

0,2 ml de globules rouges d'un sujet du groupe A Rh +, l'autre, 0,2 ml d'hématies du même donneur mais parasitées à 1 % par *P. falciparum*. Ce sang sans plaquettes, ni granulocytes, renfermait 1 700 globules blancs/mm³. Après 48 heures de culture, une centrifugation permettait de recueillir les surnageants débarrassés des éléments figurés ; le surnageant correspondant au parasitisme sanguin était considérablement appauvri en acide glutamique arginine, acide aspartique, sérine, un peu moins en proline et thréonine ; on notait conjointement une augmentation importante en ornithine, leucine, alanine et cystine.

L'Iniprol (0,15 ml), que l'on ajoutait à la culture d'hématies impaludées, semblait freiner la multiplication des hématozoaires (4,7 % de globules rouges parasités au lieu de 7,2 % normalement en 48 heures) et retenir sur leur activité métabolique ; en effet, la diminution de la concentration en acides aminés : acide glutamique, sérine, proline, acide aspartique, thréonine, arginine était moins importante dans le milieu qui recevait l'antiprotéase que dans le normal.

Ces perturbations du métabolisme peuvent s'expliquer par la connaissance de la physiologie nutritionnelle du plasmodium. Il consomme l'hémoglobine de l'hématie et la transforme en acides aminés. Ces derniers sont utilisés pour la synthèse protéique ou constituent un pool libre qui se lie au pigment malarique. L'excès d'acides aminés libres intra-érythrocytaire va diffuser dans le milieu extérieur.

D'autres mécanismes peuvent intervenir dans la synthèse, mais la deuxième source importante d'acides aminés essentiels pour l'hématozoaire est le plasma ; ici, l'incorporation à l'intérieur des globules rouges est partiellement contrôlée par les membranes et la substance propre de la cellule hôte.

Les résultats de cette étude font discuter le rôle des parasites dans la malnutrition infantile. Il ne paraît pas exister de corrélation significative entre les besoins particuliers de *P. falciparum* et les déficits majeurs en acides aminés, assez bien connus au cours des carences graves. Ces premières observations, toutefois, demandent à être confirmées.

Étude comparative des systèmes protéolytiques de *Plasmodium babesia* et *eimeria*

P. CHARET
E. AISSI
J. BIGUET

U #2 INSERM, 369 rue Jules-Guesde, 59650 Villeneuve-d'Ascq

Il est admis que les *Plasmodium* sont capables d'assumer la dégradation de l'hémoglobine et que celle-ci représenterait pour le parasite la principale source d'acides aminés nécessaires à sa croissance (1), (2), (3) (*). Dans cette hypothèse le parasite doit posséder un système protéolytique complet (endoprotéase et exoprotéase) capable d'effectuer cette dégradation depuis le stade hémoglobine native jusqu'au stade d'acides aminés libres susceptibles d'être incorporés dans les protéines plasmodiales. Un autre sporozoaire *Babesia* présente un cycle érythrocytaire voisin de celui des *Plasmodium* mais ne produit pas de pigment et ne dégrade donc pas l'hémoglobine. Si la présence dans les *Plasmodium* d'un système protéolytique complet est liée à la dégradation de l'hémoglobine ce système devrait être profondément différent

chez *Babesia*, encore plus chez un autre sporozoaire *Eimeria* qui n'a aucune relation avec les globules rouges.

Dès 1946 Moulder et Evans (4) ont mis en évidence sur des extraits de *P. gallinaceum* une activité protéolytique capable de dégrader l'hémoglobine native de poulet. En 1961 Cook et coll. (5) rapportent que des extraits de *P. berghei* et *P. knowlesi* sont capables d'hydrolyser l'hémoglobine dénaturée par l'urée mais non l'hémoglobine native. L'étude menée en fonction du pH montre la présence d'au moins 2 enzymes l'une faiblement active et instable à pH acide, l'autre plus importante, active à pH basique. Toutefois une activité similaire fut mise en évidence dans les hématies. L'étude comparée des propriétés physico-chimiques permet cependant aux auteurs de conclure que la pro-

(*) (1 à 15, voir Bibliographie.)

CONFÉRENCES SCIENTIFIQUES : BIOLOGIE-BIOCHIMIE

téase basique est d'origine parasitaire. En effet celle-ci est inhibée par le DIFP et l'EDTA alors que la protéase basique des hématies ne l'est pas.

En 1973 Levy et Chou (6), (7), (8) reprennent cette étude. Utilisant comme substrat l'hémoglobine native, ou dénaturée par les acides, ils mettent en évidence dans les hématies saines, parasitées et dans les extraits parasitaires l'existence d'une forte activité protéolytique à pH acide (pH opt. 2,5-3,6). Toutefois l'étude des propriétés physico-chimiques de la protéase obtenue à partir des extraits parasitaires comparée à celle obtenue à partir des globules rouges sains ne leur permet pas de conclure quant à l'origine de l'enzyme. Remarquons que, contrairement à Cook et coll., ils ne détectent dans leurs conditions expérimentales aucune activité à pH basique. La présence d'EDTA dans le milieu de lyse ne peut expliquer à elle seule cette absence d'activité (9), la qualité des substrats utilisés pourrait également rendre compte des différences des résultats observés. L'ensemble de ces travaux mène aux conclusions suivantes :

— il existe dans le parasite une activité protéolytique basique capable d'agir sur l'hémoglobine dénaturée par l'urée, mais sans action sur l'hémoglobine native ;

— les extraits parasitaires possèdent une activité protéolytique capable de dégrader l'hémoglobine à pH acide. Cependant le globule rouge possède également une protéase présentant des propriétés physico-chimiques sensiblement identiques.

Les informations concernant l'existence de protéases dans *Babesia* se limitent à un article de Wright et Goodger (10). Les extraits parasitaires ont une activité protéolytique vis-à-vis de l'hémoglobine. Par ailleurs, des extraits d'oocystes sporulés d'un autre protozoaire *Eimeria tenella* présentent une intense activité

aminopeptidasique, mais l'activité protéolytique à pH acide vis-a-vis de l'hémoglobine est extrêmement faible (11). L'absence d'information sur l'existence d'exopeptidases dans *Plasmodium* nous ont conduit aux travaux résumés ci-dessous (12) (13).

Les extraits enzymatiques solubles de *P. yoelii nigeriensis* ou de *B. hylomysci* sont obtenus à partir de parasites libérés par lyse à la saponine de globules rouges de souris swiss parasitées de façon massive. Une parasitémie importante est ainsi observée au 4^e jour, mais à cette date la réticulocytémie reste dans les limites de la normale. Les cellules blanches sont éliminées par passage sur cellulose CF 11 et billes de verre. Les extraits enzymatiques solubles d'*Eimeria nieschulzi* sont préparés par lyse d'oocystes sporulés. Les résultats obtenus concernant les exopeptidases de *Plasmodium*, *Babesia* et *Eimeria* sont les suivants :

— Absence carboxypeptidasique dans chaque extrait.

— Présence dans chaque préparation d'amino-peptidase active sur des substrats de synthèse : L. Ala, L. Leu et L. Lys-4 nitroanilide et un court peptide Leu-Try-Arg.

— Les aminopeptidases présentent des propriétés physico-chimiques comparables quelle que soit leur origine (tabl. I).

— Les activités enzymatiques sont inhibées de façon identique par les métaux lourds Zn, Co, Mn et Hg, le P.C.M.B. et l'orthophénantroline.

— La chloroquine, la primaquine et la quina-crine se révèlent également inhibiteurs de l'activité aminopeptidasique, mais les concentrations nécessaires pour obtenir une bonne inhibition sont très importantes.

— L'étude des points isoélectriques des amino-peptidases démontre que celles présentes dans les

TABLEAU I

	<i>B. hylomysci</i>	<i>P. y. nigeriensis</i>	<i>E. nieschulzi</i>
	L-Ala-4	L-Ala-4	L-Ala-4
SUBSTRAT	NITROANILIDE	NITROANILIDE	NITROANILIDE
pH optimum.....	8	7,2	8
Température optimale.....	55° C	42° C	42° C
Température d'inactivation.....	65° C	65° C	65° C
P.M.....	90 000 ± 5 000	90 000 ± 5 000	90 000 ± 5 000
K _m	7·10 ⁻⁴ M	14·10 ⁻⁴ M	8·10 ⁻⁴ M
pHi.....	5,32	5,35	4,95

extraits de *Plasmodium* proviennent du parasite et non de l'hôte : *P. yoelii nigeriensis* présente 3 isoenzymes de pHi 5,2, 5,3 et 5,4 alors que *P. chabaudi* présente 4 isoenzymes de pHi 5,85, 5,7, 5,6, 5,5. L'identité des hôtes parasitaires utilisés et l'absence de pHi commun démontre que les aminopeptidases sont synthétisées par le parasite.

L'étude de l'activité protéolytique acide a été menée comme l'étude des activités aminopeptidasiques de façon comparative entre *P. yoelii nigeriensis*, *Babesia hylomyisci* et des extraits enzymatiques de globules rouges de souris saines obtenus par précipitation butanolique suivant Reichelt *et al.* (14). Schématiquement les résultats suivants ont été obtenus :

— Présence dans les extraits de *Plasmodium* et d'hématies saines d'une forte activité protéolytique vis-à-vis de l'hémoglobine native à pH acide. L'activité protéolytique des extraits de *B. hylomyisci* exprimée en fonction de la quantité de parasite est environ 6 fois moindre que celle observée dans les extraits de *P. yoelii nigeriensis*.

— Les propriétés physico-chimiques (pH et T optimum, masse moléculaire Km) sont extrêmement voisines quel que soit l'extrait testé (tabl. II).

— La mobilité électrophorétique de ces enzymes a été étudiée en gel de polyacrylamide. L'activité enzymatique est révélée soit en incorporant de l'hémoglobine au gel de migration, soit par la méthode d'empreintes en déposant une gélose à l'hémoglobine sur la plaque après migration. De cette façon, la présence de 2 bandes d'activité enzymatique est révélée dans les extraits de globules rouges saines. Les extraits de *P. y. nigeriensis* et *B. hylomyisci* présentent également et exclusivement les mêmes bandes d'activité, un résultat similaire a été retrouvé avec des extraits traités par le Triton X100 avant migration.

Nos observations sont en contradiction avec celle récemment publiées par Hempelmann et Wilson (15) qui par électrophorèse en gel de polyacrylamide ont révélé des protéases acides dans des extraits de *P. knowlesi* absentes des hématies saines de singe. Ces divergences pourraient relever d'une différence dans les

TABLEAU II

Propriétés physico-chimiques de la protéase acide de *P. yoelii-nigeriensis*, *Babesia hylomyisci* et d'hématies saines

SUBSTRAT	<i>P. y. nigeriensis</i>	<i>B. hylomyisci</i>	Hématies saines
	HB DE SOURIS SWISS SAINES	HB DE SOURIS SWISS SAINES	HB DE SOURIS SWISS SAINES
pH optimum.....	3	2,8	2,8
Température optimale.....	42° C	42° C	42° C
Température d'inactivation.....	65° C	65° C	65° C
K _M	6,8·10 ⁻⁵ M	6·10 ⁻⁵ M	3·10 ⁻⁵ M
P.M.....	100 000 ± 5 000	100 000 ± 5 000	100 000 ± 5 000

systèmes hôtes-parasites étudiés (souris — *P. y. nigeriensis* dans un cas ; singe — *P. knowlesi* dans l'autre) ; d'une différence dans les méthodologies utilisées et de l'influence de la réticulocytémie.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Cet ensemble de résultats nous conduit aux conclusions suivantes : Les *Plasmodium* et les *Babesia* possèdent un système protéolytique complet capable de dégrader l'hémoglobine du stade protéine native

jusqu'au stade d'acides libres pouvant être incorporés par le parasite. Mais il est remarquable que *Plasmodium* et *Babesia* disposent du même système protéolytique alors que leur comportement vis-à-vis de l'hémoglobine est profondément différent. La fonction de ce système n'est donc pas essentiellement liée à la dégradation de l'hémoglobine. Toutefois il faut remarquer que l'activité des enzymes protéolytiques est notablement plus faible chez *Babesia*.

Il n'est pas possible de conclure si la protéase acide est synthétisée par le parasite ou par le globule rouge, les propriétés physico-chimiques des enzymes

CONFÉRENCES SCIENTIFIQUES : BIOLOGIE-BIOCHIMIE

extraits des hématies saines et parasitées étant apparemment identiques. Toutefois le fait que d'autres enzymes présentes en quantité au moins aussi importante dans l'hématie saine ne peuvent plus être objectivées dans les extraits parasitaires (par exemple, la phosphatase acide) n'est pas en faveur d'une contamination de ceux-ci par la cathepsine de l'hématie. Dans ces conditions il n'est pas exclu d'émettre l'hypothèse qui reste à vérifier que le parasite sélectionne les enzymes dont il a besoin pour ses propres métabolismes.

BIBLIOGRAPHIE

1. FULTON (J. D.) et GRANT (P. T.). 1956. — *Biochem. J.*, 63 : 274-282.
2. SHERMAN (I. W.) et TANIGOSHI (L.). 1970. — *Int. J. Biochem.*, 1 : 635-637.
3. THEASKSTON (R. D. G.), FLETCHER (K. A.) et MAEGRAITH (B. G.). 1970. — *Ann. trop. Med. Hyg.*, 64 : 63-71.
4. MOULDER (J.) et EVANS (E. A.). 1976. — *J. Biol. Chem.*, 164 : 145-149.
5. COOK (L.), GRANT (P. T.) et KERMACK (W. O.). 1961. — *Exp. Parasit.*, 11 : 372-379.
6. LEVY (R. M.) et CHOU (S. C.). 1973. — *J. Parasit.*, 51 : 1064-1070.
7. LEVY (R. M.) et CHOU (S. C.). 1974. — *Biochem. Biophys. Acta*, 334 : 423-430.
8. LEVY (R. M.), SIDDIQUI (W. A.) et CHOU (S. C.). 1974. — *Nature*, 247 : 546-549.
9. SHERMAN (I. W.), 1977. — *Bull. Org. mond. Santé*, 55 : 276.
10. WRIGHT (I. G.) et GOODGER (B. V.), 1973. — *Z. Parasitenkunde*, 42 : 213-220.
11. WANG (C. C.) et STOTISH (R. L.), 1978. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 61 B : 307-313.
12. CHARET (P.), AISSI (E.), MAUROIS (P.), BOUQUET (S.) et BIGUET (J.), 1980. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 65 B : 519-524.
13. CHARET (P.), RUFFIN (P.), DHERIN (M.), BOUQUET (S.) et DUBREMETZ (J. F.), 1980. — *Ann. Paras. hum. comp.*, sous presse.
14. REICHEL (D.), JACOBSON (E.) et HASCHEN (R. J.), 1974. — *Biochem. Biophys. Acta*, 341 : 15-26.
15. HEMPELMANN (E.) et WILSON (R. J. M.), 1980. — *Parasitology* 80 : 323-330.

Étude de la biosynthèse des lipoprotéines riches en TAG endogènes au cours du paludisme expérimental des rongeurs

P. MAUROIS
J. C. FRUCHART
B. FOURNET
P. CHARET

U 42 INSERM, 369 rue Jules-Guesde, 59650 Villeneuve-d'Ascq

L'observation initiale d'un sérum opalescent chez des souris infestées par *Plasmodium* de rongeurs nous a incité à étudier la nature des modifications des lipides et lipoprotéines de l'hôte parasité.

Dans les infestations de la souris swiss par *P. chabaudi* des rongeurs par divers *Plasmodium*, les modifications des lipoprotéines, des triacylglycérides (TAG) sériques observées ont été les plus significatives au cours de l'infestation de la souris swiss par *P. chabaudi*.

Elles consistent essentiellement en une augmentation des lipoprotéines riches en TAG : chylomicrons (CM) et Very Low Density Lipoproteins (VLDL). Cette augmentation, bien visible sur les lipoprotéinogrammes, est associée à une augmentation des LDL et une chute des HDL.

Ces mêmes modifications des lipoprotéines ont

été retrouvées chez l'homme, au cours de 2 malaria-thérapies à *P. vivax* et au cours d'infestations naturelles à *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale*. Pour étudier l'hypertriglycéridémie et le métabolisme des lipoprotéines de l'hôte infesté par *Plasmodium* nous avons donc adopté le modèle expérimental : *P. chabaudi*-souris swiss, qui se rapproche le plus du modèle naturel humain.

En ce qui concerne plus précisément le métabolisme des lipoprotéines riches en TAG chez l'hôte parasité, plusieurs questions se posent : comment expliquer d'abord l'élévation du taux des chylomicrons d'origine exogène ? On sait que leur épuration de la circulation sanguine après un repas est rapide et que, au-delà de 6 heures, on n'en trouve plus dans le sérum des sujets sains. Leur persistance chez l'animal infesté,