

Extraction et caractérisation kinase de pyruvate de la *Onchocerca ochengi* et du tissu nodulaire bovin

FODJO TATOU C.R.¹, TITANJI V. P. K.^{1,2}, ACHUKWI M. D.³ et MULUH J. P.¹

1. Centre de Biotechnologie, Université de Yaoundé I, Cameroun.

2. Université de Buéa, B.P. 63 Buéa, Cameroun.

3. IRAD de Wakwa, B.P. 65 Ngaoundéré, Cameroun.

RESUME

La chimiothérapie de l'onchocercose humaine est loin d'être satisfaisante. Une nouvelle approche d'identification de macrofilaricides inclut une compréhension approfondie de la régulation du métabolisme filarien. La pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) est une enzyme régulatrice de la glycolyse. Nous avons purifié partiellement et déterminé les propriétés cinétiques de la pyruvate kinase (PK) de *Onchocerca ochengi* et celle du tissu nodulaire bovin (*Bos indicus*). La PK de *Onchocerca ochengi* comme celle du tissu nodulaire bovin se fixe sur le gel de phosphocellulose dans les mêmes conditions de pH et de force ionique. Cependant, elles ont des solubilités différentes et la PK de *Onchocerca ochengi* est inhibée par un excès en phosphoenolpyruvate (PEP). La PK de *Onchocerca ochengi* et celle du tissu nodulaire bovin dépendent du fructose 1-6 diphosphate (FDP) pour leur activité. Les constantes de Michaelis (Km) montrent que l'enzyme filarienne a plus d'activité pour les deux substrats (phosphoenolpyruvate et adénosine 5'-diphosphate) que celle du tissu nodulaire bovin. Nos résultats suggèrent une différence de régulation de la glycolyse chez *Onchocerca ochengi* et chez le bovin.

Mots clés: Pyruvate kinase, *Onchocerca*, glycolyse, régulation, chimiothérapie

ABSTRACT

The chemotherapy of human onchocerciasis is far from satisfactory. A rational approach for the identification of macrofilaricides involves an in-depth understanding of the filarial metabolism. We have partially purified and carried out kinetic studies of pyruvate kinase (EC.2.7.1.40) a regulatory enzyme of glycolysis from the bovine filarial worm, *Onchocerca ochengi* and its surrounding nodular tissue.

The pyruvate kinase of the *O. ochengi* and nodular tissue bind to phosphoryl cellulose under similar conditions of pH and ionic strength. But they have different solubilities and furthermore the PK of *O. ochengi* is inhibited by an excess of phosphoenol pyruvate (PEP). Whilst both the bovine and onchocercal pyruvate kinases depend on Fructose, 1, 6-biphosphate (FBP) for their activities, the bovine enzyme has significantly lower Km values for PEP and ADP than the bovine enzyme. Our results are consistent with a difference in the regulation of bovine and onchocercal glycolysis at the level of the pyruvate kinase reaction.

Key words: Pyruvate kinase, *Onchocerca*, glycolysis, regulation, chemotherapy

INTRODUCTION

L'onchocercose humaine causée par *Onchocerca volvulus* (Leukart, 1893) demeure un problème de santé publique dans les pays en voie de développement. Elle engendre chaque année 40.000 nouveaux cas de cécité [WHO, 1997]. La lutte antivectorielle et la chimiothérapie envisagées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour l'éradiquer ont produit des résultats partiels [Enyong *et al* 1998]. La lutte antivectorielle est fragilisée par la réduction de la susceptibilité des simules aux insecticides, par leur migration sur de grandes distances et par la réinvasion des surfaces après épandage des insecticides [Davies, 1994]. Les molécules filaricides utilisées jusqu'à présent ont des effets secondaires ou ne sont que des microfilaricides qui réduisent la transmission de la maladie sans l'arrêter [Renz *et al*, 1995]. Une approche rationnelle de la lutte consiste à différencier les voies métaboliques du parasite et de l'hôte exploitables en chimiothérapie [WHO, 1984]. Des travaux antérieurs ont montré que *Onchocerca ochengi*, agent de l'onchocercose peu pathogène des bovins d'Afrique pourrait servir de modèle animal de *Onchocerca volvulus* [Trees, 1992 ; McHall *et al*, 1992 ; Schultz-Key *et al*, 1993 ; Renz *et al*, 1995].

La pyruvate Kinase catalyse la transphosphorylation du phosphoénolpyruvate (PEP) à l' adénosine 5'-diphosphate (ADP) et est une enzyme régulatrice de la glycolyse. Elle a déjà été caractérisée chez les mammifères [Tanaka *et al*, 1997] et chez certaines filaires [Walter RD & Schulz-Key, 1980]. Jusqu'à présent, aucune attention n'a été portée sur celle de *Onchocerca ochengi*.

Nous présentons dans ce rapport une purification partielle de la PK de *Onchocerca ochengi* et celle du tissu nodulaire bovin et la détermination de leurs constantes de Michaelis par des études cinétiques à l'état stationnaire.

MATERIELS ET METHODES

Tous les réactifs utilisés étaient de type analytique, d'un degré de pureté très élevé et disponibles sur le marché. L'eau distillée a été utilisée pour préparer les solutions.

Purification de l'enzyme: Les nodules de *Onchocerca ochengi* ont été prélevés à l'abattoir de Ngaoundéré sur des bovins de la race Gudali (*Bos indicus*) de la savane guinéenne des hauts-plateaux (Province de l'Adamaoua, Cameroun). Les vers ont été isolés et purifiés après dissection des nodules suivant la méthode décrite par [Titanji *et al*, 1990]. Pour purifier la PK, le procédé utilisé par [Tanaka *et al*, 1997] a été utilisé avec quelques

modifications. Les vers et le tissu nodulaire obtenus ont été cisailés et homogénéisés chacun dans trois volumes de tampon d'homogénéisation (20 mM Tris HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 1,5 mM MgSO₄; 1 mM EDTA; 0,2 mM FDP; 0,1 mM DTT et 1 mM PMSF). Après centrifugation à 5000 tours par minute pendant 10 minutes et à +4° C, les protéines de chacun des homogenats ont été séparés par saturation avec le sulfate d'ammonium. Par la suite, les fractions présentant une importante activité de la PK ont été retenues puis diluées dans le tampon de dilution (20 mM phosphate pH 6,0; 0,1 mM DTT et 2 mM MgSO₄) avant d'être dialysées pendant 24 heures contre le même tampon. La fraction du tissu nodulaire a été dessalée par filtration moléculaire sur Séphadex G-25 à +4° C. Une première chromatographie s'est faite sur phosphocellulose avec élution par un gradient linéaire de force ionique (10-500 mM phosphate) et une deuxième couplée à la présence de 0,1 mM FDP et de 0,5 mM PEP. Enfin, après une concentration de l'éluat par saturation au sulfate d'ammonium et centrifugation, une filtration moléculaire sur séphacryl-300 s'est faite en présence de 0,2 mg d'albumine du sérum bovin (BSA) par millilitre. La méthode décrite par [Bradford M.M. 1976] et la mesure de l'absorbance à 280 nanomètres (nm) ont été utilisées pour déterminer la concentration protéique des différentes fractions.

Dosage de l'activité de la PK et études cinétiques:

Pour déterminer la présence de la Pyruvate Kinase dans les différentes fractions, la méthode colorimétrique a été utilisée [Kimberg D.V., Yielding K.L. 1962]. A 50 µl de chaque fraction ou échantillon issu d'une étape de purification, 50 µl de tampon de dilution, 100 µl de solution de substrat A (10 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 4 mM ADP, 100 mM KCl, pH 7,5), 50 µl de substrat B (8 mM PEP, 0,5 mM FDP). Dix minutes après, 200 µl de DNPH à 0,1%, 200µl de NaOH (10 M) et 2 ml d'éthanol à 95°. Enfin, après centrifugation à 2000 tours par minute pendant 5 mn, l'absorbance d'un ml du surnageant est lu à 520 nm. S'agissant des études cinétiques, la méthode décrite par [Ljungstrom *et al*, 1974] a été utilisée. L'activité est mesurée en réalisant un mélange réactionnel de 1050 µl contenant: 700 µl (150 mM tris-HCl pH 7,5; 3 mM MgCl₂; 50 mM KCl) 35 µl d'ADP, 35µl de PK (diluée de manière à obtenir une baisse convenable de l'absorbance), 35 µl de lactico-déshydrogenase (LDH) contenant 60 unités, 35 µl d'hexokinase contenant 30 unités, 35 µl d'une solution de 4,5 mM de nicotinamide- adénine-dinucléotide réduite (NADH). Après une incubation à la température ambiante pendant 3 minutes, la réaction débute avec l'addition de 35 µl de

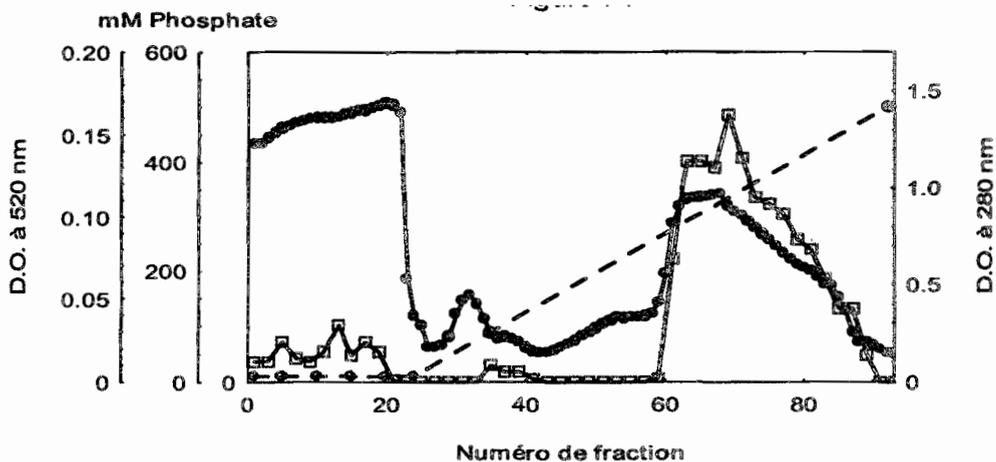


Figure 1: Chromatogramme sur phosphocellulose de la Pyruvate Kinase de *Onchocerca ochengi* en présence de 0,5 mM PEP et de 0,1 mM FDP. La vitesse d'éluion était de 4 ml par heure et chaque fraction contenait 0,75 ml d'éluat.

- gradient phosphate (10 - 500 mM).
- Protéines à 280 nm.
- Activité de la Pyruvate Kinase à 520 nm

PEP et la lecture à 340 nm. Pour déterminer l'influence d'un effecteur, le mélange réactionnel contient 35 µl de cet effecteur et seulement 70 µl d'eau distillée en plus des autres réactifs. Pour une concentration fixe et constante de l'extrait enzymatique, nous avons mesuré la vitesse de la réaction en fonction de la concentration de l'un des substrats ou d'un effecteur. L'utilisation de la méthode dite de Cleland a permis de déterminer les constantes cinétiques [Cleland W.W., 1970].

Khideox a été utilisé pour déterminer la conformité de deux essais d'une même manipulation. Lorsque la manipulation est reprise trois fois, nous avons utilisé la technique de l'analyse de variance avec classification suivant un facteur. Le test de Student a été utilisé pour comparer les constantes cinétiques.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du sulfate de dodécyl de sodium (SDS): La méthode décrite par [Laemmli U.K. 1970] a été utilisée afin d'apprécier la purification.

RESULTATS

Comparaison des constantes cinétiques: Pour valider nos résultats et nos conclusions, nous avons fait des tests statistiques au seuil de 0,05. Le test de

Purification

La PK de *Onchocerca ochengi* précipite à plus de 89 % après la saturation à 40-70 % en sulfate d'ammonium et centrifugation à 4500 tours par minute pendant 30 minutes. Après la dialyse, la PK de *Onchocerca ochengi* se fixe à pH 6,0 sur le gel de phosphocellulose et est décrochée avec 300 mM du tampon d'éluion (10-500 mM phosphate pH 6,0; 2 mM MgSO4 et 0,2 mM

Tableau 1: Tableau de purification de la Pyruvate Kinase de *Onchocerca ochengi*.

Fractions	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité (UI)	Act. spécifique UI/mg	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogenat	57,5	36,02	213,59	5,929	1	100,00
40-70 %	4,3	18,041	190,99	10,586	1,785	89,42
Dialysée	10,0	15,761	84,564	5,365	0,905	39,59
Phosph. 1	42,5	1,704	64,430	37,811	6,376	30,165
Phosph. 2	52,0	0,943	53,820	57,073	9,624	25,197
Concentrée	1,0	0,568	42,778	75,313	12,700	20,028
Séphacryl-300	8,2	0,187	27,519	147,16	24,816	12,887

La quantité de protéines dans les différentes fractions a été dosée par la méthode de Bradford et l'activité enzymatique mesurée par la méthode continue. L'activité spécifique désigne le ratio de l'activité enzymatique et de la quantité de protéine à une étape de purification. Le facteur de purification représente l'activité spécifique à une étape de purification divisé par l'activité spécifique de l'homogenat et le rendement, l'activité enzymatique totale à une étape de purification divisé par l'activité enzymatique totale de l'homogenat.

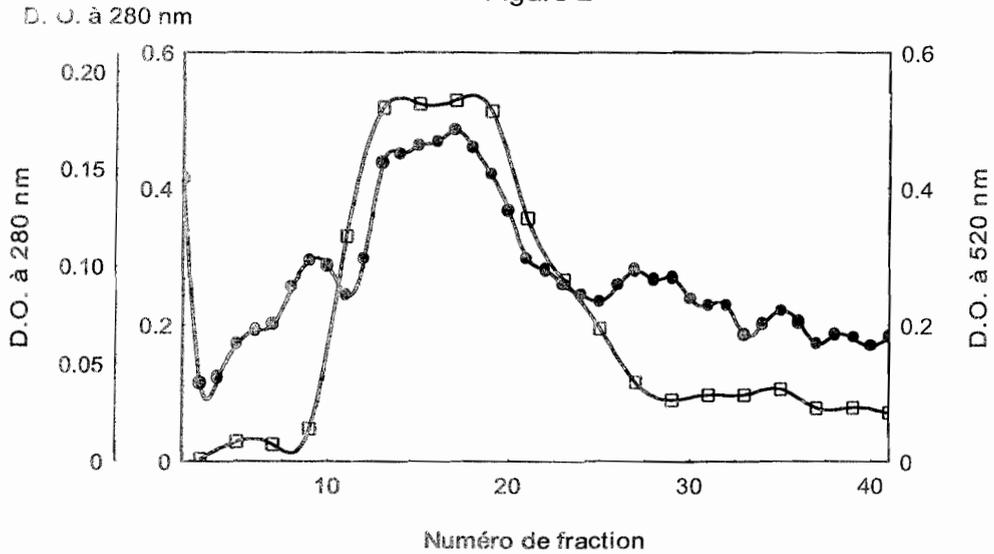


Figure 2: Chromatogramme sur séphacryl-300 de la Pyruvate Kinase du tissu nodulaire bovin éluée sur la colonne de phosphocellulose et concentrée par saturation au sulfate d'ammonium.

● Protéines à 280 nm. □ Activité de la Pyruvate Kinase à 520 nm

Tableau 2: Tableau de purification de la Pyruvate Kinase du tissu nodulaire bovin.

Fractions	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité (U)	Act. spécifique	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogenat	141,1	124,47	733,2	5,89	1	100
55-80 %	9,0	31,071	594,9	19,14	3,25	81,13
Dialysée	15,0	18,043	351,0	19,453	3,302	47,87
Phosph. 1	50,0	2,69	275,15	102,17	17,346	37,52
Phosph. 2	70,0	1,964	250,74	127,66	21,67	34,19
Concent.rée	1,4	1,054	249,14	236,37	44,130	33,98
S-300	13,0	0,313	202,81	647,94	110,01	27,66

DTT). En présence de 0,5 mM PEP et de 0,1 mM FDP, elle est décrochée avec 260 mM du même tampon. Le tableau 1 représente le tableau de purification et la figure 1 présente le chromatogramme de l'éluion sur phosphocellulose en présence de 0,5 mM PEP et de 0,1 mM FDP de la PK de *Onchocerca ochengi*.

Après homogénéisation, la PK du tissu nodulaire bovin précipite à environ 20 % seulement à la saturation 40-70 % en sulfate d'ammonium et à plus de 80 % à la saturation 55-80 %. Après dessalage par filtration moléculaire sur gel de Séphadex G-25, elle se fixe sur le gel de phosphocellulose à pH 6,0. L'éluion s'est faite

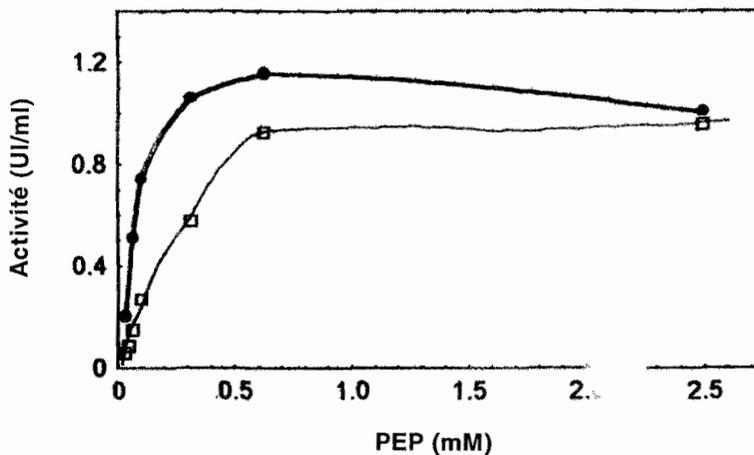


Figure 3: Effet du PEP sur la Pyruvate Kinase de *Onchocerca ochengi* en absence (□) et en présence (●) de 200 µM de FDP. L'activité de l'enzyme a été déterminée par la méthode continue. En absence du FDP, la courbe est sigmoïde et traduit la propriété allostérique de la Pyruvate Kinase de *Onchocerca ochengi*.

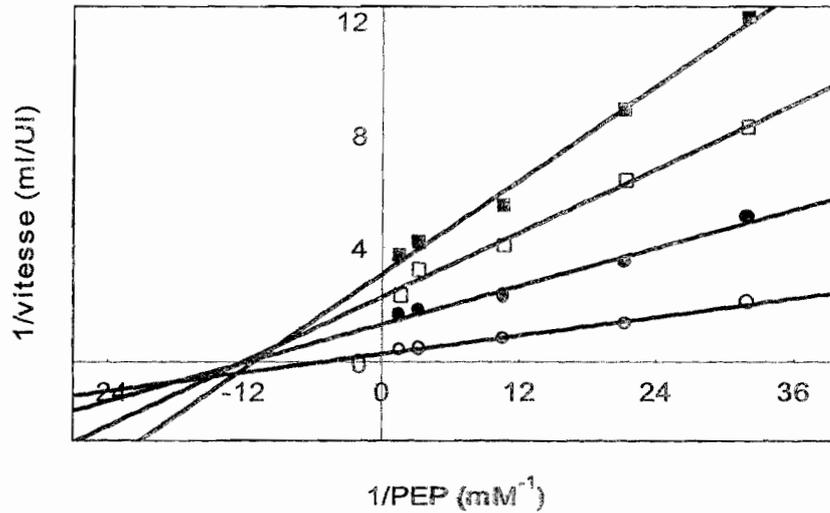


Figure 4: Diagramme primaire de l'effet du PEP sur la Pyruvate Kinase du tissu nodulaire bovin élue sur séphacryl-300 en présence de 0,04 mM (■); 0,06 mM (□); 0,10 mM (●) et de 0,50 mM (○) ADP. L'activité de l'enzyme a été déterminée par la méthode continue.

avec un gradient linéaire de 10-500 mM du tampon d'éluion en absence et en présence de 0,5 mM PEP et de 0,1 mM FDP. La PK du tissu nodulaire bovin est décrochée avec 375 et 310 mM de tampon d'éluion respectivement en absence et en présence de 0,5 mM PEP et de 0,1 mM FDP. Le tableau 2 représente le tableau de purification et la figure 2 présente le chromatogramme de l'éluion sur séphacryl-300 de la fraction éluee et concentrée de la PK du tissu nodulaire bovin.

Electrophorèse

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS a permis d'identifier environ 20 bandes protéiques pour l'extrait brut de *Onchocerca ochengi*, 18 pour la fraction dessalée sur Séphadex G-25, 7

correspondant à 67; 56,3; 52,6; 41; 33; 30,2 et 20,6 kilodaltons (kD) pour la fraction éluee sur phosphocellulose en présence du PEP et 4 (41,4; 39,2; 34,3 et 30,8 kD) pour la fraction éluee sur séphacryl-300. Pour ce qui est du tissu nodulaire bovin, la fraction éluee sur séphacryl-300 présente 2 bandes protéiques de masses moléculaires 39,2 et 34,3 kD.

Etudes cinétiques

Effet du PEP et du FDP

La représentation de la variation de la vitesse initiale des réactions catalysées par la PK de *Onchocerca ochengi* éluee sur séphacryl-300 en fonction de la concentration en PEP et en présence de 1 mM ADP montre une courbe de type Michaelis et Menten en présence de 0,2

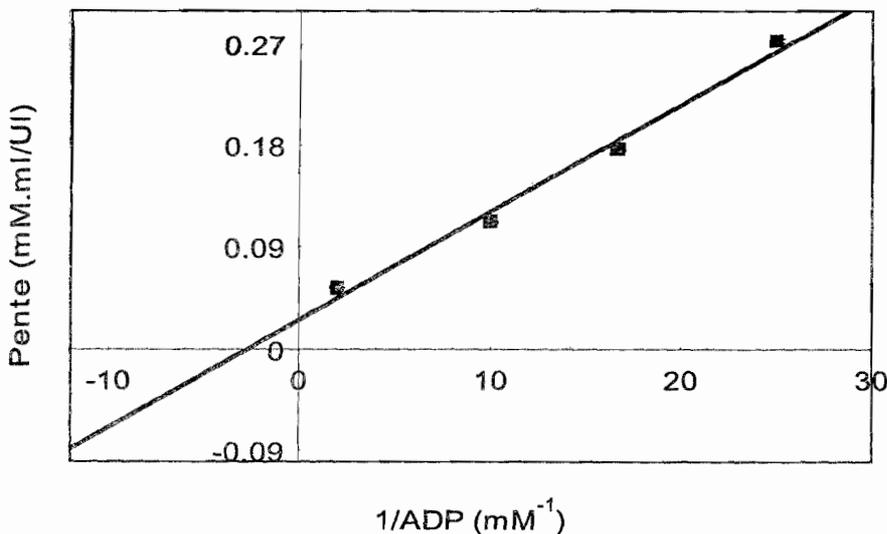


Figure 5: Effet de l'ADP sur la Pyruvate Kinase du tissu nodulaire bovin éluee sur séphacryl-300 (diagramme secondaire). La constante de Michaelis dérivée est de $0,370 \pm 0,115$ mM ADP.

Tableau 3: Tableau récapitulatif des constantes cinétiques de la Pyruvate Kinase de *Onchocerca ochengi* et de celle du tissu nodulaire bovin à trois étapes de purification.

sources		Etapes	Phospho-cellulose 1	Phospho-cellulose 2	Séphacryl-300
<i>Onchocerca ochengi</i>		K _{mADP}	0,606 ± 0,096	0,308 ± 0,034	0,165 ± 0,024
		K _{mPEP}	0,069 ± 0,018	0,029 ± 0,009	0,056 ± 0,006
		K _{mFDP} (×10 ⁻³)	Non déterminé	Non déterminé	3,669 ± 0,115
Tissu nodulaire bovin		K _{mADP}	0,548 ± 0,063	Non déterminé	0,370 ± 0,115
		K _{mPEP}	0,235 ± 0,015	Non déterminé	0,063 ± 0,011
		K _{mFDP}	Non déterminé	Non déterminé	9,254.10 ⁻³

mM FDP et une courbe sigmoïde en absence du FDP (figure 3). La constante de Hill est de 1,91. La figure 3 montre aussi une baisse de l'activité de la PK de *Onchocerca ochengi* pour des concentrations élevées en PEP.

Effet de l'ADP.

La figure 4 présente le diagramme primaire de la fraction du tissu nodulaire bovin élue sur séphacryl-300 pour des concentrations variables en PEP (0,0312; 0,0468; 0,1; 0,3125 et 0,625 mM) et fixes en ADP (0,04; 0,06; 0,1 et 0,5 mM) en présence de 0,2 mM FDP. Cette figure montre que le mécanisme de la réaction est séquentiel avec combinaison indépendante. La figure 5 présente le diagramme secondaire. La K_m réelle est de 0,370 ± 0,115 mM ADP.

Les effets de l'ADP, du PEP et de l'ATP ont été déterminés pour la PK de *Onchocerca ochengi* et du tissu nodulaire bovin à différentes étapes de purification. Le tableau 3 récapitule les constantes cinétiques obtenues en millimolaire.

DISCUSSIONS ET CONCLUSION

La présence de la PK chez *Onchocerca ochengi*, confirme la suggestion de [Walter R.D., Schulz Key, 1980] d'après laquelle ce filaire possède la voie glycolitique. La PK de *O. ochengi* et celle du tissu nodulaire bovin ont des activités spécifiques de l'homogénat presque identiques. L'activité spécifique de l'extrait brut de *O. ochengi* est comparable à celle de l'extrait brut des cellules tumorales AH-130 Yoshida qui renferment la PK type M₂ [Tanaka *et al.*, 1997]. Les différences observées lors du fractionnement par du sulfate d'ammonium montrent que la PK de *O. ochengi* et du tissu nodulaire bovin ont des solubilités différentes. Il a été observé que l'introduction du fructose 2,6-biphosphate (FBP) fait éluer spécifiquement la PK de *Trypanosoma brucei* en une seule étape sur une colonne de phosphocellulose en présence du PEP, avec une activité spécifique de 175 UI/mg de protéines, un facteur de purification de 63 et un rendement d'environ 60 % [Barnard J.P.,

P.L. Pedersen, 1988]. La FDP n'agit pas sur l'élution de la PK de *O. ochengi* et celle du tissu nodulaire bovin. Cette inefficacité s'expliquerait par le fait que la FDP n'entre pas en compétition avec les deux groupes phosphoryls en position 2 et 6 du phosphocellulose. En fait, le FBP en plus d'être un effecteur allostérique de la PK de *Trypanosoma brucei* [Barnard J.P., P.L. Pedersen, 1988 ; Callens M., Opperdoes F.R. 1994], est en compétition avec le site de fixation de la PK sur le gel de phosphocellulose, qui est un polymère de D-glucoses reliés par des liaisons β-1,4 glucosidiques avec des groupements phosphoryls en positions 2 et 6 [Barnard J.P., P.L. Pedersen, 1988]. La purification s'illustre par l'accroissement de l'activité spécifique et se confirme par la réduction du nombre de bandes protéiques sur le gel de polyacrylamide. Cette évolution de la purification est en concordance avec les chromatogrammes, où on observe une séparation nette de la PK des autres protéines. Les activités spécifiques obtenues sont comparables à celles obtenues par d'autres auteurs avec les PK du coeur et du cerveau de porc purifiées à plus de 97 % [Kiffmeyer W.R., Farrar W.W., 1991, Farrar G., Farrar W.W. 1995]. Les faibles rendements et facteurs de purification obtenus s'expliquent certainement par les pertes et la dénaturation de la PK au cours de la purification. Ces phénomènes dépassent 50 % au cours de la dialyse de la fraction 40-70 % et montrent que la PK de *O. ochengi* est très instable en absence de stabilisateurs. Ambasht *et al.* affirment que pendant la dialyse et la filtration moléculaire en absence de l'EDTA, la PK est irréversiblement inactivée [Ambasht P.K. *et al.*, 1996].

L'électrophorèse sur le gel de polyacrylamide en présence du SDS présente deux bandes protéiques communes aux extraits de *O. ochengi* et du tissu nodulaire bovin, et deux bandes propres à l'extrait de *O. ochengi*. Cette multiplicité de bandes protéiques de faibles masses moléculaires pourrait s'expliquer par des modifications protéolytiques des sous-unités ou par l'impureté de l'enzyme.

Les études cinétiques montrent que la PK de *O. ochengi* et celle du tissu nodulaire bovin sont deux enzymes allostériques qui requièrent pour leur activité les ions Mg^{2+} et K^+ , et qui sont activées comme les PK type L, M2 et R des eucaryotes, et du type I des procaryotes [Mattevi A. et al, 1995], par le PEP et FDP. Cette régulation allostérique peut être expliquée selon le modèle de [Monod J. et al, 1965]. Les deux enzymes sont probablement des tétramères et sont présentes chacune sous deux états: l'état relaxé ou R et l'état tendu ou T. D'après [Mattevi A. et al, 1995], la fixation du FDP induit le passage de l'état T qui a moins d'affinité pour le PEP, à l'état R par une rotation des domaines B et C de la sous-unité et une réorientation de la sous-unité entière. Ce changement de conformation induit une distorsion du site catalytique et un accroissement de l'affinité de l'état R pour le PEP [Walker D. et al 1992 ; Mattevi A. et al, 1996]. Cette propriété allostérique n'a pas été observée avec la PK du tissu nodulaire bovin éluee sur phosphocellulose. L'apparition de cette propriété après élution sur séphacryl 300 serait due à la concentration de l'éluat de la colonne de phosphocellulose et à une séparation du FDP de l'enzyme. Aussi, le tissu nodulaire étant vascularisé, la présence de la PK type R serait à l'origine de la propriété allostérique observée.

Les constantes cinétiques obtenues pour la PK de *O. ochengi* et celle du tissu nodulaire bovin, sont dans la marge de concentrations physiologiques de l'ADP et du PEP. Ces mêmes résultats montrent que la PK de *O. ochengi* a plus d'affinité pour les deux substrats que celle du tissu nodulaire bovin. Une autre différence porte sur l'inhibition exclusive de la PK de *O. ochengi* par des concentrations en PEP supérieures ou égales à 2,5 mM. D'après [Segel L.H., 1975], dans les réactions enzymatiques à deux substrats et à deux produits comme celle catalysée par la PK, le substrat à forte concentration se fixe à l'un des produits de la réaction au site actif et inactive l'enzyme. Cette inhibition de la PK au moment où la charge énergétique de la cellule est basse et quand la production de l'ATP par l'enzyme est presque nécessaire, est paradoxale et participe probablement à la régulation de la PK.

L'étude de l'effet du FDP n'a pas été facile. Ceci sans doute en raison de l'extrême instabilité du FDP en solution et probablement aussi d'après [Etges R., Mukkada A.J., 1988], de la variation de l'activité maximale de l'enzyme purifiée en fonction du pH et de la présence du FDP.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié d'un financement sous forme de don par ISP/IPICS (Cam 01) Uppsala, Suède.

BIBLIOGRAPHIE

WHO (1997). Chigas disease, Leprosy, Lymphatic filariasis, Onchocerciasis: Prospects for elimination. TDR/Gen./97.1 35 pages.

ENYONG P.A., BENNETT K., SIMONEC S. and LUSTIGMAN S. (1998). Large scale production of infective larvae of *Onchocerca volvulus* and *Onchocerca ochengi*. 4th European commission filariasis contract holders meeting MNHN, Paris France, 26th - 29th January 1998.

DAVIES J.B. (1994). Sixty years of onchocerciasis vector control: A chronological summary with comments on Eradication, Reinvasion and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **39**, 23-45.

RENZ A. TREES A.J., ACHU-KWI M.D., EDWARDS G. and WAHL G. (1995). Evaluation of Suramin, Ivermectin and CGP 20376 in a new macrofilaricidal drug screen, *Onchocerca ochengi* in Africa cattle. *Trop. Med. and Parasitology* **46**, 31-37.

World Health Organisation (1984). Onchocerciasis Chemotherapy Project. *Biochemical Pharmacology* vol. 33, N° 3, 513-514.

TREES A.J. (1992). *Onchocerca ochengi* Mimic, Model or Modulator of *Onchocera volvulus*? *Parasitology Today* Vol. 8, No. 10.

MCCALL P.J., TOWNSON H. and TREES A.J. (1992). Morphometric differentiation of *O. volvulus* and *O. ochengi* infective larvae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**: 63-65.

SCHULZ-KEY H., G. WAHL, S. KLAGER, A.J. TREES, D. ACHU-KWI and A. RENZ (1993). *Onchocerca ochengi* in Africa cattle: a new model for macrofilaricidal drug screening. *Zentralblatt fur Bakteriologie und Hygiene*, **325**, 82.

TANAKA T., K. HARADA, S. SAHERKI and K. WADA (1978). Purification of four pyruvate kinase isoenzyme of rats by affinity elution chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* **524**, 327-339.

WALTER R.D. and SCHULZ-KEY H. (1980). *Onchocerca volvulus*: Effect of Suramin on Lactate Dehydrogenase and Malate Dehydrogenase. *Tropenmed Parasit*, **31**, 55-58.

TITANJI V.P.K., MBACHAM W.F., and SAKWE A. (1990). Identification of the different radiolabelled anti-

gens of *Onchocerca volvulus* developmental stages. *Acta Trop.* 47, 307-321.

BRADFORD M.M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

KIMBERG D. V., YIELDING K. L. (1962). Pyruvate Kinase: Structural and functional changes induced by diethylstilbestrol and certain steroid hormones. *J. Biol. Chem.* 237, 2233-2239.

Ljungstrom O., Helmqvist G. and Engstrom L. (1974). Phosphorylation of rat liver pyruvate kinase by cyclic 3' 5'- AMP-stimulated protein kinase. *Biochimica and Biophysica Acta*, 358, 289-298.

CLELAND W. W. (1970). Steady State Kinetics in *The Enzymes*. Student Edition, edited by BOYER P. D. vol. 2, 1-65.

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

BARNARD J.P. and P.L. PEDERSEN (1988). Purification in a single step and kinetic characterisation of the pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 31, 141-148.

CALLENS M., OPPERDOES F. R. (1992). Some kinetic properties of pyruvate kinase from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 50 (2): 235-243.

ERNEST I., CALLENS M., OPPERDOES F.R. and MICHELS P.A. (1994). Pyruvate kinase of *Leishmania mexicana mexicana*. cloning analysis of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and characterisation of the enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 64 (1): 43-54.

KIFFMEYER W.R. and FARRAR W.W. (1991). Purification and properties of pig heart pyruvate kinase. *Jour-*

nal Protein Chemistry. 10 (6): 585-591.

FARRAR G., and FARRAR W.W. (1995). Purification and properties of the pyruvate kinase isoenzyme M1 from the pig brain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 27 (11): 145-1151.

AMBASHT P.K., MALHOTRA O.P., KAYASTHA A.M. (1996). Purification, characterisation and steady state kinetic properties of cytosolic pyruvate activity from germinating mung beans (*Vigna radiata L.*). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 33 (3) 184-194.

MATTEVII A., G. VALENTINI, M.RIZZI, M.L. SPERANZA, M. BOLOGNESI and A. CODA (1995). Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Structure* 3, 729-741.

MONOD J., WYMAN J. and CHANGEUX J.P. (1965). On the nature of the allosteric transition: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.

WALKER D., W.N. CHIA and H. Muirhead (1992). Key Residues in the Allosteric Transition of *Bacillus stearothermophilus* Pyruvate kinase Identified by Site-directed Mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 228, 265-276.

MATTEVI A., M. BOLOGNESI and G. VALENTINI (1996). The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Letters*, 389, 15-19.

SEGEL I.H. (1975). Enzyme kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Isoenzyme Systems. *John Wiley Interscience*, New-York.

ETGES R., MUKKADA A.J. (1988). Purification and characterisation of a metabolite - regulated pyruvate kinase from *Leishmania major* promastigote. *Molecular and Biochemical Parasitology* 27, (2-3): 281-289.

Received: 11/04/02

Accepted: 19/02/03