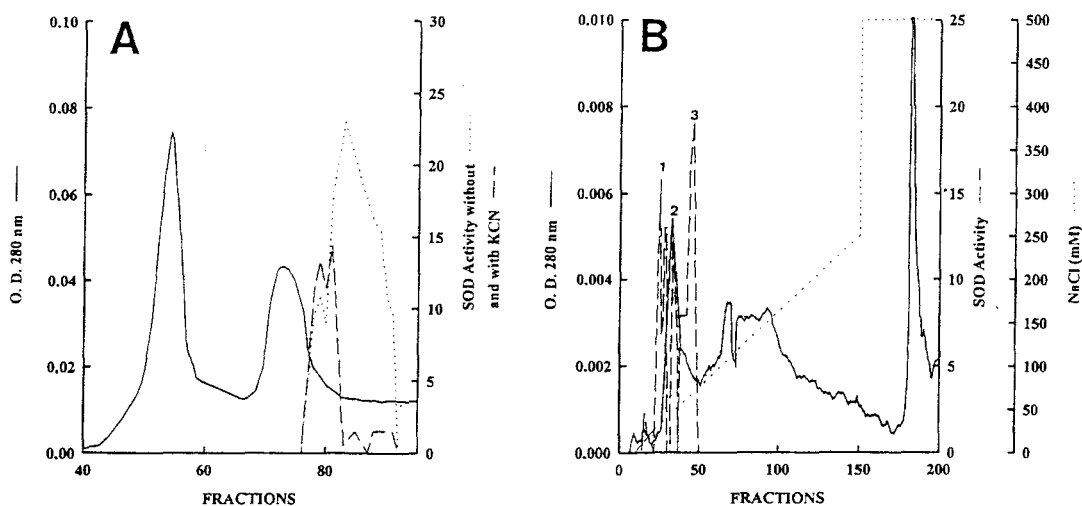


Fig. 3. Purification of SOD of *P. falciparum*. (A) Elution pattern for the gel filtration of the crude extract from *P. falciparum*. (B) Ion exchange chromatography on DEAE-Trisacryl. The fractions from gel filtration containing SOD activity were applied after pooling on a column (1.5 × 8 cm) and eluted with a linear gradient of NaCl. Peaks 1 and 2 correspond to pooled SOD activity of *P. falciparum*.

additional methionine residue preceding V-1. The initial output of this M-1 residue was 18.6 pmol. The N-terminal sequence of the purified parasite-derived SOD corresponded exactly to the sequence obtained by sequencing the cDNA (Fig. 2, underlined sequence), showing that the gene is expressed by the parasite under standard culture conditions.

The sequence of the SOD of *P. falciparum* was then compared with 32 known Fe- or Mn-SODs by DARWIN system. This analysis showed that the resulting sequence was related to typical Fe-SODs and quite different from Mn-SODs. The most related SODs seemed to be those of *Synechococcus* sp. and *Entamoeba histolytica*.

#### 4. Discussion

The present work consisted in the characterization of *P. falciparum* endogenous SOD through enzymatic activity, the determination of the protein sequence after cloning of cDNA, and verification of the expression of the gene through the purification of the enzyme and N-terminal sequencing.

The iron-dependent nature of the *P. falciparum* SOD has been established both from the sequence of the enzyme subunit and on the basis of action of specific inhibitors. As rodent malaria parasites exhibited a cyanide-resistant and hydrogen peroxide-sensitive SOD activity [16], this result could be expected for *P. falciparum*. As Ranz and Meshnick [14] detected a cyanide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistant SOD activity (deduced Mn-dependent) in this species, the precise characterization of the enzyme needed the determination of the protein sequence, which can allow to distinguish a typical Fe-SOD from an Fe-SOD structurally related to Mn-SODs as known in *Tetrahymena* [33], from a 'cambialistic' SOD [34] functional either with Mn or Fe in its active site, or from Mn-SODs. The purification of the protein and the determination of the complete sequence allowed us to conclude that the endogenous SOD activity expressed in standard *P. falciparum* cultures is a typical Fe-SOD, consisting of two subunits not linked by disulfide bonds. The comparison of protein sequences discriminates unambiguously this SOD both from cambialistic SODs, typical Mn-SODs and from the Fe-SOD of *Tetrahymena*.

Although several isoforms of SOD were detected in the crude extract of parasites by isoelec-

Table 1  
Purification of superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*

Purification step	Total protein (mg)	Total Units	Specific activity (Units/mg)	% inhibition by KCN
Homogenate	14.50	128	8.80	62
after G-75	0.35	17	49.0	65
after DEAE	0.02	3	150.0	10

The assays of SOD activity were determined by the method of Marklund (1974; Ref. [26], based on autoxidation of pyrogallol.

trofocusing, they correspond to a single N-terminal sequence after protein purification. The cDNA analysis confirmed this observation. The presence of two isoforms may be related to the instability of the enzyme, as suggested for the isoforms of *Tetrahymena* SOD by Barra et al. [33]. During the purification of *P. falciparum* SOD, we also observed a modification of the isoenzymes pattern, with an enrichment of the isoform at pI 6.2, which would be in accordance with this hypothesis.

In a previous report, an endogenous Mn-SOD activity, considered to be negligible on the basis of IEF results, was found in *P. falciparum* [13,14]. Moreover, the same authors concluded

that rodent malaria and *P. falciparum* internalize the host SOD [15,35] for their own protection. We have found that the endogenous activity of an extract of asynchronized *P. falciparum*, which is underestimated because of the contamination of extracts by internalized RBC content, is 20% of the total activity measured. Such an activity cannot be considered as negligible. The remaining 80% activity may correspond to the RBC SOD internalized in the digestive system of the parasite. However, this adopted SOD has never been proved to participate in the protection of other cellular compartments. The characterization of an endogenous *P. falciparum* Fe-SOD indicates that the parasite is able to defend its cytoplasmic compartment against superoxide anion, but do not exclude the existence of an Mn-SOD in the mitochondria [14]. Studies are in progress to localize this enzyme and to define its involvement in parasite protection both in normal conditions and under oxidant stress.

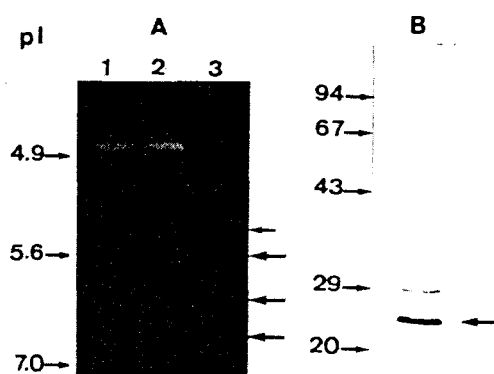


Fig. 4. (A) Analysis of the purification procedure of *P. falciparum* SOD by isoelectrofocusing of the sample from the different purification steps. The gel was stained for SOD activity. Lane 1, crude extract from *P. falciparum* (120  $\mu$ g); lane 2, after Sephadex G-75 (15  $\mu$ g); lane 3, after DEAE Trisacryl (2  $\mu$ g). (B) Analysis of the purified SOD on SDS-PAGE. The proteins were stained with silver nitrate. The arrow indicates the 23-kDa monomeric *P. falciparum* SOD (0.2  $\mu$ g).

#### Acknowledgements

The cDNA library was kindly provided by Steve Dolan.

The authors wish to thank Dr C. Odberg-Ferragut for fruitful discussions and Ms B. Leu, M. Mortuaire and A. Masset for their skillful technical assistance.

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

## References

- [1] W.H.O. (1994) World malaria situation in 1992. Parts I and II. Weekly Epidemiol. Rec. 69, 309–314 and 317–321.
- [2] Golenser, J., Marva, E. and Chevion, M. (1991) The survival of *Plasmodium* under oxidant stress. Parasitol. Today 7, 142–146.
- [3] Marva, E., Chevion, M. and Golenser, J. (1991) The effect of free radicals induced by paraquat and copper on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. Free Rad. Res. Commun. 12, 115–118.
- [4] Pied, S., Rénia, L., Nüssler, A., Miltgen, F. and Mazier, D. (1991) Inhibitory activity of IL-6 malaria hepatic stages. Parasite Immunol. 13, 211–217.
- [5] Dubey, M.L., Rai, S.K., Ganguly, N.K., Kalra, A., Varma, S.C. and Mahajan, R.C. (1991) Generation of reactive oxygen species by blood monocytes in human *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections. APMIS 99, 210–212.
- [6] Eze, M.O. (1991) Production of superoxide by macrophages from *Plasmodium chabaudi* infected mice. Cytobios 66, 93–104.
- [7] Golenser, J., Kamy, M., Tsafack, A., Marva, E., Cohen, A., Kitrossky, N. and Chevion, M. (1992) Correlation between destruction of malaria parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. Free Rad. Res. Commun. 17, 249–262.
- [8] Malhotra, K., Salmon, D., Le Bras, J. and Vilde, J.I. (1988) Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to a peroxidase-mediated oxygen-dependent microbicidal system. Infect. Immun. 56, 3305–3309.
- [9] Rockett, K.A. and Playfair, J.H.L. (1990) The role of reactive oxygen intermediates in vitro and in vivo – some comments – commentary. Blood cells 16, 602–6047.
- [10] Simoës, A.P.F.C., Van Den Berg, J.J.M., Roelofsen, B. and Op den Kamp, J.A.F. (1992) Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 298, 651–657.
- [11] Wozencraft, A.O. (1986) Damage to malaria-infected erythrocytes following exposure to oxidant-generating systems. Parasitology 92, 559–567.
- [12] Clark, I.A., Chaudhri, G. and Cowden, W.B. (1989) Some roles of free radicals in malaria. Free Rad. Biol. Med. 6, 315–321.
- [13] Fairfield, A.S., Abosch, A., Ranz, A., Eaton, J.W. and Meshnick, S.R. (1988) Oxidant defense system of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 30, 77–82.
- [14] Ranz, A. and Meshnick, S.R. (1989) *Plasmodium falciparum*: inhibitor sensitivity of the endogenous superoxide dismutase. Exp. Parasitol. 69, 125–128.
- [15] Fairfield, A.S., Meshnick, S.R. and Eaton, J.W. (1983) Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase. Science 221, 764–766.
- [16] Bécuwe, P., Slomianny, C., Camus, D. and Dive, D. (1993) Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species. Parasitol. Res. 79, 349–352.
- [17] Bécuwe, P., Slomianny, C., Valentin, A., Schrevel, J., Camus, D. and Dive, D. (1992) Endogenous superoxide dismutase activity in two *Babesia* species. Parasitology 105, 177–182.
- [18] Bécuwe, P., Van Beeumen, J., Samyn, B., Touzel, J.P., Slomianny, C., Camus, D. and Dive, D. (1994) Purification, characterization and aminoterminal sequence of the superoxide dismutase from *Babesia hyalomysci*. Comp. Biochem. Physiol. 109B, 637–645.
- [19] Meier, B., Sehn, A.P., Michel, C. and Saran, M., (1994) reactions of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* – An enzyme which is equally active with iron or manganese – Are independent of the prosthetic metal. Arch. Biochem. Biophys. 313, 296–303.
- [20] Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673–675.
- [21] 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.
- [22] Bessis, M. (1972) Cellules du sang normal et pathologique. Masson Ed. Paris, Vol. 1, pp. 31–32.
- [23] Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44, 276–287.
- [24] Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M. and Carewell, R.W. (1975) The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J. Lab. Clin. Med. 85, 337–341.
- [25] Mc Cord, J.M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049–6055.
- [26] Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47, 469–474.
- [27] Hyde, J.E., Kelly, S.L., Holloway, S.P., Snewin, V.A. and Sims, P.F.G. (1989) A general approach to isolating *Plasmodium falciparum* genes using non-redundant oligonucleotides inferred from protein sequences of other organisms. Mol. Biochem. Parasitol. 32, 247–262.
- [28] Bauer, J., Deely, D., Braman, J., Viola, J. and Weiner, M. (1992) pCR-Script SK(+) cloning system: a simple and fast method for PCR cloning. Strategies 5, 62–64.
- [29] Sanger, F. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467.
- [30] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- [31] Merrill, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211, 1437–1438.
- [32] Gonnet, G.H., Cohen, M.A. and Benner, S.A. (1992) Exhaustive matching of the entire protein sequence database. Science 256, 1443–1445.

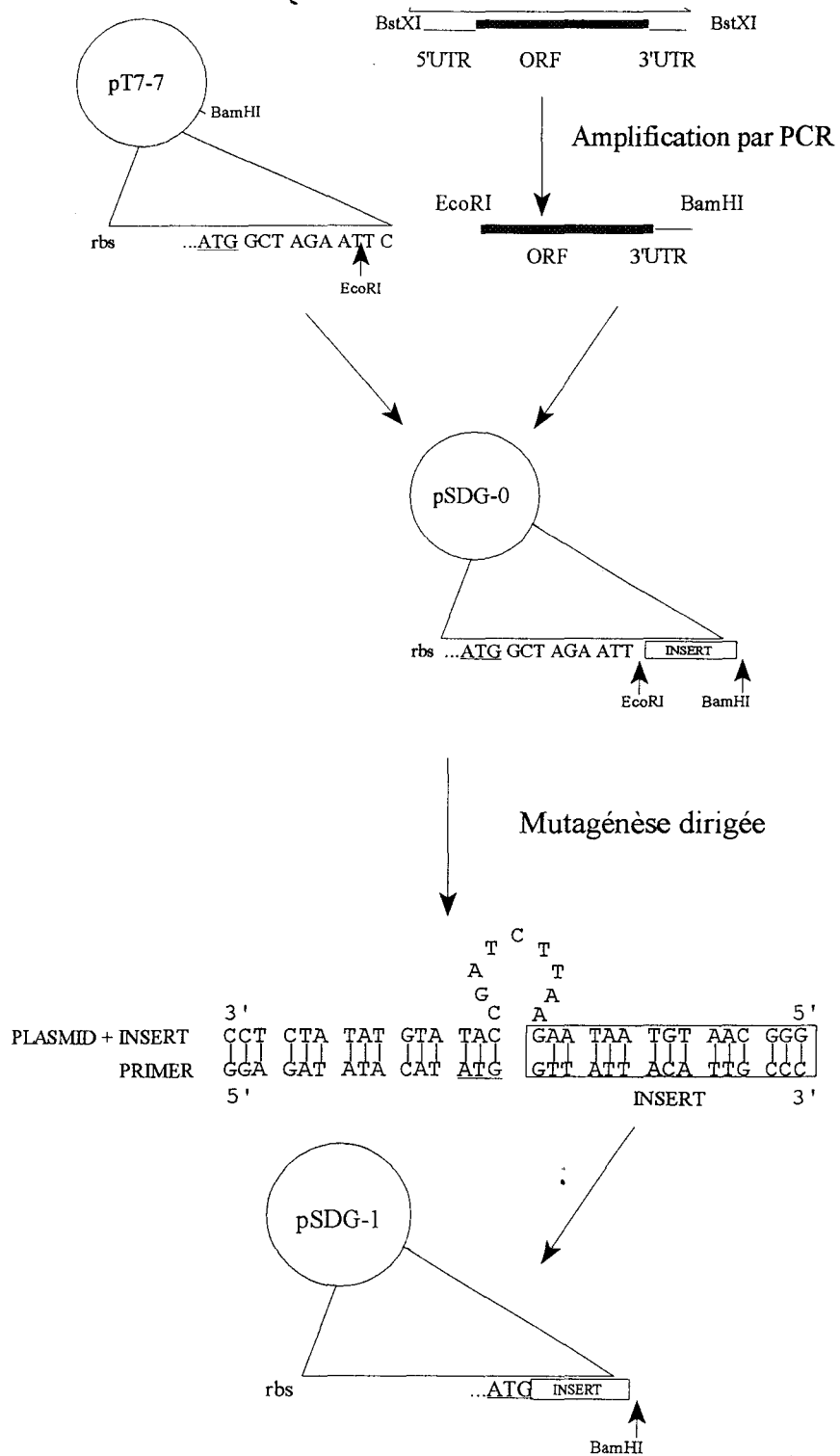
- [3] Barra, D., Schinina, M.E., Bossa, F., Puget, K., Durosay, P., Guissani, A. and Michelson, A.M. (1990) A tetrameric iron superoxide dismutase from the eucaryote *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* 265, 17680–17687.
- [4] Amano, A., Shizukuishi, S., Tsunemitsu, A. and Tsunasawa, S. (1992) Identity of amino acid sequences of superoxide dismutase purified from anaerobically maintained and aerated *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 7, 368–371.
- [35] Fairfield, A.S., Eaton, J.W. and Meshnick, S.R. (1986) Superoxide dismutase and catalase in the murine malaria, *Plasmodium berghei*: content and subcellular distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 25, 526–529.

**CHAPITRE VI :**  
**CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET BIOPHYSIQUE DE LA SOD**  
**A FER RECOMBINANTE DE *P. FALCIPARUM*.**  
**ROLE DU TRP 72 DANS CETTE ENZYME**

La caractérisation d'une SOD-Fe endogène chez *P. falciparum* (Bécuwe et coll., 1996) pourrait ouvrir de nouvelles approches en chimiothérapie. En effet, cette enzyme qui diffère des deux enzymes de l'hôte peut être sélectionnée pour un ciblage médicamenteux. Mais le développement d'inhibiteurs spécifiques de cette molécule demande une connaissance approfondie de sa structure et de son fonctionnement. Or, il est impossible de préparer, à partir des parasites, une quantité de protéine native suffisamment importante pour effectuer les études biochimiques et biophysiques nécessaires. Nous avons donc produit dans un système bactérien une protéine recombinante afin de confirmer d'une part la présence du fer dans cette SOD et, d'autre part, d'étudier sa structure par diverses approches biochimiques et biophysiques.

Les SOD-Fe et les SOD-Mn étant extrêmement proches d'un point de vue structural, il faut cibler une région de la protéine parasitaire qui soit suffisamment différente de celle de l'hôte pour pouvoir être spécifique. A part quelques exceptions (Meier et coll., 1982; Martin et coll., 1986; Pennington et Gregory, 1986), le métal cofacteur de ces enzymes est spécifique. D'autre part, la SOD-Fe peut être inhibée par 4 mM d'azide et est inactivée par le peroxyde d'hydrogène alors que la SOD-Mn exige une quantité beaucoup plus importante d'azide pour être inhibée et apparaît stable en présence de peroxyde d'hydrogène (Misra et Fridovich, 1978). Une explication de cette différence de sensibilité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène a été proposée par Meier et coll. (1994) qui ont observé que le résidu tryptophane proche du second résidu ligand (His74 pour *E.coli*) était conservé dans toutes les SOD-Fe sensibles à l' $H_2O_2$  et absent dans toutes les SOD-Mn. En conséquence, l'absence de ce résidu tryptophane et non la nature du métal cofacteur de la SOD pouvait être la cause principale de la sensibilité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. Nous avons donc réalisé une mutagenèse dirigée sur la protéine recombinante en remplaçant le tryptophane 72 (Trp72) en un résidu aliphatique, la valine 72 (Val72), dans le but de vérifier l'hypothèse de Meier. Si cette hypothèse s'avérait correcte, il devenait alors envisageable d'agir spécifiquement au niveau de ce résidu pour inactiver sélectivement la SOD parasitaire.





**Figure 21: Construction des plasmides**

## I. RESULTATS ET COMMENTAIRES DE L'ARTICLE 2.

Une très grande partie des résultats que nous allons exposer dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article intitulé : "Effect of mutagenesis of the tryptophan-72 residue on activity and hydrogen peroxide sensitivity of iron superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*. Biochemical and EPR study." Cet article est actuellement soumis au journal : *The Journal of Biological Chemistry*.

Nous insisterons sur certains points qui ont été donnés sans explications détaillées dans l'article.

### I.1 Construction des plasmides (Fig. 21)

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'ADNc de 1 kb comprenant les extrémités 5' et 3' non traduites (5' UTR et 3' UTR respectivement) ainsi que le cadre ouvert de lecture de 594pb est présent dans le plasmide pcDNAII. Afin de surproduire la SOD-Fe de *P. falciparum*, nous avons utilisé le système T7 ARN polymérase/promoteur de Tabor et Richardson (1985): le plasmide pT7-7 présente en amont du site multiple de clonage, le promoteur  $\Phi 10$  reconnu par l'ARN polymérase du phage T7 et le site rbs, séquence reconnue par la machinerie traductionnelle procaryotique.

#### I.1.1 Amplification par PCR de la région codante et du 3' UTR

Le plasmide pcDNAII nous a servi de matrice pour amplifier la région codante de l'ADNc et le 3' UTR de la SOD-Fe par PCR. L'amorce sens, spécifique de l'extrémité 5' de la séquence codante, présente un site *EcoRI* au niveau de l'ATG, alors que l'amorce antisens spécifique du 3' UTR possède un site *BamHI* en aval du codon stop. Le produit de PCR est digéré par *EcoRI* et *BamHI* puis inséré dans le plasmide pT7-7 aux sites de restriction correspondants, en tenant compte du cadre de lecture. Le sous-clonage de notre ADNc au site *EcoRI* a entraîné l'insertion de 3 acides aminés entre le codon ATG et la valine 2 résidu qui a été lui-même remplacé par une leucine 2. Le plasmide résultant appelé **pSDG-0** code donc pour une protéine différant de celle de *P. falciparum* dans sa partie N-terminale.

### I.1.2 Mutagénèses dirigées

Une première mutagénèse dirigée a permis d'éliminer les 3 acides aminés en excès et de changer la leucine en valine dans la protéine recombinante. Le plasmide codant pour la protéine recombinante sauvage a été nommé **pSDG-1**. Une deuxième mutagénèse dirigée a été réalisée afin de remplacer le tryptophane 72 en une valine (W72V). Le plasmide contenant la protéine recombinante mutée a été appelé **pSDG-2**.

### I.2 Construction des souches (réalisée à Paris sous la direction de D. Touati)

La souche sauvage K38/pGp1-2 (Tabor et Richardson, 1985) renferme le plasmide pGp1-2, compatible avec le plasmide pT7-7. Le plasmide pGp1-2 contient le gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 qui est sous le contrôle du promoteur du phage  $\lambda$  P<sub>L</sub>. A 30°C, une protéine thermosensible cI-857 se fixe sur le promoteur du phage  $\lambda$ , réprimant ainsi l'expression du gène de l'ARN polymérase.

Une transduction par le phage P1 de la souche sauvage va permettre d'introduire par recombinaison homologe les mutations sodA (gène codant pour la SOD-Mn) et sodB (gène codant pour la SOD-Fe) dans le génome bactérien. La présence de ces mutations entraîne l'inactivation de ces deux protéines dans la souche K38/pGp1-2 qui est appelée **QC2449**.

Cette souche QC2449 est ensuite transformée par le plasmide PSDG-1 et le plasmide PSDG-2 pour donner respectivement la souche **QC2450** (K38 sodA sodB/pGp1-2, pSDG-1) et la souche **QC2451** (K38 sodA sodB/pSDG1-2, pSDG-2).

### I.3 Surproduction des protéines recombinantes sauvage et mutée

La souche QC2450 est cultivée en fermenteur de 20 litres alors que la souche QC2451 est cultivée dans un erlenmeyer de 2 litres. Le protocole de ces cultures bactériennes, induisant la production des deux protéines recombinantes, est détaillé dans l'annexe technique.

### I.4 Purification des deux protéines recombinantes

#### a) La SOD-Fe recombinante sauvage

Nous avons purifié en 4 étapes la protéine recombinante sauvage à partir du culot bactérien QC2450, comprenant une dénaturation à la chaleur à 70°C, une précipitation au sulfate d'ammonium à 55 puis 80% de saturation, une chromatographie gel filtration ACA44 et une

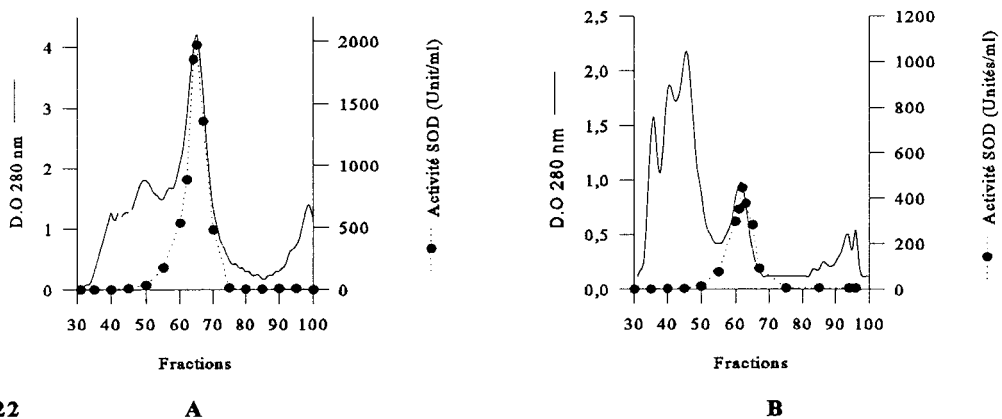


Fig : 22

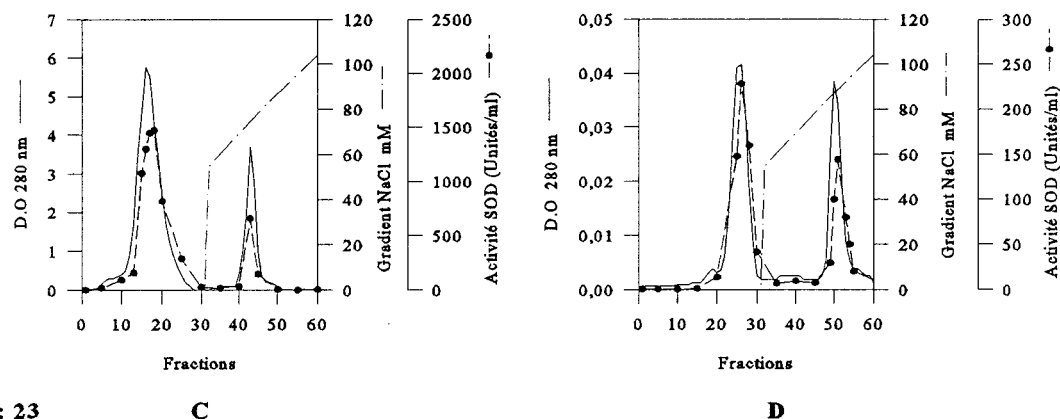


Fig : 23

**Figure 22 :** Chromatographie en gel filtration ACA 44 d'un extrait bactérien (souche QC2450) produisant la SOD sauvage (A); d'un extrait bactérien (souche QC2451) produisant la SOD mutée W72V (B).

L'éluion des protéines est suivie par la détection de l'absorbance à 280 nm (—). L'activité SOD est mesurée dans chaque fraction (-●-).

**Figure 23 :** Chromatographie sur DEAE-trisacryl de la SOD-Fe recombinante sauvage (C), de la SOD-Fe recombinante mutée W72V (D). Les protéines sont éluées de la colonne par un gradient linéaire de 55 à 112,5 mM de NaCl (---) et détectées à 280 nm (—). L'activité SOD est mesurée dans chaque fraction (-●-).

chromatographie échangeuse d'anions.

L'activité SOD a été dosée selon la méthode de Marklund, basée sur l'autooxydation du pyrogallol (Marklund et Marklund, 1974).

Le culot protéique obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation est repris et déposé sur une colonne ACA44. Au cours de l'élution des protéines, un seul pic d'activité SOD a été détecté (**Fig. 22A**). Les fractions contenant la SOD-Fe sont alors soumises à une chromatographie échangeuse d'ions. Après lavage de la colonne et élution par un gradient linéaire de NaCl (55mM à 112,5mM), nous obtenons deux pics d'activité SOD, l'un correspondant aux protéines non fixées sur la colonne, l'autre plus faible, correspondant à des protéines éluées à 76,5mM de NaCl (**Fig. 23C**). Le rendement de purification de la protéine recombinante sauvage est résumé dans le tableau 1.

	Volume (ml)	Protéines (mg)	Unités totales (U)	Activité spécifique (U/mg)	Purification (x)	Rendement (%)
Extrait Brut	31	647,9	117800	181,8	1	100
Dénaturation 70°C	27,5	418	102300	244,7	1,4	86,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 55%	29	150,8	101500	673,1	3,7	86,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 80%	5	108	93250	863,5	4,75	79,1
ACA 44	35	35	49300	1409	7,75	41,85
DEAE Trisacryl Fraction non retenue	0,8	28,9	47210	1631	9	40

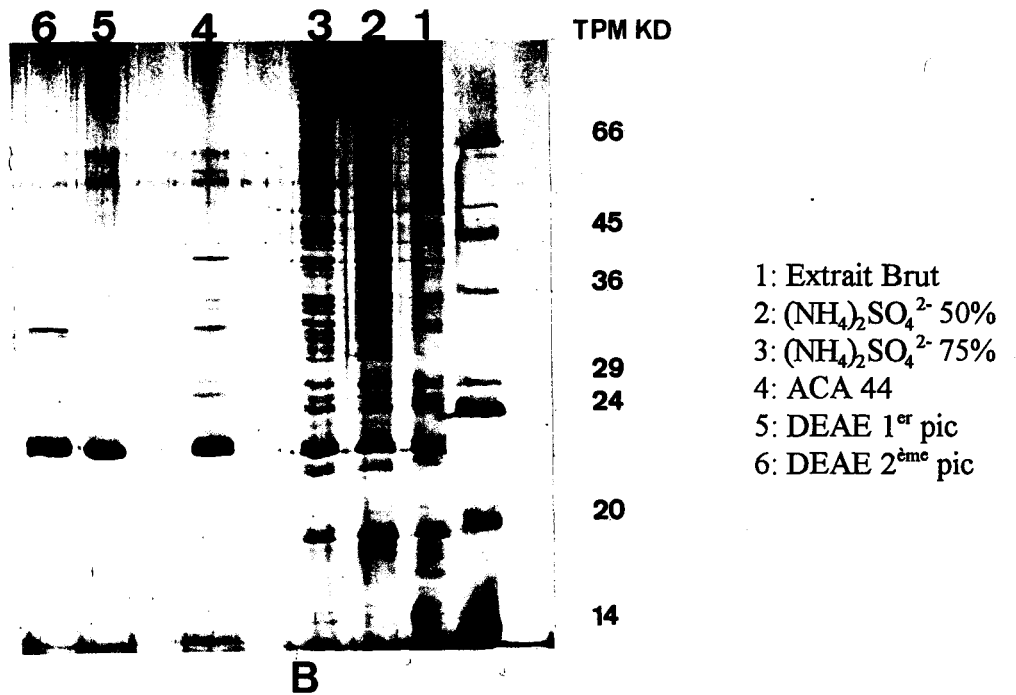
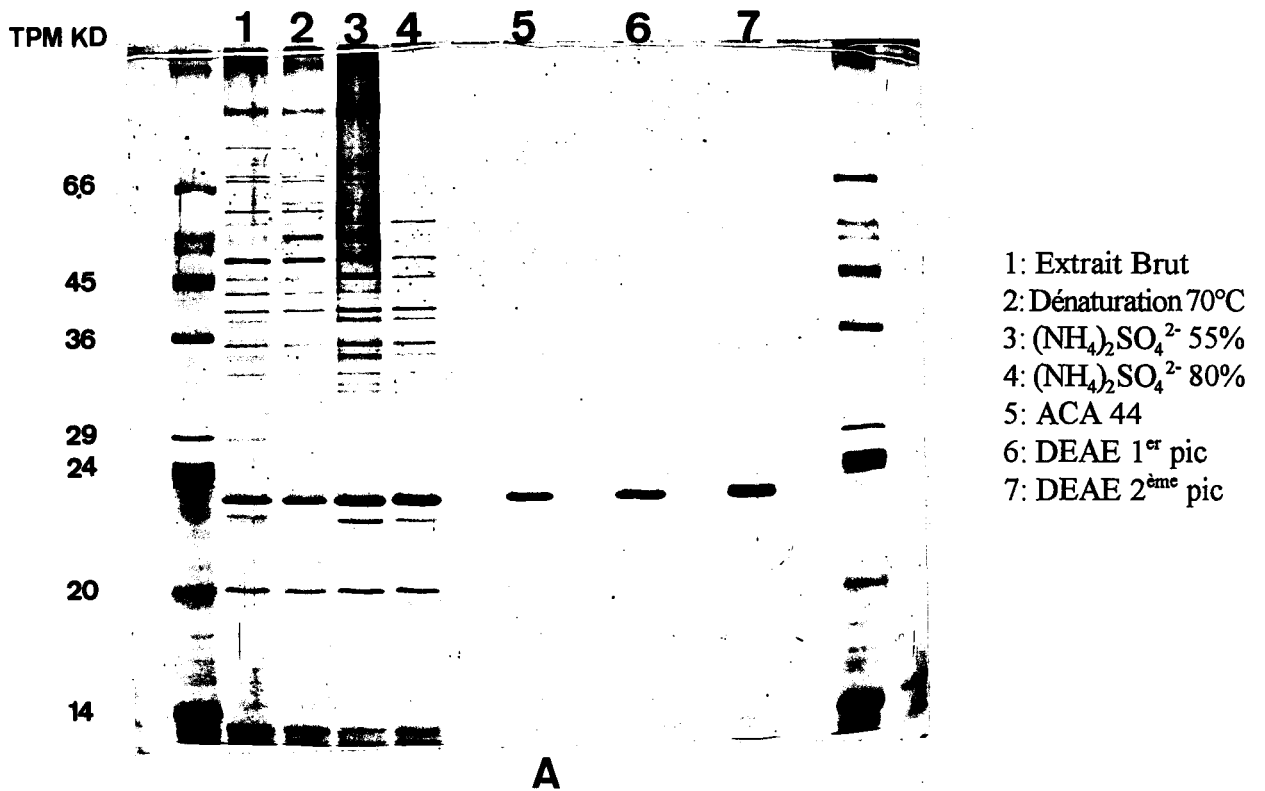
**Tableau 1** : Purification de la SOD-Fe recombinante sauvage de *Plasmodium falciparum*.

La protéine recombinante sauvage présente une activité spécifique de 1631U/mg de protéines.

#### b) La SOD-Fe recombinante mutée W72V

Par rapport au protocole utilisé pour purifier la protéine sauvage, la dénaturation à 70°C est éliminée et la précipitation au sulfate d'ammonium est réalisée à 50 puis 75% de saturation.

Après chromatographie gel filtration ACA 44, un seul pic d'activité SOD est détecté (**Fig. 22B**). Par contre, après chromatographie DEAE Trisacryl, deux pics sont visibles, le premier, le



**Figure 24:** Contrôle par SDS-PAGE des étapes de purification des SOD recombinantes sauvage (A) et mutée W72V (B). Les protéines sont colorées au nitrate d'argent.

plus important, représente la SOD non fixée sur la colonne, le deuxième pic correspond à la SOD, éluée à 76,5 mM de NaCl (**Fig. 23D**). Les résultats de la purification de la protéine recombinante mutée sont présentés dans le tableau 2.

	Volume (ml)	Protéines (mg)	Unités totales	Activité Spécifique (U/mg)	Purification (x)	Rendement (%)
Extrait Brut	23	501,4	90312	180,1	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 50%	19	180,5	80926	448,4	2,48	89,6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 75%	5	82,5	43666	530	2,94	48,35
ACA 44	44	14,5	8605	593,5	3,29	9,5
DEAE Trisacryl Fraction non retenue	0,8	5	4535	907	5,04	5,02

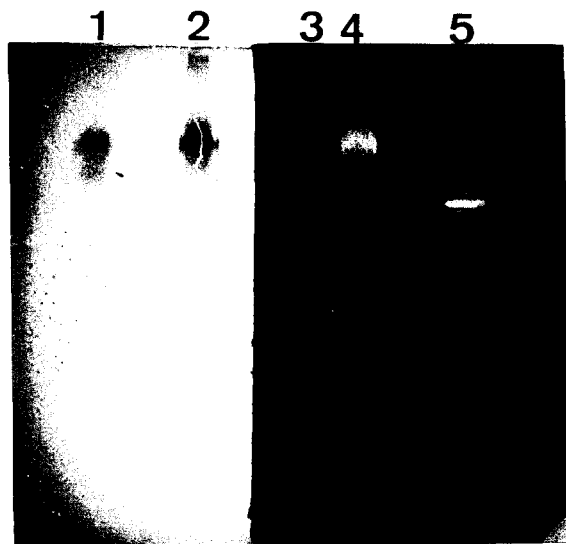
**Tableau 2:** Purification de la SOD-Fe recombinante mutée de *Plasmodium falciparum*.

L'activité spécifique de la protéine recombinante mutée est de 907 U/mg de protéines, soit 40% inférieure à celle de la protéine sauvage.

### I.5 Analyse électrophorétique des échantillons obtenus après purification

Les étapes de purification des protéines recombinantes sauvage et mutée ont été analysées en électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices (0,1M DTT) afin de vérifier la pureté des différents échantillons (**Fig. 24**). Après coloration des protéines au nitrate d'argent, une seule bande d'environ 23 kDa présente dans l'échantillon correspondant à la SOD non retenue sur la colonne échangeuse d'ions DEAE Trisacryl est visualisée (**Fig. 24A piste 6: SOD-Fe sauvage; Fig. 24B piste 5: SOD-Fe mutée**). Cette fraction purifiée sera utilisée pour les études biochimiques et biophysiques. Un gel SDS-PAGE en conditions non réductrices révèle une seule bande, montrant qu'aucun pont disulfure intrachaine et interchaîne n'est présent dans ces deux enzymes (non montré).

Les protéines recombinantes sauvage et mutée purifiées sont soumises à une électrophorèse en conditions non dénaturantes et colorées au bleu de Coomassie ou révélées selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Les bandes obtenues après coloration au bleu de Coomassie coïncident avec les bandes d'activité des 2 SOD (**Fig. 25**).



**Figure 25: Analyse de l'homogénéité des fractions purifiées.**

Les protéines sont soumises à une électrophorèse en conditions non réductrices.

A gauche: coloration des protéines au bleu de Coomassie.

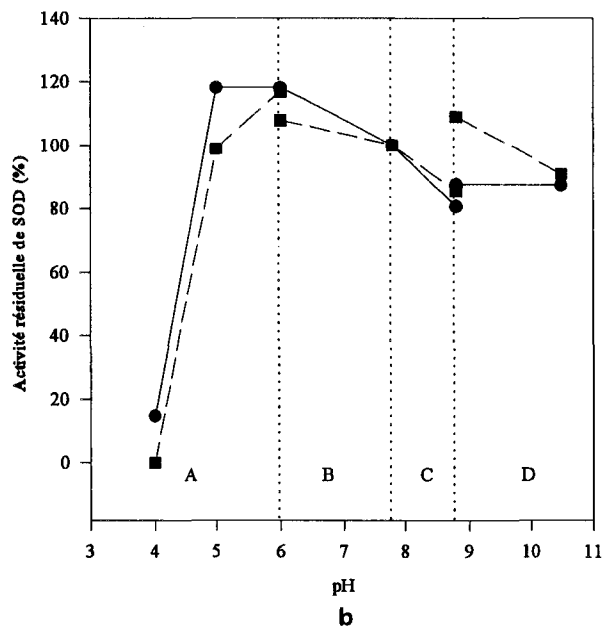
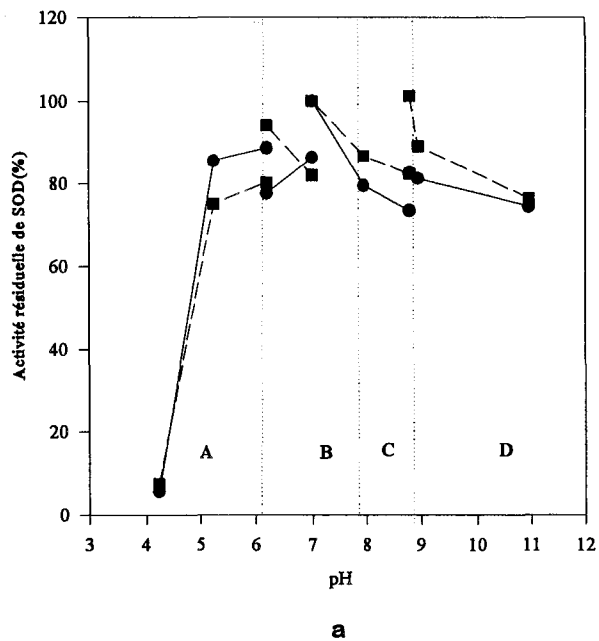
A droite: révélation de l'activité SOD par la méthode de Beauchamp et Fridovich.

Pistes 1 et 3: SOD-Fe sauvage

Pistes 2 et 4: SOD-Fe mutée W72V

Piste 5: SOD-Fe de *E. coli*.





### Figure 26: Effet du pH sur la stabilité de l'enzyme

Les SOD-Fe recombinantes sauvage et mutée sont diluées pour donner 1 unité d'enzyme dans les conditions standard. Les changements d'activité observés sont calculés en pourcentage. Les protéines sauvage (a) et mutée (b) sont incubées dans différents tampons à différents temps:

- A: acide citrique pH 4,0-6,0
- B: phosphate de sodium pH 6,0-7,8
- C: Tris/HCl pH 7,8-8,8
- D: glycine-NaOH pH 8,8-10,5

- temps d'incubation 5h
- temps d'incubation 24h

## **I.6 Caractérisation biochimique et biophysique des SOD-Fe recombinantes sauvage et mutée**

I.6.1 Identification du métal par spectrométrie d'absorption atomique (réalisée en collaboration avec Mr Philippo, Services des Eaux de l'Institut Pasteur de Lille)

L'analyse en spectrométrie d'absorption atomique réalisée sur la SOD recombinante sauvage révèle la présence de 1,7 atomes de fer par dimère, suggérant que chaque sous-unité contient un site ferrique mononucléaire.

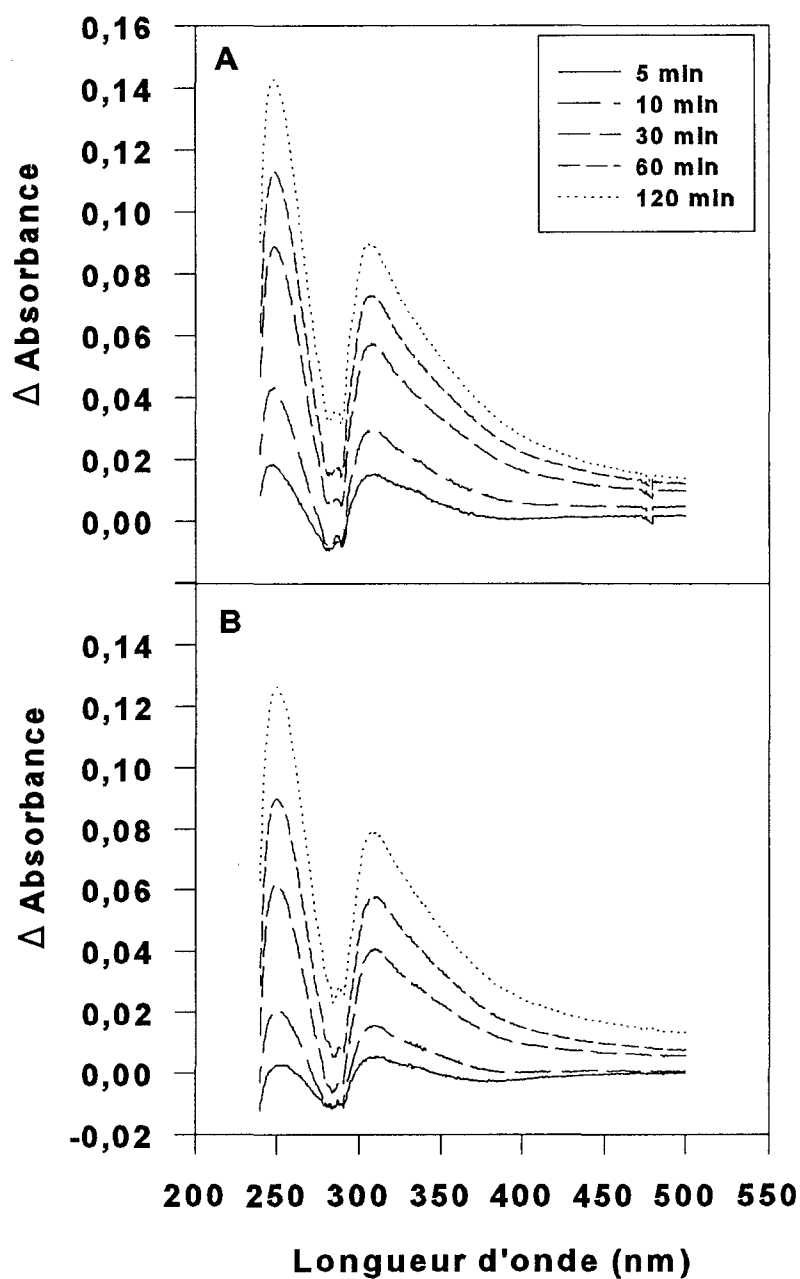
### **I.6.2 Caractéristiques biochimiques des SOD sauvage et mutée**

La stabilité des SOD recombinantes a été testée en fonction de la température (**Fig. 2 de l'article P118**) et du pH (**Fig. 26**). La SOD recombinante sauvage semble relativement stable à des températures élevées puisqu'elle est toujours active à 60°C. Par contre, à 70°C, l'activité de cette protéine commence à décliner. A cette température, l'activité de la SOD mutée décroît plus rapidement en fonction du temps que la protéine sauvage, indiquant que la protéine mutée est moins stable à haute température.

Par contre, aucune différence n'a été détectée dans le comportement des deux enzymes face au pH. En dessous de pH 4, les deux protéines sont inactivées alors que dans une gamme de pH comprise entre 5 et 10,5, les SOD sauvage et mutée présentent une activité maximale et constante, exceptée à pH 8,8 où une diminution de 20% de l'activité est observée. D'autre part, l'augmentation du temps d'incubation de nos deux protéines n'entraîne pas une perte d'activité de celles-ci.

I.6.3 Etude en RPE des SOD recombinantes sauvage et mutée (réalisée en collaboration avec S. Ménage et M. Fontecave, Université Joseph Fourier, Grenoble)

Le spectre RPE de la SOD recombinante sauvage (**Fig. 3A de l'article P119**) est assez complexe car il est constitué de deux signaux différents, reflétant la présence de deux types de fer dans le site actif de la protéine. Le premier signal est composé de trois résonances à  $g=4,8$ ;  $g=3,9$ ;  $g=3,6$ , caractéristiques d'un fer ferrique haut spin situé dans une symétrie presque rhombique, que nous nommerons FeA. Le second signal, moins bien résolu, centré à  $g=4,38$  indique la présence



**Figure 27 : Mesure de l'oxydation des tryptophanes dans les SOD traitées au peroxyde d'hydrogène.**

Les SOD-Fe recombinantes sauvage et mutée sont incubées avec 0,625 mM de  $H_2O_2$  dans du tampon Tris/HCl 10mM pH7,8. Les spectres de la SOD-Fe sauvage (A) et de la SOD-Fe mutée (B) ont été réalisés à différents temps d'incubation. Le spectre des SOD natives est soustrait des spectres correspondants aux SOD incubées avec  $H_2O_2$ . Aucune augmentation de l'absorbance n'est détectée dans la cuve témoin (SOD-Fe sauvage ou mutée incubées dans du tampon Tris/HCl 10mM pH7,8 en absence de  $H_2O_2$ ).

d'un fer ferrique haut spin situé dans une symétrie rhombique, que nous nommerons FeB. L'intensité relative de ces deux signaux varie en fonction du pH, le signal FeA étant plus important à pH alcalin (**Fig. 3A et 3B de l'article P119**). En effet, en soustrayant le spectre obtenu à pH 5 de celui obtenu à pH 7, il est possible d'obtenir le spectre "pur" correspondant au signal FeA (**Fig. 4A de l'article P120**).

La mutation du tryptophane 72 en valine 72 entraîne un changement drastique dans la proportion relative des deux signaux. On observe au même pH un signal beaucoup plus intense pour  $g=4,38$ , indiquant que le signal FeB est devenu prédominant dans la protéine mutée (**Fig. 3C de l'article P119**). En effet, la soustraction du spectre obtenu pour la SOD sauvage à celui obtenu pour la SOD mutée donne un spectre "pur" correspondant au signal  $g=4,38$  (**Fig. 4B de l'article P120**).

## **I.7 Mise en évidence de la sensibilité des deux protéines vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène**

### **I.7.1 Tests d'activité en présence de $H_2O_2$**

L'incubation des SOD recombinantes sauvage et mutée en présence de 2,5 mM d' $H_2O_2$  entraîne l'inactivation des deux enzymes. Quels que soient le temps d'incubation ou la concentration en peroxyde d'hydrogène, nous notons une sensibilité plus marquée de la protéine sauvage (**Fig. 5A et 5B de l'article P121**).

### **I.7.2 Mesure de l'oxydation des tryptophanes en spectrophotométrie**

Hachimori et coll., (1964) ont montré que l'oxydation des résidus tryptophane par le peroxyde d'hydrogène était accompagnée d'une augmentation de l'absorption aux environs de 320 et 260 nm et par une diminution de l'absorption à 280 nm. L'inactivation des SOD recombinantes sauvage et mutée de *P. falciparum* a été étudiée en spectrophotométrie UV. Elle s'accompagne d'une augmentation constante de l'absorption à 255 nm et 310 nm en fonction du temps. Ce résultat suggère donc que l'inactivation de ces deux protéines par le peroxyde d'hydrogène implique l'oxydation de résidus tryptophane (**Fig. 27**).

I.7.3 Dosage du fer libéré dans le milieu lors de l'inactivation des deux SOD recombinantes sauvage et mutée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'inactivation des deux protéines par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est accompagnée par une libération du fer dans le milieu, détectable en spectrophotométrie à 550 nm après chélation du métal par la bathophénantroline (**Fig. 6 de l'article P122**). La quantité de fer relargué augmente au cours du temps jusqu'à atteindre un plateau, indiquant une saturation. La libération du fer est à la fois plus rapide et plus importante pour la protéine sauvage par rapport à la protéine mutée. D'autre part, afin de vérifier la stabilité de nos deux protéines ainsi que l'inaptitude de la bathophénantroline à complexer le fer présent dans le site actif des protéines non dénaturées, nous les avons incubées avec le chélateur en absence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aucune sortie de fer n'est observée dans ces deux échantillons.

I.7.4 Etude des spectres RPE en présence du peroxyde d'hydrogène (réalisée en collaboration avec S. Ménage et M. Fontecave)

L'incubation de la SOD sauvage avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été suivie en spectroscopie RPE à 100K. Durant cette réaction, les signaux caractéristiques du Fe<sup>3+</sup> haut spin s'atténuent et un nouveau signal centré à g= 2 apparaît (**Fig. 7 de l'article P123**). Les propriétés de ce signal sont caractéristiques d'un radical organique. Cependant, l'intensité du spectre est trop faible pour permettre une identification de la structure hyperfine.

Le traitement de la SOD mutée W72V avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'entraîne pas la formation du radical organique. La disparition du signal Fe<sup>3+</sup> haut spin est beaucoup plus lente que dans le cas de la SOD sauvage (**Fig. 8 de l'article P124**). Une incubation prolongée des deux protéines avec le peroxyde d'hydrogène se traduit par l'apparition d'un signal g= 4,3 typique du fer libre, ce qui confirme les résultats obtenus avec la bathophénantroline.

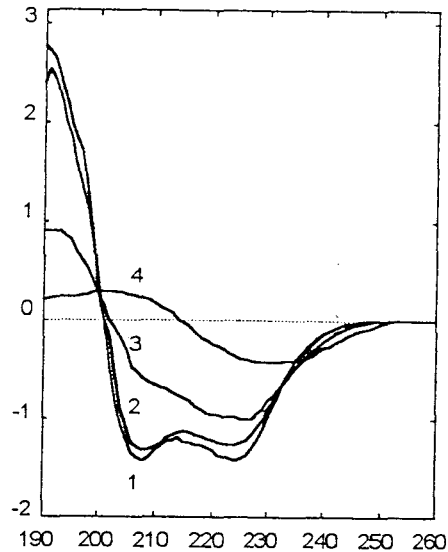
## II RESULTATS COMPLEMENTAIRES

II.1 Etude en spectroscopie optique : Dichroïsme circulaire (réalisée en collaboration avec M. Dauchez)

Ce travail n'a été réalisé pour l'heure que sur la protéine recombinante sauvage. Il nous

permet d'obtenir des informations sur la structure secondaire de la protéine présente en solution sous sa forme dimérique. Le spectre obtenu en dichroïsme circulaire varie en fonction de la température, indiquant un changement de conformation de la protéine (Fig. 28).

Fig. 28 : Spectres de la SOD-Fe sauvage obtenus en dichroïsme circulaire mesurés à température ambiante (1), 58°C (2), 70°C (3) et 75°C (4).



Jusqu'à 60 °C, nous n'observons pas de changement de conformation de la protéine qui contient 56 % d'hélices- $\alpha$  et 7% de brins- $\beta$ . Une diminution progressive du pourcentage d'hélices- $\alpha$  et une augmentation progressive de brins- $\beta$  sont observées lors de l'incubation de la protéine à des températures de 70°C et 75°C. Ces résultats corroborent ceux obtenus lors des dosages d'activité de la protéine qui montrent qu'au-dessus de 70°C, un changement de conformation survient dans la protéine, entraînant une perte d'activité.

### III DISCUSSION

Les résultats obtenus apportent des informations nouvelles et importantes sur trois points particuliers:

- 1- les propriétés spécifiques de la SOD de *Plasmodium falciparum*;
- 2- des données originales sur l'état du fer dans le site actif de la SOD de *P. falciparum*, celles-ci peuvent apporter des informations sur les autres SOD à fer;
- 3- le mécanisme de l'inactivation de la SOD de *P. falciparum* par le peroxyde d'hydrogène

qui peut se généraliser aux autres SOD à fer et le rôle du résidu Trp72 dans la SOD de *Plasmodium*.

-1- La SOD à fer de *Plasmodium falciparum*.

L'étude de la SOD recombinante de *P. falciparum* établit sans ambiguïté sa nature fer-dépendante sur la base de l'identification du métal en spectrophotométrie d'absorption atomique et de l'étude en RPE.

Cette SOD partage un grand nombre de propriétés avec les SOD à fer de la même famille phylogénique:

- c'est une protéine homodimérique d'environ 40 kDa dont les sous-unités ne sont pas liées par des liaisons covalentes. La masse moléculaire de la sous-unité, (voisine de 23000 Da), est très semblable à celle des SOD à fer de même type. Une seule SOD de masse moléculaire plus faible (voisine de 17500 Da) a été signalée chez *Cryptosporidium parvum* (Entrala et coll., 1996);

- l'enzyme contient un atome de fer par sous-unité, résultat déjà vérifié chez *Photobacterium leiognathi* et *P. sepiæ* (Puget et Michelson, 1974) et d'autres organismes. Seuls Yost et Fridovich (1973) ont signalé chez *E. coli* une SOD à fer contenant un seul atome de fer par dimère, mais ce résultat n'a pas été confirmé par les autres études réalisées sur la même espèce (Beyer et coll., 1991);

- le fer présent dans le site actif est sous la forme de fer ferrique à haut spin pentacoordonné. Ceci suggère fortement que les acides aminés ligands soient identiques à ceux définis par l'alignement des séquences peptidiques (3 His et 1 Asp). Un cinquième ligand doit également être présent soit sous la forme d'une molécule d'eau, soit sous la forme d'un ion hydroxyl (Lah et coll., 1995; Cooper et coll., 1995);

- l'enzyme est très sensible à l'action de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En revanche, l'enzyme de *Plasmodium* diffère également des SOD-Fe classiques par plusieurs caractères:

- c'est une protéine très thermostable puisqu'elle reste active jusqu'à 60°C alors que beaucoup de SOD-Fe sont stables jusqu'à 35°C- 40°C (Puget et Michelson, 1974; Kim et coll.,

1991). Les résultats obtenus en dichroïsme circulaire sont en accord avec ceux obtenus en dosage d'activité de la protéine recombinante sauvage. En effet, aucun changement de conformation n'est observé jusqu'à 60°C, alors qu'à 70°C, une diminution des hélices- $\alpha$  et une augmentation des feuillets- $\beta$  sont détectées dans la protéine, provoquant ainsi une chute de son activité;

- elle est plus stable à pH élevé. En règle général, les SOD-Fe sont inactivées à pH alcalin, au dessus de pH 8,8, à l'exception de la SOD-Fe d'*Aerobacter aerogenes* (Kim et coll, 1991) et de la SOD-Fe de *Photobacterium leiognathi* (Puget et Michelson, 1974).

La mutation W72V n'entraîne pas de modifications sensibles sur le plan biochimique: les deux protéines ont un comportement très semblable en gel filtration, en chromatographie échangeuse d'ions et en électrophorèse. Le comportement vis-à-vis du pH est également très voisin.

Les différences les plus notables sont:

- une activité spécifique plus faible de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage;
- une moins grande stabilité de la protéine mutée, qui perd très vite son activité. Cette instabilité se manifeste particulièrement à haute température;
- une sensibilité moindre de la protéine mutée au peroxyde d'hydrogène.

Un point particulier à souligner est le comportement des deux enzymes en échange d'ions où deux pics d'activité peuvent être détectés. L'hypothèse serait l'existence d'une population hétérogène de SOD recombinantes sauvage et mutée au sein de la bactérie qui présenteraient des conformations structurales ou des pI différents. Une isoélectrofocalisation réalisée sur ces deux fractions permettrait de répondre à cette question.

## -2- L'état du fer dans le site actif de la SOD-Fe de *Plasmodium*.

Deux signaux correspondants à 2 environnements de l'ion ferrique sont détectés en RPE. Les valeurs de  $g= 4,8$ ;  $3,9$  et  $3,6$  montrent la présence d'un ion ferrique situé dans une symétrie partiellement rhombique appelé FeA, alors que le signal centré à  $g= 4,38$  indique un ion ferrique situé dans une symétrie quasi rhombique appelé FeB. Ce spectre RPE constitué de ces deux signaux n'est pas exceptionnel, puisqu'on les retrouve dans des proportions variables dans les SOD d'autres organismes. En effet, la SOD-Fe de *E. coli* possède essentiellement le site de type FeA



(Skylhouse et Fee, 1976), alors que la SOD-Fe de *P. ovalis* présente un mélange des sites FeA et FeB (Yamakura, 1976), la proportion de ces deux sites étant proche de celle observée pour la SOD-Fe de *P. falciparum*. Par contre, *P. shermanii* possède le site FeB en majorité (Meier et coll., 1995). En général, le rapport FeA/FeB varie en fonction du pH. Ceci peut être dû à des modifications survenues au niveau du site de coordination de la molécule d'eau ou à la présence d'un acide aminé ionisable proche du site actif.

Le remplacement du tryptophane 72 en une valine a un effet drastique sur le spectre RPE de la protéine, révélant une prédominance du fer sous la forme FeB dans la protéine mutée W72V. Ceci suggère fortement que le résidu tryptophane 72 agirait indirectement par l'intermédiaire du résidu ligand au niveau du centre ferrique. La mutation de ce résidu pourrait affecter la longueur et l'énergie de liaison de l'histidine ligand (His 74) avec le métal, provoquant un changement de symétrie du site ferrique.

La différence des activités spécifiques entre les SOD-Fe recombinantes sauvage et mutée peut s'expliquer par un changement du rapport site FeA/FeB. La présence majoritaire du site FeB dans la protéine mutée W72V entraînerait une diminution de l'activité spécifique de cette protéine, suggérant que ce site ait une affinité plus faible pour l'anion superoxyde.

-3- Inactivation de la SOD-Fe de *Plasmodium* par le peroxyde d'hydrogène et rôle du résidu Trp72.

Comme une grande partie des SOD-Fe, la SOD de *P. falciparum* est rapidement inactivée par  $H_2O_2$ . Cette inactivation semble impliquer l'oxydation des résidus tryptophanes et la perte de l'ion ferrique comme l'indiquent l'étude en spectrophotométrie, le test à la bathophénantroline et l'apparition du signal en RPE centré à  $g=4,3$  caractéristique d'un fer libre.

Bien que les deux protéines soient inactivées par l' $H_2O_2$ , la SOD-Fe sauvage présente une sensibilité plus marquée vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. Ceci peut s'expliquer par la différence entre le rapport site FeA/ site FeB entre les deux protéines. En effet, la protéine sauvage possède en grande majorité le site FeA alors que dans la SOD mutée, le site FeB prédomine. Une des hypothèses serait que le site FeA présente une affinité plus importante pour l' $H_2O_2$  ce qui impliquerait une plus grande sensibilité de la SOD-Fe sauvage vis-à-vis de cet inhibiteur. Dans la



protéine mutée, le site FeB étant prédominant, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  se fixerait statistiquement moins rapidement et en quantité moins importante sur le site FeA, expliquant ainsi la disparition plus lente du signal centré à  $g=4,8$  caractéristique du site FeA dans la protéine mutée. D'autre part, le résultat montrant la différence du taux de relargage du fer entre les deux protéines abonde dans ce sens. En effet, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  se fixerait préférentiellement sur le site FeA, entraînant ainsi sa libération dans le milieu qui est mesurée en spectrophotométrie et caractérisée par l'apparition d'un signal détecté en RPE, typique du fer libre. Le site FeA étant plus abondant dans la protéine sauvage, son inactivation s'accompagnerait d'une plus grande libération du fer dans le milieu.

Une des hypothèses de ce travail est donc que la fixation du peroxyde au métal entraîne la formation d'un complexe intermédiaire, le "peroxo-fer" qui constitue la première partie de la réaction. Ensuite, un transfert d'électrons provenant de tryptophanes ou d'autres résidus va jusqu'au complexe intermédiaire, créant ainsi l'oxydation, l'inactivation de la protéine et le relargage du fer dans le milieu. Durant cette réaction, un radical organique caractérisé par un signal en RPE à  $g=2$  est transitoirement formé. Le fait que ce signal ne puisse être détecté lors de la réaction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec la SOD mutée W72V suggère que ce radical est localisé sur le résidu tryptophane 72, comme un radical tryptophanyl ou comme un radical peroxy dérivé à partir de la réaction du résidu tryptophane avec l'oxygène moléculaire ( Sahlin et coll., 1994; Degray et coll., 1997). Cependant, d'autres études sont exigées pour identifier avec précision ce radical organique. Par exemple, il est possible que la mutation ait affecté la chaîne de transfert d'électrons, empêchant ainsi la formation d'un radical qui serait loin du tryptophane 72.

Il serait possible d'aborder ce problème en étudiant plus précisément en RPE une SOD à fer contenant un résidu Phe ou Tyr dans cette position. Ce pourrait être la SOD de *P. falciparum* modifiée par mutagenèse dirigée, ou une SOD provenant d'un autre organisme. Il serait alors préférable de sélectionner la tyrosine comme résidu car le radical tyrosinyl est détectable en RPE. Si l'inactivation de cette SOD par  $\text{H}_2\text{O}_2$  entraînait l'apparition d'un radical tyrosinyl, ce résultat viendrait renforcer notre hypothèse sur la localisation du radical formé lors de l'inactivation de la SOD sauvage de *P. falciparum* par le peroxyde d'hydrogène. Une telle étude apporterait donc des données nouvelles sur le comportement des SOD à fer vis-à-vis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et sur la fonction de l'acide aminé aromatique spécifique de ces SOD.

#### IV. CONCLUSION

A partir de tous ces résultats, plus aucun doute ne subsiste sur la nature fer dépendante de la SOD de *P. falciparum*. Cette SOD-Fe présente deux sites mononucléaires ferriques dans son homodimère, et une sensibilité importante vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène, caractéristiques de nombreuses SOD-Fe. D'autre part, le remplacement du tryptophane 72 par une valine amène à infirmer l'hypothèse de Meier qui pensait que ce résidu était responsable de l'inactivation des SOD-Fe par le peroxyde d'hydrogène. Or, la SOD mutée reste toujours sensible au peroxyde d'hydrogène. Cette mutation sur ce tryptophane a permis de dévoiler en partie le rôle de ce résidu dans la protéine. Premièrement, cet acide aminé ne semble pas essentiel pour l'activité de l'enzyme puisque la protéine mutée présente une activité spécifique de 903U/mg de protéines. Deuxièmement, il interviendrait au niveau du site actif par l'intermédiaire du résidu ligand His 74, son remplacement par une valine entraînerait un changement dans la symétrie de l'ion ferrique. Troisièmement, ce tryptophane pourrait être le radical organique produit lors de l'inactivation de la protéine sauvage par le peroxyde d'hydrogène. Quatrièmement, ce résidu ne serait pas responsable ou en tout cas pas le seul responsable, de l'inactivation des SOD-Fe par l' $H_2O_2$ . Un ciblage médicamenteux impliquant ce résidu ne semble donc pas une voie intéressante pour le développement de nouveaux antimalariques.

Effect of mutagenesis of the tryptophan-72 residue on activity and hydrogen peroxide sensitivity of iron superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*. Biochemical and EPR study.

Sylvie Gratepanche<sup>‡</sup>, Stéphane Ménage<sup>\*</sup>, Danièle Touati<sup>§</sup>, Carmen Odberg-Ferragut<sup>‡</sup>, Marc Fontecave<sup>\*</sup>, Annick Masset<sup>‡</sup>, Christian Slomianny<sup>‡</sup>, Daniel Camus<sup>‡</sup> et Daniel Dive<sup>\* ‡</sup>.

<sup>‡</sup>INSERM U42, 369 rue Jules Guesde, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq cedex, France

<sup>\*</sup> L.E.D.S.S., Laboratoire de Chimie Bioinorganique, Université J. Fourier, URA CNRS 332, BP 53X, 38041 Grenoble Cedex, France

<sup>§</sup> Institut Jacques Monod, CNRS-Université Paris VII, 2, Place Jussieu, 75251 Paris cedex 05, France

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel : (33)-20-47-24-02; Fax : (33)-20-05-91-72

## Summary

To study involvement of the Trp72 residue of the iron-containing superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum* in hydrogen peroxide sensitivity, the residue was replaced by valine (Fe-SODW72V) by directed mutagenesis. Recombinant wild type and mutant proteins were produced in a SOD-deficient strain of *Escherichia coli*, purified and characterized Electron Paramagnetic Resonances. Analysis of wild type SOD showed two different signals, reflecting the presence of two different types of Fe site. The first signal corresponded to a ferric high spin iron in a nearly rhombic symmetry. The second signal, centered  $g=4.38$ , was indicative of a ferric iron in a rhombic symmetry. The tryptophan 72 to valine mutation led to a large change in the relative proportion of the two signals, with a pronounced increase of the  $g=4.38$  signal in the Fe-SODW72V mutant. The mutant protein was only slightly less sensitive than the wild type protein to inactivation by  $H_2O_2$ , indicating that tryptophan at position 72 is not essential for the sensitivity of Fe-SOD to  $H_2O_2$ . The specific dismutase activity and thermal stability were both lower for the mutant than wild type Fe-SOD, implying that tryptophan-72 may play a structural role, possibly in the conformation of the active site (presumably through hydrogen bonding to the metal ligand histidine-74).

## INTRODUCTION

*Plasmodium falciparum* is the causative agent of malaria, the most prevalent parasitic disease in the world. The emergence of *Plasmodium* resistance to currently used antimalarial agents, is reversely restricting of treatment available for patients in endemic areas (1). This problem has stimulated investigations parasite-specific metabolic pathways and enzymatic machineries, in an attempt to find new selective and efficient drugs.

*P. falciparum* has specific antioxidant enzymes, for protection against the highly oxidizing iron- and oxygen-rich environment where it grows (the human red blood cell). Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) genes have been characterized in the parasite (2,3). Both are only found in the parasite and not in the host and are therefore possible pharmacological targets. SODs are metalloenzymes which catalyze the dismutation of superoxide radicals to give hydrogen peroxide and molecular oxygen (4). Three classes of SODs are known: copper- and zinc-containing SODs (Cu/Zn-SOD), found in the cytoplasm of eukaryotes and also in periplasmic space of a few bacteria (5, 6), manganese-containing SODs (Mn-SOD) and iron-containing SODs (Fe-SOD), both found in prokaryotes and in the chloroplasts of eukaryotes. MnSOD is also found in the mitochondrial matrix of eukaryotes. The aminoacid sequence of *P. falciparum* SOD (*P.f.*SOD) suggests that it is an Fe-SOD (2), thus different to SODs of its host (Mn-SOD and Cu/Zn-SOD). A more complete characterization of the parasite enzyme is necessary to distinguish it from Mn-SOD.

Mn- and Fe-SODs are structural by similar and are thought to have a common ancestral origin (7, 8). The active sites of these enzymes are remarkably similar (9, 10) although the molecular basis for the metal specificity still remains unclear (11). However, some species have another class of SOD (named "cambialistic" SOD) which can accommodate either iron or manganese, depending on metal availability, and conserve activity (12,13). The first three-dimensional structure of such a SOD (from *Propionibacterium shermanii*), was recently solved and the active site is not significant by different to those of strictly Fe-dependent and strictly Mn-dependent SODs (14).

SODs can be distinguished from each other according to sensitivity to inactivation by hydrogen peroxide (4). Fe-SODs are generally very sensitive whereas Mn- and cambialistic SODs are much more resistant. Meier et al (1994) observed that a tryptophan residue (tryptophan 73 in *E. coli* FeSOD) near one of the histidine metal ligands is conserved in all H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive FeSODs and is absent from all MnSODs. In the few examples of resistant Fe-SODs, like *Methanobacterium thermoautotrophicum* SOD, there is a valine at the corresponding position (15). Therefore they suggested that the absence of this tryptophan residue, and not the metal content of the SOD, is the main cause of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity (13,16). This agrees with the observation that the tryptophan content of the protein decreased during exposure to hydrogen peroxide (17,18). The *P.f.* SOD carries a tryptophan at that position and thus expected to be hydrogen peroxide sensitive. We overproduced the *P. falciparum* SOD in *E. coli*, and purified and characterized the recombinant protein by biochemical and spectroscopic methods. We confirm that *P. falciparum* SOD is an Fe-dependent dimeric enzyme, and is sensitive to hydrogen peroxide. Further to elucidate the relationship between tryptophane at position 72 and sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, we mutagenized this residue and compared properties of the mutant and the wild type proteins.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Nitro blue tetrazolium, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline disulfonic acid (Bathophenanthroline) and the reagents for SOD assays were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). The reagents for protein determination were obtained from Pierce, Interchim (France). ACA 44 and DEAE Trisacryl M were from Biosepra (France). The Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit was from Clontech (Ozyme, France). The Sequenase version 2.0 kit for the DNA sequencing was from United States Biochemical (USB, Cleveland, USA). Microprodicon™ Membranes MWCO 15,000 were from Spectrum (Houston, TX).

### Plasmid and strain constructions

Construction of pSDG-1 and pSDG-2: The T7 RNA polymerase/promotor system of Tabor and Richardson (19) was used to overproduce the SOD protein of *P.falciparum*. *Plasmodium falciparum* Fe-SOD cDNA was introduced into pT7-7 in two steps (fig1). The whole coding region of Fe-SOD cDNA and the 3' untranslated region (2) were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), using as template the plasmid pcDNAII containing the FeSOD cDNA. The sense primer 5' CCGGAATTCTTATTACATGCCC 3' created an EcoRI site at the position of the ATG site of the SOD coding sequence, and the antisense primer 5' CGGGATCCCAGTGTGCTC 3' created a BamHI site downstream from the stop codon. The PCR product was digested with EcoRI and BamHI and inserted into pT7-7 at the corresponding sites in frame with the translation start site of the T7 gene 10 protein, using standard techniques (20). The resulting plasmid, pSDG-0, which encodes an hybrid SOD protein (Fig1) was further mutated by site directed mutagenesis to obtain pSDG-1, which carries the sequence encoding the wild type P.f SOD. The tryptophan 72 codon (TGG) was changed to a valine codon (GTG) by site-directed mutagenesis using the primer 5' CAACGCTGCTCAAATAGTGAACC ATACTTTTACTGGG 3'. The resulting plasmid was called pSDG-2.

QC2449 is K38(pGP1-2) (21) in which the sodA and sodB mutations were introduced by transduction. QC2449 was transformed with plasmids pSDG-1 and pSDG-2 leading to QC2450 (K38 sodA sodB/pGP1-2, pSDG-1) and QC2451 (K38 sodA sodB/pGP1-2, pSDG-2). QC2449 transformed with pT7-7 was used as a SOD defective control.

### DNA Sequencing

Plasmids PSDG-1 and PSDG-2 were prepared by the alkaline denaturation method (22). Double strand DNA sequencing of the *Pfsod* region was performed using the dideoxy chain termination method of Sanger (23) with the Sequenase Kit (USB, Cleveland, USA).

### Overproduction of SOD proteins

To overproduce wild type protein, strain QC2450 was grown in a fermenter (Setric, capacity 50l) containing 20 l of enriched medium (2% Bactotryptone, 1% Yeast Extract, 0.5% NaCl, 0.2% Glycerol, 50mM KPO<sub>4</sub> pH 7.2) in presence of ampicillin (75 µg/ml) and kanamycin (75 µg/ml). The culture was incubated at 30° C with gentle shaking (250 rpm). Once it had grown to 1.5 O.D (590 nm). The temperature was raised to 42° C for 30 min and then returned to 37° C for 90 min . Cells were then harvested by continuous flow centrifugation (CEPA) at 35,776 g. The bacterial pellet was stored at -80° C until use for SOD purification. To overproduce mutant protein the strain QC 2451 was grown in 2 l of the same medium following the same temperature conditions. Bacteria were pelleted at 4° C ( 5000g, 10min, Beckman JA-20 rotor) and stored as above.

### **Purification of the wild type and mutated *P.f.* Fe-SODs**

Crude extract preparation: 5g bacterial pellets of the strains QC 2450 and QC2451 were resuspended in 30 ml extraction buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10<sup>-2</sup>M,pH7.4, EDTA 10<sup>-4</sup>M) and immediately chilled on ice. Cells were disrupted by passage through a French press at 1260 bars and the lysate was clarified by centrifugation at 13,000g for 30 min.

Protein purification: Crude extract of strain QC 2450 was heated at 70° C for 5 min. Denatured proteins were precipitated by centrifugation for 30 min at 13,000g and discarded. Solid ammonium sulfate was gradually added to the supernatant to 55% saturation with constant stirring over a period of 60 min at 4° C. The insoluble fraction was eliminated by centrifugation for 30 min at 13000g. Solid ammonium sulfate was again added to the supernatant to 80% saturation, and the sample incubated for 2 hours at 4° C. The resulting precipitate was collected and dissolved in buffer A (Tris/HCl 10mM, pH 7.8), then fractionated by gel filtration chromatography on a 2.5 x100 cm ACA44 column. Proteins were eluted with buffer A at a 30 ml/hr flow rate. Five ml fractions containing SOD activity were pooled and applied to an ion-exchange DEAE-Trisacryl M (2.5 x 30 cm) column, equilibrated with buffer A. Unbound material was eluted with buffer A. The column was developed using a NaCl gradient from 55 mM to 112.5 mM in the equilibration buffer. The flow rate was 24 ml/hr and 3 ml fractions were collected. The fractions containing SOD activity were pooled, dialysed against Tris/HCl 10mM pH 7.8, concentrated at 4° C in Microprodicon TM Membranes MWCO 15,000, and stored at -80° C. The same purification protocol was used for the extract of QC2451 strain with the following modifications. As the mutated protein seemed to be more heat sensitive than the native protein, the denaturation step at 70° C was omitted. Furthermore, ammonium sulfate was added to 50% and 75% saturation instead of 55% and 80%.

### **Protein and SOD activity measurements**

Protein concentrations were determined according to Lowry (24), using bovine serum albumin as a reference protein. SOD production and purity was checked by SDS/ polyacrylamide gel electrophoresis followed by staining with Coomassie brilliant blue (25) or silver staining according to Merril et al (26). SOD activity was determined by the pyrogallol autooxidation method according to Marklund and Marklund (27), and visualized on gels according to Beauchamp and Fridovich.(28).



### **Protein stability studies**

Thermal stability was studied by incubation of the enzymes at 70°C in 10mM Tris/HCl, pH 7.8. Aliquots were withdrawn after various times and transferred immediately onto ice before determination of the residual enzymatic activity. The effect of pH on the stability of Fe-SOD was examined by incubation of the enzyme for 5 or 24 h in 50mM buffer at various pH values from 4 to 10.5 (pH 4.0-6.0, citric-citrate; pH6.0-7.8, potassium phosphate; pH7.8-8.8, Tris-HCl; pH8.8-10.5, glycine-NaOH). The pH of the incubation mixture was measured immediately after addition of the enzyme (to a final concentration was 80 µg/ ml). After incubation, the activity of samples was assayed as above.

### **Iron measurements**

A Varian AA20 spectrometer was used to determine metal content by atomic absorption spectrometric analysis.

*Measurements of iron release:* Aliquots of 150 µg of protein (native SOD or mutated SOD) were incubated in Tris/HCl 10 mM (pH 7.8) with 0.625 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 2.3 mM bathophenanthroline for 3 hours. The kinetics of the chelation of released iron by bathophenanthroline was monitored with a spectrophotometer Uvikon 930 (Kontron Instruments) at 550nm.

### **Electron Paramagnetic Resonance (EPR) studies**

X band EPR spectra were recorded with an EPR spectrometer ESP 300E working at a 9.42 GHz at 100K with a microwave power at 20 mW and a field and frequency modulation of 10 Gauss and 100 KHz. The spectra at 4 K were obtained with a Varian E102 with a 9.23 GHz frequency, a microwave power at 500 mW and a field modulation of 10 Gauss using an Oxford cryostat. Saturation studies were performed at 10 K. The P1/2 value was estimated graphically from the graph  $\log[\text{Int}/P1/2] = f(\log P)$ . Protein concentrations were 6 mg/ml for the native and 2.25 mg/ml for the mutated protein at pH=7.8. Incubations with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were performed in a quartz tube at room temperature and followed by EPR spectroscopy (conditions: 75 µl 2.25mg/ml SOD + 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mM + 75 µl H<sub>2</sub>O). The intensity of each signal was obtained from the distance between the maximum of the signal and the baseline extrapolated in the 500 Gauss region.

## RESULTS

### Production and purification of *P. falciparum* superoxide dismutase.

The cDNA coding for *P. falciparum* SOD was expressed in a SOD deficient strain of *E. coli* from the T7 promoter. Wild type and Trp72Val mutant *P.f.* SODs were purified to homogeneity, as verified by polyacrylamide gel electrophoresis (not shown), by ammonium sulfate precipitation of *E. coli* extracts followed by gel filtration on AcA44 and ion-exchange chromatography on DEAE. The results of the purification are shown in Tables 1 and 2.

On denaturing gels, each protein appeared as a single band of 23 kD molecular mass both in the presence or in the absence of dithiothreitol. Gel filtration on Sephadex G75 demonstrated that the purified enzyme was a dimer (data not shown). Non denaturing gels stained either for protein (Coomassie blue staining) or for SOD activity, gave a spot at the same position.

### Biochemical characterization of wild type and mutant enzymes.

Iron determination for wild type enzyme gave a value of 1.7 Fe atoms per dimer, suggesting that each subunit contains a mononuclear iron site. This is the case for most previously reported dimeric Fe-SODs (29, 30). The wild type SOD was stable at 60°C and its activity was only partially lost at 70°C (Fig 2). The mutated enzyme was less active at room temperature (40 % less specific activity than wild type SOD) and more heat sensitive (Fig 2).

Both enzymes exhibited the same sensitivity to pH with maximal and stable activity between pH 5 and pH 10.5. They were rapidly inactivated below pH 5 (data not shown). This contrasts with other Fe-SODs which are more sensitive at alkaline pH (except for the Fe-SOD of *Aerobacter aerogenes* (31))

### EPR properties of wild type and mutant enzymes

The EPR spectrum at 4 K of wild type SOD was complex (Fig 3A). It could be decomposed into two different signals, reflecting the presence of two different types of Fe sites in the protein. Fe has also been reported to be observed in two different environments in Fe-SOD from *P.shermanii* (32).

The first signal, with three resonances at  $g=4.8$ ,  $g=3.9$ , and  $g=3.6$ , indicative of ferric high spin iron in a nearly rhombic symmetry, was similar to the previously reported EPR signals of Fe-SODs. These features arise from transitions from the two sub-levels of the middle Kramers doublet split by Zeeman energy. The rhombicity factor  $E/D$  was estimated to be 0.25 (30). This rhombicity is consistent with the observation of an EPR signal at  $g=9.3$  at 4K (data not shown). The second signal, centered at  $g=4.38$ , was less well resolved and was indicative of ferric iron in a rhombic symmetry. An additional very weak distinct signal at  $g=4.3$  can be attributed to small amounts of iron adventitiously bound to the protein. The following observations confirm that the overall EPR spectrum is a composite of two independent signals. First, their microwave power saturation properties were distinct. The  $P_{1/2}$  value was 14 mW and 30 mW for the nearly rhombic signal and the  $g=4.38$  signal, respectively. Furthermore,

increasing the temperature from 4 K to 100 K caused a relative disappearance of the  $g=4.38$  signal. Second, the relative amount of the two sites (calculated from the intensities of the  $g=4.8$  and the  $g=4.38$  signals) varied with pH, the nearly rhombic Fe site being more abundant at high pH (compare Fig 3A and Fig 3B). Subtracting the spectrum recorded at pH 5 from that recorded at pH 7 gave the "pure" spectrum of the nearly rhombic Fe site (Fig 4A).

The tryptophan 72 to valine mutation led to a drastic change in the relative proportion of the two signals, with much more of the  $g=4.38$  signal in the SOD mutant, at the same pH (Fig 3C). Again subtraction of the spectrum of the wild type enzyme from that of the mutant gave the pure"  $g=4.38$  signal (Fig 4B).

#### Inactivation by hydrogen peroxide

Incubation of both wild type and mutant enzymes (80  $\mu\text{g/ml}$ ) with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2.5 mM) resulted in their inactivation. The effects of concentration of the oxidant and of the incubation time on enzyme activities were followed (Fig 5A et 5B). Both enzymes were sensitive to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , although the mutant was slightly more resistant. It has been reported that the oxidation of tryptophan residues by  $\text{H}_2\text{O}_2$  increases absorption at around 320 nm and below 260 nm and decreases absorption at 280 nm (33). The time-dependent inactivation of *P. falciparum* SOD was thus monitored by light absorption spectroscopy: light absorption by both the wild type and mutant enzymes at 255 nm and 310 nm increased with time. This suggests that during inactivation tryptophan residues of both proteins were oxidized (data not shown).

Incubations of wild type and mutated enzymes (150  $\mu\text{g/ml}$ ) with 0.625 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 2.3 mM bathophenanthroline, a ferrous ion chelator, resulted in slow iron release into the medium (30% of the total iron after two hours) (Fig 6). The amount of iron released increased with time and more iron was released from the wild type than mutant enzyme. In absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , iron was not released by enzymes in presence of bathophenanthroline (data not shown). The incubation of the wild type SOD with  $\text{H}_2\text{O}_2$  was also followed by EPR spectroscopy at 100 K. During this reaction, at 4 K, the Fe-based signals slowly disappeared and a new signal centered at  $g=2$  appeared (Fig 7). The shape, the width and the microwave power saturation properties of this signal were characteristic of an organic radical. However, the intensity of the spectrum was too weak to allow unambiguous identification from its hyperfine structure. Treatment of the SOD W72V mutant with  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not generate this radical. Furthermore, the decay of the Fe-based signals from the mutant was much slower than that from the wild type enzyme (Fig 8). EPR spectroscopy of the reaction mixture at 4 K after prolonged incubation revealed the presence of a typical  $g=4.3$  signal, showing that Fe was liberated during inactivation (34).

## Discussion

Most protozoa seem to produce a FeSOD. *Plasmodium falciparum* SOD has previously been characterized and sequence comparison with other SODs suggested that it was a FeSOD. We confirm this classification by overproduction and purification of the protein: it contains one mononuclear Fe site per polypeptide chain of 23 kDa. The parasite enzyme is a dimer and shares a number of other properties with other Fe-SODs.

The EPR spectrum of the protein shows Fe-based signals similar to for *E. coli* and *P. shermanii* Fe-SODs (35, 32). This strongly suggests that, the ferric ion in the *Pf*SOD has three histidines and one aspartate as ligands consistent with amino acid sequence alignments which show that these residues are conserved. A water molecule or a hydroxyl ion is probably a fifth ligand (36, 37, 38, 39, 40).

The ferric ion is found in two different environments, that we name FeA and FeB. FeA is nearly rhombic with EPR signals at  $g=4.8$ ; 3.9; 3.6 whereas FeB is quasi rhombic with an EPR signal at  $g=4.38$ . This is not an unusual situation as both types of signals, in various proportions, have been observed in SODs from other organisms. For example *E. coli* Fe-SOD has essentially one type of site, an FeA type, (35) whereas *P. ovalis* has a both FeA and FeB type sites, more like the *P. falciparum* enzyme (41), and *P. shermanii* has a high proportion of FeB type sites at the same pH (32). In general, the FeA/FeB ratio varies with pH, as shown in this study and previously (32). This may be due either to pH-dependent modifications at the water coordination site or to the presence of an ionizable amino acid near the active site. Since the two iron sites could not be distinguished in the X ray three dimensional structures (compare for example *E. coli* and *P. shermanii*), it is likely that the EPR variations correspond to very small changes in the Fe environment. The tryptophan to valine mutation has a large effect on the EPR spectrum of the protein, which reveals that iron, in the SOD W72V, is mainly in the FeB form. This strongly suggests that the tryptophan 72 residue has some sort of connection with the iron center, in agreement with its position, separated from one of the histidine ligands by a single residue: a mutation at this position is thus likely to affect the symmetry of the iron site.

Like most FeSODs, *P. falciparum* SOD is rapidly inactivated by hydrogen peroxide. This inactivation seems to involve the oxidation of tryptophan residues and loss of the iron center, as shown by the appearance of EPR-detectable free iron and the iron release evidenced by light absorption spectroscopy. Possibly, the binding of peroxide to iron and intermediate formation of a peroxo-iron complex is an early step of the reaction. Subsequent, electron transfer from tryptophan or other residues to the peroxo-iron complex may result in oxidation and inactivation of the protein (17, 18). The release of ferrous ion is more intriguing. It could be due to decomposition of the iron peroxo complex by homolytic cleavage of the Fe-O bond. During the reaction, an organic free radical, characterized by an EPR signal at  $g= 2.00$ , is transiently formed. This radical is probably protein-bound. The fact that this signal could not be detected during reaction of  $H_2O_2$  with the SOD W72V mutant suggests that the radical is located on the tryptophane 72 residue, as a tryptophanyl radical or as a peroxy radical derived from reaction of a tryptophan radical with molecular oxygen. There are several precedents for the generation of tryptophan or tryptophanyl peroxy radicals during oxidation of iron proteins (42,43). However, this species remains to be identified and thus other interpretations are possible. For example, the mutation may have affected an

intramolecular electron transfer chain and thus prevent radical formation further away from tryptophan 72.

*P. falciparum* superoxide dismutase belongs to the Fe-SOD family, with two mononuclear Fe sites in a homodimer and high sensitivity to hydrogen peroxide. As the host of the *P. falciparum* parasite relies on either Cu-Zn- or Mn-dependent superoxide dismutase for protection against oxidative stress, and as the parasite is susceptible to oxidative stress (44, 45), it is tempting to search for agents specifically inactivating the parasite Fe-SOD by oxidation or other mechanisms which could possibly serve as candidates for new antimalarial drugs.

All sensitive Fe-SODs have a tryptophan or an aromatic amino acid at position around 72, close to one of the histidine ligands. In contrast, resistant Fe-SODs have an aliphatic amino acid at this position and similarly the resistant Mn-SODs do not have a tryptophan. Thus, Trp72 was thought to be responsible for the Fe-SODs sensitivity to  $H_2O_2$  (13, 15). We report here the first characterization of a FeSOD mutant (Try72Val) at this position. The results indicate that this residue is not essential for activity, although the mutant is 40% less active. More importantly, the mutant protein is only slightly less sensitive than the wild type protein to inactivation by  $H_2O_2$ . This disproves the hypothesis that resistance of certain SODs results directly from the absence of a tryptophan residue at position 72. The specific targets involved in  $H_2O_2$  sensitivity remain to be found.

## REFERENCES

1. W.H.O. (1995). *Weekly Epidemiol. Rec.* **71**, 17-24
2. Becuwe P., Gratepanche S., Fourmaux M.N., Van Beeumen J., Samyn B., Mercereau-Puijalon O., Slomianny C., Touzel J.P., Camus D., Dive D. (1996). *Molec. Biochem. Parasitol.* **76**, 125-134
3. Gamain B., Langsley G., Fourmaux M.N., Touzel J.P., Camus D., Dive D., Slomianny C. (1996). *Molec. Biochem. Parasitol.*, **78**, 237-248
4. Mc Cord, J.M. and Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055
5. Benov, L.T. and Fridovich, I. (1994) *J. Biol. Chem.* **41**, 25310-25314
6. Steinman, H.M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10283-10293
7. Barra, D., Schinina, M.E., Bannister, W.H., Bannister, J.V. and Bossa, F. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 1001-1009
8. Carlouz, A., Ludwig, M.L., Stallings, W.C., Fee, J.A., Steinman, H.M. and Touati, D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1555-1562
9. Stallings, W.C., Patridge, K.A., Strong, R.K., and Ludwig, M.L. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 10695-10699
10. Lah, M.S., Dixon, M.M., Patridge K.A., Stallings, W.C., Fee, J.A., and Ludwig M.L. (1995) *Biochemistry.* **34**, 1646-1660
11. Kirby, T., Blum, J., Kahane, I. And Fridovich, I. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **201**, 551-555
12. Martin, M.E., Byers, B.R., Olson, M.O.J., Salin, M.L., Arceneaux, J.E.L., and Tolbert, C. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9361-9367
13. Meier, B., Sehn, A.P., Michel, C., and Saran, M. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **313**, 296-303
14. Schmidt, M., Meier, B. And Parak, F. (1996) *J. B.I.C.* **1**, 532-541
15. Takao, M., Oikawa, A. and Yasui, A. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 210-216
16. Takao, M., Yasui, A., and Oikawa, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14151-14154
17. Beyer, W.F., and Fridovich, I. (1987) *Biochemistry.* **26**, 1251-1257
18. Yamakura, F. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 635-641
19. Tabor, S., and Richardson, C.C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 1074-1078
20. Sambrook, J., Fritsch, E.F, and Maniatis, T. (1989) in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
21. Carlouz, A. and Touati, D. (1986) *EMBO Journal.* **5**, 623-630
22. Chen, E. and Seeburg, P. (1985) *DNA.* **4**, 165-170
23. Sanger, F. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
25. Laemmli, U.K. (1970) *Nature.* **227**, 680-685.
26. Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981) *Science.* **211**, 1437-1438.
27. Marklund, S. and Marklund, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
28. Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.

29. Hatchikian, E.C. and Henry, Y.A. (1977) *Biochimie*. **59**, 153-161
30. Puget, K. And Michelson, A.M. (1974) *Biochimie*. **56**, 1255-1267
31. Kim, S.W., Lee, S.O. and Lee, T.H. (1991) *Agric. Biol. Chem.* **55**, 101-108
32. Meier, B., Michel, C., Saran, M., Hüttermann, J., Parak, F., and Rotilio, G. (1995) *Biochem. J.* **310**, 945-950
33. Hachimori, Y., Horinishi, H., Kurihara, K., and Shibata, K. (1964) *Biochim. Biophys. Acta.* **93**, 346-360
34. Cséke, C., Horvath, L.I., Simon, P., Borbély, G., Keszthelyi, L., and Farkas, G.L. (1978) *J. Biochem.* **85**, 1397-1404
35. Skylhouse, T.O., and Fee, J.A. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5472-5477
36. Lah, M. S., Dixon, M.M., Patridge, K.A., Stallings, W.C., Fee, J.A., and Ludwig, M.L. (1995) *Biochemistry* **34**, 1646-1660
37. Stallings, W.C., Powers, T.B., Patridge, K.A., Fee, J.A., and Ludwig, M.L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **80**, 3884-3888
38. Stoddard, B., Howell, P.L., Ringe, D., and Petsko, G. (1990) *Biochemistry*. **29**, 8885-8893
39. Cooper, J.B., Driessen, H.P.C., Wood, S.P., Zhang, Y., and Young, D. (1994) *J. Mol. Biol.* **235**, 1156-1158
40. Cooper, J.B., McIntyre, K., Badasso, M.O., Wood, S.P., Zhang, Y., Garbe, T.R. and Young, D. (1995) *J. Mol. Biol.* **246**, 531-544
41. Yamakura, F. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* **422**, 280-294
42. Sahlin, M., Lassman, G., Pötsch, S., Slaby, A., Sjöberg, B.M., Gräslund, A. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 11699-11702.
43. DeGray, J.A., Gunther, M.R., Tschirret-Guth, R., Ortiz de Montellano, P.R., Mason, R.P. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 2359.
44. Golenser, J., Marva, E., Chevion, M. (1991). *Parasitol. Today.* **7**, 142-145
45. Atamna, H., Ginsburg, H. (1993). *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, 231-241

## LEGENDS OF FIGURES

Fig 1: Construct of plasmid for wild type *P.f*SOD production.

Fig 2 : Effect of temperature on enzyme stability

Samples of wild type Fe-SOD and mutated SOD were diluted to give 1 unit of SOD activity under standard assay conditions. Changes in the observed activity, after incubation, were normalized to this as a percentage. The wild type SOD (●) or the mutated SOD (○) were incubated in Tris/HCl 10 mM (pH 7.8). Aliquots were incubated at 70°C for the indicated times before being assayed.

Fig 3 : First derivative EPR spectra at 4 K of :

- purified native SOD enzyme of *Plasmodium falciparum* (pH 7; 6mg/ml)
- same protein at a lower pH (pH 5)
- purified mutant W72V enzyme (pH 7, 2 mg/ml)

Recording conditions: modulation amplitude 10 Gauss, microwave power 1 mW, microwave frequency 9.225 GHz.

Fig 4 : Difference between EPR spectra of :

- the native enzyme at pH= 7 and pH=5
- the native and the mutant proteins

Fig 5 : Effect of hydrogen peroxide on the activity of *P.falciparum* wild type SOD (●) and mutant SOD(○) . Samples of wild type Fe-SOD and mutated SOD were diluted to give 1 unit of SOD activity under standard assay conditions. Changes in the observed activity in the presence H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were normalized to this as a percentage.

a)The superoxide dismutases samples were incubated in 10 mM Tris/HCl (pH 7.8) for 5 min with each of a series of concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 4°C.

b) The superoxide dismutases samples were incubated in 10 mM Tris/HCl (pH 7.8) with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 4°C. At intervals, aliquots were withdrawn and assayed under standard conditions for activity.

Fig 6 : Effect of hydrogen peroxide on the iron release from *P.falciparum* wild type SOD (●) and mutant SOD (○). The superoxide dismutases(150µg/ml) were incubated in 10 mM Tris/HCl (pH 7.8) with 0.625 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 2.3 mM bathophenanthroline for 3 hours. The control containing Fe-SOD(150µg/ml) and 2.3 mM bathophenanthroline showed no increase in absorbance. The iron release from SOD was monitored at 550 nm.

Fig 7 : First derivative EPR spectrum at 100 K of the organic radical formed during incubation of the native SOD from *P.falciparum* with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Recording conditions: modulation amplitude 3 Gauss, microwave power 10mW, microwave frequency 9.410 Ghz.

Fig 8 : Variation of the EPR signal centered at g=4.8 (characteristic of form A of the active site) in function of the incubation time of the native and mutant enzymes (0.85 mg/ml) with hydrogen peroxide ( 0.625 Mm)



	Volume	Total Protein (mg)	Total Activity (10 <sup>3</sup> units)	Specific Activity (U/mg protein)	Fold Purification	Yield (%)
Crude Extract	31 ml	647.9	117.8	181.8	1	100
Heating 70°C	27.5 ml	418	102.3	244.7	1.4	86.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -55%	29 ml	150.8	101.5	673.1	3.7	86.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -80%	5 ml	108	93.3	863.5	4.75	79.1
ACA 44	35 ml	35	49.3	1409	7.75	41.9
DEAE Trisacryl	800 µl	28.9	47.2	1631	9	40

Table 1 : Purification of wild type Fe-SOD from *Plasmodium falciparum*.

SOD activity was assayed by the method of Marklund, based on autoxidation of pyrogallol. (27)

<sup>a</sup> : Protein concentration was determined according to Lowry. (24)

<sup>b</sup> : One unit (U) of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibited pyrogallol autoxidation by 50%.

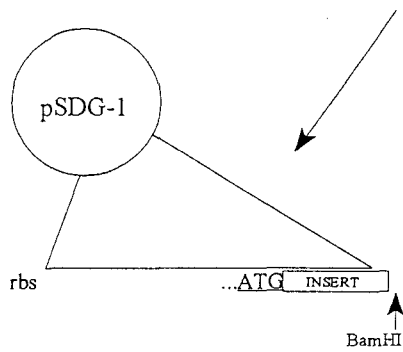
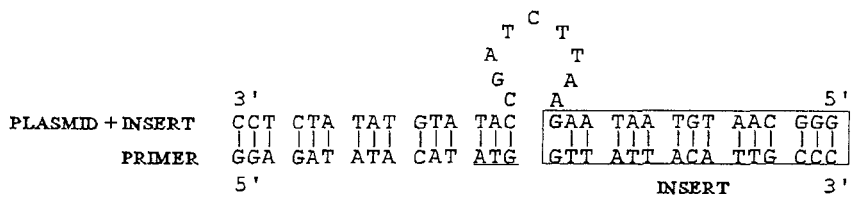
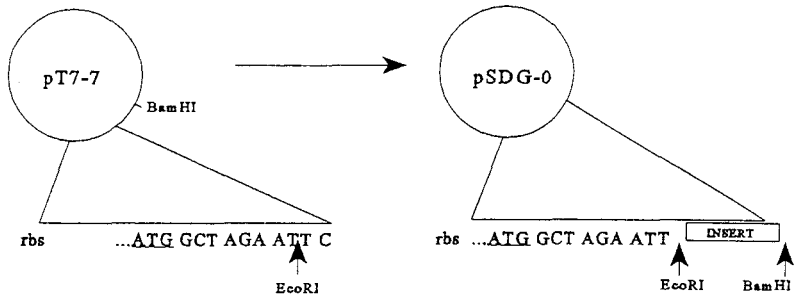
Step purification	Volume	Total Protein (mg)	Total activity ( $10^3$ units)	Specific Activity (U/mg protein)	Fold Purification	Yield (%)
Crude extract	23 ml	501.4	90.312	180.1	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^2$ - 50%	19 ml	180.5	80.926	448.4	2.48	89.6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^2$ - 75%	5 ml	82.5	43.666	530	2.94	48.35
ACA 44	44 ml	14.5	8.605	593.5	3.29	9.5
DEAE Trisacryl	800 $\mu$ l	5	4.535	907	5.04	5.02

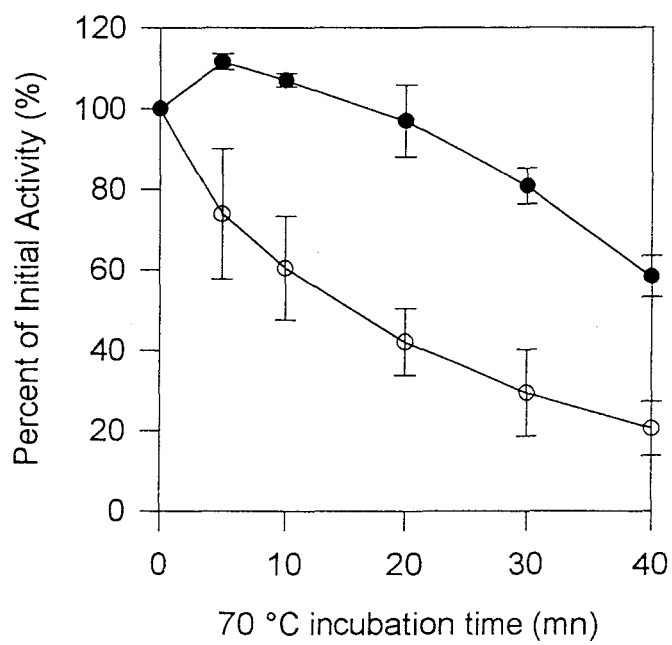
Table 2 : Purification of mutant Fe-SOD from *Plasmodium falciparum*.

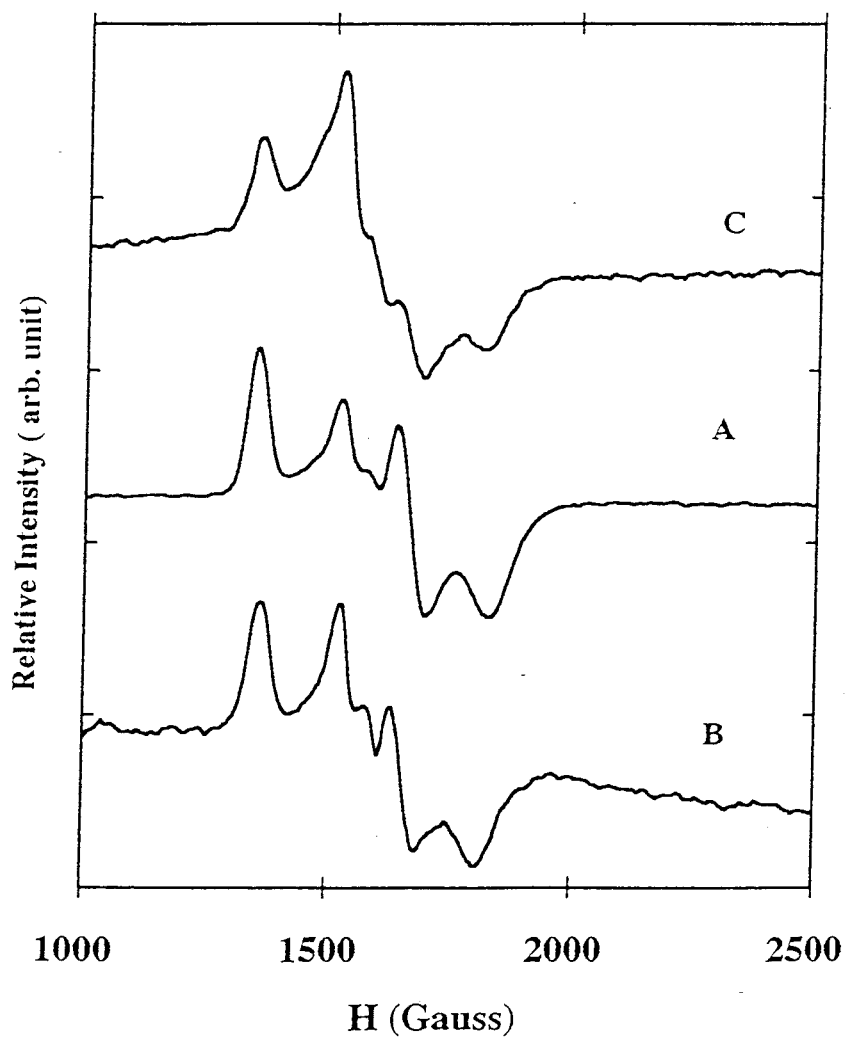
SOD activity was assayed by the method of Marklund, based on autoxidation of pyrogallol.(27)

<sup>a</sup> : Protein concentration was determined according to Lowry. (24)

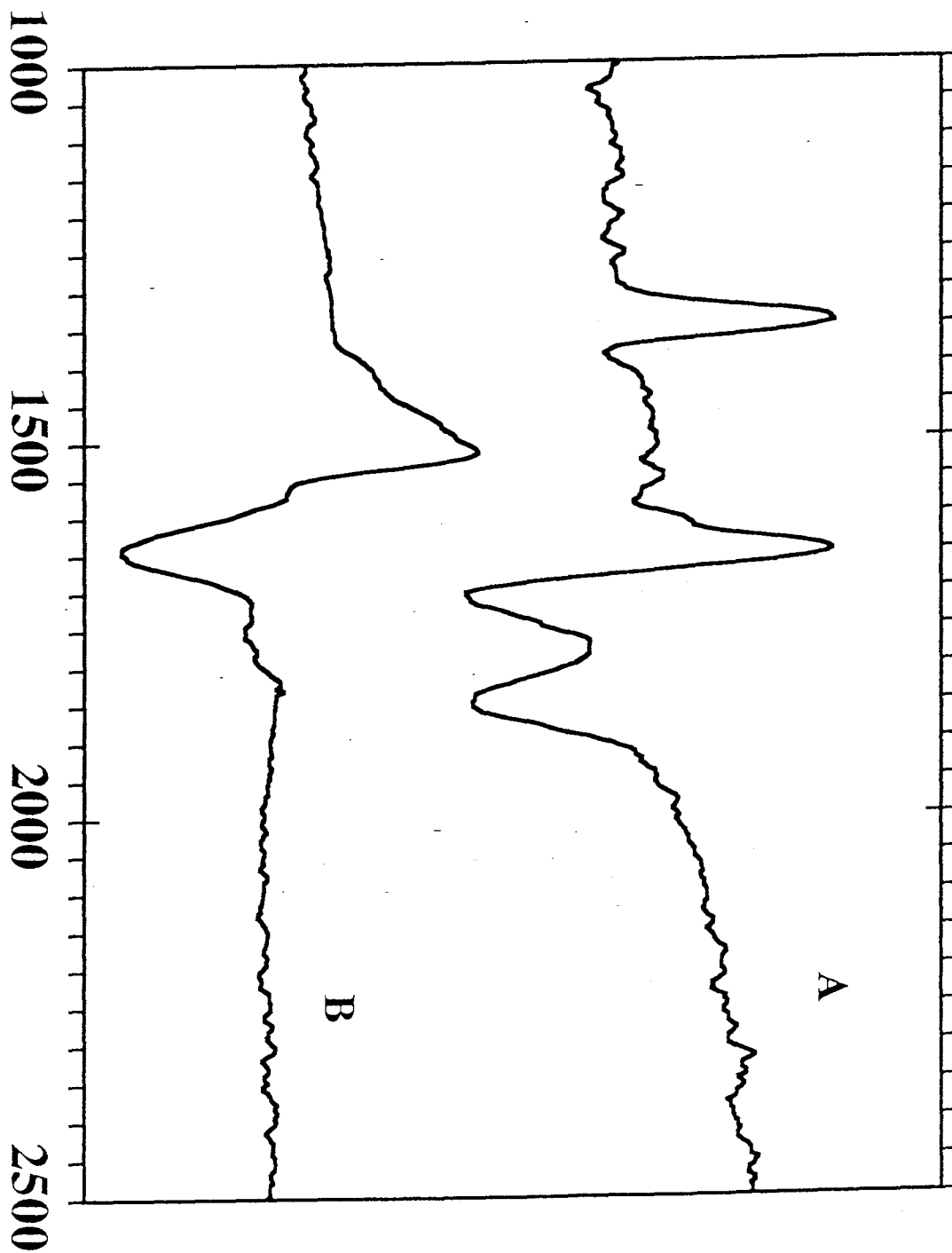
<sup>b</sup> : One unit (U) of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibited pyrogallol autoxidation by 50%.

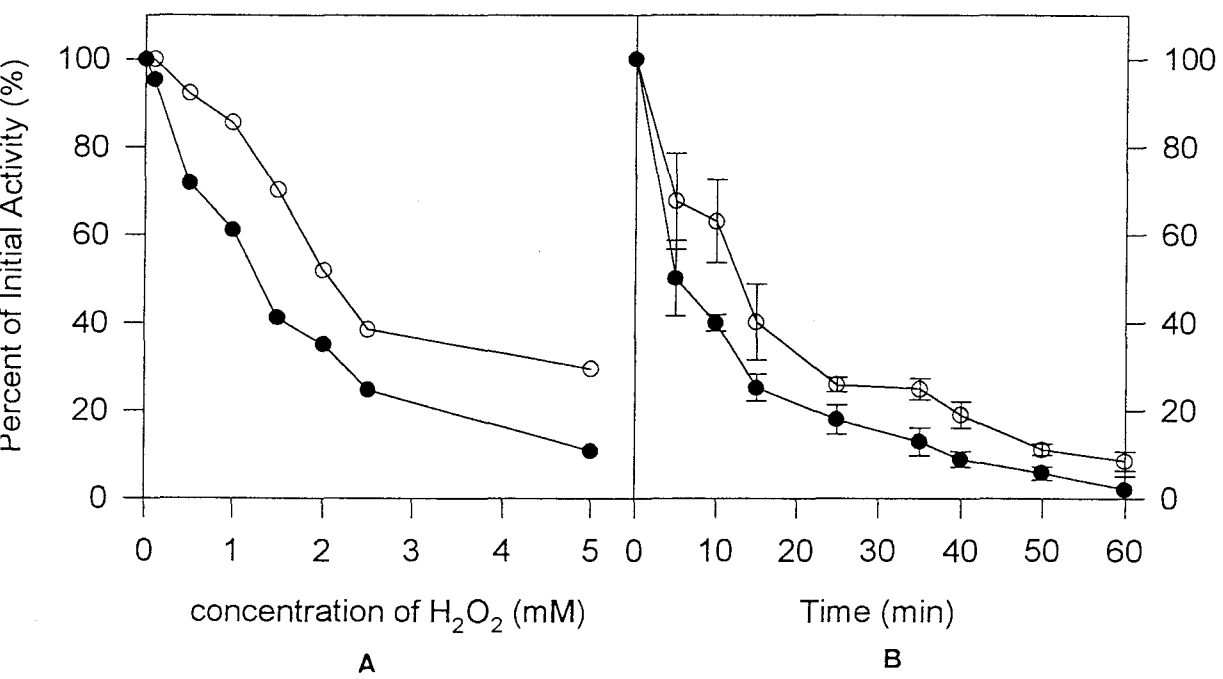


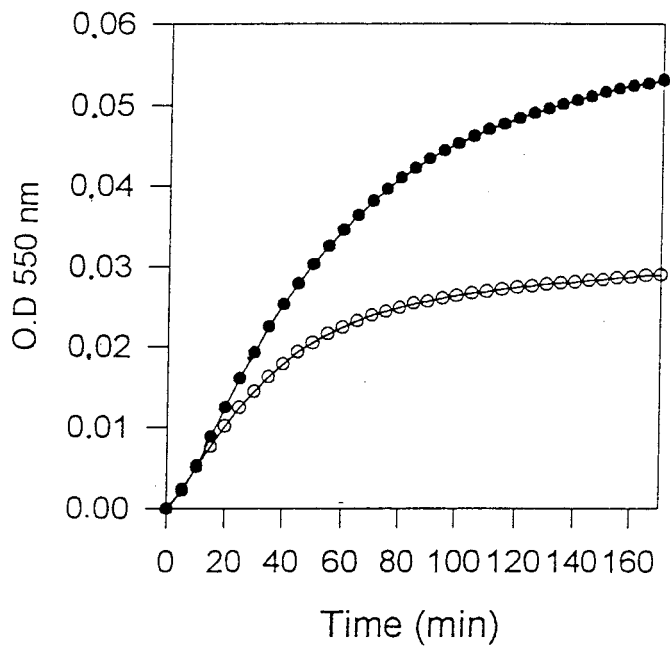




Relative Intensity ( arb. unit)

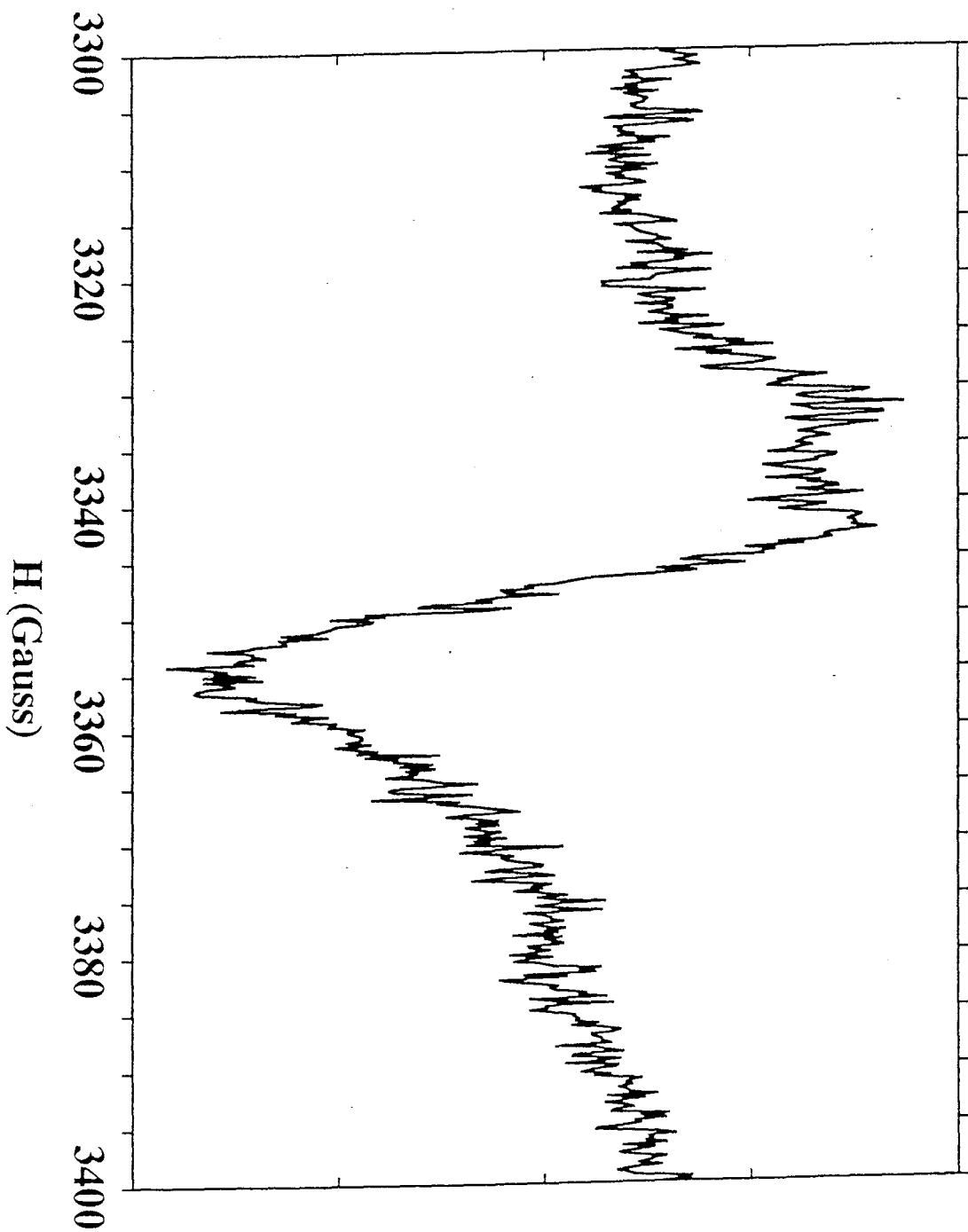




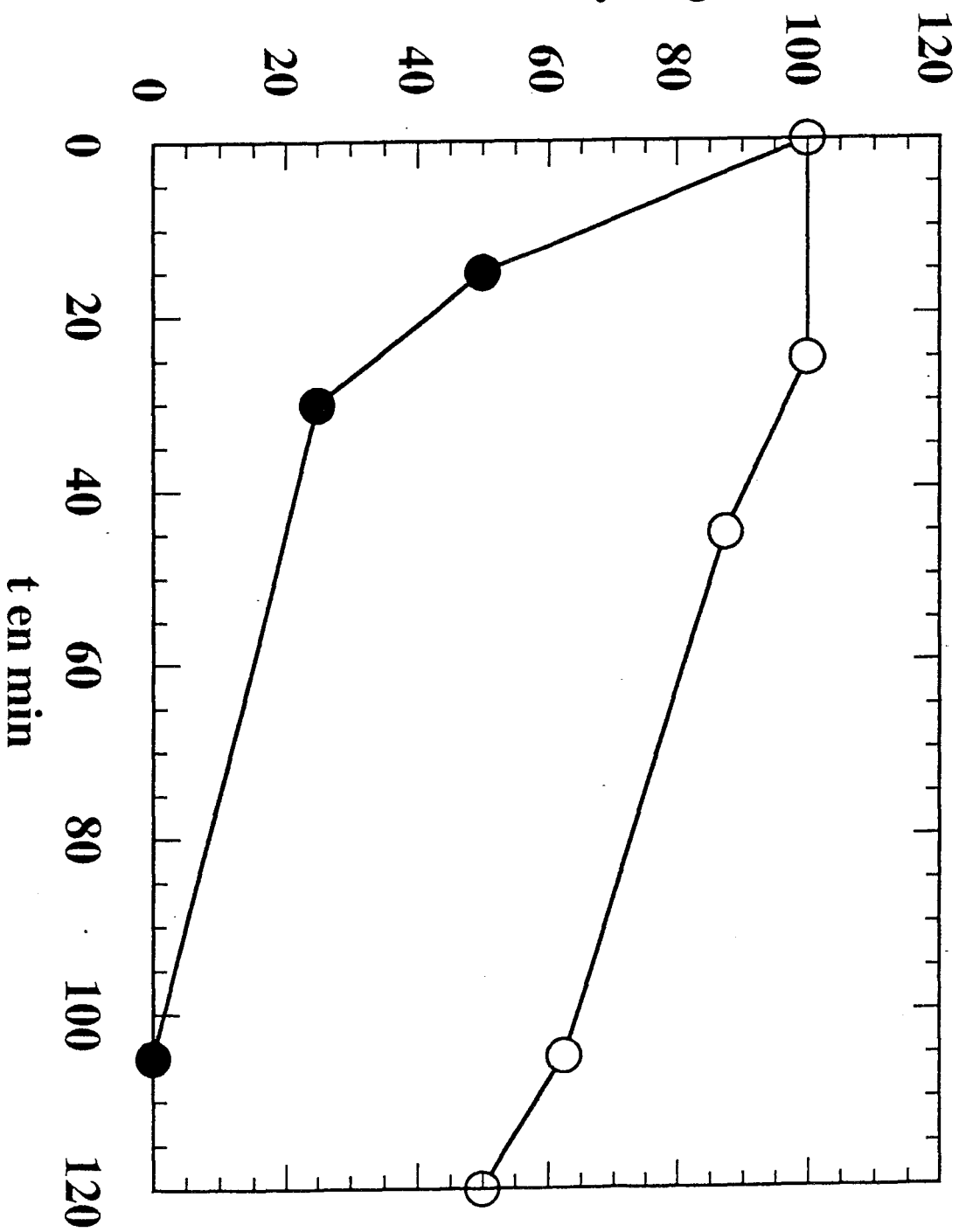


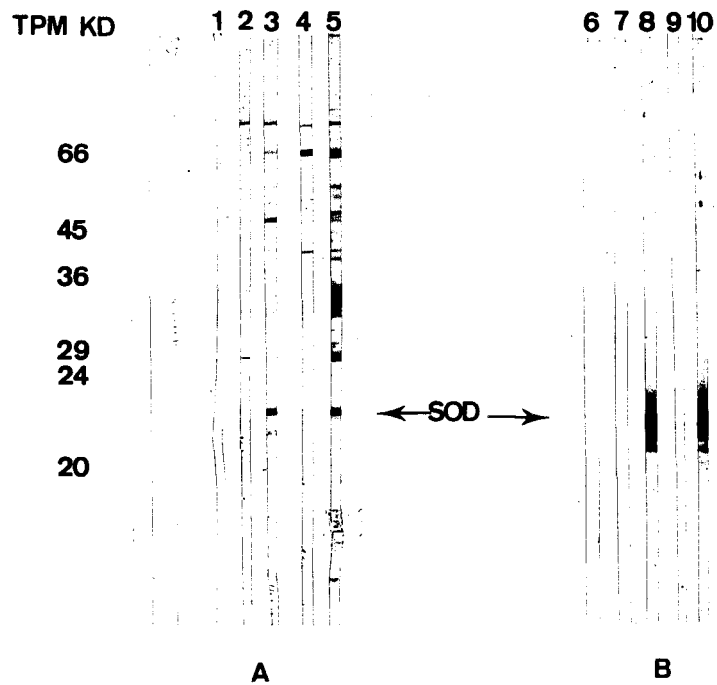


Relative Intensity (arb. unit)



% EPR intensity at  $g=4.8$





**Figure 29: Reconnaissance de la SOD de *P. falciparum* par les sérums de lapin LM1 et LF4.**

A: Extrait brut de *P. falciparum*

B: SOD-Fe recombinante semi purifiée

Pistes 1 et 6: Témoin conjugué

Pistes 2 et 7: sérum préimmun LM1, dilué au 1/100°

Pistes 3 et 8: LM1 J30, dilué au 1/100°

Pistes 4 et 9: sérum préimmun LF4, dilué au 1/100°

Pistes 5 et 10: LF4 J28, dilué au 1/100°

## CHAPITRE VII :

### IMMUNOLOCALISATION ET EXPRESSION DE LA SOD-FE PARASITAIRE AU COURS DU CYCLE INTRAERYTHROCYTAIRE

#### I. RESULTATS

##### **I.1 Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la SOD-Fe de *P. falciparum***

L'obtention de la protéine recombinante sauvage purifiée nous a permis de réaliser des anticorps dirigés contre notre protéine. Afin d'augmenter les chances de réussite, la SOD-Fe a été injectée sous la forme native et sous la forme monomérique dans deux lapins différents. Les sérums hyperimmuns ont ensuite été testés en Western Blot et en immunoprécipitation afin de vérifier la spécificité de ces anticorps.

##### -Western Blot

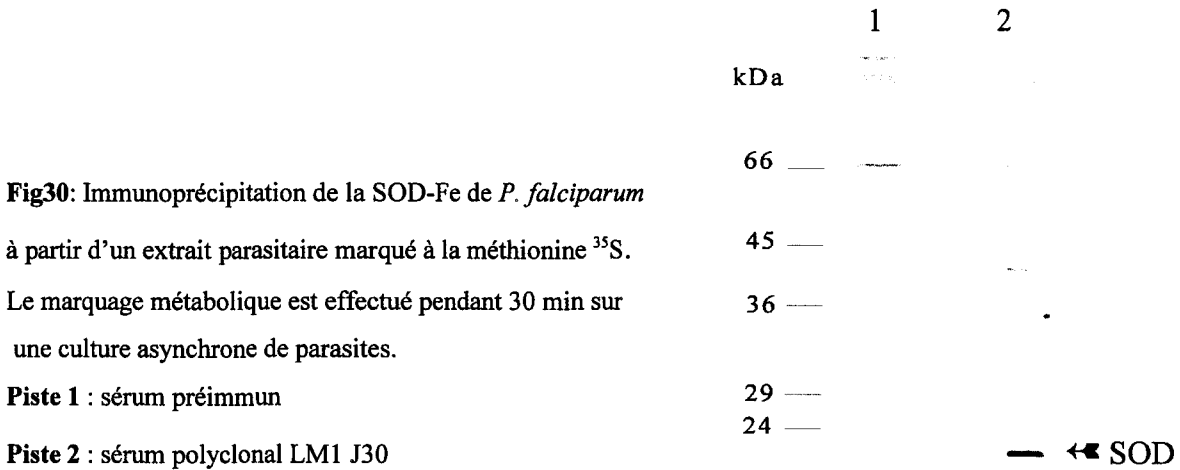
A partir de l'électrotransfert d'extrait brut de *P. falciparum*, les sérums reconnaissent une protéine migrant au même niveau que la sous-unité de la SOD recombinante purifiée (23kDa). Cette bande n'est pas détectée par les sérums préimmuns (**Fig.29A**). Par contre, d'autres protéines, dont les masses moléculaires diffèrent de celle de la SOD parasitaire, sont également mises en évidence par les sérums LF4 J28 et LM1 J30, certaines d'entre elles sont aussi reconnues par les sérums préimmuns.

Une expérience équivalente réalisée avec une fraction semi purifiée de la SOD recombinante, montre une bande à 23 kDa (**Fig.29B**).

##### -Immunoprécipitation

A partir d'un extrait de *P. falciparum* marqué métaboliquement à la méthionine <sup>35</sup>S (0,5. 10<sup>6</sup> CPM), nous avons réalisé une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps polyclonal LM1 J30. Le marquage a été effectué pendant 30 minutes sur une culture asynchrone de parasites. Après lavage et élution, les échantillons ont été soumis à une électrophorèse en SDS-PAGE. Après autoradiographie (**Fig.30**), nous observons une bande à 23 kDa, immunoprécipitée par

les anticorps LM1J30. La cellule hôte du parasite ayant perdu toute capacité de synthèse, les bandes radiomarquées immunoprécipitées ne peuvent provenir que du parasite. L'obtention de ce signal comigrant avec notre protéine recombinante nous laisse penser qu'il s'agit de la SOD-Fe parasitaire.

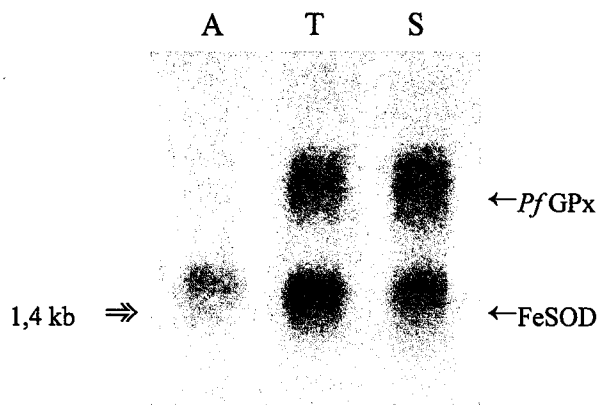


Les résultats obtenus en immunoempreinte et en immunoprécipitation nous suggèrent donc que ces anticorps polyclonaux de lapin sont spécifiques et qu'ils reconnaissent la SOD-Fe à la fois sous sa forme native et sous sa forme dénaturée.

## I.2 Etude de l'expression de la SOD-Fe parasitaire au cours du cycle intraérythrocytaire

### - Au niveau transcriptionnel

L'analyse en Northern Blot réalisée sur une culture synchrone de *P. falciparum* montre la présence d'une seule bande de 1,4 kb aux stades anneau, trophozoïte et schizonte. La même intensité du signal observée dans les trois pistes suggère que le gène de la SOD-Fe est transcrit de façon constante tout au long du cycle érythrocytaire, alors que le gène codant pour la GPx parasitaire semble surtout transcrit aux stades trophozoïtes et schizontes.

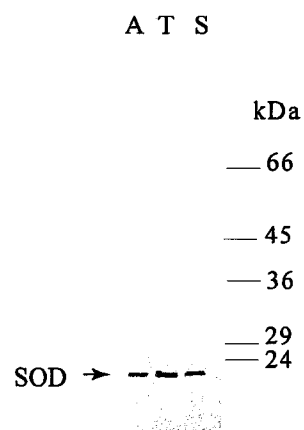


**Fig 31:** Analyse en Northern Blot de la transcription de la *Pf GPx* et de la *SOD-Fe* de *P. falciparum* aux stades anneau, trophozoïte et schizonte récupérés respectivement 10, 30, et 40 heures après l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes. 10µg d'ARN totaux ont été fractionnés sur un gel d'agarose à 1,2% puis transférés sur une membrane de nylon avant de subir une hybridation avec les sondes marquées au  $^{32}\text{P}$ . La sonde GPx a été fournie par B. Gamain (1997).

- Au niveau traductionnel

Une immunoprécipitation réalisée sur une culture de *P. falciparum* synchronisée a été effectuée à l'aide des anticorps polyclonaux. La culture a été marquée métaboliquement avec la méthionine  $^{35}\text{S}$  pendant une demi-heure à différents temps: 10h, 30h et 40h après réinvasion des mérozoïtes, ces temps correspondant respectivement aux stades anneau, trophozoïte et schizonte. La même quantité de culture radiomarquée soit 150000 cpm (coups par minutes) a été incubée avec nos anticorps polyclonaux. Après autoradiographie (**Fig.32**), nous observons une bande à 23 kDa d'intensité identique dans les trois stades indiquant que la SOD-Fe est exprimée de la même façon à tous les stades, confirmant le résultat obtenu en Northern Blot.

**Fig 32:** Immunoprécipitation de la SOD-Fe de *P. falciparum* à partir d'un extrait parasitaire marqué à la méthionine  $^{35}\text{S}$ . Le marquage métabolique est effectué pendant 30 min aux stades anneau, trophozoïte et schizonte, soit 10h, 30h et 40h après réinvasion par les mérozoïtes respectivement.



### **I.3 Immunolocalisation de la SOD-Fe de *P. falciparum*.**

Les anticorps polyclonaux nous ont servi à localiser la SOD-Fe au sein du parasite. Les cultures de parasites sont récupérées à 10h, 30h et 40h après la réinvasion puis déposées et séchées sur lames. Une immunofluorescence indirecte obtenue à partir de nos anticorps révélés par un anticorps secondaire couplé au FITC montre au stade anneau un faible marquage autour du parasite correspondant à la vacuole parasitophore. Au stade trophozoïte, nous trouvons un marquage plus intense dispersé en points dans tout le globule rouge, ce qui est caractéristique d'une localisation dans les corpuscules de Maurer. Au stade schizonte, nous retrouvons toujours ce marquage aussi intense mais qui diffère selon le nombre de mérozoïtes présents dans le parasite. En effet, lorsque le parasite vient juste de se diviser, l'immunofluorescence est identique à celle observée au stade trophozoïte, alors qu'au stade schizonte mûr caractérisé par un grand nombre de noyaux, le marquage devient plus diffus (**Planche 1**). Les noyaux des parasites sont visualisés par coloration au DAPI (4,6-Diamino-2-phénylindole hydrochloride), colorant qui s'intercale dans l'ADN bicaténaire.

D'autre part, des études en immunofluorescence indirecte réalisées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-AIP (ponts amino-imino-propène) montrent un marquage semblable à celui obtenu avec les anticorps polyclonaux dirigés contre la SOD-Fe. Ce type de marquage signifie donc que des lésions provoquées par une attaque oxydative sont générées dans ces structures, expliquant ainsi la présence de notre SOD dans ce compartiment extraparasitaire. Toutefois, nous observons rarement une colocalisation de la SOD-Fe et des ponts AIP dans les parasites (**Planche 2**). En effet, les corpuscules de Maurer qui contiennent la SOD-Fe ne possèdent pas de ponts AIP et les structures qui présentent des lésions oxydatives ne possèdent pas de SOD.

Cette technique en immunofluorescence indirecte nous a permis de montrer que notre protéine était présente non pas dans le parasite, comme nous pouvions le croire, mais dans les corpuscules de Maurer. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à exploiter nos anticorps polyclonaux en microscopie électronique pour localiser avec plus de précision notre antigène. Afin de surmonter cette difficulté, nous avons entrepris de produire des anticorps monoclonaux.

**Planche 1: Immunolocalisation de la SOD-Fe. Immunofluorescence indirecte sur des hématies humaines parasitées par *P. falciparum* à différents stades de développement.**

A gauche : Marquage au DAPI du matériel nucléaire

A droite : Immunofluorescence réalisée avec le sérum polyclonal LF4 J28 dilué au 1/100<sup>e</sup>, révélé avec un anticorps secondaire anti-IgG marqué au FITC, dilué au 1/200<sup>e</sup>.

A: Sérum préimmun, dilué au 1/100.

B: Stade anneau: 10h après réinvasion des mérozoïtes

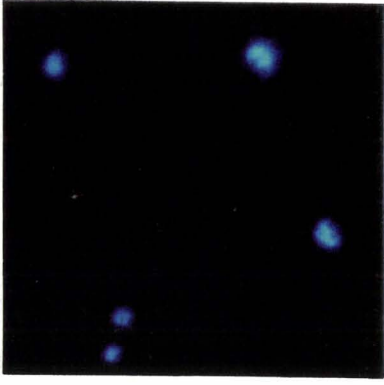
C: Stade trophozoïte jeune: 30h après réinvasion des mérozoïtes

D: Stade trophozoïte âgé: 40h après réinvasion des mérozoïtes

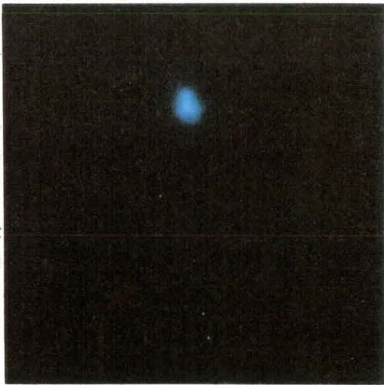
E: Stade schizonte: 46h après réinvasion des mérozoïtes



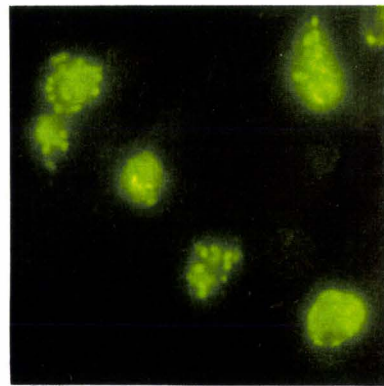
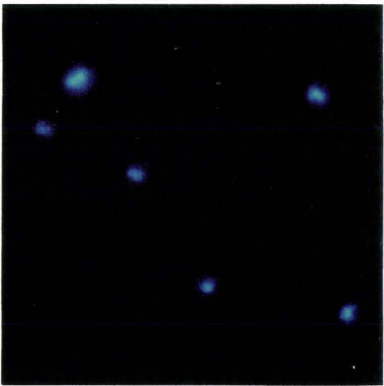
A



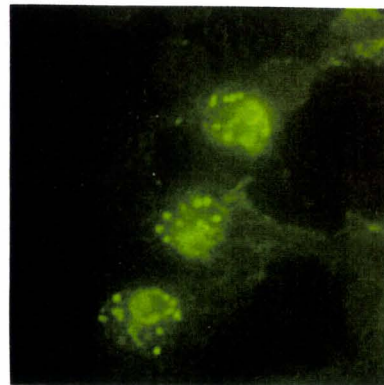
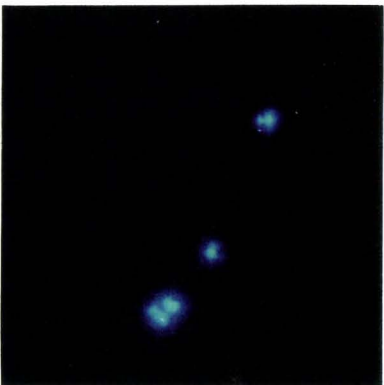
B



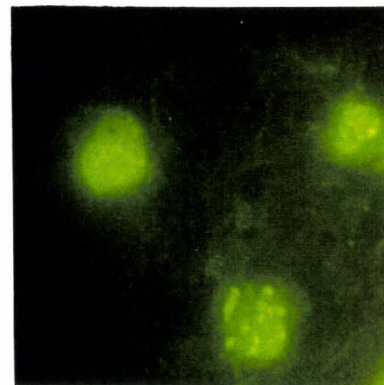
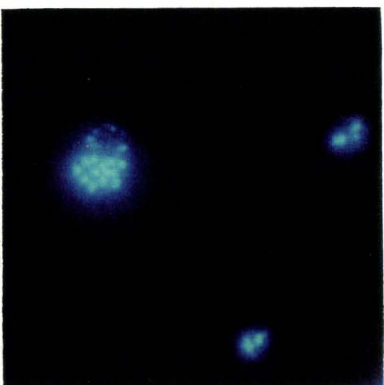
C

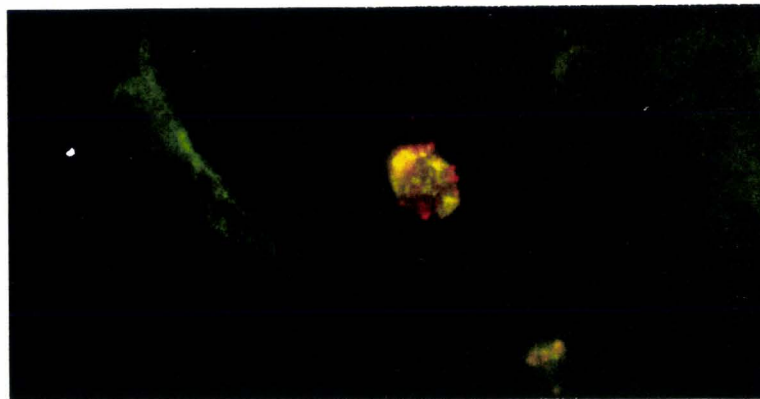
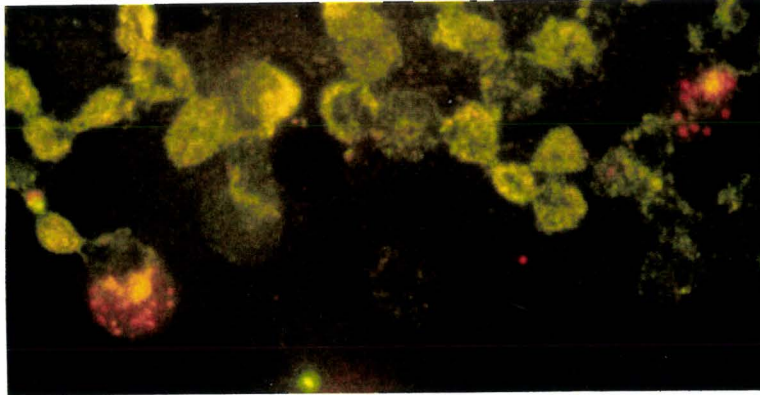


D



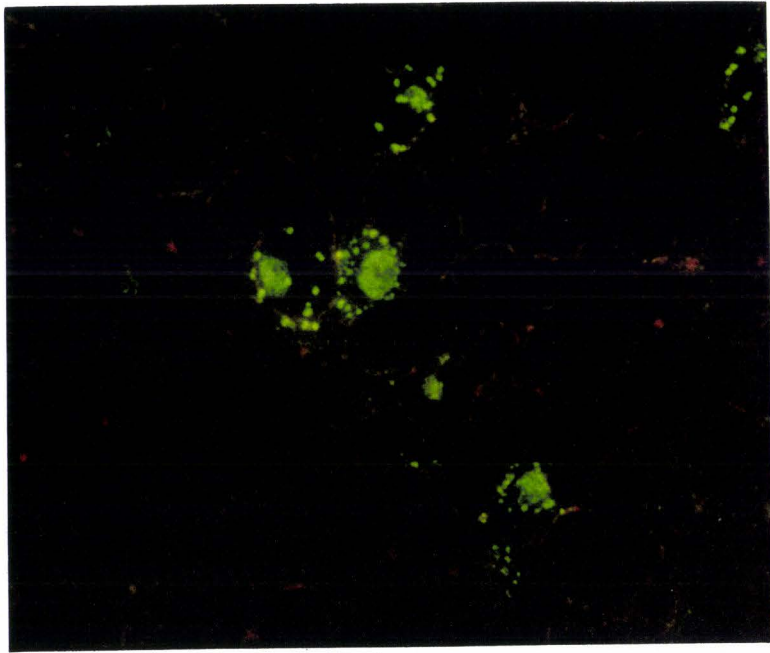
E



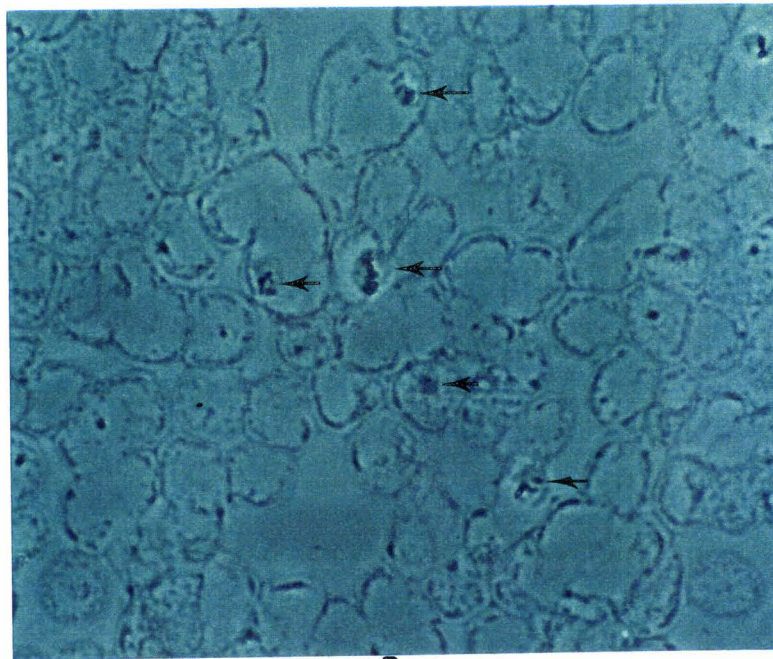


**Planche 2: Colocalisation de la SOD et des ponts AIP.**

Immunofluorescence réalisée avec le sérum polyclonal LF4 J28, dilué au 1/100<sup>e</sup>, révélé avec un Ac secondaire anti-lapin, anti-IgG marqué au Texas Red et avec l'anticorps monoclonal anti-AIP dilué au 1/200<sup>e</sup>, révélé avec un Ac secondaire anti-souris anti-IgM marqué au FITC. Ce marquage des deux anticorps a été réalisé sur une culture de parasites non synchrones.



A



B

**Planche 3: Immunolocalisation de la SOD-Fe.**

A: Immunofluorescence réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal 8F9, non dilué, révélé avec un anticorps secondaire anti-souris, anti-IgM marqué au FITC, dilué au 1/200<sup>e</sup>.

B: Les parasites sont visualisés en contraste de phase

→ : localisation des parasites dans le globule rouge

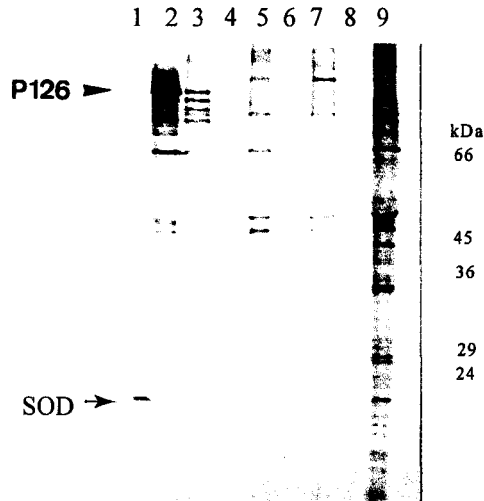
#### **I.4 Production d'un anticorps monoclonal dirigé contre la SOD-Fe**

A partir de la rate d'une souris immunisée au préalable par notre protéine recombinante purifiée et dont le sérum a été testé, nous avons réalisé une fusion qui a conduit à l'obtention d'un anticorps monoclonal d'isotype IgM dirigé spécifiquement contre la SOD-Fe. Malheureusement, cet anticorps monoclonal n'a pu être exploité puisqu'il ne fonctionne qu'en Elisa. En effet, cet anticorps ne reconnaît pas la SOD ni en Western Blot, ni en immunoprécipitation. Par ailleurs, tous les essais de localisation de la protéine en microscopie électronique se sont soldés par des échecs. L'anticorps monoclonal nous a seulement permis de confirmer les résultats obtenus en immunofluorescence par les anticorps polyclonaux. Une différence avec les anticorps polyclonaux a toutefois été observée, puisque l'immunofluorescence obtenue par cet anticorps montre un marquage dans les corpuscules de Maurer mais également dans le parasite (**planche 3**).

#### **I.5 Devenir de la SOD-Fe au sein du parasite**

Une immunoprécipitation réalisée sur une culture non synchrone de *P. falciparum* marquée métaboliquement par incorporation de méthionine <sup>35</sup>S a été réalisée pour rechercher la présence de la SOD-Fe dans les corpuscules de Maurer. Pour ce faire, nous avons réalisé une extraction à la saponine sur un lysat de globules rouges infectés radiomarqués afin de séparer le parasite du contenu de l'hématie comprenant entre autre les protéines parasitaires localisées dans le réseau tubulovésiculaire. Au bout de 30 minutes de marquage, nous observons une bande plus intense dans le culot parasitaire par rapport à celle présente dans le surnageant, qui peut s'expliquer par le fait que la protéine est en train d'être synthétisée dans le parasite (**Fig. 33**). Une chasse à la méthionine froide de 1h et 3h nous a permis de suivre le devenir de notre protéine dans le parasite. Au bout de 1h et 3h de chasse, le signal présente la même intensité dans le culot et le surnageant. D'autre part, la bande observée migre toujours à la même hauteur, indiquant qu'aucune maturation de la protéine ne s'est produite au cours de l'exportation de la protéine. Nous avons également immunoprécipité la protéine P126 qui est localisée exclusivement dans la vacuole parasitophore au stade schizonte. Nous visualisons une bande à hauteur de 126 kDa dans le culot parasitaire qui présente une intensité très faible comparée à celle observée dans le surnageant. Ce résultat montre bien que la saponine perméabilise la membrane de l'hématie ainsi que la membrane de la vacuole parasitophore.

En revanche, nous ne savons pas si, dans les conditions de notre expérience, la saponine a agi également au niveau de la membrane plasmique du parasite, laissant ainsi échapper les protéines présentes dans le cytoplasme. Pour vérifier cette hypothèse, il nous faudrait un anticorps capable d'immunoprécipiter une protéine cytoplasmique parasitaire qui servirait de témoin.



**Fig. 33** : Devenir de la SOD-Fe parasitaire. Immunoprécipitation d'une culture asynchrone de parasites marqués métaboliquement à la Met <sup>35</sup>S pendant 30 min. Les globules rouges parasités subissent une lyse à la saponine à 0,01%, puis après centrifugation, le surnageant ainsi que le culot parasitaire sont récupérés et soumis à une immunoprécipitation . **Piste 1**: culture témoin sans extraction à la saponine, Ac Lm1 J30: Ac antiSOD. **Piste 2**: surnageant, Ac anti P126. **Piste 3**: culot parasitaire, Ac antiP126. **Piste 4**: après 3h de chasse à la Met froide, surnageant, LM1 J30. **Piste 5** : après 3h de chasse à la Met froide, culot parasitaire, LM1 J30. **Piste 6** : après 1h de chasse à la Met froide, surnageant, LM1 J30. **Piste 7** : après 1h de chasse à la Met froide, culot parasitaire, LM1 J30. **Piste 8** : après marquage, surnageant LM1 J30. **Piste 9** : après marquage, culot parasitaire LM1 J30. L'anticorps anti P126 a été fourni par V. Conseil.

## II. DISCUSSION

Les résultats obtenus dans ce chapitre nous laissent supposer que la SOD-Fe joue un rôle important dans le parasite puisqu'elle est synthétisée de façon constitutive tout au long du cycle intraérythrocytaire. L'expression continue de cette protéine est typique d'un grand nombre de SOD-Fe, en particulier celle de *E. coli* qui est exprimée aussi bien en condition anaérobie qu'en

condition aérobie. D'autre part, la demi-vie de cette protéine semble relativement importante, puisque les études en immunofluorescence indirecte montrent une accumulation de cette protéine au cours du cycle parasitaire. En effet, nous observons un marquage très faible au stade anneau, qui s'amplifie aux stades trophozoïte et schizonte.

La découverte de la SOD-Fe dans les corpuscules de Maurer est assez surprenante. En effet, la présence de cette protéine dans ce compartiment ne manque pas de soulever un certain nombre d'interrogations.

Est-ce la seule SOD présente dans le parasite ?

De nombreux organismes possèdent deux ou trois types de SOD qui sont distribuées dans des compartiments distincts afin de protéger les différentes cibles soumises à une attaque des E.A.O. (Michalski, 1991; Favero, 1992; Dey et Datta, 1994). La localisation de notre protéine à l'extérieur du parasite nous laisse donc supposer qu'il puisse exister d'autres SOD qui protégeraient les compartiments soumis à un stress oxydant. La présence d'une SOD-Mn présente dans la mitochondrie n'est pas à exclure, puisqu'une activité SOD-Mn avait été détectée sur la base de l'action des inhibiteurs spécifiques (Ranz et Meshnick, 1989). Par ailleurs, le parasite pourrait renfermer également une SOD Cu/Zn cytoplasmique, dont l'activité serait masquée dans le parasite par la présence de la SOD Cu/Zn de la cellule hôte. Seule une caractérisation de ces gènes pourrait confirmer leur présence au sein du parasite.

Pourquoi la protéine est-elle exportée dans ce compartiment ?

Lors de son cycle asexué, *Plasmodium* se développe dans une vacuole parasitophore à l'intérieur de l'érythrocyte mature, cellule dépourvue de tout organite intracellulaire et ayant perdu la capacité de synthétiser les protéines *de novo*. Afin de survivre, le parasite exporte des antigènes et importe des nutriments extracellulaires (Deitsch et Wellems, 1996) à travers l'espace intraérythrocytaire par des mécanismes encore mal connus. Au stade trophozoïte, le parasite induit la formation du réseau tubulovésiculaire qui émerge à partir de la membrane de la vacuole parasitophore et qui s'étend jusqu'à la membrane de l'érythrocyte (Elford, 1993; Elmendorf et

Haldar, 1994). Il a été suggéré que ce réseau puisse être un organite impliqué dans le transport de nutriments importants tels que l'adénosine, le glutamate et l'acide orotique au stade tardif de la croissance du parasite et qu'une voie de transport alternative soit présente dans les 30 premières heures après réinvasion du mérozoïte (Lauer et coll., 1997).

La localisation de la SOD-Fe dans la vacuole parasitophore au stade anneau puis dans les corpuscules de Maurer aux stades tardifs nous amène à penser que cette protéine joue un rôle de protection pour ces structures. En effet, nous avons mis en évidence la présence de ponts AIP dans les corpuscules de Maurer, suggérant que ce compartiment soit soumis à un stress oxydatif. Nous supposons comme Haldar et coll. (1991) que les corpuscules de Maurer et le réseau tubulovésiculaire forment un seul et même compartiment, en continuité avec la vacuole parasitophore. Ces structures étant impliquées d'une part dans l'importation de nutriments et d'autre part, dans l'exportation des protéines parasitaires, le parasite sécréterait la SOD-Fe dans cet organite afin de protéger certaines cibles vitales d'une attaque oxydative.

Une autre hypothèse serait que la SOD-Fe transite dans ces structures dans le but d'être sécrétée à l'extérieur de l'hématie afin de protéger le globule rouge infecté d'un stress oxydant généré par le système immunitaire de l'hôte. En effet, des organismes tels que *Mycobacterium tuberculosis* (Kusunose, 1976) et *Nocardia asteroides* (Beaman et coll., 1983) sécrètent une SOD-Fe dans le milieu, les rendant ainsi plus résistants à l'attaque phagocytaire et donc plus virulents. De plus, Wright et coll. (1997) ont montré que les deux SOD dont une au moins à fer de *Perkinsus marinus* sont exportées dans le milieu extracellulaire et seraient des facteurs de virulence potentiels de cet organisme.

Toutefois, l'ensemble des résultats expérimentaux suggère que la première hypothèse soit la plus vraisemblable.

Quelle voie de sécrétion la SOD-Fe emprunte-t-elle ?

Chez *P. falciparum*, les mécanismes permettant le transport des antigènes au delà de la membrane de la vacuole parasitophore demeurent encore mal compris. En effet, il semblerait que celui-ci possède de multiples voies d'exportation des protéines. La voie principale serait la voie classique de sécrétion des protéines qui comprend le complexe RE/Golgi (Elmendorf et Haldar, 1993b). Les protéines sont recrutées dans le réticulum endoplasmique par un processus de

reconnaissance d'une séquence signal présente dans la protéine, puis elles sont exportées dans l'appareil de Golgi et enfin libérées au niveau de la membrane plasmique. Les protéines qui empruntent la voie classique de sécrétion possèdent un peptide signal à leur extrémité N-terminale et sont redistribuées vers le réticulum endoplasmique sous l'action de la Bréfeldine A, toxine fongique qui inhibe la sécrétion des protéines en provoquant le gonflement et l'éclatement de l'appareil de Golgi. Or, la découverte de protéines sécrétées ne présentant pas de séquence signal à leur extrémité N-terminale (Lingelbach, 1993) ainsi que celle d'une voie d'exportation insensible à la BFA nous laisse suggérer l'existence d'une voie d'exportation indépendante de la voie classique de sécrétion.

Il serait donc intéressant de connaître la voie de sécrétion empruntée par la SOD-Fe. Pour cela, un traitement par la bréfeldine A d'une culture synchrone de *P. falciparum*, suivi de la localisation de la SOD-Fe en immunofluorescence indirecte permettra de déterminer la sensibilité ou non de la protéine vis-à-vis de cette toxine. Nous nous intéresserons également à d'autres protéines pf332 et HRPII qui sont sécrétées dans les corpuscules de Maurer puis dans la membrane du globule rouge. La sécrétion de ces antigènes est connue pour être inhibée par la BFA. En effet, après un traitement des cultures à la BFA, Pf332 et HRPII ne sont plus sécrétés dans la cellule hôte mais ils s'accumulent dans le cytoplasme du parasite, suggérant que ces antigènes empruntent la voie classique RE/ Golgi (Hinterberg et coll., 1994; Howard et coll., 1986a).

Un premier élément pouvant laisser penser que la SOD-Fe emprunte une voie alternative, insensible à la BFA, est l'absence de peptide signal situé à l'extrémité N-terminale. En effet, en immunoprécipitation, aucune maturation de notre protéine n'est mise en évidence après une chasse avec la méthionine froide. De plus, le microséquençage des 29 premiers acides aminés de la SOD-Fe parasitaire purifiée montre une homologie parfaite avec l'extrémité N-terminale déduite de la séquence nucléotidique de l'ADNc. Pourtant, l'analyse de la séquence peptidique déduite de l'ADNc montre la présence d'un site potentiel de clivage situé entre la sérine 19 et l'acide glutamique 20. Afin de tester la fonctionnalité de cette séquence signal potentielle, une étude de la translocation de notre protéine dans des microsomes devra être tentée *in vitro*.



## **DISCUSSION GENERALE**

Le travail réalisé par P. Bécuwe (thèse, 1994) avait permis de mettre en évidence la présence d'une SOD endogène chez *P. falciparum*. La nature fer-dépendante de cette SOD avait été déterminée sur la base de l'action des inhibiteurs spécifiques et sur la base d'homologies obtenues à partir de la séquence peptidique déduite du fragment de 424 pb avec les SOD à fer. La caractérisation de cette SOD parasitaire était intéressante pour plusieurs raisons. Premièrement, c'était la première fois que l'on mettait en évidence chez *P. falciparum* une partie du gène codant pour une enzyme impliquée dans le système de défense antioxydant, réduisant ainsi à néant l'hypothèse qui voulait que le parasite internalise les enzymes antioxydantes du globule rouge et les utilise pour sa propre défense. Deuxièmement, la nature fer-dépendante de cette SOD endogène la rendait distincte de celles de l'hôte et donc susceptible de devenir une cible potentielle pour le développement de drogues antimalariques.

Les résultats acquis lors de notre travail de thèse ont permis d'une part de confirmer la nature fer dépendante de la SOD chez *P. falciparum* et d'autre part de définir ses propriétés biochimiques et biophysiques ainsi que son rôle au sein du parasite.

#### - La SOD parasitaire

La nature fer-dépendante de la SOD parasitaire a été démontrée par la spectrométrie d'absorption atomique ainsi que par la résonance paramagnétique électronique (RPE). La caractérisation de ce type de SOD chez un protozoaire tel que *P. falciparum* ne semble pas un fait exceptionnel. En effet, les SOD-Fe ont été caractérisées chez de nombreux protozoaires tels que les kinétoplastidés, les trichomonadines, les apicomplexa et chez *Entamoeba*. L'analyse phylogénique de ces enzymes montre qu'elles sont toutes regroupées au sein d'une même famille qui comprend exclusivement les SOD-Fe provenant de bactéries, de cyanobactéries, de chloroplastes. Seule la SOD-Fe tétramérique de *Tetrahymena pyriformis* échappe à cette règle (Barra et coll., 1990) puisqu'elle est retrouvée dans le groupe des SOD-Mn mitochondriales.

En revanche, un fait beaucoup plus inattendu est la localisation de la SOD-Fe de *P. falciparum* dans le réseau tubulovésiculaire. Chez les protistes, nous disposons pour l'instant de peu d'informations en ce qui concerne la distribution des SOD-Fe, à l'exception des SOD-Fe de *Chlamydomonas*, de *Trypanosoma* et de *Perkinsus marinus* qui sont retrouvées respectivement dans le chloroplaste, la mitochondrie et le milieu extérieur (Chen et coll., 1996; Ismail et coll.,

1997; Wright et coll., 1997). La localisation de la SOD de *P. falciparum* suggère qu'elle protège le compartiment extracellulaire du parasite d'une attaque oxydative. En effet, la présence de lésions oxydatives dans ce compartiment a été observée en immunofluorescence indirecte. D'autre part, l'inhibition même très partielle de l'expression enzymatique dans les cultures traitées avec les oligonucléotides antisens spécifiques entraîne l'apparition très rapide de lésions oxydatives dans le réseau tubulovésiculaire (L. Berry, DEA, 1997) et des études de colocalisation de la SOD et des ponts AIP (marqueurs de lésions oxydatives) révèlent la présence de ces ponts AIP dans les structures qui ne possèdent pas de SOD. Nous pouvons donc en déduire que le parasite sécrète la SOD-Fe dans le réseau tubulovésiculaire afin de le protéger d'un choc oxydatif auquel il serait exposé.

Ceci nous amène à nous interroger sur l'origine du choc oxydant dans ces structures:

-L'anion superoxyde serait produit dans le stroma du globule rouge lors de l'oxydation spontanée de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine (Misra et Fridovich, 1972b). Au cours de son développement dans l'hématie, le parasite internalise et digère le contenu de l'hématie conduisant à un affaiblissement du système antioxydant de l'hématie parasitée. Au stade anneau, l'anion superoxyde produit dans le cytoplasme du globule rouge est rapidement dismuté par la SOD Cu/Zn de l'hôte. Par contre, aux stades trophozoïte et schizonte,  $O_2^\circ$  est beaucoup moins détoxifié à cause de l'internalisation puis la digestion de la SOD Cu/Zn, et peut alors atteindre le réseau tubulovésiculaire. Pour arriver dans ce compartiment, l'anion superoxyde doit donc être capable de traverser la membrane de la vacuole parasitophore. Or, cette espèce radicalaire diffuse peu à travers les membranes, à l'exception de la membrane de l'hématie où elle emprunte un canal anionique (Lynch et Fridovich, 1978). Des canaux anioniques et de larges canaux non spécifiques ont été mis en évidence respectivement dans la membrane des hématies infectées par *Plasmodium falciparum* (Kirk et coll., 1994), et dans la membrane de la vacuole parasitophore (Desai et coll., 1993). Il est possible d'imaginer que l'anion superoxyde traverse la membrane de la vacuole parasitophore *via* ces canaux non spécifiques. Afin de compenser la disparition de la SOD Cu/Zn, le parasite sécréterait et accumulerait la SOD-Fe dans ce compartiment au cours de son développement.

-L'anion superoxyde peut également être produit à l'extérieur de l'hématie parasitée au

cours d'une réponse immune non spécifique produite par les cellules phagocytaires. Il peut s'introduire dans le globule rouge par deux mécanismes différents.  $O_2^{\circ}$  pénètre dans le stroma du globule rouge *via* les canaux anioniques présents dans la membrane de l'hématie. On se retrouve alors dans le même cas de figure que précédemment. L'anion superoxyde pourrait également emprunter un accès direct jusqu'au parasite *via* le "duct", structure qui permet l'importation directe des nutriments au parasite (Pouvelle et coll., 1991). Dans ce cas précis, l'anion superoxyde ne traverserait aucune membrane puisque le "duct" assurerait une continuité entre l'environnement et l'espace vacuolaire entourant le parasite. Il faut souligner que l'existence de cette structure semble encore aujourd'hui assez controversée (Haldar et Uyetake, 1992; Fujioka et Aikawa, 1993).

La présence de la SOD-Fe dans le réseau tubulovésiculaire implique la formation d' $H_2O_2$  dans ce compartiment. L'élimination du peroxyde d'hydrogène peut s'envisager suivant deux processus différents:

- Comme il est capable de traverser aisément les membranes, il repasserait dans l'hématie où il serait détruit par la GPx et la catalase érythrocytaires. Toutefois, un tel phénomène ne pourrait se produire que dans les stades anneaux, car au delà le contenu de l'hématie est internalisé par le parasite.

- Il existerait dans le réseau tubulovésiculaire des enzymes capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène. Il serait donc important de rechercher leur présence éventuelle.

La localisation de la SOD-Fe à l'extérieur du parasite nous laisse supposer que celui-ci possède d'autres SOD capables de défendre les différents compartiments soumis à un stress oxydant. Chez *Plasmodium*, la mise en évidence d'un cytochrome P450 (Ndifor et coll., 1990; Surolia et coll., 1993), enzyme microsomale impliquée dans la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène suggère l'existence d'une SOD cytoplasmique parasitaire. Toutefois, on peut s'interroger sur la nature de cette SOD. Beaucoup de protistes ne possèdent qu'une SOD à fer actuellement connue. Toutefois, une activité SOD Cu/Zn a été décrite chez *Leishmania* (Dey et Datta, 1994), chez *Tetrahymena* (Favero, 1992) mais également chez *Eimeria* (Michalski et Prowse, 1991).

D'autre part, la caractérisation de la dihydroorotate déshydrogénase mitochondriale,

enzyme générant de l' $O_2^{\cdot -}$  lors de la synthèse des bases pyrimidiques (Krungkrai, 1991), suggère la présence d'une SOD capable de détoxifier ces E.A.O dans ce compartiment. La nature manganèse dépendante est soupçonnée pour plusieurs raisons. Premièrement, la localisation mitochondriale de l'enzyme est en faveur de cette hypothèse, malgré la caractérisation de SOD-Fe présentes dans cet organite (Barra et coll., 1990; Ismail et coll., 1997). Deuxièmement, une activité SOD-Mn avait été détectée sur la base de l'action d'inhibiteurs spécifiques chez *P. falciparum* (Ranz et Meshnick, 1989) or elle n'avait jamais été caractérisée par Bécuwe et coll. (1996). Les cultures réalisées par Ranz et Meshnick étaient maintenues à une tension d'oxygène d'environ 15% alors que les cultures utilisées par Bécuwe étaient réalisées en présence de 5% d'oxygène. L'existence d'une SOD-Mn chez *P. falciparum* semble donc plausible, mais elle ne serait induite qu'en présence de tensions en oxygène supérieures à 5%. En revanche, il est envisageable qu'elle soit exprimée plus facilement *in vivo* du fait d'une teneur en  $O_2$  comparable à celle obtenue en "candle jar" et de la présence de manganèse dans le sérum. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en travaillant sur des espèces de *Plasmodium* de rongeurs. Toutefois, Bécuwe et coll. (1993) n'ont pas observé d'activité SOD-M, celle-ci pouvant être masquée par la présence de la SOD Cu/Zn contaminante de l'hématie. La recherche des gènes codants pour les différentes SOD semble le meilleur moyen pour démontrer la présence de ces enzymes dans le parasite.

Si l'existence de plusieurs SOD était confirmée, on ne pourrait exclure que le parasite exprime des SOD différentes au cours des phases du cycle biologique, comme chez *Eimeria* (Michalski et Prowse, 1991). Il faudrait donc rechercher les SOD exprimées par le parasite en particulier lors de la phase sexuée chez le moustique (oocystes et sporozoïtes) et au cours de la phase exoérythrocytaire chez le mammifère (phase hépatique).

- Le site actif de la SOD-Fe de *P. falciparum* et étude de sa sensibilité vis-à-vis de  $H_2O_2$

Les études réalisées en RPE ont montré la présence de deux environnements du fer chez la SOD-Fe recombinante de *P. falciparum*. Un des ions ferriques serait situé dans une symétrie partiellement rhombique (FeA) alors que l'autre ion ferrique serait situé dans une symétrie quasi rhombique (FeB). Ce type de spectre constitué de deux signaux n'est pas exceptionnel puisqu'on

le retrouve dans les SOD d'autres organismes. La différence observée chez ces SOD-Fe est une variation de la proportion des sites FeA/FeB. Dans le cas de la SOD-Fe recombinante sauvage de *P. falciparum*, le site FeA est prépondérant par rapport au site FeB alors que l'inverse est observé dans la protéine mutée W72V. La SOD-Fe recombinante sauvage se distingue de la SOD mutée W72V sur au moins deux points : une activité spécifique plus importante et une sensibilité plus grande vis-à-vis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une des hypothèses pour expliquer ces différences est le changement du rapport site FeA/site FeB observé dans ces deux protéines. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer l'activité spécifique, la sensibilité à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le spectre RPE des SOD-Fe de *E. coli*, de *P. ovalis* et de *P. shermanii* qui présentent des variations de proportion site FeA/site FeB. A partir de cette étude, nous pourrions vérifier si la proportion des sites FeA/ sites FeB observée dans chaque protéine est à l'origine des propriétés biochimiques de l'enzyme.

D'autre part, le remplacement du résidu tryptophane en une valine dans la SOD-Fe recombinante de *P. falciparum* ne rend pas cette protéine résistante à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui infirme l'hypothèse proposée par Meier et coll. (1994) qui avait suggéré que ce tryptophane était responsable de l'inactivation des SOD-Fe par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Or les connaissances actuelles sur les séquences de SOD à Mn et à fer montrent que ce résidu ne peut pas être le seul impliqué dans cette inactivation, car toutes les SOD à fer dimériques ne présentent pas un résidu tryptophane dans la position équivalente à celle de Trp72 chez *P. falciparum*. L'étude de plus de cent séquences de SOD à fer et à manganèse disponibles dans les banques montre:

- que les SOD à manganèse tétramériques et dimériques résistantes à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> présentent toujours un acide aminé aliphatique à cette position;

- que les SOD à fer présentent un acide aminé aromatique dans cette position (Trp, Phe ou Tyr). Les seules exceptions rencontrées dans la famille phylogénique des SOD à fer dimériques est précisément le fait de SOD cambialistiques de *Bacteroides* qui présentent un acide aminé aliphatique. Or les SOD à fer contenant Phe ou Tyr sont sensibles au peroxyde d'hydrogène. Cette propriété ne peut donc pas être attribuée au seul tryptophane.

A partir de ce travail, un mécanisme de l'inactivation de la SOD-Fe par le peroxyde d'hydrogène a été proposé. Comme dans les mécanismes déjà décrits (Yamakura et Suzuki, 1986; Beyer et Fridovich, 1987), le fer présent dans le site actif jouerait un rôle critique dans ce processus d'inactivation. En revanche, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'agirait pas au niveau du fer en le réduisant (Beyer

et coll., 1991), mais en formant un complexe “peroxo-fer”. Ensuite un transfert d'électrons provenant de tryptophanes ou d'autres résidus vers le complexe intermédiaire, entraînerait l'oxydation, l'inactivation et la libération du fer dans le milieu.

Pour la première fois, un signal centré à  $g=2$  correspondant à un radical organique a été décrit durant la réaction. La présence de ce signal confirme donc l'oxydation d'un ou plusieurs résidus présents dans la protéine. Le fait que ce signal ne puisse être détecté durant la réaction de  $H_2O_2$  avec la protéine mutée W72V suggère que ce radical est localisé sur le résidu tryptophane 72. Des études complémentaires devront être réalisées pour identifier ce radical.

- La SOD-Fe constitue-t-elle une bonne cible médicamenteuse?

La SOD-Fe de *P. falciparum* semble présenter toutes les caractéristiques requises pour constituer une cible antimalarique potentielle. Premièrement, sa nature fer-dépendante la rend distincte de celles de l'hôte qui sont Cu/Zn et Mn dépendantes. On peut donc envisager un ciblage médicamenteux qui affecterait préférentiellement la SOD parasitaire. Une telle démarche pourrait fragiliser encore plus le parasite vis-à-vis des E.A.O auxquelles il est exposé au cours de son développement. Deuxièmement, son expression constitutive indique que cette protéine peut être ciblée à n'importe quel moment du cycle intraérythrocytaire parasitaire. Troisièmement, sa localisation dans le réseau tubulovésiculaire, organe impliqué dans le transport des nutriments, la rend plus facilement accessible aux drogues.

Toutefois, plusieurs points sont à vérifier avant de valider cette enzyme en tant que cible thérapeutique. Jusqu'à ce jour, peu d'études ont été réalisées pour savoir si cette enzyme était indispensable, voire même vitale pour le parasite. Une stratégie antisens a été mise en place dans le laboratoire (L. Berry, D.E.A, 1997) dans cette optique. Les résultats préliminaires montrent que certains antisens inhibent bien la synthèse de la SOD-Fe parasitaire ce qui entraîne des lésions peroxydatives dans le réseau tubulovésiculaire. Par contre, l'effet de ces antisens sur l'inhibition de la culture parasitaire reste encore à prouver, car des fixations non spécifiques de ces oligonucléotides sur d'autres ARNm peuvent survenir, rendant toute interprétation difficile. Un autre moyen serait alors d'explorer la zone promotrice flanquée en amont du gène codant pour la SOD-Fe afin de produire des parasites mutants exprimant peu (par modification de la zone promotrice) ou pas du tout la SOD-Fe (Knock-out). Une telle stratégie est actuellement développée au laboratoire (H. Yera, D.E.A, 1997). Même si l'enzyme n'est pas vitale, un ciblage

peut être intéressant pour affaiblir la défense antioxydante du parasite. L'étude de la régulation de l'enzyme en présence d'un stress oxydatif semble donc indispensable pour estimer les possibilités d'adaptation de *Plasmodium*. En règle général, les SOD-Fe ne sont pas des enzymes inductibles, toutefois des exceptions subsistent telles que la SOD-Fe d'*Entamoeba histolytica* (Bruchhaus et Tannich, 1994) et de *Rhizobium japonicum* (Stowers et Elkan, 1981). De plus, la présence éventuelle d'autres SOD dans le parasite implique que celui-ci puisse exprimer ces SOD à différents stades du développement mais également dans différentes conditions de stress. Si la présence d'autres SOD était vérifiée, cela signifierait que le parasite pourrait compenser la perte d'activité de la SOD-Fe par une augmentation de l'expression d'autres SOD, mais serait-il capable de sécréter ces enzymes dans le réseau tubulovésiculaire? La question est de savoir si l'absence de protection de ce compartiment serait nuisible voire léthal pour le parasite. L'utilisation de mutants n'exprimant plus la SOD ou le traitement d'une culture parasitaire avec des inhibiteurs spécifiques de la SOD-Fe permettraient de répondre à cette question.



## **CONCLUSIONS-PERSPECTIVES**

---

Ce travail avait pour principal objectif de caractériser de façon approfondie la SOD de *Plasmodium falciparum*. La protéine native ne pouvant être obtenue qu'en très faible quantité, nous avons exprimé une protéine recombinante chez une souche d' *Escherichia coli* dépourvue de SOD-Fe et SOD-Mn. L'obtention et la purification de cette protéine, nous a permis d'étudier ses caractéristiques biochimiques et biophysiques et de déterminer avec certitude la nature fer-dépendante de cette enzyme. D'autre part, les expériences de mutagenèse dirigée nous ont démontré que le résidu tryptophane 72 n'était pas responsable de l'inactivation de la SOD-Fe de *Plasmodium* par le peroxyde d'hydrogène. De plus, cette enzyme exprimée à tous les stades du cycle intraérythrocytaire serait exportée au stade anneau dans la vacuole parasitophore puis ensuite dans les corpscules de Maurer, structures qui seraient exposées à un choc oxydant.

La présence d'une SOD-Fe chez *P. falciparum* laissait présager l'existence d'enzymes parasitaires capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène. Effectivement, un gène codant pour une glutathion peroxydase (Gamain et coll., 1996a, 1996b) ainsi qu'une activité catalase (Clarebout et coll., sous presse) ont été mis en évidence chez *P. falciparum*. Toutes ces données obtenues dans notre laboratoire permettent de conclure que le parasite possède un système enzymatique antioxydant complet, ce qui modifie les idées classiquement admises sur le parasite et le choc oxydant.

Ce travail ouvre la voie à des perspectives de recherche intéressantes parmi lesquelles figurent:

- L'expression de la SOD-Fe au niveau transcriptionnel et traductionnel à la fois *in vitro* et *in vivo*, mais aussi lors d'un choc oxydant (culture de parasites maintenue à 15% d'oxygène, addition dans le milieu de culture de produits générant de l'anion superoxyde (paraquat)), en présence de chélateurs de fer.

- L'exploration de la zone promotrice du gène codant pour la SOD-Fe afin de déterminer les séquences impliquées dans la régulation telles que l'iron box (en cours).

- La production de nouveaux anticorps monoclonaux dans l'optique de déterminer avec plus de précision la localisation de la SOD en microscopie électronique.

- La recherche du gène codant pour une SOD-Mn éventuelle. Si la présence de cette enzyme s'avère exacte, il faudra savoir si cette protéine est inductible ou non et sous quelles

conditions (supplémentation en Mn dans le milieu de culture, lors d'un choc oxydant)

- La validation de la SOD-Fe comme cible thérapeutique par l'utilisation d'antisens (en cours), de molécules inhibitrices et par l'obtention de parasites mutants exprimant peu (par modification de la zone promotrice) ou pas du tout la SOD-Fe (Knock-out).

- L'étude en cristallographie de la protéine recombinante afin de définir au mieux la structure de l'enzyme.

- Les tests en microplaque permettant d'analyser l'action de différentes molécules sur l'activité de la SOD.

La réalisation de l'ensemble de ce travail complétera les données déjà acquises concernant le système enzymatique antioxydant de *Plasmodium* et permettra de savoir si la SOD-Fe de *P. falciparum* constitue une bonne cible médicamenteuse pour le développement de molécules antimalariques.

# **ANNEXE TECHNIQUE**

# PRODUCTION ET ISOLEMENT DES PARASITES

## I. SOUCHE DE PARASITE UTILISEE

Au cours de notre travail, nous avons utilisé une espèce de *Plasmodium* humain cultivé *in vitro* sur des hématies humaines:

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

## II. CULTURE DE *P. FALCIPARUM* *IN VITRO*

Le dénombrement des parasites est effectué sur frottis (réalisé à partir d'une goutte de culture de *P. falciparum*) après fixation au méthanol et coloration au Giemsa (Merck), on estime la parasitémie sur au moins 1000 hématies.

La souche FCR3 est cultivée *in vitro* selon la méthode Trager et Jensen (1976) sur des hématies du groupe O+ en milieu RPMI 1640 (Boehringer) additionné d'Hepes 25 mM, de NaHCO<sub>3</sub> 0,89 mM, de gentamycine 10 mg/ml et de 10% de sérum humain du groupe A+ décomplémenté (milieu complet). Les cultures sont placées à 37°C en atmosphère à 5% d'O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>. Dans ces conditions le taux de croissance est de l'ordre de 10 par cycle de 43 à 46 heures.

## III. 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 coll., (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.

#### **IV. ISOLEMENT DES PARASITES**

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

# APPROCHE EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

## I. CRIBLAGE DE LA BANQUE D'ADNc (fournie par O. Mercereau-Puijalon)

La banque d'ADNc a été construite à partir de la souche HB3 de *P. falciparum*. Les fragments d'ADNc dont la taille n'excède pas 5 kb, ont été insérés dans le plasmide pcDNA II aux sites de restriction *Bst* XI. Le titre de départ de la banque bactérienne a été estimé à  $10^{10}$  cfu (colonies forming units) /ml.

### I.1 Etalement des colonies

Les bactéries ( $7 \cdot 10^4$  colonies) ont été étalées sur le milieu LB agar (milieu Luria Bertani constitué de 10g/l Tryptone, 5g/l d'extrait de levure, 5g/l de NaCl, 20g/l Bactoagar pH 7,4) contenant 50 µg/ml d'ampicilline afin de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C.

### I.2 Transfert des colonies sur filtres

Les colonies bactériennes sont répliquées sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham). Les bactéries présentes sur les filtres vont subir une série de traitements (lyse douce des bactéries, dénaturation de l'ADN et neutralisation). En effet, les répliques sont déposées successivement sur du papier Whatman saturé avec :

- 1,5 mg/ml de lysosyme, 25% de sucrose et 50mM Tris/ HCl pH 8,0 pendant 3 min à 4°C.
- 0,2% Triton et 0,5N NaOH pendant 3 min à température ambiante
- 0,5 N NaOH pendant 3 min à température ambiante
- 1M Tris/HCl pH7,5 pendant 3 min à température ambiante
- 0,15 M NaCl et 0,1 M Tris/HCl pH 7,5.

Entre chaque étape, les filtres sont séchés une minute sur du papier Whatman sec.

La dernière étape consiste à irradier les filtres secs 3 minutes afin de fixer l'ADN sur les filtres.

### **I.3 Marquage de la sonde de 424 pb**

Le marquage de la sonde est réalisé par marquage au hasard (random priming) avec le kit commercialisé par Boehringer. Environ 25 ng de sonde sont dénaturés 10 min à 100°C et refroidis sur la glace. On ajoute alors successivement 3 µl de dATP, de dGTP, de dTTP, puis 2 µl de mélange réactionnel fournis dans le kit contenant les hexanucléotides servant d'amorces, 5 µl de dCTP $\alpha$ -<sup>32</sup>P correspondant à 50 µCi, enfin 1 µl de polymérase de Klenow. Le volume final est ramené à 20 µl avec de l'eau. L'ensemble est incubé 30 min à 37°C. La réaction de marquage est arrêtée par chauffage à 65°C pendant 10 min. Le reliquat du nucléotide radiomarqué libre est ensuite éliminé par gel filtration (Sephadex G-50, Pharmacia).

### **I.4 Etapes de préhybridation et d'hybridation**

La préhybridation est effectuée pendant 2 heures à 65°C avec une solution contenant 2,5% de lait en poudre, 0,5% de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et du SSC 6x (préparé à partir d'une solution mère SSC 20x : citrate de Na 0,3M pH 7 ; NaCl 3 M).

L'hybridation est réalisée toute la nuit à 65°C, dans la même solution contenant en plus une quantité de sonde équivalente à  $3 \cdot 10^7$  coups/minutes ainsi que 100µg d'ADN de sperme de hareng, tous deux préalablement dénaturés 10 minutes à 100°C.

Les filtres sont ensuite lavés à 68°C, d'abord 2 fois par une solution contenant 2,5% de lait en poudre, 0,5% de SDS et du SSC 6x, puis 2 fois par du SSC 2x, 2 fois par du SSC 0,5x, enfin 2 fois du SSC 0,1x.

Les filtres de nylon sont ensuite mis au contact d'un film photographique X-OMAT (Kodak) pendant 24 heures à -70°C.

Trois séries de criblage ont été réalisées afin d'obtenir des clones positifs purifiés.

## **II. VERIFICATION DE LA NATURE DE L'INSERT**

### **II.1 Purification des plasmides**

Afin de vérifier la taille et la nature de l'insert provenant des clones positifs, une extraction et une purification des plasmides 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°). La présence de l'insert est alors vérifiée en digérant 100ng d'ADN plasmidique avec 10 unités de *Bam* HI et de *Xho* I pendant 3 heures à 37°C. Le produit de la digestion est analysé sur un minigel à 1% d'agarose.

## II. 2 Séquençage de l'insert

Le plasmide contenant l'insert de plus grande taille 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 10% d'acétate de sodium pH 4,5 et de 3 volumes d'éthanol 100°. Le culot obtenu après une centrifugation de 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. Le séquençage de l'insert est réalisé selon la technique de Sanger (1977) avec le kit Sequenase (USB) version 2.0 contenant les tampons, l'ADN polymérase du phage T7, les nucléotides froids et la solution d'arrêt. Le principe de la méthode est basé sur la capacité des ADN polymérases d'allonger une amorce hybridée sur l'ADN à séquencer, jusqu'à ce qu'un didéoxynucléotide soit incorporé et bloque la synthèse. Le séquençage du double brin de l'insert est réalisé en utilisant comme amorces, les séquences des promoteurs SP6 et T7 (USB) qui s'hybrident sur le brin codant et non codant du vecteur.

Pour chaque amorce est réalisée une réaction de séquence. Dans chacun des deux tubes, l'amorce est hybridée au plasmide dénaturé pendant 2 min à 65°C. A ce mélange sont ajoutés, lorsque la température est descendue à 35°C, 0,1M de DTT, 0,5 µCi de dATP [<sup>35</sup>S] (Amersham) et la quantité requise de tampon contenant les nucléotides. La réaction de synthèse et de

marquage est initiée dans chacun des tubes lorsque l'ADN polymérase T7 est ajoutée au mélange. Après 5 min de réaction à température ambiante, le mélange est transféré dans 4 tubes différents renfermant chacun un didéoxynucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) et laissé en contact encore 5 min à 37°C. La réaction est ensuite arrêtée par addition de la solution d'arrêt du kit.

### **III. HYBRIDATION AVEC L'ADN GENOMIQUE DE *P. FALCIPARUM***

#### **III.1 Préparation de l'ADN génomique**

Le culot parasitaire purifié est repris par 5 ml de tampon de lyse (Tris/HCl 7,5mM pH 8; EDTA 7,5mM; 1% de SDS) contenant 0,4 mg 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 pH6 (0,1v), éthanol absolu (2v) froid avant d'être enroulé autour d'une baguette de verre stérile et lavé dans de l'alcool à 70°C à -20°C. Après séchage à température ambiante, l'ADN est redissout dans du tampon TE (Tris/HCl 10mM 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.

#### **III. 2 Digestion de l'ADN génomique**

Environ 10 µg d'ADN génomique de *P. falciparum* sont digérés par une endonucléase de restriction, *Cla*I, *Hind* III, *Nde* I et *Xba*I (Biolabs), à raison de 6 unités d'enzyme par µg d'ADN, pendant 5 heures à 37°C.

#### **III. 3 Electrophorèse et transfert (Southern Blot)**

L'ADN génomique digéré est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% en TAE, pendant 4 heures (100 volts) parallèlement à un témoin contenant différents marqueurs de poids moléculaire.

Pour favoriser le transfert des fragments de taille supérieure à 10 kb, le gel est traité dans

une solution d'HCl 0,25 M pendant 15 min pour dépuriner l'ADN. Après un bref rinçage dans l'eau, l'ADN est dénaturé en plaçant le gel dans un bain de soude 0,4 M pendant 30 min, puis transféré par capillarité sur une membrane de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) pendant une nuit à température ambiante en présence de NaOH 0,4 M. La membrane est ensuite rincée dans un tampon SSC 2x et séchée. L'ADN est fixé par cuisson de la membrane à 80°C pendant 2 heures.

### III. 4 Réaction d'hybridation

La préhybridation est réalisée pendant 6 heures à 42°C avec une solution contenant du SSC 6x, du Denhardt's 5x (Ficoll 0,1% ; Polyvinylpyrrolidone 0,1% ; BSA 0,1%), 0,1% de SDS, 50% de formamide et 100µg/ml d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 10 min à 100°C.

L'hybridation est réalisée toute la nuit à 42°C, dans la même solution contenant la sonde de 424pb marquée au <sup>32</sup>P par random priming (2.10<sup>7</sup> coups/min), préalablement dénaturée 10 min à 100°C.

La membrane est ensuite lavée à 42°C : d'abord 2 fois par du SSC 2x 0,1% SDS, puis 2 fois par du SSC 1x 0,1 % SDS, 2 fois par du SSC 0,5x, 0,1% SDS et enfin 2 fois par du SSC 0,1x , 0,1% de SDS.

La membrane de nylon est mise au contact d'un film photographique X-OMAT (Kodak) pendant 1 jour à -70°C.

## IV. RECHERCHE DU CHROMOSOME PORTANT LE GENE CODANT POUR LA SOD-FE DE *P. FALCIPARUM* (Ce blot de chromosomes nous a été fourni par G. Langsley)

Les chromosomes provenant des souches 3D7 et FCR3 de *P. falciparum* ont été soumis à une électrophorèse en champ pulsé. Ils sont séparés dans un gel à 0,7% d'agarose en tampon TBE (0,09 M Tris, pH 8; 0,09 M d'acide borique et 0,002 M EDTA). Le gel est coloré au bromure d'éthidium, puis irradié pendant 5 minutes pour fixer l'ADN. L'ADN chromosomique est transféré par la technique de Southern Blot sur une membrane de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham). La membrane est préhybridée puis hybridée de la même façon que pour le Southern avec la sonde de 424 pb marquée par random priming au <sup>32</sup>P. Les conditions de lavage sont également identiques.

## V. HYBRIDATION AVEC L'ARN TOTAL de *P. FALCIPARUM*

### V.1 Extraction de l'ARN total de *P. falciparum*

La préparation des ARN totaux a été effectuée selon la méthode décrite par Bonnefoy et coll., (1992). Un culot d'hématies parasitées (5 ml à 12% de parasitémie) provenant des stades anneau, trophozoïte et schizonte, soit 10h, 30h et 40h après invasion des mérozoïtes, 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, suivi 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.

### V. 2 Electrophorèse et transfert (Northern Blot)

Les ARNt (ARN totaux) sont repris dans un tampon de dénaturation comprenant 50% de formamide désionisée, 6% de formaldéhyde désionisée et du MOPS 1x (MOPS 10x: 3-(N-Morpholino) Propanesulfonic acid, acétate de sodium 0,05 M pH7, EDTA disodique 0,01 M). Les ARNt sont ensuite incubés 5 min à 68 °C puis placés dans la glace. Enfin 5µl de bleu RNase free (50% de glycérol, 1mM EDTA pH 8, 0,25% de bleu de bromophénol et 0,25 % de xylène cyanol) et 1 à 2 µl de BET (Bromure d'éthidium à 10 mg/ml) sont ajoutés à l'échantillon.

Les ARNt sont déposés sur un gel dénaturant à 1,2% d'agarose contenant du MOPS 5x et 6,6% de formaldéhyde désionisée et migrent dans du MOPS 1x à 52V pendant 6 heures. Après un bref rinçage dans l'eau DEPC, les ARN sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon (hybondN+) pendant une nuit à T° ambiante en présence de SSC 20x. La membrane est rincée dans du SSC 2x et séchée à 80°C pendant une heure.

### **V. 3 Réaction d'hybridation**

Les étapes de préhybridation et d'hybridation sont similaires à celles réalisées lors de l'hybridation avec l'ADN génomique. La sonde utilisée est toujours le fragment de 424 pb marquée au  $^{32}\text{P}$  par random priming. Seules les conditions de lavage diffèrent, la membrane est lavée 2 fois par du SSC 5x, 0,1% SDS puis 2 fois par du SSC 2x, 0,1% SDS et enfin deux fois par du SSC 0,5x, 0,1% SDS. La membrane est ensuite mise au contact avec le film X-OMAT pendant une nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

# PRODUCTION DANS UN SYSTEME HETEROLOGUE DES SOD-FE RECOMBINANTES SAUVAGE ET MUTEE

## I. CONSTRUCTION DES PLASMIDES

### I.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

#### I.1.1 Choix des amorces de PCR

La synthèse des oligonucléotides a été réalisée par la société Eurogentec. Une solution de chaque oligonucléotide est préparée à la concentration de 100 µM.

L'amorce SOD5' correspond aux premiers acides aminés de la SOD-Fe, un site de restriction *EcoRI* est ajouté à l'extrémité 5' de l'amorce, entraînant une perte du codon ATG et le remplacement du deuxième acide aminé (valine<sup>2</sup>) en leucine:

5'-CCG GAA TTC TTA TTA CAT TGC CC-3'

*EcoRI*

L'amorce SOD3' correspond aux dernières bases de la région non codante situées en aval du cadre ouvert de lecture, un site de restriction *BamHI* est également ajouté à l'extrémité 5' de l'amorce:

5'-GGG ATC CCC AGT GTG CTC-3'

*BamHI*

#### I.1.2. Réaction d'amplification

Cette réaction est réalisée avec le kit "thermostable goldstar Polymerase" (Eurogentec), contenant les tampons et les nucléotides. Chaque réaction est réalisée avec 1 µM d'amorce, 0,25 µg d'ADN génomique de *P. falciparum* et 0,5 unité de goldstar polymérase. Un témoin négatif contient uniquement les 2 amorces et l'enzyme. L'échantillon est soumis à 30 cycles d'amplification dans un appareil automatique (MJ research Thermal Cycler). Chaque cycle est constitué de 1 min 30 de dénaturation de l'ADN à 94°C, puis 1 min 30 à la température d'hybridation des amorces sur l'ADN (50°C), enfin 1 min 30 à 72°C permettant l'extension. Les 30 cycles se terminent par 5 min supplémentaires à 72°C.

## **I.2 Clonage du fragment amplifié**

### **I.2.1. Préparation du fragment amplifié**

Une électrophorèse préparative en gel de 1,2% d'agarose, préalablement dissous en tampon TAE (Tris 40 mM/Acétate 40 mM, pH 8; EDTA 1mM) est réalisée et la bande correspondant à l'ADN amplifié est excisée. L'ADN est ensuite élué du gel à l'aide du kit "Qiaex" (Qiagen), contenant les tampons et le gel "Qiaex". L'ADN adsorbé sur ce gel, est ensuite élué par du tampon TE.

### **I.2.2. Insertion dans un vecteur d'expression pT7-7**

Le produit de PCR ainsi que le plasmide pT7-7 sont digérés par *EcoRI* et *BamHI* pendant 3 heures à 37°C. A 10 ng de vecteur sont ajoutés 40 ng de produit de PCR et 4 U de T4 ligase. L'ensemble est laissé en contact la nuit à 16°C.

### **I.2.3. Préparation des bactéries compétentes DH5 $\alpha$**

Lorsque la culture bactérienne atteint une D.O de 0,3, le lysat est centrifugé à 3500g pendant 15 minutes. Le culot bactérien est ensuite repris au dixième de son volume de départ par du TSS 1x froid (milieu Luria Bertani dans lequel sont ajoutés 10% de polyéthylène glycol, 5% de DMSO (diméthyl sulfoxyde) et du MgSO<sub>4</sub> 50 mM ).

### **I.2.4. Transformation des bactéries compétentes**

10ng d'ADN issus de l'étape de ligation sont ajoutés à 100 $\mu$ l de bactéries compétentes. Après 30 min sur glace, les bactéries subissent un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes. Les bactéries sont ensuite incubées 1 heure sous agitation à 37°C dans du LB puis étalées sur le milieu LB agar contenant 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline puis incubées une nuit à 37°C.

## **I.3 Mutagénèses dirigées**

Le clonage du produit de PCR dans le bon cadre de lecture a conduit à une insertion de 3 acides aminés entre le codon ATG et le deuxième acide aminé valine qui a été lui même remplacé par une leucine dans la SOD-Fe recombinante. Le plasmide contenant cet insert a été appelé **pSDG-O**.

Une mutagénèse dirigée est réalisée afin de restaurer la séquence native de la SOD-Fe de

*P. falciparum*. Le kit “Transformer™ Site -Directed Mutagenesis” (Clontech) a été utilisé dans cette optique. Il se base sur la méthode employée par Deng et Nickoloff (1992) dont le principe est d’hybrider simultanément deux oligonucléotides sur le même brin d’ADN plasmidique dénaturé. Le premier primer introduit la mutation désirée alors que le second mute un site unique de restriction présent dans le plasmide. Après élongation de l’ADN, puis ligation, une première sélection des plasmides mutés est réalisée par digestion avec l’enzyme de restriction dont le site a été muté. Le mélange de plasmides mutés et non mutés est ensuite introduit dans une souche *E. coli mutS* déficiente en enzymes de réparation des mésappariements. Les transformants sont rassemblés et l’ADN plasmidique est purifié à partir de ce mélange de populations bactériennes. L’ADN isolé est alors soumis à une deuxième digestion avec l’enzyme de restriction en question. L’ADN qui présente les deux mutations est devenu résistant à la digestion au contraire de l’ADN parental. Ce dernier étant sous la forme linéaire, il pénètre 100 fois moins que l’ADN muté dans les bactéries compétentes, augmentant ainsi le niveau de rendement des plasmides mutés.

Pour la première mutagenèse, nous avons utilisé une amorce qui introduisait la mutation désirée et mutait en même temps le site de restriction *EcoRI*. L’ADN plasmidique qui nous a servi de matrice était le plasmide **pSDG-O**.

Première amorce phosphorylée à l’extrémité 5’:

5' P-GG AGA TAT ACA TAT GGT TAT TAC ATT GCC C-3'

Le plasmide codant pour la protéine recombinante sauvage a été nommé **pSDG-1**.

Pour la deuxième mutagenèse, deux amorces ont été hybridées sur l’ADN plasmidique **pSDG-1**.

Première amorce qui apporte la mutation:

5' P-CAA CGC TGC TCA AAT AGT GAA CCA TAC TTT TTA CTG GG-3'

Valine72

Deuxième amorce qui mute un site unique de restriction:

5' P-GTC GAC CTG CAG CCC ACG CGT ATC ATC GAT GAT AAG-3'

Le plasmide codant pour la protéine recombinante mutée W72V a été nommé **pSDG-2**.



## **II. CONSTRUCTION DE LA SOUCHE SOD<sup>-</sup>SODB<sup>-</sup>** (réalisé à Paris sous la direction de D. Touati)

La souche utilisée pour produire la SOD-Fe recombinante est la souche sauvage K38/pGp1-2 (Tabor et Richardson, 1985). Les mutations sodA<sup>-</sup> et sodB<sup>-</sup> vont être introduits dans cette souche par transduction généralisée.

### **II.1 Transduction de la souche sauvage K38/pGp1-2 par un lysat P1 portant la mutation sodB Cm<sup>R</sup>.**

#### II.1.1 Lysat du phage P1

Le lysat de phages P1 se fait sur boîte, en infectant, par un stock de P1 virulent à une multiplicité d'infection de 1/1000, une culture saturée de bactéries, ayant poussé en LB+ CaCl<sub>2</sub> (2,5.10<sup>-3</sup> M) et étalées en gélose molle. La lyse des bactéries apparaît après 6 heures d'incubation à 37°C. Le lysat est gratté, chloroformé (1%) et centrifugé (9000 rpm pendant 20 min à 4°C).

#### II.1.2 Transduction généralisée

Cette méthode permet d'introduire dans une souche, par recombinaison homologue, un fragment d'ADN chromosomique transporté par le phage P1.

Les bactéries réceptrices qui sont thermosensibles sont cultivées à 30°C au lieu de 37°C en LB jusqu'à saturation puis sont incubées en présence de CaCl<sub>2</sub> (5.10<sup>-3</sup> M) pour provoquer une désorganisation de la membrane bactérienne et sont infectées par P1 pendant 20 minutes à 30°C. Avant infection, le phage est irradié aux UV pour diminuer sa virulence et augmenter le taux de recombinaison. Après adsorption, l'excès de phage est éliminé par centrifugation pendant 3 min à 10000rpm et les bactéries sont remises en suspension en LB pendant 40 minutes à 30°C pour permettre l'expression des marqueurs de sélection. Les bactéries sont étalées sur boîtes LB agar contenant du citrate (5.10<sup>-3</sup> M), ce qui inhibe la réadsorption du phage libéré, et 20µg/ml de chloramphénicol.

## **II.2 Transduction généralisée de la souche K38/ pGp1-2 sodB Cm<sup>R</sup> par le lysat du phage P1 contenant la mutation sodA Cm<sup>R</sup> et Tet<sup>R</sup>**

La souche K38/ pGp1-2 sodB Cm<sup>R</sup> obtenue a été utilisée comme souche réceptrice du lysat du phage P1 contenant la mutation sodA Cm<sup>R</sup> et Tet<sup>R</sup>. A la suite de ces transductions, nous obtenons une souche K38/pGp1-2 possédant des SOD-Fe et Mn inactives. Cette souche a été appelée QC 2449.

## **II.3 Transformation de la souche QC2449 par les différents plasmides**

II.3.1 Préparation des bactéries compétentes QC2449 (voir paragraphe I.1.2.3 du même chapitre)

Nous avons rendu les bactéries compétentes par le TSS 1x. La seule différence est que les bactéries qui sont thermosensibles poussent à 30°C.

II.3.2 Transformation des bactéries QC2449 (voir paragraphe I.1.2.4 du même chapitre)

La seule différence avec une transformation classique est que le choc thermique est réalisé à 37°C pendant 5 min au lieu de 90 secondes à 42°C. D'autre part, les bactéries transformées sont étalées sur du LB agar contenant 20µg/ml d'ampicilline et 20µg/ml de kanamycine.

Les bactéries transformées avec le plasmide pSDG-1 codant pour la SOD-Fe recombinante sauvage a été appelée QC2450. Les bactéries transformées avec le plasmide pSDG-2 codant pour la SOD-Fe mutée W72V a été appelée QC2451. Les bactéries ont été également transformées avec le plasmide pT7-7 sans insert, cette souche servant de contrôle.

## **III. PRODUCTION DES PROTEINES RECOMBINANTES SAUVAGE ET MUTEE**

### **III.1 Production de la protéine recombinante sauvage**

La culture bactérienne QC2450 est réalisée dans un fermenteur de 20 litres (Setric). Les bactéries poussent à 30°C, sous agitation (250rpm), en présence de 50 l/h d'O<sub>2</sub>, dans un milieu enrichi (2% de Bactotryptone, 1% d'extrait de levure, 0,5% de NaCl, 0,2% de glycérol, 50mM

KPO<sub>4</sub> pH 7,2) contenant 75µg/ml d'ampicilline et 75µg/ml de kanamycine. Lorsque la culture atteint la phase de saturation (D.O= 1,5), les bactéries subissent un choc thermique pendant 30 min à 42°C. A cette température, le gène de l'ARN polymérase du phage T7 est dérèprimé. L'enzyme va alors pouvoir se fixer sur son promoteur induisant ainsi l'expression du gène d'intérêt. Les bactéries sont ensuite placées à 37°C pendant 90 min. Les bactéries sont récupérées par centrifugation continue à 35,776 g. Le culot bactérien est stocké à -80°C.

### **III.2 Production de la protéine recombinante mutée W72V**

La souche QC 2451 a été cultivée dans le même milieu (2 litres) et dans les mêmes conditions de température. En revanche, cette culture a été réalisée dans un Erlenmeyer au lieu d'un fermenteur. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation à 5000g pendant 10 min à 4°C (Beckman JA-20 rotor) et stockées à -80°C.

# PURIFICATION DES SOD-FE RECOMBINANTES

## SAUVAGE ET MUTEE

### I. PURIFICATION DE LA SOD-FE RECOMBINANTE SAUVAGE

#### I.1 Lyse du culot bactérien

Le culot bactérien QC 2450 (5 g environ) est repris par 30 ml de tampon phosphate  $10^{-2}$  M, EDTA  $10^{-2}$  M pH7,2. Après une bonne homogénéisation, le tout est passé à la french press à 1260 bars pour lyser les bactéries. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 30 min à 4°C, le surnageant contenant les protéines bactériennes est récupéré.

#### I.2 Dénaturation à la chaleur

Le surnageant est placé dans un bain marie à 70°C pendant 5 min puis il est centrifugé pendant 30 min à 12000 rpm à 4°C. Le culot blanc formé de protéines dénaturées est éliminé.

#### I.3 Précipitation au sulfate d'ammonium

-Précipitation à 55 % de sulfate d'ammonium :

La quantité de sulfate d'ammonium est déterminée à l'aide d'une table en tenant compte du volume. On ajoute le sulfate d'ammonium doucement dans le surnageant, sous faible agitation à 4°C puis on laisse incuber pendant 1 heure. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 30 min à 4°C, le surnageant est récupéré puis il est soumis à la précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation.

-Précipitation à 80 % de sulfate d'ammonium :

De la même façon, on ajoute la quantité de sulfate d'ammonium pour obtenir 80% de saturation et on laisse incuber 1 ou 2 heures à 4°C. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 30 min à 4°C, le culot protéique est récupéré puis repris par 5 ml de Tris/HCl 10 mM, pH 7.8.

#### I.4 Chromatographie gel filtration, ACA 44

Une colonne de 2,5 cm de diamètre et 100 cm de hauteur est équilibrée par du tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,8 à 4°C et calibrée avec différents marqueurs de poids moléculaire connu (Sigma): le bleu dextran (2000 kDa), l'albumine sérique bovine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa),

l'anhydrase carbonique (29 kDa) et le cytochrome c (12,4 kDa). La courbe  $V_e/V_o = f(\log \text{ poids moléculaire})$  est alors tracée.

Les protéines bactériennes ayant précipitée à 80% de saturation de sulfate d'ammonium sont déposées à la surface de la colonne. Elles sont éluées par le tampon Tris/HCl 10mM pH 7,8 à 4°C, avec un débit de 30 ml/ heure et leur sortie est suivie à 280 nm. L'activité SOD est mesurée dans chacune des fractions de 5 ml par la méthode au pyrogallol. Les fractions contenant l'activité SOD sont rassemblées.

### **I.5 Chromatographie échangeuse d'ions**

Les fractions contenant la SOD sont déposées sur une colonne DEAE-Trisacryl (IBF) de 2,5 cm x 30 cm préalablement équilibrée avec du Tris/HCl 10mM pH 7,8. Lors du lavage par un volume de colonne du même tampon, les protéines non retenues sur la colonne sont éluées. Les protéines fixées sont alors éluées par un gradient de NaCl (55 à 112,5 mM) avec un débit de 24 ml/heure. La détection de l'activité SOD est réalisée dans chacune des fractions de 3ml, une partie de l'activité a été retrouvée dans les fractions non retenues et une autre partie a été éluée à 76,5 mM de NaCl, les fractions contenant les deux pics d'activité ont été concentrées séparément à 4°C dans les Microprodicon TM membranes MWCO 15,000 puis stockées à -80°C.

## **II. PURIFICATION DE LA PROTEINE MUTEE**

Le même protocole de purification a été utilisé pour purifier la protéine recombinante mutée à partir de la souche QC 2451. La seule différence est que l'étape de dénaturation à 70°C a été éliminée et les précipitations au sulfate d'ammonium ont été réalisées à 50% puis 75% de saturation.

## **III. CONTROLE DE LA PURIFICATION**

### **III.1 Electrophorèse en SDS-PAGE (Laemmli, 1970)**

Un gel de séparation de 0,75 mm d'épaisseur à 12% d'acrylamide dans un tampon (Tris/HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1%), est coulé entre 2 plaques de verre (grand gel) ou entre une plaque de verre et d'alumine (mini gel). Le gel de concentration à 5% d'acrylamide est préparé

dans un tampon (Tris/HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1%). Les échantillons sont dilués dans un tampon de reprise (Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% ; saccharose 10% ; bleu de bromophénol 0,2%). Selon les cas on peut ajouter 0,1 M de dithiothréitol. Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min. L'électrophorèse est réalisée en courant constant à 30 mA pendant 2 heures pour les grands gels et 30 minutes pour les mini gels.

Le gel est calibré à l'aide de dépôts de marqueurs de poids moléculaire (LMW kit de Pharmacia).

### **III.2 Coloration des protéines**

#### **III.2.1 Coloration au nitrate d'argent (Merril et coll. 1981)**

Les protéines sont fixées dans le gel successivement par une solution contenant 50% de méthanol et 12% d'acide acétique pendant 30 min, puis par 3 bains de 10 min dans 10% d'éthanol et 5% d'acide acétique. Le gel est ensuite trempé pendant 5 min dans une solution contenant 3,4 mM de  $K_2Cr_2O_7$  et 3,2 mM d' $HNO_3$ . Après avoir été rincé plusieurs fois à l'eau bidistillée, le gel est trempé dans une solution de 12 mM de nitrate d'argent sous agitation pendant 30 min. La révélation des protéines est réalisée par une solution de 0,28 M de carbonate de sodium contenant 0,5 ml/l de formaldéhyde à 37%. La coloration est arrêtée par de l'acide acétique à 1% puis le gel est rincé à l'eau avant d'être séché.

#### **III.2.2 Coloration 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%.

## **IV. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE SOD SUR GEL**

### **IV.1 L'électrophorèse verticale en conditions non dénaturantes**

Le gel inférieur de 0,75 mm d'épaisseur à 7,5% en acrylamide dans un tampon Tris/HCl 375 mM pH 8,8 est coulé entre 2 plaques de verre. Le gel de concentration à 5% d'acrylamide est préparé dans le même tampon. Les échantillons sont repris dans un tampon (Tris/HCl 62,5 mM

pH 8,8 ; saccharose 10% ; bleu de bromophénol 0,2%). La migration est réalisée à 4 °C en tampon de migration (Tris 25 mM/Glycine 192 mM, pH 8,6) pendant 2 heures à 30 mA.

#### **IV.2 Révélation de l'activité SOD**

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

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

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

### **V. DOSAGE DE L'ACTIVITE SOD**

#### **V.1 Méthode au pyrogallol (Marklund et Marklund, 1974)**

L'activité SOD peut être déterminée en mesurant le taux d'auto-oxydation du pyrogallol en milieu alcalin par l'anion superoxyde. Le pyrogallol oxydé lors de la réaction est détecté à 420 nm. On mesure sa vitesse d'apparition qui est diminuée en présence de SOD.

##### V.1.1 Réactifs

Solution A: Tampon Tris 50 mM- acide cacodylique, pH 8,2  
Diéthylène Triamine Penta Acétique ou DTPA 1 mM

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

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

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

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

### V.1.2. Protocole de dosage

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

#### - Le témoin blanc (T<sub>0</sub>):

Nous réalisons un témoin blanc en absence de SOD pour déterminer la quantité de solution de pyrogallol 6 mM à ajouter dans le milieu réactionnel, pour avoir une variation de DO<sub>420</sub> / min de 0,020 ± 0,005. Cette quantité sera ensuite constante durant tout le dosage.

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

Les temps de lecture sur le spectrophotomètre (Uvikon) sont de 5 mesures d'absorbance en 2 min.

L'activité SOD est détectée sur 5 mesures d'absorbance réparties sur 1 min. A partir des 5 valeurs d'absorbance, la variation de DO/min est calculée.

#### - La courbe étalon

Cette courbe est réalisée avec la SOD-Fe recombinante purifiée dans les mêmes conditions que précédemment. La variation de DO/min pour chaque concentration de SOD est calculée. A partir de cette valeur, nous calculons le pourcentage d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD avec la formule suivante:

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



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

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

#### - Le dosage de l'échantillon

A 1,8 ml de solution A est ajouté  $x \mu\text{l}$  de l'échantillon à doser et la quantité de pyrogallol déterminée précédemment.

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

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

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

En ce qui concerne les tests d'activité de la SOD, la SOD est d'abord incubée selon les différentes conditions décrites dans les résultats (température, pH,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) puis l'enzyme provenant de la condition témoin (température ambiante, pH 7,8, absence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est diluée de façon à obtenir une unité d'enzyme lors du dosage d'activité. La même quantité de SOD est ensuite prélevée dans les différents échantillons puis mesurée. Le pourcentage d'activité résiduel est donc ainsi calculé par rapport aux témoins.

## **VI. MESURE DE L'OXYDATION DES TRYPTOPHANES**

Afin de savoir si l'inactivation de la SOD-Fe par le peroxyde d'hydrogène s'accompagnait d'une oxydation des résidus tryptophanes, nous avons mesuré le spectre d'absorption (compris entre 240nm et 500nm) des SOD-Fe recombinantes sauvage et mutée (350  $\mu\text{g}$ ) incubées en présence de 2,5 mM d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans du tampon Tris/HCl 10mM pH7,8. Nous avons réalisé une cinétique en mesurant le spectre d'absorption au temps  $t=0$ ,  $t=5\text{min}$ ,  $10\text{min}$ ,  $30\text{min}$ ,  $60\text{min}$ , et

120min après incubation de la SOD-Fe avec  $H_2O_2$ . Une cuve témoin contenant du tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,8 + 2,5 mM d' $H_2O_2$  a été mesurée en parallèle, permettant de soustraire directement le spectre obtenu par la présence de  $H_2O_2$ .

## **VII. DOSAGE DU FER LIBERE DANS LE MILIEU**

Des aliquots de 150  $\mu$ g de protéines ( SOD sauvage et mutée) sont incubés dans du Tris/HCl 10 mM (pH 7.8) avec 0,625 mM  $H_2O_2$  et 2.3 mM bathophénanthroline pendant 3 heures. Lorsque la bathophénanthroline capture le fer présent dans le milieu, celle-ci prend une couleur rose qui absorbe à 550nm. L'absorbance à 550nm est donc mesurée toutes les 5 min pendant 3 heures, traduisant la libération du fer au cours du temps. L'incubation de la SOD-Fe sauvage ou mutée en présence de bathophénanthroline seule n'entraîne pas une augmentation de l'absorbance à 550nm, indiquant qu'aucune libération de fer est observée en absence d' $H_2O_2$  et que le chélateur est incapable de fixer le fer présent dans le site actif de la protéine.

# **PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX. IMMUNOLOCALISATION DE LA SOD-FE DE *P. FALCIPARUM***

La purification de la SOD-Fe recombinante de *P. falciparum* nous a permis de réaliser des anticorps polyclonaux ainsi que des anticorps monoclonaux dirigés contre la SOD. Nous avons injecté la SOD-Fe recombinante sous la forme native et sous la forme monomérique.

## **I. ELECTROELUTION DE LA SOD-FE**

Nous avons réalisé une électrophorèse en condition dénaturante afin d'électroéluer la SOD-Fe. Après SDS-PAGE, le gel est coloré 30 min avec une solution de bleu de Coomassie 1% dans l'eau puis décoloré 1 heure dans l'eau. La SOD-Fe est localisée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire, puis découpée. L'électroélution s'effectue dans une cuve ISCO (ISCO electroelution cup, ISCO Inc, Lincoln, Ne 68 505) à une puissance constante de 3 watts par cuve pendant 3 heures, dans le tampon de migration SDS-PAGE.

## **II. PRODUCTION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX ANTI-SOD DE *PLASMODIUM***

### **II.1 Immunisation des lapins**

Avant de commencer l'immunisation, du sérum de deux lapins est prélevé, constituant le Jo. Ces deux lapins sont ensuite immunisés par voie sous cutanée à raison d'une injection toutes les trois semaines. Les animaux reçoivent 3 injections de 150 µg de SOD recombinante soit sous la forme native (lapin LM1) soit sous la forme monomérique (lapin LF4), dont la première avec adjuvant complet de Freund et 5 mg de mycobactéries (BCG) et les deux autres avec l'adjuvant incomplet de Freund.

### **II.2 Immunisation des souris**

Les souris Balb/C sont immunisées par voie intrapéritonéale à raison d'une injection toutes

les trois semaines. Les animaux reçoivent 3 injections de 25 µg de la SOD-Fe sous la forme native. La première est effectuée avec de l'adjuvant complet de Freund et les deux autres avec l'adjuvant incomplet de Freund.

### **II.3 Production d'un anticorps monoclonal**

Le jour de la fusion, la souris Balb/C est sacrifiée par dislocation des vertèbres cervicales, sa rate est prélevée stérilement et broyée dans un homogénéisateur de Potter. Les cellules spléniques sont lavées 3 fois par centrifugation à 400g pendant 5 minutes à 4°C dans du milieu DMEM contenant 10 mM d'HEPES, puis elles sont numérées dans un hématimètre en présence de 0,5% de bleu Trypan (Seromed).

Les splénocytes et les cellules myélomateuses sont mélangés dans un rapport de 5 pour 1 et centrifugés pendant 10 minutes à 400g et à 4°C. Le culot est repris dans 1 ml de PEG-DMSO (30g de polyéthylène glycol 4000 (MERCK) dissous dans 42 ml de PBS 0,1M pH 7,2 additionné de 6,2 ml de diméthylsulfoxyde) ajouté goutte à goutte en 45 secondes sous agitation douce. Le PEG est dilué par l'adjonction progressive de DMEM contenant 10mM d'HEPES à raison de 1 ml en 45 secondes, puis 10 ml en 2 minutes, cette dernière opération est répétée deux fois. Les cellules fusionnées sont lavées 2 fois par centrifugation à 400g pendant 10 minutes dans du milieu HT puis réparties à raison de  $5 \cdot 10^4$  cellules par puits dans des plaques de culture cellulaire à 96 puits contenant les cellules nourricières. Les cultures sont placées dans un incubateur à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>.

Les hybrides sont sélectionnés par le milieu HAT (milieu HT additionné de  $10^{-4}$  M d'aminoptérine). Cette opération est réalisée par addition du milieu HAT à chaque puits de culture 24 heures après la fusion et par remplacement du surnageant par le même milieu jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour. Ensuite le milieu HAT peut être remplacé par le milieu HT.

Les hybridomes produisant des anticorps sont sélectionnés à partir du surnageant des cultures confluentes, par ELISA. Le clonage des hybrides sécréteurs est réalisé par la méthode de dilution limite. A partir d'un puits positif, une série de dilutions est réalisée de façon à obtenir une cellule par puits après la répartition en plaque 96 puits. Un examen au microscope inversé des plaques permet de sélectionner les puits contenant un seul clone. Les surnageants de ces puits sont testés à confluence et les clones sécréteurs d'anticorps sont multipliés par transfert progressif dans des alvéoles de taille croissante.

### III. DETECTION DES ANTICORPS SPECIFIQUES

#### III.1 Elisa

Une plaque de 96 puits est sensibilisée par 0,1 µg/puits d'antigène (SOD-Fe purifiée) dilué dans un tampon carbonate-bicarbonate 50 mM pH 9,6, pendant une nuit à 4°C. La plaque est ensuite saturée 1 heure à 37°C avec du PBS contenant 5% de lait écrémé, puis lavée 2 fois avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20. Les sérums dilués préalablement dans du PBS contenant 0,05% de Tween 20 sont ajoutés dans chacun des puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la plaque est lavée 3 fois avec le PBS-Tween 20. L'anticorps anti-immunoglobulines de souris, conjugué à une peroxydase (Zymed, Californie, USA) est dilué au 1/3000<sup>ème</sup> dans le PBS-Tween20 et ajouté à chaque puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C et 3 lavages, l'activité peroxydasique est révélée en utilisant le o-phenylènediamine comme substrat (0,4 mg/ml dans un tampon citrate 0,2 M/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M pH 5 contenant 1,5 ul/ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%). La réaction colorée est arrêtée en ajoutant 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N par puits. La densité optique à 492 nm est mesurée pour chaque puits par un lecteur ELISA automatique (J Bio).

#### III.2 Electrotransfert et Immunoempreinte (Western Blot)

Cette technique a pour but de mettre en évidence, par les anticorps polyclonaux ou monoclonaux, la SOD de *P. falciparum* à partir d'un extrait brut de parasites, après une électrophorèse en SDS-PAGE.

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (LKB) selon la méthode de Towbin et coll. (1978). Le gel de séparation est placé sur une membrane de nitrocellulose et l'ensemble est inséré entre deux séries de feuilles de papier Watman n°3, imbibées par un tampon de transfert (Tris 48 mM/glycine 39 mM; SDS 0,0375%; méthanol 20%). Le transfert est réalisé sous ampérage constant (0,8 mA/cm<sup>2</sup>) pendant 1 heure. Après transfert, la membrane de nitrocellulose est colorée 10 min par une solution de rougeponceau 0,2% dans 3% d'acide trichloroacétique, puis rincée à l'eau.

La détection de protéines spécifiques transférées s'effectue par révélation immunochimique. La feuille de nitrocellulose est découpée en bandelettes, puis celles-ci sont incubées 30 min dans un tampon TNT (Tris/HCl 15mM pH 8 ; NaCl 0,14 M ; Tween 20 0,05%)

contenant 1% de gélatine, afin de saturer la bande et d'éviter toute adsorption non spécifique sur la nitrocellulose. Les sérums de lapins ou de souris utilisés à différentes dilutions dans le TNT sont ajoutés et les bandelettes sont incubées 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages de 10 min avec du TNT contenant 1M de NaCl, chaque bandelette est incubée pendant 1 heure à température ambiante, en présence d'un anticorps de chèvre anti-immunoglobuline G de lapin conjugué à la phosphatase alcaline ou d'un anticorps anti-immunoglobuline AGM de souris, dilué au 1/7500 ème dans le TNT. Les bandelettes sont à nouveau lavées avec du TNT contenant 1M de NaCl. La phosphatase alcaline est ensuite révélée à l'obscurité en présence de BCIP (Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate) et de NBT (Kit Promega). La réaction est arrêtée par un lavage des bandelettes à l'eau distillée.

#### **IV. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE**

##### **IV.1 Préparation des échantillons**

Les hématies saines et parasitées sont lavées plusieurs fois par du PBS, avant d'être 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.

##### **IV.2 Immunodétection**

Les lames sont placées en atmosphère humide. Les sites antigéniques sont saturés par du PBS-BSA (PBS contenant 2% de BSA). Les lames sont ensuite incubées en présence du sérum de lapin ou de l'anticorps monoclonal à différentes dilutions dans du PBS-BSA pendant une heure à 37°C. Après une série de lavages par le PBS-BSA, l'anticorps secondaire anti-immunoglobulines de lapin ou de souris couplé à la fluorescéine (Zymed) dilué au 1/200 est incubé pendant 1 heure à 37°C dans du PBS-BSA. Les lames sont ensuite lavées par du PBS-BSA puis par du PBS. Une solution de dapi à 10 mg/ml est diluée au 1/200 dans un tampon (Tris 10 mM, EDTA disodique 10mM, NaCl 100 mM pH 7,4) contenant 10 mM de 2-mercaptoéthylamine. Le dapi ainsi dilué est déposé sur les lames pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames 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).

### **IV.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.

# IMMUNOPRECIPITATION DE LA SOD-FE ENDOGENE DE *P. FALCIPARUM*

## I. LYSAT PARASITAIRE

### I.1 Marquage métabolique à la méthionine <sup>35</sup>S

Le marquage est réalisé par incorporation métabolique de la méthionine <sup>35</sup>S (Met <sup>35</sup>S label, > 1000 Ci/mmmole, 37 Tbq/mmmole, Isotopchim) par les parasites *in vitro*. Les cultures de *P. falciparum* synchronisées (3% d'hématocrite, 10% de parasitémie) aux stades anneau, trophozoïte et schizonte (10h, 30h et 40h après réinvasion des mérozoïtes respectivement) sont utilisées pour le marquage. Les cultures de parasites sont centrifugées 5min à 1000 rpm, lavées dans une solution RPMI 1640 dépourvue de méthionine (RPMI- Met<sup>-</sup>), puis resuspendue pour 30 min dans un milieu complet (RPMI- Met<sup>-</sup>) additionnée de méthionine <sup>35</sup>S (50μCi/ml). La suspension parasitaire peut être ensuite reprise, le culot cellulaire lavé deux fois en RPMI 1640 puis congelé sec à -20°C.

### I.2 Comptage de la radioactivité: Précipitation au T.C.A (Acide-Trichloro acétique)

Le culot globulaire radiomarqué est repris dans 1 ml de tampon de lyse NP40 1% en PBS pH 7,5 additionné d'inhibiteurs de protéases (leupeptine 10μg/ml, aprotinine 100μg/ml, EDTA 2 mM, PMSF 2 mM). Le lysat est ensuite centrifugé 15 min à 12000 rpm et le surnageant utilisé pour l'expérimentation.

Le comptage de la radioactivité est effectué en trois exemplaires sur une fraction de 10 μl du surnageant. Après addition de 0,5 ml d'une solution de lyse et de décoloration (NaOH 1 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 M), les tubes sont incubés 15 min à 37°C puis refroidis dans la glace. Un ml d'acide trichloro acétique (TCA) (Prolabo) froid à 25% dans l'eau est alors ajouté et l'ensemble est laissé de 30 min à 2 heures dans la glace. Le contenu de chaque tube est filtré sur filtre GF/C (Whatman). Chaque filtre est lavé trois fois au TCA 8% pour éliminer la radioactivité non incorporée, lavé à l'eau et à l'éthanol puis séché et immergé dans 4 ml de liquide scintillant (Beckman). Le comptage est effectué à l'aide d'un compteur Beckman LS 1800 réglé pour la fenêtre <sup>35</sup>S.



## **II. PREPARATION DE L'IMMUNOADSORBANT**

### **II.1 Couplage d'immunoglobulines sur protéine A-sépharose 4B**

Un couplage rapide d'immunoglobulines non purifiées peut s'effectuer sur gel de protéine-A sépharose 4B. L'immunoabsorbant est obtenu après incubation en rotation, sur une nuit à 4°C ou 4 heures à température ambiante, de 20 µl de gel avec 10 ou 20 µl de sérum en tampon PBS pH 7,5. Après un lavage en PBS, le gel est prêt à l'emploi ou peut être conservé à 4°C.

## **III. IMMUNOPRECIPITATION**

### **III.1 Immunoabsorption de la SOD-Fe parasitaire**

Avant utilisation, le culot parasitaire provenant des différents stades du cycle intraérythrocytaire est repris par 1 ml de tampon de lyse décrit précédemment, le lysat est centrifugé 15 min à 12000 rpm et le surnageant utilisé comme source de SOD. L'échantillon contenant 150000 CPM (coups par minute) est incubé avec 20 µl d'immunoabsorbant sur la nuit à 4°C sous agitation.

### **III.2 Elution des protéines adsorbées**

Le gel est lavé 5 fois 10 min sous agitation, en tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8,3, NaCl 1M, NP 40 0,5%, méthionine 20 mM, puis une fois en 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 chauffées 5 min à 95°C puis centrifugées. L'éluat est analysé en électrophorèse SDS-Page, sur un gel de 1,5 mm d'épaisseur à 12% d'acrylamide.

## **IV. ANALYSE DES PROTEINES IMMUNOPRECIPITEES**

### **IV.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%.

## **IV.2 Fluorographie**

Le gel est traité par un agent scintillant (En<sup>3</sup>Hance, NEF) 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 pour révéler les protéines radiomarquées.

## **BIBLIOGRAPHIE**

AIKAWA, M., TORII, M., SJOLANDER, A., BERZINS, K., PERLMANN, P., MILLER, L. (1990). Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Exp. Parasitol.* **71**, 326-329.

ALANO, P., CARTER, R. (1990). Sexual differentiation in malaria parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* **44**, 429-449.

AMANO, A., SHIZUKUISHI, S., TSUNEMITSU, A., MAEKAWA, K., TSUNASAWA, S. (1990). The primary structure of superoxide dismutase purified from anaerobically maintained *Bacteroides gingivalis*. *FEBS.* **272**, 217-220.

AMES, B.N., CATHCART, R., SCHWIERS, E., HOCHSTEIN, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer : a hypothesis. *Pro.Natl.Acad.Sci. USA.* **78**, 6858-6862.

ANDERSEN, P., ASKGAARD, D., LJUNGQVIST, L., BENNEDSEN, J., HERON, I. (1991). Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect. Immun.* **59**, 1905-1910.

AREEKUL, S., 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.

ARGESE, E., VIGLINO, P., ROTILIO, G., SCARPA, M., RIGO, A. (1987). Electrostatic control of the rate-determining step of the copper, zinc superoxide dismutase catalytic reaction. *Biochemistry.* **26**, 3224-3228.

ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., GAJEWSKI, E., DIZDAROGLU, M. (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxyde and ferric ion chelates. *J.Biol.Chem.* **264**, 20509-20512.

ASADA, K., YOSHIKAWA, K., TAKAHASHI, M.A., MAEDA, Y., ENMANJI, K. (1975). Superoxide dismutases from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* **250**, 2801-2807.

ASAWAMAHASAKDA, W., ITTARAT, I., PU, Y.-M., ZIFFER, H., MESHNICK, S.R. (1994a). Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1854-1858.

ASAWAMAHASAKDA, W., BENAKIS, A., MESHNICK, S.R. (1994b). The interaction of artemisinin with red cell membranes. *J. Clin. Lab. Med.* **123**, 757-762.

ATAMNA, H., GINSBURG, H. (1993). Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, 231-242.

ATKINSON, C.T., and AIKAWA, M. (1990). Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells.* **16**, 351-368.

-B-

BAGG, A., NEILANDS, J.B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **26**, 5471-5477.

BANCI, L., BERTINI, I., BRUNI, B., CARLONI, P., LUCHINAT, C., MANGANI, S., ORIOLI, P.L., PICCIOLI, M., RIPNIEWSKI, W., WILSON, K.S. (1994). X-RAY, NMR and molecular dynamics studies on reduced bovine superoxide dismutase: Implications for the mechanism. *Biochem. and Biophys. Research Comm.* **202**, 1088-1095.

BANNISTER, L.H., BUTCHER, G.A., DENNIS, E.D., MITCHELL, G.H. (1975). Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites *in vitro*. *Parasitol.* **71**, 483-491.

BANNISTER, J.V., BANNISTER, W.H., ROTILIO, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**, 111-180.

BANNISTER, L.H., and DLUZEWSKI, A.R. (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections : a review. *Blood Cells.* **16**, 257-292.

BARNWELL, J.W. (1990). Vesicle-mediated transport of membrane and proteins in malaria infected erythrocytes. *Blood Cells.* **16**, 379-395.

BARRA, D., SCHININA, M.E., BOSSA, F., PUGET, K., DUROSAY, P., GUISSANI, A., MICHELSON, M. (1990). A tetrameric iron superoxide dismutase from the eucaryote *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 17680-17687.

BATTISTONI, A., ROTILIO, R. (1995). Isolation of an active and heat-stable monomeric form of Cu,Zn superoxide dismutase from the periplasmic space of *Escherichia coli*. *FEBS Letter.* **374**, 199-202.

BATTISTONI, A., FOLCARELLI, S., GABBIANELLI, R., CAPO, C., ROTILIO, G. (1996). The Cu,Zn superoxide dismutase from *Escherichia coli* retains monomeric structure at high protein concentration. *Biochem. J.* **320**, 713-716.

BAYOUMI, R.A. (1987). The sickle-cell trait modifies the intensity and specificity of the immune response against *P. falciparum* malaria and leads to acquired protective immunity. *Medical Hypothesis*. **22**, 287-298.

BEAMAN, B.L., BLACK, C.M., DOUGHTY, F., BEAMAN, L.V. (1985). Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: Importance in resistance to microbial activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* **47**, 135.

BECANA, M., SALIN, M.L. (1989). Superoxide dismutase in nodules of leguminous plants. *Can. J. Bot.* **67**, 415-421.

BECUWE, P., SLOMIANNY, C., VALENTIN, A., SCHREVEL, J., CAMUS, D., DIVE, D. (1992). Endogenous superoxide dismutase activity in two *Babesia* species. *Parasitol.* **105**, 177-182.

BECUWE, P., SLOMIANNY, C., CAMUS, D., DIVE, D. (1993). Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species. *Parasitol. Res.* **79**, 349-352.

BECUWE, P., VAN BEEUMEN, J., SAMYN, B., TOUZEL, J.P., SLOMIANNY, C., CAMUS, D., DIVE, D. (1994). Purification, characterization and amino terminal sequence of the superoxide dismutase from *Babesia hylomysci*. *Comp. Biochem. Physiol.* **109**, 637-645.

BECUWE, P., GRATEPANCHE, S., FOURMAUX, M.N., VAN BEEUMEN, J., SAMYN, B., MERCEREAU-PUJALON, O., TOUZEL, J.P., SLOMIANNY, C., CAMUS, D., DIVE, D. (1996). Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**, 125-134.

BENOV, L.T., FRIDOVICH, I. (1994). *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **269**, 25310-25314.

BENOV, L., CHANG, L.Y., DAY, B., FRIDOVICH, I. (1995). Copper, zinc superoxide dismutase in *Escherichia coli* : periplasmic localization. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 508-511.

BENTING, J., MATTEI, D., LINGELBACH, K. (1994). Brefeldin A inhibits transport of the glycophorin-binding protein from *Plasmodium falciparum* into the host erythrocyte. *Biochem. J.* **300**, 821-826.

BERMAN, P.A., ADAMS, P.A. (1997). Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Radical Biology and Medicine*. **22**, 1283-1288.

BEYER, W.F., FRIDOVICH, I. (1987). Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **26**, 1251-1257.

BEYER, W.F., IMLAY, J., FRIDOVICH, I. (1991). Superoxide dismutases. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **40**, 221-253.

- BIELSKI, B.H., CHAN, P.C. (1973). Enzyme-catalysed free radical reactions with nicotinamide-adenine nucleotides. I. Lactate dehydrogenase-catalysed chain oxidation of bound NADH by superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 873-879.
- BJERRUM, M.J. (1987). Structural and spectroscopic comparison of manganese-containing superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta.* **915**, 225-237.
- BORDO, D., DJINOVIC-CARUGO, K., BOLOGNESI, M. (1994). Conserved patterns in superoxide dismutase structure. *J. Mol. Biol.* **238**, 366-368.
- BOREL, J.P., MONBOISSE, J.C., BELLON, G. (1988). Inflammation, collagène et radicaux libres oxygénés. *M/S* **5**, 304-310.
- BORGSTAHL, G.E.O., PARGE, H.E., HICKEY, M.J., BEYER, W.F., Jr, HALLEWELL, R.A., TAINER, J.A. (1992). The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell.* **71**, 107-118.
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZE, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- BRAUN-BRETON, C., LANGSLEY, G., MATTEI, D., SCHERF, A. (1990). Vesicle-mediated transport of membrane and proteins in malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells.* **16**, 396-400.
- BRAY, R.C., COCKLE, S.A., FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., ROTILIO, G., CALABRESE, L. (1974). Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **139**, 43-48.
- BRICKER, B.J., TABATABAI, L.B., JUDGE, B.A., DEYOE, B.L., MAYFIELD, J.E. (1990). Cloning, expression, and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.* **58**, 2935-2939.
- BROWN, H.J., and COPPEL, R.L. (1991). Primary structure of a *Plasmodium falciparum* rho-trypan antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 99-110.
- BRUCHHAUS, I., TANNICH, E. (1994). Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**, 281-288.
- BUFFINTON, G.D., HUNT, N.H., COWDEN, W.B., 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.

CAIOLA, M.G., CANINI, A., GALIAZZO, F., ROTILIO, G. (1991). Superoxide dismutase in vegetative cells, heterocysts and akinetes of *Anabaena cylindrica* Lemm. *FEMS Microbiol. Letters* **80**, 161-166.

CANINI, A., CIVITAREALE, P., MARINI, S., CAIOLA, M.G., ROTILIO, G. (1992). Purification of iron superoxide dismutase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Lemm. and localization of the enzyme in heterocysts by immunogold labeling. *Planta* **187**, 438-444.

CARELL, R.W., WINTERBOURN, C.C., RACHMILEWITZ, E.A. (1975). Activated oxygen and haemolysis. *Br. J. Haem.* **30**, 259-264.

CARLIOZ, A., LUDWIG, M.L., STALLINGS, W.C., FEE, J.A., STEINMAN, H.M., TOUATI, D. (1988). Iron superoxide dismutase: nucleotide sequence of the gene from *Escherichia coli* K12 and correlations with crystal structures. *J. Biol. Chem.* **263**, 1555-1562.

CHA, M.K., KIM, I.H. (1995). Thioredoxin-linked peroxidase from human red blood cell: Evidence for the existence of thioredoxin and thioredoxin reductase in human red blood cell. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **217**, 900-907.

CHADD, H.E., NEWMAN, J., MANN, N.H. (1996). Identification of iron superoxide dismutase and a copper/zinc superoxide dismutase enzyme activity with in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 7803. *FEMS Microbiology Letters.* **138**, 161-165.

CHAMBERS, I., HARRISON, P.R. (1987). A new puzzle in selenoprotein biosynthesis : selenocysteine seems to be encoded by the "stop" codon, UGA. *Trends in Biochemical Sciences.* **12**, 255-256.

CHAN, V.W.F., BJERRUM, M.J., BORDERS, C.L. Jr. (1990). Evidence that chemical modification of a positively charged residue at position 189 causes the loss of catalytic activity of iron-containing and manganese-containing superoxide dismutases. *Arch. Biochem. Biophys.* **279**, 195-201.

CHANG, L.Y., SLOT, J.W., GEUZE, H.J., CRAPO, J.D. (1988). Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* **107**, 2169-2179.

CHARY, P., HALLEWELL, R.A., NATVIG, D. (1990). Structure, exon pattern, and chromosome mapping of the gene for cytosolic copper-zinc superoxide dismutase (*sod-1*) from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **265**, 18961-18967.

CHEN, H., ROMO-LEROUX, P.A., SALIN, M.L. (1996). The iron-containing superoxide dismutase-encoding gene from *Chlamydomonas reinhardtii* obtained by direct and inverse PCR. *Gene.* **168**, 113-116.



CHEVION, M. (1988). A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Biol. Med.* **5**, 27-37.

CHRISTMAN, M.F, MORGAN, R.W., JACOBSON, F.S., AMES, B.N. (1985). Positive control of a regulon for defense against oxidative stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **41**, 753-762.

CLAREBOUT, G., SLOMIANNY, C., MIDDELKOP, E., DELCOURT, P., LEU, B., MASSET, A., CAMUS, D., DIVE.D. Status of *Plasmodium falciparum* towards catalase. *British J. Haematol.* sous presse.

CLARK, I.A., HUNT, N.H. (1983). Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect. Immun.* **39**, 1-6.

CLARK, I.A., COWDEN, W.B., HUNT, N.H., MAXWELL, L.E., MACKIE, E.J. (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., 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., 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., COWDEN, W.B. (1989). Some roles of free radicals in malaria. *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 315-321.

COMPAN, I., TOUATI, D. (1993). Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**, 1687-1696.

COMPAN, I., TOUATI, D. (1994). Anaerobic activation of ArcA transcription in *Escherichia coli*: Roles of Fnr and ArcA. *Mol. Microbiol.* **11**, 955-964.

COOPER, J.B., McINTYRE, K., BADASSO, M.O., WOOD, S.P., ZHANG, Y., GARBE, T.R., YOUNG, D. (1995). X-ray Structure Analysis of the Iron-dependent Superoxide Dismutase from *Mycobacterium tuberculosis* at 2.0 Angstroms Resolution Reveals Novel Dimer-Dimer Interactions. *J. Mol. Biol.* **246**, 531-544.

COOPER, J.B., SAWARD, P.T., ERSKINE, M.O., BADASSO, S.P., WOOD, Y., ZHANG, Y. (1996). X-ray structure analysis of an engineered Fe-superoxide dismutase Gly-Ala mutant with significantly reduced stability to denaturant. *FEBS letters.* **387**, 105-108.

CRANSTON, H.A., BOYLAN, C.W., CAROLL, G.L., SUTERA, S.P., WILLIAMSON, J.R., GLUZMAN, I.Y., KROGSTAD, D.J. (1984). *Plasmodium falciparum* maturation abolishes physiological red cell deformability. *Science.* **223**, 400-403.

CRARY, J.L., and HALDAR, K. (1992). Brefeldin A inhibits protein secretion and parasite maturation in the ring stage of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **53**, 185-192.

CSEKE, C., HORVATH, L.I., SIMON, P., BORBELY, G., KESZTHELYI, L., FARKAS, G.L. (1979). An iron-containing superoxide dismutase from *Anacystis nidulans*. *J. Biochem.* **85**, 1397-1404.

CUDD, A., FRIDOVICH, I. (1982). Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **257**, 11443-11447.

-D-

DAS, B.S., THURNHAM D.I. (1992). Plasma lipid peroxidation in *P. falciparum* malaria. in A.S.H. ONG, PACKER. L. (eds) *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications, 1992, Birkhäuser-Verlag, Basel/Switzerland*, 397-405.

DAS, B.S., PATNAIK, J.K., MOHANTY, S., MISHRA, S.K., MOHANTY, D., SATPATHY, S.K., 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).

DEISSEROTH, A., DOUNCE, A. (1970). Catalase : physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.* **50**, 319-375.

DEITSCH, K.W., WELLEMS, T.E. (1996). Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**, 1-10.

DEL RIO, L.A., SANDALIO, L.M., PALMA, J.M., BUENO, P., CORPAS, F.J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 557-580.

DEMPLE, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 315-337.

DESAI, S.A., KROGSTAD, D.J., McCLESKEY, E.W. (1993). A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature.* **362**, 643-646.

DEY, R., DATTA, S.C. (1994). Leishmanial glycosomes contain superoxide dismutase. *Biochem. J.* **301**, 317-319.

DHAUNSI, G.S., GULATI, S., SINGH, A.K., ORAK, J.K., ASAYAMA, K., SINGH, I. (1992). Demonstration of Cu-Zn superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. Biochemical and immunochemical evidence. *J. Biol. Chem.* **267**, 6870-6873.

DIGUISEPPI, J., FRIDOVICH, I. (1984). The toxicology of molecular oxygen. *Crit. Rev. Toxicol.* **12**, 315-342.

DJINOVIC, K., CODA, A., ANTOLINI, L., PELOSI, G., DESIDERI, A., FALCONI, M., ROTILIO, G., BOLOGNESI, M. (1992a). Crystal structure solution and refinement of the semisynthetic colbat-substituted bovine erythrocyte superoxide dismutase at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**, 227-238.

DJINOVIC, K., GATTI, G., CODA, A., ANTOLINI, L., PELOSI, G., DESIDERI, A., FALCONI, M., MARMOCCHI, F., ROTILIO, G., BOLOGNESI, M. (1992b). Crystal structure of yeast Cu,Zn superoxide dismutase. Crystallographic refinement at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **225**, 791-809.

DJINOVIC-CARUGO, K., BATTISTONI, A., CARRI, M.T., POLTICELLI, F., DESIDERI, A., ROTILIO, G., WILSON, K.S., BOLOGNESI, M. (1996). Three-dimensional structure of *Xenopus laevis* Cu,Zn superoxide dismutase determined by X-ray crystallography. *Acta Crystallogr. D.* **52**, 176-188.

DOCKRELL, H.M., PLAYFAIR, J.H.L. (1983). Killing of blood-stage murine malaria parasites by hydrogen peroxide. *Infect. Immun.* **39**, 456-459.

DONG, A., HUANG, P., CAUGHEY, W.S. (1995). Redox-dependant changes in  $\beta$ -sheet and loop structures of Cu/Zn superoxide dismutase in solution observed by infrared spectroscopy. *Arch. Biochem. And Biophys.* **320**, 59-64.

DOUGHERTY, H.W., SADOWSKI, S.J., BAKER, E.E. (1978). A New Iron-containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*. From the Merck Institute for Therapeutic Research, Rahway, New Jersey 07065. *Journal of Biological Chemistry.* 5220-5223.

DROILLARD, M.J., PAULIN, A. (1990). Isoenzymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus L.*) during senescence. *Plant Physiol.* **94**, 1187-1192.

DUBOIS, V.L., PLATEL, D.F.N., PAULY, G., TRIBOULET-DURET, J. (1995). *Plasmodium berghei*: Implication of intracellular glutathione and its related enzyme in chloroquine resistance *in vivo*. *Experiment. Parasitol.* **81**, 117-124.

-E-

EATON, J.W., ECKMAN, J.R., BERGER, E., JACOB, H.S. (1976). Suppression of malaria infection by oxidant-sensitive host erythrocytes. *Nature* **264**, 758-760.

EATON, J.W., ECKMAN, J.R. (1979). Malaria infection and host cell oxidant damage. In: Caughley, W., eds.. *Biochemical and clinical aspects of oxygen*. New York. 825-837.

ECKMAN, J.R., EATON, J.W. (1979). Dependence of plasmodial glutathione metabolism on the host cell. *Nature* **278**, 754-756.

ELFORD, B.C., FERGUSON, D.J.P. (1993). Secretory Processes in *Plasmodium*. *Parasitol. Today*. **9**, 80-81.

ELLIS, J.E., YARLETT, N., COLE, D., HUMPHREYS, M.J., LLOYD, D. (1994). Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. (1994). *Microbiology*. **140**, 2489-2494.

ELMENDORF, H.G., HALDAR, K. (1993a). Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* : separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi. *EMBO J.* **12**, 4763-4773.

ELMENDORF, H.G., HALDAR, K. (1993b). Secretory transport in *Plasmodium*. *Parasitol. Today*. **9**, 98-102.

ELMENDORF, H.G., HALDAR, K. (1994). *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J. Cell. Biol.* **124**, 449-462.

ELSTNER, E.F. (1991). Oxygen radicals -Biochemical basis for their efficacy. *Klin. Wochenschr.* **69**, 949-956.

ENTRALA, E., MASCARO, C., BARRETT, J. (1997). Anti-oxidant enzymes in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol.* **114**, 13-17.

-F-

FAIRFIELD, A.S., MESHNICK, S.R., EATON, J.W. (1983). Malaria parasites adopt host cell superoxide dismutase. *Science* **221**, 764-766.

FAIRFIELD, A.S., MESHNICK, S.R., EATON, J.W. (1984). Host superoxide dismutase incorporation by intraerythrocytic plasmodia. In: *Malaria and the Red Cell* (Brewer, G., and Eaton, J., eds.). *Alan Liss*. New York. 13-23.

FAIRFIELD, A.S., EATON, J.W., MESHNICK, S.R. (1986). Superoxide dismutase and catalase in the murine malaria, *Plasmodium berghei* : content and subcellular distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 526-529.

FAIRFIELD, A.S., ABOSCH, A., RANZ, A., EATON, J.W., MESHNICK, S.R. (1988). Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**, 77-82.

FARBER, P.M., BECKER, K., MULLER, S., SCHIRMER, R.H., FRANKLIN, R.M. (1996). Molecular cloning and characterization of a putative glutathione reductase gene, the PfGR2 gene, from *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* **239**, 655-661.

FAVERO, M., CASSINI, A., ALBERGONI, V. (1992). Superoxide dismutase in *Tetrahymena thermophila*. In *Abstracts of 1st European Congress of Protozoology, British Society of Parasitology, England*.

FENTON, H.J.H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J.Chem.Soc.* **65**, 899-910.

FERRADINI, C. (1986). Espèces activées radicalaires de l'oxygène. *Biochimie.* **68**, 779-785.

FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., BRAY, R.C., LOWE, D.J., MAUTNER, G.N., ROTILIO, G., CALABRESE, L. (1974). Mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half the active sites function in catalysis. *Biochem. J.* **139**, 49-60.

FLINT, D.H., EMPTAGE, M.H., GUEST, J.R. (1992). Fumarase A from *Escherichia coli*: Purification and characterization as an iron-sulfur cluster containing enzyme. *Biochemistry.* **31**, 10331-10337.

FLINT, D.H., TUMINELLO, J.F., EMPTAGE, M.H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**, 22369-22376.

FLOHE, L., SCHLEGEL, W. (1971). Glutathion peroxidase IV. Intrazelluläre Verteilung des Glutathion-Peroxidase-Systems in der Rattenleber. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.* **352**, 1401-1410.

FOLEY, M., TILLEY, L., SAWYER, W.H., ANDERS, R.F. (1991). The ring-infected surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**, 137-148.

FOOTE, C.S., DENNY, R.W. (1968). Chemistry of singlet oxygen VII. Quenching by beta-carotene. *J.Chem.Soc.* **90**, 6233-6240.

FRANZON, V.L., ARRONDEL, J., SANSONETTI, P.J. (1990). Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexneri* pathogenesis. *Infect. Immun.* **58**, 529-535.

FREI, B., KIM, M.C., AMES, B.N. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4879-4883.

FRIDOVICH, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*. **201**, 875-880.

FRIDOVICH, I. (1986). Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* **58**, 62-97

FRIDOVICH, I. (1989). Superoxide dismutases. *J.Biol.Chem.* **264**, 7761-7764..

FRIDOVICH, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 97-112.

FRITSCH, B., DIECKMANN, A., MENZ, B., HEMPELMANN, E., FRITSCH, K.-G., FRITSCH, G., JUNG, A. (1987). Glutathione and peroxide metabolism in malaria-parasitized erythrocytes. *Parasitol. Res.* **73**, 515-517.

FUJIOKA, H., AIKAWA, M. (1993). Morphological changes of clefts in *Plasmodium*-infected erythrocytes under aversive conditions. *Exp. Parasitol.* **76**, 302-307.

-G-

GABAY, T., GINSBURG, H. (1993). Hemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate. A possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. *Exp. Parasitol.* **77**, 261-272.

GAMAIN, B., ARNAUD, J., FAVIER, A., CAMUS, D., DIVE, D., SLOMIANNY, C. (1996a). Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation. *Free Radical Biol. Med.* **21**, 559-565.

GAMAIN, B., LANGSLEY, G., FOURMAUX, M.N., TOUZEL, J.P., CAMUS, D., DIVE, D., SLOMIANNY, C. (1996b). Molecular characterization of glutathione peroxidase gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**, 237-248.

GARDNER, P.R. (1991). Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J. Biol. Chem.* **266**, 19328-19333.

GARDNER, P.R., FRIDOVICH, I. (1991). Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. chem.* **266**, 1478-1483.

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., 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.*

GELLER, B.L., WINGE, D.R. (1982). Rat liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Subcellular location in lysosomes. *J. Biol. Chem.* **257**, 8945-8952.

GENDREL, D., KOMBILA, M., NARDOU, M., GENDREL, C., DJOUBA, F., MARTZ, M., RICHARD-LENOBLE, D. (1992). Paludisme et hémoglobine S: interactions chez l'enfant africain. *Presse Méd.* **21**, 887-890.

GERSCHMAN, R., GILBERT, D.L., NYE, S.W., DWYER, P., FENN, W.O. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation : A mechanism in common. *Science.* **119**, 623-629.

GETZOFF, E.D., TAINER, J.A., WEINER, P.K., KOLLMAN, P.A., RICHARDSON, J., RICHARDSON, D.C. (1983). Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature.* **306**, 287-290.

GILLE, G., SIGLER, K. (1995). Oxidative stress living cells. *Folia Microbiol.* **40**, 131-152.

GINSBURG, H., ATAMNA, H. (1994). The redox status of malaria-infected erythrocytes : an overview with an emphasis on unresolved problems. *Parasite.* **1**, 5-13.

GLUZMAN, I.Y., FRANCIS, S.E., OKSMAN, A., SMITH, C., DUFFIN, K. *et al.* (1994). Order and specificity of the *Plasmodium* hemoglobin degradation pathways. *Journal of Clinical Investigation.* 1602-1607.

GOLDBERG, D.E. (1992). Plasmodial Hemoglobin Degradation - An Ordered Pathway in a Specialized Organelle. *Infectious Agent Diseases.* 207-211.

GOLDSTEIN, I.M., KAPLAN, H.B., EDELSON, H.S., WEISSMANN, G. (1979). Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J.Biol.Chem.* **254**, 4040-4045.

GOLENSER, J., 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., CHEVION, M. (1991a). The survival of *Plasmodium* under oxidant stress. *Parasitol. Today* **7**: 142-146.

GOLENSER, J., MARVA, E., HAR-EL, R., CHEVION, M. (1991b). Induction of oxidant stress by iron available in advanced forms of *Plasmodium falciparum*. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**, 639-643.

GORMLEY, J.A., HOWARD, R.J., TARASCHI, T.F. (1992). Trafficking of malarial proteins to the host cell cytoplasm and erythrocyte surface membrane involves multiple pathways. *J. Cell Biol.* **119**, 1481-1495.

GOSCIN, S.A., FRIDOVICH, I. (1972). The purification and properties of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **289**, 276-283.

GOWDA, D.C., GUPTA, P., DAVIDSON, E.A. (1997). Glycosylphosphatidylinositol Anchors Represent the Major Carbohydrate Modification in Proteins of Intraerythrocytic Stage *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **272**, 6428-6439.

GREEN, S.J., MELLOUK, S., HOFFMAN, S.L., MELTZER, M.S., NACY, C.A. (1990). Cellular mechanism of non specific immunity to intracellular infection : cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunology Letters.* **25**, 15-20.

GREENBERG, J.T., MONACH, P., CHOU, J.H., JOSEPHY, P.D., DEMPLE, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 6181-6185.

GRIENGLING, K.K., MINIERI, C.A., OLLERENSHAW, J.D., ALEXANDER, R.W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research.* **74**, 1141-1148.

GRIFFITHS, G., PFEIFFER, S., SIMONS, K., MATLIN, K. (1985). Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans-cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *J. C. Biol.* **101**, 949-964.

GRUENBERG, J., ALLRED, P.R., SHERMAN, I.W. (1983). A scanning electron microscope analysis of the protusions (knobs) present on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 795-802.

GUGGENMOOS-HOLZMANN, I., BIENZLE, U., LUZZATTO, L. (1981). *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. II. Red cell genetic traits and resistance against malaria. *International Journal of Epidemiology.* **10**, 16-22.

GÜNTHER, K., TÜMMLER, M., ARNOLD, H., RIDLEY, R., GOMAN, M., SCAIFE, J.G., LINGELBACH, K. (1991). An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**, 149-158.

GYAN, B., TROYE-BLOMBERG, M., PERLMANN, P., BJORKMAN, A. (1994). Human monocytes cultured with and without interferon gamma inhibit *Plasmodium falciparum* parasite growth *in vitro* via secretion of reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunology.* **16**, 371-375.

-H-

HABER, F., WEISS, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Roy. Soc. (London).* **A147**, 332-351.

HALDAR, K., UYETAKE, L., GHORI, N., ELMENDORF, H.G., LI, W.-L. (1991). The accumulation and metabolism of a fluorescent ceramide derivative in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 143-156.



HALDAR, K., UYETAKE, L. (1992). The movement of endocytic tracers in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**, 161-178.

HALLIWELL, B., 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., GUTTERIDGE, J.M.C. (1988). Iron as a biological prooxidant. *ISI Atlas Sci.Biochem.* **1**, 48-52.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., eds. (1989). Protection against oxy-rad in biological systems : the superoxide theory of oxygen toxicity. In *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford. 67-72.

HALLIWELL, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad.Res.Comm.* **9**, 1-32.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1990a). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : An overview. *Meth.Enzymol.* **186**, 1-85.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE J.M.C. (1990b). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1-8.

HANTKE, K. (1982). Negative control of iron uptake systems in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 83-86.

HARRIS, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* **6**, 2675-2683.

HASSAN, H.M. (1989). Microbial superoxide dismutases. *Adv. Genet.* **26**, 65-97.

HATCHIKIAN, E.C., HENRY, Y.A. (1977). An iron-containing superoxide dismutase from the strict anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway 4). *Biochimie.* **59**, 153-161.

HEINECKE, J.W., SHAPIRO, B.M. (1989). Respiratory burst oxidase of fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* **86**, 1259-1263.

HEMPELMANN, E., SCHIRMER, R.H., FRITSCH, G., HUNDT, E., GROSCHEL-STEWART, U. (1987). Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**, 19-24.

HENNET, T., RICHTER, C., PETERHANS, E. (1993). Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem. J.* **289**, 587-592.

HENRY, L.E., CAMMACK, R., SCHWITZGUEBEL, J.P., PALMER, J.M., HALL, D.O. (1980). Intracellular localization, isolation and characterization of two distinct varieties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **187**, 321-328.

HINTERBERG, K., SCHERF, A., GYSIN, J., TOYOSHIMA, T., AIKAWA, M., MAZIE, J.C., PEREIRA DA SILVA, L., MATTEI, D. (1994). *Plasmodium falciparum*: The Pf332 Antigen is Secreted from the Parasite by a Brefeldin A-Dependent Pathway and is Translocated to the Erythrocyte Membrane via the Maurer's Clefts. *Exp. Parasitol.* **79**, 279-291.

HIRTZLIN, J. (1995). Molecular and biochemical characterization of a *Plasmodium falciparum* cyclophilin containing a cleavable signal sequence. *Eur. J. Biochem.* **233**, 765-772.

HJALMARSSON, K., MARKLUND, S.L., ENGSTROM, A., EDLUND, T. (1987). Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* **84**, 6340-6344.

HOLDOM, M.D., HAY, R.J., HAMILTON, A.J. (1995). Purification, N-terminal amino acid sequence and partial characterization of a Cu,Zn superoxide dismutase from the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Free Radical Res.* **22**, 519-531.

HOLDOM, M.D., HAY, R.J., HAMILTON, A.J. (1996). The Cu, Zn Superoxide Dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: Purification and Biochemical Comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn Superoxide Dismutase. *Infect. Immun.* **64**, 3326-3332.

HOMMEL, M., DAVID, P., OLIGINO, L. (1983). Surface alteration of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Antigenic variation, antigenic diversity, and role of the spleen. *J. Exp. Med.* **157**, 1137-1148.

HOWARD, R., UNI, S., AIKAWA, M., ALEY, S., LEECH, J., LEW, A., WELLEMS, T., RENER, J., TAYLOR, D. (1986a). Secretion of a malarial histidine-rich protein (PfHRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Cell Biol.* **103**, 1269-1277.

HOWARD, R.J., ANDRUTIS, A.T., LEECH, J.H., ELLIS, W.Y., COHEN, L.A., KIRK, K.L. (1986b). Inhibitory effects of histidine analogues on growth and protein synthesis by *P. falciparum* in vivo. *Biochem Pharmacol.* **35**, 1589-1596.

HOWARD, R., LYON, J., UNI, S., SAUL, A.J., ALEY, S., KLOTZ, F., PANTON, L., SHERWOOD, J., MARSH, K., AIKAWA, M., ROCK, E. (1987). Transport of an Mr 300,000 *Plasmodium falciparum* protein (PfEMP2) from the intraerythrocytic asexual parasite to the cytoplasmic face of the host cell membrane. *J. Cell Biol.* **104**, 1269-1280.

HOWARD, R.J. (1988). *Plasmodium falciparum* proteins at the host erythrocyte membrane : Their biological and immunological significance and novel parasite organelles which deliver them to the cell surface. In *The Biology of Parasitism. Inc. Alan R.Liss, ed.* (Alan R. Liss). 111-145.

HOWARD, R.F., REESE, R.T. (1990). *Plasmodium falciparum* : Hetero-oligomeric complexes of rhoptry polypeptides. *Exp. Parasitol.* **71**, 330-342.

HSIAO, L.L., HOWARD, R.J., AIKAWA, M., 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., STOCKER, R. (1990). Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* **16**, 499-526.

-I-

IMLAY, K.C., IMLAY, J.A. (1996). Cloning and analysis of sodC, encoding the copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 2564-2571.

INSELBURG, J. (1985). Induction and isolation of artemisinin-resistant mutants of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 417-418.

ISMAIL, S.O., BATHIA, A., PARAMCHUK, W., OMARA-OPYENE, L.A., GEDAMU, L. (1995). Cloning of FeSOD from *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*: role in protection against oxidative stress. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 130.

ISMAIL, S.O., PARAMCHUK, W., SKEIKY, Y.A.W., REED, S.G., BHATIA, A., GEDAMU, L. (1997). Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**, 187-197.

ISOBE, T., FANG, Y., MUNO, D., OKUYAMA, T. (1988). Difference between amino acid residues in the metal-ligand environments of iron- and manganese-superoxide dismutases. *Biochem. Int.* **16**, 495-501.

IUCHI, S., MATSUDA, Z., FUJIWARA, T., LIN, E.C. (1990). The arcB gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon. *Mol. Microbiol.* **4**, 715-757.

IUCHI, S., LIN, E.C. (1992). Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 5617-5623.

IUCHI, S., LIN, E.C. (1993). Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* **9**, 9-15.

-J-

JONES, D.P., EKLOW, L., THOR, H., ORRENIUS, S. (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Arch Biochem Biophys.* **210**, 505-516.

JONES, D.P. (1985). The role of oxygen concentration in oxidative stress : Hypoxic and hyperoxic models, 273-309 in *Oxidative Stress* (H. Sies, Ed.) Academic Press, New York-London.

JONES, K.R., COTTRELL, B.J., TARGETT, G.A.T., PLAYFAIR, J.H.L. (1989). Killing of *Plasmodium falciparum* by human monocyte-derived macrophages. *Parasite Immunol.* **11**, 585-592.

-K-

KAMCHONWONGPAISAN, S., VANITCHAREON, N., YUTHAVONG, Y. (1992). The mechanism of antimalarial action of artemisinin (qinghaosu). *Lipid-soluble antioxidants : biochemistry and clinical applications*, 363-372.

KANEMATSU, S., ASADA, K. (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 535-545.

KANEMATSU, S., ASADA, K. (1989). CuZn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Spirogyra sp.*: occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. *Plant Cell Physiol.* **30**, 717-727.

KARA, U.A.K., STENZEL, D.J., INGRAM, L.T., KIDSON, C. (1988). The parasitophorous vacuole membrane of *Plasmodium falciparum* : demonstration of vesicle formation using an immunoprobe. *Eur. J. Cell Biol.* **46**, 9-17.

KARDINAH, S., SCHMIDT, C.L., PETERSEN, A., SCHÄFER, G. (1996). Isolation, characterization and crystallization of an iron-superoxide dismutase from the crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEMS Microbiology Letters.* **138**, 65-70.

KARPINSKI, S., WINGLE, G., OLSSON, O., HAELLGREN, J.E. (1992). Characterisation of cDNA encoding Cu,Zn-superoxide dismutases in Scots pine. *Plant Mol. Biol.* **18**, 545-555.

KEELE, B.B. Jr, McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **245**, 6176-6181.

KEELE, B.B. Jr, McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1971). Further Characterization of Bovine Superoxide Dismutase and Its Isolation from Bovine Heart. *J. Biol. Chem.* **246**, 2875.

KHARAZMI, A., JEPSEN, S., ANDERSEN, B.J. (1987). Generation of reactive oxygen radicals by human phagocytic cells activated by *P. falciparum*. *Scand. J. Immunol.* **25**, 335-341.

KILEJIAN, A. (1974). A unique histidine-rich polypeptide from the malaria parasite *P. lophurae*. *J. Biol. Chem.* **249**, 4650-4655.

- KIM, S.W., LEE, S.O., LEE, T.H. (1991). Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 101-108.
- KIM, H.K., KIM, S.J., LEE, J.W., CHA, M.K., KIM, I.H. (1996). Identification of promoter in the 5'-flanking region of the *E. coli* thioredoxin-linked thiol peroxidase gene: evidence for the existence of oxygen-related transcriptional regulatory protein. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **221**, 641-646.
- KIRBY, T.W., LANCASTER, J.R., FRIDOVICH, I. (1981). Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 140-148.
- KIRK, K., HORNER, H.A., ELFORD, B.C., ELLORY, J.C., NEWBOLD, C.I. (1994). Transport of diverse substrates into Malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J. Biol. Chem.* **269**, 3339-3347.
- KITAGAWA, Y., TANAKA, N., HATA, Y., KUSONOKI, M., LEE, G., KATSUBE, Y., ASADA, K., AIBARA, S., MORITA, Y. (1991). Three-dimensional structure of Cu,Zn superoxide dismutase from spinach at 2.0 Angströms resolution. *J. Biochem.* **109**, 447-485.
- KITCHENER, K.R., MESHNICK, S.R., FAIRFIELD, A.S., WANG, C.C. (1984). An iron-containing superoxide dismutase in *Trichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **12**, 95-99.
- KNAPP, B., HUNDT, E., KÜPPER, H. (1989). A new blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* transported to the erythrocyte surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**, 47-56.
- KNAPP, B., HUNDT, E., LINGELBACH, K. (1991). *Plasmodium falciparum* proteins exported to the erythrocyte membrane. *Parasitology Research.* **77**, 277-282.
- KOPPENOL, W.H., in RODGERS, M.A., and POWERS (eds.) (1981). Oxygen and Oxy-radicals in Chemistry and Biology. *Academic Press*, New York. 671.
- KRANTZ, S.B. (1991). Erythropoietin. *Blood.* **77**, 419-434.
- KRINSKY, N.I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *P.S.E.B.M.* **200**, 248-254.
- KROLL, J.S., LANGFORD, P.R., LOYNDS, B.M. (1991). Copper-zinc superoxide dismutase of *Haemophilus influenzae* and *H. Parainfluenzae*. *J. Bacteriol.* **173**, 7449-7457.
- KRUNGKRAI, S. R., YUTHAVONG, Y. (1987). The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 710-714.

KRUNGKRAI, J. (1991). Malarial dihydroorotate dehydrogenase mediates superoxide radical production. *Biochem. Int.* **24**, 833-839.

KUMAR, N., KOSKI, G., HARADA, M., AIKAWA, M., ZHENG, H. (1991). Induction and localization of *Plasmodium falciparum* stress proteins related to the heat shock protein 70 family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **48**, 47-58.

KUMAR, N., and ZHENG, H. (1992). Nucleotide sequence of a *Plasmodium falciparum* stress protein with similarity to mammalian 78-kDa glucose-regulated protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 353-356.

KUO, C.F., MASHINO, T., FRIDOVICH, I. (1987).  $\alpha,\beta$ -Dihydroxyisovalerate dehydratase: A superoxide-sensitive enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**, 4724-4727.

KURDI-HAIDAR, B., LUZZATTO, L. (1990). Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**, 83-92.

KUSUNOSE, M. (1976). Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biochem. (Tokyo)*. **80**, 1343-1352.

KWIATOWSKI, J., SAFIANOWSKA, A., KANIUGA, Z. (1985). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves, *Lycopersicon esculentum*. *Eur. J. Biochem.* **146**, 459-466.

-L-

LAH, M.S., DIXON, M.M., PATTRIDGE, K.A., STALLINGS, W.C., FEE, J.A., LUDWIG, M.L. (1995). Structure-Function in *Escherichia coli* Iron Superoxide Dismutase: Comparisons with the Manganese Enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*. **34**, 1646-1660.

LANGER, B.W., PHISPHUMVIDHI, P., JIAMPERMPOON, D. (1970). Malarial parasite metabolism: the glutamic acid dehydrogenase of *Plasmodium berghei*. *Exp. Parasitol.* **28**, 298-303.

LANGER, B.W., PHISPHUMVIDHI, P. (1971). The amino acid oxydases of *Plasmodium berghei*. *J. Parasitol.* **57**, 677-678.

LANGFORD, P.R., LOYNDS, B.M. and KROLL, J.S. (1996). Cloning and Molecular Characterization of Cu,Zn Superoxide Dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**, 5035-5041.

LATIMER, E., SIMMERS, J., SRIRANGANATHAN, N., ROOP II, R.M., SCHURIG, G.G., BOYLE, S.M. (1992). *Brucella abortus* deficient in copper/zinc superoxide dismutase is virulent in BALB/c mice. *Microb. Pathog.* **12**, 105-113.

- LAUER, S.A., RATHOD, P.K., GHORI, N., HALDAR, K. (1997). A Membrane Network for Nutrient Import in Red Cells Infected with the Malaria Parasite. *Science*. **276**, 1122-1125.
- LEE, J.S., HAH, Y.C., ROE, J.H. (1993). The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1013-1018.
- LEMESLE-VARLOOT, L., HENRISSAT, B., GABORIAUD, C., BISSERY, V., MORGAT, A., MORNON, J.P. (1990). Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D representation of protein sequences. *Biochimie*. **72**, 555-574.
- LE TRANT, N., MESHNICK, S.R., KITCHENER, K., EATON, J.W., CERAMI, A. (1983). Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* **258**, 125-130.
- LEVANDER, O.A., AGER, A.L., MORRIS, V.C., MAY, R.G. (1989). Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium, and cod-liver oil : Effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite *Plasmodium yoelii*. *Am. J. Clin. Nutr.* **50**, 346-352.
- LIEW, F.W., COX, F.E.G. (1991). Non-specific defense mechanism : the role of nitric oxide. In *Parasitology Today*, eds C.Ash and R.B.Gallagher, p. A17. *Elsevier Trends Journals*, Cambridge
- LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. (1974). Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates, *Tritrichomonas foetus* and *Monocercomonas sp.* *J. Biol. Chem.* **249**, 4634-4637.
- LINGELBACH, K. (1993). *Plasmodium falciparum* : A molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp. Parasitol.* **76**, 318-327.
- LIOCHEV, S.I., FRIDOVICH, I. (1992). Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 5892-5896.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., YUAN, L.C., BONIFACINO, J.S., KLAUSNER, R.D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A : evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*. **56**, 801-813.
- LOOAREESUWAN, S., WILAIRATANA, P., VANNAPHAN, S. (1996). Co-administration of desferrioxamine B with artesunate in malaria : an assessment of safety and tolerance. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **90**, 551-554.
- LUDWIG, M.L., METZGER, A.L., PATTRIDGE, K.A., STALLINGS, W.C. (1991). Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **219**, 335-358.
- LUMSDEN, J., HALL, D.O. (1974). Soluble and membrane-bound superoxide dismutases in a blue-Green alga (*Spirulina*) and spinach. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **58**, 35-41.
- LYNCH, R.E., FRIDOVICH, I. (1978). Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* **253**, 4697-4699.

MAGUIRE, P.A., SHERMAN, I.W. (1990). Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 105-112.

MAILER, K., MAESTRO, R.F. (1991). Stability of the anti-oxidative enzymes in aqueous and detergent solution. *Mol. Cell. Biochem.* **107**, 47-54.

MARKLUND, S.L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 7634-7638.

MARKLUND, S.L. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* **222**, 649-655.

MARTIN, M.E., ROWE BYERS, B., OLSON, M.O.J., SALIN, M.L., ARCENEUX, J.E.L., TOLBERT, C. (1986). A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **261**, 9361-9367.

MATSUMOTO, T., TERAUCHI, K., ISOBE, T., MATSUOKA, K., YAMAKURA, F. (1991). Iron- and manganese-containing superoxide dismutases from *Methylomonas J*: Identity of the protein moiety and amino acid sequence. *Biochemistry.* **30**, 3210-3216.

MATTEI, D., OZAKI, L.S., PEREIRA DA SILVA, L. (1988). A *Plasmodium falciparum* gene encoding a heat shock-like antigen related to the 78 Kd glucose-regulated protein. *Nucleic Acids Res.* **16**, 5204.

MAY, B.P., DENNIS, P.P. (1989). Evolution and regulation of the gene encoding superoxide dismutase from the Archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *J. Biol. Chem.* **264**, 12253-12258.

McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. (1969). Superoxide dismutase : An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6050.

McCORD, J.M., CRAPO, J.D., FRIDOVICH, I. (1977). Superoxide dismutase assays : A review of methodology, 11-17 in *Superoxide and Superoxide Dismutases* (A.M. Michelson, J.M. McCord, I. Fridovich, Eds). Academic Press, London.

McCORD, J.M., RUSSELL, W.J. (1988). Superoxide inactivates creatine phosphokinase during reperfusion of ischemic heart, 27-35 in *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*. Alan R. Liss, New York-London.

MEIER, B., BARRA, D., BOSSA, F., CALABRESE, L., ROTILIO, G. (1982). Synthesis of either Fe- or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent of the metal supplied. *J. Biol. Chem.* **257**, 13977-13980.



MEIER, B., RADEKE, H.H., SELLE, S., YOUNES, M., SIES, H., RESCH, K., HABERMEHL, G.G. (1989). Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochemical Journal*. **263**, 539-545.

MEIER, B., CROSS, A.R., HANCOCK, J.T., KAUP, F.J., JONES, O.T.G. (1991). Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochemical Journal*. **275**, 241-245.

MEIER, B., SEHN, A.P., MICHEL, C., SARAN, M. (1994). Reactions of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*—an enzyme which is equally active with iron or manganese—are independent of the prosthetic metal. *Arch. Biochem. Biophys.* **313**, 296-303.

MESHNICK, S.R., EATON, J.W. (1981). Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **102**, 970-976.

MESHNICK, S.R., THOMAS, A., RANZ, A., XU, C.M., PAN H.Z. (1991). Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 181-190.

MESHNICK, S.R., YANG, Y.Z., LIMA, V., KUYPERS, F., KAMCHONWONGPAISAN, S., YUTHAVONG, Y. (1993). Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1108-1114.

MEYER, M., SCHRECK, R., BAEUERLE, P.A. (1993). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells : AP-1 as secondary antioxidant response factor. *EMBO J.* **12**, 2005-2015.

MICHALSKI, W., PROWSE, S. (1991). Superoxide dismutase in *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**, 189-196.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1972a). The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **247**, 3410-3414.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1972b). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **247**, 6960-6962.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1977). Purification and properties of superoxide dismutase from red alga, *Porphyridium cruentum*. *J. Biol. Chem.* **252**, 6421-6423.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. (1978). Inhibition of superoxide dismutase by azide. *Arch. Biochem. Biophys.* **189**, 317-322.

MISRA, H.P. (1979). Reaction of copper-zinc superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.* **254**, 11623-11628.

MISUMI, Y., MIKI, K., TAKATSUKI, A., TAMURA, G., IKEHARA, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 11398-11403.

MOHAN, K., GANGULY, N.K., DUBEY, M.L., 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., 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.



MORLIERE, P., MOYSAN, A., GABORIAU, F., SANTUS, R., MAZIERE, J.C., DUBERTRET, L. (1992). Ultraviolet A et peau : implications d'espèces activées de l'oxygène, tendances actuelles et résultats récents. *Pathol. Biol.* **40**, 160-168.

MUHIA, D.K., THOMAS, C.G., WARD, S.A., EDWARDS, G., MBERU, E.K. (1994). Ferriprotoporphyrin catalysed decomposition of artemether : Analytical and pharmacological implications. *Biochemical Pharmacology.* 889-895.

MULLER, S., BECKER, K., BERGMANN, B., SCHIRMER, R.H., WALTER, R.D. (1995). *Plasmodium falciparum* glutathione reductase exhibits sequence similarities with the human host enzyme in the core structure but differs at the ligand-binding site. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**, 11-18.

MULLER, S., GILBERGER, T.W., FARBER, P.M., BECKER, K., SCHIRMER, R.H., WALTER, R.D. (1996). Recombinant putative glutathione reductase of *Plasmodium falciparum* exhibits thioredoxin reductase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **80**, 215-219.

MURPHY, L.M., STRANGE, R.W., HASNAIN, S.S. (1997). A critical assessment of the evidence from XAFS and crystallography for the breakage of the imidazolite bridge during catalysis in CuZn superoxide dismutase. *Structure.* **5**, 371-379.

-N-

NAIR, C.R., GUPTA, P.H., CHAUHAN, D.P., VINAYAK, V.K. (1984). Peroxidative changes in erythrocytic enzymes in *Plasmodium berghei* induced malaria in mice. *Indian. J. Med. Res.* **80**, 627-631.

NAKAYAMA, K. (1994). Rapid viability loss on exposure to air in a superoxide dismutase-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **176**, 1939-1943.

NAKAZAWA, H., GENKA, C., FUJISHIMA, M. (1996). Pathological aspects of active oxygen/free radicals. *Japanese Journal of Physiology.* **46**, 15-35.

NDIFOR, A.M., WARD, S.A., HOWELLS, R.E. (1990). Cytochrome P-450 Activity in Malarial Parasites and its Possible Relationship to Chloroquine Resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**, 251-257.

NIEDERHOFFER, E.C., NARANJO, C.M., BRADLEY, K.L., FEE, J.A. (1990). Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric iron uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* **172**, 1930-1938.

NUNOSHIBA, T., deROJAS, W.T., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R., DEMPLE, B. (1993). Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 9993-9997.

-O-

O'BRIEN, E., KURDI-HAIDAR, B., WANACHIWANAWIN, W., CARVAJAL, J-L., VULLIAMY, T.J., CAPPADORO, M., MASON, P.J., 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., 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.

ORAGO, A.S.S., FACER, C.A. (1993). Cytokine-induced inhibition of *Plasmodium falciparum* erythrocytic growth *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* **91**, 287-294.

OSEKI, H., UMESONO, K., INOKUCHI, H. (1989). The chloroplast genome of plants : a unique origin. *Genome.* **31**, 169-174.

-P-

PALMA, J.M., PASTORI, G.M., BUENO, P., DISTEFANO, S. and DEL RIO, L.A. (1996). Purification and Properties of Cytosolic Copper, Zinc Superoxide Dismutase from Watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) Cotyledons. *Free Radical Res.* **26**, 83-91.

PALMER, J.G. (1985). Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In *Molecular Evolutionary Genetics* (MacIntyre, R. J., ed.). 131-174. New York.

PANG, X-P., ROSS, N.S., PARK, M., JUILLARD, G.D.F., STANLEY, T.M., HERSHMAN, J.M. (1992). Tumor necrosis factor  $\alpha$  activates nuclear factor  $\kappa$ B and induces manganous superoxide dismutase and phosphodiesterase mRNA in human papillary thyroid carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 12826-12830.

- PARGE, H.E., HALLEWELL, R.A., TAINER, J.A. (1992). Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6109-6113.
- PARKER, M.W., BLAKE, C.C.F. (1988). Iron- and manganese- containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS* **229**, 377-382.
- PENNINGTON, C.D., GREGORY, E.M. (1986). Isolation and reconstitution of iron- and manganese-containing superoxide dismutases from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* **166**, 528-532.
- PIGEOLET, E., CORBISIER, P., HOUBION, A., LAMBERT, D., MICHIELS, C., RAES, M., ZACHARY, M.-D., REMACLE, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech.Age.Dev.* **51**, 283-297.
- POUVELLE, B., SPIEGEL, R., HSIAO, L., HOWARD, R.J., MORRIS, R.L., THOMAS, A.P., TARASHI, T.F. (1991). Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites. *Nature*. **353**, 73-75.
- POUVELLE, B., GORMLEY, J.A., TARASHI, T.F. (1994). Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 83-96.
- POWELL, S.R., TORTOLANI, A.J. (1992). Recent advances in the role of reactive oxygen intermediates in ischemic injury. *J. Surg. Res.* **53**, 417-429.
- PRADA, J, MALINOWSKI, J., MULLER, S., BIENZLE, U., KREMSNER, P.G. (1995). Hemozoin differentially modulates the production of interleukin 6 and tumor necrosis factor in murine malaria. *Eur. Cytokine Netw.* **6**, 109-112.
- PRE, J. (1991). La lipoperoxydation. *Pathol.Biol.* **39**, 716-736.
- PRENSIER, G., SLOMIANNY, C. (1986). The karyotype of *Plasmodium falciparum* (FCR3 strain) determined by ultrastructural serial sectioning and 3-D reconstruction. *J. Parasitol.* **72**, 731-736.
- PRYOR, W.A. (1986). Oxy-radicals and related species : Their formation, lifetimes, and reactions. *Ann.Rev.Physiol.* **48**, 657-667.
- PUGET, K., MICHELSON, A.M. (1974). Iron containing superoxide dismutase from luminous bacteria. *Biochimie* **56**, 1255-1267.

RAGGE, K., ARNOLD, H.-H., TÜMMLER, M., KNAPP, B., HUNDT, E., LINGELBACH, K. (1990). In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serine rich protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**, 93-100.

RAJAGOPALAN, S., SURZ, S., MUNZEL, T., TARPEY, M., FREEMAN, B.A., GRIENDLING, K.K., HARRISON, D.G. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotortone. *Journal of Clinical Investigation.* **97**, 1916-1923.

RANZ, A., MESHNICK, S.R. (1989). *Plasmodium falciparum*: inhibitor sensitivity of the endogenous superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* **69**, 125-128.

RAVETCH, J.V., FEDER, R., PAVLOVEC, A., BLOBEL, G. (1984). Primary structure and genomic organisation of the histidine-rich protein of the malaria parasite *P. lophurae*. *Nature.* **312**, 616-620.

RAVINDRANATH, S.D., FRIDOVICH, I. (1975). Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *J. Biol. Chem.* **250**, 6107-6112.

REPKA, T., SHAVEV, O., REDDY, R., YUAN, J., ABRAHAMOV, A., RACHMILEWITZ, E.A., LOW, P.S., HEBBEL, R.P. (1993). Nonrandom association of free iron with membranes of sickle and beta-thalassemic erythrocytes. *Blood.* **82**, 3204-3210.

RICHTER, C., PARK, J.W., AMES, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6465-6467.

RIDLEY, R.G., TAKACS, B., LAHM, H.W., DELVES, C.J., GOMAN, M., CERTA, U., MATILE, H., WOOLLETT, G.R., SCAIFE, J.G. (1990). Characterization and sequence of a protective rhoptry antigen from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**, 125-134.

ROSENTHAL, P.J., NELSON, R.G. (1992). Isolation and characterization of a cysteine protease gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 143-152.

ROTH, E.F., RAVENTOS-SUAREZ, C., PERKINS M., 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., 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.

ROTILIO, G., BRAY, R.C., FIELDEN, E.M. (1972). A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta.* **268**, 605-609.

RUSHMORE, T.H., MORTON, M.R., PICKETT, C.B. (1991). The oxidant response element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 11632-11639.

RYBIN, V et al. (1996). GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature*. **383**, 266-269.

RYPNIEWSKI, W.R., MANGANI, S., BRUNI, B., ORIOLI, P.L., CASATI, M., WILSON, K.S. (1995). Crystal structure of reduced bovine superoxide dismutase at 1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **251**, 282-296.

-S-

SAHNI, S.K., SAXENA, N., PURI, S.K., DUTTA, G.P., PANDEY, V.C. (1992). NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* : partial purification and characterization. *J. Protozool.* **39**, 338-342.

SALIN, M.L., BRIDGES, S.M. (1980). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**, 369-374.

SALIN, M.L., DUKE, M.V., OESTERHELT, D., MA, D.P. (1988). Cloning and determination of the nucleotide sequence of the Mn-containing superoxide dismutase gene from *Halobacterium halobium*. *Gene* **70**, 153-159.

SALIN, M.L. (1991). Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**, 851-858.

SALO, D.C., PACIFICI, R.E., LIN, S.W., GIULIVI, C., DAVIES, K.J.A. (1990). Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J. Biol. Chem.* **265**, 11919-11927.

SANDALIO, L.M., DEL RIO, L.A. (1987). Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *Journal of Plant Physiology.* **127**, 395-409.

SANDIALO, L.M., DEL RIO, L.A. (1988). Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiol.* **88**, 1215-1218.

SATO, S., HARRIS, J.I. (1977). Superoxide Dismutase from *Thermus aquaticus*. Isolation and Characterization of Manganese and Apo Enzymes. *Eur. J. Biochem.* **73**, 373-381.

SATO, S., NAKADA, Y., NAKAZAWA-TOMIZAWA, K. (1987). Amino-acid sequence of a tetrameric, manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB8. *Biochimica and Biophysica Acta.* **912**, 178-184.

SAUL, A.J., COOPER, J., HAUQUITZ, D., IRVING, D., CHENG, Q., STOWERS, A., LIMPAIBOON, T. (1992). The 42-kilodalton rhoptry-associated protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**, 139-150.

SAWADA, Y., OHYAMA, T., YAMAZAKI, I. (1972). Preparation and Physicochemical Properties of Green Pea Superoxide Dismutase. *Biochim. Biophys. Acta.* **268**, 305.

SCHIRMER, R.H., MULLER, J.G., KRAUTHSIEGEL, R.L. (1995). Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents : The design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew chem. Int. Ed.* 141-154.

SCHMIDT, M., MEIER, B., PARAK, F. (1996). X-ray structure of the cambialistic superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* active with Fe or Mn. *JBIC.* **1**, 532-541.

SCHNELL, S., STEINMAN, H.M. (1995). Function and stationary-phase induction of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase and catalase/peroxidase of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **177**, 5924-5929.

SCHRECK, R., ALBERMANN, K., BAEUERLE, P.A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Rad. Res. Comms.* **17**, 221-237.

SCHUBERT, J., WATSON, J.A., BAECKER, J.M. (1968). Formation of a histidine-peroxide adduct by hydrogen peroxide or ionising radiation on histidine. *Int. J. Radiat. Biol.* **14**, 577-583.

SCHWARZER, E., TURRINI, F., ULLIERS, D., GIRIBALDI, G., GINSBURG, H., ARESE, P. (1992). Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes or isolated malaria pigment. *J. Exp. Med.* **176**, 1033-1041.

St CLAIR, D.K., OBERLEY, T.D., HO, Y.S. (1991). Overproduction of human Mn-superoxide dismutase modulates paraquar-mediated toxicity in mammalian cells. *FEBS.* **293**, 199-203.

SCOTT, M.D., EATON, J.W. (1995). Thalassaemic erythrocytes : cellular suicide arising from iron and glutathione-dependent oxidation reactions. *British Journal of Haematology.* **91**, 811-819.

SEARCY, K.B., SEARCY, D.G. (1981). Superoxide dismutase from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta* **670**, 39-46.

SETH, R.K., SAINI, A.S., JASWAL, T.S. (1985). *Plasmodium berghei* : oxidant defense system. *Exp. Parasitol.* **60**, 414-416.

- SHAHABUDDIN, M., GUNTHER, K., LINGELBACH, K., AIKAWA, M., SCHREIBER, M., RIDLEY, R., SCAIFE, J. (1992). Localisation of hypoxanthine phosphoribosyl transferase in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.* **74**, 11-19.
- SHARONOV, B.P., CHURILOVA, I.V. (1992). Inactivation and oxidative modification of Cu, Zn superoxide dismutase by stimulated neutrophils : the appearance of new catalytically active structures. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **189**, 1129-1135.
- SHEAR, L.S., SRINIVASAN, R., NOLAN, T., NG, C. (1989). Role of IFN- $\gamma$  in lethal and non-lethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *Journal of Immunology.* **143**, 2038-2044.
- SHEAR, L.S., NG, C., ZHAO, Y. (1990). Cytokine production in lethal and non-lethal murine malaria. *Immunology Letters.* **25**, 123-128.
- SHERMAN, I.W., PETERSON, I., TANIGOSHI, L., TING, I.P. (1971). The glutamate dehydrogenase of *Plasmodium lophurae* (avian malarial). *Exp. Parasitol.* **29**, 433-439.
- SIBLEY, L.D., LAWSON, R., WEIDNER, E. (1986). Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**, 83-87.
- SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**, 213-219.
- SIES, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**, 1058-1071.
- SIMMONS, D., WOOLLETT, G., BERGIN-CARTWRIGHT, M., KAY, D., SCAIFE, J. (1987). A malaria protein exported into a new compartment within the host erythrocyte. *EMBO J.* **6**, 485-491.
- SIMURDA, M.C., VAN KEULEN, H., REKOSH, D.M., LOVERDE, P.T. (1988). *Schistosoma mansoni* : identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Exp. Parasitol.* **6**, 443-457.
- SINES, J., ALLISON, S., McCAMMON, J.A. (1990). Point charge distributions and electrostatic steering in enzyme/substrate encounter: Brownian dynamics of modified copper/zinc superoxide dismutase. *Biochemistry.* **29**, 9403-9412.
- St. JOHN, G., STEINMAN, H.M. (1996). Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*. A role in stationary phase survival. *J. Bacteriol.* **176**, 1578-1584.
- SLOMIANNY, C., PRENSIER, G. (1986). Application of the serial sectioning and tridimensional reconstruction technics to the morphological study of the *Plasmodium falciparum* (FCR3) mitochondrion. *J. Parasitol.* **72**, 595-598.
- SLOMIANNY, C. (1990). Three-dimensionnal reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells.* **16**, 369-378.



- SLOMIANNY, C., PRENSIER, G. (1990). A cytochemical ultrastructural study of the lysosomal system of different species of malaria parasites. *J. Protozool.* **37**, 465-470.
- SLOT, J.W., GEUZE, H.J., FREEMAN, B.A., CRAPO, J.D. (1986). Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab. Invest.* **55**, 363-371.
- SMITH, M.W., DOOLITTLE, R.F. (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J. Mol. Evol.* **34**, 175-184.
- SOHAL, R.S., BRUNK, U.T. (1992). Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation Res.* **275**, 295-304.
- SRIVASTAVA, P., PURI, S.K., DUTTA, G.P., PANDEY, V.C. (1992). Status of oxidative stress and oxidant defences during *Plasmodium knowlesi* infection and chloroquine treatment in *Macaca mulata*. *Int. J. Parasitol.* **22**, 243-245.
- STABEL, T.J., SHA, Z., MAYFIELD, J.E. (1994). Periplasmic location of *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase. *Vet. Microbiol.* **38**, 307-314
- STALLINGS, W.C., POWERS, T.B., PATTRIDGE, K.A., FEE, J.A., LUDWIG, M.L. (1983). Iron superoxide dismutase from *Escherichia coli* at 3.1 Angstrom resolution : a structure unlike that of copper/zinc protein at both monomer and dimer levels. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **80**, 3384-3388.
- STALLINGS, W.C., PATTRIDGE, K.A., STRONG, R.K., LUDWIG, M.L. (1985). The structure of manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB8 at 2.4 Angströms resolution. *J. Biol. Chem.* **260**, 16424-16432.
- STEINMAN, H.M. (1982). Superoxide dismutases : protein chemistry and structure-function relationships. In "Superoxide dismutase", L.W. Oberley (ED) Vol I, CRC Boca Raton Fla. 11-68.
- STEINMAN, H.M. (1985). Bacteriocuprein superoxide dismutases in *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **162**, 1255-1260.
- STEINMAN, H.M. (1987). Bacteriocuprein superoxide dismutase of *Photobacterium leiognathi*. Isolation and sequence of the gene and evidence for a precursor form. *J. Biol. Chem.* **262**, 1882-1887.
- STEINMAN, H.M., ELY, B. (1990). Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus* : cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J. Bacteriol.* **172**, 2901-2910.
- STEINMAN, H.M., WEINSTEIN, L., BRENOWITZ, M. (1994). The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA. *J. Biol. Chem.* **269**, 28629-28634.

STEVENSON, M.M., TAM, M.F., WOLF, S.F., SHER, A. (1995). IL-12 Induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* requires IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *Journal of Immunology*. **155**, 2545-2556.

STOCKER, R., HUNT, N.H., BUFFINTON, G.D., WEIDEMANN, M.J., LEWIS-HUGHES, P.H., CLARK, I.A. (1985). Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in relation to *Plasmodium vinckei* load. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 548-551.

STOCKER, R., HUNT, N.H., WEIDEMANN, M.J., 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., 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.

STODDARD, B.L., HOWELL, P.L., RINGE, D., PETSKO, G.A. (1990). The 2.1 Angstrom resolution structure of iron superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*. *Biochemistry*. **29**, 8885-8893.

STOWERS, M.D., ELKAN, G.H. (1981). An inducible iron-containing superoxide dismutase in *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* **27**, 1202-1208.

STRELLER, S., WINGSLE, G. (1994). *Pinus sylvestris* L. Needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta*. **192**, 195-201.

SUROLIA, N., KARTHIKEYAN, G., PADMANABAN, G. (1993). Involvement of Cytochrome P-450 in Conferring Chloroquine Resistance to the Malarial Parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 562-569.

SUTTON, H.C., WINTERBOURN, C.C. (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Rad. Bio. Med.* **6**, 53-60.

-T-

TAINER, J.A., GETZOFF, E.D., BEEM, K.M., RICHARDSON, J.S., RICHARDSON, D.C. (1982). Determination and analysis of the 2 Angströms structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* **160**, 181-217.

TAINER, J.A., GETZOFF, E.D., K.M., RICHARDSON, J.S., RICHARDSON, D.C. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*. **306**, 284-287.

TAKAO, M., KOBAYASHI, T., OIKAWA, A., YASUI, A. (1989). Tandem arrangement of photolyase and superoxide dismutase genes in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **171**, 6323-6329.

TAKAO, M., OIKAWA, A., YASUI, A. (1990). Characterization of a superoxide dismutase gene from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 210-216.

TAKAO, M., YASUI, A., OIKAWA, A. (1991). Unique characteristics of superoxide dismutase of a strictly anaerobic archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14151-14154.

TANABE, K. (1990). Glucose transport in malaria infected erythrocytes. *Parasitol. Today.* **6**, 225-229.

TANNICH, E., BRUCCHAUS, I., WALTER, R.D., HOSRTMANN, R.D. (1991). Pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 61-72.

TARDAT, B., TOUATI, D. (1991). Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli* : Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control). *Mol. Microbiol.* **5**, 455-466.

TATUM, F.M., DETILLEUX, P.G., SACKS, M.J., HALLING, S.M. (1992). Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus* : Analysis of survival *in vitro* in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. *Infect. Immun.* **60**, 2863-2869.

TAVERNE, J., TAVERNIER, J., FIERS, W., PLAYFAIR, J.H.L. (1987). Recombinant tumor necrosis factor inhibits malaria parasites *in vivo* but not *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* **67**, 1-4.

TEEBOR, G.W., BOORSTEIN, R.J., CADET, J. (1988). The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA : a review. *Int. J. Radiat. Biol.* **54**, 131-150.

TEMPERTON, N.J., WILKINSON, S.R., KELLY, J.M. (1996). Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**, 339-343.

TESFA-SELASE, F., HAY, R.J. (1995). Superoxide dismutase of *Cryptococcus neoformans*: purification and characterization. *Med Vet Mycol.* **4**, 253-259.

TOUATI, D. (1997a). Superoxide Dismutases in Bacteria and Pathogen Protists. In: *Oxidative Stress and Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 447-482.

TOUATI, D. (1997b). Regulation and Protective Role of the Microbial Superoxide Dismutases. In: *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. 231-261.

TSANEVA, I.R., WEISS, B. (1990). *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **172**, 4197-4205.

TURRENS, J.F., ALEXANDRE, A., LEHNINGER, A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. BioChem. Biophys.* **237**, 408-414.

-U-

URSINI, F., 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., 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-

VALENTINE, J.S., PANTOLIANO, M.W. (1981). Protein-metal ion interactions in cuprozinc proteins. In *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H., ed.). **3**, 291-358, Dekker, New York.

VAN CAMP, W., BOWLER, C., VILLARROEL, R., TSANG, E.W.T., VAN MONTAGU, M., INZE, D. (1990). Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 9903-9907.

VANDER-JAGT, D.L., HUNSAKER, L.A., KIBIRIDGE, M., CAMPOS, N.M. (1989). NADPH production by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* **74**, 471-474.

VENNERSTROM, J.L., EATON, J.W. (1988). Oxidants, oxidant drugs and malaria. *J. Med. Chem.* **31**, 1269-1277.

VISCOGLIOSI, E., DELGADO-VISCOGLIOSI, P., DURIEUX, I., DAUCHEZ, M., GRATEPANCHE, S., TOUZEL, J.P., ALIX, J.P., SANCHES, R., CAMUS, D., DIVE, D. . Iron-containing superoxide dismutase in the parasite protist, *Trichomonas vaginalis*. (Soumis)

VON HEIJNE, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research.* **14**, 4683-4690.

WAGNER, U.G., PATTRIDGE, K.A., LUDWIG, M.L., STALLINGS, W.C., WERBER, M.M., OEFNER, C., FROLOW, F., SUSSMAN, J.L. (1993). Comparison of the crystal structures of genetically engineered human manganese superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* : differences in dimer-dimer interaction. *Protein Sci.* **2**, 814-825.

WALTER, R.D., NORDMEYER, J.P., KONIGK, E. (1974). NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Plasmodium chabaudi*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 495-500.

WANG, G.L., SEMENZY, G.L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**, 21513-21518.

WARD, G.E., TILNEY, L.G., LANGSLEY, G. (1997). Rab GTPases and the unusual secretory pathway of *Plasmodium*. *Parasitol. Today.* **13**, 57-62.

WASSERMAN, H.H., MURRAY, R.W., eds. (1979). Singlet Oxygen, *Academic Press*, New York. 45.

WEI, N.M., SADRZADEH, S.M.H. (1994). Enhancement of hemin-induced membrane damage by artemisinin. *Biochemical Pharmacology.* 737-741.

WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I. (1973a). Superoxide dismutase: organelle specificity. *J. Biol. Chem.* **248**, 3582-3592.

WEISIGER, R.A., FRIDOVICH, I. (1973b). Mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **248**, 4793-4796.

WILLCOX, M., BJORKMAN, A., BROHULT, J. (1985). *Falciparum* malaria and  $\beta$ -thalassaemia trait in northern Liberia. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **77**, 335-347.

WINTERBOURN, C.C. (1990). Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. *Semin. Hematol.* **27**, 41-50.

WOZENCRAFT, A.O., DOCKRELL, H.M., TAVERNE, J., TARGETT, G.A.T., PLAYFAIR, J.H.L. (1984). Killing of human malaria parasites by macrophage secretory products. *Infect. Immun* **43**, 664-669.

WOZENCRAFT, A.O. (1986). Damage to malaria-infected erythrocytes following exposure oxidant-generating systems. *Parasitol.* **92**, 559-567.

WRIGHT, A.C., AHMED, H., GAUTHIER, J.D., SLIVA, A., VASTA, G.R. (1997). Superoxide dismutases *Marinus*: cloning, cDNA sequence, and *in vitro* expression. Résumé du congrès de Woodshole

-Y-

YAMAKURA, F. (1984). Destruction of tryptophan residues by hydrogen peroxide in iron-superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **122**, 635-641.

YAMAKURA, F., SUZUKI, K. (1986). Inactivation of *Pseudomonas* iron-superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **874**, 23-29.

YAMAKURA, F., KOBAYASHI, K., TAGAWA, S., MORITA, A., IMAI, T., OHMORI, D., MATSUMOTO, T. (1995). pH-dependent activity change of superoxide dismutase from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**, 233-240

YANG, Y.Z., ASAWAMAHASAKDA, W., MESHNICK, S.R. (1993). Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin. *Biochem. Pharmacol.* **46**, 336-339.

YOST, F.J., FRIDOVICH, I. (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **248**, 4905-4908.

YOUN, H.D., KIM, E.J., ROE, J.H., HAH, Y.C., KANG, S.O. (1996a). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *J. Biochem.* **318**, 889-896.

YOUN, H.D., YOUN, H., LEE, J.W., YIM, Y.I., LEE, J.K., HAH, Y.C., KANG, S.O. (1996b). Unique Isozymes of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **334**, 341-348.

YOUNGMAN, R.J. (1984). Oxygen activation : Is the hydroxyl radical always biologically relevant *Trends Biochem.Sci.* **9Phy**, 280-283.

YU, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139-162.

-Z-

ZHANG, Y., HEMPELMANN, E., 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., KONIG, I., SCHIRMER, H. (1988b). Glutathione reductase-deficient erythrocytes as host cells of malarial parasites. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 861-865.

ZHANG, F., GOSSER, D.K., MESHNICK, S.R. (1992). Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu). *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1805-1809.

