Nº d'ordre : 685 50376 1986 55

50376 1986 52

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

> THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

SLOMIANNY Christian

ACTION DE LA CHLOROQUINE SUR LE PROCESSUS DE DEGRADATION DE L'HEMOGLOBINE CHEZ PLASMODIUM sp.

- Etude ultrastructurale morphologique et cytochimique -





Présentée le 29 mai 1986 devant la Commission d'Examen

JURY :

MM. E. VIVIER

A. DHAINAUT L. PEREIRA DA SILVA A. VERNES F. E. G. COX P. DE PUYTORAC Examinateur



Président



REMERCIEMENTS

A mes Parents qui m'ont donné le goût du travail bien fait et m'ont permis, par des sacrifices quotidiens, d'accéder au niveau où je suis parvenu. Que cette thèse soit un modeste témoignage de ma reconnaissance et de mon amour pour eux.

A mon épouse qui, par son soutien sans faille, m'a aidé à surmonter les problèmes posés par la rédaction et à aboutir à cet ouvrage. Qu'elle en soit ici remerciée et assurée de mon amour. Je tiens à remercier tout particulièrement Gérard PRENSIER qui m'a guidé et conseillé tout au long de ce travail et sans qui ce manuscrit n'existerait sans doute pas. Que cet ouvrage soit un gage de ma reconnaissance et de mon amitié.

Que soient également remerciés Serge MOREAU, Pierre CHARET et Eduardo DEI-CAS avec qui j'ai eu de nombreuses discussions très constructives qui m'ont permis d'avancer dans mes recherches. Cette thèse est le reflet d'une étroite collaboration entre les membres de notre équipe.

Mes remerciements s'adressent aussi à Alain VERNES qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a fourni toute l'aide matérielle et morale nécessaire au bon déroulement de mes travaux. Par son intermédiaire, je tiens à remercier toutes les personnes qui composent l'Unité 42, qui m'ont aidé, de près ou de loin à réaliser mes projets :

- par leur collaboration technique si précieuse, je veux citer Catherine ANSEL, Jacqueline HERBAUT, Gilbert LEPAGE et Marlène MORTUAIRE qui m'ont aidé, chacun dans leur spécialité, à mener à bien des tâches souvent ardues.
- tout le mérite de la frappe du manuscrit revient à Michèle MASURELLE qui a eu non seulement la patience de relire mes "écritures" mais également une rare conscience professionnelle de faire une mise en page parfaite et d'une très grande qualité.

Je tiens enfin à faire part de ma gratitude envers mes juges et le Président du Jury d'accepter de juger mon travail.

INTRODUCTION

Le mécanisme de nutrition des <u>Plasmodium</u> est étudié depuis de nombreuses années. La microscopie optique a permis d'observer un stade particulier du développement intraérythrocytaire, appelé trophozoïte, (figure A) caractérisé par la présence à l'intérieur du cytoplasme, de vacuoles dont l'aspect du contenu semble indiquer une origine érythrocytaire. L'apparition d'une pigmentation noire consécutive à cette intense envacuolisation du stroma du globule rouge a tout de suite suggéré aux paludologues l'existence d'une dégradation de l'hémoglobine (principal constituant du stroma). Le pigment malarique observé serait le résultat de l'accumulation de la partie héminique de cette molécule, qui ne serait donc pas catabolisée, tandis que la partie protéique serait dégradée en acides aminés utilisables par le parasite.

A l'heure actuelle, peu de démonstrations probantes ont été faîtes sur le mécanisme de nutrition du parasite. Les éléments connus sont l'état et la composition des produits de départ ainsi que les supposés produits finals résiduels. Le mécanisme conduisant de l'un à l'autre est mal connu et fait l'objet de diverses hypothèses qui tendent à montrer l'existence d'une endocytose active du stroma érythrocytaire. Celle-ci se réaliserait (selon les auteurs) par l'intermédiaire d'une structure spécialisée du type cytostome. La dégradation proprement dite de l'hémoglobine est encore plus mal connue : identification, localisation et mode d'action des enzymes protéolytiques sont imprécis.

Ces différents points sont indispensables à connaître lorsque l'on veut étudier le mode d'action de la chloroquine (antimalarique le plus couramment utilisé). En effet, l'utilisation de ce médicament a induit l'apparition de souches chloroquino-résistantes caractérisées par une moindre pigmentation et leur prédilection pour des hématies immatures (réticulocytes). Cette constatation tendrait donc à montrer une modification du mécanisme de nutrition de <u>Plasmo</u>dium.



Figure A : Cycle évolutif de Plasmodium murin.

C'est pourquoi l'objet du présent travail est d'étudier le mécanisme de dégradation de l'hémoglobine chez différentes espèces de <u>Plasmodium</u> (murins et humains) afin de mieux cerner le problème et ainsi de proposer une hypothèse montrant l'identité du processus chez différents <u>Plasmodium</u>. Cette étude comparative a été réalisée en présence et en absence de chloroquine afin de préciser certains effets de celle-ci.

Nous présenterons ce travail sous la forme d'une revue générale avec référence aux travaux publiés tandis que les parties non publiées (ou en cours de publication) feront l'objet d'une rédaction plus détaillée sous forme d'article.

CHAPITRE I

ETUDE COMPAREE DU MECANISME DE DEGRADATION DU STROMA ERYTHROCYTAIRE

1. MORPHOLOGIE ULTRASTRUCTURALE

La synthèse de l'ensemble des travaux de microscopie électronique sur ce sujet conduit à considérer qu'il existe chez <u>Plasmodium</u> un système vacuolaire complexe comportant des vacuoles de grande taille, des vésicules de pinocytose, contenant toutes du stroma érythrocytaire, des cytostomes, des vacuoles pigmentaires. Cependant, ces observations ont été faites sur des coupes isolées de parasite et n'ont donc pu montrer l'organisation spatiale ni les interrelations que présentent ces diverses structures.

Utilisant la technique de coupes sériées associée à une reconstitution tridimensionnelle, nous avons repris des études déjà réalisées antérieurement, ceci chez différentes espèces de Plasmodium de Mammifères.

A) Système digestif de P. chabaudi :

confère l'article N°1 : "Ingestion of erythrocytic stroma by <u>P. chabaudi</u> trophozoītes : ultrastructural study by serial sectioning and 3-dimensional reconstruction".

Parasitology (1985), 90, pp : 579-588.

B) Système digestif de <u>P. berghei</u> :

A la suite de ce premier travail, qui a en partie fait l'objet de la thèse de troisième cycle, nous avons décrit un certain nombre de faits que nous avons cherché à généraliser à d'autres <u>Plasmodium</u>, notamment <u>P. ber-</u><u>ghei</u> (souche sauvage) (Planches I et II).

confère l'article N°2, lère partie : "Etude ultrastructurale comparée du processus de dégradation de l'hémoglobine par <u>P. berghei</u> (Vincke et Lips, 1948) en fonction de l'état de maturité de la cellule hôte".

The Journal of Protozoology (1985), 32, pp : 1-5

C) Système digestif de <u>P. falciparum</u> (FCR₃) :

Toujours dans un but de généralisation, mais également pour répondre aux souhaits de l'OMS (dans le cadre d'un contrat), nous avons étendu nos recherches à P. falciparum (FCR3) en culture.

. Culture de <u>P. falciparum</u> : le cycle intraérythrocytaire de la souche FCR₃ est reproduit <u>in vitro</u> sur des hématies humaines provenant du C.R.T.S. selon la technique préconisée par Trager et Jensen (1976).

Les cultures que nous utilisons sont soit asynchrones soit synchronisées par deux traitements au sorbitol à 28 heures d'intervalle. Ce traitement élimine préférentiellement les formes âgées et provoque une synchronisation sur une fourchette d'environ 4 heures. Quand la parasitémie atteint 25 %, les échantillons sont préparés pour la microscopie électronique selon les méthodes décrites dans les articles précédents.

. Résultats : le phénomène d'endocytose se déroule selon deux mécanismes.

- Une pinocytose très active chez les jeunes stades (5-10 heures), (Fig. III,1). Elle conduit à la formation de vésicules pigmentaires qui vont très vite coalescer pour former de petites vacuoles pigmentaires (Figs. III,2 et 3).

- Un système cytostomal apparaît chez le trophozoîte âgé d'environ 15 heures. Un tube se forme puis se vésiculise tandis que débute la dégradation de l'hémoglobine (apparition de pigment). Une fois les cristaux apparus, les vésicules cytostomales coalescent en 2 ou 3 vacuoles qui elles-mêmes vont fusionner en une ou deux grosses vacuoles résiduelles (Figs. III,3,4 et 5 ; IV,1). L'endocytose du stroma érythrocytaire se poursuit très tard dans le cycle. Quand la dégradation s'achève dans une vésicule, celle-ci vient fusionner avec la vacuole résiduelle et y déverse son contenu cristallin (Figs. IV,2 et 3).

D) Comparaison :

A l'issue de cette étude comparative sur 3 souches, nous montrons qu'il ne semble pas exister de différences fondamentales dans le mécanisme d'endocytose du stroma érythrocytaire chez les <u>Plasmodium</u> (de Mammifères tout au moins), contrairement à ce qui était précédemment décrit.

Il existerait ainsi deux mécanismes distincts (figures B et C)

- Une pinocytose active chez les jeunes stades conduisant à la formation des vésicules pigmentaires.

- Un système cytostomal chez les trophozoïtes moyens produisant des vacuoles pigmentaires.

Les différences observées se situent essentiellement au niveau de l'importance relative des deux mécanismes et de leur chronologie. Ainsi FCR₃ se distingue par une coalescence très précoce des vésicules en vacuoles pigmentaires (en fait, presque dès leur formation, c'est-à-dire dès l'apparition des cristaux de pigment), bien avant le début des divisions nucléaires, pour former une (ou deux) vacuole(s) résiduelle(s) centrale(s) (figure C). Par contre, cette dernière ne se forme que très tardivement chez les <u>Plasmodium</u> de rongeurs. Les cristaux n'apparaissent que lorsque la membrane interne a disparu.

Si le processus de pinocytose semble identique chez les espèces que nous avons étudiées, l'importance du système cytostomal est très variable. Chez les <u>Plasmodium</u> de Rongeur, les tubes cytostomaux (souvent 2 ou 3 par cellule) prennent beaucoup de volume et présentent de multiples digitations. Nous verrons plus tard que cette observation ne s'applique pas aux souches chloroquino-résistantes. Chez FCR₃, ce système de pinocytose semble n'exister que chez les jeunes trophozoïtes, et il est très vite remplacé par des vésicules cytostomales qui bourgeonnent tout au long du cycle (Figure C, Planche II).



Figure B : Endocytose du stroma érythrocytaire chez des <u>Plasmodium</u> murins.



<u>P. falciparum.</u> FCR3

Figure C : Endocytose du stroma érythrocytaire.

Afin de confirmer ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier, à l'aide des mêmes techniques, d'autres espèces, notamment des espèces parasites d'oiseaux qui, d'après certains auteurs, posséderaient une véritable "vacuole digestive" où se ferait la dégradation de l'hémoglobine (Aikawa et Coll., 1966).

Cependant, l'étude purement morphologique du phénomène n'est pas suffisante pour déterminer avec certitude le lieu de la dégradation du stroma érythrocytaire. Le repérage du site d'apparition des cristaux donne certes une indication mais seule une étude enzymo-cytochimique peut apporter les preuves nécessaires.

2. CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE

A) Localisation des enzymes protéolytiques

Etant donné que l'hémoglobine est une molécule composée d'hème et de globine qui est une protéine, nous avons tenté de localiser les activités enzymatiques responsables de la dégradation des protéines (protéases), activités qui avaient été préalablement détectées par des méthodes biochimiques classiques (Charet et Coll., 1980).

confère l'article N°3 : "Ultrastructural localisation of Enzymes involved in the Feeding Process in <u>P. chabaudi</u> and <u>Babesia hylomysci</u>.

The Journal of Protozoology, 1983, 30(1), pp : 376-382.

La même étude a été menée chez <u>P. berghei</u> et semble donner des résultats analogues bien que nous ayons un problème de reproductibilité des expériences. Chez FCR_3 , ces travaux n'ont pas encore abouti pour des raisons toujours inexpliquées (conditions de culture, substrats différents...).

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de localiser d'autres enzymes soit par la même technique, soit par l'utilisation de la cryoultramicrotomie dont les possibilités semblent prometteuses. Une des enzymes à rechercher serait la cathepsine D qui possède comme substrat spécifique l'hémoglobine et qui se trouve en grande quantité dans le stroma érythrocytaire. A ce sujet, se pose le problème de l'origine des enzymes responsables de la dégradation chez Plasmodium.

B) Origine des enzymes

Il existe deux réponses à ce problème.

. les enzymes sont d'origine exogène, c'est-à-dire qu'elles préexistent dans le stroma érythrocytaire et seraient activées lors de la formation des vésicules d'endocytose (exemple probable, la cathepsine D). Cette activitation

serait consécutive à une modification du pH du contenu intravésiculaire (Okuma et Coll, 1978 ; Geison et Coll., 1981 ; Schneider, 1982 ; Mc Neil et Coll., 1983 ; Schneider, 1983 ; Yamashiro et Coll., 1983,).

les enzymes sont synthétisées par le parasite (comme le montre l'article N°3) et seraient amenées sur les sites de dégradation par l'intermédiaire de structures de type lysosome. Après fusion de ces derniers avec les vésicules d'endocytose, la dégradation se ferait dans un phagolysosome (De Duve, 1969).

Il était donc intéressant de rechercher de telles structures chez <u>Plas-</u> <u>modium</u> d'autant plus que la bibliographie sur ce thème est particulièrement pauvre et contradictoire (voir pour revue générale Sinden, 1978).

a) Recherche de la phosphatase acide :

Une des hydrolases caractéristique du lysosome est la phosphatase acide. Chez <u>P. berghei</u> l'existence de cette enzyme est controversée : Aikawa et Coll. (1971) la mettent en évidence au niveau des cisternes du réticulum endoplasmique tandis que Scorza et Coll. (1972) sont incapables de la localiser bien qu'ils détectent une aryl-sulfatase (qui peut être d'origine exogène) chez cette même espèce.

Devant ces résultats contradictoires, nous avons tenté de localiser la phosphatase acide par la technique classique :

B glycérophosphate $\xrightarrow{PA} PO_4 \xrightarrow{--}$

+ Pb (N0₃)₂ → Pb₂ PO₄

. mode opératoire :

Nous avons utilisé P. berghei pour mettre au point la technique.

Le sang de souris impaludées est prélevé de la façon habituelle et fixé dans du glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,3 pendant 30 mn à $+4^{\circ}C$.

Les culots sont lavés toute la nuit dans un mélange de tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,3 contenant 10 % de DMS0 et additionné de 7,5 % de sucrose, ceci afin d'éliminer le fixateur. Suit une incubation à 37°C pendant 30 min dans le milieu suivant :

B glycérophosphate à 1,25 %	10 ml
tampon acétate 0,2 M, pH5	10 mi
eau distillée	10 ml
initrate de plomb à 0,2 %	20 ml

Après des lavages soigneux dans le tampon, les échantillons sont postfixés puis inclus suivant la technique habituelle. Les coupes sont observées sans avoir été constrastées de manière à ne pas masquer le marquage. Les témoins sont incubés dans du milieu additionné de NaF, 0,01 M, inhibiteur de la phosphatase.

. résultats :

Cette technique met en évidence un marquage très fin des cisternes du réticulum endoplasmique (Fig. V,1) et de petites vésicules (Fig. V,2) sont parfois localisées à proximité de vésicules ou vacuoles d'endocytose. Ces vésicules sont plus nombreuses chez les stades âgés (Fig. V,1 et 3).

Les macrophages ou les trombocytes, dont la richesse en phosphatase acide est bien connue, servent de témoin interne pour la réaction (Planche V,4).

Les mêmes observations peuvent se faire chez <u>P. yoelii nigeriensis</u> (Planche VI) où le marquage s'intensifie avec l'âge du parasite.

Chez <u>P. falciparum</u> (FCR₃), le marquage est identique, chez les formes jeunes, à celui des parasites murins (Figs. VII,1,2 et 3). Chez les trophozoītes plus âgés (15-20 heures), des structures à contenu dense (150 nm environ) appa-

raissent au voisinage des vacuoles résiduelles. Leur contenu présente une activité phosphatasique acide. (Figs. VII,4 et VIII, 1 et 2). Le marquage s'intensifie au point de fusion des vésicules pigmentaires (Fig. VIII,3).

. discussion :

Jusqu'à présent, aucune des études morphologiques de la structure fine des stades asexués (de différentes espèces) de <u>Plasmodium</u> ne décrit ou ne mentionne la présence de structures de type lysosome. De plus, exceptés Rudzinska et Trager (1959) qui ont observé des vésicules dispersées au voisinage du noyau du trophozoīte, personne n'a décrit d'appareil de Golgi susceptible de produire ces lysosomes. La détection d'une activité phosphatasique acide au niveau du réticulum et de vésicules pourrait être en faveur de l'existence d'un complexe lysosomal chez <u>Plasmodium</u>. Cependant, le marquage relativement faible pose des problèmes d'interprétation : quantité d'enzyme, spécificité de la réaction (Sabatini et Coll., 1963 ; Janigan, 1967 ; Seeman et Coll., 1967 ; Wetzel et Coll., 1967 ; Fahima et Coll., 1968 ; Hourdry, 1974 ; Ryter et Coll., 1976). Ces difficultés nous ont poussés à rechercher une technique qui permet de mieux visualiser les différents compartiments intracytoplasmiques.

b) technique à l'iodure de zinc - acide osmique (IZO) :

Cette méthode, dérivée de la microscopie optique (Champy, 1913 et Maillet, 1963) permet en fait de marquer les différents compartiments cellulaires et ainsi de réaliser un contraste qui favorise leur étude. Le principe consiste à marquer les protéines soufrées (thiols -S-H et ponts disulfures -S-S-) par l'iodure de zinc au moment de la postfixation (Clark et Coll., 1970 ; Pellegrino de Iraldi, 1977 ; Benchimol et Coll., 1985).

. Méthode :

- fixation classique : glutaraldéhyde de Na 2,5 % dans un tampon cacodylate de Na 0,1 M à pH 7,4 pendant 1 H 30 à 4°C.

- lavages dans une solution A de :

Tris 0,01 M pH 4,5 NaCl 1,13 M CaCl₂ 0,01 M MgCl₂ 0,03 M

incubation à l'obscurité et à 4°C pendant 16 H à 24 H dans :
iodure de zinc fraîchement préparé 1 vol.
B solution A 1 Vol.

puis 4 vol de B additionnés de 1 Vol d' $0s0_4$ forment le bain d'incubation.

- lavage puis déshydratation et inclusion classiques (Epon).

NB : - témoin + avec du dithiothreitol qui coupe les -S-S-

- témoin - avec du N-ethylmaleimide 1 mM qui inhibe la réaction avant incubation dans l'IZO.

. résultats :

L'observation des coupes montre un marquage très net, dense et localisé dans différents compartiments cellulaires :

- l'espace périnucléaire : la limite du ou des noyaux (après division) est clairement visualisée de même que les marquages respectent parfaitement les pores nucléaires (Figs. IX,2,3 et 4 ; X,5).

- le réticulum endoplasmique (Planche IX) est très ténu chez les jeunes stades, prend de l'extension au fur et à mesure de la croissance parasitaire pour s'aligner en lamelles parallèles, caractéristiques du trophozoīte mature. - la mitochondrie (Fig. IX,3) montre quelques rares crêtes en négatif.

- l'appareil de Golgi se repère sans doute possible (Figs. X,3 et 4). Il est atypique et se présente sous la forme d'un aggrégat de vésicules de 50 nm environ. Il prend naissance au niveau soit du réticulum endoplasmique soit de l'enveloppe nucléaire (processus lié à la formation des rhoptries du futur mérozoïte.

- les vésicules et vacuoles du système digestif sont très bien marquées uniquement lorsqu'elles sont fermées (pas de marquage de la vacuole cytostomale en bourgeonnement, ni du tube non vésiculisé). Les vacuoles et vésicules pigmentaires sont très intensément marquées sauf au niveau du cristal de pigment lui-même (Figs. XI,2 et 3).

Chez <u>P. berghei</u> RC, les mêmes observations peuvent être faîtes si ce n'est que le R.E. ne se développe pas comme chez <u>P. berghei</u> N. (Planche XII). Le Golgi se repère également très facilement (Figs. XII,3 et 4).

 FCR_3 montre un marquage identique à celui des Plasmodiums murins (Figs. XIII,1,2 et 3). Les structures de type lysosome restent fortement marquées quand la concentration d'iodure est réduite (Figs. XIV,1 et 2).

. discussion :

Cette technique est très intéressante pour l'étude des compartiments cellulaires qui sont marqués sans ambiguité. Elle est d'un avantage très appréciable pour le repérage d'organites tels que le réticulum ou les petites vésicules qui sont peu visibles sur des coupes classiques. Ainsi, le Golgi et ses vésicules ont pu clairement être mis en évidence. Chez les stades âgés, cet organite présente toujours le même aspect quelque soit la souche étudiée.

Bien que la présence de ces vésicules tend à favoriser l'hypothèse de l'existence de lysosomes, l'observation de nombreuses coupes ne nous a jamais

permis d'observer de fusion de vésicules avec les vésicules ou vacuoles d'endocytose, ce qui est en défaveur d'un système phagolysosome. Par contre, chez FCR₃, il existe de nombreuses vésicules à la périphérie de la vacuole résiduelle. Comme aucune fusion n'a été observée, leur proximité avec une vacuole où apparemment la digestion est terminée pose le problème de leur rôle. Si l'on se réfère à certains auteurs (Aikawa et Coll., 1966) qui tendent à voir dans la vacuole résiduelle le site de dégradation de l'hémoglobine, le rôle de ces vésicules serait bien lysosomal. Néanmoins, tant que la localisation des protéases ne sera pas démontrée, il ne sera pas possible de résoudre totalement ce problème.

En conclusion, la présence d'un appareil de Golgi et de vésicules qui pourraient jouer le rôle de lysosomes peut être un argument en faveur de l'existence d'un système lysosomal chez <u>Plasmodium</u> bien que son rôle dans le mécanisme de dégradation du stroma érythrocytaire ne soit pas clairement démontré. Malgré cela, l'origine des enzymes protéolytiques est vraisemblablement double : exogène telle la cathepsine D, endogène telle l'aminopeptidase (figure D).

Remarque : La réaction IZO n'est pas encore bien comprise sur le plan chimique. Cependant, il est curieux de noter que ce marquage est uniquement localisé dans des systèmes fermés. De plus, l'intensité de la réaction est variable notamment au niveau de la mitochondrie (que ce soit chez le parasite ou les cellules sanguines) : dans certains cas le marquage est totalement inexistant alors que l'organite voisin est correctement marqué. Cette réaction ne pourrait-elle être le marqueur d'une certaine "activité", ou "non activité" biologique ?

L'étude cytochimique nous permet de proposer une cinétique d'activité des différents enzymes : la phosphatase détruirait la membrane interne des



Figure D : Mécanisme d'endocytose puis de dégradation de l'hémoglobine, avec intervention des enzymes protéolytiques.

vésicules permettant ainsi au système protéolytique d'entrer en action (figure E).

La dégradation de l'hémoglobine produit deux types de composés ; les acides aminés, issus de la globine, le pigment, issu de l'hème. Nous nous sommes attachés à étudier le devenir de ces produits.

3. DEVENIR DES PRODUITS DE DEGRADATION DE L'HEMOGLOBINE A) Acides aminés

La protéolyse de la globine conduit naturellement à penser que le parasite utilise les acides aminés pour ses propres synthèses. Cette hypothèse fait l'objet de l'étude de l'article N°4 : "Comparative study of amino acid production in erythrocytes parasitized by <u>Plasmodium sp.</u> and <u>Babesia</u> hylomysci. Comparative Biochemystry and Physiology (1983), 75B, pp. 347-353.

Nous y avons montré que, tout au moins, la leucine n'était pas ou peu utilisée par le parasite <u>in vivo</u>. Il serait prématuré de conclure à un rejet de tous les acides aminés par le parasite au vu d'une seule étude. Aussi faudra-t-il l'étendre à d'autres acides aminés notamment les acides aminés essentiels car le parasite pourrait dégrader de grandes quantités d'hémoglobine en vue d'assimiler un ou quelques acides aminés particuliers (par exemple l'histidine qui est peu abondante dans l'hémoglobine) (figure E).

Remarque : Si le rejet total des acides aminés s'avère exact, une source de "nourriture" possible du parasite serait alors le plasma lui-même. Mais se pose alors le problème de l'utilité d'une telle dégradation de l'hémoglobine.

B) Pigment :

a) Composition :

La nature et la composition chimique de ce composé font toujours l'objet d'étude et de controverses (Homewood et Coll., 1972). L'hypothèse de la haute teneur en hématine est la plus probable avec, en plus, une fraction protéique dont l'existence et l'origine n'est pas de ce fait clairement démontrée. Or nous avons montré que les vésicules pigmentaires contiennent beaucoup de

protéines soufrées (technique à l'IZO). Cette remarque pourrait être un élément de réponse au problème de cette fraction protéique qui ne serait alors qu'une contamination.

b) Devenir (figure E) :

Après leur formation, les vésicules et vacuoles pigmentaires fusionnent plus ou moins rapidement selon l'espèce pour former une vacuole résiduelle centrale. Chez les souches résistantes, ce schéma est modifié par un phénomène très particulier comme nous le verrons dans le chapître suivant. Au moment de la lyse de l'hématie lors de la libération des mérozoïtes, cette vacuole est rejetée dans la circulation sanguine. N'étant pas catabolisable par l'organisme infesté, il s'accumule au niveau du système macrophagique (système réticuloendothélial), en particulier au niveau du foie (cellules de Kupffer).



<u>Figure E</u> : : Devenir des produits de dégradation de l'hémoglobine. La phosphatase acide détruirait la membrane interne de la vacuole d'endocytose permettant ainsi l'action du système protéolytique.

CHAPITRE II

ACTION DE LA CHLOROQUINE SUR LE SYSTEME DE DEGRADATION DE L'HEMOGLOBINE

La chimiothérapie est définie comme l'administration d'une substance qui a une action antimicrobienne systémique ; définition à laquelle répond la chloroquine qui est considérée comme un schizonticide sanguin.

1. ETUDE MORPHOLOGIQUE

A) Plasmodiums murins

Lorsqu'une souris infestée par <u>P. berghei</u> normal est traitée par une dose curative de 5 mg/kg de chloroquine, on peut observer une coalescence progressive du pigment malarique. Cette expérience est décrite dans l'article $N^{\circ}5$: "Action préférentielle de la chloroquine sur les <u>Plasmodium</u> hébergés par des hématies matures". Pathologie Biologie (1984), <u>32</u>, pp. 1019-1023.

L'action de la chloroquine est très importante sur le système digestif de <u>Plasmodium</u>. Morphologiquement, elle se traduit non seulement par une fusion progressive et prématurée des vacuoles et vésicules du système digestif mais également, si l'expérience et l'observation sont prolongées, par une fusion de fragments cytoplasmiques avec la vacuole autophage (Planche XV) suivie par une expulsion de la vacuole autophage (Planche XVI).

Ce schéma de l'action de la chloroquine se retrouve chez d'autres espèces de <u>Plasmodium (P. chabaudi, P. yoelii nigeriensis)</u>.

B) Plasmodium humain

Chez <u>P. falciparum</u> (FCR₃) la coalescence naturelle très rapide masque la coalescence induite par la chloroquine lors d'une étude en microscopie photonique. Ceci a fait conclure que l'action de cette drogue est moindre chez FCR₃ sur ce plan-là, bien que son action létale soit effective. L'observation des coupes ultrafines montre cependant une action sur les jeunes stades qui se traduit par une hypertrophie des vésicules pigmentaires avec malformation du cristal de pigment (Fig. XVII,2). Les vésicules et vacuoles non pigmentées ne semblent pas atteintes (Figs. XVII, 1 et 3).

Chez les trophozoïtes moyens, la chloroquine provoque une fusion prématurée des vésicules cytostomales dont le contenu n'est pas encore dégradé et qui possèdent encore leurs deux membranes limitantes, avec la vacuole résiduelle (Figs. XVII,4 et 5 ; XVIII,1 et 3). Cela provoque une accumulation de vésicules cytostomales non dégradées dans la vacuole résiduelle (figure F). Les stades âgés (schizontes) ne sont que peu affectés (sur le plan morphologique) par le médicament (Fig. XVIII,2).

Nous avons recherché également la phosphatase acide sur des parasites traités par la chloroquine. Les résultats sont assez surprenants en ce sens que cet antimalarique semble augmenter le nombre de vésicules marquées surtout au voisinage de vacuoles d'endocytose (Planche XIX).

Remarque : La fusion prématurée des vacuoles cytostomales avec la vacuole résiduelle chez FCR_3 est également obtenue lorsque la culture est mal traitée (séjour plus ou moins prolongé à température ambiante) ou lorsque le parasite est soumis à des conditions sévères (French Press par exemple). Les figures de fusion pourraient donc être la réaction du parasite à un stress et ne seraient ainsi pas spécifiques de la chloroquine (Fig. XVIII, encart).

Le mécanisme de désorganisation progressive du parasite par la chloroquine est mis en défaut avec l'apparition de souches résistantes à ce médicament.



Figure F : L'accumulation des vésicules cytostomales non dégradées dans la vacuole résiduelle peut s'expliquer par la structure-même de ces vésicules :

- cellule non traitée : la dégradation de l'hémoglobine ne débute que lorsque la membrane interne de la vésicule a disparu (2).
 Lors de la fusion (3), le pigment est libéré dans la vacuole résiduelle.
- la chloroquine provoque une fusion prématurée de la vacuole cytostomale (le stade 2 est omis). C'est donc une vacuole à deux membranes limitantes qui fusionne ainsi la vacuole autophage. La membrane externe fusionne avec la membrane de la vacuole autophage (comme dans le cas précédent, 3) mais c'est une vacuole limitée par la membrane interne qui est alors libérée.

2. ETUDE DE LA RESISTANCE A LA CHLOROQUINE

A) Définition de la résistance à un médicament

La résistance à un médicament est définie comme "la capacité qu'a une souche de parasite à se multiplier et à survivre en présence d'une concentration de médicament qui, normalement, détruit les parasites de la même espèce ou prévient leur multiplication. Une telle résistance peut être relative (par rapport à des doses croissantes de la drogue tolérées par l'hôte) ou totale (aux doses maximales tolérées par l'hôte)" OMS, 1963.

B) Historique et distribution géographique

Bien que la définition ci-dessus puisse s'appliquer à n'importe quelle espèce, au stade de croissance parasitaire, la notion de résistance au médicament antipaludéen se réfère souvent à l'action de schizonticides sanguins, spécialement les 4-aminoquinoléines (dont la chloroquine), utilisées dans le traitement contre P. falciparum.

La chloroquine est le schizonticide sanguin le plus couramment utilisé de par le monde pour le traitement contre le paludisme. Des cas de résistance par <u>P. falciparum</u> à cette drogue ont été presque simultanément déclarés en Thaïlande, Vénézuéla et Colombie au début des années 60. Durant les années qui suivirent, des cas de plus en plus nombreux sont apparus en Asie de l'Est et en Amérique du Sud.

En 1978, des cas de résistance ont été démontrés en Afrique de l'Est et actuellement ce fléau s'étend en Afrique Centrale (figure G).

Il est à remarquer que seul <u>P. falciparum</u> présente une résistance à la chloroquine contrairement aux trois autres espèces parasites de l'homme (<u>vivax</u>, <u>malariae</u> et <u>ovale</u>) contre lesquelles la chloroquine reste le traitement de choix.



Figure G : Distribution des foyers de résistance à la chloroquine dans le monde. (figure reprise de l'article de Spencer, 1985).



De nombreux cas de résistance aux autres médicaments antipaludéens ont également été recensés : la pyrimethamine/sulphadoxine (Fansidar) commence à rencontrer des ilôts de résistance en Afrique et au Brésil, de même pour la pyriméthamine associée au proguanil. Seule la méfloquine semble encore très efficace à plus de 95 %. La quinine reste le traitement le plus sûr dans des cas de paludisme sévère malgré quelques échecs.

C) Etude de la chloroquino-résistance chez les Rongeurs

La multiplication alarmante de ces cas a poussé des chercheurs à reproduire ce phénomène en laboratoire sur des modèles murins afin d'en étudier le mécanisme (Peters et Coll. 1965).

Deux observations primordiales ont été faites lors de l'étude en microscopie photonique :

- La morphologie du parasite diffère de celle de la souche originelle sauvage par une moindre pigmentation et un système vacuolaire plus développé (analogie avec une éponge).

- les parasites se développent quasi-essentiellement dans les réticulocytes avec un décours de parasitémie bimodal.

L'étude ultrastructurale complète sur <u>P. berghei</u> est faite dans l'article $N^{\circ}2$, deuxième partie.

a) Action préférentielle de la chloroquine

Il a été constaté que, lors d'une infestation par <u>P. berghei</u> N, les quelques parasites qui se développent dans les réticulocytes sont moins touchés par la chloroquine que les autres (Macomber et Coll., 1967 ; Peters, 1968 ; Howells et Coll., 1968 a et b). Cette relation - développement dans des hématies immatures et moindre sensibilité au médicament - nous a poussé à émettre l'hypothèse d'une action préférentielle de la chloroquine pour les parasites hé-

bergés par des globules rouges âgés. Le thème est étudié dans l'article N°6 : "Relation between haemoglobin degradation and maturity of the red blood cell infected by <u>P. berghei</u>". Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, <u>78B</u>, pp : 891-896 et repris dans les articles N° 2 et 5.

Il y est fait notamment mention d'un mécanisme tout à fait particulier, l'exocytose du pigment malarique qui pourrait être un moyen d'échapper à l'action de la chloroquine par les souches résistantes.

b) Un mécanisme possible d'échappement à la chloroquine

Cette hypothèse a été bâtie sur deux observations :

- Les parasites (<u>P. berghei RC</u>), hébergés par les réticulocytes, ont la capacité d'exocyter le pigment malarique. Cela se traduit par l'expulsion de vésicules pigmentaires typiques dans le cytoplasme du réticulocyte.

- L'effet de la chloroquine se traduit par la formation de vacuoles résiduelles chez les souches sensibles et résistantes de <u>P.berghei</u> mais également de <u>P. yoelii nigeriensis</u>. Cependant, chez les souches résistantes le phénomène est plus lent et se prolonge par une expulsion de la vacuole autophage à l'extérieur du réticulocyte : celle-ci se latéralise, se pédiculise puis se détache du parasite et, comme chez l'érythrocyte, est libérée dans le cytoplasme du réticulocyte qui, par contre, la rejette dans la circulation sanguine.

Ces observations appellent plusieurs commentaires :

- Le réticulocyte est capable, contrairement à l'érythrocyte, d'exocyter son cytoplasme (expulsion du noyau, des organites...). Ce mécanisme doit également être capable d'une part de faciliter l'exocytose du pigment par le parasite et d'autre part de prendre en charge les vésicules et vacuoles expulsées par ce dernier et les éliminer dans la circulation sanguine.

- Les parasites sensibles à la chloroquine réagissent comme les parasites résistants mais le mécanisme se bloque de par l'incapacité de leur hôte à prendre en charge les produits d'excrétion puis de les exocyter. L'accumulation normale des vésicules pigmentaires peut expliquer la plus grande pigmentation des parasites normalement sensibles. L'exocytose naturelle des vésicules pigmentaires n'est jamais observée dans ce cas-là. L'expulsion, par le parasite, de la vacuole autophage semble beaucoup plus difficile au vu des perturbations provoquées au niveau de la vacuole parasitophore (Fig. XVI,3). Dès cet instant, le phénomène peut se bloquer.

- Les vacuoles issues de l'action de la chloroquine seraient létales pour le parasite par deux processus possibles :

. désorganisation progressive du parasite par accumulation de ses divers organites dans cette vacuole conduisant ainsi à la lyse.

. la vacuole autophage pourrait ête expulsée par le parasite mais l'hôte étant incapable d'exocytose se lyserait et provoquerait ainsi la libération prématurée du parasite dans la circulation d'où sa lyse. (figure H)

REMARQUE

Cette prédilection pour les hématies immatures par les souches résistantes est observée également chez <u>P. y. nigeriensis</u>. Il est donc tentant d'extrapoler aux autres espèces de <u>Plasmodium</u> notamment <u>P.</u> falciparum.

Ceci serait de plus corrélé par le quasi-parfait recouvrement des zones d'endémie à <u>Plasmodium</u> résistant et des zones d'anémie provoquées par des causes diverses (autres parasitoses, malnutrition...), synonymes d'une réticulocytémie importante. Le traitement par la chloroquine serait donc inefficace pour les raisons précitées.


<u>Figure H</u> : Schéma organigramme d'un mécanisme possible d'échappement à l'action de la chloroquine grâce à une capacité d'exocytose.

- *

L'étude de ce phénomène est très difficile, voire impossible au laboratoire étant donné d'une part la difficulté d'obtenir des réticulocytes pour les cultures et d'autre part la faible durée de vie de ces derniers : ils deviennent matures en 3 jours. Cependant, des expériences en cours au laboratoire visant à séparer sur gradient d'albumine les populations érythrocytaires en fonction de leur âge, puis de les parasiter, tendent à confirmer l'hypothèse de la moindre activité létale de la chloroquine sur des parasites hébergés par les hématies les plus jeunes.

Il existe d'autres facteurs influençant l'augmentation des cas de chloroquino-résistance de <u>Plasmodium</u>. Certaines études ont en effet montré que les souches résistantes ont un avantage biologique apparent par rapport aux souches sensibles. Des <u>P. falciparum</u> résistants s'avèrent plus infestants pour l'Anophèle vecteur que les parasites sensibles (Wilkinson et Coll., 1976). Ceci a également été montré dans notre laboratoire (Prensier, communication personnelle) chez <u>P. yoelii nigeriensis</u>. <u>P. chabaudi</u> résistant croît plus vite que la même souche sensible (Rosario et Coll., 1978), de même que <u>P. yoelii</u> (Fahey et Coll. 1984) et <u>P. falciparum</u> en culture (Taithong, 1983). De plus il est intéressant de remarquer que si la résistance confère un avantage biologique en l'absence de pression médicamenteuse, on serait en droit de s'attendre à ce que les parasites deviennent de plus en plus résistants même en l'absence d'utilisation de la drogue (Spencer, 1985).

L'intensité de la transmission, l'apport du traitement et l'état immun de la population doit également influencer l'expansion des zones de résistance. Il a été ainsi suggéré que l'utilisation à grande échelle de la chloroquine pour des traitements de masse des populations ou la chimioprophylaxie, augmentent préférentiellement la dissémination de cette chloroquino-résistance (Peters, 1982). L'emploi de mélange de médicaments pourrait être une solution pour prévenir cette résistance.

CHAPITRE III

MODE D'ACTION POSSIBLE DE LA CHLOROQUINE

L'échec dans l'éradication et la continuelle expansion du paludisme alliés à une incidence croissante de la résistance aux médicaments ont poussé les chercheurs à se poser la question de savoir exactement ce qui tue les <u>Plas</u>-<u>modium</u>. Il existe deux voies de recherche : l'immunologie et la chimiothérapie.

1. RAPPEL IMMUNOLOGIQUE

Bien que ce ne soit pas le propos du travail, il est intéressant de noter que dans le cas de parasite de Rongeurs, la réponse anticorps de l'hôte ne semble avoir que peu d'effet sur <u>P. vinckei</u> et <u>P. chabaudi</u> qui, rappelons-le, envahissent préférentiellement des hématies matures (Allison, 1982) tandis que les anticorps semblent jouer un rôle assez important dans les infestations à <u>P. berghei</u> et <u>P. yoelii</u> qui parasitent des réticulocytes. Ceci pourrait être mis en parallèle avec la continuelle excrétion d'antigènes parasitaires grâce au phénomène d'exocytose que nous avons mis en évidence chez les cellules rouges immatures.

2. LA VOIE CHIMIOTHERAPIQUE

Si l'efficacité des médicaments antipaludéens est reconnue, par contre, leur mode d'action reste encore obscur. Il semble exister deux modes possibles d'action des drogues.

A) Le mode direct (c'est-à-dire action sur le parasite lui-même)

a) Action sur le système digestif

. Action sur les membranes :

La chloroquine a pour effet majeur, chez <u>Plasmodium</u>, de faire fusionner les vacuoles et vésicules du système digestif (coalescence), (Aikawa et Coll., 1969 ; Warhurst et Coll., 1967, 1973 ; Thurston et Coll., 1972 ; Colombo et Coll., 1985) puis de fragments de cytoplasme selon la dose employée (avec cependant inhibition du phénomène à fortes doses, Warhurst et Coll., 1973).

Ceci semble indiquer une action de la drogue au niveau membranaire (Kramer et Coll., 1971 ; Siwarapor et Coll., 1982 ; Homewood et Coll., 1977 ; Tauber et Coll., 1985 ; Wunderlich et Coll., 1985) qui explique en partie le gonflement des vésicules (Yayon et Coll. 1983, 1984) et qui peut être également observé chez d'autres cellules de type macrophage ou lymphocyte (Yang et Coll., 1965 ; Okhuma et Coll., 1978,81,82). Cette action est typique de bases faibles lysosomotropes (définition de De Duve, 1974).

. Action lysosomotrope :

Peu d'explications sont fournies sur l'effet de telles substances sur les voies métaboliques intracellulaires. En général, ces substances provoquent la fuite des constituants lysosomiaux vers l'extérieur de la cellule peut-être par une redistribution ou un blocage des sites récepteurs (Sando et Coll., 1976 ; Gonzalez-Noriega et Coll., 1980 ; Brown et Coll., 1984 ; Geuze et Coll., 1985) ou par une altération de la stabilité des lysosomes (Bertini et Coll., 1970 ; Homewood et Coll., 1972 ; Jones et Coll., 1984). Ainsi, la chloroquine agirait sur le tri des enzymes lysosomales. En sa présence, les hydrolases acides sont sécrétées au lieu d'être envacuolisées dans les lysosomes (Wiesmann et Coll., 1975 ; Willcox et Coll., 1979 ; Moore et Coll., 1983 ; Hohman et Coll., 1985). Cependant, la chloroquine n'affecte pas l'activité des enzymes déjà présentes dans les lysosomes, comme semble le montrer notre expérience sur la phosphatase acide (Wibo et Coll., 1974 ; Dijkstra et Coll., 1984 ; Tauber et Coll., 1985), bien qu'il existe des travaux contradictoires à ce sujet (Seglen et Coll., 1974, 79 ; Lockshin et Coll., 1979).

Un autre mécanisme possible d'action des bases faibles serait une augmentation du pH intravésiculaire (Okhuma et Coll., 1978,81,82 ; Poole et Coll., 1981) ; Maxfield, 1982 ; Antoine et Coll., 1985 ; Krogstad et Coll., 1985) avec pour conséquence un mauvais fonctionnement des hydrolases qui travaillent à pH acide d'où une moindre dégradation de l'hémoglobine qui contrarierait la croissance parasitaire.

L'accumulation du médicament dans les lysosomes peut s'expliquer par une diprotonation de la molécule dans le compartiment intravésiculaire qui empêcherait sa sortie (Homewood et Coll., 1972).

Si l'on considère le pigment malarique (hématine) comme faisant partie d'un phagolysosome son rôle dans la concentration de la drogue doit également être pris en considération par son intercalation <u>in vitro</u> dans la ferriprotoporphyrine IX (Chou et Coll., 1980 ; Moreau et Coll., 1982).

b) Action sur d'autres organites :

Les antimalariques s'attaquent également à d'autres organites essentiels du parasite. Sous l'action de la primaquine (Aikawa et Coll., 1969; Beaudoin et Coll., 1968) ou du quinghaosu (ou artémisine) (Jiang et Coll., 1985), la mitochondrie subit de profondes modifications telles que gonflement et désorganisation interne. De même le Golgi est atteint par des bases faibles (Stromberg et Coll., 1985) qui provoquent chez d'autres cellules (Stromberg et Coll., 1985; Anderson et Coll., 1985) des distensions notamment de la partie trans. Les organites étant étroitement liés aux fonctions métaboliques, une atteinte de ceux-ci provoquerait un dysfonctionnement du métabolisme et notamment des synthèses (Theakston et Coll., 1972; Wibo et Coll., 1974; Antoine et Coll., 1985) essentielles à la vie du parasite selon son stade évolutif (Deans et Coll., 1983 a et b, De Roja et Coll., 1985) avec une répercussion probable sur le système digestif.

La chloroquine est également connue pour s'intercaler <u>in vitro</u> dans l'ADN (Kurnick et Coll., 1962 ; Allison et Coll., 1965 ; Hahu et Coll., 1974) et ainsi provoquer des dérèglements très graves (Ladda, 1966).

B) Le mode indirect (c'est-à-dire par l'intermédiaire de l'hématie hôte elle-même).

L'étude de cette voie est relativement récente et implique des

radicaux oxygène toxiques vis-à-vis de Plasmodium (Bhatia et Coll., 1985 ; Cox 1983). Il est à remarquer que ces observations sont valables sur des souches parasites d'hématies matures et non pour P. berghei, par exemple, lorsqu'il envahit des réticulocytes. Ainsi une fois de plus, l'importance de l'hôte dans la protection du parasite vis-à-vis des agents extérieurs est mise en évidence. En effet, les antimalariques pourraient libérer des radicaux peroxyde toxiques à la fois pour le parasite et pour l'hôte (Clark et Coll., 1983 ; Ockenhouse et Coll., 1984). Mais ce dernier a des capacités naturelles à se défendre contre cette agression de part sa nature (Laser et Coll., 1984). Il est d'ailleurs aidé par le parasite lui-même qui se protège contre ce type d'attaque par la libération de constituants du type glutathion qui est un élément-clé du système de défense de l'érythrocyte contre les dommages oxydatifs (Stocker et Coll., 1985 ; Seth et Coll., 1985). Le réticulocyte a une capacité de défense supérieure à l'hématie mature car il possède encore quelques fonctions de synthèse. Par contre, l'hématie, notamment lorsqu'elle est parasitée par un trophozoïte âgé, a perdu beaucoup de ses capacités et se trouve sous stress oxydatif. Le traitement par la chloroquine doit submerger ses défenses et entrainer sa lyse, d'où une libération prématurée du parasite dans la circulation sanguine qui conduit à la lyse.

Il est également à noter que la chloroquine pourrait se lier au plasmalemme érythrocytaire (Fitch et Coll., 1974) et donc le déstabiliser.

Le mécanisme d'action des peroxydes peut être relié au mode d'attaque qu' emploient les macrophages pour détruire <u>Plasmodium</u> (Dockrell et Coll., 1983 ; Ockenhouse et Coll., 1984). Ceci est un point où chimiothérapie et immunologie se rejoignent (Cox, 1983).

En résumé, le mode d'action des antimalariques est complexe et semble se situer à différents niveaux. Ceci rend d'autant plus difficile l'étude de la résistance aux médicaments de part le nombre de facteurs mis en jeu (figure I).



Figure I : Modes d'action possibles de la chloroquine sur <u>Plasmodium</u> au niveau de :

- 1 l'ADN (transcription, traduction ...)
- 2 la mitochondrie (énergie)
- 3 l'appareil de Golgi et la production d'enzymes lysosomales (fuite des enzymes)
- 4 la dégradation de l'hémoglobine (pH, mauvaise dégradation)
- 5 la coalescence du pigment (fusion des membranes)
- 6 le globule rouge (par choc oxydatif).

CONCLUSION

L'étude comparative de la morphologie ultrastructurale du mécanisme d'endocytose puis de dégradation du stroma érythrocytaire chez diverses espèces de <u>Plasmodium</u> nous permet de faire plusieurs constatations et d'apporter certaines précisions.

1) Point de vue technique :

Bien qu'assez lourde, la technique de coupes sériées suivie d'une reconstitution tridimensionnelle semble être la meilleure pour étudier une structure complexe dans l'espace et d'en apprécier les relations avec les autres constituants cytoplasmiques. La visualisation serait améliorée grâce aux techniques récentes de dessin assisté par ordinateur (DAO ou CAO) mais nécessite une infrastructure informatique assez évoluée et adaptée aux problèmes rencontrés en biologie. De plus, les logiciels et systèmes d'acquisition automatique d'images ne sont pas encore suffisamment efficaces dans le domaine ultrastructural.

2) Endocytose :

Il existe une remarquable identité du mécanisme d'endocytose de l'hémoglobine chez <u>Plasmodium</u>. Quelle que soit la souche étudiée, il existe deux systèmes d'endocytose :

- une micropinocytose sur toute la périphérie du parasite qui conduit à la formation de petites vésicules.

- un système cytostomal qui prend naissance à partir d'une structure spécialisée de type micropore : le cytostome.

Ces deux systèmes se succèdent durant la croissance du trophozoïte, après une période de coexistence. La seule différence entre les souches est l'importance relative des deux systèmes. Alors que le système cytostomal est développé en tube chez les souches normales (sensibles à la chloroquine), il n'est représenté

que par des vacuoles cytostomales chez les souches RC où la pinocytose est très active. FCR_3 est particulier en ce sens que le tube existe en début de croissance et est remplacé par des vacuoles par la suite.

3) Dégradation de l'hémoglobine :

La dégradation de l'hémoglobine est également identique chez les diverses souches, tout au moins du point de vue morphologique. Elle ne débute que lorsque les vésicules ou vacuoles d'endocytose ne possèdent plus qu'une membrane limitante. Elle se traduit par l'éclaircissement progressif de la matrice et l'apparition de cristaux de pigment malarique. La quantité de pigment est variable selon la souche : très importante chez les souches normales, elle est réduite chez les souches RC.

- système enzymatique :

Les enzymes intervenant dans ce système sont de deux types :

les protéases : un système protéolytique prend en charge la dégradation proprement dite de la grosse protéine qu'est l'hémoglobine. L'enzyme que nous avons détectée et localisée est l'aminopeptidase. Cette hydrolase acide interviendrait en fin de processus par la découpe des peptides en acides aminés. Les protéases précédentes comprendraient, entre autres, la cathepsine D qui est très spécifique de l'hémoglobine.

. la(es) phosphatase(s) : une phosphatase acide a été localisée au niveau des vésicules d'endocytose. Son rôle dans la dégradation de l'hémoglobine est nul mais il peut être utile par le fait de la nécessité de dégrader la membrane interne des vésicules ou vacuoles d'endocytose avant la protéolyse de l'hémoglobine.

Se pose ainsi le problème de l'origine des enzymes :

. origine exogène, donc préexistant dans le stroma érythrocytaire telle la cathepsine D qui serait activée par l'acidification du contenu intravésiculaire.

. origine endogène, c'est-à-dire synthétisée par le parasite lui-même. Se pose alors le problème du transfert des enzymes du lieu de leur synthèse au site d'action. Ce rôle pourrait être tenu par un système de type lysosomal, que nous avons détecté et qui pourrait avoir pour origine un appareil de Golgi atypique (visualisé par une technique cytochimique de mise en évidence des compartiments cellulaires). Cependant, aucune image de fusion lysosome-vésicule n'a été enregistrée juqu'à présent.

- devenir des produits de dégradation :

. les acides aminés ne seraient pas tous utilisés par le trophozoïte pour ses propres synthèses si l'on prend pour exemple la leucine qui est rejetée en grandes quantités. Mais ce ne doit pas être le cas pour tous les acides aminés composant l'hémoglobine.

. le pigment, chez les souches sensibles, va subir une coalescence progressive. Très précoce chez FCR₃, elle ne prend place chez les souches de rongeurs qu'au moment des divisions nucléaires.

Chez les souches RC, les vésicules pigmentaires sont régulièrement expulsées de la cellule par un mécanisme d'exocytose. Ceci pourrait expliquer la pauvreté en pigmentation malgré une dégradation de l'hémoglobine au moins aussi active que chez les souches normales.

4) Action de la chloroquine

L'action de cet antipaludéen sur le système digestif est très importante. Elle conduit à une coalescence progressive du pigment, quelle que soit la souche étudiée, sensible ou non à la chloroquine. Seule la chronologie des évènements est différente :

- plus tardive chez RC, certainement de part la moindre pigmentation de cette souche.

- masquée chez FCR3, de part la précocité de la coalescence naturelle, mais remarquable par la fusion prématurée des vacuoles cytostomales dont le contenu n'est pas encore dégradé.

Les vacuoles de coalescence ont tendance à se latéraliser et à être expulsées de la cellule. Cependant, seules les souches RC sont capables d'une exocytose efficace et de se débarrasser de ce phagosome et donc d'échapper à l'action de la chloroquine. En effet, ce phagosome, s'il reste dans le parasite, tend à être le réceptacle de toute sorte de vésicules et de fragments cellulaires, ce qui entraîne une désorganisation totale du parasite qui le conduit à la lyse.

Il est aussi remarquable de constater que le mécanisme d'échappement à la chloroquine a pour origine une particularité de l'hôte. Celui-ci, dans le cas des RC, est le réticulocyte qui est capable d'exocyter ses propres constituants cellulaires. Ce mécanisme prend en charge les rejets du parasite comme il le fait pour les propres organites du réticulocyte. L'hématie mature a perdu ces capacités d'exocytose. Aussi, un rejet de pigment parasitaire provoquerait sa lyse d'où la mort du parasite. Cette constatation met en évidence l'importance de l'hôte dans la protection vis-à-vis d'un stress. Le changement d'hôte serait un moyen pour le parasite d'échapper à l'action de la chloroquine.

5) Mode d'action de la chloroquine

- action directe sur le parasite : la coalescence des vésicules et vacuoles puis de fragments cytoplasmiques tend à montrer que la chloroquine a pour effet majeur de provoquer une modification des membranes entrainant une fusion. Comme chez d'autres cellules (macrophages, lymphocytes), la chloroquine provoque un gonflement des vésicules de type lysosomorphe. Ceci pourrait faire classer les vésicules digestives dans la catégorie lysosomes ou tout au moins phagolysosome. Ces diverses constatations montrent que la chloroquine induit des troubles graves de métabolisme du parasite, entrainant sa lyse.

- voie indirecte : cette voie implique des radicaux oxydatifs toxiques pour le parasite (peroxydes). Malgré une défense accrue de la part du parasite contre ces radicaux conduisant à une meilleure protection contre les dommages oxydatifs, il reste possible que les drogues antimalariques puissent agir par cette voie et conduire à la mort du parasite par la lyse de son hôte qui serait déjà lui-même sous stress oxydatif et donc plus sensible aux effets des radicaux.

En conclusion, certaines connaissances ont été acquises sur la biologie de <u>Plasmodium</u> mais beaucoup de choses restent à faire pour comprendre les mécanismes de résistance aux antimalariques et aux "vaccins". Seule une connaissance parfaite conduira à l'éradication de ce fléau. De plus, pour citer FEG Cox : "Beaucoup de ces expériences ont été faites sur des Rongeurs... Il y a un long chemin entre la souris et l'homme et on ne sait même pas quelle espèce de parasite murin ressemble le plus à ceux de l'homme... Il se passera encore beaucoup de temps avant que l'on sache si ces expériences représentent une solution ou même un indice à l'énigme de l'éradication du paludisme ou si simplement elles augmentent la confusion...".

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

AIKAWA M. 1972. High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with 3 H-chloroquine.

American Journal of Pathology. 67, 277-284.

AIKAWA M., HEPLER P.K., HUFF C.G. et SPRINZ H. 1966. The feeding mechanism of avian malarial parasites.

The Journal of Cell Biology. 28, 355-373.

AIKAWA M. et BEAUDOUIN R.L. 1969. Effects of chloroquine on the morphology of the erythrocytic stages of <u>P. gallinaceum</u>. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **18**, 166-181.

AIKAWA M. et BEAUDOIN R.L. 1969. Morphological effects of 8-aminoquinoleines on the exoerythrocytic stage of <u>P. fallax</u>. Military Medicine. **134**, 986-999.

AIKAWA M. et THOMPSON P.E. 1971. Localization of acid phosphatase activity in <u>P. berghei</u> and <u>P. gallinaceum</u> : an electron microscopic observation. The Journal of Parasitology. **57**(3), 600-610.

ALLISON A.C., O'BRIEN R. et HAHN F. 1965. DNA : Reaction with chloroquine.

Science. 149, 111.

ALLISON A.C. et EUGUI A.M. 1982. A radical interpretation of immunity to malaria parasites.

Lancet. i, 1431-1433.

ANDERSON R.G.W. et PATHAK R.F. 1985. Vesicles and cisternae in the trans Golgi apparatus of human fibroblasts are acidic compartments. Cell. 43, 635-643.

ANTOINE J.C., GOOD B., JOUANNE C., MAURICE M. et FEEDMANN G. 1985. Ammonium chloride, Methylamine and Chloroquine reversibly inhibit antibody secretion by plasma cells. Biology of the Cell. 55, 41-54.

BEAUDOIN R.L. et AIKAWA M. 1968. Primaquine-induced change in morphology of exoerythrocytic stages of malaria. Science. 160, 1233-1234.

BENCHIMOL M. et DE SOUZA W. 1985. <u>Trichomonas foetus</u> cytochemical visualization of the endoplasmic Reticulum-Golgi complex and lipids. Experimental Parasitology. 59, 51-58.

BERTINI F. et BARI D.R. 1970. The effect of drugs on the rate of proteolysis within secondary liver lysosomes. The Journal of Cell Physiology. **76**, 225-229.

BHATIA A. et CHARET P. 1985. Chloroquine induces oxidative lysis of <u>P.</u> <u>berghei</u> parasitized red blood cells.

Annales de la Societé Belge de Médecine Tropicale. 65, (suppl. 2), 97-103.

BROWN W.J., CONSTANTINESCU E. et FARQUHAR M.G. 1984. Redistribution of mannose-6-phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. The Journal of Cell Biology. 99, 320-326. CHAMPY C. 1913. Granules et substances réduisant l'iodure d'osmium. Journal d'Anatomie et Physiologie. 4, 323-343.

CHARET P., AISSI E., BOUQUELET S., et BIGUET J. 1980. Aminopeptidase in rodent <u>Plasmodium</u>.

Comparative Biochemistry and Physiology. 65 B, 519-524.

CHOU A.C., CHEVLI R. et FITCH C.D. 1980. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. Biochemistry. **19**, 1543-1549.

CLARK I.A. et ACKERMAN G.A. 1970. Osmium-Zinc iodide reactivity in human blood and bone marrow cells. Anatomical Records. 170, 81-96.

CLARK I.A. et HUNT N.H. 1983. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria . Infection and Immunity. **39**, 1-6.

COLOMBO M.I. et BERTINI F. 1985. <u>In vivo</u> interaction between mouse liver lysosomes and chloroquine.

Biology of the Cell. 54, 73-78.

COX F.E.G. 1983. Oxidant killing of the malaria parasites. Nature. 302, 19.

DEANS J.A., THOMAS A.W. et COHEN S. 1983. Stage-specific protein synthesis by asexual blood stage parasites of <u>P. knowlesi.</u> Molecular and Biochemical Parasitology. 8, 31-44.

DOCKRELL H.M. et PLAYFAIR J.H.L. 1983. Killing of blood stage murine malaria by hydrogen peroxide. Infection and Immunity. **39**, 456.

FAHEY J.R. et SPITALNY G.L. 1984. Virulent and Nonvirulent forms of <u>P. yoelii</u> are not restricted to growth within a single erythrocyte type. Infection and Immunity, **44**(1), 151-156.

FAHIMI H.D. et DROCHMANS P. 1968. Purification of glutaraldehyde. Its significance for preservation of acid phosphatase activity. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 16(3), 199-204.

FITCH C.D. 1969. Chloroquine resistance in malaria : a deficiency in chloroquine binding.

Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A. 64, 1181-1187.

FITCH C.D. 1977. Linkage of chloroquine resistance in <u>P. berghei</u> to infection of immature erythrocytes in mice.

Life Sciences. 20, 1281-1284.

FITCH C.D., CHEVLI R. et GONZALEZ Y. 1974. Chloroquine accumulation by ergthrocytes : a latent capability.

Life Sciences, 14, 2441-2446.

GARVIN A.J., LYUBSKY S. et POORE C.M. 1981. A cytochemical study of GERL in cultured human fibroblasts. Experimental Cell Research. 133, 297-307. DEANS J.A., THOMAS A.W., INGE R.M.G. et COHEN S. 1983. Stage-specific protein synthesis by asexual blood stage parasites of <u>P. falciparum</u>. Molecular and Biochemical Parasitology. 8, 45-51.

DE DUVE. 1969. Lysosomes. Dans Biology and Pathology. Dingle J.T. et Fell H.B. Editeurs. North-Holland. Vol. 1, 3-40.

DE DUVE C., DE BARSY T., POOLE B., TROUET A., TULKENS P. et VAN HOOF F. 1974. Lysosomotropic agents.

Biochemical Pharmacology. 23, 2495-2531.

DE ROJAS M.A. et WASSERMAN M. 1985. Temporal relationships on macromolecular synthesis during the asexual cell cycle of <u>P. falciparum</u>. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **79**, 792-796.

DIJKSTRA J., VAN GALEN M. et SCHERPHOF G.L. 1984. Effects of ammonium chloride and chloroquine on endocytic uptake of liposomes by Kupffer cells <u>in</u> <u>vitro</u>.

Biochemica et Biophysica Acta. 804, 58-67.

DIRIBE C.O. et WARHURST D.C. 1985. A study of the uptake of chloroquine in malaria infected erythrocytes. High and low affinity uptake and the influence of glucose and its analogues.

Biochemical Pharmacology, 34(17), 3019-3027.

GEISOW M.J., D'ARCY H. et YOUNG M.R. 1981. Temporal changes of lysosomal and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophage studies by fluorescence spectroscopy.

The Journal of Cell Biology. 89, 645.652.

GEUZE H.J., SLOT J.W., STROUS G.J.A.M., HASIUK A. et VON FIGURA K. 1985. Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. The Journal of Cell Biology. 101, 2253-2262.

GONZALES-NORIEGA A., GRUBB J.H., TALKAD V. et SEV W.S. 1980. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhance enzyme secretion by imparing receptor recycling.

The Journal of Cell Biology. 85, 839-852.

HAHN F.E. 1974. Dans Antibiotics : Mechanism of action of Antimicrobial and Antitumor Agents (Corcoran f.W. et Hahn F.E. Editeurs), Springer Verlag West Berlin, volume 3, 58-78.

HEIPLE J.M. et TAYLOR D.L. 1982. Changes in pinosomes and phagosomes in the amoeba, <u>Chaos carolensis</u>. The Journal of Cell Biology. **94**, 143-149.

HOHMAN T.C. et BOWERS B. 1985. Vacuolar pH is one factor that regulates hydrolase secretion.

European Journal of Cell Biology. 39, 475-480.

HOMEWOOD C.A. et NEAME D. 1980. Biochemistry of Malaria. Dans Malaria, J.P. Kreier Editeur. Academic Press, Tome I, 345-405. HOMEWOOD C.A., WARHURST D.C., PETERS W. et BAGGALEY V.C. 1972. Lysosomes, pH and the antimalarial action of chloroquine. Nature. 235, 50-52.

HOURDRY J. 1974. Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans les cellules animales et problèmes posés par cette visualisation. Journal de Microscopie. 21, 245-252.

HOWELLS R.E., PETERS W. et THOMAS E.A. 1968. The chemotherapy of rodent malaria. III, Host-parasite relationships, part 3 : The relationship between haemozoin formation and the age of the host cell. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 62, 267-270.

HOWELLS R.E., PETERS V. et THOMAS E.A. 1968. The chemotherapy of rodent malaria. IV, Host relationships, part 4 : The relation between haemozoin formation and host-cell age in chloroquine and primaquine-resistant strains of <u>P. berghei.</u>

Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 62, 271-276.

HOWELLS R.E., PETERS W., HOMEWOOD C.A. et WARHURST D.C. 1970. Theory for the mechanism of chloroquine resistance in rodent malaria. Nature. 228, 625-628.

HOWELLS R.E., PETERS W. et FULLARD J. 1970. The chemotherapy of rodent malaria. XII, Fine structural changes observed in the erythrocytic stages of <u>P. berghei</u> following exposure to primaquine and menoctone. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 64(2), 203-207. JANIGAN D.T. 1965. The effects of aldehyde fixation on acid phosphatase activity in tissue blocks.

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 13(6), 476-483.

JEARNPIPATKUL A., GOVITRAPONG P., YUTHAVONG Y., WILAIRAT P., et PANIJPAN B. 1980. Binding of antimalarial drugs to hemozoin from <u>P. berghei.</u> Experientia. **36**, 1063-1064,

JIANG J.B., JACOBS G., LIANG D.S. et AIKAWA M. 1985. Qinghaosu induced changes in the morphology of <u>P. inui.</u>

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 34(3), 424-428.

JONES C.J.P., SALISBURY R.S. et JAYSON M.I.V. 1984. The presence of abnormal lysosomes in lymphocytes and neutrophils during chloroquine therapy : a quantitative ultrastructural study.

Annals of the Rheumatic Diseases. 43, 710-715.

KRAMER P.A. et MATUSIK J.E. 1971. Localisation of chloroquine binding sites in <u>P.berghei.</u>

Biochemical Pharmacology. 20, 1619-1626.

KROGSTAD D.J., SCHLESINGER P.H. et GLUZMAN I.Y. 1985. Antimalarials increase vesicle pH in <u>P. falciparum</u>.

The Journal of Cell Biology. 101, 2302-2309.

KURNICK B. et RACLIFFE I. 1962. Reaction between DNA and quinacrine and other antimalarials.

Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 60, 669-674.

LADDA R.L. 1966. Morphologic observations on the effect of antimalarial agents on the erythrocytic forms of <u>P. berghei in vitro</u>. Military Medicine (Suppl) 993-1008.

LASER H., KEMP P., MILLER N., LANDER D. et KLEIN R. 1975. Malaria, quinine and red cell lysis. Parasitology. **71**, 167-181.

LOCKSHIN R.A. et BEAULATON J. 1979. Programmed cell death. Chloroquine limits resorption but does not delay its onset. An ultrastructural and biochemical study.

Biologie Cellulaire. 36, 37-42.

MACOMBER P.M.B., SPRINZ H. et TOUSIMIS A.J. 1967. Morphological effects of chloroquine on <u>P. berghei</u> in mice. Nature. 214, 937-939.

MAILLET M. 1963. Le réactif au tétraoxyde d'osmium-iodure de zinc. Zeitschrifft fur Microscopie und Anatomic Forschung. 70, 397-425.

MAXFIELD F.R. 1982. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. The Journal of Cell Biology. **95**, 676-681.

Mc NEIL P.L., TANASURGIAN L., MEIGS J.B. et TAYLOR D.L. 1983. Acidification of phagosomes is initialised before lysosomal enzyme activity is detected.

The Journal of Cell Biology. 97, 692-702.

MOORE H.P., GUMBINER B. et KELLY R.B. 1983. Chloroquine diverts ACTH from a regulated to a constitutive secretion pathway in AtT-20 cells. Nature. 302, 433-436.

MOREAU S., PERLY B. et BIGUET J. 1982. Interactions de la chloroquine avec la ferriprotoporphyrine IX. Etude par RMN. Biochimie. 64, 1015-1025.

OCKENHOUSE C.F. et SHEAR H.L. 1984. Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite <u>P. yoelii</u> by activated macrophages. Journal of Immunology. **132**, 424-431.

OKHUMA S. et POOLE B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 75, 3327-3331.

OKHUMA S. et POOLE B. 1981. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. The Journal of Cell Biology. 90, 656-664.

OKHUMA S., MORIYAMA Y. et TAKANO T. 1982. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence.

Proceeding of the National Academy of Sciences of U.S.A. 79, 2758-2762.

OLLIVIER-BOUSQUET M. 1980. Effet des agents lysosomotropes sur la stimulation par la prolactine de la sécrétion des protéines du lait. Biology of the Cell. **39**, 21-30. O.M.S. 1963. Terminology of malaria and of malaria eradication. Report of a drafting Committee, Genève.

Bulletin de l'Organisation Mondiale pour la Santé. 116.

PELLEGRINO DE IRALDI A. 1977. Significance of the Maillet method (ZIO) for cytochemical studies of subcellular structures.

Experientia. 1, 1-10.

PETERS W. 1968. The chemotherapy of rodent malaria. II, The relationship between chloroquine sensivity and the age of the host cells. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 62, 246.

PETERS W. 1974. Prevention of drug resistance in rodent malaria by the use of drug mixtures.

Bulletin de l'Organisation Mondiale pour la Santé. 51, 379-383.

PETERS W. 1982. Antimalarial drug resistance : an increasing problem Malaria, COHEN S. Editeur.

British Medical Bulletin. 38, 179-185.

PETERS W., FLETCHER K.A. et STAUBLI W. 1965. Phagotrophy and pigment formation in chloroquine resistant strain of <u>P. berghei</u> (Vincke et Lips, 1948). Annals of Tropical Medicine and Parasitology. **59**, 126-135.

POLET H. 1970. Influence of sucrose on chloroquine ³H content in mammalian cells <u>in vitro</u> : the possible role of lysosome in chloroquine resistance. Journal of Pharmacology and Experimental Therapy. **173**, 71-77.

POOLE B. et OKHUMA S. 1981. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages.

The Journal of Cell Biology. 90, 665-669.

RUDZINSKA M.A. et TRAGER W. 1959. Phagotrophy and two new structures in the malaria parasite P. berghei.

Journal of Biophysical and Biochemical Cytology. 6, 103-112.

RYTER A. et BOWERS B. 1976. Localization of acid phosphatase in <u>Acantha-</u> <u>moeba castellanii</u> with light and electron microscopy during growth and after phagocytosis.

Journal of Ultrastructure Research. 57, 309-321.

ROSARIO V.E., HALL R., WALLIKER D. et BEALE G.H. 1978. Persistence of drug-resistant malaria parasites. Lancet. i, 185-187.

SANDO G.N., TITUS-DILLON P., HALL C.W. et NEUFELD E.F. 1979. Inhibition of receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme into fibroblasts by chloroquine, procaine and ammonia.

Experimental Cell Research. 119, 359-364.

SABATINI D.E., BENSCH K. et BARNETT R.J. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.

The Journal of Cell Biology. 17, 19-58.

SCHNEIDER D.L. 1982. ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes.

Journal of Biological Chemistry. 256, 3858-3864.

SCHNEIDER D.L. 1983. ATP-dependant acidification of membrane vesicles isolated from purified rat liver lysosome.

Journal of Biological Chemistry. 258, 1833-1838.

SCORZA J.V., DE SOUZA C. et MONTEIRO M.C.C. 1972. Cytochemical observations of three acid hydrolases in blood stages of malaria parasites. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 66(2), 167-172.

SEEMAN P.M. et PALADE G.E. 1967. Acid phosphatase localization in rabbit eosinophils.

The Journal of Cell Biology. 34, 746-756.

SEGLEN P.O. et REITH A. 1974. Ammonia inhibition of protein degradation in isolated rat hepathocytes, quantitative ultrastructural alterations in the lyso-somal system.

Experimental Cell Research. 100, 276-280.

SEGLEN P.O. et GRINDE B. et SOLHEIM A.E. 1979. Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin.

European Journal of Biochemistry. 95, 215-225.

SETH R.K., SAINI A.S. et JASWAL T.S. 1985. <u>P. berghei</u> oxidant defense system.

Experimental Parasitology. 60, 414-416.

SINDEN R.E. 1978. Cell Biology. Dans Rodent Malaria, Killick-Kendrich R. et Peters W. éditeurs, London, Academic Press. 85-168.

SINDEN R.E. 1982. Gametocytogenesis of <u>P. falciparum in vitro</u> ultrastructural observations on the lethal action of chloroquine. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. **76**(1), 15-23.

SIWARAPORN W., PANIJPAN B. et YUTHAVONG Y. 1982. <u>P. berghei</u> : uptake and distribution of chloroquine in infected mouse erythrocytes. Experimental Parasitology. 54, 260-270.

SPENCER H.C. 1985. Drug-resistant malaria changing patterns mean difficult decisions.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 79, 748-758.

STOCKER R., HUNT N.K.H., BUFFINTON G.D., WEIDEMANN M.J., LEWIS-HUGHES P.H. et CLARK I.A. 1985. Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in relation to <u>P. vinckei</u> load. Proceedings of Natural Academy of Science of USA. **82**, 548-551.

STROMBERG K., PERSSON A.M. et OLSSON I. 1985. The processing and intracellular transport of myeloperoxydase. Modulation by lysosomotropic agents and monensin.

European Journal of Cell Biology. 39, 424-431.

TAUBER R., HEINZE K. et REUTTER W. 1985. Effect of chloroquine on the degradation of L-fucose and the polypeptide moiety of plasma membrane glyco-proteins.

European Journal of Cell Biology. 39, 380-385.

THEAKSTON R.D.G., ALI S.N. et MOORE G.A. 1972. Electron microscope autoradiographic studies on the effect of chloroquine on the uptake of tritiated nucleosides and methionine by <u>P. berghei.</u>

Annals of Tropical Medecine and Parasitology. 66(3), 295-302.

THURSTON J.P. 1953. The morphology of <u>P. berghei</u> before and after treatments with drugs.

Transaction of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene. 47(3), 248-256.

TRAGER W. et JENSEN J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture.

Science. 193, 173.

WARHURST D.C. et HOCKLEY D.J. 1967. Mode of action of chloroquine on <u>P. berghei</u> and <u>P. cynomolgi.</u>

Nature. 214, 935-936.

WARHURST D.C., HOMEWOOD C.A., PETERS W. et BAGGALEY V.C. 1973. Pigment changes in <u>P. berghei</u> as indicators of activity and mode of action of antimalarial drugs.

Proceedings of the helminthological Society of Washington. 39, 271-278.

WETZEL B.K., SPIECER S.S. et HORN R.G. 1967. Fine structural localization of acid and alkaline phosphatases in cells of rabbit blood and bone marrow. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 15(6), 311-334.

WIBO M. et POOLE B. 1974. Protein degradation in cultured cells. II, The uptake of chloroquine by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation and cathepsine B_1 .

The Journal of Cell Biology. 63, 430-440.

WIESMANN U.N., DI DONATO S. et HERSCHKOWITZ N.N. 1975. Effect of chloroquine on cultured fibroblasts : release of lysosomal hydrolases and inhibition of their uptake.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 66, 1338-1343.

WILKINSON R.N., NOEYPATIMANONDH S. et GOULD D.J. 1976. Infectivity of falciparum malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chlo-roquine treatment.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 70, 306-307.

WILLOX P. et RATTRAY S. 1979. Secretion and uptake of β -N-acetyl glucosaminidase by fibroblasts. Effect of chloroquine and mannose-6-phosphate. Biochemical and Biophysical Reseach Communications. 586, 442-452.

WUNDERLICH, F., STUBIG H. et KONIGK E. 1981. Chloroquine effects on parasite and host membranes of intraerythrocytic <u>P. chabaudi</u>. Tropenmedizin und Parasitologie. **32**, 77-81. YAMASHIRO D.J., FLUSS S.R. et MAXFIELD F.R. 1983. Acidification of endocytic vesicles by an ATP dependent proton pump. The Journal of Cell Biology. 97, 929-934.

YANG W.C.T., STRASSER E.F. et POMERAT C.M. 1965. Mechanism of drug induced vacuolization in tissue culture. Experimental Cell Research. 38, 495-506.

YAYON A. et GINSBURG H. 1983. Chloroquine inhibits the degradation of endocytic vesicles in human malaria parasites. Cell Biology International Reports. 7(11), 895.

YAYON A., TIMBERG R., FRIEDMAN S. et GINSBURG H. 1984. Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malaria parasite <u>P. falciparum</u>.

The Journal of Protozoology. 31(3), 367-372.

ARTICLES

ARTICLE 1

Article

¢.,

Ingestion of erythrocytic stroma by *Plasmodium chabaudi* trophozoites: ultrastructural study by serial sectioning and 3-dimensional reconstruction

C. SLOMIANNY, G. PRENSIER and P. CHARET

I.N.S.E.R.M. U. 42, Domaine du C.E.R.T.I.A., 369 rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

(Accepted 2 November 1984)

SUMMARY

An ultrastructural study of numerous serial sections of *Plasmodium chabaudi* trophozoites at various growth stages, followed by 3-dimensional reconstruction, allowed us to describe more precisely the internalization process of the erythrocytic stroma, both in space and in time. Two endocytotic processes are apparent. (1) Pinocytosis - as soon as the merozoite has become a young trophozoite (ring stage), small double membrane-bound vesicles can be seen budding off around the whole periphery of the parasite. After the inner membrane of the vesicle has disappeared, the contents alter and a pigment crystal appears. (2) Cytostomal system - this phenomenon coexists with, and eventually replaces, pinocytosis. It consists of invagination of the membrane of the parasitophorous vacuole and of the plasmalemma, through a typical cytostome, in order to form a cytostomal vacuole. This extends into a long tube, the cytostomal tube, which eventually digitates. When the tube reaches its maximal size, the cytostome disappears and the tube remains open to the erythrocytic stroma by a simple aperture. A new cytostome can form elsewhere on the parasite surface and another tube can extend. Two or three such tubes can coexist in a trophozoite although only one cytostome is functional at one time. At the end of the tubes vesicles bud off, the contents of which become modified as described previously. The residual product of haemoglobin degradation is the malarial pigment.

INTRODUCTION

Reports in the literature have suggested the existence of three endocytotic processes in the trophozoite stage of malaria parasites: a complex vacuolar system composed of large vacuoles, pinocytic vesicles and one or several cytostomes.

Fulton & Flewett (1956) were the first to show that trophozoites engulf large parts of the erythrocytic stroma into food-vacuoles. Rudzinska & Trager (1957, 1959) called this type of endocytosis phagotrophy. A number of authors have confirmed these observations based only on the study of single sections of these food-vacuoles (Fletcher & Maegraith (1962) in *P. knowlesi*; Scalzi & Bahr, (1968) and Killby & Silverman (1969) in *P. chabaudi*).

A second mechanism of endocytosis of the stroma was described by Aikawa, Hepler, Huff & Sprinz (1966*a*), and Rudzinska & Trager (1968): a ring structure resulting from parasite plasmalemma differentiation is involved in the invagination of the limiting membranes (parasite plasmalemma and parasitophorous vacuole membrane). This micropore or cytostome has been described in a number of Plasmodium or other Sporozoa (Vivier, Schrevel & Hennéré, 1964; Howells, Peters & Thomas, 1968; Sinden & Garnham, 1973; Langreth, 1976; Sinden, 1978).

Lastly, there exists another endocytotic mechanism revealed for the first time by Rudzinska & Trager (1957) in *P. lophurae*. These authors showed that small vesicles are pinched off from the food-vacuole. This pinocytotic process might also exist in

C. SLOMIANNY, G. PRENSIER AND P. CHARET

P. coatneyi (Rudzinska & Trager, 1968), in P. knowlesi, P. gallinaceum and P. cynomolgi, notably around the vacuole derived from the cytostome (Aikawa et al. 1966a,b,), in P. simium (Seed, Sterling, Aikawa & Rabbege, 1976) and in P. falciparum (Trager, Rudzinska & Bradbury, 1966). These pinched off vesicles may also coexist with the cytostome (Aikawa et al. 1966a,b; Aikawa & Sterling, 1974; Seed et al. 1976).

These observations, however, were all made on isolated sections and the spatial organization of different organelles was therefore not demonstrated completely. Moreover, the early observations concerning the trophozoite stage did not take its age into account. Considering these rather disparate and sometimes contradictory results we decided to perform a more precise study by serial sectioning and 3-dimensional reconstruction of the different developmental stages of the *P. chabaudi* trophic phase. *P. chabaudi*, a natural parasite of *Thamnomys rutilans* (Peters) was chosen, since its normal cycle in the laboratory mouse is rather synchronous.

MATERIALS AND METHODS

Biological models

The *P. chabaudi* strain was obtained from Dr Walliker's laboratory (Edinburgh). It was maintained in mice by mechanical passage. Every 6th or 7th day, when the parasitaemia had reached 60%, 3 drops of blood were taken from the mouse's tail, mixed with 1.5 ml of Eagle's minimal essential medium and inoculated intraperitoneally into a new mouse (0.5 ml/mouse).

Experimental

At 8, 12 and 20 h, tail blood was distributed into several tubes containing fixative solution (2.5%) glutaraldehydein0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2). Fixation was performed for 1.5 h at room temperature. The samples were then centrifuged at 1700 g for 5 min and washed by resuspension in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, containing 0.15 M sucrose. Samples were then post-fixed in 1% osmium tetroxide in washing medium for 1.5 h at 4 °C. After dehydration in graded alcohols, the pellets were embedded in Epon Epikote and sectioned with an MT 1 Porter-Blum ultramicrotome. Sections were collected either on one hole grids or longitudinal barred grids. We attempted to collect at least 60–100 sections on each grid in order to obtain a complete series for some parasites. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with Hitachi HS 7S or HU 11 E transmission electron microscopes.

For 3-dimensional reconstruction, limits of interesting structures of the parasite (limiting membranes, vacuolar system, organelles, pigment vesicles) were drawn on glass slides and then superimposed. Three-dimensional reconstructions were photographed with a 7° tilt angle so as to obtain stereopairs.

C. Freeze-fracture of a young trophozoite. The arrow shows a budding pinocytotic vesicle. Well-formed crystals are clearly seen.

Fig. 1. Pinocytosis.

A. Young trophozoite. Note its typical shape and the presence of double-membraned vesicles (arrows). n, Nucleus.

B. Trophozoite. The arrow shows well-formed pigment vesicles (single membraned). The first 'vacuole' is still present and remains open to the erythrocytic stroma. n, Nucleus.
Digestive process in P. chabaudi



BU



RESULTS

Examination of numerous series of trophozoite sections at various stages of growth enabled us to describe, more precisely, the internalization of the vacuolar system of erythrocyte stroma, both in space and in time.

Different endocytotic phenomena are involved according to the growth stage. Generally, 2 processes take place – pinocytosis and endocytosis caused by formation of large tubes which we referred to as cytostomal tubes. Very shortly after entering the host cell, the parasite takes the shape of a cup (Fig. 1A) whose rims get nearer so as to form what appears as a large subspherical vacuole, which remains open to the erythrocytic stroma (Fig. 1B). During transformation of the merozoite into a trophozoite, pinocytosis commences. At the periphery of the first vacuole, as well as on the periphery of the parasite, 60–100 nm diameter double membrane-bound vesicles, containing electron-dense erythrocyte stroma, are formed (Fig. 1A). Vesicles in the process of formation can rarely be seen in a satisfactory way since they are likely to form very rapidly and are generally included in the thickness of the section. On the contrary, pictures obtained by freeze-fracture techniques make it possible to visualize this process better (Fig. 1C).

The contents of older pinocytotic vesicles are more clearly visible since they are bound only by a unit membrane (Fig. 2B). Their final developmental stage corresponds to single-membraned vesicles containing a crystalline structure, the malarial pigment (Fig. 2B,C).

Thus the first endocytotic mechanism seen in a young trophozoite is pinocytosis, as shown by the 3-dimensional reconstruction (Fig. 3 A). This mechanism is completed very rapidly and then almost replaced by a more complex process involving the formation of 'cytostomal tubes'. The cytostomal tube is formed from a typical cytostome which is 80 nm across (50 nm inner diameter, 120 nm outer diameter). Through the ring, the 2 membranes invaginate to form a subspherical vesicle and then a single rather short tube, the cytostomal tube (Fig. 2 A, B). In older trophozoites, reconstruction of several series showed very significant extension of the cytostomal tube, often branching out (Fig. 4 A) and, in most trophozoites studied, there existed 2 or 3 tubes at different degrees of extension (Fig. 4 B).

As regards the cytostome, although it was always present on cytostomal vacuoles at the beginning of formation, it seemed to disappear when invagination reached its maximum extension, opening via a wide aperture into the erythrocyte stroma (Fig. 2C, D).

Fig. 4A, B represents stereoscopic views of the digestive system and malarial pigment and indicates that the whole cytostomal system constitutes a significant volume of the

Fig. 2. Cytostomal system.

A. Cytostomal tube invaginating through a typical cytostome (arrow). n, Nucleus.

B. Transverse section of a cytostome.

C. Old trophozoite. After the vacuole has extended into a long digitated tube, the cytostome disappears (arrow). A budding vesicle shows the two limiting membranes joining together opposite a cisterna of the reticulum (arrow head). Note the presence of a digestive vesicle whose contents are being degraded (star). m, Mitochondrion; n, nucleus.

D. Old trophozoite. The numerous 'vacuoles' are, in fact, the sections of two digitated eytostomal tubes; the aperture of one is indicated (arrow).

E. At the end of the tube vesicles bud off whose two limiting membranes become tightly adherent.

C. SLOMIANNY, G. PRENSIER AND P. CHARET



- 8

Fig. 3. Stereoscopic views.

A. Stereopair of a young trophozoite. The arrows show pinocytotic vesicles. The first 'vacuole' is still present.

B. Stereopair of a trophozoite. The thin arrow shows the cytostome from which has extended the cytostomal tube. The thick arrow indicates a pigment vesicle containing numerous pigment crystals budded off from the tube.

parasite cytoplasm. In Fig. 4B, the arrows show the cytostomal tube opening into the erythrocyte stroma, whereas, in Fig. 4A, the arrows show the opening through the existing cytostome. At the end of the tubes, vesicles measuring about 350 nm in diameter became visible and were seen to be pinched off progressively (Fig. 2E). Before the vesicle is formed, the 2 limiting membranes join together when they are opposite a cisterna of the endoplasmic reticulum or nuclear envelope (Fig. 2C, E). In the vesicles thus formed, haemoglobin degradation occurs at the same time as malarial pigment is forming (residue of this degradation).

In developed stages (Figs 3 B and 4 B), 3-dimensional reconstruction makes it possible to see the arrangement of large pigment vesicles which are, in fact, much larger than those in isolated sections. Dense piles of pigment grains are gathered near the cytostomal tubes.

DISCUSSION

Plasmodium parasites are known to ingest and subsequently digest haemoglobin. These deductions are based on the fact that the cytoplasm of the parasite contains both the so-called 'food vacuoles' containing haemoglobin, and vesicles containing a residual compound, namely haemozoin or malarial pigment which has been demonstrated to contain haematin (Deegan & Maegraith, 1956a, b; Sherman & Hull, 1960). Hypotheses about how the parasite feeds have been based mainly on morphological observations and are therefore unable to propose the biochemical processes involved in feeding.

Digestive process in P. chabaudi



Fig. 4. Stereoscopic views.

A. Stereopair of a trophozoite. The arrow points out the cytostome of a highly digitated tube. B. Stereopair of an old trophozoite. The cytostomes (arrows) have disappeared. The two tubes remain open directly to the stroma.

Our purpose here is not to discuss the nutrition of the parasite, but only to clarify the morphological aspects of the ingestion of erythrocytic stroma during trophozoite growth. In order to study the biochemical mechanisms involved in haemoglobin degradation, enzyme cytochemistry has been performed on *P. chabaudi* (Slomianny, Charet & Prensier, 1983). Among the several theories which have been proposed to explain the internalization of erythrocyte stroma, envacuolization of host cell cytoplasm (phagotrophy) (Rudzinska & Trager, 1957, 1959) and ingestion of host cytoplasm through the cytostome (Aikawa *et al.* 1966*a, b*) have been considered as distinct feeding processes. These authors described the vacuoles in the parasites as 'food vacuoles'.

Our observations from 3-dimensional reconstruction of various growth stages of P.chabaudi trophozoites help clarify two points. First, the so-called 'food vacuoles' found previously in isolated sections of parasites are always in direct connexion with the erythrocytic stroma and are not true vacuoles. This had been suggested by Aikawa (1971) but not clearly demonstrated, leading him to distinguish 'false and true food vacuoles'. The degradation of haemoglobin, at least in P.chabaudi, occurs in secondary vacuoles pinched off from the end of the cytostomal tubes, as shown by the piles of pigment crystals gathered near the cytostomal tubes. Like Cox & Vickerman (1966), we propose that the large vacuole observed in young trophozoites merely increases the surface area of the parasite and consequently the exchanges between the parasite and its host cell. The second point to be discussed is the role of the cytostome. It has previously been suggested that this structure can play a role in the formation of 'food'

vacuoles', although different mechanisms for this have been described. The mechanism of stroma ingestion through this ring seems to differ among species. In most species, host cytoplasm appears to be pinched off from the wall of the enlarged cytostomal cavity (Aikawa & Seed, 1980). Conversely, in *P. elongatum* stroma together with the cytostomal wall is apparently pinched off at the cytostomal orifice (Aikawa, Huff & Sprinz, 1967).

We have demonstrated that, barring the first vacuole formed by the transformation of the merozoite into a young trophozoite (ring stage), the other cytostomal tubes all originated from a cytostome which was a transient structure which disappeared when the cytostomal tube extended. We think that more than one functional cytostome can exist in mammalian malarial parasites, as observed by Theakston, Fletcher & Maegraith (1968) and, for us, these structures appear *de novo* as proposed by Ladda (1969).

Another point to be discussed concerns the pinocytotic mechanism. Cox & Vickerman (1966), Scalzi & Bahr (1968) and Rudzinska, Trager & Bray (1965), described small invaginations of host cell stroma into the parasite cytoplasm and considered them to be pinocytotic vesicles. Theakston *et al.* (1968) also observed single-membraned vesicles and they suggested that these secondary vesicles bud off from the 'food vacuole' upon which a pinocytotic process may take place, a phenomenon also noticed by Howells *et al.* (1968).

We also observed such a phenomenon and are able further to define the pinocytotic mechanism. First, it is found mainly in young trophozoites in which we observed double-membraned vesicles pinching off from the plasma membrane and also single-membraned vesicles containing malarial pigment. We suppose that the inner membrane disappears by an unknown mechanism and that the pinocytotic vesicles become digestive ones (Slomianny *et al.* 1983).

Vesicles in which the inner membrane was being digested were never observed in this study, perhaps because this stage is very short and therefore less easy to observe. For the vacuoles formed by the cytostomal system, which occur in later trophozoites, it was noticed that the 2 limiting membranes of the budding vesicles collapsed so that only 1 unit membrane could then be seen surrounding the malarial pigments. Nevertheless, a single membrane seems to be a prerequisite for haemoglobin degradation.

One point which has still not been explained is the association of the budding vesicles with endoplasmic reticulum cisternae. Wunderlich, Stubig & Konigk (1980a, b) noticed that compaction domains could be seen between the nuclear envelope and the plasma membrane. In our case, this could be a prerequisite for proteolytic enzyme penetration and activation.

In conclusion, serial sectioning and 3-dimensional reconstruction is a useful technique to describe the evolution and complexity of the uptake of erythrocytic stroma by *Plasmodium*, and our impression is that the differences between avian and mammalian malarial parasites may not be as important as previously believed (Aikawa *et al.* 1966*b*; Aikawa & Seed, 1980).

This research was supported by the Malarial Component of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. The authors wish to thank Professor W. Peters and Dr D. C. Warhurst for their helpful comments in the preparation of the work, Miss M. Brugge and Dr V. Hopwood for correcting the English and Mrs Masurelle for typing the manuscript.

REFERENCES

AIKAWA, M. (1971). Plasmodium: the fine structure of malarial parasites. Experimental Parasitology **30**, 284-320.

AIKAWA, M., HEPLER, P., HUFF, C. G. & SPRINZ, H. (1966a). The feeding mechanism of avian malarial parasites. Journal of Cell Biology 28, 355-73.

AIKAWA, M., HUFF, C. G. & SPRINZ, H. (1966b). Comparative feeding mechanism of avian and primate malarial parasites. *Military Medicine* 131, 969-83.

AIKAWA, M., HUFF, C. G. & SPRINZ, H. (1967). Fine structure of the asexual stages of P. elongatum. Journal of Cell Biology 34, 229-49.

AIKAWA, M. & SEED, T. M. (1980). Morphology of *Plasmodia*. In *Malaria* (ed. P. Kreier) pp. 285-344. New York: Academic Press.

AIKAWA, M. & STERLING, C. R. (1974). Intracellular Parasitic Protozoa. New York and London: Academic Press.

Cox, F. E. G. & VICKERMAN, K. (1966). Pinocytosis in P. vinckei. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 60, 293-6.

- DEEGAN, T. & MAEGRAITH, B. G. (1956a). Studies of the nature of malarial pigment (haemozoin). I. The pigment of the simian species *P. knowlesi* and *P. cynomolgi*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology **50**, 194-211.
- DEEGAN, T. & MAEGRAITH, B. G. (1956b). Studies of the nature of malarial pigment (haemozoin). II. The pigment of the human species *P. falciparum* and *P. malariae*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 50, 212-22.

FLETCHER, K. A. & MAEGRAITH, B. G. (1962). Intracellular phagotrophy by P. knowlesi. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 56, 492-5.

FULTON, J. D. & FLEWETT, T. H. (1956). The relation of *P. berghei* and *P. knowlesi* to their respective red cell hosts. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 50, 150-8.

HOWELLS, K. E., PETERS, W. & THOMAS, E. A. (1968). Host parasite relationships. Part. 4: The relationship between haemozoin formation and host cell age in chloroquine and primaquine resistant strains of *P. berghei*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology **62**, 271-6.

KILLBY, V. A. A. & SILVERMAN, P. H. (1969). Fine structural observations of the erythrocytic stages of *P. chabaudi* (Landau, 1965). Journal of Protozoology 16, 354-70.

LADDA, R. L. (1969). New insights into the fine structure of rodent malarial parasites. Military Medicine 134, 825-65.

LANGRETH, S. G. (1976). Feeding mechanism in extracellular Babesia microti and P. lophurae. Journal of Protozoology 23, 215-33.

RUDZINSKA, M. A. & TRAGER, W. (1957). Intracellular phagotrophy by malarial parasites: an electron microscopy study of *P. lophurae. Journal of Protozoology* 4, 190-9.

RUDZINSKA, M. A. & TRAGER, W. (1959). Phagotrophy and two new structures in the malaria parasite P. berghei. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 6, 103-12.

RUDZINSKA, M. A. & TRAGER, W. (1968). The fine structure of trophozoites and gametocytes in *P. coatneyi. Journal of Protozoology* 15, 73-88.

RUDZINSKA, M. A., TRAGER, W. & BRAY, P. (1965). Pinocytic uptake and the digestion of haemoglobin in malaria parasites. *Journal of Protozoology* 12, 563-76.

SCALZI, H. A. & BAHR, G. F. (1968). An electron microscopic examination of erythrocytic stages of two rodent malarial parasites. P. chabaudi and P. vinckei. Journal of Ultrastructural Research 24, 116-33.

SEED, M., STERLING, C. R., AIKAWA, M. & RABBEGE, J. (1976). P. simium: ultrastructure of erythrocytic phase. Experimental Parasitology 39, 262-76.

SHERMAN, I. W. & HULL, R. W. (1960). The pigment (haemozoin) and proteins of the avian malaria parasite *P. lophurae. Journal of Protozoology* 7, 409-16.

SINDEN, R. E. (1978). Cell Biology. In *Rodent Malaria* (ed. R. Killick-Kendrick and W. Peters), pp. 85-168. London: Academic Press.

SINDEN, R. E. & GARNHAM P. C. C. (1973). A comparative study on the ultrastructure of *Plasmodium* sporozoites within the oocyst and salivary glands, with particular reference to the incidence of the micropore. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 631-7.

SLOMIANNY, C., CHARET, P. & PRENSIER, G. (1983). Ultrastructural localization of enzymes involved in the feeding process in *P. chabaudi* and *Babesia hylomysci. Journal of Protozoology* **30**, 376–82.

THEAKSTON, R. D. G., FLETCHER, K. A. & MAEGRAITH, B. G. (1968). The fine structure of *P. vinckei*, malaria parasite of rodents. Annals of Tropical Medicine and Parasitology **62**, 122-34.

C. SLOMIANNY, G. PRENSIER AND P. CHARET

TRAGER, W., RUDZINSKA, M. A. & BRADBURY, P. (1966). The fine structure of *P. falciparum* and its host erythrocytes in malarial infection in man. Bulletin of the World Health Organization 35, 883-5.

VIVIER, É., SCHREVEL, J. & HENNÉRÉ, E. (1964). L'ultrastructure de la paroi de quelques Sporozoaires, ses rapports avec certains organites cytoplasmiques, son rôle possible dans la nutrition. Proceedings of the 1st International Congress of Parasitology, Rome 1, 290-1.

WUNDERLICH, F., STUBIG, H. & KONIGK, E. (1980a). Nuclear envelope – plasma membrane compaction domain in malaria parasites. Cellular Biology International Reports 4, 519–24.

WUNDERLICH, F., STUBIG, H. & KONIGK, E. (1980b). Development of *P. chabaudi* in mouse red blood cells: structural properties of the host and parasite membrane. Journal of Protozoology 29, 60-6.

ARTICLE 2

The Journal of Protozoology

Volume 32

February 1985

Number 1

J. Protozool., 32(1), 1985, pp. 1-5 © 1985 by the Society of Protozoologists

Etude ultrastructurale comparée du processus de dégradation de l'hémoglobine par *P. berghei* (Vincke et Lips, 1948) en fonction de l'état de maturité de la cellule hôte¹

C. SLOMIANNY, G. PRENSIER, et P. CHARET

INSERM U.42 Domaine du Certia 369, rue Jules Guesde 59650 Villeneuve d'Ascq, France

ABSTRACT. By serial sectioning and 3D reconstruction we have been able to demonstrate that the type of system for hemoglobin digestion in two strains of *Plasmodium berghei*, N and RC, is dependent on the maturity of the host cell. In parasites growing in erythrocytes, both systems for the endocytosis of hemoglobin—micropinocytosis and the cytostomal system (i.e. a cytostome budding a cytostomal tube that releases food vacuoles)—are fully functional and produce a great quantity of residual pigment. Parasites growing in reticulocytes have a disrupted cytostomal system; no tube is formed and only food vacuoles are visible in their cytoplasm. Residual pigment is smaller in size and in quantity. The reduced quantity of pigment in reticulocytes is explained by our observation of the exocytosis of pigment. We propose a hypothesis that relates the process of degradation of hemoglobin to the maturity of the host cell and a possible mechanism of protection against chloroquine, a drug known for its affinity for malarial pigment.

RESUME. Il existe deux souches diffèrentes de *Plasmodium berghei*: une souche originelle N et une souche dérivée de la première, RC, résistante à la chloroquine. Cette deuxième souche est connue pour sa prédilection pour les hématies immatures ou réticulocytes et pour sa moindre pigmentation. Grâce à l'étude comparative ultrastructurale de ces deux souches ainsi que de la souche N que nous avons fait passer dans des souris anémiées présentant donc un fort taux de réticulocytémie, nous avons pu montrer que le système digestif, conduisant à la dégradation de l'hémoglobine, est fortement dépendant de l'état de maturité de la cellule parasitée. Cette étude a été entreprise à l'aide de la technique des coupes sériées suivie d'une reconstitution tridimensionnelle, technique capable de rendre compte de l'organisation spatiale du parasite. Les deux systèmes d'endocytose de l'hémoglobine, à savoir, la pinocytose et le système cytostomal (formation d'un tube digité à partir du cytostome) sont présents dans tous les cas mais sont plus ou moins perturbés. Chez les parasites évoluant dans les normocytes (N), les deux systèmes sont complets et fonctionnent normalement avec production massive de pigment résiduel. Les parasites évoluant dans les réticulocytes (RC et NR) présentent une pinocytose normale mais un système cytostomal fortement bouleversé, sans formation de tube mais uniquement de vacuoles cytostomales; le pigment résiduel est alors en moindre quantité. Ces études ont montré un faible taux de pigment résiduel chez RC et NR. Ceci a été élucidé par l'observation d'un phénomène d'exocytose de pigment dans le cytoplasme de l'hôte. Cette observation nous a permis d'émettre une hypothèse mettant en relation le processus de dégradation de l'hémoglobine avec la maturité de la cellule hôte et un mécanisme possible d'échappement à la chloroquine sachant que cet antimalarique est connu pour son affinité pour le pigment malarique.

L E mécanisme de dégradation de l'hémoglobine par des *Plasmodium* de rongeurs a fait l'objet de nombreux travaux, tant par l'étude de la morphologie du système digestif (1, 2, 8, 12, 16, 17, 19) que par l'étude des enzymes protéolytiques capables d'intervenir dans cette dégradation (3, 4, 6, 10, 11, 18).

La plupart des études ultrastructurales, effectuées sur des coupes isolées, avaient apporté des informations fractionnaires. Par contre, la technique des coupes sériées suivie d'une reconstitution tridimensionnelle des hématies parasitées par *P. chabaudi*, nous a permis d'observer l'organisation des différents systèmes d'endocytose du stroma érythrocytaire (18).

Ainsi, nous avons pu montrer que l'ingestion du stroma s'effectue de deux manières dont l'importance est fonction du stade de croissance du parasite. Chez les jeunes trophozoïtes, cette ingestion se fait essentiellement par un phénomène de pinocytose, dont la fonction digestive a été mise en évidence par la révélation d'activités enzymatiques. Au fur et à mesure de la croissance se développe un second système d'endocytose qui tend à supplanter complètement le premier. A partir d'un cytostome typique se forme une vacuole qui s'allonge en un tube digité dit tube cytostomal à l'extrémité duquel se détachent des grosses vésicules digestives dans lesquelles se fera la dégradation proprement dite de l'hémoglobine.

Dans le but de vérifier si ces phénomènes sont communs à d'autres *Plasmodium* de rongeurs, nous avons entrepris la même étude sur *P. berghei*. D'autre part, comme dès 1968 Howells et al. (9) ont signalé que la digestion de l'hémoglobine se faisait de façon différente lorsque le parasite évolue dans les réticulocytes (hématies immatures), nous avons complété notre travail en étudiant le système digestif des parasites évoluant dans des réticulocytes.

Enfin, comme l'une des principales caractéristiques d'une souche de *P. berghei* résistant à la chloroquine, obtenue pour la première fois par Peters (12, 14), est de se développer exclusivement dans des hématies immatures (7, 9, 15), nous avons utilisé cette même souche comme second modèle expérimental.

MATERIELS ET METHODES

Souches. Les deux souches de P. berghei (N et RC) nous ont été gracieusement fournies par le Pr. W. Peters (de l'Ecole de Médecine Tropicale de Londres).

Les parasites sont inoculés à des souris Swiss âgées de 6 à 8

¹ Cette recherche a été supportée en partie par le Malarial Component of the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.

semaines indemnes d'*Eperythrozoon*. Les souches sont passées par injection intrapéritonéale de 10⁸ parasites tous les 5 à 6 jours pour *P. berghei* N, tous les 15 jours pour *P. berghei* RC. Quand la parasitémie atteint le taux de 60%, le sang est prélevé à la queue de la souris et mélangé directement dans le fixateur à raison de 500 μ l de sang pour 5 ml de fixateur (glutaraldéhyde à 2.5% [v/v] dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M, pH 7.2). La fixation se poursuit pendant 1.5 h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite lavés, après centrifugation à 1700 g pendant 5 min, dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M, pH 7.2 additionné de sucrose 0.15 M. La postfixation se fait dans du tétroxide d'osmium à 1% (w/v) dans le tampon de lavage. Après 1.5 h de postfixation, les culots sont déshydratés dans des alcools croissants puis inclus dans de l'Epon.

Les coupes sériées sont faites sur un ultramicrotome Porter-Blum MT-1 et recueillies sur des grilles à barreaux longitudinaux recouvertes de Parlodion (au moins 70 à 80 coupes par grille). Après double coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, les grilles sont observées sur les microscopes électroniques Hitachi HS 7 ou Jeol 100 CX.

Les micrographies sont agrandies au rapport correct en tenant compte de l'épaisseur de la coupe. Les contours cellulaires et les structures cellulaires intéressantes sont dessinés par transparence sur des plaques de verre. Ces différentes plaques sont ensuite superposées et alignées optiquement en respectant les axes des abcisses et des ordonnées dans l'espace (en trois dimensions). Les reconstitutions ainsi obtenues rendent partaitement compte de l'organisation spatiale des parasites. Les paires stéréoscopiques sont obtenues en prenant deux vues dont l'angle entre les axes est de 7°.

Anémie. Des souris sont anémiées par des saignées quotidiennes en ponctions rétroorbitales de 0.5 ml par prélèvement pendant trois jours. Le 3ème jour de l'expérience le taux moyen de réticulocytémie est de 30 à 40%. Les souris sont alors infestées de la façon habituelle. Quand la parasitémie atteint le taux requis (en 6-7 jours), le sang est prélevé et traité de la manière décrite précédemment.

RESULTATS

Les observations effectués sur de nombreuses coupes sériées de *P. berghei* normal évoluant dans les hématies matures (*P. berghei* N), de *P. berghei* N évoluant dans des réticulocytes (*P. berghei* NR) et de *P. berghei* résistant à la chloroquine (*P. berghei* RC), se résument de la manière suivante:

P. berghei N. Les trophozoïtes ont une morphologie com-

parable à celle de *P. chabaudi.* En effet, les stades très jeunes montrant la présence d'un grand nombre de vésicules de pinocytose, alors que le système cytostomal est encore inexistant (Fig. 1). Ces vésicules, situées à la périphérie du parasite, sont limitées par deux membranes et ont un contenu d'aspect analogue au stroma érythrocytaire. Sur des coupes de trophozoïtes un peu plus âgés, ces vésicules ne présentent plus qu'une seule membrane limitante et contiennent alors des cristaux de pigment (Fig. 2).

Chez les stades cellulaires plus avancés, nous constatons l'apparition du système cytostomal caractérisé par un cytostome typique avec lequel est adjascent soit une vacuole cytostomale, soit un tube cytostomal dont le degré de ramification est fonction du stade de croissance (Figs. 3, 4). Remarquons, au passage, que la texture du stroma érythrocytaire est différente du contenu du tube cytostomal.

Enfin, les trophozoïtes âgés montrent de tels tubes dépourvus de cytostome tandis qu'ailleurs sur la périphérie parasitaire, se forme un nouveau système cytostomal. Deux à trois tels systèmes peuvent coexister dans une même cellule. Cependant seul un cytostome à la fois est observé par cellule (Fig. A).

P. berghei NR. Le passage de P. berghei N dans les réticulocytes se fait assez aisèment. La parasitémie évolue d'autant plus rapidement que la réticulocytémie est importante.

La morphologie du parasite est modifiée par ce changement d'hôte. En effet, si la pinocytose est toujours présente chez les stades jeunes, les vésicules formées sont légèrement plus petites (Fig. 9) et les vésicules pigmentaires restent peu nombreuses. De plus, certaines coupes des parasites révélent la présence de vésicules pigmentaires dans le cytoplasme même du réticulocyte. Par contre, le système cytostomal voit son importance considérablement réduite: le cytostome est normalement présent mais le tube cytostomal est soit absent soit limité à une simple vacuole (Figs. 9, 10). Apparemment, il n'existe qu'un seul système cytostomal par cellule (Fig. B).

P. berghei RC. Le parasite se développe préférentiellement dans les réticulocytes et sa morphologie rappelle celle de la souche NR (Fig. 5).

Chez les stades jeunes, les vésicules de pinocytose sont encore plus petites ainsi que les grains de pigment qu'elles contiennent (Figs. 6-8). De même que chez *P. berghei* NR, il existe un phénomène d'exocytose des vésicules pigmentaires dans le cytoplasme du réticulocyte, phénomène observé sur chaque série de coupes (Fig. 11).

Le système cytostomal est perturbé par rapport à ce que nous

Figs. 1-4. Plasmodium berghei normal (évoluant dans des hématies matures). 1. Jeune trophozoïte montrant la "vacuole primitive" (VP) résultant du reploiement sur lui même du parasite en forme de coupe. Noter la formation d'une vésicule pigmentaire (flèche). M = mitochondrie. \times 54,000. 2. Jeune trophozoïte montrant une pinocytose intense (pointes de flèche). La membrane interne des vésicules disparait tandis qu'apparaissent des cristaux de pigment (flèche). \times 72,000. 3. Début de formation du système cytostomal avec apparition du cytostome (flèche courbe) en coupe tangentielle. Noter la présence de nombreuses vésicules pigmentaires (flèche). \times 55,000. 4. Les "vacuoles" contenant du stroma éry-throcytaire sont en fait des sections d'un seul et même tube cytostomal extrêmement digité dont le contenu commence à être dégradé. Il semble y avoir une concentration de l'hémoglobine (qui apparait plus dense) puis formation de cristaux (flèches). La vacuole primitive (VP) persiste très longtemps mais diminue de volume. \times 60,000.

Figs. 5-7. Plasmodium berghei résistant à la chloroquine (évoluant dans les réticulocytes). Noter la présence de ribosomes dans le cytoplasme des réticulocytes.
5. Pinocytose active. Des vésicules à deux membranes bourgeonnent à la périphérie du trophozoite (pointes de flèche). × 56,000.
6. Formation du système cytostomal. Invagination d'une vacuole cytostomale à travers un cytostome typique (flèche courbe). × 50,000.
7. Disparition du cytostome. Le système cytostomal se réduit à des vacuoles ouvertes sur le cytoplasme du réticulocyte (flèche courbe). Les vésicules de pinocytoses peuvent continuer à se former à partir d'une vacuole cytostomale (pointe de flèche). N = noyau. × 35,000.

Figs. 8-9. Plasmodium berghei normal (évoluant dans des réticulocytes). 8. Les vésicules pigmentaires sont semblables à celle de P. berghei RC (flèche). × 33,000. 9. Détail du système cytostomal qui se réduit souvent à un cytostome d'où ne se forme qu'une petite vésicule (flèche courbe). × 40,000.

Fig. 10. Phénomène d'exocytose du pigment résiduel par *P. berghei* RC (fièche). Le processus est identique chez *P. berghei* NR. Noter également la présence d'organites typiques des réticulocytes (mitochondrie, réticulum) (pointes de flèches). × 58,000.

.





Figs. A-C. Vues stéréoscopiques des différentes souches de *P. berghei*. A. Trophozoite de *P. berghei* N. Noter l'importance du phénomène de pinocytose (vésicules blanches indiquées par des grosses flèches). La flèche fine indique l'ouverture de la "vacuole primitive." B. Trophozoite de *P. berghei* N évoluant dans un réticulocyte. La flèche courbe montre un système cytostomal "avorté" représenté par un cytostome seul. La flèche fine indique l'ouverture de la "vacuole primitive." Noter également l'aspect et le nombre des vésicules pigmentaires. C. Trophozoite de *P. berghei* RC. Les vacuoles cytostomales (flèches courbes) sont nombreuses. Seule la flèche pleine indique un cytostome fonctionnel. Il n'y a pas de tubes cytostomaux. La pigmentation a un aspect identique à celle de *P. berghei* NR.

observons chez *P. berghei* N ou *P. chabaudi*. En effet, le tube cytostomal est représenté par de nombreuses vacuoles cytostomales (quatre à cinq par trophozoïte). Ces vacuoles sont d'âges différents. Eiles sont toutes ouvertes sur le stroma érythrocytaire mais seule la dernière formée possède un cytostome fonctionnel, comme le montre la reconstitution tridimensionnelle (Fig. C).

Les trois reconstitutions tri-D permettent également l'observation suivante: la vacuole primitive, c'est-à-dire la vacuole observée chez le stade "anneau" semble persister très longtemps. En effet, elle se retrouve, bien que de taille réduite, chez les trophozoïtes âgés.

DISCUSSION

Le premier fait que nous devons souligner est la stricte analogie existant entre le système digestif de *P. berghei* N, donc se développant dans les normocytes, et *P. chabaudi*. En effet, l'observation des structures d'internalisation du stroma érythrocytaire par les différents stades de croissance permet de fixer la chronologie des évènements. En résumé, chez *P. berghei* comme chez *P. chabaudi*, l'endocytose du stroma érythrocytaire débute par une pinocytose (chez les stades jeunes, ce système est seul présent), qui est progressivement relayée par le système que nous avons appelée système cytostomal. Comme pour *P. chabaudi*, la méthode des coupes sériées que nous avons adoptée est la seule qui nous permet d'éviter toute confusion sur la structure du système digestif et ainsi de visualiser l'organisation spatiale de ce dernier.

Lorsque la souche P. berghei N évolue dans les réticulocytes ou lorsque l'on observe P. berghei RC (également dans les réticulocytes) les systèmes d'ingestion du cytoplasme se modifient de façon considérable. En effet, si ceux-ci se différencient peu entre eux, ils présentent vis à vis de P. berghei N ou P. chabaudi (qui, eux, évoluent dans des normocytes), deux différences essentielles: une pinocytose qui se caractérise par une diminution en nombre et en taille des vésicules pigmentaires et une absence du système cytostomai proprement dite, à savoir la réduction du tube. En effet, bien que nous puissions observer des cytostomes, les tubes cytostomaux ne se développent pas en aboutissant à la formation des vésicules digestives terminales et semblent être bloqués dans leur évolution, ce qui suggère une perte de fonctionnalité de ces systèmes. La dégradation de l'hémoglobine par des parasites NR et RC se ferait alors exclusivement par l'intermédiaire du système de pinocytose.

Ceci est en accord avec les observations effectuées par Peters (13, 15) à propos de la souche RC et par Howells (9) à propos de *P. berghei* évoluant dans les réticulocytes qui indiquaient que les parasites ne présentaient que des grains de pigment de petite taille.

Ces résultats nous conduisent à émettre l'hypothèse qu'il existe une relation entre le mécanisme de dégradation de l'hémoglobine et l'état de maturité de l'hématie hôte. En effet, entre *P. berghei* RC et *P. berghei* NR évoluant tous deux dans les réticulocytes, les différences restent très minimes: d'un point de vue morphologique. la seule différence réside dans le niveau d'altération du système cytostomal (le développement de ce dernier étant encore plus réduit chez NR).

Ces analogies sont à mettre en relation avec les résultats que nous avons obtenus (20) par l'étude biochimique de la dégradation de l'hémoglobine. En effet, il nous a été possible de démontrer que P. berghei NR et P. berghei RC dégradaient l'hémoglobine de la cellule hôte de façon plus importante que P. berghei N évoluant dans les normocytes. Nous avons pu montrer par dosage que le taux d'hématine intraparasitaire de NR et RC était moins important que chez P. berghei évoluant dans les hématies matures. Cette apparente contradiction (dégradation augmentée et pigmentation moindre) n'a pu être élucidée que par l'emploi de la technique des coupes sériées. En effet, il nous a été possible d'observer l'exocytose de pigment dans le cytoplasme du réticulocyte. Comme le réticulocyte est lui-même le siège d'une activité exocytaire très importante (expulsion du noyau et de nombreux constituants cellulaires), celui-ci doit vraisemblablement rejeter par ce mécanisme les vésicules pigmentaires provenant du parasite.

Une section isolée du parasite a peu de chances de montrer une vésicule pigmentaire en cours d'exocytose étant donné que cette dernière est d'une taille voisine de l'épaisseur d'une coupe. Seule la technique des coupes sériées permet d'augmenter les chances de visualiser ce phénomène. Nous avons pu ainsi observer ce mécanisme dans toutes les séries de coupes que nous avons effectuées.

Le phénomène d'exocytose peut expliquer la moindre sensibilité à la chloroquine. En effet, l'élimination de l'hématine (pigment) au fur et à mesure de sa formation peut être un moyen pour le parasite d'échapper à la pression de cet antimalarique si, comme le suggèrent Chou et al. (5), l'hématine est responsable de la concentration de la drogue à l'intérieur de l'hématie parasitée.

BIBLIOGRAPHIE CITEE

1. Aikawa, M. & Seed, T. M. 1980. Morphology of plasmodia, *in* Kreier, J. P., ed., *Malaria*, Academic Press, New York, London, 1: 285-344.

2. Aikawa, M. & Sterling, C. R. 1974. Intracellular Protozoa. Academic Press, New York, San Francisco, London.

3. Aissi, E., Charet, P., Bouquelet, S. & Biguet, J. 1983. Endoprotease in P. yoelii nigeriensis. Comp. Biochem. Physiol., 74B: 559-566. 4. Charet, P., Aissi, E., Maurois, P., Bouquelet, S. & Biguet, J. 1978. Aminopeptidase in rodent *Plasmodium, Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**: 519–524.

5. Chou, A. C., Chevli, R. & Fitch, C. D. 1980. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor for malaria parasites. *Biochemistry*, **19**: 1543–1549.

6. Cook. L., Grant, P. T. & Kennack, W. O. 1961. Proteolytic enzymes of the erythrocytic forms of rodent and simian species of malarial plasmodia. *Exp. Parasitol.*, 11: 372-379.

7. Fulton, J. D. & Flewett, T. H. 1956. The relation of *P. berghei* and *P. knowlesi* to their respective red cell hosts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **50**: 150-156.

8. Howells, R. E. 1970. Electron microscope observation on the development and schizogony of the erythrocytic stages of *P. berghei.* Ann. Trop. Med. Parasitol., 64: 305-307.

9. Howells, R. E., Peters, W. & Thomas, E. A. 1968. The chemotherapy of rodent malaria. III. Host parasite relationships, part 3: the relationship between haemozoin formation and the age of the host cell. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 62: 267–270.

10. Levy, M. R. & Chou, S. C. 1973. Activity and some properties of an acid proteinase from normal and *P. berghei* infected red cells. *J. Parasitol.*, **59**: 1064-1070.

11. Levy, M. R., Siddiqui, W. A. & Chou, S. C. 1974. Acid protease activity in *P. falciparum* and *P. knowlesi* and ghosts of their respective host cell. *Nature (Lond.)*, 247: 546-549.

12. Peters, W. 1964. Pigment formation and nuclear division in chloroquine resistant malaria parasite (*P. berghei*, Vincke & Lips 1948). *Nature (Lond.)*, 203: 1290-1292.

13. —— 1965. Morphological and physiological variations in chloroquine resistant *P. berghei*, Vincke & Lips 1948. Ann. Soc. Belge Med. Trop., **45**: 365-378.

14. _____ 1969. Recent advances in the physiology and biochemistry of plasmodia. *Trop. Dis. Bull.*, 66: 1-8.

15. —— 1980. Chemotherapy of malaria, in Kreier, J. P., ed., Malaria, Academic Press, New York, London, 1: 145-283.

16. Peters, W., Fletcher, K. A. & Staubli, W. 1965. Phagotrophy and pigment formation in a chloroquine resistant strain of *P. berghei*, Vincke & Lips 1948. Ann. Trop. Med. Parasitol., **59**: 126-135.

17. Rudzinska, M. A. & Trager, W. 1959. Phagotrophy and two new structures in the malaria parasite *P. berghei. J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**: 103-112.

18. Slomianny, C., Charet, P. & Prensier, G. 1983. Ultrastructural localization of enzymes involved in the feeding process in *P. chabaudi* and *Babesia hylomysci. J. Protozool.*, **30**: 376-382.

19. Slomianny, C., Prensier, G. & Vivier, E. 1982. Ultrastructural study of the feeding process of erythrocytic *P. chabaudi. Mol. Biochem. Parasitol.*, Abstracts of the ICOPA V: 695.

20. Slomianny, C., Prensier, G. & Charet, P. 1984. Relation between hemoglobin degradation and maturity of the red blood cell infected by *P. berghei. Comp. Biochem. Physiol.* (sous presse)

Received 2 IV 84; accepted 18 VII 84

ARTICLE 3

Article

Ultrastructural Localization of Enzymes Involved in the Feeding Process in *Plasmodium chabaudi* and *Babesia hylomysci*¹

C. SLOMIANNY, P. CHARET, and G. PRENSIER

Inserm U. 42, Domaine du Certia, 369, rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

ABSTRACT. In *P. chabaudi*, hemoglobin digestion occurs in two ways: micropinocytosis and cytostomal phagocytosis. Both mechanisms lead to the formation of digestive vesicles which evolve to pigment vesicles containing hemozoin crystals. We used ultrastructural enzyme cytochemistry to detect and localize endoarylamidase and aminopeptidase activity. In *P. chabaudi*, these two enzymes are at first detected at the level of cytoplasmic ribosomes. When pinocytic vesicles appear, enzyme activity is localized at the membrane of the newly formed vesicles. Then, the labelling extends to the vesicle contents where it becomes very prominent. In the late trophozoite, enzymatic activity decreases and is no longer detected. In *B. hylomysci*, no endoarylamidase activity can be detected. Aminopeptidase is noted in the cytoplasm, the labelling being heavier in the growing trophozoites than in the younger stages. No vesicles or pigment can be observed. We thus conclude that aminopeptidase or endoarylamidase are synthesized in the cytoplasm of *P. chabaudi* and migrate to the digestive vesicles where hemoglobin digestion occurs. We do not know whether *Babesia* degrades hemoglobin since it does not produce residual pigment. It could feed from small peptides or amino acids coming from or through the stroma of the red blood cell.

W E showed in a previous report (16) the existence of a welldefined digestive system in *Plasmodium chabaudi*, which seems to be particular to this parasite. This system is based on the formation of a cytostomal tube from which pinocytic vesicles derive. Vesicles can also form at the periphery of the parasite by a micropinocytic process. The culmination of all these changes results in the creation of crystals surrounded by a unit-membrane after the inner membrane has disappeared and the content has become less dense.

To clarify exactly the part that these vesicles play in the hemoglobin digestive process, it seemed of interest to localize some proteolytic enzymes whose presence was demonstrated biochemically in *P. chabaudi* by Charet et al. (3, 5). They demonstrated an aminopeptidase whereas Aissi et al. (2) made conspicuous an endoarylamidase. More recently, Gyang et al. detected, in *P. falciparum*, the same enzymes and an acid peptidase (6). The two first enzymes are active on synthetic substrates and can be revealed by cytochemical techniques. On the other hand, Aissi et al. (2) studied the proteolytic system of *B*. *hylomysci*; this parasite shows an intraerythrocytic cycle similar to that of *P. chabaudi* but does not seem to degrade hemoglobin because it does not produce residual pigment. Nevertheless, these authors confirmed the presence, in the parasitic extracts, of two proteases, a cathepsin D and an aminopeptidase as in *P. chabaudi*. They did not detect endoarylamidase activity.

We thus undertook a search for aminopeptidase and endoarylamidase comparing *P. chabaudi* with *B. hylomysci*, the latter being considered as a control.

MATERIALS AND METHODS

Principle. The principle rests on Seligman's method (15). The object of his technique is to let the enzyme act on a synthetic substrate, to bind the residues to 4-aminophtalhydrazide (4APH), in order to create a final product which is hydrophobic, lipophobic, and osmiophilic.

Parasites. Plasmodium chabaudi strains are provided by Dr. Walliker's laboratory (Edinburgh), B. hylomysci by Dr. Wery's laboratory. Parasites are kept in mice by intraperitoneal injections every 6 or 7 days for Plasmodium, every 4 or 5 days for Babesia. When parasitemia reaches the rate of 50%, samples are taken of tail blood and directly mixed in the fixative solution, at the rate of 500 μ l of blood in 5 ml of fixative (2.5% v/v glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2). Fixation goes on 1 h at ambient temperature. Samples are then centri-

Figs. 1-3. Plasmodium chabaudi. 1-3 (AP activity). 1. Ring-form. The cytoplasm is regularly labelled. Note a newly formed vesicle (arrow). Only its periphery shows AP activity. N, nucleus. $\times 40,000$. 2. Ring-form. Vesicles have just pinched off from the plasmalemma (arrows); AP activity is only localized close to the membrane. $\times 80,000$. 3. Trophozoite. The vesicles are increasingly labelled (large arrows) whereas several hemozoin crystals (*) are already well-formed. Labelling can also be seen on the erythrocytic membrane (small arrows). FV, "food-vacuole." The "food-vacuole" is not a true vacuole because it never closes (16). This term was used by early workers to designate this structure; we shall follow convention and retain the designation. N, nucleus. $\times 76,000$.

Figs. 4-6. Increase of AP activity in the digestive vesicles of *P. chabaudi*. 4. The contents of the vesicles have now become labelled (large arrows). The cytoplasm is still strongly labelled. Note the AP activity seen on the red blood cell membrane. $\times 125,000, 5$. The vesicles are now strongly labelled (large arrows); AP activity is always seen on the plasmalemma of the erythrocyte (small arrows). $\times 73,000, 6$. Old trophozoite. General AP activity decreases; the cytoplasm is less strongly labelled than in the younger stages and only one vesicle still shows AP activity (arrow). The enzyme cannot be detected anymore in the vesicles whose hemozoin crystal (*) is well-formed. N, nucleus. $\times 54,000$.

Figs. 7-10. Endoarylamidase activity in *P. chabaudi.* 7. The cytoplasm is very slightly labelled as is a vesicle (large arrow). Note that EAA activity is seen in the erythrocytic stroma (small arrows). N, nucleus, FV, food-vacuole. $\times 62,000$. 8. Well-formed hemozoin crystals; they are very dense to the electron beam and do not show more enzymatic activity. They are lying close to the periphery of the "food-vacuole" (FV). Note that they are surrounded by a unit-membrane (arrows). $\times 82,000$. 9. Old trophozoite. The general EAA activity is vanishing. The erythrocytic stroma remains labelled (arrow). The nucleus (N) is cup-shaped, which explains the two sections. The same explanation can be made for the "food-vacuole" (FV). $\times 52,000$. 10. Control in which the substrate has been omitted from the incubation medium. Note the opacity of the pigment crystals, which are lying at the periphery of the parasitic cell. $\times 40,000$.

¹ This research was supported in part by the Malarial Component of the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases. The authors wish to thank Professor W. Peters and Dr. D. C. Warhurst for their helpful comments in the preparation of the manuscript.











fuged at 1700 g for 5 min and washed by resuspension in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, with 0.15 M sucrose.

Incubation. Samples were incubated to detect AP activity using Seligman's method (15). The synthetic substrate we use is L-alanyl-4-methoxy-2-naphthylamide hydrochloride. The substrate of EAA search is synthetized as follows: acetylation of L-alanyl-4-methoxy-2-naphthylamide hydrochloride: to 50 mg of this compound in 1 ml anhydrous pyridine add 300 μ l acetic anhydride. Let the product stay for 48 h at laboratory temperature and in darkness. Pyridine is then evaporated under vacuum. Purification is achieved by addition of benzene and evaporation. The acetylated compound crystallizes. To use, dissolve this substrate in methanol. Controls are obtained by the omission of the substrate from the incubation medium. Incubation, which lasts 2 h, needs a change to fresh substrate during this time because of rapid degradation of the products.

Blood samples are then rinsed in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4. Postfixation occurs in 1% (w/v) osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, with 0.15 M sucrose. After 1 h 30 min postfixation, the samples are dehydrated in graded alcohols and embedded in Epon. Sections are cut on a Porter-Blum MT1 ultramicrotome and picked up on 200-mesh grids. Sections were left unstained and examined in Hitachi HU 11E or Jeol 100CX electron microscopes.

RESULTS

Aminopeptidase activity (AP) localization. In Plasmodium chabaudi, AP activity exists in the ring-forms. The labelling is uniformly scattered in the cell cytoplasm as points more or less clustered together (Figs. 1, 4) and seem to be superimposed on the ribosomes. When pinocytic vesicles appear in the trophozoites, we notice a precipitate at their level, especially when they are newly formed. Labelling seems, at first, to appear at the periphery of the vesicle, close to the membrane (Figs. 1, 2), then to spread through the whole contents (Figs. 3, 4) where it becomes very prominent (Figs. 5, 6). It tends to vanish as the crystals of malarial pigment become more and more dense. Hemozoin crystals are opaque to the electron beam and tend to mask the precipitate (Figs. 3, 6). At the same time, we observe a progressive disappearance of cytoplasmic labelling (Fig. 6). Generally, it no longer exists when the trophozoites enter schizogony. Pigment is then well formed (Fig. 8).

In *B. hylomysci*, AP activity can also be detected; however, it only localizes scattered through the cytoplasm. The precipitate does not exist in all the stages and seems to be heavier in the later stages than in the younger forms (Figs. 11, 12). We do not observe vesicles as in *Plasmodium*.

Controls, in which we omitted the substrate, do not show any deposit (Fig. 14). In this way, we can see the opacity of malarial pigment when it progressively develops in *P. chabaudi* (Fig. 10).

Endoarylamidase activity (EAA) localization. In P. chabaudi, EAA detection follows more or less the same evolution as AP. Indeed, it appears in the young stages in the cytoplasm, then becomes more intense in the pinocytic vesicles (Fig. 7); however, the labelling is less visible than in the first case and rapidly vanishes (Fig. 9).



Fig. 17. Hypothetical pathway of hemoglobin degradation.

In *B. hylomysci* under the same experimental conditions, we cannot detect any EAA activity in the parasite in any stage we have observed (Fig. 13).

DISCUSSION

Aminopeptidase and endoarylamidase are enzymes included in the group of proteases, i.e. enzymes that hydrolyze peptide bonds. The purpose of this work was to localize their activity by making them operate on a specific substrate to produce a compound which can be visualized by electron microscopy. As the nature of the fixative can influence the localization of enzyme activity (10), we chose glutaraldehyde fixative as advocated by Monis, Wasserkrug & Seligman. Seligman's method was also chosen in preference to others (1, 4, 7, 11, 12, 14) for its high degree of specificity.

As described in a previous report (16), we confirm that hemoglobin digestion in *P. chabaudi* takes place in the pinocytic vesicles. Indeed, besides the morphological observations that led us to this conclusion, the presence of proteases in this location allows us to think that it may be the real mechanism.

The controls we used, *B. hylomysci*, studied by Aissi et al. (2), and the internal controls that are the leucocytes, confirm the validity of the technique used for this material. Aminopeptidase is localized in the piroplasm cytoplasm and confirms the biochemical studies of some authors on the same problem (2, 17). The macrophages also present in our samples show a prominent labelling (Fig. 15), and it is well known that these cells contain a great deal of proteases. On the other hand, EAA does not seem to exist in *Babesia* as stated in Aissi et al. (2), although it is found in the cytoplasm of the erythrocyte (Figs. 7, 9, 13). We also note a labelling of the plasmalemma of the red blood

Figs. 11-14. Enzymatic activity in *Babesia hylomysci*. Figs. 15, 16. Aminopeptidase activity in a macrophage and a reticulocyte. 11. (AP activity in a young trophozoite) The cytoplasm does not yet show strong labelling. N, nucleus. FV, food-vacuole. $\times 60,000$. 12. (Trophozoite) No pigment or digestive vesicle is visible in the densely labelled cytoplasm. (In *Plasmodium*, both pigment and digestive vacuoles are present in the cytoplasm.) As in *Plasmodium*, "food-vacuoles" are only invaginations that increase exchange. $\times 100,000$. 13. (EAA activity) No labelling is found in the parasitic cells although it is present in erythrocytic stroma (arrows). N, nucleus. $\times 48,000$. 14. Controls where the substrate has been omitted showing no labelling. $\times 32,000$. 15. (Macrophage) Arrows indicate very strong AP activity in the lysosomes. N, nucleus. $\times 31,000$. 16. (Reticulocyte) AP activity labelling is scattered throughout the cytoplasm. $\times 40,000$.

cell (Figs. 3-5) confirming the work of Pennel (13), among others, who showed proteases attached to the membranes. Reticulocytes are also labelled (Fig. 16).

Our results allow us to describe the development of the digestive system. In the younger forms, these proteases are localized at the ribosomes where they are probably synthesized. Following their appearance, the pinocytotic vesicles become markedly labelled, even though they do not yet contain any pigment. Proteolytic activity decreases progressively and tends to disappear as the parasite begins schizogony, and the pigment formation ceases. Unfortunately, we cannot specify with this technique by which mechanism the proteolytic enzymes are brought to the site of action.

Hemoglobin degradation requires the intervention of enzymes other than those we have just localized, very likely a cathepsin D whose presence was pointed out by Levy and Chou (8, 9) then by Gyang et al. (6). This type of enzyme specifically hydrolyzes hemoglobin. Knowing that AP only hydrolyzes short peptides, it seems it is necessary that hemoglobin be predegraded before AP can operate. We must have a degradation sequence where cathepsin D operates at first, and AP at the end, but we have not yet been able to devise a suitable method for localization of cathepsin D at the electron microscopic level. This enzyme operates at an optimal pH of 2.5 whereas enzymes such as AP operate at neutral or basic pH. How can we explain how two enzymes whose operating conditions are so different can act at the same place? Our previous studies can perhaps bring a first response. Indeed, a modification of the internal membrane is observed just at the beginning of the evolution of the pinocytotic vesicle. This modification can entail a rise of the internal membrane pH of the vesicle. The fall of the EAA activity can be explained by the fact that optimal activity of that enzyme is at about 37°C, whereas our techniques take place at room temperature; therefore, there is a lower efficiency of the enzyme. It is tempting to suggest that hemoglobin degradation might occur as in Fig. 17 although we have no information to clarify the operating mode of the EAA in P. chabaudi.

The simultaneous study of *Babesia*, which we considered as a control, enables us to see that the main difference concerns the EAA. Although these parasites live in the same conditions, they show a great difference; *Plasmodium* lives and grows in a parasitophorous vacuole whereas *Babesia* lives directly in contact with the red blood cell stroma. The nutrients can pass through its own plasmalemma without necessitating a complex pinocytotic system and can thus be degraded by the AP into amino acids. We cannot be sure that the nutrients come from the hemoglobin because this parasite does not produce pigment, as does *Plasmodium*. Indeed, malarial pigment (hemozoin) is widely assumed to be hemoglobin degradation residues and is regarded as hematin derivatives. Furthermore, this piroplasm does not seem to produce pinocytic vesicles where hemoglobin could be engulfed.

A further report will try to show that *Plasmodium* degrades more hemoglobin than it really needs for its growth and that a large proportion of amino acids deriving from the globin degradation are not used and are released to the plasma.

LITERATURE CITED

1. Adnet, J. J., Hopfner, C., Pluot, M. & Caulet, T. 1973. Détection ultrastructurale des leucine-aminopeptidases par chélation au plomb. *Biomed.*, **19**: 492-494.

2. Aissi, E. & Charet, P. 1981. Proteolytic system in Babesia hylomysci. Comp. Biochem. Physiol., 70 B: 133-139.

3. Aissi, E., Charet, P., Bouquelet, S. & Biguet, J. 1983. Endoproteases in *P. yoelii nigeriensis. Comp. Biochem. Physiol.* **74 B:** 55-56.

4. Burstone, M. S. & Folk, J. E. 1956. Histochemical demonstration of leucine-aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem., 4: 217-226.

5. Charet, P., Aissi, E., Bouquelet, S. & Biguet, J. 1980. Aminopeptidase in rodent *Plasmodium. Comp. Biochem. Physiol.*, 65 B: 519-524.

6. Gyang, F. N., Poole, B. & Trager, N. 1982. Peptidases from *P. falciparum* cultured *in vitro*. Mol. Biochem. Parasitol. 5: 263-273.

7. Holt, S. J. & Hicks, R. M. 1966. The importance of osmiophilia in the production of stable azoindoxyl complexes of high contrast for combined enzyme cytochemistry and electron microscopy. J. Cell. Biol., 29: 361-369.

8. Levy, M. R. & Chou. C. 1973. Activities and some properties of an acid proteinase from normal and *Plasmodium berghei*-infected red cells. J. Parasit., **59**: 1064–1070.

9. ——— 1974. Acid proteases activity in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*, and ghosts of their respective host red cells. *Nature*, 247: 546-549.

10. Monis, B., Wasserkrug, H. L. & Seligman, A. M. 1965. Comparison of fixative and substrates for aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem., 13: 503-509.

11. Nachlas, M. M., Crawford, D. T. & Seligman, A. M. 1956. The histochemical demonstration of leucine-aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem., 5: 264–278.

12. Nachlas, M. M., Monis, M., Rosenblatt, D. & Seligman, A. M. 1960. Improvement of the histochemical localization of leucine-aminopeptidase with a new substrate, L-leucyl-4-methoxy-naphtylamide. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7:261-276.

13. Pennel, R. B. 1974. Composition of normal human red cells, in Surgenor, D. M., ed., *The Red Blood Cell*, 2nd ed., Academic Press, New York, Vol. 1: 93-146.

14. Rutenburg, A. M., Kim, H., Fishbein, J. W., Hanken, J. S., Wasserkrug, H. L. & Seligman, A. M. 1969. Histochemical and ultrastructural demonstration of γ glutamyltranspeptidase activity. J. Histochem. Cytochem., 17: 517-526.

15. Seligman, A. M., Wasserkrug, H. L., Plapinger, R. E., Seito, T. & Hanken, J. S. 1970. Membrane ultrastructural demonstration of aminopeptidase and γ glutamyltranspeptidase activities with a new diazonium salt that yields a lipophobic, osmiophilic azo dye. J. Histochem. Cytochem., 18: 542-551.

16. Slomianny, C., Prensier, G. & Vivier, E. 1982. Ultrastructural study of the feeding process of erythrocytic *P. chabaudi* trophozoite. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Suppl. 695.

17. Wright, I. G. & Goodger, B. V. 1973. Proteolytic enzyme activity in the intraerythrocytic parasites *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. Z. Parasitenk., **42**: 213-220.

Received 25 VI 82; accepted 1 XI 82

ARTICLE 4

Article 4 1

۱

Ň

0305-0491/83/060347-07\$03.00/0 © 1983 Pergamon Press Ltd

COMPARATIVE STUDY OF AMINO ACID PRODUCTION IN ERYTHROCYTES PARASITIZED BY *PLASMODIUM* sp. AND *BABESIA HYLOMYSCI*

P. CHARET*, G. PRENSIER† and C. SLOMIANNY*

*INSERM U 42, 369 rue Jules Guesde. 59650 Villeneuve d'Ascq, †Laboratoire de Biologie animale, U.S.T.L. I 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

(Received 11 October 1982)

Abstract—Parasitized red blood cells are incubated in an isotonic buffer and the release of amino acids is determined in the cells and the buffer according to time.

1. Erythrocytes parasitized by *P. yoelii nigeriensis* showed an intense release of amino acids whereas those parasitized by *B. hylomysci* behaved almost like the uninfected erythrocytes.

2. A large amount of the amino acids produced by proteolysis are thus released out of the red blood cell.

3. Red blood cells parasitized by *P. berghei* and *P. berghei* chloroquino-resistant strains have the same proteolytic activity.

4. Chloroquine does not inhibit proteolysis.

5. The release of amino acids out of parasitized cells has been confirmed in vivo.

INTRODUCTION

Parasites in the genus *Plasmodium* are known to degrade 25-75% of the host-cell haemoglobin during their stay in the red blood cell. At the same time, amino-nitrogen is released and insoluble heme pigment is deposited (Moulder & Evans, 1946; Groman, 1951). Cenedella *et al.* (1968) showed that, during the *in vitro* incubation of red blood cells parasitized by *P. berghei*, the quantity of free amino acids increased and their composition was reminiscent of that of haemoglobin, which led these authors to conclude that haemoglobin was degraded.

It is tempting to think that the parasite carries out this degradation in order to obtain the amino acids required for its growth.

While a number of authors have tried to prove this hypothesis (Fulton & Grant, 1956; Sherman & Tanigoshi, 1970; Theakston *et al.*, 1970), it is certain that the parasite uses aminoacids acquired from the environment of the red blood cell and must be able also to synthesize them (Sherman, 1977).

In order that the degradation mechanism may be understood, *Plasmodium* proteolytic enzymes have been identified and studied (Levy & Chou, 1973; Charet *et al.*, 1980; Gyang *et al.*, 1982; Aissi *et al.*, 1982). However the studies conducted on specific enzymes did not necessarily reveal their global intracellular function. In order to study the global proteolytic activity of *Plasmodium*, we repeated the experiment described by Cenedella *et al.* (1968), but instead of determining the quantity of amino acids released during the time in the whole complex of incubation medium and parasitized red blood cells, we separated these from each other. The results obtained stimulated us to verify whether the phenomenon observed *in vitro* occurred also *in vivo*.

We have been able to show that another intraerythrocytic parasite, *Babesia hylomysci*, had a proteolytic system related to that of *Plasmodium* (Aissi & Charet, 1981), and we decided to study proteolysis in this parasite in the same way for comparison. This study seemed to us interesting since *Babesia* is not considered to degrade haemoglobin as it does not produce pigment.

MATERIALS AND METHODS

Strains

P. yoetii nigeriensis and P. chabaudi strains were presented by Dr D. Walliker (Edinburgh), P. berghei, P. berghei pyrimethamine-resistant (P. berghei Pyr.) and chloroquine-resistant P. berghei (P. berghei RC) were given by Prof. W. Peters, B. hylomysci by Prof. M. Wéry (Anvers), all of whom we thank very much.

They were inoculated into Eperythrozoon-free, 6–8 week old female Swiss mice fed with an adequate diet supplemented with para-amino-benzoic acid in the drinking water at 0.3 mg/ml.

Chemicals were provided by Merck, antimalarial drugs (chloroquine and quinine) by Sigma and pepstatin by Boehringer.

Study of in vitro proteolysis

Fifteen mice were inoculated intraperitoneally with 10^8 parasitized red blood cells per mouse. Four or five days after infection with *P. yoelii nigeriensis*, *P. berghei* or *B. hylomysci*, the mice were bled by cardiac puncture: parasitaemia reached 30-40% whereas the reticulocyte level remained normal (Charet *et al.*, 1979). The mice infected by *P. berghei* Pyr. were bled after 6 or 7 days and the mice parasitized by *P. berghei* RC after 12 days and the parasitaemia rate of every group was similar.

Red blood cells were collected by centrifugation $(300 g, 10 \text{ min}, 4^{\circ}\text{C})$ and washed 3 times with 4 vol of Trager's

isotonic buffer as modified by Sherman & Hull (1966). Most floating leukocytes were eliminated.

Standard preparations were carried out from uninfected red blood cells or red blood cells with a high level of reticulocytosis following phenylhydrazine injections. To about 2 ml of packed erythrocytes, 5 ml of Trager's medium were added and the cells were resuspended. Cell suspensions were deposited in small Petri dishes at the rate of 2 ml per dish and incubated in a "candle jar" at 37° C. After 0, 2 and 4 hr, the percentage of parasitaemia was calculated for every dish and the red blood cell count was established by use of a Thoma cell.

The supernatant I was separated from red blood cells by centrifugation. The pellet of red cells was lysed by 1 ml of distilled water and grinding. The membranes and parasites were separated by centrifugation and the supernatant II was collected.

The level of amino acids was then determined in each of the supernatants as follows (Cenedella *et al.*, 1968): 0.5 ml of supernatant were stirred with 0.5 ml of 10% trichloracetic acid, the precipitate was centrifuged and the supernatant extracted by three times 1 ml of ether in order to eliminate the TCA.

Amino acids were then determined by use of the ninhydrin method. According to Piez & Morris (1960), Leucine 1 mM was used as a reference amino acid. The results were expressed in μ mole of leucine for 10⁹ uninfected or parasitized red cells.

The whole method is summarized in Fig. 1.

Action of antimalarial drug on proteolysis

The same method was utilized in order to verify whether chloroquine and quinine modify proteolysis. The incubation medium was then supplemented by chloroquine at various concentrations: 10^{-6} , 10^{-3} , 10^{-3} , 10^{-2} M. In another experiment we subcutaneously injected 2 mg of chloroquine per kg of weight and killed mice 80 min after that injection. Incubation was conducted as previously described.

Study of haemoglobin degradation in vivo

The methods which were used are summarized in Fig. 2. (a) Labelling of normal red blood cell haemoglobin by $Leu^{14}C$. Mice, previously weakened by blood puncture,

10⁹ PARASITIZED R.B.C IN 2 ML OF TRAGER'S MEDIUM



Fig. 1. Study diagram of in vitro proteolysis.

MEASURE OF HAEMOGLOBIN DEGRADATION IN. VIVO



Fig. 2. Diagram of the course of *in vivo* haemoglobin degradation.

received an injection of $20 \ \mu C$ of Leu¹⁴C. The development of labelling was followed during 6 days up to the almost total disappearance of the plasma label, whereas radioactivity remained stable. Total blood was then collected and red blood cells were removed and washed three times in PBS isotonic.

(b) Study of haemoglobin degradation. Labelled red blood cells (0.5 ml) were injected respectively into an normal mouse, a mouse parasitized by *B. hylomysci* and 2 mice parasitized by *P. chabaudi*. In each case, the parasitaemia rate was about 50% and the mice were injected at about 18.00 hr. After 14 hr, 100 μ l of blood were taken from each mouse by orbital sinus puncture with a calibrated capillary tube. Red blood cells were packed by centrifugation; a low fraction of red blood cell 20 μ l and a high fraction of plasma 20 μ l were prepared for scintillation counting.

The counting was carried out as follows: $20 \,\mu$ l of the preparation diluted with distilled water so as to obtain 200 μ l were added to 1 ml of Lumasolve and 0.2 ml of isopropanol. The whole mixture was maintained for 2 hr at 60°C.

Then 0.65 ml of H_2O_2 at 30 per 100 were added drop by drop. After 2 hr at room temperature, the mixture was supplemented by 15 ml of Lumagel and 0.5 ml of HCl 2 N. After storing overnight at 4°C, samples were counted with an LKB counter.

High resolution autoradiography

Fixation: samples of separated red blood cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.3 for 90 min, then washed quickly in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 0.15 M sucrose and again fixed with osmic acid for 1 hr. Afterwards, they were dehydrated by increasing concentrations of alcohol and propylene oxide. Final inclusion was made in Epon Epi-





Fig. 3. Equivalent quantity in μ M of Leucine released in incubation medium by red blood cells according to time for 10⁹ uninfected red blood cells (NRBC 1) or reticulocytes (NBRC 2) and for 10⁹ red blood cells infected by *B. hylomysci* (B) and *P. yoelii nigeriensis* (N). Mean of 5 determinations \pm SD.

kote. The samples were prepared for autoradiography on slides according to the classical method. The slides were covered with a NTE Kodak emulsion. Exposure lasted for 1 month and was followed by developing with Dektol Kodak 2'.

RESULTS

Comparison between proteolysis of uninfected red blood cells and that of red blood cells parasitized by P. yoelii and B. hylomysci

During incubation of red blood cells, slight haemolysis was observed of uninfected red blood cells and a little more in the cells parasitized by *P. yoelii nigeriensis* and *B. hylomysci.*

Determination of the amino acid level in the incubation medium (Fig. 3) shows that it significantly increases with time with red blood cells parasitized by *P. yoelii nigeriensis*, whereas it increases only very slightly with red blood cells parasitized by *B. hylomysci*. On the other hand uninfected red blood cells or reticulocyte-rich ones (about 50% of young forms) practically do not release amino acids into the incubation medium while in the cytoplasm of the red blood cell the amino acid level remains almost constant (Table 1).

Study of proteolysis in red blood cells parasitized by P. berghei, P. berghei Pyr. and P. berghei RC

As in the case of red blood cells parasitized by *P. yoelii nigeriensis* for these 3 strains we observed an increase in the amino acid level in the incubation medium (Fig. 4). Moreover, red blood cells parasitized by *P. berghei* RC appear to have a higher level of activity that normal *P. berghei* strain and pyrimeth-amine-resistant ones.

Study of chloroquine effect.

When chloroquine was added to the incubation medium of red blood cells parasitized by *P. yoelii* nigeriensis at 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M concentrations, we did not observe any important change in

proteolysis. The same result was obtained if, instead of adding chloroquine to the incubation medium, we subcutaneously injected $40 \,\mu g$ of chloroquine in parasitized mice 80 min before collecting their red blood cells.

Finally let us note that pepsatin which specifically inhibits cathepsin D, does not modify proteolysis notably up to concentrations of $200 \ \mu g$ per ml in the incubation medium.

Study of amino acid release in vivo

In order to confirm the results obtained in vitro we carried out an experiment on an uninfected mouse (reference mouse 6a), a mouse parasitized by *B. hylomysci* (reference mouse 6b), and 2 mice parasitized by *P. chabaudi* (reference mouse 6c and d).

The incorporation of Leu C¹⁴ into stroma proteins of the uninfected red blood cell is total. In fact the radioactivity of a labelled and carefully washed red blood cell hemolysate is precipitated almost totally by 10% trichloroacetic acid. Moreover, in Fig. 5, the red blood cells show a significant labelling of haemoglobin. The course of radioactivity in red blood cells is reported in Figs 6a, b, c and d. The red blood cell activity of the uninfected mouse and that of the mouse infected by *B. hylomysci* remains constant during the experiment. In mice parasitized by *P. chabaudi*, red blood cell activity decreases dramatically when trophozoites increase.

Table I. Concentration in amino acids in the cytoplasma of uninfected red blood cells (RBC) and red blood cells parasitized by P. yoelii nigeriensis (N) and by B. hylomysci (B)

Time	0	2 hr	4 hr	
RBC N B	$\begin{array}{c} 0.18 \pm 0.04 \\ 0.70 \pm 0.25 \\ 0.40 \pm 0.16 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.14 \pm 0.06 \\ 0.70 \pm 0.25 \\ 0.41 \pm 0.17 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.12 \pm 0.05 \\ 0.70 \pm 0.25 \\ 0.47 \pm 0.20 \end{array}$	

Expressed in μ moles of leucine per 10⁹ cells according to time of incubation. Mean of 5 determinations \pm S.D.



Fig. 4. Equivalent quantity in μM of Leucine released in incubation medium by infected red blood cells according to time for 10⁹ red blood cells infected by *P. berghei* (N), *P. berghei* pyrimethamine-resistant (Pyr.) and chloroquine-resistant *P. berghei* (R.C.). Mean of 5 determinations \pm SD.

Preliminary observation in high resolution autoradiography

In Fig. 5 showing red blood cells parasitized by P. *chabaudi*, we note significant labelling of the erythrocyte stroma and endocytotic vesicle whereas the rest of the parasite does not give evidence of any labelling.

DISCUSSION

This comparative study of amino acid production by Plasmodium and Babesia confirms the intensity of haemoglobin degradation by Plasmodium, whereas it does not seem to exist or is slight in Babesia. A number of authors (Frerichs & Holbrook, 1974; Rudzinska, 1976; Langreth, 1976) had already suggested that Babesia did not degrade haemoglobin, the absence of pigmentation being their main argument. This hypothesis was confirmed later. Although Babesia has proteolytic enzymes related to those of Plasmodium (Aissi & Charet, 1981), the localization of these enzymes in cells enabled us to make clearer the digestive mechanism in Plasmodium and show that it did not exist in Babesia (Slomianny et al., 1982). While we were completing this work, Barry (1982) published a similar result. This author showed that in vitro Babesia rodhaini produced much less free amino acids than P. berghei.

Contrary to what we might have thought, chloroquine, which inhibits amino-peptidase (Charet *et al.*, 1980, Gyang *et al.*, 1982) in parasites has no effect on the release of amino acids. However it seems that chloroquine must have penetrated into parasitized red blood cells since its concentration into them is very rapid and to a very high level (Fitch, 1969).

When we inject chloroquine into parasitized mice, it is certain that, after 80 min, chloroquine reaches the parasite as the clumping of the pigment proves (Warhurst & Hockley, 1967). This result does not agree with those obtained by Livesey *et al.* (1980) who showed that chloroquine inhibits the proteolysis of endogenous and exogenous proteins in mammalian cells. This is perhaps due to a different mechanism of action. Chloroquine is known to have an effect on lysosomes; however haemoglobin phagocytosis in *Plasmodium* is carried out directly in pinocytotic vesicles without previous fusion with lysosome (Slomianny *et al.*, 1982).

While chloroquine is without effect on proteolysis, as early as 1946, Moulder and Evans showed that quinine inhibited the production of amino-nitrogens. We have also found this result in our experimental system (unpublished data). This probably indicates a profound difference in the mechanisms of action of these two drugs.

We have shown that chloroquine-resistant P. berghei degrades haemoglobin at least as much as the normal strain, in spite of the decrease in production of parasite pigment, which otherwise might suggest a decrease in haemoglobin degradation.

This agrees with the increase in proteolytic activity observed in this type of parasite by Mahoney & Eaton (1981) and Aissi *et al.* (1982). It thus appears interesting to try to determine what becomes of the heme in this case.

The release of amino acids is the point which has focused our attention especially. This observation on parasitized red blood cells surviving *in vitro* needed to be confirmed *in vivo*.

As the direct demonstration by the determination of plasma free amino acids can prove to be delicate because of the very rapid turnover of serum amino acids, we followed the parasitized red blood cell activity during a schizogonic cycle. We chose *P. chabaudi* bearing in mind the relative synchronicity of its cycle in the mouse. Uninfected mice and mice infected by *B. hylomysci* served as reference mice.

The results obtained on the reference mice make us reject the hypothesis of extra-parasitic haemolysis of reinjected, labelled red blood cells. The radioactivity found in red blood cells remained practically constant throughout the experiment (Fig. 6). On the contrary, in two mice parasitized by *P. chabaudi* we observed that radioactivity significantly decreased by more Amino acid production in parasitized erythrocytes



Fig. 5. Autoradiography of red blood cells parasitized after $[^{14}C]$ Leucine labelling. The radioactive labelling is practically localized only on the outside of the erythrocytic stroma or in parasite vacuoles. (FV). The trophozoite does not present any labelling. (A × 40,000; B × 15,000).

than 1/3 from the time when trophozoites started decreasing, which corresponds to the peak of haemoglobin degradations (Slomianny *et al.*, 1982). This confirms what we have shown *in vitro*, that amino acids and other degradation products, dissipate outwards for the most part.

Siddiqui & Trager (1967) showed that, during the infection of ducks by P. lophurae, the level of free amino acids increased, although Sherman and Mudd (1966) had noted a less significant increase. The

remark we have made on the turnover of serum amino acids accounts for the difference.

From these results we think that *Plasmodium* does not only degrade haemoglobin for its growth requirements. Indeed, although the preliminary results obtained by autoradiography (lack of labelling in parasites) seem to show that the parasite does not utilize haemoglobin-derived amino acids, it may use only a very small fraction of them (e.g. methionine).

As early as 1970, Theakston et al. studied haemo-



Fig. 6(a)-(d). (·_____) Curves showing changes in radioactivity according to time (hours of the day AM) in the red blood cell. Value of radioactivity for 20 µl of packed red blood cells collected at time mentioned in Fig. 2. (a) An uninfected control mouse shows that the level of red blood cell radioactivity remains constant and thus no or little haemolysis of infected red blood cell is produced during the experiment. (b) *B. hylomysci* infected mouse. No clear change in radioactivity curves show a marked decrease, especially from about 10 hr vegetative growth (the maximum of reinfestation takes place at about 1–2 a.m.). [The rise in radioactivity between 10 and 11 a.m. (Fig. c) and 9 and 10 a.m. (Fig. d) corresponds to a second stage of schizogony (enrichment in labelled red blood cells).]

globin degradation during infection by P. berghei in mice whose haemoglobin had been previously labelled. The experimental method used by the authors (haemoglobin labelling, then infection and evolution for 5 days) make their results difficult to interpret from this point of view. The number of schizogonic cycles can lead to an accumulation of the labelled amino acids released by *Plasmodium* proteolysis after their passage into the plasma. With haemoglobin labelled by tritiated Leucine, these workers obtained only a weak incorporation of haemoglobin into *Plasmodium* proteins. The heme labelling reveal its significant accumulation inside the parasite.

Other authors have attempted to show by biochemical techniques that haemoglobin amino acids are incorporated into *Plasmodium* proteins. Fulton & Grant (1956), after labelling monkey red blood cell haemoglobin with methionine ³⁵S, found this methionine in the parasite but Sherman & Tanigoshi who, in 1970, resumed a similar study on *P. lophurae* criticized this result: according to them the parasite may be contaminated by haemoglobin residues. These authors, after labelling haemoglobin with a mixture of [¹⁴C]amino acids thought that they found radioactivity in the parasite. However, as according to their methods, they collected their parasites after the first schizogonic cycle, these parasites might have also accumulated labelled amino acids from the plasma.

It seems premature to conclude from our results that parasites do not degrade haemoglobin for their growth. A large part of the amino acids coming from haemoglobin degradation must diffuse outside the parasitized red blood cell, perhaps for reasons of osmolarity.

Our study will have to be extended, especially by using autoradiography of higher sensibility and by varying the nature of the labelled amino acids.

Acknowledgements—This research was supported in part by Malaria component of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. We are indebted to Dr W. Peters for his helpful advice in the writing of this article. We thank Miss M. Dherin and Mrs A. Masset for their skilful technical assistance.

REFERENCES

- AISSI E. & CHARET P. (1981) Proteolytic system in B. hylomysci. Comp. Biochem. Physiol. 70B, 133-139.
- AISSI E., CHARET P., BOUQUELET S. & BIGUET J. (1982) Endoprotease in P. yoelii nigeriensis. Comp. Biochem. Physiol. 74B, 559-566.
- BARRY N. D. (1982) Metabolism of Babesia parasites in vitro, amino acid production by B. rodhaini compared to P. berghei, Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 60, 175–180.
- CENEDELLA R. J., ROSE N. H., ANGEL C. R. & SAXE L. H. (1968) Free amino acid production in vitro by P. berghei. Am. J. trop. Med. Hyg. 17, 800-803.
- CHARET P., MAUROIS P., COQUEMPOT M. F., FOURNET B. & BIGUET J. (1979) Etude comparée des glucides des membranes d'hématies saines et parasitées par *P. yoelii nigeriensis. Protistologica* **15**, 79–85.

CHARET P., AISSI E., MAUROIS P., BOUQUELET S. & BIGUET

J. (1980) Aminopeptidase in rodent Plasmodium. Comp. Biochem. Physiol. 65B, 519-524.

- FITCH C. D. (1969) Chloroquine resistance in malaria: A deficience in chloroquine binding. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 64, 1181-1187.
- FRERICHS W. M. & HOLBROOK A. A. (1974) Feeding mechanism in Babesia equi, J. Protozool. 21, 707-709.
- FULTON J. D. & GRANT P. T. (1956) The sulphur requirement of the erythrocytic form of P. knowlesi. Biochem. J. 63, 274-282.
- GYANG F. N., POOLE B. & TRAGER W. (1982) Peptidases from P. falciparum cultured in vitro. Molec. biochem. Parasit. 5, 263-273.
- GROMAN N. B. (1951) Dynamic aspects of the nitrogen metabolism of *P. galinaceum in vivo* and *in vitro*. J. infect. Dis. 88, 126-150.
- LANGRETH S. G. (1976) Feeding mechanism in extra-cellular Babesia microti and Plasmodium lophurae. J. Protozool. 23, 215-223.
- LEVY M. R. & CHOU S. C. (1973) Activities and some properties of an acid proteinase from normal and *P. berghei* infected red cell. J. Parasit **59**, 1064–1070.
- LIVESEY G., WILLIAMS K. E., KNOWLES S. E. & BALLARD F. J. (1980) Effect of weak bases on the degradation of endogenous and exogenous proteins by rat yolk sacs. *Biochem. J.* 188, 895.
- MAHONEY J. R. & EATON J. W. (1981) Chloroquine-resistant malaria association with enhanced protease activity. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 100, 1266-1271.
- MOULDER J. W. & EVANS E. A. (1946) The biochemistry of the malaria parasite. VI. Studies on the nitrogen metabolism of the malaria parasite. J. biol. Chem. 165, 145-159.
- PIEZ K. A. & MORRIS L. (1960) A modified procedure for the automatic analysis of amino acids. Analyt. Biochem. 1, 187-201.
- RUDZINSKA M. A. (1976) Ultrastructure of intra-erythrocytic Babesia microti with emphasis on the feeding mechanism, J. Protozool. 23, 224–233.
- SHERMAN I. W. & HULL R. W. (1966) The pigment (hemozoin) and proteins of the avian malaria parasite P. lophurae. J. Protozool. 7, 409-416.
- SHERMAN I. W. & MUDD J. B. (1966) Malaria infection (P. lophurae) changes in free amino acids. Science, N.Y. 154, 287-289.
- SHERMAN I. W. & TANIGOSHI L. (1970) Incorporation of ¹⁴C-amino acids by malaria (P. lophurae). III. In vivo utilisation of frost cell haemoglobin. Int. J. Biochem. 1, 635-637.
- SIDDIQUI W. A. & TRAGER W. (1967) Free amino acids of blood plasma and erythrocytes of normal ducks and ducks infected with malarial parasites, *P. lophurae. Nature, Lond.* 214, 1046-1047.
- SLOMIANNY C., PRENSIER G. & VIVIER E. (1982) Ultrastructural study of the feeding process of erythrocytic *P. chabaudi. Molec. Biochem. Parasitol. supplement*, 695.
- SLOMIANNY C., CHARET P. & PRENSIER G. (1982) Ultrastructural localization of enzymes involved in feeding process in *Plasmodium chabaudi* and *Babesia hylomysci*. *Molec. Biochem. Parasitol. supplement*, 194.
- THEAKSTON R. P., FLETCHER K. A. & MAEGRAITH B. G. (1970) The use of electron microscope autoradiography for examining the uptake and degradation of haemo-globin by *P. berghei. Ann. Trop. Med. Parasitol* 64, 63-71.
- WARHURT D. C. & HOCKLEY D. (1967) Mode of action of chloroquine on *P. berghei* and *P. cynomolgi. Nature, Lond.* 214, 935–936.

ARTICLE 5

Article 5

ACTION PRÉFÉRENTIELLE DE LA CHLOROQUINE SUR LES PLASMODIUM HÉBERGÉS DANS DES HÉMATIES MATURES

E. DEI-CAS¹, C. SLOMIANNY¹, G. PRENSIER¹, A. VERNES¹, J.J. COLIN², A. VERHAEGHE¹, A. SAVAGE¹, P. CHARET¹ avec la collaboration technique de G. LEPAGE

DEI-CAS E., SLOMIANNY C., PRENSIER G., VERNES A., COLIN J.J., VERHAEGHE A., SAVAGE A., CHARET P. — Action préférentielle de la chloroquine sur les *Plasmodium* héberges dans des hématies matures. **Path. Biol.**, 1984. **32**, nº 10, 1019-1023.

RESUME : L'étude *in vivo* de l'action de la chloroquine sur *Plasmodium berghei* en fonction de l'âge de la cellule hôte a permis de mettre en evidence l'action préferentielle de la drogue sur les parasites evoluant dans les hématies matures. La DE-SO pour ceux-ci est plus basse (1.64 \pm 0.2 mg kg jour) que pour les parasites héberges par les réticulocytes (2.45 \pm 0.2 mg kg jour). La coalescence du pigment (« clumping test ») de *P. berghei* se multipliant dans les jeunes hématies s'accomplit essentiellement comme dans une souche chloroquino-résistante de la mème espèce. Ces résultats sont confrontes à des observations physiologiques sur le rapport hôte-parasite de *Plasmodium* avec la cellule hôte, et à des discordances biocliniques de la sensibilité à la chloroquine de souches sauvages de *P. falciparum*, observées *in vivo* et déterminées *in vitro*.

MOTS-CLÉS : Chloroquine. — Plasmodium. — Résistance. — Réticulocytes.

INTRODUCTION

La composante génétique joue sans doute un rôle dans la résistance de *Plasmodium* à la chloroquine (Rosario, 1976 [10] : Peters, 1982 [9]). Cependant, le mécanisme d'action de cet antimalarique et celui de la résistance développée vis-à-vis de cette drogue par un nombre croissant de souches de *P. falciparum*, demeurent inexpliqués.

L'affinité remarquable de la chloroquine pour la ferriprotoporphyrine IX (Chou et al., 1980 [3]), partie essentielle du pigment malarien, et la combinaison des deux molécules (Moreau et al., 1982 [7]), indiquent que l'action du médicament pourrait être liée à la dégradation de l'hémoglobine par le parasite. Il existe en effet une nette corrélation entre la production du pigment par *P. falciparum în vitro* et la concentration de chloroquine radiomarquée dans les hématies parasitées (Vernes et al. [12], résultats non publiés).

DEI-CAS E., SLOMIANNY C., PRENSIER G., VERNES A., COLIN J.J., VERHAEGHE A., SAVAGE A., CHARET P. — Preferential action of chloroquine for *Plasmodium* growing in mature red blood cells. (*In French*). **Path. Biol.**, 1984. **32**, nº 10, 1019-1023.

SUMMARY : In vitro studies on the effects of chloroquine on *Plasmodium berghei* in relation to the age of the host cell made it possible to demonstrate the preferential effect of the drug on parasites growing in mature red blood cells. The ED-50 for parasites in mature red blood cells is lower (1.64 \pm 0.2 mg kg day) than in reticulocytes (2.45 \pm 0.2 mg kg day). The result of clumping test for chloroquino-sensitive *P. berghei* growing in young red blood cells, is almost similar as in a chloroquino-resistant strain of the same species. These results are compared with physiological observations on *Plasmodium* host parasite relationships and bioclinical discrepancies noticed between *in vivo* chloroquino testing.

KEY-WORDS : Chloroquine. — Plasmodium. — Resistance. — Reticulocytes.

La cathepsine D, enzyme qui participe à la dégradation de l'hémoglobine par le parasite, est plus active dans la souche de *P. berghei* résistante à la chloroquine que dans la souche homologue chloroquinosensible (Mahoney et Eaton, 1981 [6], Aissi et al., 1983 [1]).

Or, lorsque *P. berghei* chloroquino-sensible siège dans des réticulocytes, la dégradation de l'hémoglobine est aussi efficace que dans la souche chloroquino-résistante (Slomianny et al., 1984 [11]). La

Manuscrit reçu à la Rédaction le 24 février 1984. Accepté modifié le 3 mai 1984.

^{1.} INSERM (Unité 42), 369, rue Jules Guesde, F 59650 VILLE-NEUVE D'ASCQ.

^{2.} Laboratoire Central de l'Hôpital G. Duron, rue du Président Coty, F 59028 TOURCOING.

^{3.} Laboratoire du CH Général, 130, av. Louis Herbaux, F 59385 DUNKERQUE Cedex (France).

ACTION DE LA CHLOROQUINE SUR LES PLASMODIUM

PATHOLOGIE BIOLOGIE DECEMBRE 1984

7 ± 3.5 3 ± 1

11 ± 3

18 ± 10

16 ± 8 11 ± 7

14 = 6

A. Souris à réticulocytémie normale						
Chloroquine (mg/kg/jour)	Réticulocytes par 1 000	% Réticulocytes parasités (a)	% Normocytes parasités (b)	Parasites par 1 000	Ret. parasit. normocytes parasit.	
0	10.4 ± 5.7 7 ± 4	87 ± 7 85 ± 22	9 ± 3 13 ± 5	100 ± 38 138 ± 54	11.5 ± 6.7 7.5 ± 1.5	
1	21 ± 4	79 ± 13	15 ± 8	162 ± 85	7 ± 4	
2	12.4 ± 4 22 ± 7	58 ± 15 73 ± 16	8 ± 6 10 ± 4	84 ± 56 115 ± 43	8 ± 4 8 ± 3	
3	14 <u>±</u> 7	35 <u>±</u> 22	0.8 <u>±</u> 0.4	10 <u>=</u> 3	45 <u>±</u> 21	
4	13 <u>±</u> 4	22 <u>±</u> 7	0.6 <u>=</u> 0.4	· 7 <u>=</u> 6	46 <u>=</u> 27	
5	26 ± 19 26 ± 9	10 ± 7 6 ± 1	0.4 ± 0.2 0.2 ± 0.1	7 ± 5 1.4 ± 1.7	25 ± 10 33 = 11	
6	14 ± 13	0	0	<u>0</u>	_	
B. Souris à réticulocytémie élevée						
Chloroquine (mg/kg/jour)	Réticulocytes par 1 000	% Réticulocytes parasités (a)	% Normocytes parasites (b)	Parasites par 1 000	Rét. parasit./ normocytes parasit.	
0	19.2 ± 14 40 ± 8	88 ± 9.2 83 ± 8	27 ± 11 47 ± 18	296 ± 126 483 ± 180	$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	
1	59 <u>=</u> 42	70 = 34	40 = 5	342 = 186	2 = 0.4	

10 ± 4 26 ± 11

1

3 = 1.5

0.6

 $1 \pm 0.$ 3.2 \pm 1

0.4 ± 0.2

4 <u>.</u>

63 ± 11 77 ± 11

24 ± 13

19 ± 16

12 ± 17

47 = 14

14 ± 14

TABLEAU I. — Influence de la chloroquine sur le développement de Plasmodium berghei (souche N. chloroquino-sensible) en fonction de l'àge de l'hématie hôte - 5° jour après l'inoculation I.P. de 10' hématies parasitées. Résultats de deux expériences.

% de réticulocytes parasités par rapport au nombre de reticulocytes a) b) % de normocytes parasités par rapport au nombre de normocytes.

32 ± 10 112 ± 64

49 ± 4

68 ± 24 146 ± 20

62 ± 18

112

57 ± 13

2

3

4

5

6

nature de la cellule hôte, qui a donc une influence sur le métabolisme parasitaire, pourrait aussi influencer l'action de la chloroquine sur Plasmodium.

Cette contribution rapporte l'étude in vivo de l'action de la chloroquine sur P. berghei en fonction du degré de maturité de l'hématie hôte. Nous rapportons également les résultats observés sur P. falciparum in vivo et in vitro.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Plusieurs lots de 35 souris Swiss (non infectées par Epervilirozoon, de 6 à 8 semaines, sous régime supplémenté en acide paraaminobenzoïque) ont été inoculés par voie LP, avec 10° hématics. parasitées par *Plasmodium berghei* (souche N, chloroquino-sensi-ble, aimablement cédée par le P⁶W. Peters). La moitié des souris avait subi auparavant une saignée à l'œit de 0.6 ml trois jours consécutifs.

Chacun des lots de souris (non saignées et saignées) a'été divisé en sept groupes de cinq animaux. Les souris du premier groupe n'ont pas reçu de chloroquine. Celles des deuxième, troisième, quatrième, cinquième, sixieme et septième groupes de chaque lot ont respectivement reçu par voie S.C. 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg et 6 mg kg/jour de chloroquine pendant quatre jours.

= 40 = 122

120

322

70 .: 20

40 - 20

 15 ± 10 47 ± 34

10 = 10

Les doses efficaces 50 % (DE-50 : dose qui diminue de 50 % la parasitémie après quatre jours d'administration quotidienne de chloroquine aux doses de 1 à 6 mg/kg/jour) ont été déterminées selon la méthode de Peters (1965) [8].

Des frottis de sang prélevé à la queue, colorés au méthanol Giemsa, ont été effectués tous les jours et les parasites ont été comptés sur 5 000 hématies au minimum. La réticulocytémie a été appréciée au départ par le bleu d'Unna puis par la tonalité bleuâtre acquise par les réticulocytes I au Giemsa (Bessis, 1976 [2]).

Les parasitémies ont été étudiées séparément dans les réticulocytes et dans les normocytes.

VOLUME 32 Nº 10

L'étude de la coalescence du pigment (« clumping test ») a été réalisée sur *P. herghei N* (chloroquino-sensible) se développant dans des souris à réticulocytémie élevée (15 à 30 %), et sur *P. berghei* R.C. (souche chloroquino-résistante, aimablement cédée par le Pⁱ Peters). Dans les deux cas les parasitémies étaient de 30 à 40 %. Après l'administration I.P. de 5 mg/kg de chloroquinonous avons déterminé le pourcentage des trois différentes dispositions du pigment (Warhurst et Hockley, 1967 [13] : Warhurst et Robinson, 1971 [14]) sur des froitis de sang prélevé à la queue, frottis non colorés réalisés toutes les 15 minutes.

Enfin, la détermination de l'ID-50 (tableau III) de chloroquine pour les souches de *P. falciparum* isolées chez l'homme a été effectuée en microplaques selon la technique de Desjardins et al. (1979) [4], après adaptation des souches sauvages à la culture *in vitro* selon la technique de Haynes et al. (1976) [5].

RÉSULTATS

Résultats expérimentaux (tableau l)

En absence de chloroquine la parasitémie atteint au cinquième jour, respectivement, 100 à 150 pour 1 000 et 300 à 500 pour 1 000 chez les animaux à réticulocytémie normale et élevée au début de l'expérimentation, les réticulocytes I étant parasités à plus de 80 % dans les deux séries.

Sauf indication contraire, les autres variables sont semblables dans les deux séries : elles sont rapportées globalement ci-dessus.

Dans les lots traités à la chloroquine la parasitémie diminue en fonction de la dose, la chute significative se vérifiant aux environs de 2 mg/kg/jour.

Au cinquième jour la proportion de réticulocytes I parasités par rapport la proportion de normocytes parasités (dernière colonne du tableau I) est trois à cinq fois plus faible chez les souris qui n'ont pas reçu de chloroquine que chez les animaux traités avec 3, 4, 5 et 6 mg/kg/jour (fig. 1).

Sous 5 mg/kg/jour de chloroquine le nombre de parasites hébergés par des réticulocytes I diminue 4 à 14 fois : la même dose provoque une chute de 15 à 65 fois du nombre de parasites hébergés par les normocytes.

Variations de la DE-50 (a) (tableau II)

La DE-50 est sensiblement plus élevée (2,45 \pm 0,2 mg/kg/jour) pour les parasites siégeant dans des réticulocytes I que pour ceux hébergés par les normocytes (1.64 \pm 0,2 mg/kg/jour).





TABLEAU II. — Dose efficace-50 de chloroquine (mg/kg/jour) pour Plasmodium berghei (souche « N ») en fonction de l'âge de la cellule hôte.

Gio			
R	R ÷ N	N	n (b)
2.3 2.6 2.25 2.65	1.65 1.67 1.92 1.95	1.55 1.4 1.87 1.75	33 40 36 34
2,45 ± 0.2	1.8 ± 0.15	1.64 ± 0.2	143

a) R : réticulocytes : N : normocytes.

b) n : nombre de souris pour chaque détermination.

Test de coalescence du pigment (« clumping test »)

La coalescence complète du pigment de *P. berghei* N des souris à réticulocytémie normale a lieu 150 min, après l'administration de chloroquine. Par contre, il n'y a presque pas de coalescence pour *P. berghei* R.C., et celle-ci est très discrète chez *P. berghei* N (chloroquino-sensible) évoluant dans les souris à réticulocytémie élevée (fig. 2).

Sensibilité de P. falciparum à la chloroquine

Enfin, trois souches de *P. falciparum*, provenant de Guyane, qui se sont avérées réfractaires *in vivo* aux amino-4-quinoléines (doses chimioprophylactiques pour les trois patients, puis thérapeutiques pour deux d'entre eux, tableau III), se sont montrées sensibles à la chloroquine une fois adaptées à la culture *in vitro*.



Fig. 2. — Evolution du taux de coalescence (« clumping test »), du pigment de *Plasmodium berghei* après administration I.P. de 5 mg/kg de chloroquine. *P. berghei* « N », chloroquino-sensible, chez des souris à réticulocytémie normale: *A*, et élevée : *B. P. berghei* R.C., chloroquino-résistant : *C.* Types 1 (triangles), 2 (cercles vides) et 3 (cercles pieins) de coalescence pigmentaire (nomenclature proposée par Warhurst et Robinson, 1971 [14]).

DISCUSSION

Nous apportons des arguments physiologiques, expérimentaux et biocliniques en faveur de l'hypothèse selon laquelle la nature de la cellule hôte joue un rôle dans le mécanisme de la résistance de *Plasmodium* à la chloroquine.

Les arguments physiologiques sont analysés en détail par ailleurs (Slomianny et al., 1984 [11]) : brièvement, la dégradation de l'hémoglobine est plus efficace lorsque *P. berghei* est hébergé par de jeunes hématies ; en l'absence ou en présence de chloroquine ce *Plasmodium* parasite préférentiellement celles-ci (tableau I). Chez les parasites hébergés par des réticulocytes, les résidus d'hématine sont beaucoup moins abondants que chez les parasites qui siègent dans les hématies matures (Slomianny et al., 1984 [11]). Or, le pigment malarique essentiellement constitué par de molécules d'hématine (Chou et al., 1980 [3] : Moreau et al., 1982 [7]) serait responsable de la concentration de la chloroquine dans l'érythrocyte parasité (Chou et al., 1980 [3]).

Les arguments expérimentaux sont ceux apportés dans ce travail : *in vivo P. berghei* semble mieux résister à l'action de la chloroquine lorsqu'il est hébergé par des réticulocytes. Plusieurs expériences concordantes montrent que la DE-50 pour les parasites des réticulocytes est significativement plus élevée que pour les parasites siégeant dans des normocytes (tableau II). Les résultats obtenus chez les souris à réticulocytémie normale et élevée sont essentiellement les mêmes.

Un dernier argument expérimental concerne la coalescence pigmentaire. Nous avons retrouvé les résultats obtenus par Warhurst et al. (1971, 1974) [14, 15] sur *P. berghei* chloroquino-sensible. Le taux de coalescence vis-à-vis de la même dose de chloroquine est considérablement diminué lorsque la même souche se développe dans des réticulocytes, et est très proche du taux de coalescence de *P. berghei* R.C. L'effet de la chloroquine semble donc lié à l'âge de la cellule hôte.

Cas nº	Provenance géographique	Chimioprophylaxie aux amino-4 quinoléines	Chloroquine aux doses thérapeutiques	Forme clinique	Traitement curatif	ID-50 (b) de la souche sauvage (ng/ml)	ID-50 (b) de la souche témoin (ng/ml) (c)
1,G.B. J 44 ans	Guyane	oui	oui	Sévère ; parasitémie 4,5 %	Sulfadoxine et pyriméthamine Quinine I.V. Réanimation	16.2	6,6
2,J.D. 0 28 ans	Guyane	oui	non	Sévère ; parasitémie 1 %	Quinine I.V. Réanimation	44	34
3,L.B 0° 25 ans	Guyane	oui	oui	Modérée ; parasitémie faible	Quinine I.V.	2	2,7

TABLEAU III. - Sensibilité de Plasmodium falciparum à la chloroquine : discordances entre la réponse in vivo et le test (a) in vitro.

a) Test effectué selon la technique de Desjardin et al. (1979).

b) ID-50 : concentration de chloroquine permettant d'inhiber 50 % l'incorporation de 3H-hypoxanthine par le parasite. Pour les souches résistantes l'ID-50 dépasse, dans ce système, 120 ng/ml environ.

c) Souche témoin chloroquino-sensible.

VOLUME 32 Nº 10

Enfin, bien qu'ils soient plus discutables, nous pouvons ajouter des arguments biocliniques. Nous avons remarqué dans notre laboratoire que la chimioprophylaxie à la chloroquine n'empêche pas toujours la survenue d'accès palustres souvent sévères. à P. falciparum réfractaires aux doses thérapeutiques de la même drogue (et parfois d'autres antimalariques). Adaptées à la culture ces souches de P. falciparum se révèlent être chloroquino-sensibles in vitro (tableau III). Ces discordances pourraient être en rapport avec la nature des cellules hôtes : alors que la population d'hématies, lors du test in vitro, est composée de globules rouges matures quelque peu vieillis, chez les malades la population érvihrocytaire est hétérogène et renferme souvent une proportion considérable d'érythrocytes jeunes dont l'apparition est consécutive à l'anémie palustre.

En conclusion, la biologie de Plasmodium apparaît étroitement liée à celle de la cellule-hôte. L'efficacité de la dégradation de l'hémoglobine est liée à la nature de l'hématie parasitée (Slomianny et al., 1984 [11]). Compte tenu du rôle de l'hématine dans le mode d'action de la chloroquine il était intéressant d'étudier cette action en fonction de la cellule hôte.

Nos résultats montrent une moindre sensibilité de *Plasmodium* à la drogue lorsqu'il parasite des jeunes hématies. Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse de travail selon laquelle l'un des facteurs pouvant intervenir dans l'apparente résistance à la chloroquine de certaines souches de Plasmodium, est lié à la nature de la population érythrocytaire parasitée.

RÉFÉRENCES

- 1. AISSI E., CHARET P., BOUQUELET S., BIGUET J. Endopro-tease in Plasmodium yoelii nigeriensis, Comp. Biochem. Physiol., 1983, 74 B, 559-566.
- 2. BESSIS M. Réinterprétation des frottis sanguins. Masson éd., Paris, 1976,
- 3. CHOU A.C., CHEVLI R., FITCH C.D. Ferriprotoporphyrine IX fullfills the criteria for identification as the chloroquine receptor for malaria parasites. Biochemistry, 1980, 19, 1543-1549
- DESJARDINS R.E., CANFIELD C.J., HAYNES D., CHULAY J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob. Agents Chemo-ther., 1979, 16, 710-718.
- HAYNES J.D., DIGGS C.L., HINES F.A., DESJARDINS R.E. Cuiture of human malaria parasites. *Plasmodium falciparum*. *Nature* (Lond.), 1976, 263, 767-769.
- 6. MAHONEY J.R., EATON J.W. Chloroquine resistant malaria association with enhanced plasmodial protease activity. Biochem. Bio-phys. Res. Commun., 1981, 100, 1266-1271.
- MOREAU S., PERLY B., BIGUET J. Interactions de la chloro-quine avec la ferriprotoporphyrine IX. *Biochimie*, 1982, 64, 1015-1025.

- 8. PETERS W. Drug resistance in Plasmodium berghei Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine Resistance. Exp. Parasit., 1965, 17, 80-8

- Lips, 1948. I. Chloroquine Resistance. *Exp. Parasit.*, 1965. 17, 80-89.
 9. PETERS W. Antimalarial drug resistance : an increasing problem. *Brit. Med. J.*, 1982. 38, 187-192.
 10. ROSARIO V.E. Genetics of chloroquine-resistance in malaria parasites. *Nature (Lond.)*, 1976. 261, 585-586.
 11. SLOMIANNY Ch., PRENSIER G., CHARET P. Relation between hacmoglobin degradation and maturity of the red blood cell infected by *P. berghei. Comp. Biochem. Physiol.*, 1984, 78 *B*, 891-896.
 12. VERNES A., SLOMIANNY Ch., MOREAU S., ANSEL C. *In vitro* "C-chloroquine uptake by synchronized *Plasmodium falciparum.* Its relation to hacmoglobin degradation. (Source) in *its indication*.
- Its relation to hacmoglobin degradation. (Soumis à publication). 13. WARHURST D.C., HOCKLEY D.J. Mode of action of chloroquine on Plasmodium berghei and P. cynomolgi. Nature (Lond.), 1967, 214, 935-936.
- 14. WARHURST D.C., ROBINSON B.L. Cytotoxic agents and haemozoin pigment in malaria parasites (*Plasmodium berghei*). Life Sci., 1971, 10, 755-760.
- 15. WARHURST D.C., HOMEWOOD C.A., BAGGALEY V.C. -The chemotherapy of rodent malaria, XX. Autophagic vacuole formation in Plasmodium berghei in vitro. Ann. Trop. Med. Parasit., 1974, 68, 265-281.
ARTICLE 6

Article

0305-0491/84 $S3.00 \pm 0.00$ © 1984 Pergamon Press Ltd

RELATION BETWEEN HAEMOGLOBIN DEGRADATION AND MATURITY OF THE RED BLOOD CELL INFECTED BY P. BERGHEI

C. SLOMIANNY, G. PRENSIER and P. CHARET*

INSERM U 42, 369 rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France (Tel: 20-91-14-62)

(Received 12 January 1984)

Abstract-1. The action on haemoglobin of P. berghei growing in mature red cells, P. berghei growing in reticulocytes and P. berghei R.C. (which grows almost exclusively in reticulocytes) was compared. 2. P. berghei growing in reticulocytes had a much higher level of proteolytic activity on haemoglobin than that of P. berghei growing in mature red cells.

3. The amount of residual hematin was considerably reduced.

4. In P. berghei R.C. and P. berghei growing in reticulocytes, the pigment seems to be exocyted as it is forming.

5. The mechanism of haemoglobin degradation seemed therefore to be linked to the nature of the host red cell.

INTRODUCTION

The occurrence of human chloroquine-resistant Plasmodium strains has promoted researchers to explore the same phenomenon in laboratory models and more particularly in rodent *Plasmodia*. Thus, as early as 1964, Peters obtained P. berghei strains resistant to very high doses of chloroquine (P. berghei R.C.). These P. berghei strains are characterized, as regards cytology, by the fact that trophozoites have a great number of "food-vacuoles" and very little pigmentation (Peters et al., 1965).

Another characteristic of the P. berghei R.C. strain is that the parasites grow almost exclusively in reticulocytes whereas those of the parent strain develop in mature erythrocytes.

This finding, and the hypothesis advanced by Schueler and Cantrell (1964) and Cohen et al. (1964) that the binding of chloroquine by hematin might account for chloroquine resistance, directed attention to haemoglobin digestion and its waste product "malarial pigment" as being possibly of significance in both the mode of action of chloroquine and in resistance to it.

More recently, Chou et al. (1980) showed the affinity of chloroquine for ferriprotoporphyrin IX aggregates and postulated that malaria pigment was involved in the concentration of chloroquine in blood cells parasitized by sensitive strains. Moreau et al. (1982) have now shown how ferriprotoporphyrin could combine with chloroquine.

Some authors have tried to provide evidence of proteolysis in Plasmodium and haemoglobin is now known to be degraded significantly (Cenedella et al., 1968). The search for proteolytic enzymes liable to be involved in this mechanism has been the subject of a number of studies and it seems that three enzymes are implicated in this process: a cathepsin D, an endo-

arylamidase and an amino-peptidase (Levy and Chou, 1973; Charet et al., 1980; Gyang et al., 1982; Aissi et al., 1983). Lastly Mahoney and Eaton (1981) and Aissi et al. (1983) have indicated that cathepsin D activity is higher in P. berghei R.C. strains compared with that present in chloroquine-sensitive P. berghei.

In 1968, Howells et al. showed that ultrastructural morphology of normally sentitive P. berghei was reminiscent of that of P. berghei R.C., more specifically as regards pigmentation, when developing in reticulocytes; it appeared therefore interesting to us to study haemoglobin proteolysis mechanism when normally sensitive P. berghei developed in young red blood cells.

As, on the other hand, increase in proteolysis and decrease in pigmentation observed by electron microscopy were apparently contradictory, we also measured parasite residual hematin to verify whether it might have been undetected by electron microscopy.

Therefore we have compared haemoglobin degradation in P. berghei R.C. with that of chloroquine sensitive P. berghei caused to grow in reticulocytes by maintaining the strain in anaemic mice.

MATERIALS AND METHODS

Strains

P. berghei "N" strain and chloroquine-resistant (P. berghei R.C.) were provided by Prof. W. Peters (London), whom we thank very much.

They were inoculated into eperythrozoon-free, 6-8 week old Swiss mice fed with an adequate diet supplemented with paraminobenzoic acid in the drinking water at 0.3 mg/ml.

Production of parasites in reticulocytes

Mice were made anaemic by ocular puncture of 0.4 ml of blood daily for 3 consecutive days. Normally the mice presented after 3 days a 20 to 40% reticulocytaemia level. In order to obtain parasites growing in young red blood cells, 1 or 2 days after their latest venepuncture the mice were

^{*}To whom all correspondence should be addressed.

infected intraperitoneally at the rate of 10^8 parasites per mouse.

From now on, we shall use the following nomenclature: *P. berghei* N for the chloroquine-sensitive *P. berghei* strain growing in the normal mouse; *P. berghei* Nr when growing in the mouse first made anaemic; *P. berghei* R.C., for the chloroquino-resistant strain growing in the normal mouse; *P.berghei* R.C., for the chloroquino-resistant growing in the mouse first made anaemic.

Preparation of enzyme extracts

For all types of infection 40 mice were infected intraperitoneally by 10^8 parasitized red blood cells per mouse. When parasitaemia reached 30 to 50% the mice were killed by jugular vein puncture. White cells and platelets were removed through a short cellulose and glass bead column.

The process of preparation of enzyme extracts was then similar to that previously described (Charet et al., 1980). Red blood cells were collected by centrifugation (300 g,10 min., 4°C) and washed three times with 4 vol. of Trager isotonic buffer as modified by Sherman and Hull (1966). Red cell pellet was mixed with 4 vol. of isotonic buffer and 0.5 vol. of 0.2% saponin solution was added, the suspension being kept for 15 min., at 37°C in a gentle roller system. Free parasites were separated from host haemoglobin and red blood cell membranes by centrifugation (2000 g, 10 min., 4°C) and washed several times in the same manner until the supernatant became colourless. Packed free parasites were resuspended in an equal volume of isotonic buffer and lysed by successive cycles of freeze-thawing, then centrifuged (20 min., 20,000 g, 4°C). The supernatant was collected and this formed the enzymatic extract.

Measure of enzyme activity of parasite extracts

Amino-peptidase activity was determined by use of the synthetic substrate Ala-4-nitroanilide, endoarylamidase activity with the synthetic substrate N-acetyl-Ala-nitroanilide and acid proteolysis activity (cathepsin D) with haemoglobin solution.

The methods used are described in earlier papers (Aissi and Charet, 1981; Aissi et al., 1983).

Determination of cathepsin D activity in red blood cells

In red blood cells, cathepsin D is already present with its substrate haemoglobin (Melloni et al. 1981).

The activity of this enzyme was determined by measuring autolysis. Red blood cells collected after removal of leukocytes and platelets and washed in physiological solution were lysed by hypotonic shock. To a volume of packed red blood cells, an equal volume of iced water was added. Concentration of haemoglobin was determined by the method of Drabkin and adjusted to 10%.

The measurement was then carried out as follows:

	Testing tube	Standard tube
Red cell		* <u></u>
cytoplasm	0.05 ml	0.05 ml
Buffer pH 2.8	0.95 ml	0.95 ml
•	for 1 hr at 37°C	Immediately
TCA 5 %	1 ml	l mi

After a 20 min interval, the tubes were centrifuged and the supernatant was collected. Optical density was read at 280 nm against the standard tube. Enzyme activity was expressed arbitrarily by the increase of optical density per mg of haemoglobin.

Titration of the parasite hematin

Free parasites obtained as described above were lyophilized. Ten milligrams of parasites were suspended in 2 ml of 0.1 m tris HCl buffer at pH 8.5 and hydrolysed at 37° C by pronase, and after adding $100 \ \mu$ g of enzyme at times 0, 4 and 8 hours, hydrolysis continuing for 24 hr. Then, after adjusting to pH 3 with 3 drops of concentrated hydrochloric acid, the fine suspension was extracted three times with 1 ml of butanone.

The extraction system had two phases: the upper phase of butanone was well stained whereas the lower aqueous phase became practically colourless. The upper phases were collected and dry-evaporated. The black residue was redissolved in butanone, and quantitation was carried out by spectrophotometer at 390 nm with commercial hematin in solution in butanone as a standard.

Determination of proteolytic activity in intact cells

The methods used have already been described (Charet et al., 1983). Parasitized or uninfected red blood cells were incubated in Trager's medium and haemoglobin degradation with time was assessed by determining the quantity of amino-acids released by ninhydrine.

Electron microscopy

Blood (200 μ l) was taken from the mouse's tail and distributed into several tubes containing fixative (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2). Fixation lasted 1.5 hr at room temperature. The blood was then washed by centrifugation at 1700 g for 5 min and resuspended in 0.15 M sucrose in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.2. Samples were then postfixed in 1% osmium tetroxide in washing medium for 1 hr 30 at 4°C. After dehydration in graded alcohols, the pellets were enabedded in Epon and sectioned with a MT 1 Porter-Blum ultramicrotome. Sections were collected either on one hole grid or on longitudinal barred grids. We tried to collect at least 50 sections on each grid, these being stained with uranyl acetate and lead citrates. Grids were then observed with Hitachi HS 7S or Jeol 100 CX electron microscopes.



Fig. 1. Growth of *P. berghei* R.C. in normal mice. (\frown — \bullet) percentage of parasitized reticulocytes, (\triangle — \frown) percentage of parasitized mature red cells. Growth of *P. berghei* R.C. in mice previously made anaemic. (\bullet — $-\bullet$) percentage of parasitized reticulocytes, (\triangle — $-\bullet$) percentage of parasitized mature red cells.

Table 1. Enzyme activity in parasite extracts

Activity	P. berghei "N"	P. berghei "Nr"	P. berghei R.C.	P. berghei R.C. ₂
Cathepsin D	1	5.4 ± 1.7	5.3 ± 1.4	6.4 ± 2.4
Aminopeptidase	1	1.3 ± 0.6	1 ± 0.7	1 ± 0.6
Endoarylamidase	l	2.3 ± 1.4	1.2 ± 0.6	1.1 ± 0.7

Each value corresponds to the average of 5 batches obtained from 40 mice \pm one S.D. *P. berghei* R.C.₁ corresponds to the chloroquine-resistant strain growing in normal mice and *P. berghei* R.C.₂ to the same strain growing in mice previously made anaemic. Arbitrarily we have chosen *P. berghei* "N" extract activity as base 1.

RESULTS

Strain development

In a normal mouse heavily infected (by 10^8 parasites) *P berghei* "N" grows very rapidly. The parasitaemia level reaches 50% over 5–7 days, without any marked alteration of reticulocytaemia. *P. berghei* N develops approximately in the same way in mice first made anaemic (*P. berghei* "Nr").

On the other hand, *P. berghei* R.C. growing in the normal mouse develops in a totally different way (Fig. 1). In fact, however high the infesting dose may be, the parasitaemia level remains very low up to the 7th day, while reticulocytaemia level remains practically normal, then suddenly the latter increases and reaches 60-70%. At the 13th-14th day, parasites are found exclusively in reticulocytes. However, if *P. berghei* R.C. is injected to mice previously made anaemic, parasitaemia develops very rapidly and reaches a 40% level on the 7th day.

Enzyme activities

Cathepsin D, endoarylamidase and aminopeptidase activity determinations are reported in Table 1. P. berghei R.C. enzyme extract had a much higher cathepsin D activity than found in P. berghei "N" extracts. In P. berghei "Nr" extracts obtained from mice previously made anaemic, cathepsin D activity reached a similar level to that found in P. berghei R.C. obtained from normal mice (P. berghei R.C.) As regards endoarylamidase and aminopeptidase, this phenomenon was not observed. On the other hand, autolysis at pH 3 of red cell cytoplasm containing a normal level of reticulocytes was much less than the autolysis of red cells enriched in reticulocytes (Table 2).

Determination of proteolytic activity in intacts cells

Figure 2 shows the quantity of amino-acids released in the incubation medium with time. It appears that this quantity is lower when *P. berghei* is injected into a normal mouse than when it is injected to a mouse first made anaemic, as observed also for *P. berghei* R.C. (Charet *et al.*, 1983).

Hematin quantity in parasites

As the lyophilized parasite does not become soluble in buffer, hematin cannot be totally extracted in this way; however, the effect of pronase on 10 mg of

Table 2. Cathepsin I	D activity i	n the rec	i cell cy	tosplasm
according to th	ie percenta	age of re	ticulocy	tes
% Reticulocyte	2	6.6	11.4	16.4

% Reticulocyte	2	6.6	11.4	16.4
Activity/mg Hb	0.21	0.82	1.01	1.07

extract suspended in 2 ml of buffer makes it possible to obtain a homogeneous suspension. The staining of the parasite is then completely extracted by butanone. The spectra (Fig. 3) of the organic extract obtained from *P. berghei* "N", *P. berghei* R.C., *P. berghei* "Nr" and *P. berghei* R.C.₂ derived from mice made anaemic are all similar and similar to that of commercial hematin in solution in butanone, with the greatest absorption at 395 nm. The level of hematin for 10 mg of dry parasite is given in Table 3. We observed that *P. berghei* R.C. contains 7 times less hematin than *P. berghei* "N" and *P. berghei* "Nr" obtained from mice made anaemic contains about three times less hematin.

Electron microscopy

A comparative study of the ultrastructure of P. berghei "Nr" growing in reticulocytes and that of P. berghei "N" growing in mature red cells shows a modification of pigmentation which is similar to that observed in P. berghei R.C.₁. It is very thin and is found on the periphery of the parasite. Moreover with P. berghei R.C. and P. berghei "Nr" the presence of pigmentation in the reticulocyte cytoplasma can be observed (Fig. 4).

DISCUSSION

In 1981 Mahoney and Eaton indicated that acid proteolytic activity (cathepsin D) was much more significant in *P. berghei* R.C. than in *P. berghei*. These



Fig. 2. Equivalent quantities of μ M of leucine released in incubation medium by red blood cells according to time for 10⁹ uninfected red bloods cells (RBC) or reticulocytes and for 10⁹ red blood cells infected by *P. berghei* (N), *P. berghei* R.C. and *P. berghei* in anaemic mice (Nr.)

C. SLOMIANNY et al.



Fig. 3. Spectra of parasite butanone-extracts, P. berghei
R.C. (A), P. berghei in anemic mice (B), P. berghei in normal mice (C) and control hematin (D).

authors therefore concluded that resistance to chloroquine could be explained by a modification of the mechanism of haemoglobin degradation in *P. berghei* R.C.

But P. berghei R.C. is known to grow mainly in polychromatophilic red cells (Peters, 1964), parasitaemia remaining very low as long as the reticulocyte level is not high. Therefore enzyme activity determinations were carried out on P. berghei R.C. parasitizing young cells. On the other hand as cathepsin D is also found in uninfected red blood cells and as Melloni et al. (1981) have shown, its activity is much greater in young blood cells, it seemed necessary to compare P. berghei R.C. cathepsin D activity with that of P. berghei "Nr" infecting young red cells.

The increase in cathepsin D activity noted by Mahoney and Eaton (1981) and confirmed by Aissi *et al.* (1983) might be simply due to contamination of parasite extracts by the host cell enzyme.

The fact that we noted that during the development of P. berghei in reticulocytes, the cathepsin D level of parasite extracts increases just as it does in P. berghei R.C. confirms this hypothesis.

Experiments determining proteolytic activity of intact cells undoubtely show that *P. berghei* R.C. and *P. berghei* "Nr" degrade haemoglobin more significantly than *P. berghei* "N" growing in mature red cells.

The quantitative modification of proteolytic activity is accompanied by a qualitative modification. In fact, as Peters *et al.* (1965), and Howels *et al.* had shown (1968a,b), a decrease in pigmentation in *P. berghei* R.C. and *P. berghei* "Nr" in comparison with that of *P. berghei* "N" growing in mature red cells is observed. But malaria pigment is, at least partly, constituted of hematin piles coming from haemoglobin degradation. Therefore decrease in pigmentation can seem to be in contradiction with increase in haemoglobin proteolysis, unless released hematin is in a form which cannot be detected by electron microscopy. For this reason, we have determined the rate of heme in the parasite.

Results obtained clearly show that the level of hematin in *P. berghei* R.C. is much less high than in *P. berghei* "N". A little less significant decrease is observed in *P. berghei* "N" growing in mice made anaemic. This is probably due to the fact that in mice made anaemic *P. berghei* does not develop exclusively in reticulocytes, the produced reticulocytaemia being not superior to 50%.

Therefore we conclude that in *P. berghei* R.C. and *P. berghei* "Nr", hematin coming from haemoglobin degradation is partly eliminated.

As Eckman *et al.* (1977) have shown that the reticulocyte parasitized by *P. berghei* R.C. could not catabolize the heme, another mechanism of elimination must be considered.

The ultrastructural study of a number of serial sections of reticulocytes parasitized by *P. berghei* R.C. and *P. berghei* "Nr" makes it possible to observe the presence of pigment vesicles (Fig. 4) quite frequently in the cytoplasma of the red cell: this observation has led us to propose the hypothesis that pigment is partly exceyted, after its formation, into the reticulocyte cytoplasm which removes it in a similar manner; exocytosis into the reticulocyte being a well known phenomenon.

This hypothesis is consistent with the fact that ultrastructural morphology of the digestive system of the parasite growing in the reticulocyte is different from the parasite growing in the mature red cell.

Slomianny et al. (1983) have shown that in rodent parasites, P. chabaudi or P. berghei, growing in the mature red cell, haemoglobin degradation is carried

Table 3. Quantity in μ moles of hematin for 10 mg dry wt of lyophilized parasites

	P. berghei	P. berghei in reticulocytes	P. berghei RC ₁	P. berghei RC ₂
Hematin µM/10 mg	2.06 ± 0.5	0.78 ± 0.22	$0.30 \div 0.04$	0.30 ± 0.06

Each value corresponds to the average of 5 batches obtained from 40 mice \pm SD. *P. berghei* RC₁ corresponds to the chloroquine-resistant strain growing in uninfected mice and *P. berghei* RC₂ to the same strain growing in mice previously made anaemic.



Fig. 4. Ultrastructural morphology of *P. herghei* in reticulocytes (A) and *P. herghei* R.C. (B). Note the presence of pigment vesicules (arrow) in the cytoplasm of the host cells (× 45,000).

out with a cytostomal system and a pinocytotic one, whereas they have shown in 1983 (unpublished results) that haemoglobin degradation is carried out almost exclusively by pinocytosis in *P. berghei* growing in the reticulocyte and *P. berghei* R.C.

As Howels *et al.* (1968a,b) had already suggested, haemoglobin degradation by the parasite should be in close relation with the nature of the parasitized red cell. But we have still to determine if this phenomenon is due to adaptation of the strain to its host or selection of a type of parasite adapted to the growth in the reticulocyte and preexisting in the infesting inoculum.

The answer to that question should be given by the cloning of the initial strain.

Nevertheless, whatever the mechanism, our results show that the mechanism of haemoglobin degradation by the parasite depends on the host blood state.

895

If, as Fitch (1983) suggests, malarial pigment plays a basic role in the mode of action of chloroquine and if chloroquine-resistance can be explained by the decrease in pigmentation, it will be interesting to determine chloroquine-sensitivity of the normally sensitive parasite strain developing in reticulocytes so as to appraise whether chloroquine resistance is in relation with the host blood state.

Acknowledgements—This research was supported in part by Malaria component of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. We are indebted to Pr Peters for his helpful advice in the writing of this article. We thank Mr G. Lepage for his skilful technical assistance.

REFERENCES

- Aissi E. and Charet P. (1981) Proteolytic system in Babesia hylomysci. Comp. Biochem. Physiol., 70B, 133-139.
- Aissi E., Charet P., Bouquelet S. and Biguet J. (1983). Endoprotease in *P. yoelli nigeriensis. Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, 559-566.
- Cenedella R. J., Rosen H., Angel C. R. and Saxe L. H. (1968) Free amino-acid production in vitro by P. berghei. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17, 800-803.
- Cohen S. N., Phifer K. C. and Yielding K. L. (1964) Complex formation between chloroquine and ferrihaemic acid *in vitro* and its effects on the antimalarial action of chloroquine. *Nature*, *Lond.* 202, 805-806.
- Charet P., Aissi E., Maurois P., Bouquelet S. and Biguet J. (1980). Amino peptidase in rodent *Plasmodium. Comp. Biochem. Physiol.* 65B, 519-524.
- Charet P., Prensier G. and Slomianny C. (1983) Comparative study of amino acid production in erythrocytes parasitized by *Plasmodium sp.* and *Babesia hylomysci. Comp. Biochem. Physiol.* **75B**, 347-353.
- Chou A. C., Chevli R. and Fitch C. D. (1980) Ferriprotoporphyrin IX fulfils the criteria for identification as the chloroquine receptor of malarial parasites. *Biochemistry* 19, 1543-1549.

Eckman J. R., Modler S., Eaton J. W., Berger E. and Engel R. R. (1977) Host heme catabolism in drug sensitive and drug resistant malaria. J. Lab. clin. Med. 90, 767-770.

Fitch C. D. (1983) Malaria chemotherapy. In Malaria and

the Red Cell (Edited by Pitman), Vol. 94, pp. 222-232. Ciba Foundation Symposium, London.

- Gyang F. N., Poole B. and Trager W., (1982) Peptidases from *P. falciparum* cultured in vitro. Molec. Biochem. Parasitol. 5, 263-273
- Howells R. E., Peters W. and Thomas E. A. (1968a) Host parasite relationship, part. 3. The relationship between haemozoin formation and the age of the host cell. Ann. Trop. Med. Parasit. 62, 267-270.
- Howells R. E., Peters W. and Thomas E. A. (1968b) Host parasite relationship, part. 4. The relationship between haemozoin formation and the age of the host cell in chloroquine and primaquine-resistant strains of *Plasmodium berghei. Ann. Trop. Med. Parasit.* 68, 271-276.
- Levy M. R. and Chou S. C. (1973) Activity and some properties of an acid proteinase from normal and *P.* berghei-infected red cells. J. Parasit. **59**, 1064–1070.
- Mahoney J. R. and Eaton J. W. (1981) Chloroquine resistant malaria association with enhanced plasmodial protease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 1266-1271.
- Melloni E., Salamino F., Sparatore B., Michetti M., Morelli A., Benatti U., Deflora A. and Pontremoli S. (1981) Decay of proteinase and peptidase activities of human and rabbit erythrocytes during cellular aging. *Biochem. biophys. Acta* 675, 110-116.
- Moreau S., Perly B. and Biguet J. (1982) Interactions de la chloroquine avec la ferriprotoporphyrine IX. *Biochimie* 64, 1015-1025.
- Peters W. (1964) Drug resistance in *P. berghei* Vincke and Lips 1948. Exp. Parasit 17, 80-89.
- Peters W., Fletcher K. A. and Staubli W. (1965) Phagotrophy and pigment formation in a chloroquine-resistant strain of *P. berghei* Vincke and Lips 1948. Ann. Trop. Med. Parasit. 59, 126-135.
- Schueler F. W. and Cantrell W. F. (1964) Antagonism of the antimalarial action of chloroquine by ferrihemate and a hypothesis for the mechanism of chloroquine resistance. J. Pharmac. exp. Therap. 143, 278-281.
- Sherman I. W. and Hull R. W. (1966) The pigment and proteins of the avian malaria parasite *P. lophurae. J. Protozool.* 7, 409-416.
- Sherman I. W. and Tanigoshi L. (1981). The protease of Plasmodium. A cathepsin D like enzyme from P. lophurae. In The Biochemistry of Parasites (Slutzky G. M., Ed.), pp. 137-149. Pergamon Press, Oxford.
- Slomianny C., Charet P. and Prensier G. (1983) Ultrastructural localization of enzymes involved in the feeding process in *P. chabaudi* and *B. hylomysci. J. Protozool.* 30, 376-382.



01.5

PLANCHE I

Reconstitution tridimensionnelle

Vue nº 1 : Trophozoīte de P. chabaudi.

Vue n° 2 : Trophozoïte de <u>P. berghei N</u>. Noter la présence de deux tubes cytostomaux.

En rouge pointillé : limites cellulaires En rouge continu : le tube cytostomal En bleu continu : la mitochondrie En vert continu : le noyau En noir : le pigment.

.



PLANCHE II

Reconstitution tridimensionnelle

- Vue n° l : Trophozoïte de <u>P. berghei</u> R.C. Remarquer la présence d'au moins trois vacuoles cytostomales et les très nombreuses vésicules pigmentaires.
- Vue n° 2 : Trophozoïte de <u>P. falciparum</u> FCR3. Les vacuoles résiduelles sont déjà bien formées. La mitochondrie est très ramifiée. En brun : vésicules de type lysosome.



PLANCHE III

FCR3

Vue n° l : Trophozoīte jeune. Noter la présence de nombreuses vésicules de pinocytose.

X 27 000.

Vue n° 2 : Trophozoïte jeune. L'hémoglobine a été dégradée. Des cristaux apparaissent dans les vésicules pigmentaires.

X 35 000

Vue nº 3 : Trophozoīte moyen. La pinocytose est relayée par le système cytostomal. Plusieurs cytostomes fonctionnels peuvent être observés.

X 51 000

Vue nº 4 : Trophozoīte moyen. Dégradation du stroma érythrocytaire dans les vacuoles issues du système cytostomal.

X 71 000

Vue nº 5 : Trophozoïte moyen. La première "vacuole" du stade anneau peut subsister assez longtemps. Quand elle se ferme, son contenu se dégrade. Pour que ce processus ait lieu, il faut que la vacuole perde sa membrane interne. Les vacuoles adjascentes ne sont pas encore en phase de dégradation étant donné leurs deux membranes limitantes.

X 32 000



PLANCHE IV

FCR3

Vue n° l : Trophozoïte moyen. Le contenu des vacuoles cytostomales est complètement dégradé. La matrice est transparente aux électrons.

X 33 000

Vue n° 2 : Trophozoīte âgé. Formation de la vacuole résiduelle par coalescence des vésicules et vacuoles pigmentaires(*).

X 25 000.

Vue nº 3 : Début de division nucléaire. Noter la présence de cinétochores(*). La coalescence continue avec une cristallisation du pigment en cristaux plus importants.

X 18 000.

Vue nº 4 : Schizonte prêt à être libéré.

X 19 500



PLANCHE V

P. berghei. Phosphatase acide

Vue n° l : Trophozoïte. Le marquage est peu intense et se situe au niveau de guelques lamelles du R.E. ou quelques vésicules.

43 000

Vue n° 2 : Trophozoīte jeune. Certaines vésicules périphériques, qui sont des vésicules de pinocytose, sont marquées. Le précipité peut également se retrouver au voisinage de vésicules pigmentaires.

X 52 000

Vue nº 3 : Trophozoīte mature. Le marquage est présent dans la zone de formation des rhoptries qui correspond donc à un Golgi.

X 38 000

Vue nº 4 : Témoin interne de la réaction. Macrophage activé.

X 17 000





PLANCHE VI

P. yoelii nigeriensis - Phosphatase acide

Vue n° l : Jeunes trophozoītes. Peu intense, le marquage se retrouve surtout à la périphérie cellulaire au niveau des vésicules (*).

X 33 500

Vue n° 2 : Trophozoīte. Le précipité, plus intense, est observé au niveau des vésicules d'endocytose mais également au voisinage des vésicules pigmentaires (*).

X 45 000

Vue nº 3 : TrophozoIte. Mêmes remarques que précédemment.

X 30 500

Vue n° 4 : Trophozoïte moyen. Le marquage est de plus en plus intense. Des vésicules issues du système cytostomal sont marquées.

X 38 000

Vue n° 5 : Trophozoïte mature. Les zones de sécrétion golgienne se marquent(*). L'endocytose est toujours active.

X 26 500



PLANCHE VII

FCR3 - Phosphatase acide

Vue n° l : Jeune trophozoīte. Une vésicule d'endocytose est visualisée par un précipité.

X 96 000

Vue nº 2 : Trophozoīte. Alors que les vésiçules d'endocytose sont marquées, les vésicules pigmentaires ne le sont pas.

X 52 000

Vue n° 3 : Trophozoīte moyen. Quelques amas de vésicules se marquent à leur périphérie. Elles correspondent à une zone de sécrétion golgienne.

X 38 000

Vue n° 4 : Trophozoīte. Des vésicules à contenu dense aux électrons apparaissent vers les 2/3 du cycle biologique et sont visualisées par la technique utilisée.

X 17 000





PLANCHE VIII

FCR3 - Phosphatase acide

Vue n° l : Les vésicules à contenu dense, de type lysosome, sont nettement marquées et se situent souvent au niveau des vacuoles résiduelles, bien qu'aucune fusion n'ait été observée.

X 61 000

Vue n° 2 : Trophozoīte. Coupe doublement contrastée. Présence des vésicules de type lysosome au voisinage d'une vacuole d'endocytose.

X 27 000

Vue n° 3 : Trophozoïte mature. Des fusions de vésicules pigmentaires s'accompagnent d'un marquage au niveau du point de contact(*).

X 35 000





PLANCHE IX

P. berghei - IZO

Evolution du réticulum endoplasmique

Vue n° l : Vue habituelle du R.E. sur une coupe doublement contrastée. Les contours sont très sinueux et difficiles à suivre (témoin).

X 28 000

Vue nº 2 : Jeune trophozoïte. Le R.E. est très peu abondant. Il existe cependant déjà une vacuole cytostomale.

X 30 000

Vue nº 3 : Trophozoīte. Le R.E. prend de l'ampleur. Les organites sont clairement visibles. La mitochondrie montre quelques rares crêtes.

X 18 500

Vue nº 4 : Trophozoïte moyen. Le R.E. s'organise en lamelles paralèlles, apparamment au niveau de l'enveloppe nucléaire.

X 50 000

Vue nº 5 : Trophozoïte moyen. Alignement du R.E.

X 53 000



PLANCHE X

126

P. berghei - IZO

Golgi - Noyau

Vue n° l : Schizonte. L'appareil de Golgi est surtout visible lors de la formation des organites apicaux des futurs mérozoītes. (coupe doublement constrastée).

X 80 000

Vue n° 2 : Trophozoīte moyen. Des amas de vésicules sont parfois observés. Leur origine est difficilement discernable.

(coupe doublement constrastée).

X 80 000

Vue n° 3 : Trophozoïte moyen. L'IZO permet de visualiser facilement un bourgeonnement de vésicules au niveau de l'enveloppe nucléaire.

X 64 500

Vue nº 4 : Trophozoīte moyen. Le bourgeonnement peut se faire également à partir du R.E. et ce bien avant la formation des mérozoītes. Ces vésicules pourraient bien être des structures de type lysosome.

X 51 000

Vue n° 5 : Trophozoīte moyen. Le contraste apporté par l'IZO permet de visualiser très finement l'enveloppe nucléaire qui, coupée tangentiellement montre les pores nucléaires parfaitement délimités (flèches).

X 41 500





PLANCHE XI

P. berghei - IZO

Vue nº 1 : Macrophage circulant. Témoin interne de la technique.

X 21 500

Vue nº 2 : Vue de détail de vacuoles pigmentaires résiduelles. Seule la matrice est marquée.

X 62 000

Vue n° 3 : Vue de détail de vésicules pigmentaires. Le marquage respecte parfaitement les contours des cristaux.

X 58 000



PLANCHE XII

P. berghei RC - IZO

Vue nº 1 : Trophozoïte. Visualisation du R.E.

X 32 500

Vue n° 2 : Trophozoïtes jeunes. Le pigment est dispersé et ténu. L'enveloppe nucléaire est bien contrastée.

X 24 000

Vue nº 3 : Trophozoïte. Certaines zones du R.E. sont caractérisées par une vésiculisation intense correspondant à une zone de Golgi.

X 47 000

Vue n° 4 : Trophozoites. La technique permet également de visualiser les organites du réticulocyte, notamment les mitochondries dont les crêtes sont bien délimitées.

X 24 500





PLANCHE XIII

FCR3 - IZO

Vue nº 1 : Trophozoīte jeune. Le R.E. est très peu abondant. Les vésicules d'endocytose sont marquées.

X 34 000

Vue n° 2 : Trophozoïte jeune. Le R.E. commence à prendre de l'ampleur. Les vésicules d'endocytose sont clairement marquées. (Coupe légèrement contrastée).

X 42 500

Vue nº 3 : Schizonte. Noyaux et organites (sauf les rhoptries) sont visualisées.

X 30 000

Vue nº 4 : Trophozoītes âgés. Les clefs de Maurer sont visualisées et sont disposées de façon très particulière.

X 22 000







PLANCHE XIV

FCR3 - IZO

Vue n° l : Avec une concentration moindre d'iodure dans le substrat d'incubation, seules certaines vésicules restent marquées. Elles pourraient correspondre à des structures de type lysosome. Noter le marquage des clefs de Maurer.

X 25 000

Vue n° 2 : Même technique que la vue précédence. Ces vésicules se retrouvent souvent à proximité de vésicules pigmentaires.

X 31 000

Vue nº 3 : Témoin de la technique à faible concentration. Eosinophile de souris dont les granules et les lysosomes sont marqués alors que les autres organites ne le sont pas.

X 20 500




PLANCHE XV

Trophozoïtes de P. berghei. Action de la chloroquine

Vue nº 1 : Aspect habituel du parasite au temps O

X 28 000

Vue n° 2 : 15 minutes après le traitement, les vésicules pigmentaires commencent à coalescer (*). Noter la présence d'une zone de Golgi.

X 27 500

Vue nº 3 : 30 minutes après le traitement, les vacuoles de coalescence sont déjà importantes. Des fragments cytoplasmiques sont également incorporés dans la vacuole autophage (*).

X 35 000

Vue n° 4 : 45 minutes après le traitement, la vacuole autophage, maintenant unique, commence à être latéralisée.

X 29 500



PLANCHE XVI

Trophozoītes de P. berghei. Action de la chloroquine

Vue n° l : l heure après traitement. Pédiculisation de la vacuole autophage.

X 29 000

Vue n° 2 : l heure après traitement. Stade un peu plus avancé de pédiculisation.

X 29 000

Vue nº 3 : l heure 30 après traitement. Début d'expulsion de la vacuole autophage. Noter la perturbation induite par ce processus au niveau de la vacuole parasitophore (*).

X 29 000

Vue n° 4 : l heure 30 après traitement. La vacuole autophage a été expulsée dans le stroma de l'hôte. Il semble persister encore quelques perturbations de la vacuole parasitophore, témoin cette clef de Maurer, rare chez P. berghei.

X 29 000

NB : Chez <u>P. berghei</u> RC, le même phénomène peut s'observer. Il est cependant plus lent mais le réticulocyte prend en charge la vacuole autophage au même titre que ses propres organites qu'il expulse dans la circulation sanguine. La cellule hôte ne se lyse pas au moment de cette exocytose, le parasite continue ainsi à se développer.



PLANCHE XVII

FCR3. Action de la chloroquine

(30 minutes de traitement sur culture synchronisée)

Vue n° l : Jeune trophozoīte qui ne semble pas touché par le traitement. Les vésicules d'endocytose sont intactes.

X 33 500

Vue n° 2 : Jeune trophozoīte. Dès que le pigment apparaît, l'action de la chloroquine est révélée par un gonflement important des vésicules pigmentaires.

X 48 500

Vue nº 3 : Le système cytostomal n'est pas affecté par le médicament.

X 42 000

Vue n° 4 : La dégradation de l'hémoglobine ne s'effectue pas normalement. Les vésicules cytostomales coalescent prématurément avec la vacuole résiduelle.

X 33 500

Vue n° 5 : Une vésicule cytostomale non dégradée vient de fusionner avec la vacuole résiduelle. Elle possède encore sa membrane interne intacte. Noter la présence anormale de débris membranaires dans la vacuole résiduelle qui devient phagolysosome.

X 25 500



PLANCHE XVIII

FCR3. Action de la chloroquine

Vue nº l : Trophozoīte montrant une vacuole autophage qui contient des vacuoles cytostomales plus ou moins vidées de leur contenu.

X 15 000

Vue nº 2 : Trophozoïte mature. La vacuole autophage contient des vacuoles cytostomales non dégradées.

X 20 000

Vue nº 3 : Trophozoïte mature. Le cytoplasme du parasite commence à se désorganiser à cause des fusions plus ou moins anarchiques des organites.

X 37 000

Encart : Le phénomène de fusion prématurée de vacuoles cytostomales avec la vacuole résiduelle n'est pas sans rappeler des images de parasites qui ont souffert. Ici, un parasite rescapé d'un passage à la French Press.

X 10 000

134



PLANCHE XIX

Action de la chloroquine - Phosphatase acide

Vue n° l : Trophozoīte de <u>P. berghei</u>. Le marquage des vésicules est identique à celui des parasites non traités avec cependant une présence plus marquée de vésicules réactives dans les vacuoles autophages (*).

X 25 000

Vue n° 2 : Trophozoīte de <u>P. yoelii nigeriensis</u> après expulsion de la vacuole autophage. Le marquage est identique à un <u>P.y.nige-</u> <u>riensis</u> non traité et la même remarque que la précédente peut être faite.

X 30 000

Vue nº 3 : Trophozoïte mature de <u>P. falciparum</u> FCR₃ (coupe doublement contrastée). Bien que masquées par la "coloration", les vésicules de type lysosome sont plus nombreuses que dans le cas d'une cellule non traitée. Noter, au passage, la présence de "knobs" sur le plasmalemme érythrocytaire (*).

X 35 000





TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
INTRODUCTION	5
CHAPITRE I : ETUDE COMPAREE DU MECANISME DE DEGRADATION DU STROMA	
ERYTHROCYTAIRE	9
1. MORPHOLOGIE ULTRASTRUCTURALE	
A) Système digestif de <u>P. chabaudi</u>	10
B) Système digestif de <u>P. berghei</u>	10
C) Système digestif de <u>P. falciparum</u>	11
. culture de <u>P. falciparum</u>	11
. résultats	11
D) Comparaison	12
2. CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE	
A) Localisation des enzymes protéolytiques	16
B) Origine des enzymes	16
a) recherche de la phosphatase acide	17
. mode opératoire	17
. résultats	18
. discussion	19
b) technique à l'iodure de zinc - acide osmique (IZO)	19
. méthode	20
. résultats	20
. discussion	21
3. DEVENIR DES PRODUITS DE DEGRADATION DE L'HEMOGLOBINE	
A) Acides aminés	25
B) Pigment	25
a) Composition	25
b) Devenir	26

CHAPITRE II : ACTION DE LA CHLOROQUINE SUR LE SYSTEME DE DEGRADATION DE L'HEMOGLOBINE 28 1. ETUDE MORPHOLOGIQUE 29 A) Plasmodiums murins 29 B) Plasmodium humain 29 2. ETUDE DE LA "RESISTANCE" A LA CHLOROQUINE 30 A) Définition de la résistance à un médicament 32 B) Historique et distribution géographique 32 C) Etude de la chloroquine - résistance chez les rongeurs 34 a) Action préférentielle de la chloroquine 34 b) Un mécanisme possible d'échappement à la chloroquine .. 35 CHAPITRE III : MODE D'ACTION POSSIBLE DE LA CHLOROQUINE 39 1. RAPPEL IMMUNOLOGIQUE 40 2. LA VOIE CHIMIOTHERAPIE 40 40 A) Le mode direct a) Action sur le système digestif 40 . action sur les membranes 40 . action lysosomotrope 41 b) Action sur d'autres organites 42 B) Le mode indirect 42 CONCLUSION 45 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 51 ARTICLES 69



139