

50 376  
1 990  
1 34

69 558

50376  
1990  
134

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
LILLE - FLANDRES - ARTOIS

N° d'ordre 505

**THESE**

Présentée par

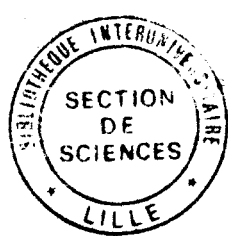
**ALAIN DEBRABANT**

Pour l'obtention du

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

De l'Université de Lille - Flandres - Artois

**Etude de la protéolyse de la protéine P126  
de *Plasmodium falciparum***



Soutenue le 28 février 1990 devant le jury composé de :

- Mme MM.      CAMUS Daniel  
                    CHARET Pierre  
                    DELPLACE Patrick  
                    GRAS Hélène  
                    PERRIN Luc  
                    VERMES Alain

Unité de Biologie et de Biochimie Parasitaires et Fongiques  
INSERM U 42 , Villeneuve d'Ascq

Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude envers Madame Hélène GRAS et Messieurs Daniel CAMUS, Patrick DELPLACE, Alain VERNES, Pierre CHARET et Luc PERRIN pour l'honneur qu'ils me font d'accepter de juger ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier Jean-François DUBREMETZ ainsi que tous les membres de l'INSERM U42 et du Service de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur qui par leurs conseils, leur aide, leur collaboration et leur amitié m'ont soutenu tout au long de ce travail et m'ont aidé à le réaliser.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> . . . . .	1
<b>GENERALITES</b> . . . . .	5
<b>I. CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>P. FALCIPARUM</i></b> . . . . .	6
I.1. Déroulement du cycle biologique. . . . .	6
I.2. Cycle intraérythrocytaire. . . . .	7
I.2.1. Le mérozoïte, rappels cytologiques. . . . .	7
I.2.2. L'invasion. . . . .	8
I.2.3. La phase trophique. . . . .	8
I.2.4. La schizogonie. . . . .	9
<b>II. ACTIVITES PROTEOLYTIQUES DES <i>PLASMODIUM</i> AU COURS DU CYCLE     INTRAERYTHROCYTAIRE.</b> . . . . .	10
II.1. Protéases et dégradation de l'hémoglobine. . . . .	10
II.1.1. Endoprotéases acides. . . . .	11
II.1.2. Endoprotéases neutres ou basiques. . . . .	14
II.1.3. Exoprotéases. . . . .	16
II.2. Protéases et réinvasion. . . . .	17
II.2.1. Protéases et invasion. . . . .	17
II.2.2. Protéases et libération des mérozoïtes. . . . .	23
II.3. Protéases et transformation antigénique. . . . .	24
II.3.1. Antigène de 225 kD . . . . .	24
II.3.2. P76 . . . . .	25
II.3.3. GPB 130 . . . . .	25
II.3.4. GP 190 . . . . .	26
II.3.5. P230 . . . . .	28
II.3.6. P126 . . . . .	28
<b>MATERIELS ET METHODES</b> . . . . .	33
<b>I. TECHNIQUES DE CULTURE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i></b> . . . . .	34

I.1. Culture <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> . . . . .	34
I.1.1. Entretien des parasites. . . . .	34
I.1.2. Cryopréservation des souches de <i>P. falciparum</i> . . . . .	34
I.1.2.1. Congélation. . . . .	35
I.1.2.2. Décongélation. . . . .	35
I.2. Synchronisation des parasites par le sorbitol. . . . .	35
I.3. Purification des schizontes sur métrizamide. . . . .	36
I.4. Action des inhibiteurs de protéases sur une culture de <i>Plasmodium falciparum</i> . . . . .	37
I.4.1. Protocole expérimental. . . . .	37
I.4.2. Méthodes d'observation. . . . .	38
I.4.2.1. Microscopie photonique. . . . .	38
I.4.2.2. Microscopie électronique. . . . .	38
I.5. Marquage radioactif métabolique. . . . .	39
II. PURIFICATION DE PROTEINES PAR AFFINITE. . . . .	39
II.1. Préparation des immunoabsorbants. . . . .	40
II.1.1. Production d'anticorps monoclonaux. . . . .	40
II.1.2. Purification des AcMc à partir d'ascites de souris. . . . .	40
II.1.3. Couplage des IgGs purifiées sur un gel de Sepharose 4B-CNBr . . . . .	41
II.2. Immunoabsorption d'antigènes radiomarqués. . . . .	41
II.2.1. Solubilisation des antigènes radiomarqués par le NP40. . . . .	41
II.2.2. Comptage de radioactivité. . . . .	42
II.2.3. immunoabsorption. . . . .	42
II.3. Chromatographie d'affinité d'antigènes du milieu de culture. . . . .	43
III. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES. . . . .	44
III.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE). . . . .	44
III.2. Coloration des protéines. . . . .	44
III.2.1. Par le bleu de coomassie. . . . .	44
III.2.2. Par le nitrate d'argent. . . . .	45

III.3. Immunoélectrotransfert des protéines (Western blotting). . . . .	46
III.4. Autoradiographie. . . . .	47
IV. MICROSEQUENCAGE DES PROTEINES. . . . .	47
V. TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES. . . . .	48
V.1. Utilisation de la P56 comme substrat. . . . .	48
V.1.1. Protéolyses tryptiques comparées des P56, P50 et P126. . . . .	48
V.1.2. Protéolyse de la P56 <i>in vitro</i> . . . . .	48
V.1.3. Protéolyse de la P56 en présence de parasites. . . . .	49
V.2. Autres substrats. . . . .	49
IV.2.1. Galeries API. . . . .	49
IV.2.2. Gélatine SDS-PAGE. . . . .	50
<b>RESULTATS</b> . . . . .	52
I. ETUDE DE LA PROTEOLYSE DE LA P126. . . . .	53
I.1. Action des inhibiteurs de protéases sur <i>P. falciparum</i> . . . . .	53
I.1.1. Action des inhibiteurs en culture. . . . .	53
I.1.1.1. Effets sur la libération des mérozoïtes. . . . .	53
I.1.1.2. Effets morphologiques. . . . .	54
I.1.1.2.1. En microscopie optique. . . . .	54
I.1.1.2.2. En microscopie électronique. . . . .	54
I.1.2. Action des inhibiteurs de protéases sur la P126. . . . .	55
I.1.2.1. Effet sur l'apparition de la P50. . . . .	55

I.1.2.2. Effet de la leupeptine sur les autres fragments de la P126. . . . .	57
I.1.2.3. Effet de la leupeptine et du E64 sur la P126 sur d'autres isolats de <i>P. falciparum</i> . . . . .	57
I.2. Protéolyse <i>in vitro</i> de la P126 et des fragments 56 et 50 kD par la trypsine. . . . .	58
II. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA PROTEOLYSE DU FRAGMENT P56. . . . .	58
II.1. Utilisation de la P56 comme substrat. . . . .	58
II.1.1. Elimination des inhibiteurs macromoléculaires du milieu de culture. . . . .	60
II.1.1.1. Dialyse du sérum contre le RPMI. . . . .	60
II.1.1.2. Utilisation du Caryoser comme substitut de sérum. . . . .	60
II.1.2. Mise en évidence de l'activité enzymatique dans le milieu de culture. . . . .	61
II.1.3. Caractérisation <i>in vitro</i> de l'activité protéasique par les inhibiteurs de protéases. . . . .	62
II.2. Recherche d'activités protéolytiques dans les extraits parasitaires avec d'autres substrats. . . . .	64
II.2.2. Substrats APIZYM. . . . .	64
II.2.3. Technique gélatine-SDS-PAGE. . . . .	65
III. RECHERCHE DES SITES DE COUPURE DE LA P126 PAR MICROSEQUENCAGE NH <sub>2</sub> -TERMINAL DES FRAGMENTS DE PROTEOLYSE. . . . .	66
III.1. Protéine P50. . . . .	68
III.1.1. Purification et contrôles. . . . .	68
III.1.2. séquence NH <sub>2</sub> -terminale. . . . .	68
III.2. Protéine P56. . . . .	69
III.2.1. Purification et contrôles. . . . .	69
III.2.2. séquence NH <sub>2</sub> -terminale. . . . .	69
III.3. Protéine P126. . . . .	69

III.4. Protéine P73 (P47 + P18).	70
III.4.1. Purification et contrôles.	70
III.4.2. séquences NH <sub>2</sub> -terminales.	71
<b>DISCUSSION</b>	<b>72</b>
I. PROTEOLYSE DE LA P126 ET INHIBITEURS DE PROTEASES.	73
I.1. Effet des inhibiteurs de protéases sur les schizontes.	73
I.2. La leupeptine et le E64 modifient la transformation de la P126.	75
II. CARACTERISATION DE LA PROTEOLYSE P56 --> P50.	78
II.1. Recherche de conditions permettant de préserver une activité enzymatique extraparasitaire.	78
II.2. Etude du substrat P56.	80
II.3. Etude d'autres substrats.	82
III. SITES DE COUPURES PROTEOLYTIQUES DE LA P126 PAR MICROSEQUENCAGE NH <sub>2</sub> -TERMINAL DES FRAGMENTS.	84
III.1. Protéines P50 et P56.	85
III.2. Protéine P126.	85
III.3. Protéine P73.	86
III.4. Activités protéasiques pouvant être responsables des sites de coupures déduits du microséquençage.	87
IV. ACTIVITE PROTEASIQUE DE LA P126 ?	88
<b>CONCLUSION</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>93</b>

## ABBREVIATIONS

4-AB	: 4 amino benzamidine
AEC	: Aminoéthyl carbazol
BIPC	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
Bq	: Becquerel
CAPS	: acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique
cpm	: coup par minute
DOC	: Désoxycholate de sodium
DIFP	: Diisopropylfluorophosphate
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
E64	: L-trans-époxysuccinyl-leucylamido(4-guanido) butane
GBP	: "Glycophorine Binding Protein"
HEPES	: Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N <sup>1</sup> -2-éthanesulfonique
IgG	: Immunoglobuline G
IADS	: Immunoabsorbant
kD	: Kilodalton
NEM	: N éthylmaléïmide
NP-40	: Nonidet P-40
NTB	: Nitro bleu de tétrazolium
PBS	: Tampon phosphate salin
pHMB	: p-hydroxymercuribenzoate
PIPLC	: Phospholipase C phosphatidyl inositol spécifique



PMSF : Phénylméthylsulfonyl fluoride  
PVDF : Polyvynylène difluoride  
RPMI : "Roswell Park Memorial Institute"  
RPMI/DS: Milieu RPMI contenant la fraction dialysable du sérum  
SDS : Dodécylsulfate de sodium  
SDS-PAGE: Elettrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS  
SERA : "Serine-repeat antigen"  
SERP I : "Serine protein I"  
STI : Inhibiteur trypsique du soja  
TCA : Acide trichloracétique  
TLCK : N- $\alpha$ -tosyl-lysine-chlorométhyl cétone  
TPCK : L-1-tosylamide-2-phényléthyl-chlorométhyl cétone  
TNT : Solution Tris-HCl, NaCl, Tween 20  
Tris : Tri hydroxyméthyl aminométhane

#### MOTS CLES

PLASMODIUM FALCIPARUM - PROTEOLYSE - INHIBITEURS DE PROTEASES -  
SEQUENCAGE NH<sub>2</sub>-TERMINAL -

## INTRODUCTION

Le paludisme représente une des maladie infectieuse les plus importantes dans le monde. D'après le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publié en 1989 (Relevé épidémiologique hebdomadaire. 1989, 64: 241-248), résumant la situation du paludisme en 1986 et 1987, 2117 millions d'habitants (soit 43% de la population mondiale, chiffre de 1987) vivent en zone d'endémie.

Entre 1985 et 1987, le nombre de cas déclarés de paludisme est resté stationnaire, se situant aux alentours de 5 millions par an, mais ce chiffre ne tient pas compte de l'Afrique pour laquelle les données sont insuffisantes et irrégulières (0,814 millions pour 1987). L'incidence du paludisme clinique dans le monde est estimé à quelque 103 millions de cas par an et la prévalence de l'infection pourrait être de l'ordre de 264 millions de porteurs de parasites.

On ignore presque totalement le niveau de la mortalité imputable au paludisme dans la plupart des zones d'endémie; une étude effectuée en Gambie en 1987 a révélé qu'environ 25% des décès de jeunes enfants (1-4 ans) pouvaient être attribués au paludisme.

L'agent pathogène du paludisme a été découvert par LAVERAN (1880) et son mode de transmission élucidé par ROSS (1897) à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Sur les quatre espèces de plasmodies qui infestent naturellement l'homme, *Plasmodium vivax* est la plus répandue, puisqu'on la rencontre dans toute la zone intertropicale et dans de nombreuses régions tempérées. Comme le paludisme à *Plasmodium ovale*, que l'on observe principalement en Afrique tropicale, le paludisme à *P. vivax* se caractérise par des rechutes, c'est à dire la réapparition des symptômes après une période de latence qui peut atteindre 5 années. *Plasmodium falciparum* est très répandu dans les zones tropicales et subtropicales et provoque la forme de paludisme la plus dangereuse. Quant à

*Plasmodium malariae*, il a une large distribution mais il est beaucoup moins fréquent que *P. vivax* ou *P. falciparum*.

Devant l'incidence considérable du paludisme sur la population et l'économie de nombreux pays en voie de développement, l'OMS a mis en place, dès les années cinquante, un programme d'éradication à l'échelle mondiale. L'emploi d'insecticide (DDT) contre les anophèles (moustiques vecteurs) ainsi que l'administration de chloroquine aux malades ont, dans un premier temps, fait reculer ce fléau. Cependant, dès 1965, l'apparition d'une résistance des moustiques aux insecticides d'une part et d'autre part des parasites à certains antimalariques, ont réduit à néant les progrès réalisés auparavant et ont même conduit à une recrudescence de la maladie dans certains pays tels que l'Inde ou la Thaïlande.

Parallèlement à la recherche de nouvelles molécules aux propriétés antimalariques pour pallier à ces phénomènes de résistance, les recherches se sont orientées vers la mise au point d'un vaccin anti-palustre. De récentes tentatives de vaccination de l'homme contre *P. falciparum* (HERRINGTON *et al.* 1987, PATARROYO *et al.* 1988), utilisant des peptides synthétiques dérivés des stades sporozoïtes et mérozoïtes, ont donné des résultats très intéressants mais cependant limités.

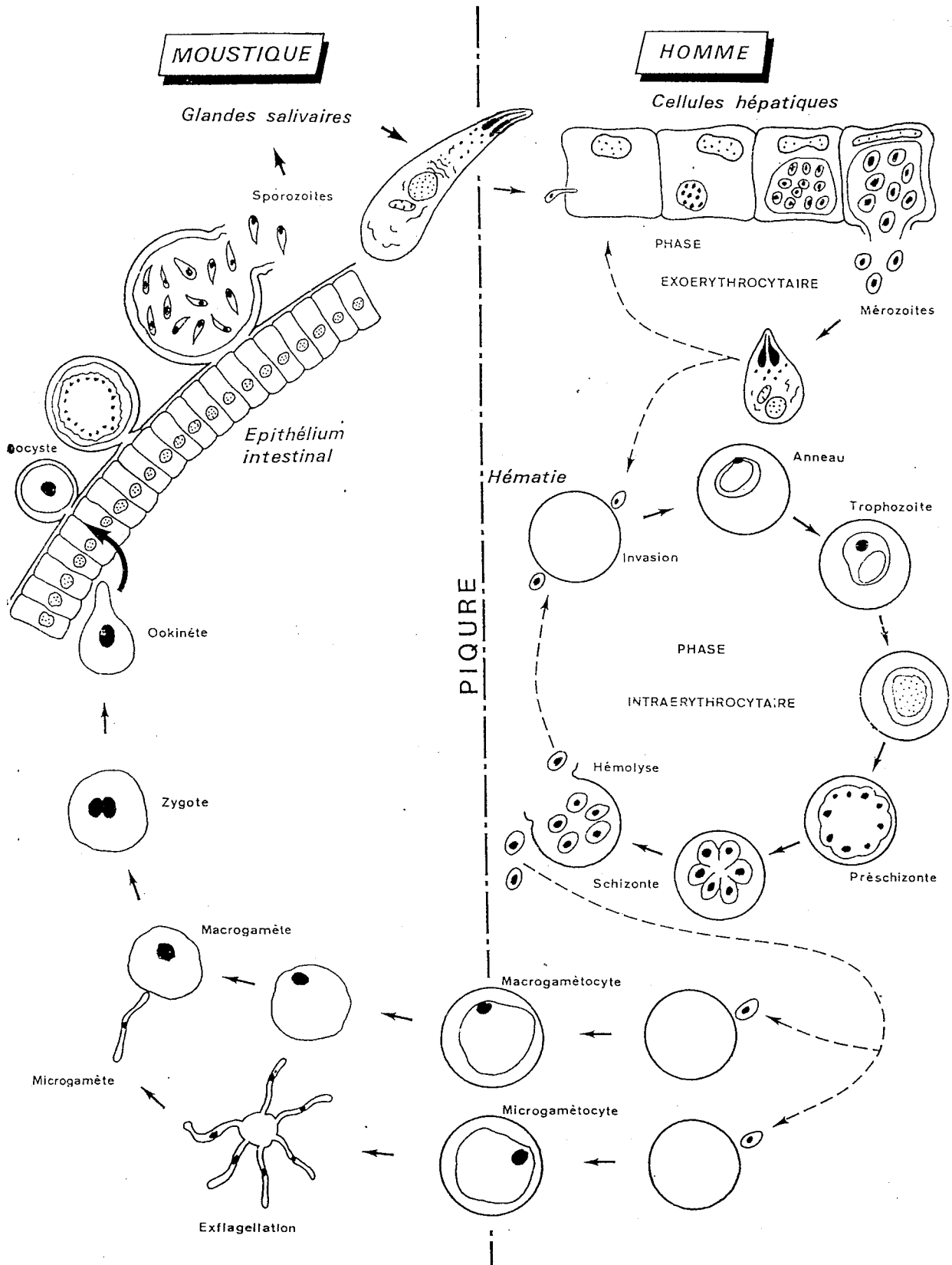
La découverte d'activités enzymatiques de certaines protéines immunogènes étudiées dans la recherche d'un vaccin antipaludique ouvrent la voie à d'autres applications. Ainsi la séquence du gène de la protéine 41 kD décrite par PERRIN *et al.* (1981) a permis de l'identifier comme une aldolase (CERTA *et al.* 1988). Le rôle de cet enzyme pour le parasite n'est pas encore établi. En revanche, l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes pourrait dépendre en particulier d'une protéase de type sérine protéase (BRAUN BRETON *et al.* 1988) dont l'activité est régulée par un autre enzyme de type

phospholipase C. Ces enzymes joueraient donc un rôle clé dans le développement du parasite. En dehors de leur intérêt comme candidat pour un vaccin, ces protéines pourraient être d'excellentes cibles pour des médicaments antipaludéens. Ainsi une autre voie est ouverte concernant la recherche d'un enzyme vital pour le parasite, même non immunogène, et de médicaments capables d'inhiber son activité (LANGSLEY, 1988).

L'objectif de notre travail a été d'étudier la protéolyse de la protéine P126 (DELPLACE *et al.* 1985) qui semble être liée aux phénomènes intervenant lors de l'éclatement des formes matures (schizontes) à la fin du cycle intra-érythrocytaire et dont la protéolyse est modifiée, parallèlement à un blocage de l'éclatement des schizontes, par des inhibiteurs de protéases très spécifiques.

**GENERALITES**

**CYCLE DE PLASMODIUM FALCIPARUM.**



## I. CYCLE BIOLOGIQUE DE *P. FALCIPARUM*.

### I.1. Déroulement du cycle biologique.

*P. falciparum* est l'une des quatre espèces de *Plasmodium* inféodées à l'homme avec *P. vivax*, *P. malariae*, et *P. ovale*.

Son cycle de développement implique un hôte intermédiaire: l'homme, chez lequel se produit une multiplication asexuée du parasite par schizogonie et un hôte définitif: le moustique du genre *Anopheles* où se déroule la multiplication sexuée (cf. cycle ci-contre).

Lors d'un repas sanguin, l'anophèle femelle inocule des sporozoïtes qui vont envahir rapidement les cellules hépatiques. Dans le foie se déroule la phase exoérythrocytaire du cycle aboutissant à la formation du schizonte hépatique. Celui-ci éclate et libère plusieurs centaines de mérozoïtes dans la circulation sanguine. C'est le début de la phase érythrocytaire. Le mérozoïte pénètre une hématie et s'y développe en passant par les stades anneau, trophozoïte puis schizonte. L'éclatement du schizonte mature libère 16 nouveaux mérozoïtes qui vont pouvoir envahir d'autres hématies et recommencer le cycle intraérythrocytaire.

Dans l'hématie, certains parasites subissent une différenciation sexuée en gamétocytes mâles et femelles qui, ingérés par le moustique lors d'une piqûre, se transforment dans son estomac en microgamètes et macrogamètes. La fécondation aboutit à la formation d'un oeuf mobile ou ookinète qui se loge sous la paroi stomacale. Il évolue en oocyste où vont s'individualiser par division les sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère les sporozoïtes qui colonisent les glandes salivaires du moustique. Ils peuvent alors initier un nouveau cycle chez l'homme.



## I.2. Cycle intraérythrocytaire.

### I.2.1. Le mérozoïte, rappels cytologiques.

(AIKAWA et STERLING, 1974)

Le mérozoïte est une cellule subsphérique d'environ 1,5  $\mu\text{m}$  de longueur et 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, recouverte d'un manteau fibrillaire. La pellicule du mérozoïte est composée d'une membrane externe, le plasmalemme et du complexe membranaire interne. Ce complexe est formé de deux membranes unitaires étroitement accolées correspondant à des vésicules aplaties recouvrant la totalité de la surface du mérozoïte excepté au niveau du cytostome (dans la partie médiane) et de l'extrémité apicale.

Des microtubules sous-pelliculaires, issus d'un anneau d'insertion situé à la base complexe apical, s'étendent le long du mérozoïte à intervalles réguliers sous le complexe membranaire interne. L'anneau d'insertion des microtubules sous pelliculaires est surmonté par deux anneaux apicaux. C'est au niveau de cette structure que sont insérés les pédoncules de deux organites appelés rhoptries. Ce sont des vésicules piriformes d'environ 200 nm de diamètre ayant un contenu dense aux électrons. Il existe deux autres types de vésicules localisées essentiellement dans la partie antérieure et qui sont les micronèmes et les granules denses. Ces organites ont une taille inférieure aux rhoptries, les granules denses sont sphériques tandis que les micronèmes sont plus allongés.

Le mérozoïte renferme outre ces différenciations cytologiques caractéristiques et son noyau, tous les organites présent dans dans une cellule eucaryote mais qui sont très peu développés (mitochondries, ribosomes réticulum endoplasmique etc.). Le noyau est situé dans la partie centrale ou postérieure de la cellule qui ne renferme qu'une seule mitochondrie.

### I.2.2. L'invasion.

Le mérozoïte, après s'être accolé sans orientation préférentielle à la surface d'une hématie, subit une réorientation qui amène son extrémité apicale au contact de la membrane de la cellule hôte. Une jonction caractéristique s'établit entre les deux plasmalemmes. Elle a d'abord une forme de calotte sphérique, puis devient un anneau qui glisse le long du mérozoïte jusqu'à son extrémité postérieure. Cette jonction mobile laisse place derrière elle, du côté de la cellule hôte, à une membrane vacuolaire, qui finit par enfermer complètement le mérozoïte dans une vacuole parasitophore se séparant du plasmalemme de la cellule hôte.

Le revêtement fibrillaire recouvrant le mérozoïte disparaît au niveau de la jonction au fur et à mesure que ce dernier pénètre dans le globule rouge. Bien que la membrane vacuolaire soit pendant toute sa formation en continuité avec le plasmalemme de l'hématie par l'intermédiaire de la jonction mobile, elle en est morphologiquement distincte, en particulier par sa déplétion totale en particules intramembranaires. Le contenu des rhoptries, et peut-être celui des micronèmes, est exocyté pendant l'invasion et contribuerait à la formation de la vacuole parasitophore.

### I.2.3. La phase trophique.

Après l'invasion, le mérozoïte perd rapidement les restes du complexe apical, les microtubules ainsi que le complexe membranaire interne et évolue en trophozoïte. Il commence par s'étirer pour prendre la forme d'une cupule qui se referme progressivement sur une portion de cytoplasme érythrocytaire. Le parasite acquiert ainsi la forme dite en anneau, renfermant la première vacuole digestive. Il grossit, et ingère de nouvelles vacuoles par l'intermédiaire d'une

structure dérivée de la vacuole initiale ou d'un micropore et nommée tube cytotomal (SLOMIANNY *et al.*, 1985).

La digestion de l'hémoglobine jusqu'au stade acides aminés par le parasite implique un système enzymatique complexe dont certaines activités protéasiques sont connues et seront décrites plus loin (cf. chapitre II.1.). Cette dégradation conduit à l'accumulation d'un résidu contenant en particulier l'hème, qui cristallise pour former le pigment malarique. Celui-ci est rassemblé dans une vésicule résiduelle unique.

#### I.2.4. La schizogonie.

Le parasite passe du stade trophozoïte au stade schizonte lorsque la division nucléaire a commencé, environ 24 h après l'invasion. Un fuseau de division intranucléaire s'organise. Il est constitué d'un faisceau de microtubules dont les pôles restent fixés à l'enveloppe nucléaire au niveau de pores nucléaires modifiés constituant les centres d'organisation des microtubules (équivalents des centrioles). Chez *P. falciparum* quatre cycles mitotiques se succèdent pour donner 16 noyaux fils à l'origine des 16 mérozoïtes.

Parallèlement à la dernière division nucléaire, se déroule la différenciation des mérozoïtes. La mitochondrie augmente en taille, bourgeonne et donne finalement plusieurs mitochondries filles. Les organites de la zone apicale, se différencient et s'organisent ainsi que le complexe membranaire interne et les microtubules sous-pelliculaires. Un découpage cytoplasmique du schizonte s'effectue, les mérozoïtes s'individualisent et se séparent du résidu cytoplasmique ne contenant plus que le pigment malarique.

Les mérozoïtes sont ensuite libérés par éclatement de la cellule hôte, phénomène dont le mécanisme est encore inconnu mais pourrait impliquer des activités protéolytiques parasitaires (cf. paragraphes II.2.2. et II.3.). Notre

travail a concerné la protéolyse d'une molécule de 126 kD localisée dans la vacuole parasitophore, et qui donne naissance à plusieurs fragments libérés dans le milieu de culture lors de la libération des mérozoïtes (DELPLACE *et al.*, 1985 et 1987).

## II. ACTIVITES PROTEOLYTIQUES DES *PLASMODIUM* AU COURS DU CYCLE INTRAERYTHROCYTAIRE.

### II.1. Protéases et dégradation de l'hémoglobine.

La croissance de *Plasmodium* dans l'hématie nécessite une grande quantité d'acides aminés indispensables pour les synthèses protéiques. Ceux-ci proviendraient en partie de la dégradation de l'hémoglobine de la cellule hôte (SHERMAN *et al.*, 1979, CHARET *et al.*, 1984).

Pour dégrader une protéine comme l'hémoglobine jusqu'au stade d'acides aminés il faut un système enzymatique comprenant des endopeptidases et des exopeptidases (CHARET *et al.* 1984). Un problème majeur dans la recherche de telles activités est de pouvoir discerner si les enzymes identifiés dans des extraits parasitaires sont bien d'origine parasitaire ou sont des contaminants de la cellule hôte.

### II.1.1. Endoprotéases acides.

COOK *et al.* (1961) ont été les premiers à identifier deux endoprotéinases, ayant des pH optimum de 4 et 8 chez *Plasmodium berghei*, et 5 et 8 chez *Plasmodium knowlesi*. Dans chaque cas, la protéase alcaline était la plus active.

LEVY et CHOU (1973) comparent l'activité protéolytique des globules rouges normaux et parasités par *P. berghei*. Ils trouvent, dans chaque cas, une forte activité à pH acide, vis à vis de l'hémoglobine native. Cette activité étant 5 à 10 fois plus active dans les hématies parasitées que dans les hématies saines, ils suggèrent l'existence d'un enzyme strictement parasitaire. Ces auteurs ont ensuite purifié et comparé les propriétés physicochimiques des enzymes responsables de cette activité, leur matériel de départ étant soit le globule rouge normal, soit le parasite libéré de la cellule hôte (LEVY et CHOU, 1974). Ils constatent que les enzymes ne possèdent pas de propriétés permettant de les différencier. Ils obtiennent les mêmes résultats avec *P. knowlesi* et *P. falciparum* parasitant respectivement les hématies de singes Rhésus et Aotus (LEVY *et al.*, 1974).

Les propriétés physicochimiques de ces activités à pH acide correspondent aux propriétés de la cathepsine D isolée par REICHELDT *et al.* (1974), à partir d'hématies humaines. Cet enzyme se caractérise par une grande spécificité d'action vis à vis de l'hémoglobine à pH acide et est fortement inhibé par la pepstatine.

HEMPELMAN et WILSON (1980), ont étudié la mobilité électrophorétique de la cathepsine D d'hématies de singes parasités ou non par *P. knowlesi*. Ils ont révélé la présence d'enzymes différents dans les hématies parasitées par rapport aux hématies saines. Cela a conduit ces auteurs à conclure à la présence d'une

cathepsine D spécifique du parasite. Cet enzyme a également été décrit chez *Plasmodium lophurae* (SHERMAN et TANIGOSHI, 1981).

GYANG *et al.* (1982), décrivent, chez *P. falciparum*, une protéase acide qui dégrade l'hémoglobine. Elle possède un pH optimum de 3.5, et une grande sensibilité à la pepstatine. Ces auteurs indiquent qu'elle ressemble à la cathepsine D des mammifères bien que sa masse moléculaire apparente, 148.000 daltons, soit bien supérieure aux masses moléculaires décrites pour ces enzymes: 40.000-45.000 ou, exceptionnellement deux fois ces valeurs (YAGO et BOWERS, 1975, BARRETT, 1977).

AISSI *et al.* (1983), travaillant sur des extraits enzymatiques de *Plasmodium yoelii nigeriensis*, ont montré que les protéases acides (cathepsines D) présentent la même migration électrophorétique dans les extraits parasitaires et dans les extraits d'hématies de souris non parasitées, et qu'elles ne diffèrent que par leurs pHi. Malheureusement, ces auteurs indiquent qu'ils n'ont pas pu déterminer ces valeurs de pHi de façon rigoureuse et qu'ils n'ont donc pas pu conclure sur l'origine parasitaire de l'enzyme.

Plus récemment, VANDER JAGT *et al.* (1986), ont caractérisé, chez *P. falciparum*, une protéase (protéase S, présente dans la fraction soluble d'un lysat parasitaire) de faible masse moléculaire (inférieure à 10.000 daltons), capable de dégrader l'hémoglobine dénaturée. L'hydrolyse est maximum à pH 4,5, mais une forte activité est également observée à pH 6. L'inhibition de la protéase S par la pepstatine est importante, mais est cependant bien inférieure à celle observée pour les cathepsines D.

Lors d'une étude comparée sur les protéases des souches de *P. falciparum* sensibles et résistantes à la chloroquine, VANDER JAGT *et al.* (1987), ont isolé

quatre protéases acides capables de dégrader l'hémoglobine. Les protéases acides de la souche chloroquino-sensible comprennent la protéase S (décrite plus haut) dans la fraction soluble, un enzyme faiblement associé à la membrane (protéase  $M_2$ ), et deux enzymes fortement associés à la membrane (protéases  $M_3$  et  $M_4$ ). Pour la souche chloroquino-résistante, sont isolées les protéases S,  $M_2$ , une autre protéase faiblement associée à la membrane ( $M_1$ ), et  $M_3$ . Ces protéases ont été récemment caractérisées par rapport à l'action d'inhibiteurs de protéases (VANDER JAGT *et al.*, 1989). Cependant, les similarités observées parmi ces protéases des souches sensibles et résistantes suggèrent à ces auteurs que la résistance à la chloroquine ne résulte pas d'une modification des protéases parasitaires.

SATO *et al.* (1987), décrivent une protéase acide extraite d'un lysat de parasite de *P. berghei*. Ses caractéristiques sont: une grande activité à dégrader l'hémoglobine, un pH optimum de 3,2, une masse moléculaire apparente de 18.000-20.000 daltons, une inhibition spécifique par la pepstatine. Ces auteurs concluent que cet enzyme présente les caractéristiques d'une cathepsine D.

ROSENTHAL, *et al.* (1987), identifient chez *P. falciparum*, trois protéases spécifiques des stades anneau, trophozoïte, schizonte. Ces activités enzymatiques sont révélées dans un gel de polyacrylamide dans lequel a été copolymérisé la gélatine comme substrat (HEUSSEN et DOWDLE, 1980).

La protéase de 28 kD, spécifique du stade trophozoïte est inhibée par la leupeptine et par le E-64 (inhibiteurs des cystéines protéases). Elle a un pH optimum de 6.0 qui est proche du pH de 5.3 calculé pour la vacuole digestive (YAYON *et al.* 1985; KROGSTAD *et al.* 1985) dans laquelle l'hémoglobine est dégradée.

L'implication de la protéase 28 kD dans la dégradation de l'hémoglobine a été confirmée dans des travaux qui suivirent (ROSENTHAL *et al.* 1988). En effet,

la leupeptine ainsi que le E64 provoquent la formation dans les trophozoïtes d'une grosse vacuole renfermant de l'hémoglobine non digérée. Dans ce cas la protéase n'est plus détectée en gel. De plus, ces auteurs ont localisé en microscopie électronique de la leupeptine tritiée dans ces vacuoles. Compte tenu des propriétés biochimiques de la protéase 28 kD des trophozoïtes (spécificité de substrat, profil de pH, sensibilité aux inhibiteurs), ces auteurs l'ont assimilée à la cystéine protéase cathepsine L lysosomale.

Dans de récents travaux, ROSENTHAL *et al.* (1989), ont confirmé cette hypothèse en examinant l'effet de composés, peptidyl diazométhyl-cétones et peptidyl fluorométhyl-cétones, qui inhibent spécifiquement les cathepsines B et L, mais pas les autres classes ou sous-classes des cystéines protéases.

#### II.1.2. Endoprotéases neutres ou basiques.

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre précédent, COOK *et al.* (1961), ont mis en évidence une activité enzymatique importante à pH basique (7-8), vis à vis de l'hémoglobine dénaturée, dans des extraits parasitaires de *P. knowlesi* et *P. berghei*. Bien que le globule rouge normal présente une activité protéolytique possédant le même pH optimum, les auteurs en concluaient que l'enzyme des extraits parasitaires était d'origine plasmodiale, en s'appuyant sur le fait qu'il est inhibé par le diisopropylfluorophosphate (DIFP) alors que la protéase globulaire ne l'est pas.

GYANG *et al.* (1982), signalent qu'il existe, dans les extraits de *P. falciparum* obtenus par cultures *in vitro*, un enzyme capable de dégrader le substrat de synthèse N-acéthyl-alanine-4-nitroaniline à pH 8.



AISSI *et al.* (1983), ont caractérisé, dans les extraits parasitaires de *Plasmodium* de rongeurs, une activité enzymatique identique contre le substrat de synthèse N-acétyl-L-alanine-4-nitro-anilide. Cette activité endo arylamidase semble être spécifique du parasite car sa température optimale diffère de celle du globule rouge (respectivement 47°C et 60°C). Ils proposent l'intervention de cet enzyme dans la dégradation de l'hémoglobine, en s'appuyant sur le fait qu'il leur a été, par la suite, possible de le localiser au niveau du site cellulaire de dégradation (SLOMIANNY *et al.*, 1983). Quant au rôle de cette endoarylamidase dans le processus de dégradation de l'hémoglobine, ces auteurs proposent deux hypothèses (CHARET *et al.*, 1984):

- La première: l'endoarylamidase est une peptidase vraie et elle intervient directement dans la séquence de dégradation:

Hémoglobine -----> polypeptides -----> peptides -----> amino-acides + hème  
                           *Cathepsine D*                          *Endopeptidase*                          *Aminopeptidase*

- La seconde: l'endoarylamidase active certains facteurs qui permettent l'action de la cathepsine et de l'aminopeptidase.

### II.1.3. Exoprotéases.

CHARET *et al.* (1980), décrivent une activité aminopeptidase chez *P. yoeli nigeriensis* et *P. chabaudi*, contre les substrats synthétiques L-leucine-p-nitroanilide et L-alanine-p-nitroanilide. Les propriétés biochimiques de ces enzymes sont très similaires: pH optimum 7, température optimum 42 pour *P. yoeli nigeriensis*. et 50°C pour *P. chabaudi*, masses moléculaire identiques 90.000 daltons, points isoélectriques: 5,3 pour *P. yoeli nigeriensis*. et plusieurs pHi à 5,5; 5,6;5,7;5,8 pour *P. chabaudi*.

Une aminopeptidase équivalente a été décrite par GYANG *et al.* (1982) chez *P. falciparum*, avec cependant une masse moléculaire plus importante: 186.000 daltons.

VANDER JAGT *et al.* (1984), ont caractérisé une autre aminopeptidase chez *P. falciparum*, en utilisant les même substrats synthétiques. Cet enzyme a une masse moléculaire de 100.000 daltons et est fortement inhibée par la bestatine et le phosphoramidon. Ces auteurs pensent que cette aminopeptidase est probablement localisée dans le cytosol plutôt que dans la vacuole digestive acide, compte tenu du profil de pH obtenu. Selon ces auteurs les peptides obtenus par digestion de l'hémoglobine dans la vacuole digestive sont hydrolysés en acides aminés par des peptidases localisées à l'extérieur de cette vacuole.

Ces même auteurs ont comparé les protéases des souches chloroquinosensibles et chloroquinorésistantes de *P. falciparum* (VANDER JAGT *et al.* 1987). Ils ont retrouvé, entre autres, l'aminopeptidase décrite précédemment dans les deux souches. Ces enzymes ont une masse moléculaire identique de 63.000 daltons (obtenue par une technique différente que pour la première détermination). Cependant, ces enzymes présentent des sensibilités à la chloroquine très voisines, qui ne permettent pas d'expliquer la sensibilité ou

la résistance à la chloroquine de ces deux souches par une simple altération au niveau de cette aminopeptidase.

## II.2. Protéases et réinvasion.

La réinvasion est une étape très brève (quelques minutes) mais capitale du cycle intraérythrocytaire. Elle peut être divisée en trois phases principales qui sont: l'éclatement du schizonte mature avec la libération des mérozoïtes, une phase de reconnaissance pendant laquelle interviennent des interactions spécifiques entre le mérozoïte et les composants de la membrane de l'érythrocyte, et une phase d'internalisation du mérozoïte dans l'hématie.

Bien que la réinvasion ait été étudiée par de nombreux auteurs, l'ensemble des processus impliqués est loin d'être élucidé. Plusieurs activités protéolytiques ont cependant été décrites, liées à l'une ou l'autre des étapes de la réinvasion. Ces activités ont été soit déduites de l'activité d'inhibiteurs de protéases très spécifiques, soit purifiées et très bien caractérisées.

### II.2.1. Protéases et invasion.

Pour expliquer des observations telles que la disparition du manteau fibrillaire du mérozoïte, la formation de la jonction mobile, et la disparition de particules intramembranaires lors de la formation de la vacuole parasitophore pendant les interactions entre le mérozoïte et l'érythrocyte, l'implication de protéases parasitaires dans le processus d'invasion a été postulée (LADDA *et al.*, 1969; AIKAWA *et al.*, 1978; McLAREN *et al.* 1979). BANYAL *et al.* (1978) ont suggéré que les mérozoïtes isolés possédaient de puissants enzymes protéolytiques. Ils ont démontré l'existence de protéases dans les mérozoïtes de *P. knowlesi in vitro*

(BANYAL *et al.*, 1980), et ont rapporté pour la première fois l'implication de protéases parasitaires dans l'interaction entre le parasite et l'érythrocyte chez *P. knowlesi*, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de protéases (BANYAL *et al.*, 1981). La présence de ces inhibiteurs est sans effet sur la libération des mérozoïtes mais inhibe l'entrée des parasites dans les globules rouges. Ainsi, à 50 µg/ml, la chymostatine et la leupeptine bloquent complètement la réinvasion, tandis que la pepstatine et l'élastatinal n'entraînent que 50% d'inhibition et le phosphoramidon 30%. Le prétraitement des érythrocytes avec ces inhibiteurs ne bloque pas l'invasion. Ces auteurs proposent donc que les mérozoïtes sécrètent des protéases similaires à la trypsine et à la chymotrypsine et qu'elles jouent un rôle dans l'invasion.

Il faut cependant noter que dans des travaux antérieurs de LEVY et CHOU (1975), chez *P. berghei*, sur l'inhibition des synthèses macromoléculaires par les inhibiteurs de protéases, la pepstatine à 0,25 µg/ml provoquait une diminution de 50% de l'incorporation d'isoleucine tritiée dans les protéines. D'autres inhibiteurs affectaient également le développement intracellulaire du parasite. Ceci ne semble pas être le cas chez *P. knowlesi* d'après les observations réalisées par BANYAL *et al.* (voir ci dessus).

L'utilisation de mérozoïtes isolés de *P. knowlesi* pour effectuer des tests d'invasion a permis à HADLEY *et al.* (1983) de montrer que la chymostatine, le N- $\alpha$ -tosyl-lysine chloromethyl ketone (TLCK), le L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chloromethyl-ketone (TPCK), provoquent une inhibition significative de l'invasion. Par contre, la leupeptine, l'antipain, la pepstatine et le phenylmethanesulfonyl-fluoride (PMSF) n'ont que très peu ou pas d'effet. De plus, le TLCK et le TPCK inhibent l'attachement des mérozoïtes aux érythrocytes tandis que la chymostatine, au contraire, n'a aucun effet sur l'attachement mais semble inhiber spécifiquement une protéase nécessaire à l'invasion.

DEJKRIENGKRAIKHUL et WILAIRAT, (1983), décrivent une protéase de type chymotrypsine impliquée dans l'entrée des mérozoïtes de *P. falciparum* (isolat K1, Thaïlande) dans les érythrocytes humains. Afin de faire la distinction entre un effet toxique et une action spécifique sur la réinvasion, ces auteurs ont observé l'action d'inhibiteurs de protéases sur la croissance de jeunes stades (incubés 24h en présence d'inhibiteurs) et sur des schizontes (incubés 15h). Pour des concentrations supérieures à 50  $\mu$ M, la leupeptine, la pepstatine, le TLCK ont un effet toxique sur la croissance et inhibent l'invasion, tandis que l'antipaïne, l'alpha-1-antitrypsine, l'aprotinine, le Soybean Trypsin Inhibitor (STI) jusqu'à des concentration de 500 mM, n'ont pas d'effet sur la croissance ni sur l'invasion. Seuls la chymostatine, le PMSF et le TPCK, des inhibiteurs de la chymotrypsine, bloquent l'invasion et ne perturbent pas la croissance du parasite (50% d'inhibition pour une concentration inférieure à 1 mM). Pour vérifier si la chymostatine, le PMSF et le TPCK agissaient sur la libération des mérozoïtes ou sur l'invasion, des schizontes ont été préincubés 20 mn à 37°C avec ces inhibiteurs (à une concentration environ 3 fois supérieure à celle nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition) avant le test de réinvasion. Une inhibition équivalente à celle obtenue sans prétraitement a été observée, sans apparition de forme dégénérées de schizontes, ce qui suggère à ces auteurs que ces inhibiteurs agissent plutôt au niveau de l'invasion que de la libération des mérozoïtes.

L'implication d'une protéase sensible à la chymostatine a également été suggérée dans l'invasion d'érythrocytes humains par des mérozoïtes de *P. falciparum*, (DLUZEWSKI *et al.*, 1986). Les essais ont été réalisés avec des schizontes matures (les mérozoïtes purifiés de *P. falciparum* sont le plus souvent non invasifs). Cependant, afin de savoir si la chymostatine empêchait l'attachement ou la pénétration, les érythrocytes ont été exposés à la chymotrypsine avant le test de réinvasion: les érythrocytes prétraités étaient

alors sensibles à l'invasion en présence de chymostatine. De plus, si la chymostatine était introduite dans les globules rouges (par formation de ghosts en présence d'inhibiteur) avant le contact avec les parasites, une réelle inhibition de l'invasion était observée. Une sérine protéase sensible à la chymostatine semble donc être directement impliquée dans le processus d'invasion. Ces auteurs pensent que cette activité est confinée au niveau de la jonction entre le parasite et la cellule hôte puisqu'il ne leur a pas été possible de la détecter dans un milieu d'éclatement de schizontes.

Plusieurs protéases neutres ont été caractérisées chez *P. falciparum*. Pourtant aucune corrélation n'a pu être réellement établie entre une protéase spécifique et un processus spécifique de la vie du parasite dépendant d'une protéase.

ROSENTHAL *et al.* (1987), ont identifié deux protéases de 35/40 kDa et 75 kDa spécifiques des stades schizonte et mérozoïte. La 35/40 kDa serait une cystéine protéase (similaire aux cathepsines B ou L) car inhibée par le L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanido) butane (E64). La 75 kDa appartiendrait au groupe des sérines protéases à cause de sa sensibilité au diisopropyl fluoro phosphate (DIFP). De par leur spécificité de stade, ces auteurs suggèrent que ces protéases sont impliquées dans le stade final de la différenciation du parasite intracellulaire ou dans les processus d'éclatement et d'invasion.

Les protéases susceptibles d'être impliquées dans l'invasion ont également été étudiées à l'aide d'une technique fluorométrique très sensible (SCHREVEL *et al.*, 1984) et de la technique gélatine-SDS-PAGE (SCHREVEL *et al.*, 1988).

Les substrats gluconoyl-VAL-LEU-GLY-LYS(ou ARG)-3-amino-9-éthylcarbazole (-AEC) sont sélectivement hydrolysés par une endopeptidase plasmodiale chez les souches de rongeurs *P. berghei* et *P. chabaudi*, ainsi que

chez la souche humaine *P. falciparum* (BERNARD et SCHREVEL, 1987; BERNARD *et al.*, 1987; GRELLIER *et al.*, 1989). Ces endopeptidases sont purifiées à partir d'un extrait soluble de schizontes, par chromatographie liquide à haute performance. Elles ont la même masse moléculaire apparente de 68 kDa déterminée en SDS-PAGE, et un optimum d'activité à pH 7,4.

Un antisérum de souris dirigé contre la fraction purifiée Pb 68 (*P. berghei*) réagit spécifiquement par immunoélectrotransfert avec la protéase Pb 68 dans un extrait brut et dans la fraction purifiée. Les endopeptidases Pb 68 et Pf 68 (*P. falciparum*) ont été localisées dans les schizontes et dans les mérozoïtes par immunofluorescence indirecte sur des mérozoïtes de *P. berghei* (fluorescence dans la région apicale des mérozoïtes) et par identification de l'activité Pf 68 dans les mérozoïtes libres de *P. falciparum*.

Pb 68 et Pf 68 appartiennent à la classe des cystéines protéases; elles sont fortement inhibées par le p-hydroxymercuribenzoate (pHMB), l'iodoacétamide et le N-éthylmaléïmide (NEM).

L'analyse par gélatine-SDS-PAGE de la fraction enrichie Pb 68 montre une bande protéolytique à 95 kDa et parfois une autre à 68 kDa. Dans des fractions brutes d'extraits de schizontes de *P. berghei* ou *P. falciparum*, deux bandes protéolytiques majeures à 95 kDa et 90 kDa sont détectées. Pendant des expériences de réinvasion avec *P. falciparum*, il est possible de retrouver la 95 kDa ainsi qu'une 40 kDa, dans les surnageants de culture obtenus dans un milieu semi-défini sans sérum.

Le rôle biologique de Pb 68 et Pf 68 est encore inconnu. Cependant, ces auteurs pensent que, comme l'endopeptidase Pf 68 a un maximum d'action à pH neutre et que des dérivés hydrophiles du substrat VAL-LEU-GLY-ARG-AEC sont capables de bloquer la réinvasion, la protéase Pf 68 pourrait être impliquée dans les processus intervenant entre la libération des mérozoïtes et l'invasion des érythrocytes.

En utilisant la même technique de gélatine-SDS-PAGE, BRAUN-BRETON *et al.* (1988), ont démontré que le traitement de mérozoïtes ou des membranes de schizontes de *P. falciparum* par une phosphatidylinositol-spécifique phospholipase C (PI-PLC) induit l'activation d'une protéase de 76 kDa (P76). La P76 est synthétisée dans les schizontes sous forme d'un précurseur membranaire de 83 kDa qui est rapidement transformé en P76 (BRAUN-BRETON *et al.*, 1986). Sur la base de sa sensibilité au PMSF et à la chymostatine, ainsi qu'à sa capacité à fixer le DIFP tritié (le DIFP se fixe spécifiquement sur le site actif des sérines protéases)(BRAUN-BRETON et PEREIRA DA SILVA, 1988), la forme soluble de la P76 a été caractérisé comme étant une sérine protéase. Des résultats publiés par deux laboratoires suggèrent que la P76 est associée aux rhoptries (SCHOFIELD *et al.*, 1986, CLARK *et al.*, 1987).

En ce qui concerne l'activité biologique de la P76, BRAUN-BRETON *et al.* proposent que cet enzyme soit activé par une PI-PLC endogène, déversé dans les rhoptries au moment de la réorientation du parasite sur le globule rouge (cf. paragraphe I.2.2.). La P76 activée serait ensuite libérée en même temps que le contenu des rhoptries et pourrait faciliter la formation de la jonction en hydrolysant *in situ* les glycoprotéines de surface de l'érythrocyte.

### II.2.2. Protéases et libération des mérozoïtes.

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, les protéases impliquées dans les phénomènes d'éclatement des schizontes et de libération des mérozoïtes sont le plus souvent associées à la transformation d'antigènes parasitaires.

HADLEY *et al.* (1983), ont observé sur des frottis, après l'action de la leupeptine ou de la chymostatine (à 50 µg/ml) sur des schizontes de *P. knowlesi*, de nombreux schizontes incomplètement éclatés, qui ressemblaient à des paquets



de mérozoïtes entourés par une membrane. Cependant, de telles formes parasitaires n'ont pas été signalées par DLUZEWSKI *et al.* (1986) lors de manipulations similaires.

Par contre, LYON et HAYNES (1986) ont montré que l'incubation de schizontes de *P. falciparum* avec un mélange à 10 µg/ml de leupeptine, chymostatine, pepstatine et antipaine provoquait une inhibition de la libération des mérozoïtes et conduisait à l'accumulation de groupes de mérozoïtes bien conservés autour du pigment malarique. Ces groupes de mérozoïtes étaient entourés par une membrane érythrocytaire perméable.

### II.3. Protéases et transformation antigénique.

Plusieurs protéines de *Plasmodium* sont synthétisées sous forme de précurseurs qui sont ensuite transformés pendant la maturation du schizonte ou lors de l'éclatement et de la libération des mérozoïtes. La maturation s'accompagne le plus souvent de coupures enzymatiques, qui peuvent être perturbées par des inhibiteurs de protéases spécifiques. Les produits de protéolyse sont retrouvés à la surface des mérozoïtes ou sous forme soluble dans le sérum ou le milieu de culture *in vitro*.

#### II.3.1. Antigène de 225 kD

ROGER *et al.* (1988), décrivent une protéine de 225 kD, chez *P. falciparum*, synthétisée pendant la schizogonie sous la forme d'un précurseur de 240 kD, rapidement transformé en une molécule de 225 kD. Il semble qu'il existe une accumulation du précurseur avant sa transformation, qui surviendrait à des temps variant d'une trentaine de minutes à environ quatre heures après sa synthèse.

La molécule est localisée dans les rhoptries, où elle semble avoir une distribution hétérogène. Associée à une zone latérale (peu dense aux électrons) dans les rhoptries immatures des jeunes schizontes, elle est retrouvée dans le pédoncule des rhoptries de mérozoïtes individualisés.

L'activité protéasique responsable de la protéolyse de la 240 kD en 225 kD n'a pas été étudiée.

### II.3.2. P76

Une autre protéine localisée dans les rhoptries de *P. falciparum* a été étudiée par BRAUN-BRETON *et al.* (1986). Son précurseur de 83 kD est protéolysé quelques minutes après sa synthèse en une protéine de 76 kD.

Ces auteurs ont ensuite montré que la protéine membranaire de 76 kD était une protéase de type sérine-protéase (cf. paragraphe II.2.1.). Cet enzyme n'est actif qu'après le clivage du domaine phospholipidique l'ancrant à la membrane par une phospholipase C de type phosphatidyl inositol spécifique (BRAUN-BRETON *et al.*, 1988).

Ici encore l'activité protéasique impliquée dans la protéolyse de la 83 kD en 76 kD n'a pas été identifiée.

### II.3.3. GPB 130

La GPB 130 (Glycophorin Binding Protein) est une protéine de *P. falciparum* qui possède la propriété de s'attacher aux glycophorines des globules rouges (PERKINS, 1984a). Elle est synthétisée par les trophozoïtes et accumulée dans les schizontes (BONNEFOY *et al.*, 1988; PERKINS, 1988).

PERKINS (1984b) a décrit cette protéine comme étant localisée à la surface des schizontes et des mérozoïtes. Les études ultérieures (BONNEFOY *et al.*, 1988, BIANCO *et al.*, 1987) ont en fait montré qu'elle était essentiellement localisée dans le cytosol érythrocytaire et ont expliqué sa présence dans le surnageant de culture comme le résultat de l'éclatement des schizontes, ou d'une sécrétion par les hématies parasitées par les schizontes. Cette molécule est également retrouvée dans le sérum de singes et d'humains infectés par *P. falciparum* (BONNEFOY *et al.*, 1988).

La GPB 130 est protéolysée en un triplet de trois polypeptides (P130, P100, et P80) qui sont retrouvés dans des préparations de mérozoïtes (PERKINS,

1988). Ces protéines sont éliminées des mérozoïtes par lavage, ce qui indique une faible association avec la surface du parasite.

Les protéases impliquées, et l'action des inhibiteurs de protéases dans la protéolyse de la GBP 130 n'ont pas encore été étudiées.

#### II.3.4. GP 190

La protéine P190 est l'antigène majeur de surface des schizontes de *P. falciparum* (HOLDER et FREEMAN, 1982). Cette protéine est synthétisée dans les trophozoïtes et les schizontes (HOLDER et FREEMAN, 1982; HALL *et al.*, 1984) comme une protéine membranaire ayant un ancrage de type glycosylphosphatidyl-inositol (HALDAR *et al.*, 1985), et est transformée lors de la maturation des mérozoïtes (FREEMAN et HOLDER, 1983).

A ce stade, la P190 est protéolysée en plusieurs polypeptides qui sont retrouvés à la surface des mérozoïtes (HOLDER et FREEMAN, 1984; HEIDRICH *et al.*, 1986; LYON *et al.*, 1986; McBRIDE et HEIDRICH, 1987). Ces fragments sont:

- une molécule de 83 kD, elle même transformée en molécule de 73 kD, puis 67 kD dans la souche Camp; ces fragments étant également retrouvés dans le milieu de culture (CAMUS *et al.*, 1987). La protéine P83 semble être associée à la matrice extracellulaire des mérozoïtes libres par une interaction avec la P42 (HEIDRICH *et al.*, 1986; McBRIDE et HEIDRICH, 1987), et serait perdue pendant l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes.

- une molécule de 42 kD (P42), qui correspond à la partie COOH-terminale de la P190, ancrée à la surface des mérozoïtes par un ancrage glycosylphosphatidylinositol. La P42 est à l'origine de 2 polypeptides de 19 kD et 15-18 kD.

- une molécule de 36 kD (P36), qui est le troisième produit majeur de protéolyse de la P190 retrouvé à la surface des mérozoïtes.

La transformation du précurseur s'accompagne également de la formation de produits intermédiaires de 150 kD et 110 kD.

Le gène codant pour la P190 a été cloné et séquencé (HALL *et al.*, 1984; HOLDER *et al.*, 1985; MACKAY *et al.*, 1985). La séquence protéique déduite du gène étant alors connue, l'organisation des fragments (P83, P42, P36) sur le précurseur devenait possible par un séquençage des parties NH<sub>2</sub>-terminale de ces derniers.

Le séquençage de la protéine de 83 kD a permis de déterminer que la séquence N-terminale de la P83 correspondait à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du précurseur (HOLDER *et al.*, 1985; STRYCH *et al.*, 1987). La fin de la séquence signal et le site de coupure par la signal peptidase ont alors pu être localisés sur la séquence peptidique déduite du gène.

Les séquences N-terminales des fragments 42 kD et 36 kD ont été déterminées par HEIDRICH *et al.* (1989). La P42 est située dans la partie C-terminale de la P190 et est obtenue par le clivage d'une liaison GLU-ALA. La P36 est située entre la P83 et la P42 et résulte de la coupure d'une liaison ASN-ASP.

Les protéases spécifiques impliquées dans la dégradation de la P190 n'ont pas encore été identifiées.

Cependant, quand la maturation des schizontes est conduite en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases dont la leupeptine, la chymostatine, l'antipaine et la pepstatine, LYON *et al.* (1986) observent une augmentation sélective de certains fragments de protéolyses de la P190 (83, 73, 66, 45 et 17 kD) à la surface des mérozoïtes. Les mérozoïtes obtenus dans ces conditions, apparaissent sous la forme de paquets entourés par la membrane érythrocytaire devenue perméable (cf. paragraphe II.2.2). L'augmentation de ces antigènes

pourrait refléter, d'après ces auteurs, une inhibition sélective de certaines protéases.

### II.3.5. P230

DAVID *et al.* (1984), ont étudié la protéolyse de l'antigène majeur de surface de *P. knowlesi*, la protéine de 230 kD, qui est l'équivalent de la 230 kD de *P. yoelii*, et de la P190 de *P. falciparum* (HOLDER et FREEMAN, 1982; FREEMAN *et al.* 1980).

La P230 est synthétisée pendant la schizogonie et localisée sur la membrane plasmique des jeunes schizontes. Cette protéine est protéolysée au moment de l'éclatement des schizontes et les produits de protéolyse (75, 57, 50 et 43 kD) sont retrouvés à la surface des mérozoïtes (DAVID *et al.*, 1984). Les protéases impliquées dans la protéolyse de cet antigène ne sont pas connues.

Cependant, ces auteurs révèlent l'existence d'une activité protéolytique, qui apparaît seulement dans les schizontes et les mérozoïtes. Cette activité, inhibée partiellement par le DIFP et complètement en présence de 1% de SDS, n'est pas responsable de la protéolyse spécifique de la P230, mais plutôt de sa dégradation pendant son extraction par les détergents. Des polypeptides de 200, 145 et 43 kD sont alors immunoprécipités sur un anticorps monoclonal anti 230-kD.

### II.3.6. P126

La P126 a été décrite indépendamment par différents auteurs à des masses moléculaires très différentes: 140 kD (PERRIN *et al.*, 1984), 105 kD (BANYAL et INSELBURG, 1985), 126 kD (DELPLACE *et al.*, 1985) et 113 kD (CHULAY *et al.*, 1987). Cette variation de masse moléculaire semble être liée aux techniques et méthodes utilisées pour sa détermination plutôt qu'à une réelle variabilité

suivant les souches. En effet, la masse moléculaire apparente de la P126 ne varie que de 126 kD à 128 kD pour dix isolats de *P. falciparum* (BATHIA *et al.*, 1987).

La P126 a été décrite dans notre laboratoire en utilisant le sérum d'un homme ayant vécu pendant plusieurs années en zone d'endémie (DELPLACE *et al.*, 1985). Les immunoglobulines provenant de ce sérum ont été purifiées et utilisées pour immunoprécipiter les antigènes libérés dans le surnageant de culture de *P. falciparum*. Plusieurs antigènes majeurs ont été identifiés, parmi ceux-ci un antigène de 50 kD, contre lequel ont été produits des anticorps monoclonaux (AcMc). Ces anticorps ont permis d'identifier dans les érythrocytes infectés par des schizontes une molécule précurseur de 126 kD.

La localisation du précurseur intraparasitaire a été réalisée avec un anticorps monoclonal par immunofluorescence indirecte et par immunodétection en microscopie électronique (DELPLACE *et al.*, 1987, COPPEL *et al.*, 1988, KNAPP *et al.*, 1989). La P126 n'est détectée que dans les formes trophozoïte et schizonte et est localisée dans la vacuole parasitophore. Elle semble y être stockée sous forme soluble et non associée aux membranes (ou très faiblement) comme le montrent des expériences de solubilisation par la saponine et par choc hypotonique (DELPLACE *et al.*, 1988).

Des essais d'immunisation ont été effectués chez le singe *Saimiri* avec la P126 purifiée à partir de schizontes de *P. falciparum* (souche UPA) par chromatographie d'affinité en utilisant un anticorps monoclonal (DELPLACE *et al.*, 1988). Les singes ont été immunisés par trois injections sous cutanées d'antigène purifié, à trois semaines d'intervalle. Quatre semaines après la dernière injection, les animaux ont été splénectomisés et les cellules spléniques utilisées pour des tests de transformation lymphoblastiques. Un mois après la splénectomie, les singes ont été infectés expérimentalement par *P. falciparum* (UPA).

Suite à l'infection expérimentale, les deux singes témoins ont développés une infection aigüe, tandis que deux singes immunisés sur les trois ont éliminé leurs parasites sans traitement. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par PERRIN *et al.* (1984) qui ont induit une protection contre l'infection par *P. falciparum* (souche Palo Alto) chez les singes *Saimiri* en utilisant l'antigène 140 kD purifié par électro-élution après SDS-PAGE.

La P126 induit donc une immunité protectrice relative contre l'infection par *P. falciparum* chez les singes *Saimiri*. Par ailleurs, les résultats des tests de transformation lymphoblastiques semblent montrer que l'immunité cellulaire joue un rôle dans cette protection (DELPLACE *et al.*, 1988).

Face à cette immunité protectrice relative induite par la P126, différentes équipes ont entrepris le clonage et le séquençage du gène de cette molécule.

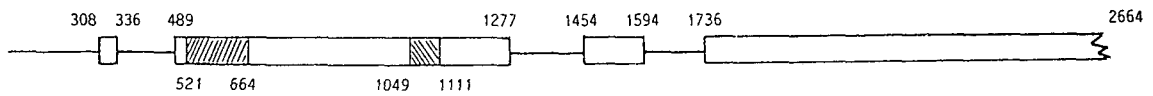
WEBER *et al.* (1987), publient le clonage et le séquençage d'une portion du gène de la P126 (souche CAMP) codant pour 139 amino-acides. Une particularité de cette séquence est qu'elle renferme 21 résidus de sérine consécutifs.

COPPEL *et al.* (1988), décrivent un clone cDNA exprimant une partie de la P126 (souche FC27). La séquence nucléotidique code pour 427 amino-acides et renferme une partie commune avec la séquence de WEBER *et al.* (1987). Cependant, sur les 48 résidus superposables des deux séquences, il existe des séquences conservées, et d'autres variables, suggérant l'existence de déterminants spécifiques de souches.

Après avoir obtenu un clone cDNA codant pour une grande partie de la P126 chez la souche FCR3 (HORII *et al.*, 1988), BZIK *et al.* (1988) publient la séquence nucléotidique complète de la P126. Ces auteurs ont ainsi montré que le gène de la P126 code pour une protéine de 989 amino-acides (111 kD), qu'il contient une séquence signal potentielle (séquence N-terminale hydrophobe), et pas de domaine d'ancrage membranaire. Cette protéine contient 21% de sérine



Schéma du gène de la P126 d'après DELPLACE et al. (1988)



L'extrémité 5' de la séquence ADN porte le codon d'initiation en position 308 suivit d'une séquence hydrophobe (308-336). Les introns sont représentés par des lignes entre les positions (336-489, 1277-1454 et 1594-1736). La zone hachurée 521-664 correspond aux 6 séquences répétées de 8 amino-acides. La zone hachurée 1049-1111 correspond à la séquence polysérine.

dont 57% sont portées par une séquence polysérine de 35 résidus. La séquence renferme également 3 sites possibles de N-glycosylation (ASN-X-SER) et de nombreux sites possibles de O-glycosylation.

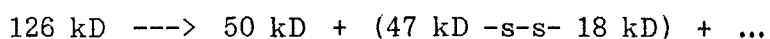
L'isolement, l'analyse de la séquence, et la structure du DNA génomique (gDNA) codant pour le gène de la P126 ont été récemment rapportés pour la souche FCR3 (LI *et al.*, 1989) et pour la souche FCBR (KNAPP *et al.*, 1989). On constate une très forte homologie entre ces deux séquences. La région codante est interrompue par trois introns de petite taille. Les introns, comme les régions flanquantes sont caractérisées par un contenu très riche en A + T. Le premier intron se situe à la fin de la séquence signal et les deux autres sont localisés en aval. La partie N-terminale de la protéine renferme une séquence particulière constituée par 6 répétitions successives d'octapeptides (5 répétitions chez la souche FCR3). Dans ce premier exon, se trouve une autre séquence répétée qui est la polysérine, 35 résidus consécutifs chez la souche FCR3 et 37 résidus coupés par un ASN chez la souche FCBR (cf. schéma ci-contre).

Le gène codant pour la P126 a été localisé sur le chromosome 2 de *P. falciparum* (BIGGS *et al.*, 1989).

Nous avons rappelé plus haut que la P126 a été initialement identifiée au laboratoire par l'intermédiaire d'un fragment de protéolyse de 50 kD découvert dans le milieu de culture. Cette transformation a été étudiée par DELPLACE *et al.* (1987) de la manière suivante. Ces auteurs ont d'abord montré qu'après avoir été synthétisée entre la 32<sup>ème</sup> et la 36<sup>ème</sup> heure du cycle (cycle de 42 h pour la souche FCR3), la P126 est stockée dans la vacuole parasitophore puis est protéolysée au moment de l'éclatement des schizontes.

Un antisérum polyclonal monospécifique a été préparé chez le lapin en utilisant la P126 purifiée par un anticorps monoclonal spécifique du fragment anti 50 kD. L'antisérum polyclonal, ainsi que différents anticorps monoclonaux, ont été

utilisés pour identifier les produits de protéolyse de la P126 dans le surnageant de culture. Deux fragments majeurs de 73kD et 50kD ont été caractérisés, le premier étant composé de deux sous-unités de 47 et 18 kD ont été caractérisés, reliés par des ponts disulfures (DELPLACE et al., 1987). Le schéma suivant de protéolyse a alors été proposé:



La P126 n'est protéolysée que si les mérozoïtes sont libérés de façon naturelle. Lors d'une lyse artificielle de schizontes par congélation-décongélation, aucun fragment de protéolyse n'est retrouvé. De plus, la réinvasion consécutive à l'éclatement des schizontes n'est pas nécessaire pour observer ce phénomène de protéolyse.

La protéolyse de la P126 est donc déclenchée au moment de l'éclatement des schizontes. Cette protéolyse pourrait être l'un des processus responsables de la libération des mérozoïtes et donc de la multiplication du parasite au cours du cycle intra-érythrocytaire.

Des observations d'inhibition d'éclatement des schizontes par action d'inhibiteurs de protéases avaient été rapportées (HADLEY *et al.*, 1983, LYON et HAYNES, 1986). Disposant comme modèle d'une protéine qui subit une protéolyse au moment de l'éclatement des schizontes, l'objet de ce travail a été d'étudier l'effet de différents inhibiteurs de protéases sur la protéolyse de la P126 et de caractériser les activités enzymatiques impliquées dans ce phénomène dans le but ultérieur d'en tirer des informations sur le processus de libération des mérozoïtes.

## MATERIELS ET METHODES

## I. TECHNIQUES DE CULTURE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*.

### I.1. Culture *in vitro* de *P. falciparum*.

#### I.1.1. Entretien des parasites.

Les isolats de *P.falciparum* qui ont été utilisés lors de cette étude sont FCR3, CAMP, ITUX respectivement originaires de Gambie, Malaisie, Brésil et l'isolat NF54, producteur de gamétocytes *in vitro*, isolé à partir d'un voyageur néerlandais. Cet isolat nous a été donné par le Dr. MONJOUR (INSERM U 313, PARIS).

Les isolats sont cultivés *in vitro* selon la technique de TRAGER et JENSEN (1976).

La culture est effectuée à l'aide de globules rouges humain O<sup>+</sup>, en milieu RPMI 1640, HEPES 25 mM, NaHCO<sub>3</sub>, Gentamycine 10 mg/l additionné de 10% de sérum humain A<sup>+</sup> décomplémenté 30 min à 56°C (milieu de culture complet). Les cultures sont placées à 37°C, en atmosphère O<sub>2</sub> 5%, CO<sub>2</sub> 5%, N<sub>2</sub> 90%. La parasitémie est déterminée sur 2500 globules rouges après étalement sur lame, fixation au méthanol et coloration au GIEMSA. Dans les conditions expérimentales utilisées, le taux de croissance est de 10 par cycle de 42 heures pour l'isolat FCR3.

Pour certaines manipulations, des milieux de cultures modifiés ont été utilisés pour lesquels le sérum humain a été remplacé soit par 4% de Caryoser (substitut de sérum, IBF), soit par la fraction dialysable du sérum humain. Le second milieu est obtenu en dialysant l'équivalent de 20% de sérum humain contre la quantité correspondante de RPMI, pendant 24 h à 4°C, puis est filtré sur un filtre de porosité 0,22 µ. Ces milieux sont utilisés dans les mêmes conditions que le milieu complet.

#### I.1.2. Cryopréservation des souches de *P. falciparum*.

### I.1.2.1. Congélation.

A 1 volume de culot d'hématies parasitées est ajouté 0,4 volume d'une solution de cryopréservation: glycérol 6,2 M, lactate de sodium 0,14 M, KCl 5 mM, tamponnée à pH 7,4 avec  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 7,4, à un débit de 0,75 ml/mn sous agitation douce. Après 5 mn de repos, sont ajoutés successivement dans les mêmes conditions 1,2 volumes, puis après 5 mn, 2,4 volumes de la solution de cryopréservation. La suspension est ensuite aliquotée par fractions de 2 ml dans des tubes à cryopréservation (NUNC), congelée 24 h à  $-80^\circ\text{C}$  puis transférée dans l'azote liquide.

### I.1.2.2. Décongélation.

Sorti de l'azote liquide, le tube de cryopréservation est placé 2 mn au bain marie à  $37^\circ\text{C}$ . La culture est transférée dans un tube stérile (vacutainer), où y sont ajoutés 2 volumes de sorbitol à 27% (1 vol. en 8 mn, 1 vol. en 5 mn). Après un repos de 5 mn, 2 volumes de sorbitol à 5% sont ajoutés. Après 5 mn, la suspension est centrifugée (500xg, 5 mn) et le surnageant éliminé. Le culot est alors repris par 2 volumes de sorbitol à 5% (ajoutés en 8 mn), la culture est centrifugée et le culot cellulaire repris par du milieu de culture normal et placé à  $37^\circ\text{C}$ .

## I.2. Synchronisation des parasites par le sorbitol.

LAMBROS et VANDENBERG (1979), VERNES *et al.* (1984).

La suspension cellulaire parasitée est centrifugée 5 mn à 500xg à température ambiante. Un volume de culot est resuspendu dans 3,33 volumes d'une solution contenant 15% de D-sorbitol et 0,1% de glucose dans l'eau. Après une incubation de 5 mn à  $37^\circ\text{C}$  et une agitation rapide (15 sec, vortex), une

solution de glucose à 0,1% dans l'eau est ajoutée à raison de 6,65 volumes de culot. La suspension est de nouveau incubée 5 mn à 37°C, agitée rapidement, puis centrifugée 5 mn à 500xg à température ambiante.

Ce traitement détruit les parasites âgés (trophozoïtes et schizontes, plus vieux que 19 h pour un cycle de 42 h). Le culot est alors repris dans du milieu de culture complet et remis en culture pour 27 h, ce qui assure une plage de réinvasion de 4 h. Un second traitement est alors effectué, après lequel la culture ne contient plus que des jeunes parasites âgés de 0 à 4 h, qui sont remis en culture jusqu'à obtention du stade parasitaire désiré.

### **I.3. Purification des schizontes sur métrizamide.**

PAVIA, DIGGS et WILLIAMS, (1983).

Les globules rouges parasités dilués au 1/10 dans du milieu de culture complet sont déposés sur un coussin constitué de 0,7 volumes de métrizamide à 35% dans l'eau, et de 1 volume de RPMI complet. Après une centrifugation à 500xg, 10 mn à température ambiante, les schizontes, situés à l'interface des deux couches, sont collectés. Ils sont lavés 2 fois dans du RPMI ou du PBS qu'ils soient remis en culture ou congelés (-20°C) sous forme de culot.

SPECIFICITE DES INHIBITEURS

INHIBITEUR	P R O T E A S E S à			METALLO PROTEASE	EXO PROTEASE
	SERINE	CYSTEINE	ASPARTIQUE		
3,4-DICHLORO- ISOCOUMARIN	+				
4 AMINO- BENZAMIDINE	+				
ANTIPAINÉ	+	+			
APROTININE	+				
BESTATINE					+
CHYMOSTATINE	+	+			
DIFP	+				
E64		+			
EDTA				+	
IDOACETAMIDE		+			
LEUPEPTINE	+	+			
NEM		+			
PEPSTATINE			+		
pHMB		+			
PHOSPHORAMIDON				+	
PMSF	+				
TLCK	inhibiteur spécifique de la trypsine				
TPCK	inhibiteur spécifique de la chymotrypsine				
α1-antitrypsine α2-macroglobuline STI	inhibiteurs macromoléculaires à spécificité large				



#### I.4. Action des inhibiteurs de protéases sur une culture de *Plasmodium falciparum*.

##### I.4.1. Protocole expérimental.

Afin de tester l'action des inhibiteurs de protéases sur la réinvasion, une culture de *P. falciparum* est synchronisée par un double traitement au sorbitol. Les parasites sont remis en culture dans un milieu de culture normal jusqu'au stade schizonte. La culture est ensuite distribuée, à un hématoците de 2%, dans une plaque de culture de 24 puits par fraction de 1 ml. Les inhibiteurs de protéases sont alors ajoutés pour donner des concentrations finales de 50, 25 ou 5 µg/ml. Deux contrôles sont réalisés: le premier sans inhibiteur, le second avec 10 µl de DMSO.

Les inhibiteurs utilisés:

la leupeptine, la bestatine, l'antipaïne, la pepstatine, l'iodoacétamide, le phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), le L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanido) butane (E64), l'aprotinine, le alpha-1-antitrypsine (alpha-1-AT), le 3,4-dichloro-isocoumarin proviennent de la firme Boehringer.

La chymostatine, le p-chloromercuribenzoate (pCMB) proviennent de la firme Sigma et le N-α-tosyl-lysine chloromethyl ketone (TLCK), le L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK), le 4-aminobenzamidine (4AB), le N-ethylmaleimide (NEM) de la firme Serva.

Une solution mère de chaque inhibiteur a été préparée à une concentration de 5 ou 10 mg/ml. La chymostatine, la pepstatine, la bestatine, le TPCK, le pCMB et le 3,4-dichloro-isocoumarin ont été solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) tandis que les autres inhibiteurs ont été solubilisés dans l'eau.

## I.4.2. Méthodes d'observation.

### I.4.2.1. Microscopie photonique.

Après 16 h d'incubation à 37°C dans une étuve tri-gaz (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, Heraeus), des frottis sont réalisés et colorés au Giemsa. Les pourcentages de nouveaux anneaux et de schizontes non rompus sont quantifiés et comparés aux contrôles (Tableau n°1).

### I.4.2.2. Microscopie électronique.

Une culture asynchrone (parasitémie 15%) de *P. falciparum* est cultivée 16 h dans un milieu normal additionné de leupeptine ou de E64 (à 50 µg/ml).

La culture est centrifugée à 500xg pendant 5 mn. Les cellules sont fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,4 pendant 1 h à 4°C, lavées dans le même tampon puis fixées par du tétroxyde d'osmium à 2% pendant 1 h. Elles sont ensuite déshydratées à température ambiante par une série de bains à concentrations croissantes d'éthanol (alcool 70°: 5 mn, alcool 95°: 2 fois 15 mn, alcool 100°: 3 fois 20 mn), puis dans de l'oxyde de propylène (2 fois 30 mn). L'incubation dans le mélange d'oxyde de propylène et d'EPON (50%, 50%, V/V) pendant 1 h à 37°C précède l'inclusion dans l'EPON pur dont la polymérisation dure 48 h à 60°C.

Les coupes fines effectuées à l'ultamicrotome ULTRACUT (REICHERT) sont récupérées sur des grilles de cuivre recouvertes d'une membrane de parlodion, colorées à l'acétate d'uranyle à 2% (p/v) dans l'éthanol 50° (2 mn à l'obscurité), rincées, contrastées au citrate de plomb (2 mn à l'abri du CO<sub>2</sub>), rincées à l'eau distillée et séchées avant d'être examinées au microscope électronique HITACHI HU12A ou H600.

### I.5. Marquage radioactif métabolique.

Ce marquage est réalisé par incorporation métabolique d'acides aminés radioactifs, soit d'isoleucine tritiée ( $^3\text{H}$ -Ile, AMERSHAM: activité spécifique 3-4,4 TBq/mmol) ou  $^{35}\text{S}$ -méthionine ( $^{35}\text{S}$ -Met, AMERSHAM; activité spécifique supérieure à 30 TBq/mmol), par les parasites en culture *in vitro*.

Les globules rouges parasités (parasitémie d'environ 10%, culture asynchrone) sont centrifugés à 500xg, 5 mn à température ambiante, puis lavés en milieu de culture complet dépourvu de l'acide aminé servant au marquage (RPMI 1640, selectamine kit GIBCO). Ils sont alors mis en culture à 37°C dans ce même milieu additionné de l'acide aminé radioactif,  $^{35}\text{S}$ -Met (1,5 MBq/ml) ou  $^3\text{H}$ -Ile (2 MBq/ml).

Après 4 h de marquage, les globules rouges parasités sont centrifugés (500xg, 5 mn). Ils sont ensuite soit lavés 2 fois en PBS et congelés (-20°C), soit lavés une fois en RPMI complet et remis en culture dans ce milieu additionné ou non d'un inhibiteur de protéase (à une concentration finale de 50 µg/ml ou 100 µM). D'autres milieux de chasse sont également utilisés. Dans ce cas, les parasites radiomarqués sont lavés 2 fois dans un milieu RPMI sans sérum puis remis en culture, pendant 16 h, dans ce milieu ou dans un milieu RPMI renfermant la fraction dialysable du sérum ou dans un milieu RPMI additionné de Caryoser (4% final).

Après cette chasse, une centrifugation (500xg, 5 mn) permet d'obtenir d'une part les globules rouges parasités qui sont lavés en PBS et stockés à -20°C et d'autre part le surnageant de culture de la chasse qui est centrifugé à 20.000xg pendant 15 mn à 4°C et stocké à -20°C.

## II. PURIFICATION DE PROTEINES PAR AFFINITE.

## II.1. Préparation des immunoadsorbants.

### II.1.1. Production d'anticorps monoclonaux.

La production d'anticorps monoclonaux a été réalisée au laboratoire selon la technique de KOHLER et MILSTEIN (1975). Le clonage des hybridomes positifs a permis d'obtenir plusieurs clones spécifiques de la protéine P126 et de ses produits de protéolyse (DELPLACE *et al.*, 1985, BATHIA *et al.*, 1987).

Nous avons utilisé les anticorps monoclonaux 23D52H6 et 3E91A11 respectivement spécifiques des protéines P50 et P73 et reconnaissant tous deux la protéine précurseur de 126 kD.

### II.1.2. Purification des AcMc à partir d'ascites de souris.

La purification des immunoglobulines à partir des ascites de souris est réalisée selon la technique de SAINT-BLANCARD *et al.* (1982):

#### - Chromatographie d'exclusion sur gel.

3 ml de liquide d'ascite filtré sur fibre de verre sont déposés sur une colonne GF-05 de dimensions 12 cm x 1 cm<sup>2</sup>. L'équilibration de la colonne ainsi que l'élution des protéines de l'ascite sont réalisées avec du tampon 25 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl à pH 8,8. Le premier pic d'absorption à 280 nm contient les protéines.

#### - Chromatographie d'échange d'ions.

Les protéines éluées de la colonne GF 05 sont passées sur une colonne DEAE-Trisacryl (Industrie Biologique Française) de 12 cm x 1 cm<sup>2</sup>. Les immunoglobulines sont éluées par le tampon 25 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl à pH 8,8. Une fraction aliquote de l'éluat est analysée en gel de polyacrylamide SDS-PAGE dans des conditions réductrices pour vérifier la pureté des immunoglobulines.

L'éluat est ensuite dialysé et concentré dans une cuve microprodicon contre du PBS, à 4°C, pendant 48 heures dans un premier temps, puis contre du tampon bicarbonate salé (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6 contenant du 0,5 M NaCl). L'estimation de la quantité d'immunoglobulines purifiées est faite par mesure spectrophotométrique (densité optique à 280 nm).

### II.1.3. Couplage des IgGs purifiées sur un gel de Sepharose 4 B - CNBr.

10 mg d'anticorps monoclonal purifié contenus dans 5 ml de tampon bicarbonate sont mis en contact avec 300 mg de gel Sépharose-4B activé par le bromure de cyanogène, préalablement gonflé dans une solution 1 mM HCl et lavé par du tampon bicarbonate. La suspension est mise en agitation rotative pendant 2 h à température ambiante ou une nuit à 4°C. L'excès de protéines non couplées est éliminé par lavage dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH 8 puis les sites actifs libres du gel sont hydrolysés par ce même tampon à température ambiante pendant 2 heures. Le gel subit ensuite 3 lavages alternés dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4 contenant 0,5 M NaCl et dans le tampon bicarbonate de couplage. Après lavage dans du PBS, l'immunoabsorbant ainsi préparé est dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans du PBS et conservé à 4°C.

## II.2. Immunoabsorption d'antigènes radiomarqués.

### II.2.1. Solubilisation des antigènes radiomarqués par le NP40.

Les culots d'hématies parasitées en fin de marquage métabolique ( $^{35}\text{S}$ -Met ou  $^3\text{H}$ -Ile) ou en fin de chasse (congelés ou non) sont solubilisés pendant 15 mn à  $4^\circ\text{C}$ , dans le tampon de lyse: PBS, pH 7,5, Nonidet-P40 (NP40, Sigma) 1%, aprotinine 0,1 mg/ml, leupeptine 0,01 mg/ml, PMSF 1 mM, EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) 2 mM, méthionine (Merk) 20 mM, isoleucine (Merk) 20 mM. Le lysat est ensuite centrifugé à 20.000xg pendant 15 mn à  $4^\circ\text{C}$ .

### II.2.2. Comptage de radioactivité.

Une fraction (20  $\mu\text{l}$ ) du lysat NP40 d'hématies parasitées radiomarquées est précipitée par l'acide trichloracétique (TCA) 10%, filtré sur fibre de verre et insérée dans une fiole contenant un cocktail scintillant (Beckman). L'incorporation des acides aminés radioactifs est alors mesurée par scintillation en phase liquide. Cette incorporation est également déterminée pour le surnageant de chasse selon la même technique.

### II.2.3. immunoadsorption.

Un volume correspondant à 1 million de cpm (coups par minute) de radioactivité présents dans un lysat d'hématies parasitées ou à 500.000 cpm présents dans un milieu de chasse, est incubé avec 20  $\mu\text{l}$  d'immunoadsorbant. L'immunoadsorption est réalisée à température ambiante (3 heures) ou à  $4^\circ\text{C}$  (1 nuit), sous agitation rotative.

Après centrifugation, le gel est lavé 5 fois (10 mn) sous agitation en tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, NaCl 1 M, NP40 0,5%, méthionine 20 mM, isoleucine 20 mM, puis une fois en tampon Tris-HCl 5 mM, pH 6,8.

Le gel est ensuite suspendu dans 50  $\mu$ l de solution Tris 62,5 mM, dodécylsulfate de sodium (SDS) 2%, saccharose 20% (tampon Laemmli), et chauffé 5 mn à 95°C puis centrifugé. L'éluat peut alors être analysé immédiatement ou congelé.

### II.3. Chromatographie d'affinité d'antigènes du milieu de culture.

Les milieux de culture de *P. falciparum* cultivés en conditions normales ou en présence de leupeptine (50  $\mu$ g/ml, culture bloquée) sont collectés, filtrés sur fibre de verre et supplémentés en NP40 à raison de 0,5% (p/v).

Pour la purification de la P50 et de la P73 à partir du milieu de culture normal, les colonnes d'immunoabsorbant 23D52H6 et 3E91A11 (10 ml de gel) sont montées en série à la suite d'une précolonne de séparose-4B (5 ml). Pour la purification de la P56 et de la P126, à partir du milieu de cultures bloqué par la leupeptine, seul l'immunoabsorbant 23D52H6 est utilisé, couplé à la précolonne.

Après la chromatographie d'affinité réalisée à 4°C, à un débit de 30 ml/h, les colonnes sont lavées séparément, par 100 ml des tampons:

- Tris-HCl 50 mM pH 8,3, NP40 0,5%
- Tris-HCl 50 mM pH 8,3, désoxycholate de sodium (DOC) 0,5%
- Tris-HCl 50 mM pH 8,3, NaCl 1 M

Après un lavage par 20 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, les protéines immunoabsorbées sont éluées par passage de 2,5 volumes de tampon diéthylamine 0,1 M, pH 11,5. Les éluats sont dialysés et concentrés sous vide dans une cuve microprodicon (Bioblock) contre un tampon Tris-HCl 5 mM, pH 6,8, à 4°C.

### III. TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES.

#### III.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE).

L'analyse électrophorétique des protéines est effectuée selon la technique décrite par LAEMMLI (1970).

Le gel de séparation, d'une épaisseur de 0,75 mm ou 1,5 mm et de concentration en acrylamide de 8%, 10% ou 12% dans un tampon Tris 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, est préparé à partir d'une solution mère de 30% acrylamide et 0,8% bis acrylamide. Le gel de concentration de 5% en acrylamide est préparé dans un tampon Tris 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%.

Les échantillons sont solubilisés par chauffage à 95°C pendant 5 mn dans un tampon Tris 62,5 mM, SDS 2%, saccharose 20%, bleu de bromophénol 0,2%. L'addition éventuelle de dithiothréitol (DTT) 0,1 M permet de réduire les ponts dissulfures intra ou inter chaînes polypeptidiques. Des marqueurs de poids moléculaire (Bas poids moléculaires: LMW, Pharmacia et hauts poids moléculaires: HMW, Sigma) sont déposés parallèlement aux échantillons.

La séparation électrophorétique s'effectue à ampérage constant (4 mA par gel de 0,75 mm d'épaisseur) pendant 18 h en tampon Tris 0,025 M, glycine 0,192 M, SDS 0,1%.

#### III.2. Coloration des protéines.

##### III.2.1. Par le bleu de coomassie.



Après démoulage, le gel est fixé et coloré pendant 1 h sous agitation douce par une solution de bleu de Coomassie (Merk) 0,02%, acide acétique 10%, isopropanol 25%, puis décoloré avec une solution d'acide acétique à 10%.

### III.2.2. Par le nitrate d'argent.

MORRISSEY (1981)

Le gel est préfixé 30 mn dans un mélange de méthanol 50%, acide acétique 10%, puis 30 mn dans du méthanol 5%, acide acétique 10%. Il est ensuite fixé 30 mn dans une solution de glutaraldéhyde 10%, puis rincé extensivement à l'eau distillée. Une incubation de 30 mn dans du DTT (5 µg/ml) précède la coloration au nitrate d'argent 0,1% (30 mn). Après 2 rinçages rapides à l'eau distillée, la révélation est effectuée par 100 ml d'une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 3%, formaldéhyde 0,0185% jusqu'à visualisation des bandes, et stoppée par l'adjonction de 10 ml d'acide citrique 2,3 M.

### III.3. Immunoélectrotransfert des protéines (Western blotting).

TOWBIN *et al.* (1978)

Les protéines séparées par électrophorèse SDS-PAGE sont transférées électriquement sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Céra-Labo) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (LKB). Le gel de séparation est appliqué sur une feuille de nitrocellulose (pores 0,45  $\mu\text{m}$ ) imprégnée de tampon glycine 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375%, méthanol 20%. L'ensemble est inséré entre 2 séries de papier Whatman 3M imbibé du même tampon. Le transfert est réalisé à ampérage constant (0,8 mA/cm<sup>2</sup>) pendant 1 heure.

Pour vérifier la qualité du transfert des protéines, la feuille de nitrocellulose est colorée 10 mn au rouge ponceau 0,2%, acide trichloracétique 3%, puis rincée à l'eau distillée.

Des bandes correspondant aux pistes d'électrophorèse découpées dans la feuille de nitrocellulose sont incubées 30 mn dans du lait écrémé en poudre (GLORIA), 5% en tampon Tris 15 mM pH 8, NaCl 140 mM, Tween-20 0,05% (TNT) pour saturer les sites d'adsorption non spécifiques. Les anticorps (ascites de souris diluées au 1/100<sup>ème</sup>, sérum de lapin dilué au 1/1000<sup>ème</sup>) sont laissés en contact 1 h à température ambiante sous agitation douce. Les bandes sont lavées 3 fois 5 mn en TNT puis incubées 1 h à température ambiante sous agitation douce avec des IgG de lapin anti immunoglobulines de souris, ou des IgG de chèvre anti immunoglobulines de lapin, marquées à la phosphatase alcaline (Promega), diluées au 1/10.000<sup>ème</sup>.

Après 3 lavages en TNT (5 mn), la révélation s'effectue par adjonction du substrat BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) et du colorant NTB (nitroblue tetrazolium), aux dilutions recommandées par le fabricant, en quelques minutes à l'obscurité. Les bandes sont ensuite rincées à l'eau, séchées, et juxtaposées aux marqueurs de poids moléculaires colorés au rouge ponceau pour

déterminer la masse moléculaire apparente des antigènes reconnus par les anticorps.

#### III.4. Autoradiographie.

Les éluats d'immunoabsorption de protéines radiomarquées sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE. Le gel coloré au bleu de Coomassie et décoloré est immergé 1 h sous agitation dans l'Enhance (NEN), puis lavé 30 mn à l'eau distillée et séché par évaporation sous vide. Il est alors exposé sur film KODAK XO Mat AR à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### IV. MICROSEQUENCAGE DES PROTEINES.

Après leur purification sur les immunoabsorbants 23D52H6 et 3E91A11, les éluats protéiques concentrés sont lyophilisés et repris par 100  $\mu\text{l}$  de tampon de reprise d'électrophorèse sans agent réducteur, puis chauffés à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 20 mn. Ces échantillons sont déposés dans un puits large de 1 cm et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (8 % , 1.5 cm d'épaisseur).

Après électrophorèse, le gel est inséré entre deux feuilles de polyvinylène difluoride (PVDF, Millipore) et une feuille de papier Whatman 3M. Le sandwich ainsi formé est introduit dans une cuve de transfert remplie de tampon CAPS 10 mM, méthanol 10%, pH 11. Un voltage de 70 Volts, appliqué pendant une heure, électroélue les protéines du gel vers les feuilles de PVDF (MATSUMURA 1987).

Après électrotransfert, les membranes de PVDF sont colorées au bleu de coomassie R à 0.5% dans de l'isopropanol 30%, acide acétique 10% et décolorées par un tampon isopropanol 25%, acide acétique 10%. Les bandes repérées sont découpées et placées directement dans un séquenceur phase gaz (type 470 A, Applied Biosystems). Les phénylthio-hydantoïne acides aminés sont analysés par

un dispositif HPLC (type 120 A) couplé au séquenceur. L'électrotransfert et le séquençage ont été réalisés dans le Service de Chimie de Biomolécules de l'Institut Pasteur (SCBM, LILLE).

## V. TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES.

### V.1. Utilisation de la P56 comme substrat.

La protéine P56 radiomarquée est obtenue par marquage métabolique ( $^{35}\text{S}$ -MET, ou  $^3\text{H}$ -ILE) d'une culture de *P. falciparum*, et incubation des parasites dans un milieu normal supplémenté par 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de leupeptine. La P56 est ensuite fixée par immunoabsorption sur l'immunoabsorbant 23D52H6.

#### V.1.1. Protéolyses trypsiques comparées des P56, P50 et P126.

La trypsine (Sigma, traitée au TPCK) est solubilisée et diluée dans un tampon Phosphate 20 mM pH 7,2.

Les protéines radiomarquées P56, P50, P126 obtenues par marquage métabolique ( $^{35}\text{S}$ -Met) d'une culture de *P. falciparum*, sont purifiées par affinité sur l'immunoabsorbant 23D52H6 selon la méthode décrite plus haut. Après immunoabsorption et lavages, les gels sont lavés 1 fois par le tampon phosphate 20 mM pH 7,2 et incubés avec 0,5 ml des dilutions de trypsine pendant 1 h à 37°C avec une agitation toutes les 15 mn. Les gels sont ensuite lavés 1 fois par un tampon Tris 5 mM pH 6,8, et élués à 95°C 5 mn par 50  $\mu\text{l}$  de tampon de reprise d'échantillon pour SDS-PAGE.

#### V.1.2. Protéolyse de la P56 *in vitro*.

Des schizontes de *P. falciparum* obtenus par synchronisation des parasites au sorbitol ou par purification sur métrizamide, sont remis en culture dans un milieu RPMI supplémenté par du dialysat de sérum ou par 4% de caryoser, pendant environ 10 h à 37°C.

Les cellules sont éliminées par centrifugation à 500xg 5 mn, et les milieux ainsi récupérés sont centrifugés à 20.000xg pendant 10 mn à température ambiante. Ils sont ensuite incubés pendant 16 h à 37°C dans des tubes de Leighton, à raison de 1 ml de milieu pour 20 µl d'immunoabsorbant sur lequel a préalablement été purifiée et lavée la P56.

Les gels sont ensuite lavés et les protéines éluées et analysées par SDS-PAGE et autoradiographie.

### V.1.3. Protéolyse de la P56 en présence de parasites.

Des schizontes de *P. falciparum*, et la P56 fixée sur l'IADS 23D52H6 sont préparés comme précédemment.

20 µl d'IADS-56 est ajouté à 1 ml de culture de schizontes dans des tubes de Leighton. La culture est placée à 37°C pendant 16 h. Les tubes sont centrifugés, le surnageant est éliminé et les cellules solubilisées par le tampon de lyse: PBS, pH 7,5, N-P40 1%, aprotinine 0,1 mg/ml, leupeptine 0,01 mg/ml, PMSF 1 mM, EDTA 2 mM, méthionine 20 mM, isoleucine 20 mM.

Les gels sont ensuite lavés et les protéines éluées et analysées par SDS-PAGE et autoradiographie.

## V.2. Autres substrats.

### IV.2.1. Galeries API.

Des galeries API (Montalieu Vercieu, réf. 88810 à 88815) sont utilisées pour la détection d'activités protéasiques de lysats cellulaires ou de milieux de cultures.

50 µl d'échantillon sont déposés dans chacune des 20 cupules des galeries. Après 4 h d'incubation à 37°C en chambre humide, les réactifs sont ajoutés et la lecture effectuée selon les recommandations des fabricants.

#### IV.2.2. Gélatine SDS-PAGE.

##### - préparation des échantillons:

Des schizontes de *P. falciparum* sont purifiés sur métrizamide et remis en culture pendant 16 h dans du RPMI contenant du dialysat de sérum avec ou sans inhibiteur de protéase (leupeptine ou E64 à 50 µg/ml). Les milieux sont récupérés, centrifugés à 20.000xg pendant 15 mn à 4°C puis concentrés entre 50 et 100 fois dans des Centricons-10 (Amicon). Les milieux concentrés sont repris par le tampon de solubilisation d'échantillon (Laemmli) 2 fois concentré (volume / volume), sans agent réducteur et déposés (sans avoir été chauffés) sur l'électrophorèse

- **gélatine SDS-PAGE: HEUSSEN et DOWDLE (1980).**

Une suspension de gélatine à 1% dans l'eau est solubilisée au bain-marie 100°C pendant 10 mn. Cette solution est ajoutée à raison de 0,1% final en gélatine à un gel de polyacrylamide (10% en acrylamide).

L'électrophorèse se déroule dans les conditions classiques d'une électrophorèse SDS (cf. chap. III.1). Après migration, le gel est lavé sous agitation douce pendant 1 h à température ambiante dans une solution de Triton X100 à 2,5% dans l'eau. Il est ensuite baigné entre 4 et 16 h à 37°C sous agitation dans un tampon Glycine-NaOH 0,1 M pH 8,3. Le gel est enfin coloré par une solution d'amidoschwartz à 0,5% dans du méthanol 45% et de l'acide acétique 10%, et décoloré par l'acide acétique à 10%. Les zones de digestion de la gélatine apparaissent en clair par rapport au reste du gel qui est coloré.

## RESULTATS



TABLE n°1 : Effet des inhibiteurs de protéases sur la réinvasion lorsqu'ils sont incubés avec des schizontes matures.

INHIBITEURS DE PROTEASES	DE	: % de parasitémie : à la fin de : l'expérience :	% des formes parasitaires			% de réinvasion par rapport au témoin
			R	T	S	
TEMOIN		6,2	96	2	2	100
LEUPEPTINE	50	2,9	38	4	58	18,5
	25	3,1	75	0	25	39,1
	5	5,7	97	0	3	92,9
TLCK	50	1,2	0	9	91	0
	25	2,6	85	0	15	37,1
	5	5,1	96	0	4	82,2
4-AMINO-BENZAMIDINE	50	1,2	45	0	55	9,1
	25	2,6	80	0	20	34,9
	5	4,6	96	0	4	74,2
ANTIPAIN	50	5,9	94	0	6	93,2
TEMOIN DMSO		4,9	92,5	1,5	6	100
TPCK	50	1,3	0	0	100	0
	25	1,5	7	0	93	2,3
	5	2,1	62	0	38	28,7
BESTATINE	25	3,3	91	0	9	66,2
	5	3,9	90	0	10	77,4
CHYMO-STASTINE	50	2,0	79	7	14	34,9

Des schizontes maturés provenant d'une culture synchrone sont incubés, à 2% d'hématocrite, avec des inhibiteurs de protéases. Après 16 h d'incubation, des frottis sont préparés et colorés au Giemsa. 1000 globules rouges sont comptés et les pourcentages de rings (R), trophozoïtes (T) et schizontes (S) calculés. La parasitémie de départ pour tous les échantillons est de 2,7%.

## I. ETUDE DE LA PROTEOLYSE DE LA P126.

### I.1. Action des inhibiteurs de protéases sur *P. falciparum*.

Il a été décrit dans la littérature que des inhibiteurs de protéases étaient capables de bloquer l'éclatement des schizontes chez *Plasmodium knowlesi* (HADLEY *et al.*, 1983) et *P. falciparum* (LYON *et al.*, 1986). Comme la P126 est connue pour être protéolysée au moment de l'éclatement des schizontes (DELPLACE *et al.*, 1987), nous avons étudié l'effet des inhibiteurs de protéases sur la protéolyse de la P126.

#### I.1.1. Action des inhibiteurs en culture.

##### I.1.1.1. Effets sur la libération des mérozoïtes.

La table I montre l'effet d'inhibiteurs de protéases sur une culture synchrone au moment de la réinvasion. Les résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition de formation des formes anneaux par rapport au contrôle non traité.

On observe une corrélation entre d'une part, la concentration en inhibiteur utilisée et d'autre part, soit le pourcentage de croissance par rapport au témoin, soit le nombre de schizontes qui n'ont pas éclaté. Ainsi, plus la concentration en inhibiteur est forte, plus la parasitémie résultante est faible et plus le pourcentage de schizontes restant est important. Il faut cependant distinguer deux types de formes matures observés sur les frottis (cf. chapitre I.1.1.2.1).

### I.1.1.2. Effets morphologiques.

#### I.1.1.2.1. En microscopie optique.

A la concentration de 50 µg/ml, certains inhibiteurs de protéases entraînent d'important changements morphologiques du parasite, visibles en microscopie optique. Après 15 h de contact avec les inhibiteurs, deux types de parasites matures sont encore observés:

- des schizontes matures pour lesquels le parasite occupe tout le volume de l'hématie, et à l'intérieur desquels on distigue très bien les mérozoïtes individualisés ainsi que le pigment malarique (Fig. 3). Ces formes ressemblent aux schizontes matures d'une culture normale (Fig. 1), mais elles n'ont été observées que en présence de leupeptine ou de E64.

- des parasites apparaissant sous une forme picnotique très colorée, n'occupant qu'une petite partie de l'hématie (Fig. 2). Ces formes de crise sont caractéristiques d'une culture placée dans de mauvaises conditions. Elles sont observées pour des milieux supplémentés en TLCK, TPCK.

#### I.1.1.2.2. En microscopie électronique.

Une étude en microscopie électronique de schizontes incubés avec de la leupeptine montre que la leupeptine n'altère pas la différenciation des mérozoïtes à l'intérieur de l'érythrocyte jusqu'à des doses de 50 µg/ml. Les mérozoïtes apparaissent libres à l'intérieur de l'érythrocyte, la membrane de la vacuole parasitophore étant rompue; la membrane érythrocytaire ne semble pas avoir été altérée (Fig. 5). Des observations identiques ont été faites avec des schizontes incubés en présence de E64.

Sur une coupe de schizonte normal, la membrane de la vacuole parasitophore est continue et entoure les mérozoïtes, les séparant du reste du cytoplasme érythrocytaire (Fig. 4).

### I.1.2. Action des inhibiteurs de protéases sur la P126.

#### I.1.2.1. Effet sur l'apparition de la P50.

Des parasites radiomarqués pendant 4 heures sont incubés une nuit en présence de différents inhibiteurs de protéases (à 50 µg/ml). Des immunoadsorptions avec l'anticorps monoclonal anti 50 kD (23D5 2H6) sont réalisées en fin de chasse sur les milieux ainsi que sur les lysats cellulaires. On effectue ensuite une électrophorèse des éluats d'immunoadsorbants suivie d'une autoradiographie. Les inhibiteurs testés ont trois types d'effets:

- Une famille d'inhibiteurs ne semble avoir aucun effet sur l'apparition de la P50 et donne une image identique à celle du témoin. La P126 radiomarquée n'est plus détectée dans les hématies en fin de chasse (Fig. 6, a2), alors que la P50 est présente dans le milieu de culture (Fig. 6, a1). C'est le cas pour la chymostatine, l'antipaïne, la pepstatine, le PMSF, l'aprotinine et l'alpha-1 antitrypsine (Fig. 6, respectivement b, c, k, m, p, q).

- D'autres d'inhibiteurs conduisent à une libération massive de la P126 dans le milieu de culture. Cependant, la P50 est produite en faible quantité si la chasse est réalisée en présence de bestatine (Fig. 6, d) ou de 4 amino benzamidine (Fig. 6, e), mais elle est absente avec le TLCK, le TPCK, le NEM, l'iodoacétamide et le 3,4 dichloroisocoumarin (Fig. 6, respectivement f, g, j, l, s).

- Un troisième groupe d'inhibiteurs composé de la leupeptine et du E64 entraîne une modification du schéma de protéolyse de la P126. Celle-ci n'est plus présente dans le culot parasitaire (Fig. 6, h2) (comme dans les conditions normales), mais un fragment de 56 kD (P56) est observé dans le milieu de culture à la place de la P50 (Fig. 6, h1, n).

Seuls la leupeptine et le E64 entraînent une modification de la protéolyse de la P126 en provoquant l'apparition d'un fragment de 56 kD. Nous nous sommes intéressé particulièrement à la leupeptine.

Quand différentes concentrations en leupeptine sont utilisées dans un milieu de chasse (une culture radiomarquée ayant été divisée en plusieurs fractions incubées avec des concentrations croissantes en leupeptine allant de 0 à 50 µg/ml), on observe une corrélation entre la concentration en leupeptine et l'altération de la protéolyse P126 / P50 (Fig. 7). Sans inhibiteurs, seul le polypeptide de 50 kD est observé. Pour des concentrations en leupeptine allant de 5 à 50 µg/ml (Fig. 7, a-e), des quantités croissantes du polypeptide de 56 kD sont observées en même temps que la diminution progressive et la disparition de la 50 kD.

### I.1.2.2. Effet de la leupeptine sur les autres fragments de la P126.

Des immunoadsorption avec les anticorps polyclonaux monospécifiques anti P126 sont réalisées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'anticorps monoclonal 23D52H6 pour analyser l'effet de la leupeptine sur les autres fragments de protéolyse de la P126. Dans des conditions normales de culture, ces anticorps révèlent un polypeptide de 50 kD et un autre de 73 kD (Fig. 8A, d), le second étant clivé par réduction des ponts dissulfures en deux polypeptides de 47 kD et 18 kD (Fig. 8B, d).

Après un traitement à la leupeptine, aucune altération n'est observée concernant le fragment de 73 kD et ses produits de réduction, tandis que la présence d'un produit de 56 kD à la place de la P50 est également observé avec les anticorps polyclonaux monospécifiques anti P126 (Fig. 8, Ae, Be).

### I.1.2.3. Effet de la leupeptine et du E64 sur la P126 sur d'autres isolats de *P. falciparum*.

L'action de la leupeptine et du E64 sur l'apparition d'un fragment de 56 kD à la place du fragment de 50 kD lors de la protéolyse de la P126, a été testée chez trois autres souches de *P. falciparum*: NF54, ITUX et CAMP. Pour chaque isolat, après 4 h de marquage métabolique ( $^3\text{H}$ -ILE), les parasites sont incubés 15 h dans un milieu normal ou additionné de leupeptine ou de E64 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Les milieux sont ensuite analysés par immunoadsorption sur l'anticorps monoclonal anti 50 kD (23D52H6).

Les 3 isolats ont été comparés à l'isolat de référence FCR3. Les résultats (Fig. 9) montrent que la leupeptine et le E64 ont les mêmes effets sur la protéolyse de la P126 chez les 4 isolats, à savoir l'apparition d'un fragment de 56 kD à la place de la P50.

## **I.2. Protéolyse *in vitro* de la P126 et des fragments 56 et 50 kD par la trypsine.**

La leupeptine étant un inhibiteur trypsique, nous avons observé l'effet de la trypsine sur la protéine P56. Le profil de dégradation obtenu a été comparé à ceux de la P50 et de la P126.

Les protéines radiomarquées P126, P56, P50 ont été immunoadsorbées sur l'anticorps monoclonal 23D52H6 et soumis à une dégradation enzymatique par la trypsine comme il est décrit dans le chapitre matériels et méthodes (cf. chapitre IV.1.1.).

La protéolyse de la P56 donne naissance à un fragment de 50 kD qui est progressivement dégradé par des concentrations croissantes d'enzyme en un produit majeur de 34 kD et un autre mineur de 43 kD (Fig. 10, 56 a-j). Cette dégradation trypsique est complètement inhibée par 50 µg/ml de leupeptine ajoutés au milieu réactionnel (Fig. 11, c).

La protéolyse de la P50 obtenue à partir d'un milieu de culture normal produit des fragments de dégradation identiques (34 kD et 43 kD) pour les mêmes concentrations en trypsine (Fig. 10, 50 a-h).

Les polypeptides de 34 et 43 kD sont également des produits de dégradation trypsique de la P126 (Fig. 10, 126 a,h).

## **II. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE RESPONSABLE DE LA PROTEOLYSE DU FRAGMENT P56.**

### **II.1. Utilisation de la P56 comme substrat.**

La mise en évidence de la modification de la transformation de la P126 par la leupeptine et le E64 ainsi que l'obtention d'un fragment de 50 kD par protéolyse trypsique de la protéine P56, suggèrent l'intervention d'une protéase de type trypsique dans la transformation de la P126. Nous avons tenté d'étudier cette activité.

Le substrat naturel P56 semblait être le substrat idéal pour étudier la protéase responsable de sa dégradation. Pour cette étude, la P56 est apportée sous la forme d'une protéine radiomarquée ( $^3\text{H}$ -Ile) immunoadsorbée sur l'anticorps monoclonal 23D52H6 couplé à des billes de sépharose 4B. Il est incubé pendant 15 h à 37°C avec soit un milieu de culture récupéré après l'éclatement des schizontes (et débarrassé de toutes les cellules), soit avec un lysat de schizontes ou d'hématies saines (lyse effectuée dans le milieu de culture), soit avec une culture de schizontes en phase d'éclatement. Après l'incubation, les protéines éluées de l'immunoadsorbant sont analysées par SDS-PAGE et autoradiographie.

Cependant, la présence d'inhibiteurs de protéases d'origine sérique (TRAVIS et SALVESEN, 1983) dans le milieu de culture, rendait impossible une approche directe. Nous avons donc modifié les conditions de culture, puis essayé de caractériser l'activité enzymatique dans le milieu et dans les parasites.



## II.1.1. Elimination des inhibiteurs macromoléculaires du milieu de culture.

### II.1.1.1. Dialyse du sérum contre le RPMI.

Les parasites ne pouvant se multiplier dans un milieu constitué uniquement de RPMI, la première méthode utilisée pour éliminer les inhibiteurs d'origine sérique, dont les principaux sont macromoléculaires (alpha-1-antitrypsine, l'alpha-2-macroglobuline) (TRAVIS et SALVESEN, 1983), a consisté en une dialyse du sérum contre du RPMI. Au cours de la dialyse, les composés de taille inférieure à 10.000 daltons diffusent dans le RPMI qui est alors utilisé pour la culture pendant une durée ne dépassant pas quinze heures.

Afin de déterminer la viabilité des parasites dans ce milieu, une culture est radiomarquée ( $^3\text{H}$ -ILE) dans les conditions normales puis est incubée 15 h dans le RPMI renfermant la fraction dialysable du sérum (RPMI/DS). L'image obtenue (Fig. 12, d) est identique à celle du témoin en milieu normal (contenant 10% de sérum) (Fig. 12, b): la P126 (Fig. 12, a) est protéolysée en P50. De plus, si la leupeptine est ajoutée au système, la protéolyse P56  $\rightarrow$  P50 est inhibée: l'accumulation d'un fragment de 56 kD est alors observé (Fig. 12, c,e).

### II.1.1.2. Utilisation du Caryoser comme substitut de sérum.

Le RPMI supplémenté de 4% de Caryoser (IBF) a également été utilisé comme milieu de culture dépourvu d'inhibiteurs sériques (la composition du caryoser n'est cependant pas totalement connue).

Ce milieu, testé comme précédemment, permet d'obtenir une transformation normale de la P126 quant à l'apparition du fragment de 50 kD (Fig. 12, f). La présence de la leupeptine pendant la chasse provoque également l'apparition du fragment de 56 kD (Fig. 12, g).

Il faut cependant signaler que, bien que les milieux supplémentés en dialysat de sérum ou en caryoser permettent l'éclatement des schizontes avec une transformation normale de la P126, le taux de réinvasion est plus faible que lorsque l'expérience est réalisée dans un milieu normal (non quantifié).

### II.1.2. Mise en évidence de l'activité enzymatique dans le milieu de culture.

Trois types d'expériences ont été réalisées en utilisant la P56 radiomarquée immunoadsorbée sur l'AcMc 23D52H6:

#### - Incubation de la P56 avec un milieu sans cellules.

\* Le milieu d'éclatement de schizontes provenant d'une culture synchrone en RPMI/DS (parasitémie environ de 15%), récupéré environ 10 h après le début de la réinvasion, ne provoque pas la protéolyse de la P56 (Fig. 14, f,s): le profil observé dans ces pistes est identique à celui de la P56 incubée dans le milieu de culture seul (Fig. 14, a ou o).

\* Le milieu d'éclatement des schizontes purifiés sur métrizamide (parasitémie environ 80%), récupéré dans les mêmes conditions que précédemment, donne des résultats similaires (Fig. 14, g,q). Aucune protéolyse de la P56 n'est observée si la culture est réalisée dans un milieu normal (10% de sérum), (Fig. 14, h).

\* La protéolyse de la P56 n'a été observée qu'une seule fois (sur 4 expérimentations) lors d'une incubation avec un milieu d'éclatement de schizontes récupéré 10 h après la purification sur métrizamide et leur remise en culture en RPMI/DS (Fig. 14, k) ou RPMI + caryoser (Fig. 14, n). La P56 a complètement

disparu par rapport aux témoins (Fig. 14, i,l) alors qu'un fragment de 50 kD est retrouvé.

**- Incubation avec les schizontes en culture.**

\* La P56 incubée 15 h avec une culture synchrone de schizontes en RPMI/DS est protéolysée en un fragment de 50 kD (Fig. 14, b ou r). Si la culture est réalisée dans un milieu normal (RPMI + 10% de sérum), la protéolyse est beaucoup plus faible (Fig. 14, d).

\* La P56 incubée 15 h avec une culture de schizontes purifiés sur métrizamide en milieu RPMI/DS (Fig. 14, c ou p) ou en RPMI + caryoser (Fig. 14, m) est protéolysée comme précédemment en un fragment de 50 kD. Si la culture est réalisée en milieu normal, la protéolyse est beaucoup plus faible (Fig. 14, e).

\* Si la P56 est incubée 15 h avec des hématies saines en RPMI/DS aucune protéolyse n'est observée (Fig. 13, b).

**- Incubation avec un lysat cellulaire.**

\* Si la P56 est incubée 15 h à 37°C avec des hématies saines (Fig. 13, g) ou des schizontes (Fig. 13, f) lysés par congélation / décongélation dans le milieu RPMI/DS, aucune protéolyse de la P56 n'est observée.

**II.1.3. Caractérisation *in vitro* de l'activité protéasique par les inhibiteurs de protéases.**

Nous avons tenté de caractériser à l'aide d'inhibiteurs de protéases la protéolyse de la P56 décrite précédemment lors d'une incubation avec des schizontes en phase d'éclatement en milieu RPMI + dialysat de sérum. Les

inhibiteurs sont ajoutés (à 50  $\mu\text{g/ml}$  final) à la culture en même temps que le substrat P56; l'incubation durant 15 h. La protéolyse de la P56 observée sans inhibiteur (Fig. 15, c) est complètement inhibée par la leupeptine, l'antipain, et la chymostatine (Fig. 15, d, e, f), partiellement inhibée par le 4-amino-benzamidine (Fig. 15, g), et est insensible à l'aprotinine (Fig. 15, h).

La protéolyse extraparasitaire de la P56 radiomarquée nous affranchit du problème de pénétration de l'inhibiteur jusqu'au site naturel de protéolyse (qui peut être intraglobulaire, bien que non précisé), et nous permet d'envisager une caractérisation plus précise de la protéolyse en utilisant des dilutions d'inhibiteurs spécifiques des trois classes d'endoprotéases: sérine, cystéine et aspartique protéases.

Les témoins négatif et positif (T-, T+) ont été indiqués pour chacune des expériences regroupées sur la figure 16.

- Parmi les inhibiteurs spécifiques des cystéines protéases utilisés, le plus efficace est le E64 qui inhibe encore complètement la protéolyse de la P56 à une concentration de 2,8  $\mu\text{M}$  (Fig. 16, B). Le NEM montre une inhibition pour des concentrations supérieures à 8  $\mu\text{M}$  (Fig. 16, F), l'iodoacétamide est encore partiellement inhibiteur à 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 16, I) et l'effet du pCMBa disparaît pour des concentrations inférieures à 14  $\mu\text{M}$  (Fig. 16, E).

- Les inhibiteurs dont la spécificité regroupe les cystéines et les sérines protéases inhibent tous la protéolyse de la P56 jusqu'à des concentrations de 1  $\mu\text{M}$ . La leupeptine inhibe encore partiellement la protéolyse à 0,2  $\mu\text{M}$  (Fig. 16, A), la chymostatine et l'antipain à 0,15  $\mu\text{M}$  (Fig. 16, C et D). Le TLCK (inhibiteur spécifique de la trypsine) n'a plus d'effet à 12,6  $\mu\text{M}$  (Fig. 16, G).

Tableau n° 2 : DETECTION DES ACTIVITES PROTEASIQUES  
(Galeries API)

Les activités enzymatiques ont été recherchées dans:

- un lysat de schizontes: LYSAT HP
- le milieu de culture (RPMI + dialysat), après 15 h d'incubation avec des schizontes: MILIEU HP.
- le milieu de culture (RPMI + dialysat), après 15 h d'incubation avec des schizontes en présence de leupeptine (50 µg/ml): MILIEU HP/Leup.
- un lysat d'hématies saines: LYSAT HS.
- le milieu RPMI + dialysat: MILIEU Témoin.

SUBSTRATS	LYSAT HP	MILIEU HP	MILIEU HP/Leup	LYSAT HS	MILIEU Témoin
ALA-X	+++	+++	+++	+	-
β-ALA-X	-	-	-	+	-
ASP-ALA-X	+++	+	+	+	-
GLY-ALA-X	+++	+++	++	-	-
LEU-ALA-X	+	+++	-	-	-
LYS-ALA-X	+++	++	++	-	-
PHE-PRO-ALA-X	++	+	+	-	-
ALA-PHE-PRO-ALA-X	+	-	-	-	-
N-benzoyl-ALA-Y	-	-	-	-	-
N-benzoyl-LEU-X	-	-	-	-	-
ILE-X	-	-	-	-	-
PRO-X	-	-	-	-	-
OH-PRO-X	-	-	-	-	-
GLY-PRO-X	-	+	-	-	-
PHE-PRO-X	-	+	+	+	+
ALA-PHE-PRO-X	-	-	-	-	-
D-L-MET-X	+++	+++	++	+	-
SER-MET-X	++	+++	++	-	-
PHE-X	+++	+	-	+	-
GLY-PHE-X	+++	++	-	-	-
HIS-PHE-X	+	-	-	-	-
TRP-X	+++	++	++	-	-
GLY-TRP-X	+	+	+	-	-
GLY-X	+	-	-	-	-
GLY-GLY-X	-	-	-	-	-
LEU-GLY-X	-	-	-	-	-
SER-X	++	-	-	-	-
HIS-SER-X	-	-	-	-	-
VAL-TYR-SER-X	-	-	-	-	-
LEU-LEU-VAL-TYR-SER-X	-	-	-	-	-
LYS-SER-Y	++	-	-	-	-
THR-X	-	-	-	-	-
S-benzyl-CYS-X	+++	++	+	+	-
TYR-X	+	-	-	+	-
SER-TYR-X	+	-	-	-	-
GLN-X	+++	++	++	-	-
ASP-X	-	-	-	-	-
δ-GLU-X	-	-	-	-	-
α-GLU-X	-	-	-	-	-
GLN-α-GLU-X	-	-	-	-	-
ARG-X	+++	++	++	+	-
ALA-ARG-X	+++	++	+	+	-
ARG-ARG-X	++	+	+	+	-
ASP-ARG-X	+++	+	-	-	-
GLY-ARG-X	+++	-	-	-	-
PHE-ARG-X	-	+	+	-	-
PRO-ARG-X	++	+	+	-	-
N-CBZ-ARG-Y	-	-	-	-	-
N-CBZ-GLY-GLY-ARG-X	-	-	-	-	-
LYS-X	+++	+++	+++	+	-
LYS-LYS-X	+	++	++	-	-
N-acétyl-GLY-LYS-X	-	-	-	-	-
ORN-X	+++	+	+	-	-
HIS-X	+	-	-	-	-
GLN-HIS-X	-	-	-	-	-
HIS-LEU-HIS-X	-	-	-	-	-

( X=β-naphtylamide ) ( Y=4-méthoxy β-naphtylamide )

Le nombre approximatif de nanomoles de substrat libérées par l'activité enzymatique peut être déduit de l'intensité des réactions obtenues:

+ : 5 nanomoles ++ : 20 nanomoles

+++ : 40 nanomoles

- Les inhibiteurs spécifiques de sérines protéases n'inhibent pas ou faiblement la protéolyse de la P56. L'aprotinine n'inhibe pas à 50 µg/ml (7,7 µM) (Fig. 15, h) et le 4-aminobenzamidine faiblement à 50 µg/ml (240 µM) (Fig. 15 g).

- La pepstatine, inhibiteur des aspartiques protéases, inhibe la protéolyse jusqu'à une concentration de 10 µM (Fig. 16, H).

## II.2. Recherche d'activités protéolytiques dans les extraits parasitaires avec d'autres substrats.

### II.2.2. Substrats APIZYM.

Des activités protéasiques ont été mises en évidence dans le milieu d'éclatement de schizontes en utilisant des galeries API<sup>R</sup>. Ces galeries permettent de tester simultanément 59 substrats d'endo ou d'exopeptidases. Il est ainsi possible de cerner la spécificité des enzymes présentes dans un échantillon.

Les activités enzymatiques d'un milieu d'éclatement de schizontes en présence ou non de leupeptine, dans un milieu contenant du dialysat de sérum, ont été comparées à celles d'un lysat de schizontes (Tableau n°2). Les substrats sont répartis en quatre classes selon la nature de l'acide aminé impliqué dans la coupure. La première implique un acide aminé non polaire (hydrophobe) dans la liaison avec le naphtylamide: ALA, VAL, LEU, ILE, PRO, MET, PHE, TRP; la deuxième implique un acide aminé polaire non chargé: GLY, SER, THR, CYS, TYR, ASN, GLN; la troisième un acide aminé chargé négativement: ASP, GLU et la dernière un acide aminé chargé positivement au pH neutre du milieu de culture: LYS, ARG, HIS.

Dans un milieu d'éclatement de schizontes en RPMI/DS, les substrats de la première classe comprenant ALA, MET (sauf BALA ou si PRO est engagé dans la liaison N-terminale avec ALA) ou les acides aminés aromatiques PHE et TRP (sauf HIS-PHE) en position C-terminale sont fortement hydrolysés. Une faible activité est détectée pour les substrats renfermant les acides aminés polaires non chargés: CYS et GLN, en position C-terminale. Si un acide aminé chargé négativement (ASP, GLU) est engagé dans la liaison avec le naphtylamide le substrat n'est alors pas hydrolysé. Une forte activité est par contre observée pour les substrats contenant un amino-acide chargé positivement du côté C-terminal (ARG, LYS), sauf pour l'histidine.

Si l'éclatement a lieu en présence de leupeptine (50 µg/ml), l'hydrolyse du substrat LEU-ALA-B-naphtylamide est complètement inhibée et celle du substrat GLY-PHE-B-naphtylamide l'est très fortement. D'autres substrats voient leur hydrolyse diminuer de manière moins significative, c'est le cas de GLY-ALA-X, LYS-ALA-X, D,L-MET-X, SER-MET-X, CYS-X, ALA-ARG-X.

Si l'on compare les activités protéasiques du milieu d'éclatement à celles d'un lysat de schizontes (lysés par congélation / décongélation et repris dans du RPMI/DS), on remarque que certains substrats sont nettement plus dégradés dans le lysat que dans le milieu. C'est le cas pour les substrats où ARG est engagé dans la liaison avec le naphtylamide (surtout GLY-ARG-X), mais aussi pour ORN-X, SER-X, LYS-SER-X, PHE-X, ASP-ALA-X. Seul le substrat LEU-ALA-X est beaucoup moins hydrolysé dans le lysat que dans le milieu.

Les activités enzymatiques présentes dans le lysat d'hématies saines ou dans le milieu de culture (RPMI/DS) sont en concentrations très faibles et n'interfèrent pas avec le test.

### II.2.3. Technique gélatine-SDS-PAGE.

Heussen et Dowdle, (1980) ont mis au point une technique de mise en évidence d'activité protéolytique dans un gel d'électrophorèse contenant de la gélatine copolymérisée à l'acrylamide.

Nous avons utilisé cette technique pour rechercher une activité protéolytique dans un milieu d'éclatement de schizontes. Pour cela, après purification sur métrizamide, des schizontes sont incubés dans un milieu contenant du dialysat de sérum supplémenté ou non de leupeptine ou de E64. Les milieux sont analysés directement ou après concentration. Les activités du milieu sont comparées à celles d'un lysat de schizontes ou d'hématies saines.

Les milieux de culture après éclatement des schizontes, avec ou sans leupeptine, sont trop pauvres en protéines pour détecter une quelconque activité (Fig. 17, F,G). Par contre, après une concentration (50 à 100 fois) des mêmes milieux, il apparaît une zone d'activité enzymatique aux environs de 35.000 daltons dans le milieu d'éclatement en présence de leupeptine (Fig. 17, D), alors que dans le milieu sans inhibiteurs (Fig. 17, C) ou avec le E64 (Fig. 17, E) aucune activité n'est visualisée.

Dans un lysat de schizontes obtenu par congélation / décongélation, une activité protéolytique est observée à 45.000 daltons (Fig. 17, A). Aucune activité n'est détectée dans un lysat d'hématies saines obtenu dans les mêmes conditions (Fig. 17, B).

### III. RECHERCHE DES SITES DE COUPURE DE LA P126 PAR MICROSEQUENCAGE NH<sub>2</sub>- TERMINAL DES FRAGMENTS DE PROTEOLYSE.

Les produits de protéolyse de la P126 sont purifiés par affinité à l'aide des anticorps monoclonaux 23D52H6 (anti P50) et 3E91A11 (anti P73). Les protéines P50 et P73 sont purifiées à partir d'un milieu de culture normale, et



la protéine P56 purifiée à partir du milieu d'une culture bloquée par la leupeptine.

La composition de chaque fraction purifiée est analysée par SDS-PAGE suivie d'une coloration des protéines à l'argent ou d'un immunoélectrotransfert avec une révélation par le sérum de lapin polyclonal monospécifique anti P126 (126-3) ou par les anticorps monoclonaux ayant servi à la purification.

Une électrophorèse préparative est ensuite réalisée à partir des fractions purifiées de façon à obtenir au moins une nanomole de chaque bande protéique à séquencer. Les protéines sont transférées sur une membrane d'immobilon et colorées. Les protéines identifiées sont découpées et soumises directement à un microséquençage N-terminal.

Les résultats sont comparés aux séquences déduites de la séquence nucléotidique du gène de la P126 (BZIK *et al.*, 1988, KNAPP *et al.*, 1989).

Tableau n°3: Résultat des séquences NH<sub>2</sub>-terminales.

	-CYS-THR-GLY-GLU-SER-GLN-THR-GLY-ASN-THR-GLY-
SERA	.....23.....26.....29.....32...
SERPI	.....23.....26.....29.....32...
P126	THR-GLY-GLU-SER-GLN-THR-GLY-ASN-THR-GLY-
P73 S <sub>1</sub>	THR-GLY-GLU-SER-GLN-THR-GLY-ASN-THR-GLY
	-GLU-THR-GLU-ASP-ASP-ASP-GLU-ASP-ASP-TYR-THR-
SERA	.....383.....386.....389.....392..
SERPI	.....377.....380.....383.....386..
P50	THR-GLU-ASP-ASP-ASP-GLU-PHE-ASP-TYR-THR-
P56	THR-GLU-ASP-ASP-ASP-GLU-ASP-ASP-TYR-THR-
	-GLN-ASP-THR-ALA-GLY-SER-GLY-GLN-SER-GLY-LYS-
SERA	.....879.....882.....885.....888...
SERPI	.....874.....877.....880.....883...
P73 S <sub>2</sub>	ASP-THR-ALA-GLY-SER-GLY-GLN-SER-GLY-LYS-

Les séquences N-terminales des protéines des protéines P126, P56, P50, P47 et P18 ont été obtenues par microséquençage NH<sub>2</sub>-terminal de protéines purifiées par affinité sur les anticorps monoclonaux, à partir du milieu de culture de Plasmodium falciparum.

Ces séquences sont retrouvées sur les séquences protéiques déduites des enchainements nucléotidiques publiées par BZIK et al. (1988): SERA et par KNAPP et al. (1989): SERPI.

### III.1. Protéine P50.

#### III.1.1. Purification et contrôles.

Deux litres de milieu de culture ont été chromatographiés sur les immunoabsorbants 23D52H6 et 3E91A11 placés en série. Le matériel élué de l'IADS 23D52H6 est analysé par SDS-PAGE.

1 µg de protéines est analysé par coloration à l'argent (Fig. 18, a). On observe une bande majeure à 50.000 daltons ainsi que trois autres bandes de masses moléculaires supérieures et une autre de masse moléculaire inférieure. L'analyse du même matériel en blot avec le sérum de lapin 126-3 (Fig. 19, e), ou avec l'AcMc 23D52H6 (Fig. 19, f) montre que la bande à 50 kD ainsi que deux bandes de plus haut poids moléculaire sont reconnus spécifiquement par les anticorps (elles correspondent à la P126 et à un produit de dégradation) alors que la bande de plus de plus haut poids moléculaire correspond aux anticorps révélés également sur les contrôles (Fig. 19, g,h).

#### III.1.2. séquence NH<sub>2</sub>-terminale.

900 µg de protéines ont alors été déposés et traités pour un microséquençage comme il est expliqué dans le chapitre matériels et méthodes. La bande correspondant à la P50 a été découpée et la protéine séquençée. La séquence N-terminale que nous avons obtenue pour les dix premiers acides aminés est: THR-GLU-ASP-ASP-ASP-GLU-PHE-ASP-TYR-THR- (Tableau n°3, P50).

Nous retrouvons cet enchaînement à partir de l'acide aminé 383 d'après la numérotation de la séquence publiée par BZIK *et al.* (1988), à partir du résidu 377 selon la séquence de KNAPP *et al.* (1989), et à partir du nucléotide 518 d'après la séquence publiée COPPEL *et al.* (1988). Le résidu identifié en 7<sup>ème</sup>

position est PHE alors que les 3 séquences nucléotidiques prévoient un résidu ASP.

### III.2. Protéine P56.

#### III.2.1. Purification et contrôles.

Des cultures synchrones de *P. falciparum* ont été traitées par la leupeptine. 800 ml de milieu de culture récupérés après éclatement des schizontes ont été chromatographiés sur l'immunoabsorbant 23D52H6. Le matériel élué est analysé par SDS-PAGE.

La coloration à l'argent de 1 µg de protéines éluées montre une bande protéique supplémentaire, de masse moléculaire apparente 56.000 daltons (Fig. 18, c), par rapport au profil obtenu à partir d'un milieu de culture normal (Fig. 18, a). Cette protéine est détectée en blot par le sérum de lapin 126-3 (Fig. 19, l) ainsi que par l'AcM 25D52H6 (Fig. 19, k) et correspond à la protéine P56.

#### III.2.2. séquence NH<sub>2</sub>-terminale.

La bande protéique correspondant à la P56 obtenue après électrophorèse de 1,5 mg de protéines éluées de l'IADS 23D52H6 et électrotransfert sur immobilon a été découpée et la protéine soumise à un microséquençage. La séquence obtenue: THR-GLU-ASP-ASP-ASP-GLU-ASP-ASP-TYR-THR (Tableau n°3: P56), est identique à la séquence N-terminale de la P50 (Tableau n°3: P50) à l'exception du 7<sup>ème</sup> résidu qui est ASF et non PHE, et correspond exactement à un décapeptide retrouvé sur les séquences publiées (BZIK et al., 1988, COPPEL et al., 1988, KNAPP et al., 1989).

### III.3. Protéine P126.

Quand les parasites sont cultivés en présence de leupeptine (50 µg/ml), une grande quantité de P126 est retrouvée dans le milieu de culture comme nous pouvons le remarquer sur les contrôles de la purification de la P56 (Fig. 18, c ou Fig. 19, k,l).

Ainsi, à partir de la feuille d'immobilon ayant servi au transfert du matériel purifié sur l'IADS 23D52H6 pour le séquençage de la P56, la bande correspondant à la P126 a été découpée et la protéine séquencée.

La séquence N-terminale pour les 10 premiers acides aminés: THR-GLY-GLU-SER-GLN-THR-GLY-ASN-THR-GLY (Tableau n°3: P126) est retrouvée sur les 2 séquences déduites publiées à partir de l'acide aminé n°23 selon les 2 numérotations (BZIK et al., 1988, KNAPP et al., 1989).

#### III.4. Protéine P73 (P47 + P18).

##### III.4.1. Purification et contrôles.

3 µg de protéines éluées de l'immunoabsorbant 3E91A11 sont analysés. La coloration à l'argent fait apparaître une bande majeure à 73.000 daltons ainsi qu'une autre bande intense de haut poids moléculaire (Fig. 18, b). Par western blot, cette bande supérieure est détectée sur les contrôles (Fig. 19, a,b). La P73, dans les conditions de détection, n'est pas reconnue par l'AcMc 3E91A11 utilisé pour la purification (Fig. 19, c). Par contre elle est la seule bande protéique détectée par le sérum de lapin 126-3 (Fig. 19, d).

### III.4.2. séquences NH<sub>2</sub>-terminales.

1,5 mg de protéines éluées ont alors été traitées par SDS-PAGE, la bande correspondant à la P73 a été découpée et la protéine séquencée. Pour chaque cycle de dégradation, deux résidus d'acide aminé ont été détectés. 10 couples de résidus d'acides aminés ont ainsi été obtenus: (THR,ASP), (GLY,THR), (GLU,ALA), (SER,GLY), (GLN,SER), (THR,GLY), (GLY,GLN), (ASN,SER), (THR,GLY), (GLY,LYS), ce qui était attendu car la P73 est composée de 2 fragments de 47 et 18 kD reliés par des ponts dissulfures. La position observée pour le N-terminal de la P50 suggérait que l'un au moins des fragments de la P73 devait se trouver dans la région N-terminale de la P126 et pouvait correspondre au N-terminal du précurseur P126. Nous avons ainsi déduit des couples de résidus un décapeptide S<sub>1</sub>: THR-GLY-GLU-SER-GLN-THR-GLY-ASN-THR-GLY (Tableau n°3: P73 S<sub>1</sub>), correspondant à cette séquence et par soustraction un décapeptide S<sub>2</sub>: ASP-THR-ALA-GLY-SER-GLY-GLN-SER-GLY-LYS (Tableau n°3: P73 S<sub>2</sub>), que nous avons alors trouvé identique à un peptide localisé à partir de l'acide aminé n°879 selon la séquence publiée par BZIK *et al.* (1988) ou n°874 d'après la numérotation de KNAPP *et al.* (1989).

La taille théorique des fragments obtenus après localisation de la P50 sur la séquence de la P126 suggérait alors que la séquence S<sub>1</sub> devait être la P47, N-terminale sur la P126, et la séquence S<sub>2</sub> au fragment de 18 kD, à l'extrémité C-terminale de la P126.

## DISCUSSION

## I. PROTEOLYSE DE LA P126 ET INHIBITEURS DE PROTEASES.

La P126, un composant de la vacuole parasitophore de *P. falciparum* au stade intraérythrocytaire, a été décrite comme étant protéolysée en deux fragments majeurs de 50 kD (P50) et 73 kD (P73) au moment de la libération des mérozoïtes (DELPLACE et al. 1987). Après avoir été synthétisée entre la 32<sup>ème</sup> et la 36<sup>ème</sup> heure du cycle intraérythrocytaire, la protéine est stockée pendant 4 h dans la vacuole parasitophore sans subir de dégradations protéolytiques apparentes. Bien que les produits de protéolyse soient seulement trouvés dans le milieu de culture et non dans les hématies parasitées, il a été montré que la protéolyse de la P126 se passait à l'intérieur des hématies parasitées et pas dans le milieu de culture (DELPLACE et al. 1987). Ainsi, une très étroite relation semble exister entre la protéolyse de la P126 et la libération des mérozoïtes.

Des inhibiteurs de protéases, dont certains sont connus pour interférer avec la libération des mérozoïtes chez *P. knowlesi* et *P. falciparum* (HADLEY et al., 1983, LYON et al., 1986), ont donc été utilisés pour tenter de cerner plus précisément la relation fonctionnelle possible entre la protéolyse de la P126 et la libération des mérozoïtes.

### I.1. Effet des inhibiteurs de protéases sur les schizontes.

Parmi les inhibiteurs de protéases utilisés, nous avons identifié deux composés, la leupeptine et le E64, qui altèrent qualitativement la protéolyse de la P126. Cependant, tous les inhibiteurs testés provoquent une diminution plus ou moins forte du nombre d'hématies nouvellement envahies par rapport aux témoins (Tableau n°1). Cet effet pourrait résulter soit d'un effet toxique de l'inhibiteur sur le développement des schizontes, soit une inhibition de la libération des mérozoïtes, ou encore une inhibition de l'invasion.



Dans nos conditions expérimentales, le TLCK et le TPCK apparaissent très toxiques en provoquant la formation de formes parasitaires picnotiques (Fig. 2). La leupeptine et le E64 conduisent à l'accumulation de schizontes apparemment matures, ce qui correspondrait au blocage de la libération des mérozoïtes. L'action des autres inhibiteurs sur les schizontes (chymostatine, antipaïne, bestatine) est moins nette, et pour lesquels aucune conclusion définitive ne peut être tirée.

La toxicité de la leupeptine et du E64 sur la maturation des schizontes ne peut être complètement exclue. DLUZEWSKI *et al.* (1986), ont montré un effet toxique de la leupeptine sur un stade plus jeune du parasite intra-érythrocytaire (trophozoïte) en provoquant chez celui-ci la formation d'une grosse vacuole, que nous avons également observée. Celle-ci renfermerait de l'hémoglobine non digérée (ROSENTHAL *et al.*, 1988). Ainsi il semblerait que la leupeptine et le E64 aient un effet différent à deux stades parasitaires. Nous pouvons supposer une action sur deux systèmes protéolytiques différents: l'un participant à la dégradation de l'hémoglobine à partir du stade trophozoïte jeune, le second étant lié à l'éclatement des schizontes matures. Nous avons toujours veillé à travailler avec des formes âgées de *P. falciparum* qui avaient dépassé le stade trophozoïte sensible à ces inhibiteurs. Dans ces conditions, la leupeptine n'altère pas de manière significative la maturation des schizontes dans nos conditions expérimentales.

Une étude en microscopie électronique de schizontes incubés avec de la leupeptine (50 µg/ml) montre que la leupeptine ne révèle aucun signe morphologique d'altération des mérozoïtes à l'intérieur de l'érythrocyte. Ceux-ci apparaissent libres dans l'hématie, la membrane de la vacuole parasitophore étant rompue; aucune altération de la membrane érythrocytaire n'est observée. La préservation du squelette sous membranaire (ATKINSON *et al.* 1988) permettrait d'expliquer que la membrane érythrocytaire reste en place et qu'elle présente une morphologie normale en microscopie électronique. Cependant, le fait

de trouver dans le milieu extérieur des macromolécules de 73 kD et 56 kD semble indiquer que cette membrane puisse être perméabilisée.

L'accumulation de schizontes matures après un traitement par la leupeptine semble correspondre aux "clusters" de mérozoïtes décrit par LYON *et al.* (1986) sous l'effet d'un mélange d'inhibiteurs de protéases, dont fait partie la leupeptine. Il semble donc, d'après les résultats obtenus avec les différents inhibiteurs isolés que la leupeptine seule soit capable d'induire l'apparition de ces formes schizontes bloquées.

## I.2. La leupeptine et le E64 modifient la transformation de la P126.

L'immunoprécipitation des milieux de culture et des lysats d'hématies parasitées après un marquage métabolique et une chasse en présence d'inhibiteurs de protéases montre que quel que soit le devenir des parasites et l'effet des inhibiteurs, la quasi totalité de la P126 ou de ses fragments sont retrouvés dans le milieu de culture. Nous rappelons que dans les conditions utilisées, la P126 est synthétisée (et radiomarkée) avant l'addition des inhibiteurs. L'effet de ces inhibiteurs peut s'expliquer par une activité différente sur le schizonte:

- soit le composé est toxique (TLCK, TPCK, Fig. 6), dans ce cas il y a mort du parasite. On observe alors la P126 intacte dans le milieu de culture, elle semblerait relarguée par le parasite. Par ailleurs, ces mêmes composés provoquent l'apparition de formes picnotiques dans la culture (Fig. 2).

- soit le composé est inactif, et ne modifie pas l'évolution du parasite et la protéolyse de la P126 (Fig. 6).

- soit on remarque dans le cas de la leupeptine et du E64, un blocage du schizonte mature (Fig. 3) et une modification de la protéolyse de la P126 (Fig.6).

Sous l'effet de ces 2 inhibiteurs, un polypeptide de 56 kD (P56) est trouvé à la place de la P50. CHULAY *et al.* (1987) ont décrit l'accumulation d'un antigène de 55 kD immunoprécipité par leur anticorps monoclonal 5E3 (qui reconnaît la P50) dans des cultures mises en présence d'un mélange de chymostatine et leupeptine. Nous démontrons ici que la leupeptine seule produit cet effet. De plus, la P73 avec ses deux fragments de 47 et 18 kD reliés par des ponts dissulfures ne semble pas être altérée par ces inhibiteurs.

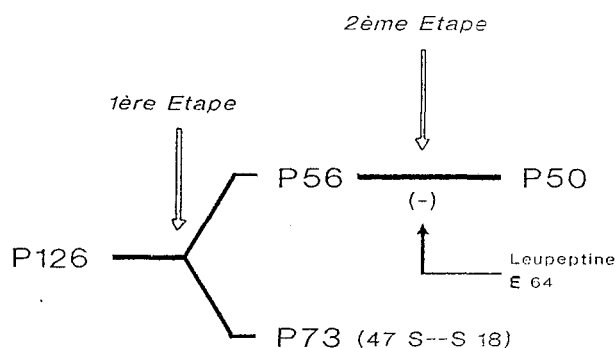
Il semble donc que la protéolyse de la P126 se passe en deux étapes, la première étant insensible à la leupeptine et donnant les polypeptides de 73 et 56 kD et la seconde correspondant au clivage 56 --> 50 kD sensible à la leupeptine et au E64. La P56 serait un produit intermédiaire dans la protéolyse de la P126. L'observation d'une bande mineure à 56 kD sur le fluorogramme surexposé montrant la protéolyse normale de la P126 est en accord avec cette hypothèse (Fig. 8,B,d').

Ainsi, la leupeptine interrompait le processus protéolytique de dégradation de la P126. Ceci pourrait se passer selon deux mécanismes: soit par une inhibition directe de la protéase responsable du clivage P56 --> P50, soit par un effet sur le métabolisme du parasite qui conduirait au blocage de la transformation 56 / 50. La leupeptine faisant partie des inhibiteurs des protéases de type trypsique, il était intéressant d'analyser l'action de la trypsine sur la molécule obtenue dans des conditions de blocage par la leupeptine. Nos résultats montrent que l'action de la trypsine sur la P56 donne un produit intermédiaire de 50 kD qui comigre avec la P50 obtenue dans des conditions normales (cette protéolyse trypsique est inhibée par la leupeptine). Une hydrolyse trypsique plus poussée des 2 molécules fait apparaître des fragments de même masse moléculaire. Bien sûr, notre analyse par SDS-PAGE montre seulement une

comigration et ne démontre pas l'identité entre les sites de clivages enzymatiques dans les deux molécules. L'analyse des extrémités N-terminales des différents fragments de 50 kD permettrait seule de déterminer ces sites.

Nos résultats vont dans le sens de la première hypothèse et suggèrent que le clivage P56 / P50 est du à une protéase de type trypsique inhibée spécifiquement par la leupeptine ou le E64. Le fragment de 6 kD dérivé de cette protéolyse n'a pas été trouvé mais pourrait ne pas être radiomarqué, ou non reconnu par les anticorps, ou complètement protéolysé.

Nous avons ainsi proposé le schéma suivant pour la transformation de la protéine P126 lors de la libération. Deux étapes successives peuvent être distinguées, la seconde étant inhibée par la leupeptine. Le fait que la dégradation 73 / 56 puisse se dérouler indépendamment de la libération des mérozoïtes alors que l'étape 56 / 50 est inhibée par la leupeptine qui bloque également cette libération suggère une relation possible entre la transformation 56 / 50 et la libération des mérozoïtes.



Une hypothèse possible est que la protéolyse responsable du clivage 56 / 50 pourrait également participer à la déstabilisation de la membrane de l'hématie (par protéolyse du cytosquelette) et contribuer à la libération des parasites. Un préalable à la démonstration de cette hypothèse était de caractériser l'enzyme responsable du clivage 56 / 50. Cela supposait d'être capable d'analyser son activité, de le purifier à partir du parasite.

## II. CARACTERISATION DE LA PROTEOLYSE P56 → P50.

### II.1. Recherche de conditions permettant de préserver une activité enzymatique extraparasitaire.

L'activité enzymatique semble s'exercer naturellement dans l'hématie parasitée et non dans le milieu de culture (DELPLACE *et al.*, 1987); cependant, si cette activité apparaît au moment de l'éclatement du schizonte, l'enzyme sera alors libéré dans le milieu de culture.

Les premières expériences ont montré que nous ne pouvions pas mettre en évidence l'activité protéolytique dans le lysat d'hématies parasitées. Nous avons donc cherché à l'obtenir à partir du milieu de culture, après la libération des mérozoïtes, en considérant qu'il fallait dans ce cas essayer de préserver une activité protéolytique s'exerçant lors de la libération.

La mise en évidence d'une activité protéasique dans le milieu de culture de *P. falciparum* nécessitait dans un premier temps l'élimination des inhibiteurs macromoléculaires d'origine sérique. En effet, le milieu RPMI est supplémenté par 10% de sérum (TRAGER et JANSEN, 1976), d'où un apport d'inhibiteurs dont les principaux sont l'alpha-1 antitrypsine et l'alpha-2 macroglobuline (TRAVIS et SALVESEN, 1983). Ces inhibiteurs pourraient inhiber partiellement ou complètement des activités protéasiques d'origine parasitaire libérées dans le milieu de culture lors de l'éclatement des schizontes.

Nous avons tenté d'éliminer ces inhibiteurs soit en utilisant un substitut de sérum, ici le Caryoser (IBF), soit en dialysant le sérum contre le RPMI qui est ensuite utilisé pour la culture.

Des essais préliminaires nous ont conduit à utiliser le Caryoser à 4% dans le RPMI. Dans ces conditions, nous observons sur frottis pour une culture synchronisée de schizontes, incubés pendant 15 h dans ce milieu, une libération

des mérozoïtes qui n'est que légèrement inférieure au témoin, ce qui nous a permis d'utiliser ces conditions pour obtenir un milieu d'éclatement de schizontes. Cependant, la composition exacte du Caryoser n'étant pas complètement connue, nous avons aussi utilisé un second type de milieu de culture se rapprochant du milieu normal.

Dans ce cas, 1 volume de sérum est dialysé contre 5 volumes de RPMI pendant 24 H. Le milieu ainsi obtenu est débarrassé des éléments macromoléculaires.

La présence de ces substituts ne permet pas une croissance normale des parasites. Cependant, l'incubation de schizontes dans ces milieux modifiés permet encore la libération des mérozoïtes, tout en perturbant fortement la réinvasion comme le montre l'absence de formes jeunes. Les processus de protéolyse de la P126 avec ces milieux sont identiques à ce qui a été obtenu précédemment avec un milieu normal renfermant 10% de sérum. Nous observons dans ces conditions la P50, l'addition de leupeptine conduisant à l'apparition de la P56.

Ces deux milieux permettent donc d'obtenir un éclatement des schizontes et une protéolyse de la P126, et ainsi de récupérer d'éventuelles protéases d'origine parasitaire ou érythrocytaire afin d'essayer d'éviter leur inactivation par les inhibiteurs macromoléculaires sériques. Le milieu d'éclatement de schizontes ainsi récupéré, débarrassé des cellules par centrifugation, est utilisé pour rechercher une activité protéasique.

## II.2. Etude du substrat P56.

Le substrat sur lequel a été testé le milieu d'éclatement de schizontes est la P56. Nous utilisons la même méthode que pour l'hydrolyse de la P56 par la trypsine, à savoir que le substrat radiomarqué est apporté sous une forme immunoabsorbée. Nos résultats avec la trypsine avaient montré que la P56

immunoabsorbée pouvait être utilisée comme substrat. L'immunoabsorbant sur lequel est fixée la P56 est incubé avec le milieu de culture et nous observons ensuite par SDS-PAGE une éventuelle protéolyse de la P56. Nous n'avons observé une protéolyse nette de la P56 pour 4 expérimentations réalisées. Bien que nous n'ayons pas pu standardiser les conditions expérimentales permettant de mettre en évidence cette protéolyse, il semble exister dans le milieu de culture une activité capable de protéolyser la P56. Cependant, cette activité paraît être très labile. Elle pourrait perdre rapidement son activité, soit par inhibition, soit par l'action d'autres protéases.

Devant la difficulté de mettre en évidence et de caractériser une activité capable de dégrader la P56 dans le milieu de culture seul, le substrat a été incubé pendant 15 h dans la culture de schizontes. Dans ces conditions, la protéolyse 56 / 50 est toujours observée. Cette protéolyse existe mais est beaucoup moins efficace dans un milieu de culture normal renfermant 10% de sérum. Elle n'est pas d'origine érythrocytaire puisqu'elle n'est pas observée quand la P56 est incubée uniquement avec des hématies saines ou avec un lysat d'hématies saines. La protéolyse est donc d'origine parasitaire mais nécessite l'éclatement des schizontes pour être observée; si l'incubation est réalisée avec un lysat de schizontes la P56 n'est pas hydrolysée.

Si la leupeptine, la chymostatine ou l'antipain sont ajoutées en même temps que le substrat (à une concentration de 50 µg/ml), la protéolyse de la P56 est complètement inhibée. L'inhibition est partielle avec le 4-aminobenzamidine et nulle avec l'aprotinine. A ce stade nous pouvons nous demander si l'inhibition est due à une action sur la protéase ou à un effet cytotoxique sur le parasite qui conduirait à une absence libération de la protéase. Cependant, nous avons observé que la chymostatine et l'antipain n'ont, à cette concentration, aucun effet sur la protéolyse naturelle de la P126 (cf. résultats chapitre I.1.2.1.).

Part le fait que la protéolyse 56 / 50 que nous voulons caractériser se passe à l'extérieur du parasite, les concentrations en inhibiteurs utilisées ont été considérablement diminuées puisque l'inhibiteur n'a plus besoin de pénétrer dans le parasite pour agir. La toxicité éventuelle de l'inhibiteur sur le parasite devrait donc être fortement diminuée. Nous avons alors établi un profil d'inhibition de la protéolyse 56 / 50. L'effet, sur la protéolyse de la P56, de différentes concentrations d'inhibiteurs spécifiques de protéases à sérine, cystéine et aspartique a été testé. Les résultats montrent que le E64 (spécifique des protéases à cystéine), ainsi que trois inhibiteurs des protéases à sérines et cystéines: la leupeptine, la chymostatine et l'antipaïne inhibent totalement la protéolyse de la P56 jusqu'à une concentration de 1  $\mu$ M. Il semble donc que la protéase appartienne au groupe des cystéines protéases puisque aucun inhibiteur spécifique des sérines protéases ne provoque pas d'inhibition à de telles concentrations.

L'absence d'inhibition de la protéolyse P56 --> P50 dans les schizontes par la chymostatine et l'antipaïne (rappelée plus haut) pourrait s'expliquer par un problème d'accessibilité de ces inhibiteurs à l'enzyme intracellulaire. Ceux ci ne pénétreraient pas dans le globule parasité alors que la leupeptine et le E64 y accéderaient. Cette hypothèse de perméabilité différentielle aux inhibiteurs reste à vérifier.

### II.3. Etude d'autres substrats.

Parallèlement aux essais de protéolyse de la P56 par les extraits parasitaires, nous avons essayé d'analyser les activités protéasiques sensibles à la leupeptine et au E64 sur d'autres substrats. Cette mise en évidence a été réalisée à l'aide d'un substrat non spécifique (la gélatine) ou de substrats



synthétiques (galeries API). Dans chaque cas les milieux d'éclatement avec et sans leupeptine ont été testés.

La technique gélatine-SDS-PAGE (HEUSSEN et DOWDLE, 1980) est utilisée pour essayer de mettre en évidence, après séparation électrophorétique, une activité enzymatique capable de dégrader la gélatine copolymérisée à l'acrylamide et pour estimer la masse moléculaire apparante de cet enzyme.

Le milieu de culture est préalablement concentré entre 50 et 100 fois dans un système centricon afin d'augmenter la concentration en protéines tout en éliminant l'excès de sels. Aucune activité n'est observée dans le milieu de culture (RPMI + dialysat). Ce résultat est en contradiction avec ceux décrits par SCHREVEL *et al.* (1988) qui observent des activités dans le milieu à 95 kD et 40 kD. Cependant, lorsque les schizontes sont incubés en présence de leupeptine, nous mettons en évidence une activité protéasique à 35 kD (qui pourrait être équivalente à la 40 kD). Tout ce passe comme si cet inhibiteur préservait cette activité qui serait donc absente dans les conditions normales de culture. Le E64, spécifique des cystéines protéases, ne permet pas de préserver cette activité. D'autres part, la composition du milieu de culture utilisé par SCHREVEL *et al.* (1988) n'étant pas connue, il est possible qu'il contienne des inhibiteurs qui préserveraient également les activités observées.

Nous n'avons cependant pas retrouvé l'activité 35 kD dans un lysat de schizontes où n'apparait qu'une activité de 45 kD. Cette activité pourrait correspondre à une protéase du triplet 35/40 présenté par ROSENTHAL *et al.* (1987). Nous n'avons pas visualisé la protéase décrite par SCHREVEL *et al.* (1988) ou par BRAUN BRETON *et al.* (1988). Ceci pourrait dépendre de la maturité des schizontes puisque la protéase de 75 kD décrite par ROSENTHAL *et al.* (1987) (équivalente à la P76 de BRAUN BRETON *et al.*, 1988, et à la Pf68 de SCHREVEL *et al.*, 1988) est présente uniquement dans une préparation de mérozoïtes.

Nous avons également testé l'activité du milieu d'éclatement de schizontes dans un RPMI + dialysat de sérum sur des substrats synthétiques en utilisant le système APIZYM.

Les résultats montrent que de nombreuses activités protéasiques sont mises en évidence dans ce milieu, mais correspondent pour la plupart à des activités également présentes dans un lysat de schizontes. Cependant un substrat (LEU-ALA-X), faiblement dégradé dans le lysat de schizontes est très fortement hydrolysé par le milieu d'éclatement. De plus, cette hydrolyse est complètement absente si l'éclatement s'est produit en présence de leupeptine. Une analyse plus complète de l'hydrolyse de ce substrat serait nécessaire pour tirer des conclusions à partir de ce résultat préliminaire. Il serait en particulier capital de vérifier si le substrat correspond au site de clivage P56 / P50. La détermination des extrémités NH<sub>2</sub>-terminales de la P50 et de la P56 permettra peut être d'éclaircir ce point.

### III. SITES DE COUPURES PROTEOLYTIQUES DE LA P126 PAR MICROSEQUENCAGE NH<sub>2</sub>-TERMINAL DES FRAGMENTS.

Devant la très forte labilité de la protéase hydrolysant la P56, et les difficultés rencontrées pour la caractériser, nous avons envisagé une approche complémentaire consistant en l'identification des sites de clivage de la P126. Après que des séquences protéiques partielles de la P126 déduite des séquences nucléotidiques obtenues par génie génétique soient publiées (WEBER et al. 1987, COPPEL et al. 1988), la séquence complète de la P126 a été publiée pour la souche FCR3 (BZIK et al., 1988) et pour la souche FCBR (KNAPP et al., 1989). Il semblait alors possible de déterminer exactement les sites de coupure protéolytique dans la P126 par microséquençage NH<sub>2</sub>-terminal des produits de protéolyse (P50, P56, P47, P18).

Nous avons déterminé les séquences NH<sub>2</sub>-terminales en amino-acides de la P126 et de ses produits de protéolyse P50, P47, P18 qui sont libérés dans le milieu de culture au moment de l'éclatement des schizontes (DELPLACE *et al.* 1987). Ces séquences nous permettent de positionner dans l'ordre les produits de protéolyses sur le précurseur P126 en prenant comme référence les séquences nucléotidiques publiées (BZIK *et al.*, 1988, KNAPP *et al.*, 1989).

### III.1. Protéines P50 et P56.

Le fragment P50 peut être facilement localisé sur la séquence déduite du précurseur bien qu'une différence (PHE à la place de ASP) soit observée pour le 7<sup>ème</sup> résidu. Le séquençage N-terminal de la P56 donne le même résultat que la P50 bien que dans ce cas, ASP soit retrouvé à la place attendue. Cette différence est difficile à comprendre parce que la P50 est connue pour être un produit de protéolyse de la P56 (DEBRABANT et DELPLACE, 1989), et que le même isolat (FCR3) a été utilisé tout au long de cette expérience.

Ayant déterminé des séquences N-terminales identiques (à l'exception du 7<sup>ème</sup> résidu) pour la P50 et la P56, nous arrivons à la conclusion que le site de clivage 56 / 50, qui dépend d'une protéase de type trypsique inhibée par la leupeptine, est localisé dans la partie C-terminale de la P56. Seule la détermination de la séquence C-terminale en amino-acide de la P50 nous aidera à identifier ce site de protéolyse.

### III.2. Protéine P126.

La séquence N-terminale de la P126 a été déterminée à partir de la molécule isolée d'un milieu de culture de schizontes traités par la leupeptine. Nous pouvons nous demander si celle-ci correspond à la molécule native trouvée dans la vacuole parasitophore du schizonte et par conséquent si la séquence N-terminale que nous avons obtenue correspond à celle de la molécule native. Bien que nous ne puissions pas conclure sur ce problème, nos résultats prédisent un site de clivage de la séquence signal au résidu 23, ce qui correspond à une séquence signal de 22 amino-acides, soit 6 résidus de plus que la séquence prédite par BZIK et al. (1988). De plus, la signal peptidase couperait après un résidu cystéine; cette spécificité a également été trouvée pour un autre antigène

de schizonte: la protéine P195 (HOLDER et FREEMAN, 1982), par un séquençage N-terminal d'un produit de protéolyse de 80 kD (HOLDER *et al.*, 1985, STRYCH *et al.*, 1987) localisé à la surface des mérozoïtes (FREEMAN et HOLDER, 1983). Le séquençage N-terminal des deux molécules natives serait nécessaire pour confirmer ces données, puisque dans les deux cas, il a été déterminé à partir de molécules obtenues après la libération des mérozoïtes.

### III.3. Protéine P73.

La localisation des segments N-terminaux de la P50 et de la P126 nous a aidé à situer les fragments de la P73 qui ont été séquencés simultanément. En effet, les protéines P47 et P18 sont associées par des ponts dissulfures pour former un complexe de 73.000 daltons (P73) lorsqu'il est analysé par SDS-PAGE en conditions non réductrices (DELPLACE *et al.*, 1987, BATHIA *et al.*, 1987). Les séquences N-terminales en amino-acides ont été déterminées à partir de la P73 et non à partir des protéines P47 et P18 séparées pour éviter une contamination de la P47 avec les chaînes lourdes d'immunoglobulines. Ainsi, pour chaque cycle de dégradation de la P73 nous avons obtenu un couple d'acides aminés. Ces paires d'acides aminés ont été arrangées en deux séquences appelées  $S_1$  et  $S_2$  correspondant à deux séquences trouvées sur les séquences précurseurs P126 publiées par deux auteurs différents (BZIK *et al.*, 1988, KNAPP *et al.*, 1989). La méthode utilisée a été de vérifier si la séquence N-terminale trouvée pour la P126 pouvait être construite à partir des paires d'acides aminés trouvées; tel était le cas ( $S_1$ ) et la série d'acides aminés restante correspondait à une séquence localisée dans la région C-terminale de la P126. Ce résultat était attendu depuis que la P50-56 était localisée: les deux composants de la P73 devaient se localiser de part et d'autre de la P50-56 puisque le nombre d'acides aminés de l'un ou de l'autre côté du fragment de 50 kD était insuffisant pour contenir un polypeptide de 73 kD.

Les séquences  $S_1$  et  $S_2$  sont attribuées aux peptides N-terminaux respectivement de la P47 et de la P18 déduits de la séquence prédite de la P126: le peptide  $S_2$  est le N-terminal d'un polypeptide de 111 amino acides, qui par conséquent devrait avoir une masse moléculaire de 12,2 kD. Ce polypeptide peut correspondre au fragment de 18 kD. La différence entre la masse moléculaire calculée (12,2 kD) et mesurée en SDS-PAGE (18 kD) pourrait s'expliquer par des phénomènes post traductionnels. Pour des questions de taille, ce polypeptide ne peut pas correspondre au fragment de 47 kD, ce qui nous conduit à localiser la P47 du côté N-terminal de la P126. Cette localisation implique que la P47 contienne la séquence polysérine. Par ailleurs, des anticorps dirigés contre une protéine recombinante contenant cette séquence reconnaissent la P47, de même que le marquage métabolique de la P126 avec de la sérine radioactive conduit à une forte incorporation de cet acide aminé dans la P47 en comparaison des autres fragments (DELPLACE communication personnelle).

#### **III.4. Activités protéasiques pouvant être responsables des sites de coupures déduits du microséquençage.**

Nous avons déterminé trois sites de clivage sur la séquence de la P126. Le site de coupure de la signal peptidase ainsi que les 2 autres sites décrit ci-après ont été déduits à partir de l'extrémités N-terminale des fragments de la P126 purifiés du milieu de culture. Nous ne pouvons pas exclure l'action d'exopeptidases (amino ou carboxypeptidases), ou d'endopeptidases libérant quelques amino acides sur ces fragments, ce qui fausserait la détermination des sites de clivage. La caractérisation des extrémités COOH-terminales de chaque fragment permettrait d'écarter cette hypothèse.

Si l'on admet qu'aucune dégradation secondaire n'est intervenue lors de cette étude, deux sites de clivage potentiels ont été déterminés sur la séquence de la P126 (en excluant celui de la signal peptidase): GLU--THR correspondant au site de clivage P47/P50 et GLN--ASP correspondant à la coupure P56/P18. Ces deux sites de protéolyse n'étant pas équivalents, deux protéases ayant des spécificités de substrat différentes doivent alors être impliquées. Ceci complique encore le schéma de protéolyse de la P126 pour lequel nous suggérons deux étapes: trois enzymes différents pourraient ainsi participer à ce phénomène. Aucune endopeptidase de *P. falciparum*, possédant ces spécificités n'a encore été décrite (SCHREVEL *et al.* 1988).

Une autre molécule de *P. falciparum* est protéolysée en fin de maturation des schizontes. Il s'agit de la P195 (HOLDER et FREEMAN, 1982), antigène majeur de surface des schizontes, qui donne naissance à des fragments de 83, 42 et 36 kD. Le moment du clivage n'a pas été défini aussi précisément que pour la P126, mais les deux événements pourraient être simultanés. Il était donc intéressant de comparer les sites de clivage des deux protéines. Ceci a été rendu possible récemment grâce aux travaux de HEIDRICH *et al* (1989) qui ont montré par séquençage N-terminal 2 sites de clivages: GLU--ALA et ASN--ASP dans la P195. Nous remarquons l'implication d'acides aminés acides (ASP, GLU) ou possédant un radical carboxamide (ASN, GLN) dans les sites de coupures de la P126 et de la P195. Les données sont insuffisantes pour affirmer que les mêmes enzymes sont impliqués dans les 2 phénomènes. Cependant, la localisation des 2 précurseurs dans le même compartiment (P195 dans la membrane du schizonte, P126 libre dans la vacuole parasitophore) qui les rend accessibles aux mêmes enzymes, et la simultanéité probable des événements, rend cette hypothèse envisageable.

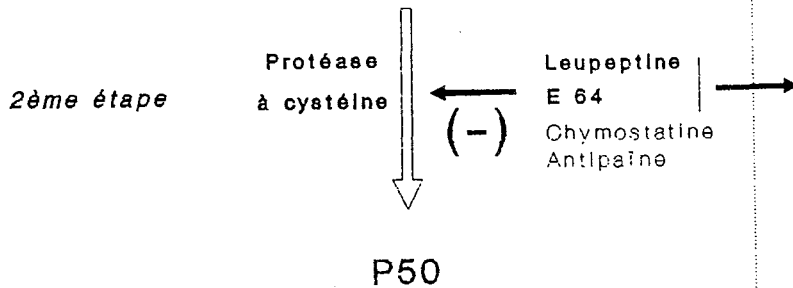
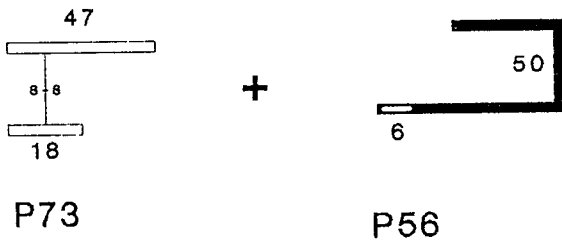
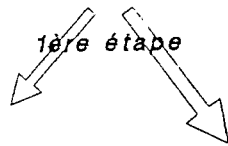
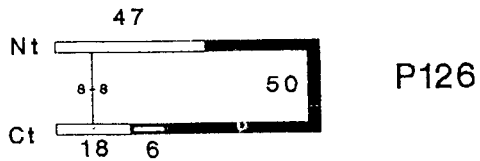
#### IV. ACTIVITE PROTEASIQUE DE LA P126 ?

Il a récemment été montré que la P126 présentait des homologies de séquence avec les cathepsines L, B, H, situées autour du site actif de ces protéases (HIGGINS *et al.*, 1989, EAKIN *et al.*, 1989). Ces deux régions du site actif correspondent aux acides aminés entourant la cystéine 585 et l'histidine 754 selon la numérotation de la séquence publiée par BZIK *et al.* (1988). Nos résultats montrent que ces régions ne sont pas localisées sur la P73. La détermination de la séquence C-terminale en amino acides de la P50 (et de la P56) permettra une localisation plus précise. Une activité type cathepsine de la P126 ou d'un de ces fragments, suggérée par ces auteurs reste cependant à démontrer de même que son rôle éventuel.



## CONCLUSION

*Protéolyse de la P126*



*Comportement  
des  
Parasites*

**Schizontes**

**Schizontes  
bloqués**

**Libération  
des  
mérozoïtes**

Initiée dans un contexte vaccinal (PERRIN *et al.*, 1984, DELPLACE *et al.*, 1985) qui reste d'actualité, l'étude de la protéine P126 a également débouché sur l'analyse d'un phénomène assez peu étudié: le mécanisme de la libération des mérozoïtes de *Plasmodium* à la fin du cycle érythrocytaire.

Bien que nous n'ayions pu aller aussi loin que nous le souhaitions dans l'analyse de l'activité enzymatique cystéine protéase qui est jusque là l'évènement le plus lié à la libération des mérozoïtes que l'on connaisse, nous avons progressé dans l'étude de ce phénomène et montré sa complexité. Il semble ainsi qu'au moins trois activités protéasiques puissent s'exercer dans le parasite en phase terminale de transformation de la P126.

La P126 est le témoin des activités enzymatiques qui interviennent au moment de la libération des mérozoïtes, mais il n'est pas exclu qu'elle ait elle même une activité enzymatique (éventuellement autocatalytique) comme l'ont suggéré certains auteurs après avoir constaté des homologies de séquence avec le site actif de certaines cathepsines (HIGGINS *et al.*, 1989, EAKIN *et al.*, 1989). Cette étude fonctionnelle reste à entreprendre.

Nous avons suggéré que la protéolyse pouvait être responsable de la déstabilisation de la membrane érythrocytaire en découpant le cytosquelette sous membranaire. Cela reste à étudier et plus précisément la protéolyse sensible à la leupeptine puisque la vacuole parasitophore est détruite en présence de leupeptine. De plus il a récemment été décrit chez *P. falciparum* une activité protéasique capable de dégrader des composants du cytosquelette érythrocytaire, en particulier la spectrine (DEGUERCY *et al.*, 1989). Nous ne pouvons cependant pas écarter l'hypothèse que la protéolyse 56 / 50 et la libération des mérozoïtes soient simplement des évènements concomitants.

La détermination des extrémités COOH-terminales des produits de protéolyse de la P126 reste également à entreprendre afin de savoir si d'autres sites de clivage sont présents sur cette molécule. Cette détermination permettrait de définir avec précision le site de clivage P56 / P50, apportant ainsi des informations sur la spécificité de la protéase impliquée dans ce clivage et également d'envisager l'élaboration de peptides synthétiques, analogues à ce site, et pouvant interférer avec la protéolyse naturelle. Les cystéines protéases comme cibles potentielles pour les inhibiteurs de protéases dans la chimiothérapie antiparasitaire ont été évoquées par McKERROW., (1989), de même que les protéases correspondantes l'ont été comme cibles vaccinales.

Cette application potentielle vient s'ajouter à l'intêret fondamental de l'élucidation du mécanisme de libération des parasites et renforce la nécessité de poursuivre ce travail.

## BIBLIOGRAPHIE

- AIKAWA, M., MILLER, L.H., JOHNSON, J., RABBEGE, J. (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell Biol.* 77, 72-82
- AIKAWA, M., STERLING, C.R. (1974) *Intracellular parasitic Protozoa*. Academic Press, New York
- AISSI, E., CHARET, P., BOUQUELET, S., BIGUET, J. (1983) Endoprotease in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 559-566
- ATKINSON, C.T., AIKAWA, M., PERRY, G., FUJINO, T., BENNETT, V., DAVIDSON, E.A., HOWARD, R.J. (1988) Ultrastructural localization of erythrocyte cytoskeletal and integral membrane proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *European Journal Of Cell Biology* 45(2): 192-9
- BANYAL, H.S., INSELBURG, J. (1985) Isolation and characterization of parasite-inhibitory *Plasmodium falciparum* monoclonal antibodies. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 34(6): 1055-64
- BANYAL, H.S., MISRA, G.C., GUPTA, C.M., DUTTA, G.P. (1981) Involvement of malarial proteases in the interaction between the parasite and host erythrocyte in *Plasmodium knowlesi* infections. *J. Parasitol.*, 67(5), 623-626
- BANYAL, H.S., PANDEY, V.C., RAO, V.K.M., DUTTA, G.P. (1978) Cultivation, isolation and enzymes activities of *Plasmodium knowlesi* merozoites. *Asian Cong. Parasit.*, pp; 88-89.
- BANYAL, H.S., PANDEY, V.C., RAO, V.K.M., DUTTA, G.P. (1980) Hydrolytic enzymes of merozoites and other erythrocytic stages of *Plasmodium knowlesi*. *International Symposium: Hundred years of malaria research, ICMR* pp. 92-93
- BARRETT, A.J. (1977) Cathepsin D and others carboxyl proteinases. In *Proteinases in mamalian cells and tissues* (Barrett, A.J. ed.), pp. 209-248. North holland, Amsterdam.
- BERNARD, F., MAYER, R., PICARD, I., DEGUERCY, A., MONSIGNY, M., SCHREVEL, J., (1987) *Plasmodium berghei* and *Plasmodium chabaudi*: a Neutral Endopeptidase in Parasite Extracts and Plasma of Infected Animals *Experimental Parasitology*, 64, 95-103
- BERNARD, F., SCHREVEL, J. (1987) Purification of a *Plasmodium berghei* neutral endopeptidase and its localization in merozoite. *Molec. Biochem. Parasitol.*, 26, 167-73
- BHATIA, A., DELPLACE, P., FORTIER, B., DUBREMETZ, J.F., VERNES, A. (1987) Immunochemical analysis of a major antigen of *Plasmodium falciparum* (P126) among ten geographic isolates. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 36(1): 15-9
- BIANCO, A.E., CULVENOR, J.G., COPPEL, R.L., CREWETHER, P.E., MCINTYRE, P., FAVALORO, J.M., BROWN, G.V., KEMP, D.J., ANDERS, R.F. (1987) Putative glycophorin-binding protein is secreted from schizonts of *Plasmodium falciparum*. *Molecular And Biochemical Parasitology* 23(1): 91-102

- BIGGS, B.A., KEMP, D.J., BROWN, G.V. (1989) Subtelomeric chromosome deletions in field isolates of *Plasmodium falciparum* and their relationship to loss of cytoadherence in vitro. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 86(7): 2428-32
- BONNEFOY, S., MATTEI, D., DUBREMETZ, J.F., GUILLOTTE, M., JOUIN, H., OZAKI, L.S., SIBILLI, L., MERCEREAU-PUIJALON, O. (1988) *Plasmodium falciparum*: molecular analysis of a putative protective antigen, the thermostable 96-kDa protein. Experimental Parasitology 65(1): 69-83
- BRAUN-BRETON, C., JENDOUBI, M., BRUNET, E., PERRIN, L., SCAIFE, J., PEREIRA, DA, SILVA, L. (1986) In vivo time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. Molecular And Biochemical Parasitology 20(1): 33-43
- BRAUN-BRETON, C., PEREIRA, DA, SILVA, L. (1988) Activation of a *Plasmodium falciparum* protease correlated with merozoite maturation and erythrocyte invasion. Biology Of The Cell 64(2): 223-31
- BRAUN-BRETON, C., ROSNEBERRY, T.L., DA SILVA, L.P. (1988) Induction of the proteolytic activity of a membrane protein of *Plasmodium falciparum* by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C Nature 332, 457-459
- BRAUN-BRETON, C., ROSNEBERRY, T.L., DA SILVA, L.P. (1988) Induction of the proteolytic activity of a membrane protein of *Plasmodium falciparum* by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C Nature 332, 457-459
- BZIK, DJ., LI, WB., HORII, T., INSELBURG, (1988) Amino acid sequence of the serine-repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* determined from cloned cDNA Molecular and Biochemical Parasitology 30: 279-88
- CAMUS, D., LYON, J.A., REAUD-JAREED, T., HAYNES, J.D., DIGGS, C.L. (1987) Characterization of gp195 processed products purified from *Plasmodium falciparum* culture supernates. Molecular And Biochemical Parasitology 26(1-2): 21-7
- CERTA, U., GHERSA, P., DOBELI, H., MATILE, H., KOCHER, H.P., SHRIVASTAVA, I.K., SHAW, A.R., PERRIN, L.H. (1988) Aldolase activity of a *Plasmodium falciparum* protein with protective properties. Science 240(4855): 1036-8
- CHARET, P., AISSI, E., MAUROIS, P., BOUQUELET, S., BIGUET, J. (1979) Aminopeptidase in rodent *Plasmodium* Comp. Biochem. Physiol. 65(B): 519-524
- CHARET, P., RUFFIN, P., DHERIN, M., DUBREMETZ, J.F., BOUQUELET, S. (1980) Aminopeptidase of *Eimeria nieschulzi* physico-chemical properties and action of antimalarial drugs. Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee 55(4): 359-66
- CHARET, P., SLOMIANNY, C., PRENSIER, G., MOREAU, S. (1984) *Plasmodium* sp. et degradation de l'hémoglobine: mecanisme et relation avec les antimalariques Ann. Biol. T.23, 31-60
- CHULAY, J.D., LYON, J.A., HAYNES, J.D., MEIEROVICS, A.I., ATKINSON, C.T , AIKAWA, M. (1987) Monoclonal antibody characterization of *Plasmodium falciparum* antigens in immune complexes formed when schizonts rupture in the presence of immune serum. Journal of Immunology, 139, 2768-2774

- CLARK, J.T., ANAND, R., AKOGLU, T., MCBRIDE, J.S. (1987) Identification and characterisation of proteins associated with the rhoptry organelles of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitol Res* 73(5): 425-34
- COOK, L., GRANT, P.T., KERMACK, W.O. (1961) Proteolytic enzymes of the erythrocytic forms of rodents and simian species of malaria plasmodia. *Expl. Parasit.* 11: 372-379
- COPPEL, R.L., CREWETHER, P.E., CULVENOR, J.G., PERRIN, L.H., BROWN, G.V., KEMP, D.J., ANDERS, R.F. (1988) Variation in p126, a parasitophorous vacuole antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Med* 5(3): 155-66
- DAVID, P., HADLEY, T.I., AIKAWA, M., MILLER, L.H. (1984) Processing of a major parasite surface glycoprotein during the ultimate stage of differentiation in *Plasmodium knowlesi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 11, 267-282
- DEBRABANT, A., DELPLACE, P. (1989) Leupeptin alters the proteolytic processing of P126, the major parasitophorous vacuole antigen of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 33(2): 151-8
- DEGUERCY, A., HOMMEL, M., SCHREVEL, J. (1989) Purification and characterisation of 37-kilodalton proteases from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* which cleave erythrocyte cytoskeletal components. *Mol. Biochem. Parasitol.* in press.
- DEJKRIENGKRAIKHUL, P., WILAIRAT P. (1983) Requirement of malarial protease in the invasion of human red cells by merozoites of *Plasmodium falciparum*. *Z. Parasitenkd.* 69, 313-317
- DELPLACE, P., BHATIA, A., CAGNARD, M., CAMUS, D., COLOMBET, G., DEBRABANT, A., DUBREMETZ, J.F., DUBREUIL, N., PRENSIER, G., FORTIER, B., HAQ, A., WEBER, J., VERNES, A. (1988) Protein p126: a parasitophorous vacuole associated with the release of *Plasmodium falciparum* merozoites *Biology of the cell*, 64: 215-21
- DELPLACE, P., DUBREMETZ, J.F., FORTIER, B., VERNES, A. (1985) A 50 kilodalton exoantigen specific to the merozoite release-reinvasion stage of *Plasmodium falciparum*. *Molecular And Biochemical Parasitology* 17(2): 239-51
- DELPLACE, P., FORTIER, B., TRONCHIN, G., DUBREMETZ, J.F., VERNES, A. (1987) Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*. *Molecular And Biochemical Parasitology* 23(3): 193-201
- DLUZEWSKI, A.R., RANGACHARI, R., WILSON, R.J.M., GRATZER, W.B. (1986) *Plasmodium falciparum*: Protease inhibitors and inhibition of erythrocyte invasion *Experimental Parasitology* 62,416-422
- EAKIN, A.E., HIGAKI, J.N., MCKERROW, J.H., CRAIK, C.S., MOTTRAM, J.C., COOMBS, G.H., NORTH, M.J. (1989) Cysteine or serine proteinase ? *Nature* 342:
- FREEMAN, R.R., HOLDER, A.A. (1983) Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Journal Of Experimental Medicine* 158(5): 1647-53



- FREEMAN, R.R., TREJDOSIEWICY, A.J., CROSS, G.A.M. (1980) Protective monoclonal antibodies recognizing stage specific merozoite antigens of rodent malaria parasites. *Nature*, 284, 366-368
- GRELLIER, P., PICARD, I., BERNARD, F., MAYER, R., HEIDRICH, H.G., MONSIGNY, M., SCHRVEL, J. (1989) Purification and identification of a neutral endopeptidase in *Plasmodium falciparum* schizonts and merozoites. *Parasitol Res* 75(6): 455-60
- GYANG, F.N., POOLE, B., TRAGER, W. (1982) Peptidases from *Plasmodium falciparum* cultured in vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology* 5: 263-273
- HADLEY, T., AIKAWA, M., MILLER, L.H. (1983) *Plasmodium knowlesi*: studies on invasion of Rhesus erythrocytes by merozoites in the presence of protease inhibitors. *Exp. Parasitol.*, 55, 306-311
- HALDAR, K., FERGUSON, MA.J., CROSS, GA.M., (1985) Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen via sn-1, 2-Diacylglycerol *Journal of Biological Chemistry* 260(8): 4969-74
- HALL, R., OSLAND, A., HYDE, J.E., SIMMONS, D.L., HOPE, I.A., SCAIFE, J.G. (1984) Processing, polymorphism, and biological significance of P190, a major surface antigen of the erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum*. *Molecular And Biochemical Parasitology* 11: 61-80
- HEIDRICH, H.G., MATZNER, M., MIETTINEN-BAUMANN, A., STRYCH, W. (1986) Immunoelectron microscopy shows that the 80,000-dalton antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites is localized in the surface coat. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde* 72(5): 681-3
- HEIDRICH, H.G., MIETTINEN-BAUMANN, A., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F. (1989) The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCB1) merozoite surface antigens of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195-kilodalton precursor. *Mol Biochem Parasitol* 34(2): 147-54
- HEMPELMANN, E. WILSON, R.J.M. (1980) Endopeptidases from *Plasmodium knowlesi* *Parasitology* 80:323-330
- HEMPELMANN, E., PUTFARKEN, B., RANGACHARI, K., WILSON, R.J.M. (1986) Immunoprecipitation of malarial acid endopeptidase. *Parasitology* 92: 305-12
- HERRINGTON, DA, CLYDE, DF, LOSONSKY, G, CORTESIA, M, MURPHY, JR, DAVIS, J, BAQAR, S, FELIX, AM.. (1987) Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature*, 328, 257-259
- HEUSSEN, C., DOWDLE, E.B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 102: 196-202
- HIGGINS, D.G, MCCONNELL, D.J., SHARP, P.M. (1989) Malarial proteinases? *Nature* 340: 604
- HOLDER, A.A., FREEMAN, R.R. (1982) Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *Journal Of Experimental Medicine* 156(5): 1528-38

- HOLDER, A.A., FREEMAN, R.R. (1984) The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. *Journal Of Experimental Medicine* 160(2): 624-9
- HOLDER, A.A., LOCKYER, M.J., ODINK, K.G., SANDHU, J.S., RIVEROS-MORENO, V., NICHOLLS, S.C., HILLMAN, Y., DAVEY, L.S., TIZARD, M.L., SCHWARZ, R.T (1985) Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature* 317(6034): 270-3
- HORII, T., BZIK, D.J., INSELBURG, J. (1988) Characterization of antigen-expressing *Plasmodium falciparum* cDNA clones that are reactive with parasite inhibitory antibodies. *Molecular And Biochemical Parasitology* 30(1): 9-18
- KNAPP, B., HUNDT, E., NAU, U., KPPER, A., (1989) Molecular cloning, genomic structure and localization in a blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by a serine stretch *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32: 73-84
- KOHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497
- KROGSTAD, DJ., SCHLESINGER, PH., GLUZMAN, IY., (1985) Antimalarials increase Vesicle pH in *Plasmodium falciparum* *Journal of cell biology*, 101: 2303-9
- LADDA, R.L. AIKAWA, M., SPRINZ, H. (1969) Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites. *J. Parasitol.* 65, 633-644
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- LAVERAN, A. (1880) Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *Bull. Acad. Med. Paris* 9: 1235-3.
- LAMBROS, C., VANDERBERG, J.P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte stages in culture. *J. Parasitol.* 65, 418-420
- LANGSLEY G. (1988) Paludisme: vers un vaccin multivalent *Biofutur*, 71, 23-30
- LEVY, M.R., CHOU, S.C. (1973) Activity and some properties of an acid proteinase from normal plasmodium berghei-infected red cells. *The Journal of Parasitology*, 59, 1064-1070
- LEVY, M.R., CHOU, S.C. (1975) Inhibition of Macromolecular synthesis in the Malarial Parasites by Inhibitors of Proteolytic enzymes *Separatum Experientia*, 31: 52-3
- LEVY, M.R., SIDDIQUI, W.A., CHOU, S.C. (1974) Acide protease activity in *Plasmodium falciparum* and *P. knowlesi* and ghosts os their respective host red cells. *Nature*: (247)22: 546-549
- LI, W.B., BZIK, D.J., HORII, T., INSELBURG, J. (1989) Structure and expression of the *Plasmodium falciparum* SERA gene. *Mol Biochem Parasitol* 33(1): 13-25
- LYON, J.A., GELLER, R.H., HAYNES, J.D., CHULAY, J.D., WEBER, J.L. (1986) Epitope map and processing scheme for the 195,000-dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* merozoites deduced from cloned overlapping segments of

the gene. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 83(9): 2989-93

LYON, J.A., HAYNES, D., DIGGS, C.L., CHULAY, J.D., PRATT-ROSSITER, J.M. (1986) *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface by antibodies when schizonts mature in the presence of growth inhibitory immune serum. Journal of Immunology, 136(6), 2252-2258

LYON, J.A., HAYNES, J.D. (1986) *Plasmodium falciparum* antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors. The Journal of Immunology 136(6): 2245-2251

MACKAY, M., GOMAN, M., BONE, N., HYDE, J.E., SCAIFE, J., CERTA, U., STUNNENBERG, H., BUJARD, H., (1985) Polymorphism of the precursor for the major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites: studies at the genetic level Embo Journal 4(13B): 3823-9

MATSUMURA, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. 262: 10035-10038

MCKBRIDE, J.S., HEIDRICH, H.G. (1987) Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. Molecular And Biochemical Parasitology 23(1): 71-84

MCKERROW, J. H. (1989) Parasite proteases Experimental Parasitology 68: 111-115

MCLAREN, D.J., BANNISTER, L.H., TRIGG, P.I., BUTCHER, G.A. (1979) Freeze-fracture studies on the interaction between the malaria parasite and the host erythrocyte in *Plasmodium knowlesi* infections. Parasitology, 79, 125-139

MORRISSEY, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. 117: 307-310

PATARROYO, M.E., AMADOR, R., CLAVIJO, P., MORENO, A., GUZMAN, F., ROMERO, P., TASCÓN, R., FRANCO, A., MURILLO, L.A., PONTÓN, G., ET AL (1988) A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 332(6160): 158-61

PAVIA, C.S., DIGGS, C.L., WILLIAMS, J. (1983) The use of metrizamide for isopyknic separation and enrichment of *Plasmodium falciparum* schizonts from continuous culture. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32, 675-681

PERKINS, M.E. (1984a) Binding of glycophorins to *Plasmodium falciparum* merozoites. Molecular And Biochemical Parasitology 10(1): 67-78

PERKINS, M.E. (1984b) Surface proteins of *Plasmodium falciparum* merozoites binding to the erythrocyte receptor, glycophorin. Journal Of Experimental Medicine 160(3): 788-98

PERKINS, M. (1988) Stage-dependent processing and localization of a *Plasmodium falciparum* protein of 130,000 molecular weight. Experimental Parasitology 65(1): 61-8

- PERKINS, M.E. (1989) Erythrocyte invasion by the malarial merozoite: recent advances. *Exp Parasitol* 69(1): 94-9
- PERRIN, L.H., MERKLI, B., LOCHE, M., CHIZZOLINI, C., SMART, J., RICHLER, R. (1984) Antimalarial immunity in Saimiri monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. *Journal Of Experimental Medicine* 160(2): 441-51
- PERRIN, L.H., RAMIREZ, E., LAMBERT, P.H., MIESCHER, P.A. (1981) Inhibition of *P. falciparum* growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. *Nature* 289(5795): 301-3
- REICHELT, D., JACOBSON, E., HASCHEN, R.J. (1974) Purification and properties of cathepsin D from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 341: 409-416
- ROGER, N., DUBREMETZ, J.F., DELPLACE, P., FORTIER, B., TRONCHIN, G., VERNES, A. (1988) Characterization of a 225 kilodalton rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular And Biochemical Parasitology* 27(2-3): 135-41
- ROSENTHAL, P.J., MCKERROW, J.H., AIKAWA, M., NAGASAWA, H., LEECH, J.H. (1987) Identification and purification of a cysteine proteinase of *Plasmodium falciparum*. *Clinical Research* 35(3): 488A
- ROSENTHAL, P.J., MCKERROW, J.H., RASNICK, D., LEECH, J.H. (1989) *Plasmodium falciparum*: inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit trophozoite proteinase and block parasite development. *Molecular and Biochemical Parasitology* 35: 177-184
- ROSENTHAL, P.J., KIM, K., MCKERROW, J.H., LEECH, J.H. (1987) Identification of three stage-specific Proteinases of *Plasmodium falciparum*. *J. Exp. med.* 166: 816-21
- ROSENTHAL, P.J., MCKERROW, J.H., AIKAWA, M., NAGASAWA, H., LEECH, J.H. (1988) A malaria cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *Journal of clinical investigation*, 82(5) 1560-66
- ROSS, R. (1887) On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malaria blood. *Br. Med. J.* 2 : 1726
- SAINT BLANCARD, J., KIRZIN, J.M., RIBERON, P., PETIT, F., FOUCAULT, J., GIROT, P., BOSCHETTI, E. (1982) A simple and rapid procedure for large scale preparation of IgGs and albumin from human plasma by ion exchange and affinity chromatography. *Affinity Chromatography and Related Techniques* (Gribnau, T.C.J., Visser, J. and Nivard, R.J.F., eds.) pp. 305-312, Elsevier, Amsterdam.
- SATO, K., FUKABORI, Y., SUZUKI, M. (1987) *Plasmodium berghei*: a study of globinolytic enzyme in erythrocytic parasite. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene A* 264(3-4): 487-95
- SCHOFIELD, L., BUSHELL, G.R., COOPER, J.A., SAUL, A.J., UPCROFT, J.A., KIDSON, C. (1986) A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* contains conserved and variable epitopes recognized by inhibitory monoclonal antibodies. *Molecular And Biochemical Parasitology* 18(2): 183-95
- SCHREVEL, J., BERNARD, F., MAINTIER, C., MAYER, R., MONSIGNY, M. (1984) Detection and characterisation of a selective endopeptidase from *Plasmodium berghei* by using fluorogenic peptidyl substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 124(3):703-710

- SCHREVEL, J., GRELLIER, P., MAYER, R., MONSIGNY, M. (1988) Neutral proteases involved in the reinvasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Biology Of The Cell* 64(2): 233-44
- SHERMAN, I.W. (1979) Biochemistry of plasmodium (Malaria Parasites) *Microbiological Reviews* 43(4):453-495
- SHERMAN, I.W., TANIGOSHI, L. (1981) The proteases of plasmodium: A cathepsin D like enzyme from plasmodium lophurae *The biochemistry of parasites* G.M. Slutzky ed. Pergamon Press N.Y. 1981 P:137-149
- SHERMAN, I.W., TANIGOSHI, L. (1983) Purification of *Plasmodium lophurae* cathepsin D on erythrocyte membrane proteins *Molecular and Biochemical Parasitology* 8: 207-226
- SLOMIANNY, C., CHARET, P., PRENSIER, G. (1983) Ultrastructural localization of enzymes involved in the feeding process in *Plasmodium chabaudi* and *Babesia hyalomysci*. *Journal Of Protozoology* 30(2): 376-82
- SLOMIANNY, C., PRENSIER, G., CHARET, P. (1985) Comparative ultrastructural study of the process of hemoglobin degradation by *P. berghei* (Vincke and Lips, 1948) as a function of the state of maturity of the host cell) *J. Protozool.* 32(1): 1-5
- STRYCH, W., MIETTINEN-BAUMANN, A., LOTTSPREICH, F., HEIDRICH, H.G. (1987) Isolation and characterization of the 80,000 dalton *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen. *Parasitol Res* 73(5): 435-41
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1978) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354
- TRAGER, W., JENSEN, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673-675
- TRAVIS, J. AND SALVESEN, G.S. (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 655-709
- VANDER JAGT, D.L., BAAK, B.R., HUNSAKER, L.A. (1984) Purification and characterisation of an aminopeptidase from *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*: 10(1): 45-54
- VANDER JAGT, D.L., CAUGHEY, W.S., CAMPOS, N.M., HUNSAKER, L.A., ZANNER, M.A. (1989) Parasite proteases and antimalarial activities of protease inhibitors. *Prog Clin Biol Res* 313: 105-18
- VANDER JAGT, D.L., HUNSAKER, L.A., CAMPOS, N.M. (1986) Characterization of a hemoglobin-degrading, low molecular weight protease from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 389-401
- VANDER JAGT, D.L., HUNSAKER, L.A., CAMPOS, N.M. (1987) Comparison of proteases from chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology* 36(19): 3285-91

- VERNES, A., HAYES, J.D., TAPCHAISRI, P., WILLIAMS, J.L., DUTOIT, E., DIGG, C.L. (1984) *Plasmodium falciparum* strain specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes. Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, 197-203
- WEBER J. L., LYON J.A., CAMUS D. (1987) Blood stage antigens genes of *Plasmodium falciparum* Molecular strategies of parasitic invasion (A. Lis, Ed) 379-88
- WEBER, J.L., LYON, J.A., WOLFF, R.H., HALL, T., LOWELL, G.H., CHULAY, J.D. (1988) Primary structure of a *Plasmodium falciparum* malaria antigen located at the merozoite surface and within the parasitophorous vacuole. Journal Of Biological Chemistry 263(23): 11421-5
- YAGO, N. AND BOWERS, W.E. (1975) Unique cathepsin D-type proteases in rat thoracic duct lymphocytes and in rat lymphoid tissue. J. Biol. Chem. 250: 4749-4754
- YAYON, A., CABANTCHIK, Z.I., GINSBURG, H. (1985) Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(9): 2784-8

FIGURES 1 à 5

FIGURES 1 à 5: EFFET D'INHIBITEURS DE PROTEASES SUR UNE CULTURE DE PLASMODIUM FALCIPARUM.

Figures 1 à 3 : Frottis colorés par le Giemsa - May Grünwald.

Figure 1 : Culture normale fortement parasitée (x1000).

Figure 2 : Formes picnotiques observées après 15 h d'incubation de schizontes en présence de TLCK à 50 µg/ml (x1000).

Figure 3 : Schizontes matures observés après 15 h d'incubation avec de la leupeptine à 50 µg/ml (x1000).

Figures 4 et 5 : Microscopie électronique.

Figure 4 : Schizonte mature obtenu dans un milieu de culture normal. L'échelle représente 1 µm.  
mvp: membrane de la vacuole parasitophore, M: mérozoïte.

Figure 5 : Forme parasitaire obtenue après 15 h d'incubation en présence de leupeptine à 50 µg/ml. L'échelle représente 1µm.  
me: membrane érythrocytaire, mvp: membrane de la vacuole parasitophore, M: mérozoïte.



Figures 1 à 5

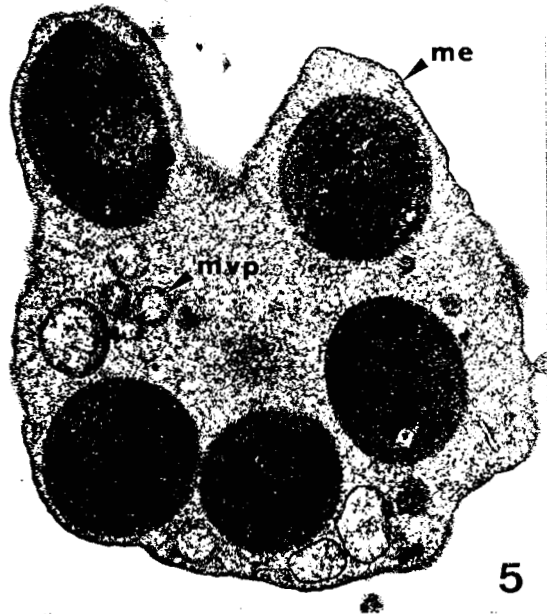
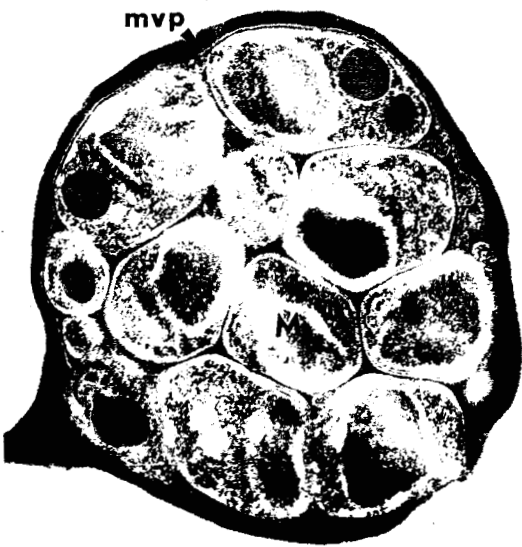
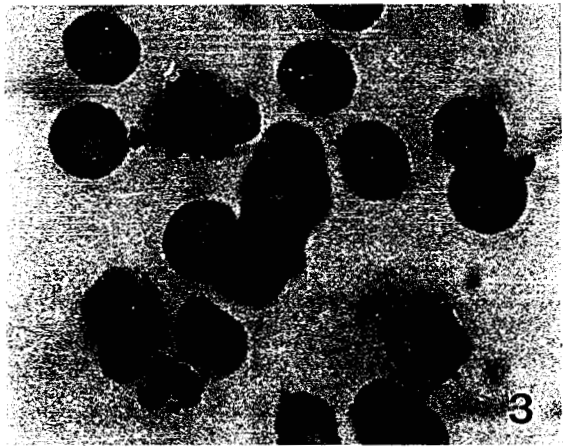
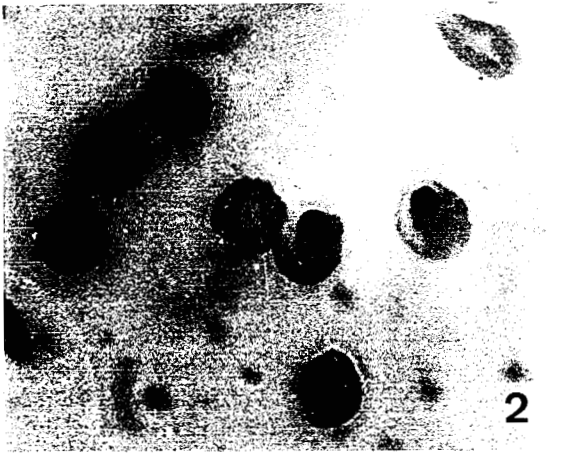
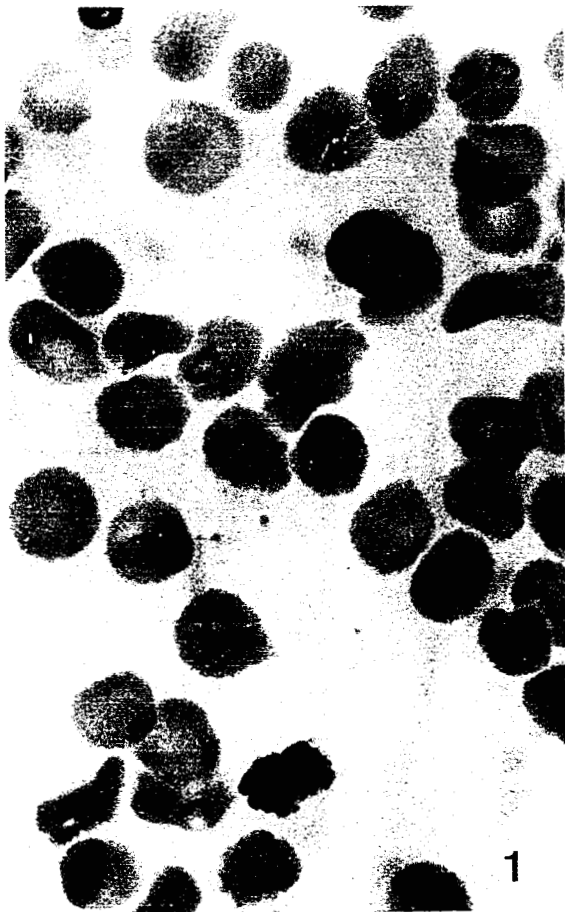


FIGURE 6

**FIGURE 6 : EFFET D'INHIBITEURS DE PROTEASES SUR LA PROTEOLYSE DE LA P126.**

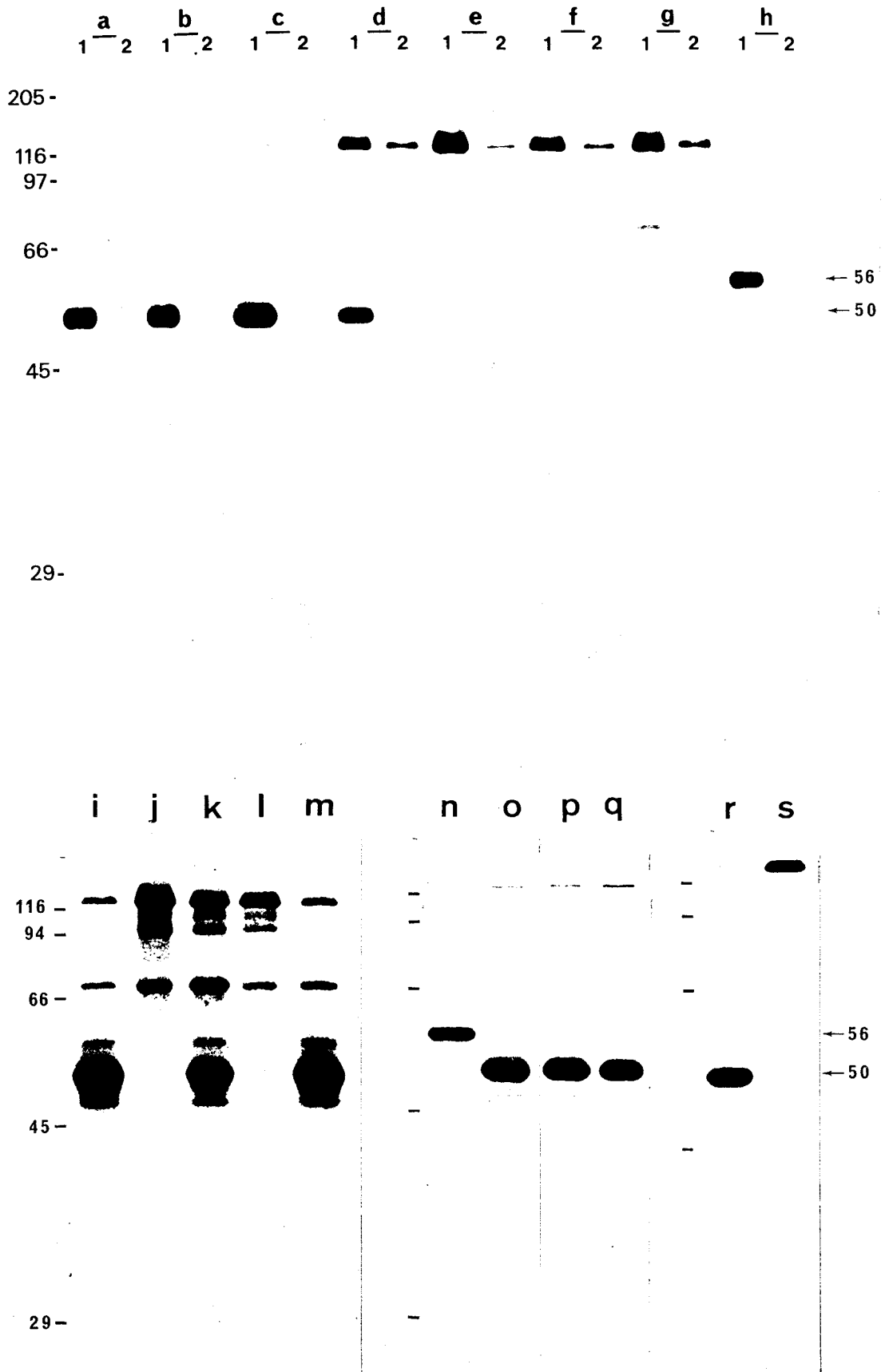
Des cultures radiomarquées  $^{35}\text{S}$ -méthionine ou  $^3\text{H}$ -isoleucine sont incubées 15 h dans des milieux supplémentés avec 50  $\mu\text{g/ml}$  de chacun des inhibiteurs de protéases. Des immunoadsorptions sur l'AcM 23D52H6 sont réalisées, comme il est décrit dans le chapitre matériels et méthodes, sur les surnageants de culture (1) et les parasites lysés (2) pour les inhibiteurs a à h, et uniquement sur les surnageants de i à s. Les antigènes immunoadsorbés sont analysés par SDS-PAGE en conditions réductrices et par fluorographie.

Les masses moléculaires apparentes des protéines témoins sont indiquées en kilodaltons.

Les pistes a, i, o, r, correspondent aux cultures témoins sans inhibiteurs.

b : chymostatine	g : TPCK	m : PMSF
c : antipaïne	h : leupeptine	n : E64
d : bestatine	j : NEM	p : aprotinine
e : 4-aminobenzamidine	k : pepstatine	q : $\alpha 1$ -AT (60 $\mu\text{M}$ )
f : TLCK	l : iodoacétamide	s : 3,4 dichloro- isocoumarin

Figure 6



FIGURES 7 à 9

**FIGURE 7 : EFFET DE LA CONCENTRATION EN LEUPEPTINE SUR LA PROTEOLYSE P126-50.**

Des parasites radiomarqués sont incubés 15 h dans un milieu supplémenté par des concentrations croissantes en leupeptine ( $\mu\text{g/ml}$ ): a=0, b=5, c=10, d=25 e=50.

Après 15 h d'incubation, les milieux de culture sont collectés et analysés selon le protocole d'immunoabsorption, sur l'AcM 23D52H6, décrit dans le chapitre matériels et méthodes. Le matériel immunoabsorbé est ensuite analysé par SDS-PAGE en conditions réductrices et par fluorographie. Les masses moléculaires apparentes des protéines témoins sont indiquées en kilodalton.

**FIGURE 8 : EFFET DE LA LEUPEPTINE SUR LA PROTEOLYSE DE LA P126.**

Des parasites radiomarqués sont incubés 15 h dans un milieu normal ou supplémenté par 50  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptine. Les lysats parasitaires et les milieux de culture sont ensuite immunoabsorbés sur l'immunoabsorbant lapin anti-P126, et analysés par SDS-PAGE, en conditions non réductrices (A) et réductrices (B), et par fluorographie. Les masses moléculaires apparentes des protéines témoins sont indiquées en kilodalton (A: bas poids moléculaires Pharmacia, B: hauts poids moléculaires Sigma).

- a : parasites après 4 h de radiomarquage.
- b : parasites radiomarqués après 15 h d'incubation dans un milieu normal.
- c : parasites radiomarqués après 15 h d'incubation dans un milieu supplémenté par 50  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptine.
- d : milieu de culture après 15 h d'incubation avec des parasites radiomarqués.
- e : milieu de culture après 15 h d'incubation avec des parasites radiomarqués, en présence de 50  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptine.
- d', e' : correspondent aux pistes d et e surexposées.

**FIGURE 9 : EFFET DE LA LEUPEPTINE ET DU E64 SUR LA PROTEOLYSE P126-50 CHEZ 4 ISOLATS DE P.FALCIPARUM.**

Pour chaque isolat: FCR3, NF54, CAMP et ITUX, après 4 h de marquage métabolique ( $^3\text{H-ILE}$ ), les parasites sont incubés 15 h dans un milieu normal ou additionné de leupeptine ou de E64 (50  $\mu\text{g/ml}$ ). Les milieux sont ensuite immunoabsorbés sur l'AcM 23D52H6. Les éluats sont analysés par SDS-PAGE en conditions réductrices et par fluorographie. Les masses moléculaires apparentes des protéines témoins sont indiquées en kilodalton.

- |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| a : FCR3 milieu normal       | f : FCR3 milieu normal       |
| b : NF54 milieu normal       | g : CAMP milieu normal       |
| c : FCR3 milieu + leupeptine | h : FCR3 milieu + leupeptine |
| d : NF54 milieu + leupeptine | i : CAMP milieu + leupeptine |
| e : NF54 milieu + E64        | j : CAMP milieu + E64        |
|                              |                              |
| k : ITUX milieu normal       | n : FCR3 milieu normal       |
| l : ITUX milieu + leupeptine | o : FCR3 milieu + leupeptine |
| m : ITUX milieu + E64        | p : FCR3 milieu + E64        |

Figure 7

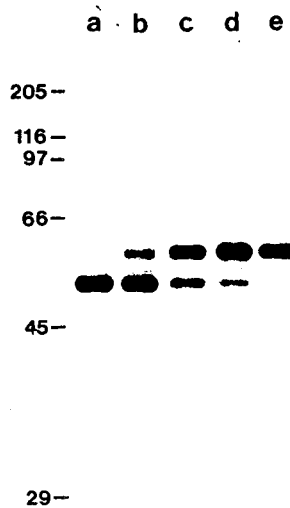


Figure 8

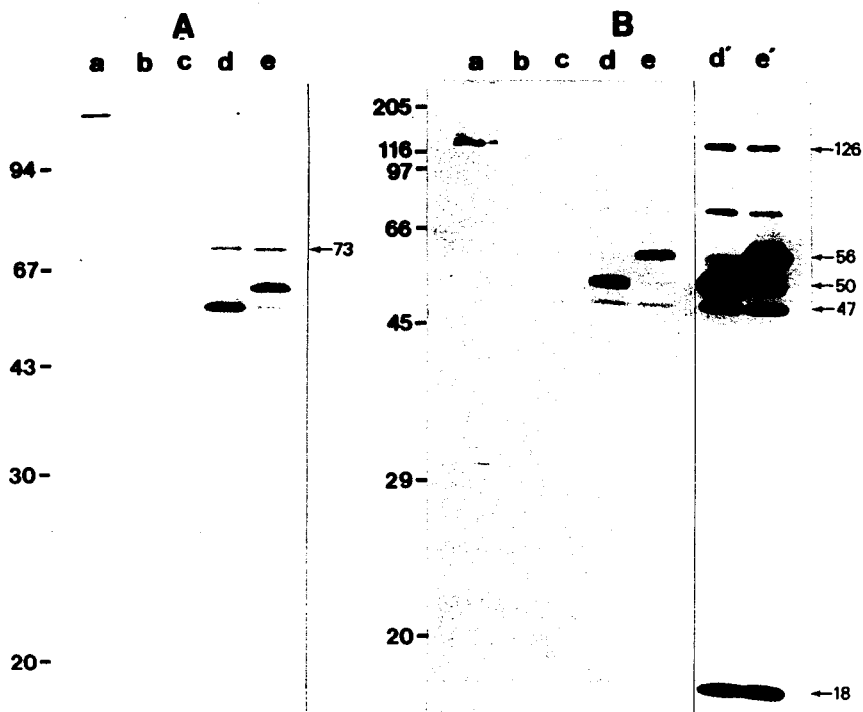
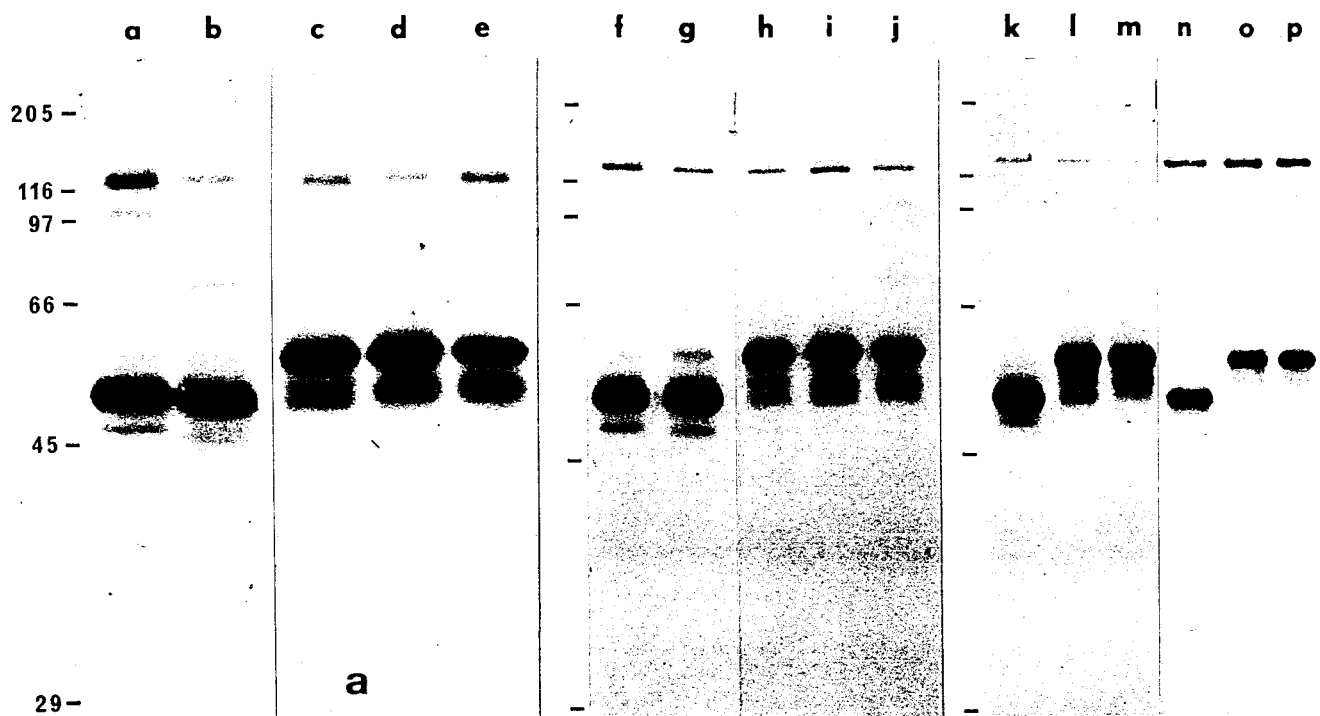


Figure 9



FIGURES 10 à 12



**FIGURE 10 : PROTEOLYSE IN VITRO DE LA P126 ET DE SES FRAGMENTS 56 ET 50 KD PAR LA TRYPSINE.**

Le traitement par la trypsine des protéines immunoabsorbées est mené suivant le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes. Après la protéolyse, le matériel immunoabsorbé est analysé par SDS-PAGE, en conditions réductrices, et par fluorographie.

Les concentrations en trypsine ( $\mu\text{g/ml}$ ) sont:  
a= 0; b= 0,10, c= 0,25, d= 0,50, e= 0,75, f= 1,0, g= 1,5, h= 2,0, i= 5,0, j= 10,0.  
Les masses moléculaires apparentes des protéines témoins sont données en kilodalton.

**FIGURE 11 : INHIBITION DE LA PROTEOLYSE TRYPSIQUE DE LA P56 PAR LA LEUPEPTINE.**

Le protocole expérimental est identique à celui de la Figure 10.

- a : témoin P56
- b : P56 après incubation avec la trypsine (1  $\mu\text{g/ml}$ ).
- c : P56 après incubation avec la trypsine (1  $\mu\text{g/ml}$ ) en présence de leupeptine (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

**FIGURE 12 : PROTEOLYSE DE LA P126 DANS DES MILIEUX SEMI-DEFINI.**

Des parasites radiomarqués ( $^3\text{H}$ -ILE) sont incubés 15 h, avec ou sans leupeptine (50  $\mu\text{g/ml}$ ) dans un milieu normal (10% sérum), ou dans un milieu où le sérum a été remplacé soit par la fraction dialysable du sérum (milieu/dialysat), soit par 4% de Caryoser (milieu/caryoser) (substitut de sérum IBF). Après l'immunoabsorption des milieux et des lysats parasitaires sur l'AcM 23D52H6, les éluats sont analysés par SDS-PAGE, en conditions réductrices, et par fluorographie.

Les masses moléculaires apparentes des protéines témoins sont données en kilodalton.

- a : parasites après 4 h de radiomarquage.
- b : milieu normal (10% sérum).
- c : milieu normal + leupeptine.
- d : milieu/dialysat.
- e : milieu/dialysat + leupeptine.
- f : milieu/caryoser.
- g : milieu/caryoser + leupeptine.

Figure 10

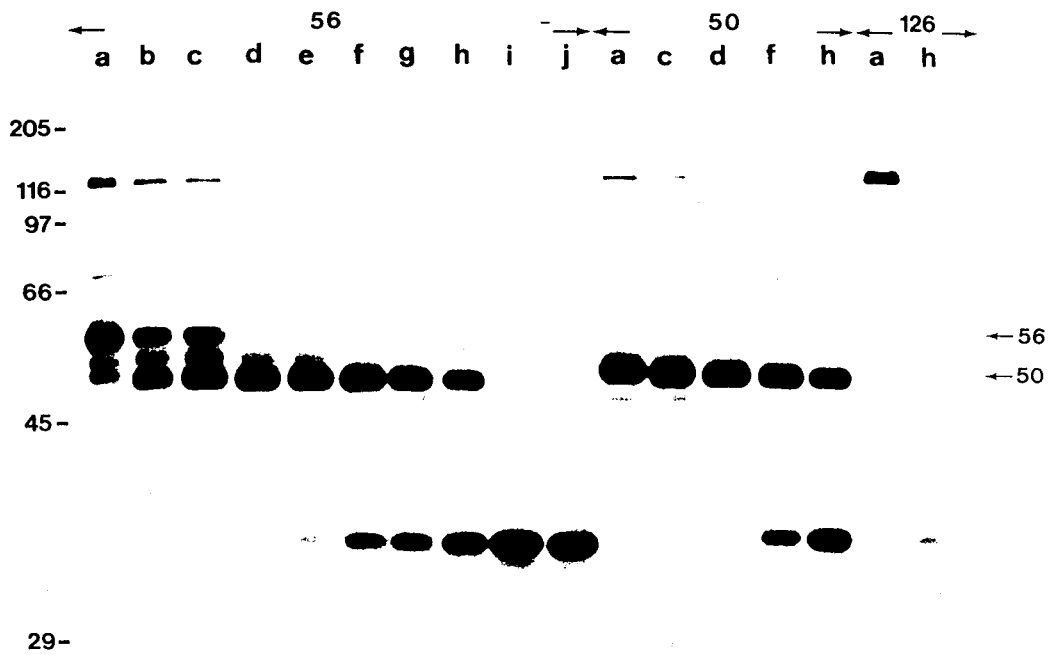


Figure 11

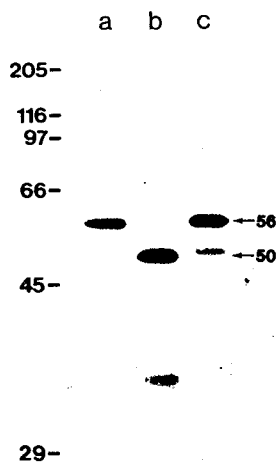
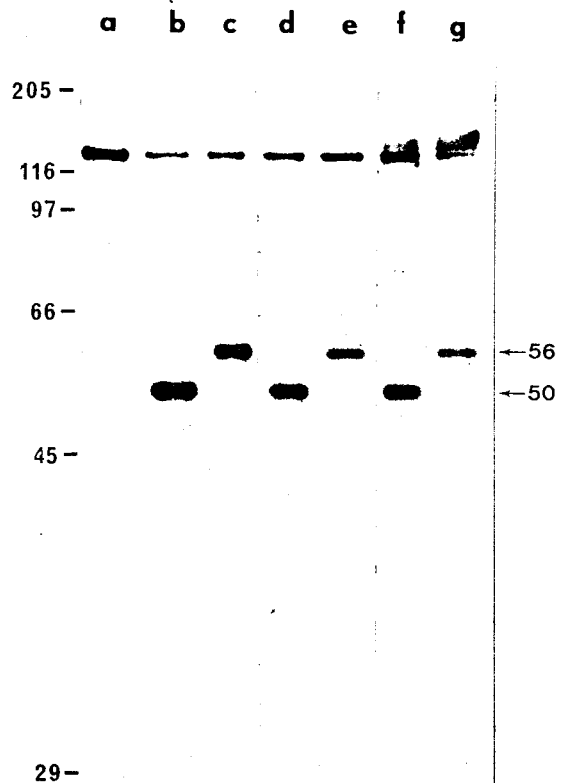


Figure 12



FIGURES 13 et 14

**FIGURE 13 : RECHERCHE D'UNE ACTIVITE P56 / 50 INTRACELLULAIRE.**

Le substrat P56 radiomarqué fixé sur l'immunoabsorbant 23D52H6 est incubé dans un milieu RPMI + dialysat, dans des conditions a à g (définies ci-après). Après 15 h d'incubation, le matériel immunoabsorbé est analysé par SDS-PAGE en conditions réductrices, et par fluorographie. Les masses moléculaires des protéines témoins sont données en kilodaltons.

Les conditions d'incubation sont:

- |      |                       |   |                              |
|------|-----------------------|---|------------------------------|
| a, d | : le milieu seul      | f | : un lysat d'hématies saines |
| b    | : des hématies saines | g | : un lysat de schizontes     |
| c, e | : des schizontes      |   |                              |

**FIGURE 14 : MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE 56 / 50 DANS LE MILIEU DE CULTURE.**

La P56 radiomarquée fixée à l'immunoabsorbant 23D52H6 est incubée dans des conditions de milieu et de culture définies ci-après (a à s). Après l'incubation les protéines immunoabsorbées sont analysées par SDS-PAGE, en conditions réductrices, et par fluorographie. Les masses moléculaires des protéines témoins sont données en kilodaltons.

les incubations sont réalisées avec:

- a,i,o: un milieu RPMI + dialysat.
- b,r : une culture synchrone de schizontes (parasitémie 15%), en RPMI + dialysat.
- c,j,p: une culture de schizontes purifiés (parasitémie 80%), en RPMI + dialysat.
- d : une culture synchrone de schizontes en milieu normal (10% de sérum).
- e : une culture de schizontes purifiés, en milieu normal.
- f,s : le milieu (RPMI+dialysat) d'éclatement de schizontes (synchronisés) récupéré 10 h après le début de la réinvasion.
- g,q : le milieu (RPMI+dialysat) d'éclatement de schizontes (purifiés) récupéré 10 h après le début de la réinvasion.
- h : identique à g mais en milieu normal (10% de sérum).
- k : le milieu (RPMI+dialysat) d'éclatement de schizontes (purifiés) récupéré 10 h après la purification.
- l : un milieu RPMI + 4% de Caryoser.
- m : identique à c mais en milieu RPMI + 4% de Caryoser.
- n : identique à k mais en milieu RPMI + 4% de Caryoser.

Remarque: les témoins i et l présentent un peu de P50 provenant d'un défaut d'inhibition (concentration insuffisante en leupeptine) lors de la préparation de la P56.

Figure 13

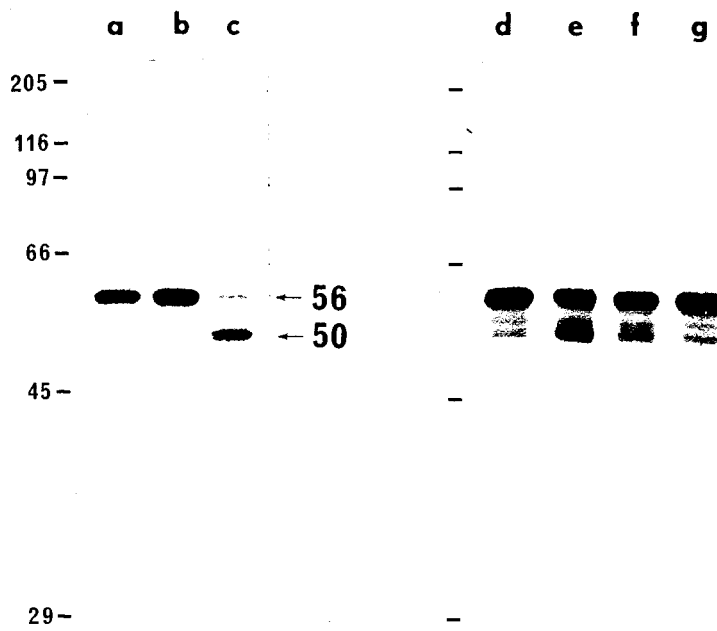
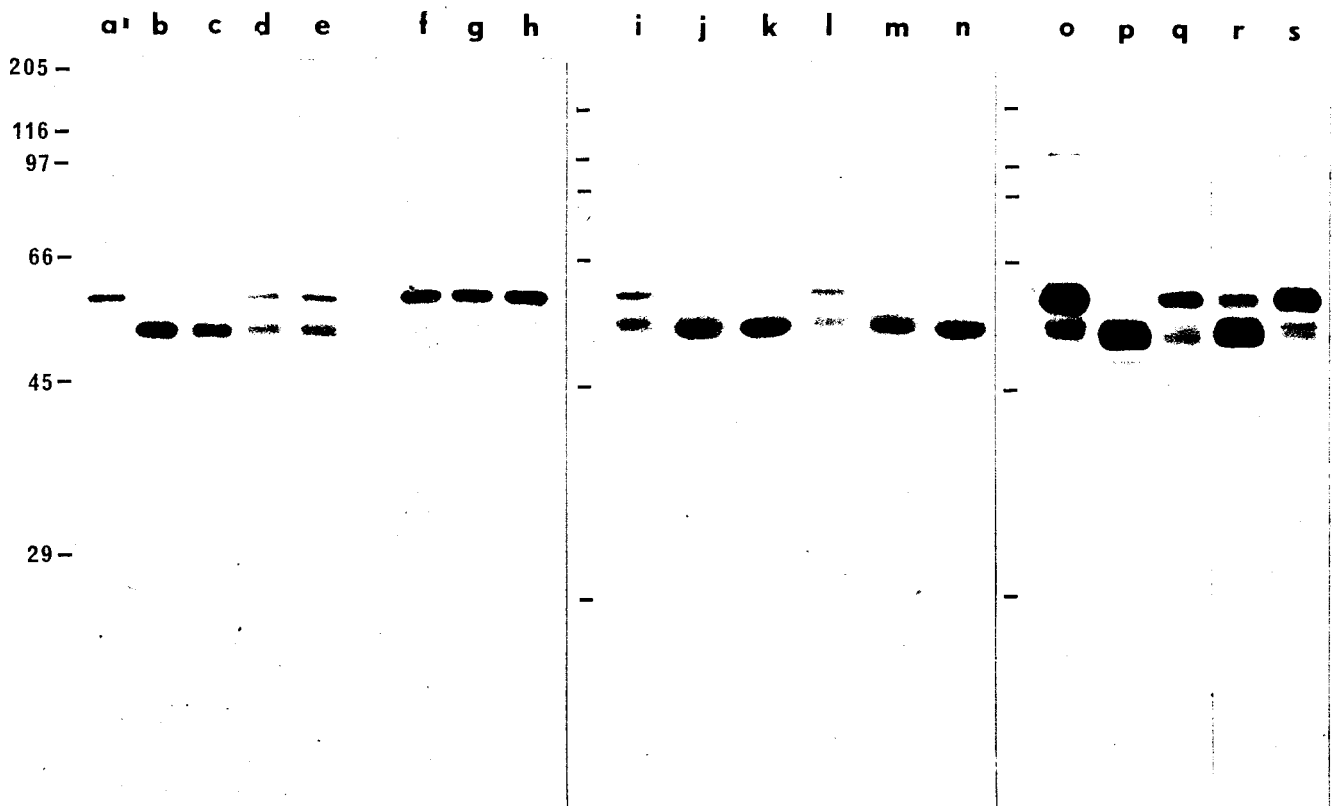


Figure 14



FIGURES 15 et 16

**FIGURE 15 : EFFET DES INHIBITEURS DE PROTEASES SUR LA PROTEOLYSE IN VITRO DE LA P56.**

Le substrat P56 radiomarqué fixé sur l'immunoabsorbant 23D52H6 est incubé avec des schizontes (purifiés) dans un milieu RPMI + dialysat avec 50 µg/ml des inhibiteurs de protéases (d à h) décrits ci après. Après 15 h d'incubation, le matériel immunoabsorbé est analysé par SDS-PAGE en conditions réductrices, et par fluorographie. Les masses moléculaires des protéines témoins sont données en kilodalton.

- a : témoin P50 obtenu à partir d'un milieu de culture normal.
- b : témoin P56 incubé dans le milieu seul.
- c : témoin P56 incubé avec des schizontes sans inhibiteur.
- d : incubation + leupeptine.
- e : incubation + antipain.
- f : incubation + chymostatine.
- g : incubation + 4-amino-benzamidine.
- h : incubation + aprotinine.

**FIGURE 16 : CARACTERISATION DE L'ACTIVITE PROTEASIQUE IN VITRO PAR LES INHIBITEURS DE PROTEASES.**

Le protocole expérimental est identique à celui de la figure 15. Les concentrations finales en inhibiteurs sont données en µM. Pour chacune des manipulations regroupées sur la figure apparaissent le témoin négatif (T-) qui correspond à l'incubation du substrat dans le milieu de culture seul, et le témoin positif (T+) qui correspond au substrat incubé avec les schizontes sans inhibiteur.

Les inhibiteurs testés sont:

A : leupeptine	1: 2,0	2: 0,2	3: 0,02
B : E64	1: 2,8	2: 0,3	3: 0,03
C : chymostatine	1: 1,6	2: 0,16	3: 0,016
D : antipain	1: 1,5	2: 0,15	3: 0,015
E : pCMB	1: 14,0	2: 2,8	
F : NEM	1: 80,0	2: 8,0	3: 0,8
G : TLCK	1: 126	2: 12,6	
H : pepstatine	1: 50,0	2: 10,0	3: 2,0
I : iodoacetamide	1: 100	2: 10,0	3: 2,0

Figure 15 ▶

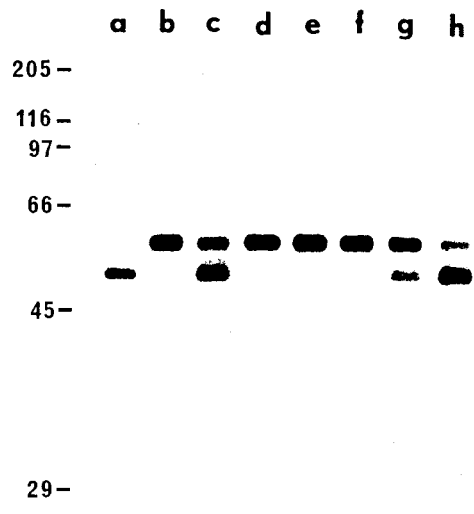


Figure 16

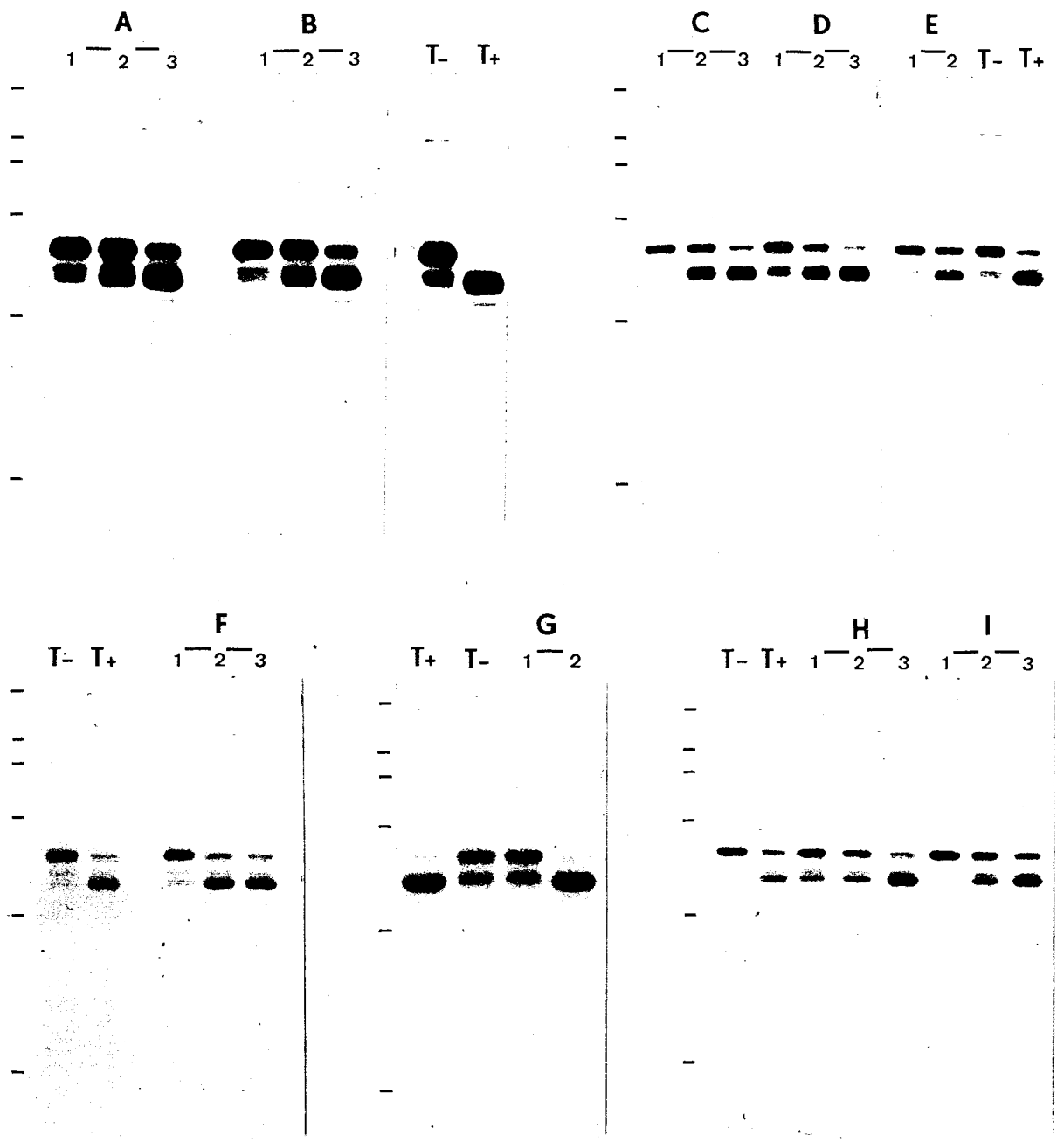




FIGURE 17

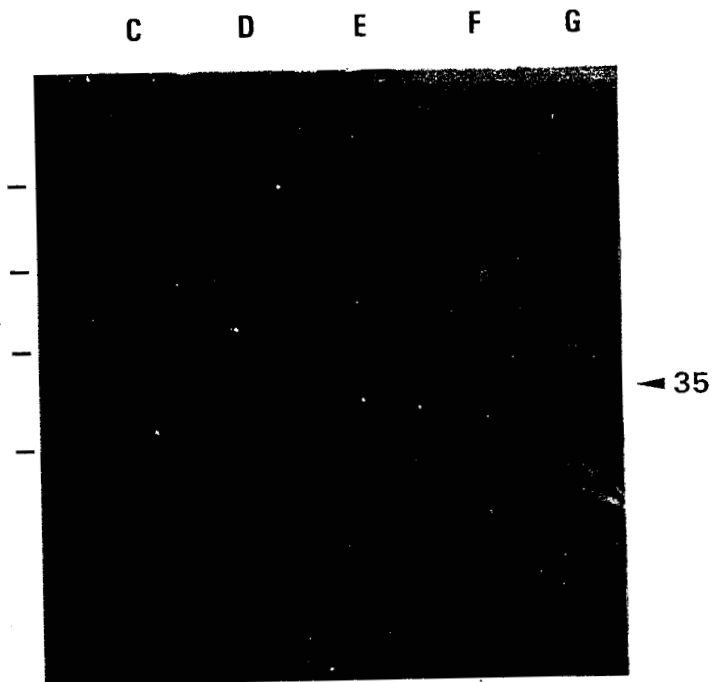
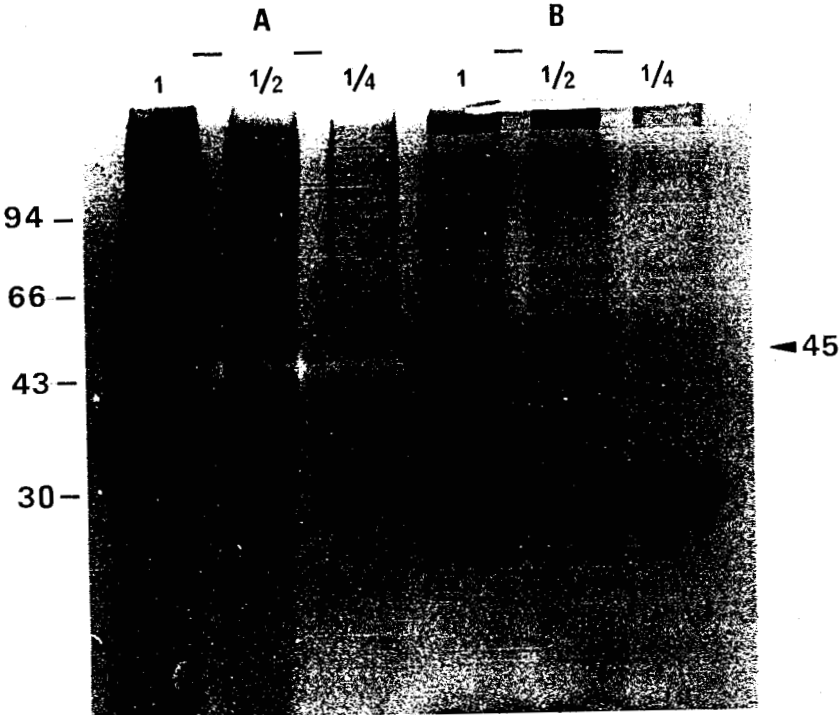
**FIGURE 17 : MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITES PROTEASIQUES PAR LA  
TECHNIQUE GELATINE-SDS-PAGE.**

Des schizontes purifiés sur métrizamide (A) ou des hématies saines (B) sont lysées dans le tampon de reprise d'échantillon (Laemmli), et analysés (dilutions 1, 1/2, 1/4) par la technique gélatine-SDS-PAGE (HEUSSEN et DOWDLE, 1980) décrite dans le chapitre matériels et méthodes.

Les milieux d'éclatement de schizontes dans un milieu RPMI + dialysat de sérum sans inhibiteurs (C, F), ou en présence de 50 µg/ml des inhibiteurs: leupeptine (D, G) et E64 (E), sont analysés selon la même technique. Ces milieux ont été concentrés environ 100 fois pour les pistes C, D, E.

Les masses moléculaires des protéines témoins sont indiquées en kilodaltons.

Figure 17



FIGURES 18 et 19

FIGURE 18 et 19 : PURIFICATION DES PROTEINES P50, P73, P56 ET P126.

Figure 18:

Analyse des produits de purification sur les immunoabsorbants 23D52H6 (a, c, d) et 3E91A11 (b), à partir d'un milieu de culture normal (a, b, d) ou du milieu d'une culture incubée avec la leupeptine (50 µg/ml) (c), par SDS-PAGE en conditions non réductrices suivie d'une coloration des protéines au nitrate d'argent.

Figure 19:

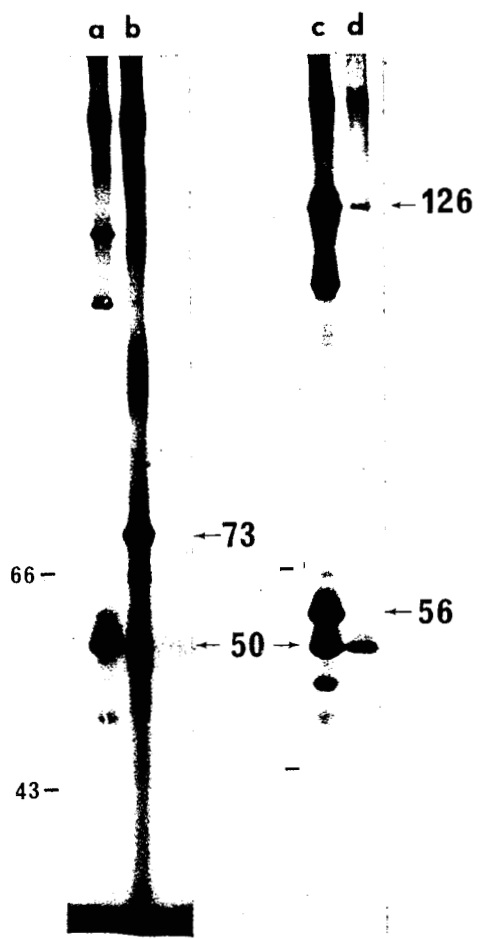
Analyse par immunoempreinte des produits de purification sur les immunoabsorbants 23D52H6 (e-h et i-l) et 3E91A11 (a-d), à partir d'un milieu de culture normal (a-d et e-h) ou d'un milieu d'une culture incubée avec la leupeptine (50 µg/ml) (i-l). L'électrophorèse a été réalisée en conditions non réductrices.

d, e, l : révélation par le sérum de lapin anti-P126 sérum au 1/2000<sup>ème</sup>.

f, k : révélation par l'AcM 23D52H6, ascite au 1/100<sup>ème</sup>.

c : révélation par l'AcM 3E91A11, ascite au 1/100<sup>ème</sup>.

a, b, g, h, i, j correspondent aux témoins anticorps conjugués à la phosphatase alcaline.



◀ Figure 18

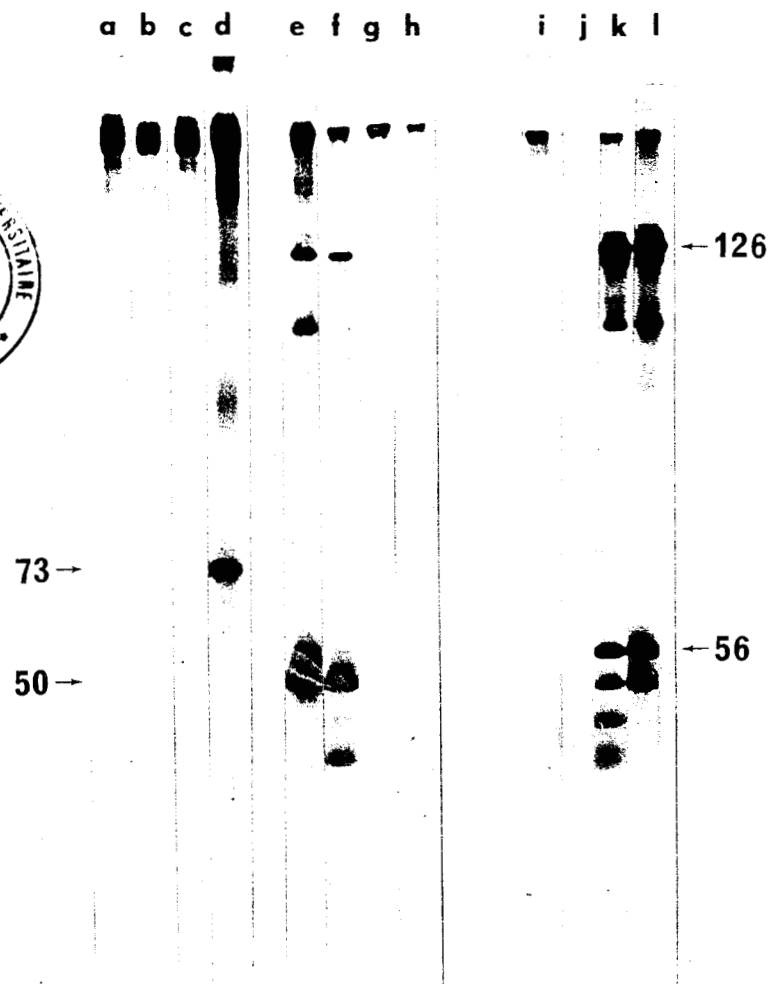


Figure 19 ▶