

Modulation de l'activité biologique des protéines de surface chez les protozoaires hémoparasites

Les protozoaires hémoparasites (leishmanies, plasmodiums, trypanosomes) ont à faire face, au cours de leur cycle infectieux, à des milieux extrêmement différents (du tube digestif des insectes au sang et aux cellules des malades infectés) et à des agressions diverses, notamment protéasiques et immunologiques. Ces organismes se protègent contre ces modifications de leur environnement par des protéines de surface liées à la membrane plasmique par des ponts glycosyl-phosphatidylinositol. Ces ponts peuvent être hydrolysés par des phospholipases spécifiques, qui libèrent par conséquent les protéines de surface sous une forme soluble, parfois catalytiquement activées, et des petites molécules, diacylglycérol et phospho-inositol glycanes. Ces dernières peuvent se comporter comme des seconds messagers, inter- ou intracellulaires, et intervenir dans le contrôle de l'état de différenciation du parasite et les relations avec l'hôte.

Catherine Braun Breton
Luis H. Pereira da Silva

ADRESSE

C. Braun Breton : chargée de recherche à l'Institut Pasteur. L. H. Pereira da Silva : directeur de recherche au Cnrs et professeur à l'Institut Pasteur. Unité de parasitologie expérimentale, Cnrs URA 146, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris, France.

Le terme protozoaire hémoparasite est tombé en désuétude du fait de la difficulté d'associer des groupes taxonomiques précis à l'habitat tissulaire particulier de ces protozoaires. On peut toutefois retenir cette dénomination, à des fins opérationnelles, pour définir les protozoaires parasites des cellules et liquides interstitiels du système hématopoïétique. Ces parasites sont responsables d'un nombre important de maladies graves : humaines et animales, comme les leishmanioses, les trypanosomiasis et les paludismes ; purement animales, comme les babésioses et les theilérioses. Si on se limite à ces maladies de mammifères, les parasites correspondants, malgré leur

appartenance à des groupes taxonomiques éloignés, partagent un certain nombre de caractéristiques importantes. Ainsi, leur transmission d'un hôte infecté (homme ou animal) à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un arthropode hématophage. Par ailleurs, chez les deux hôtes (vertébré et arthropode), ces organismes présentent des cycles complexes et successifs de multiplication et différenciation cellulaires. Chaque cycle aboutit à la production de formes infectantes, spécifiques des tissus et cellules qu'elles infectent : ce sont, par exemple, les macrophages pour les leishmanies, les hépatocytes et les érythrocytes pour *Plasmodium*, les érythrocytes pour *Babesia*, les érythrocytes et les lymphocytes pour *Theileria*.

Au cours de leur vie, ces protozoaires hémoparasites sont soumis à de brusques et profonds changements d'environnement. Par exemple, le trypanosome africain, responsable de la maladie du sommeil, qui vit, se nourrit et se multiplie dans le sang du mammifère où il résiste à l'attaque des effecteurs humoraux et cellulaires du système immunitaire de l'hôte, se trouve en quelques secondes au contact des sucs digestifs de l'insecte lors du repas sanguin de l'insecte vecteur. Ce changement des caractéristiques chimiques de son environnement est accompagné d'une baisse de la température ambiante. Un autre exemple est celui du sporozoïte de *Plasmodium*, plongé dans le liquide salivaire du moustique vecteur et injecté dans la circulation sanguine de l'hôte mammifère : il suit alors un long trajet avant d'atteindre l'hépatocyte, au cours duquel il doit résister à l'action lytique du complément. Par ailleurs, ce sporozoïte est internalisé dans l'hépatocyte par un mécanisme d'endocytose, probablement par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, et se retrouve donc dans un nouvel environnement (température différente, éventuellement pH différent et présence d'enzymes lytiques) auquel il doit s'adapter. Ces exemples montrent la diversité des changements auxquels sont soumis les hémoparasites : variations brusques de température, de sources nutritives, d'osmolarité, d'oxygénation, présence d'enzymes lytiques, d'effecteurs de l'immunité, des flores bactérienne et fongique associées aux organismes hôtes, etc.

Ces protozoaires ont de fait développé des mécanismes de résistance aux différentes attaques dont ils sont l'objet ainsi que des systèmes de régulation leur permettant d'exprimer, à chaque moment, des propriétés cellulaires nouvelles adaptées aux variations de leur environnement. Les protozoaires hémoparasites sont des cellules eucaryotes dépourvues de formes de résistance (kystes, spores) et, de ce fait, leur membrane représente la plaque tournante des changements adaptatifs nécessaires à leur survie dans un environnement hostile.

Ainsi, l'intérêt porté à l'étude des membranes des protozoaires hémoparasites semble pleinement justifié,

d'autant plus que des recherches conduites ces dix dernières années ont montré que les macromolécules exprimées à la surface de plusieurs de ces parasites sont des cibles préférentielles de la réponse immune protectrice de l'hôte mammifère. Ces recherches ont également montré que ces macromolécules sont généralement spécifiques de stade, c'est-à-dire qu'elles sont exprimées à des étapes précises du cycle parasitaire. Dans le but d'introduire une approche plus rationnelle dans la recherche de vaccins antiparasitaires, les recherches récentes essaient d'identifier des activités biologiques liées à des macromolécules de surface définies comme potentiellement vaccinales : on espère ainsi, en choisissant pour cibles des fonctions essentielles aux parasites, éviter des phénomènes d'échappement à l'immunité induite, par sélection de parasites n'exprimant plus l'antigène vaccinant ou exprimant un antigène modifié par sélection de parasites variants ou mutants. Des fonctions spécifiques ont été proposées pour certaines protéines de surface de protozoaires hémoparasites : perméases, protéases, résistance au complément, participation à la pénétration des cellules cibles, etc. Dans cet article, nous analysons un aspect de ce problème, à savoir le rôle adaptatif et fonctionnel que peut jouer l'ancrage de protéines de surface par un domaine glycosyl-phosphatidylinositol. Ce type d'ancrage semble en effet particulièrement utilisé par les protéines de surface des protozoaires hémoparasites.

Le pont glycosyl-phosphatidylinositol

L'étude de l'ancrage membranaire de la glycoprotéine variante de la surface des trypanosomes africains (appelée VSG pour *variant surface glycoprotein*) a révélé l'existence d'un nouveau domaine, de type lipidique, pouvant assurer l'insertion de protéines à la surface des cellules [1]. Ce domaine est la partie 1,2-diacylglycérol d'une molécule de phosphatidylinositol liée par une liaison covalente à l'extrémité carboxyterminale de la protéine [2]. Plus précisément (figure 1, p. 738), une éthanolamine

est liée par une liaison amide au groupement α -COOH de l'acide aminé terminal et, *via* un pont phosphodiester, à la position 6 d'un mannose, résidu terminal d'une structure glycosidique ou glycane. Le glycane se termine par une glucosamine, non acétylée, liée à l'inositol d'une molécule de phosphatidylinositol.

De nombreuses protéines de surface de cellules eucaryotes se sont avérées partager ce mode d'ancrage par un domaine glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) avec le VSG de *Trypanosoma brucei*. Ce type d'ancrage est particulièrement représenté chez les protozoaires. Ce domaine GPI peut être attaqué par différentes phospholipases (figure 1, p. 738) et, en particulier, par des phospholipases C « phosphatidylinositol-spécifiques » (PI-PLC) d'origine bactérienne [3]. Celles-ci provoquent le relargage des glycoprotéines de la surface des cellules. La protéine ainsi solubilisée présente deux caractéristiques qui la différencient de la forme membranaire : elle a perdu son caractère amphiphile et elle expose un nouvel épitope appelé CRD (*cross reacting determinant*), à la conformation duquel participent l'éthanolamine, le glycane et l'inositol-phosphate formé lors de la coupure par la PI-PLC [4]. Cet épitope CRD a été détecté dans toutes les protéines décrites jusqu'à présent, ancrées par un domaine GPI, après coupure de ce domaine par une PI-PLC.

La possibilité de détacher des protéines de la surface des cellules par l'action d'une PI-PLC, sans toucher à l'intégralité de la membrane, montre l'intérêt que peut présenter ce type d'ancrage membranaire dans la régulation de l'exposition de protéines à la surface des cellules, lorsqu'il est associé à la présence d'une PI-PLC. De fait, des activités phospholipase C capables de dégrader l'ancrage GPI de protéines de surface ont été décrites, en particulier chez différents protozoaires parasites [5-7]. Notons aussi qu'une phospholipase D attaquant le GPI de protéines de surface a été détectée dans le plasma de différents mammifères [8]. Certaines au moins de ces phospholipases semblent spécifiques de la structure GPI, c'est-à-dire sont capables de dégrader le glycosyl-phosphatidylinositol mais pas le

phosphatidylinositol ou ses dérivés mono- et biphosphatés. C'est pourquoi elles sont appelées GPI-PLC. Ces propriétés les différencient de la grande variété de PI-PLC décrites dans les cellules de mammifères et qui sont impliquées dans la production de deux types de messagers secondaires : le diacylglycérol, membranaire, activateur de protéine kinases C et donc régulateur de la phosphorylation de diverses protéines spécifiques ; l'inositol triphosphate, cytoplasmique, qui provoque la libération des ions calcium stockés dans le réticulum endoplasmique (pour revue, voir [9]). Remarquons toutefois que l'attaque d'un domaine GPI par une GPI-PLC produit au moins l'un de ces deux messagers secondaires : le diacylglycérol. Par ailleurs, la coupure du GPI par la phospholipase D plasmatique produit de l'acide phosphatidique, dont le rôle potentiel comme second messager a également été évoqué. Enfin, l'inositol-phosphate-glycane produit lors de la coupure d'un GPI par une PI-PLC pourrait être également un messager secondaire. Ainsi, les GPI-PLC pourraient jouer

un rôle crucial au cours de la vie des protozoaires parasites. Après avoir décrit quelques exemples de protéines de surface ancrées par un domaine GPI, empruntés aux leishmanies, aux trypanosomes et à l'hématozoaire du paludisme, nous discuterons l'éventuel rôle régulateur des GPI-PLC parasitaires vis-à-vis de la fonction biologique de ces protéines. Nous aborderons également l'intervention de messagers secondaires dans le cycle biologique de ces protozoaires et en particulier l'exemple de l'hématozoaire du paludisme, qui semble un modèle de choix pour l'étude de tels mécanismes régulateurs.

Les leishmanies

La surface des leishmanies est couverte principalement par deux antigènes : une glycoprotéine, gp63, et un glycoconjugué hautement polymorphe, le LPG (lipophosphoglycane) [10-12]. Récemment, de nouveaux glycoconjugués ont été identifiés dans une souche de *Leishmania major* dépourvue de LPG, dont deux, GIPL 5 et GIPL 6, sont

localisés à la surface des promastigotes* [13]. Ces différents antigènes possèdent tous un domaine d'ancrage de type GPI, avec toutefois quelques différences de structure : les glycolipides LPG et GIPL ne contiennent pas d'éthanolamine et leur lipide d'ancrage a une structure différente de celle généralement décrite pour les protéines ancrées par un domaine GPI (figure 2).

Ces antigènes sont présents à la surface des promastigotes, inoculés à l'hôte mammifère par l'insecte et internalisés par phagocytose dans les macrophages où ils se multiplient sous forme d'amastigotes**. Le LPG et la protéine gp63, au moins, semblent jouer un rôle dans cette phagocytose en interagissant avec des récepteurs spécifiques à la surface des macrophages [14, 15]. Par ailleurs, la protéine gp63 est une protéase,

* Promastigotes : formes extracellulaires.

** Amastigotes : formes intracellulaires.

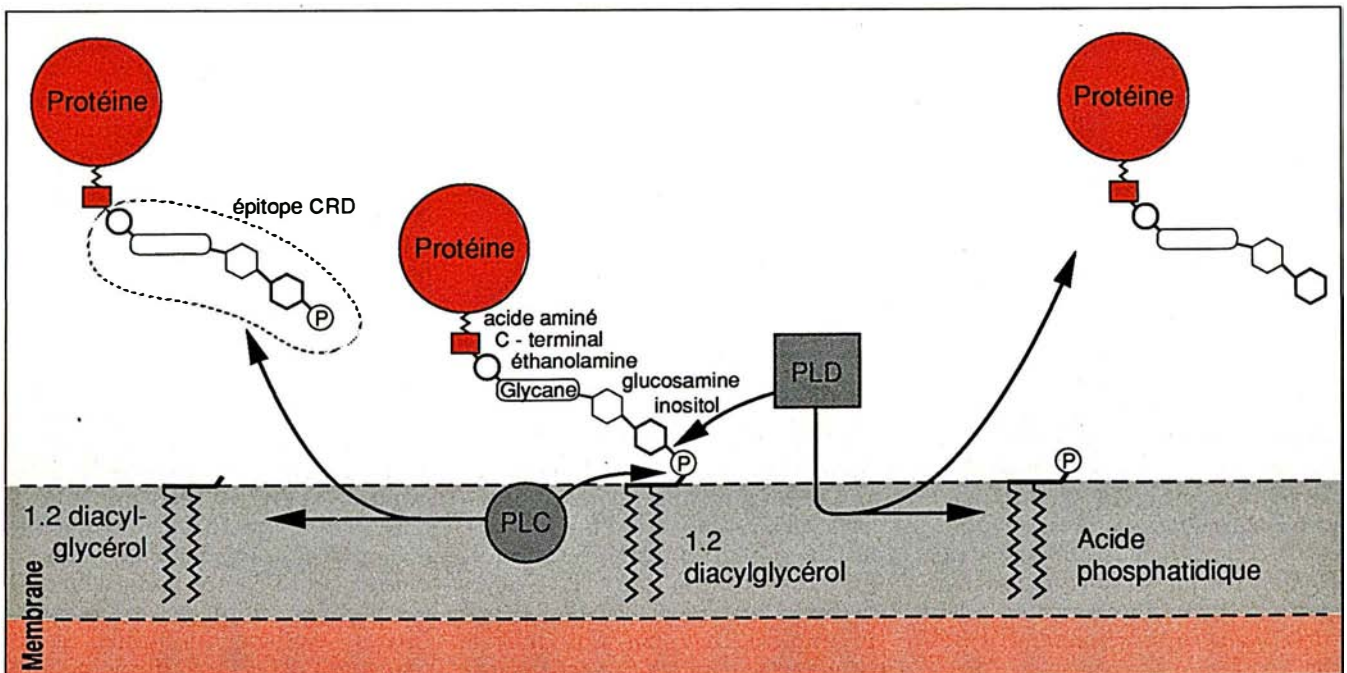


Figure 1. Structure de l'ancrage GPI (glycosyl phosphatidylinositol) et attaque par des phospholipases. PLC = phospholipase C; PLD = phospholipase D. (D'après [2].)

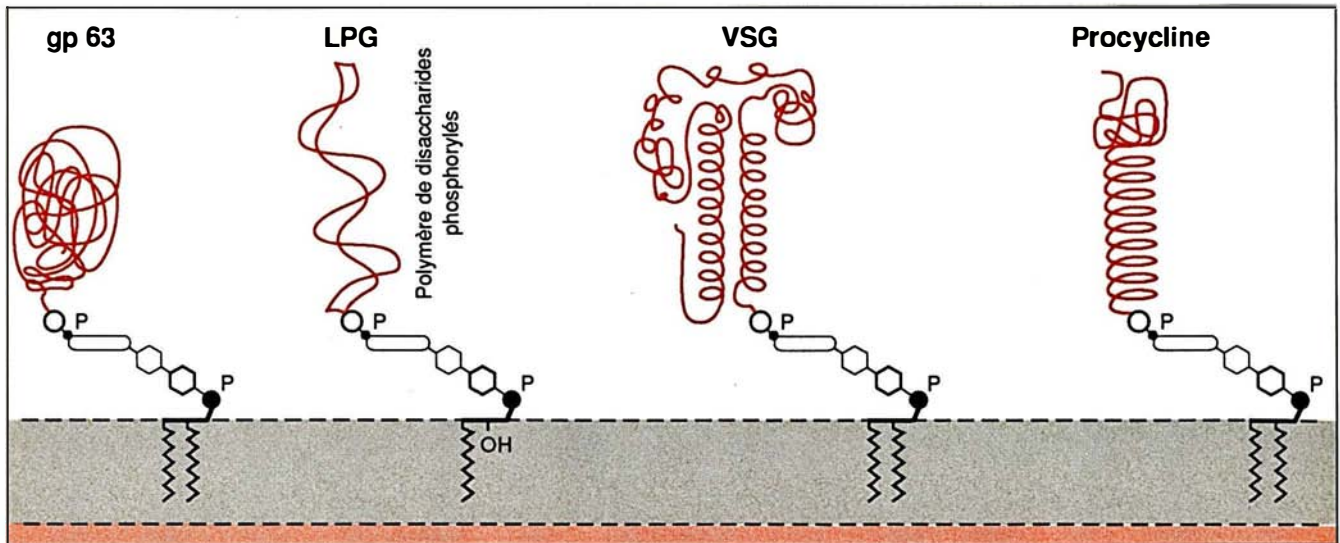


Figure 2. **Modèle de différentes molécules ancrées par un GPI (glycosyl phosphatidylinositol).** gp63 = glycoprotéine ; VSG = variant surface glycoprotein ; LPG = lipophosphoglycane. (D'après [5] et [12].)

appartenant à la famille des métalloprotéases. Cette protéase a été détectée à la surface de la majorité des espèces de leishmanies où elle est capable de dégrader différentes molécules et d'assurer la maturation du composé C3 du complément [15]. Il a été montré récemment que l'activité protéase de la forme membranaire de gp63 n'est pas sensible à l'inhibition par l' α_2 -macroglobuline plasmatique ; la forme solubilisée par une PI-PLC, en revanche, est sensible à cette inhibition. Ainsi, chez l'hôte mammifère où les promastigotes sont, dans le milieu intérieur, en contact avec l' α_2 -macroglobuline du plasma, la protéase gp63 n'est active qu'à la surface des cellules. Par ailleurs, au cours de la purification de gp63, Bouvier *et al.* [10] ont observé que cette protéine était présente sous deux formes : une forme membranaire amphiphile et une forme soluble qui pourrait être le produit de l'attaque de la gp63 membranaire par une GPI-PLC parasitaire.

Handman *et al.* ont également émis l'hypothèse de l'existence d'une GPI-PLC chez les promastigotes de *Leishmania major*, capable de dégrader les glycoconjugués de type GIPL [14]. Cette enzyme n'a toutefois pas été identifiée. Du fait de la présence de différents glycoconjugués de type

GIPL, dont certains sont à la surface des cellules et d'autres intracellulaires, il conviendrait de localiser cette GPI-PLC afin de déterminer quelles molécules des promastigotes sont des substrats pour cette enzyme et quels rôles ont les produits de cette réaction.

Les trypanosomes

Premier exemple de protéine ancrée par un domaine GPI, l'antigène de surface des formes sanguines de *Trypanosoma brucei* est certainement le plus étudié. Cette étude ne concerne pas seulement la détermination de la structure du domaine GPI, bien que ces travaux aient apporté une base structurale importante pour l'étude des protéines présentant ce type d'ancrage membranaire [4]. En effet, le VSG s'est tout particulièrement illustré par son caractère variant, c'est-à-dire par le fait que les trypanosomes africains sont capables de changer le manteau de VSG qui les entoure en synthétisant une nouvelle molécule de VSG, antigéniquement différente de la précédente.

Le remplacement d'une couverture de VSG par une autre est un phénomène relativement lent : l'ancien VSG est remplacé par le nouveau, par un mécanisme progressif et constant de recyclage de la surface

des trypanosomes (figure 3, p. 740). La mise en évidence d'une activité GPI-PLC associée aux formes sanguines de *Trypanosoma brucei* (la VSG lipase) a laissé penser que cette enzyme pouvait décoiffer, rapidement et totalement, la cellule de son manteau de VSG [5]. Cette hypothèse fut toutefois abandonnée peu à peu du fait de la localisation de la VSG lipase. Cette enzyme est en effet située dans des compartiments membranaires subcellulaires (poche flagellaire, vésicules de Golgi) et n'a pas été détectée à la surface de la cellule [16]. De plus, la VSG lipase n'est capable de dégrader le VSG que lorsque les deux protéines sont localisées dans la même bicouche lipidique [5]. Toutefois, lors du recyclage du VSG membranaire, on détecte bien la forme soluble du VSG, présentant un épitope CRD, donc due à l'attaque du VSG membranaire par une PI-PLC. Il semble en fait que les molécules de VSG soient dans un premier temps concentrées au niveau de la poche flagellaire puis internalisées dans des vésicules d'endocytose [17]. On peut détecter de telles vésicules, contenant la VSG lipase et du VSG soluble possédant le CRD, provenant donc probablement de la fusion entre vésicules d'endocytose et vésicules du Golgi contenant la VSG lipase.

Ce déshabillage discret du trypano-

RÉFÉRENCES

1. Cardoso de Almeida ML, Turner MJ. The membrane form of variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei*. *Nature* 1983; 302 : 349-52.
2. Low MG, Ferguson MAJ, Futerman AH, Silman I. Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. *TIBS* 1986; 11 : 212-5.
3. Low MG. Biochemistry of the glycosyl phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J* 1987; 244 : 1-15.
4. Ferguson MAJ, Williams AF. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Ann Rev Biochem* 1988; 57 : 285-320.
5. Bulow R, Overath P. Purification and characterisation of the membrane-form variant surface glycoprotein hydrolase of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem* 1986; 261 : 11918-23.
6. Andrews NW, Robbins ES, Ley V, Hong KS, Nussenzweig V. Developmentally regulated phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 1988; 167 : 300-14.
7. Braun Breton C, Langsley G, Barale JC, Pereira da Silva LH. A malaria phosphatidylinositol-specific phospholipase C: a possible role in merozoite maturation and erythrocyte invasion. *J Cell Biochem* 1989 (sous presse).
8. Davitz MA, Hereld D, Shak S, Krakow JL, Englund PT, Nussenzweig V. A glycan-phosphatidylinositol-specific phospholipase D in human serum. *Science* 1987; 238 : 81-4.
9. Enjalbert A. Récepteurs membranaires et mécanismes de transduction. *médecine/sciences* 1988; 10 (suppl.): 40-8.
10. Bouvier J, Etges RJ, Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J Biol Chem* 1985; 260 : 15504-9.
11. Handman E, Greenblatt CL, Goding JW. An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. *EMBO J* 1984; 3 : 2301-6.
12. Orlandi PA, Turco SJ. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 1987; 262 : 10384-91.
13. McConville MJ, Bacic A. A family of glycoinositol phospholipids from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1989; 264 : 757-66.

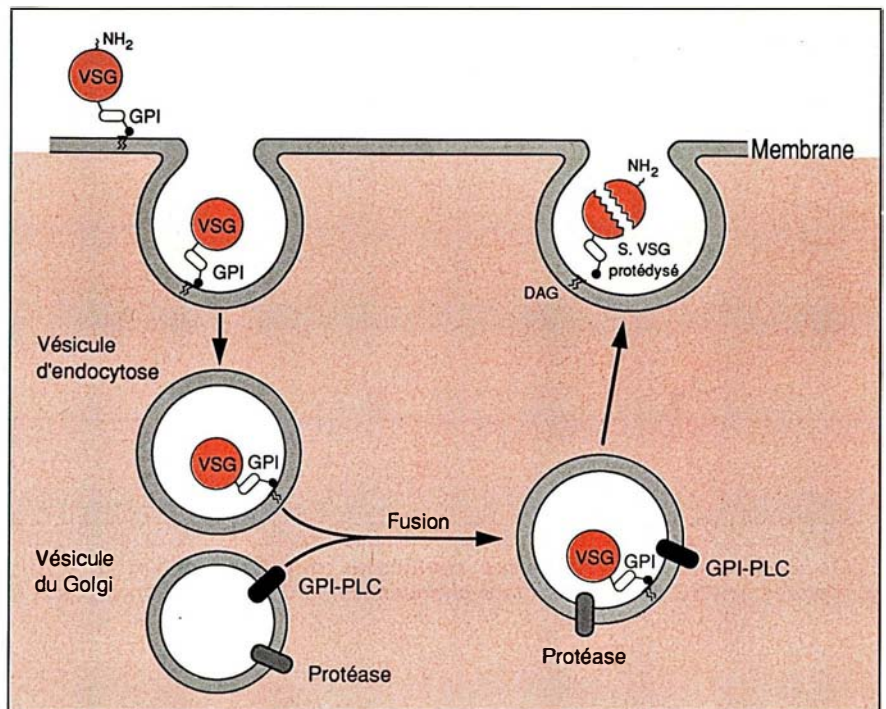


Figure 3. **Recyclage du VSG.** VSG = variant surface glycoprotein; GPI = glycosyl phosphatidylinositol (ancree); DAG = diacylglycérol; PLC = phospholipase C. (D'après [4].)

some semble intervenir également lors de la différenciation du parasite de la forme sanguine chez le mammifère à la forme procyclique chez l'insecte vecteur (figure 3). Cette différenciation peut être produite *in vitro* par passage de la culture de 37°C à 27°C en présence d'intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs [18]. Lors de cette différenciation, la synthèse de VSG est arrêtée et le VSG est progressivement remplacé par une nouvelle protéine, la procycline. La procycline couvre la surface du promastigote et présente également un ancrage membranaire de type GPI. Bülow *et al.* [18] ont envisagé qu'une solubilisation rapide du VSG pourrait être néfaste au parasite. En effet, les trypanomastigotes de *Trypanosoma brucei* sont résistants à l'activité lytique du sérum. L'interruption de la cascade de lyse par le complément semble se produire au niveau du dépôt de molécules à la surface du parasite: C3 est bien déposé à la surface des trypanosomes mais, en revanche, très peu de molécules de C5 et C9 le sont [19]. Il semble que le manteau

confluent de VSG empêche la pénétration de complexes C5b-9. De fait, un relargage rapide du VSG — soit dans le sang de l'hôte intermédiaire, soit dans l'estomac de l'insecte où le complément pourrait être encore actif — entraînerait une lyse du parasite par le complément. Par ailleurs, la synthèse rapide de procycline lors de l'ingestion du parasite par l'insecte est peut-être également nécessaire à la survie du parasite par un mécanisme encore inconnu où la procycline assurerait une protection contre le milieu extérieur.

Aucune donnée expérimentale ne prouve à l'heure actuelle que le rôle de l'ancrage GPI est d'empêcher le franchissement du manteau de VSG par des molécules extérieures. Toutefois, ce rôle a également été évoqué en ce qui concerne l'antigène Ssp4, antigène majeur de la surface des amastigotes (formes de reproduction intracellulaire) de *Trypanosoma cruzi* [20]. Les amastigotes sécrètent une substance, mise en évidence par son activité hémolytique, dont le rôle semble être de détruire la membrane de la vacuole d'endocytose par

m/s n° 10 vol. 5, décembre 89

laquelle le parasite est internalisé dans les cellules. Le parasite se retrouve alors libre dans le cytosol, à l'abri des enzymes destructrices des lysosomes. Si cette substance est capable de s'insérer dans la membrane de la vacuole, elle n'est pas capable de détruire la membrane du parasite. Le mécanisme par lequel le parasite se protège de l'hémolyse qu'il sécrète pourrait être analogue à celui par lequel il échappe à la lyse par le complément : les molécules extérieures seraient incapables de s'insérer dans une membrane couverte d'une protéine ancrée par un domaine GPI.

Comme les trypanosomes africains, *Trypanosoma cruzi* change de couverture lors de sa différenciation d'une forme à une autre. Pendant la conversion des amastigotes (formes intracellulaires de multiplication) en épimastigotes vers la formation de trypomastigotes, la protéine Ssp4 est progressivement rasée de la surface des cellules [6]. La forme soluble de Ssp4, détachée de la surface des cellules, présente un épitope de type CRD ; elle est donc le produit de l'attaque de l'ancrage GPI de Ssp4 membranaire par une PI-PLC. Andrews *et al.* [20] ont montré l'existence d'une GPI-PLC endogène dans les amastigotes et les trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, responsable de la solubilisation de Ssp4. Cette GPI-PLC est, comme la VSG lipase, sensible aux réactifs des thiols et indépendante du calcium. Chez son hôte mammifère, *Trypanosoma cruzi* change continuellement de forme entre trypomastigotes extracellulaires et amastigotes intracellulaires. Cette différenciation est associée à l'expression d'antigènes de surface spécifiques de chacun de ces stades. Si Ssp4 est spécifique des amastigotes, une autre protéine de surface, Ssp1, est spécifique des trypomastigotes. Toutes deux présentent un ancrage membranaire de type GPI et sont rasées de la surface du parasite lors de la différenciation d'une forme à l'autre. Le mécanisme de disparition graduelle de Ssp4 (et de Ssp1) de la surface des parasites serait de même type que celui impliqué dans le recyclage du VSG de *Trypanosoma brucei* et ferait intervenir la GPI-PLC parasitaire. Toutefois, la localisation de la GPI-PLC de *Trypano-*

m/s n° 10 vol. 5, décembre 89

soma cruzi n'est, pour l'instant, pas connue.

Les plasmodiums

Les protozoaires du genre *Plasmodium* présentent une grande variété d'antigènes de surface, généralement spécifiques de stade. Les stades sanguins de *Plasmodium falciparum* expriment un grand nombre de protéines différentes à la surface du parasite et en exportent également dans la membrane de la vacuole parasitophore*** et même à la surface du globule rouge infecté (figure 4). Parmi ces protéines, sept au moins possèdent un ancrage membranaire de type GPI [21]. Parmi celles-ci, quatre ont été plus particulièrement étudiées : une protéine de 102 kDa, située à la surface de l'érythrocyte infecté, qui pourrait être un récepteur de la transferrine ; une glycoprotéine de 42 kDa, produit de maturation de l'antigène majeur de la surface des schizontes (formes répli-

*** Vacuole formée de l'internalisation du parasite dans le globule rouge et dans laquelle il se développe.

catives intra-érythrocytaires), une glycoprotéine de 76 kDa et une protéine de 45 kDa, toutes trois situées soit à la surface, soit dans des organites apicaux du mérozoïte (forme infectieuse des globules rouges).

Si on fait subir un choc osmotique à des mérozoïtes, on observe la solubilisation et le relargage dans le milieu extérieur de la gp76 ; les autres protéines ancrées par un GPI ne semblent pas solubilisées dans les mêmes conditions. La forme soluble de la gp76 présente un épitope de type CRD et semble donc être le produit de l'attaque de la gp76 membranaire par une PI-PLC [21, 22]. De fait, une GPI-PLC a été caractérisée dans les mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* [7]. Une enzyme de poids moléculaire différent, mais ayant des caractéristiques très proches, a été décrite chez un plasmodium de rongeur, *Plasmodium chabaudi*. Ces deux activités enzymatiques ont également des propriétés comparables à celles de la VSG lipase. La GPI-PLC de *Plasmodium* est une enzyme membranaire dont la localisation précise dans le mérozoïte n'est pas connue. Elle semble toutefois n'avoir accès à l'ancrage GPI de la gp76 que

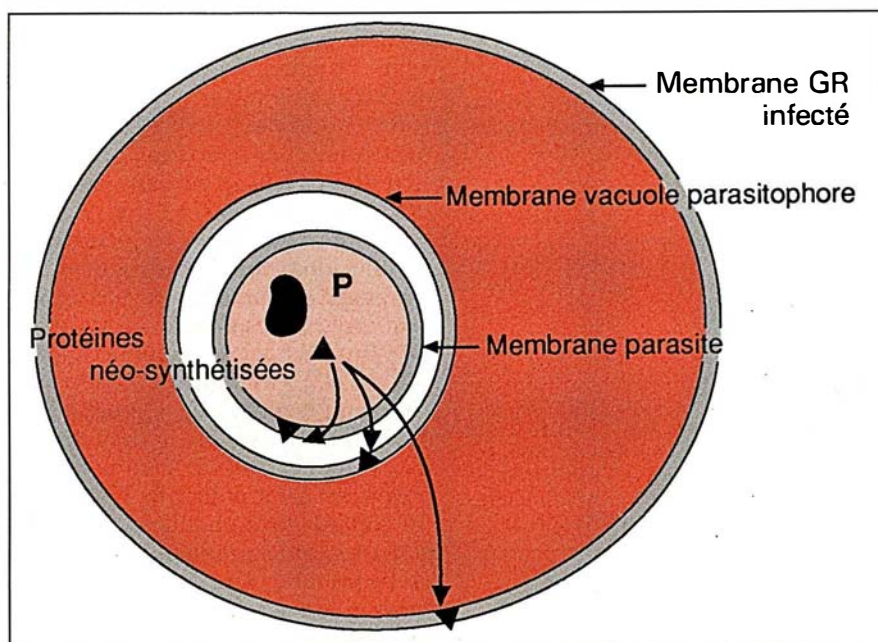


Figure 4. Exportation de protéines de plasmodium (P) aux membranes parasitaire, parasitophore ou du globule rouge (GR).

RÉFÉRENCES

14. Handman E, Goding JW. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J* 1985; 4: 329-36.

15. Russel D. The macrophage-attachment glycoprotein, gp63, is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Eur J Biochem* 1987; 164: 213-21.

16. Grab DJ, Webster P, Ito S, Fish WR, Verjee Y, Londasle-Eccles JD. Subcellular localization of a variable surface glycoprotein phosphatidylinositol-specific phospholipase C in African trypanosomes. *J Cell Biol* 1987; 105: 737-46.

17. Webster P, Grab DJ. Intracellular colocalization of variant surface glycoprotein and transferrin-gold in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 1988; 106: 279-88.

18. Bulow R, Nonnengasser C, Overath P (1989). Release of the variant surface glycoprotein during differentiation of bloodstream to procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 32: 85-92.

19. Joiner K. Complement evasion by bacteria and parasites. *Ann Rev Microbiol* 1988; 42: 201-30.

20. Andrews NW, Whitlow MB. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33: 249-56.

21. Braun Breton C, Rosenberry TL, Pereira da Silva LH (1989). Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* membrane proteins. Article soumis.

22. Braun Breton C, Rosenberry TL, Pereira da Silva LH. Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in *P. falciparum* by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Nature* 1988; 332: 457-9.

23. Braun Breton C, Pereira da Silva LH. Activation of a *Plasmodium falciparum* protease correlated with merozoite maturation and erythrocyte invasion. *Biol Cell* 1988; 64: 223-31.

Les recherches du laboratoire sont financées par des contrats avec l'OMS (UNDP/World Bank/Who Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases) et le ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur (Aide n° 87W0043 Eureka).

lors de la lyse osmotique des mérozoïtes, ou par fusion de deux membranes, l'une contenant la gp76 et l'autre, la GPI-PLC. On retrouve ici une situation semblable à celle de la VSG lipase de *Trypanosoma brucei* et de son substrat, le VSG. Toutefois, dans le cas des plasmodiums, il ne semble pas que la GPI-PLC joue un rôle dans le recyclage des antigènes de surface, mais plutôt qu'elle participe à une cascade régulatrice impliquée dans l'invasion du globule rouge par le mérozoïte.

En effet, si l'expression de l'activité GPI-PLC semble contrôlée et atteint son maximum dans le mérozoïte, la GPI-PLC est elle-même régulatrice de l'activité sérine-protéase associée à la gp76 [22]. La gp76 membranaire possède un site actif de sérine-protéase mais est catalytiquement inerte; l'activité protéolytique de cette protéine n'est détectée qu'après sa solubilisation par une PI-PLC. La coupure de l'ancrage GPI de la gp76 entraîne probablement un changement conformationnel qui révèle l'activité protéolytique. Rappelons que la coupure de l'ancrage GPI de la gp63 des leishmanies semble également entraîner un changement conformationnel de cette protéase qui, de résistante à l' α_2 -macroglobuline plasmatique, devient, après solubilisation par une PI-PLC, sensible à cet inhibiteur. L'utilisation d'anticorps monoclonaux réagissant avec la gp76 a permis de localiser cette protéine dans les rhoptries, organites situés dans l'apex du mérozoïte. L'addition de PI-PLC à des mérozoïtes intacts permet la sécrétion d'une gp76 active dans le milieu extérieur. Par ailleurs, une activité sérine-protéase d'origine parasitaire semble intervenir lors de l'invasion du globule rouge par le mérozoïte. Les caractéristiques de la gp76 en font un candidat de choix pour cette activité [23]. On réalise, en effet, l'intérêt pour le mérozoïte de stocker une enzyme préactivée mais catalytiquement inerte dans la membrane des rhoptries. Au moment de l'invasion, un signal provoquerait la fusion de vésicules contenant la GPI-PLC avec la membrane des rhoptries; ainsi, lorsque le contenu des rhoptries est sécrété au niveau de la jonction entre le parasite et le globule rouge, la PI-PLC aurait solubilisé une gp76

active et il en résulterait une concentration localement importante de cette sérine-protéase dont l'activité semble nécessaire à l'invasion du globule rouge (figure 5). Un même mécanisme de régulation liée au mérozoïte a été décrit chez *Plasmodium chabaudi* et pourrait être commun à tous les parasites possédant des rhoptries, pour l'invasion de cellules hôtes.

Remarquons que la GPI-PLC est probablement sécrétée également au niveau de la jonction parasite-érythrocyte. On peut imaginer qu'elle peut alors avoir accès aux autres protéines gp42 et gp45 ancrées par un GPI et participer ainsi à la différenciation du mérozoïte en trophozoïte, tout comme la VSG lipase participe à la différenciation des trypanostigotes en formes procycliques.

On peut toutefois se demander si la seule fonction d'une GPI-PLC parasitaire consiste en la solubilisation de protéines membranaires ou si cette enzyme joue un rôle dans la production de messagers secondaires comme les PI-PLC sensibles au calcium des cellules de mammifères ou la GPI-PLC insensible au calcium et sensible à l'insuline des hépatocytes.

La production de messagers secondaires

Les PI-PLC parasitaires que nous avons mentionnées dans cet article sont des GPI-PLC, c'est-à-dire qu'elles ne dégradent pas le phosphatidylinositol ou ses dérivés mono- et biphosphate s'ils ne sont pas associés à un glycan. L'attaque d'un tel substrat produit donc du diacylglycérol et un inositolphosphate-glycan. Le diacylglycérol est un messager secondaire bien caractérisé qui active des protéine kinases C et, chez les plasmodiums, il pourrait être à l'origine de la phosphorylation de protéines du cytosquelette de l'érythrocyte décrite lors de l'invasion du globule rouge par un mérozoïte (Mendoza, communication personnelle). Une GPI-PLC ne produit pas d'inositol-trisphosphate, mais de l'inositol-phosphate-glycan. Ce métabolite a été décrit comme pouvant être un second messager en tant qu'effecteur produit en réponse à l'insuline dans les cellules hépatiques (*m/s n° 1, vol. 3, p. 52*). Si son

m/s n° 10 vol. 5, décembre 89

TIRÉS A PART

C. Braun Breton.

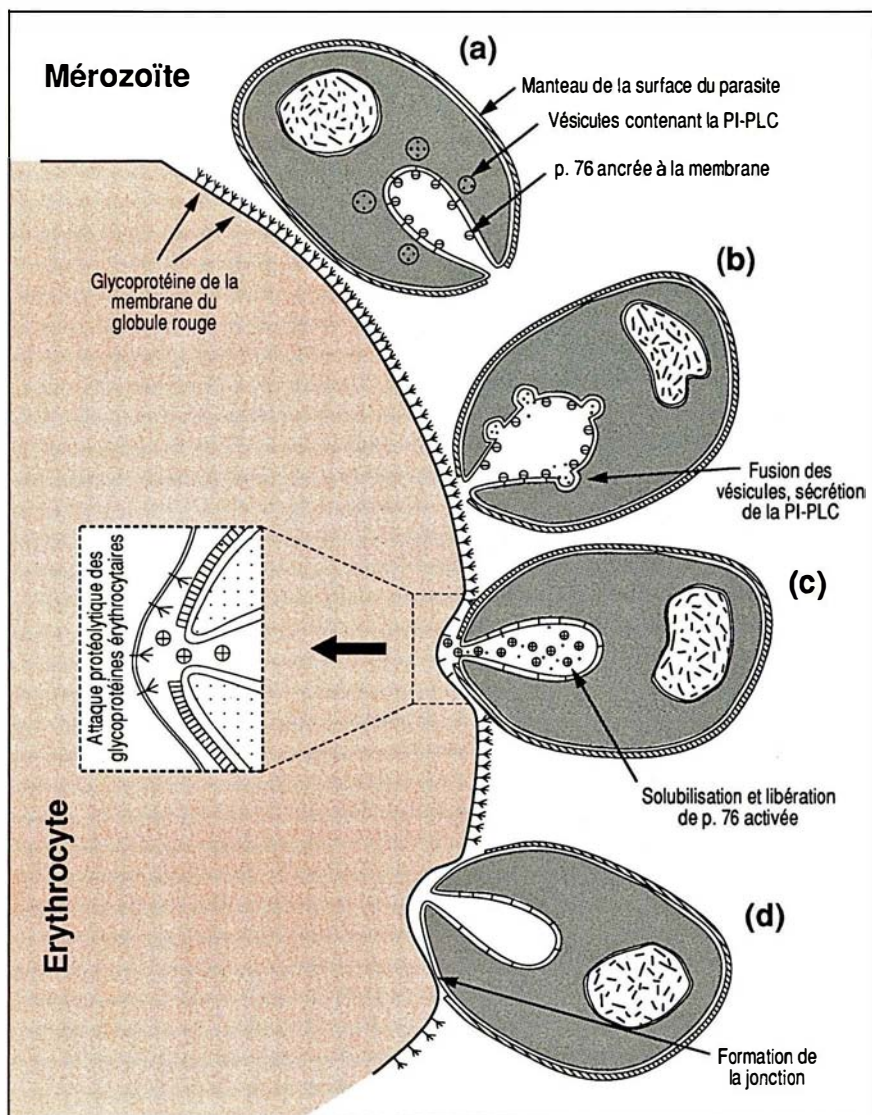


Figure 5. **Schéma de l'invasion des hématies par le plasmodium.**

action aboutit, comme celle de l'inositol-trisphosphate, à la mobilisation du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique, alors les GPI-PLC des plasmodiums pourraient être à l'origine du relargage d'ions calcium par le mérozoïte au niveau de la jonction mérozoïte-érythrocyte montrée par Mendoza et Wasserman (communication personnelle).

Trypanosomes et leishmanies, ainsi que nous l'avons décrit, changent de forme, passant d'une forme extracellulaire à une forme intracellulaire, dans le cas de *Trypanosoma cruzi*, par exemple. On peut se demander si la GPI-PLC parasitaire ne

serait pas nécessaire à la production de seconds messagers qui agiraient comme signaux de cette différenciation, ainsi que l'ont proposé Handman et Goding [14] pour *Leishmania major*.

L'étude des GPI-PLC purifiées et de leurs substrats ainsi que la recherche de médiateurs de signaux intracellulaires, tels que les protéines G dans les formes extracellulaires de ces différents parasites, devraient répondre à ces questions. De telles études sont entreprises actuellement dans notre laboratoire en ce qui concerne *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium chabaudi* ■

Summary

Possible role of glycosyl-phosphatidylinositol anchored surface proteins in hemoparasitic protozoa

Hemoparasitic protozoa are responsible for serious human and animal diseases like malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis. They belong to different taxonomic groups but share common aspects in their life cycles. These parasites develop into two different hosts: a vertebrate and a blood sucking arthropod. Within these hosts, the different life stages of hemoparasitic protozoa are submitted to the attack of a variety of elements (humoral and cellular effectors of the host immune system, phago-lysosomal enzymes, digestive enzymes of the insect) and to abrupt changes in their environment (temperature, osmolarity, pH...). Surface proteins of these parasites seem to play an important role in their adaptation to these attacks and environmental changes. Many of these proteins appeared to exhibit a particular membrane anchor constituted by a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) domain. The structure of the GPI-anchor of the Variant Surface Glycoprotein of african trypanosomes has been extensively studied. The surface protease of *Leishmania* (gp63) as well as major surface antigens of *Trypanosoma cruzi* (Ssp4) or *Plasmodium falciparum* (pI90) are anchored at the parasite surface via a GPI domain. The possible role of this GPI domain in the biological function of these proteins is discussed. Furthermore, the involvement of a GPI domain in the regulation of an enzymatic activity have been proposed: we have recently described a serine protease in malaria merozoites, the activity of which depends on the cleavage of its GPI anchor by an endogenous, developmentally regulated, GPI-specific phospholipase C. Detection of the GPI-phospholipase C activity and solubilisation of the serine protease seem to be steps of a biochemical cascade correlated with red blood cell invasion.

* GLOSSAIRE GÉNÉRAL DE PARASITOLOGIE *

Antimalarique : dirigé contre le paludisme. Synonyme : antipaludique. Caractérise le plus souvent des médicaments.

Arthropode : groupe zoologique réunissant les insectes, les arachnides et les crustacés.

CACO2 : lignée cellulaire issue d'un cancer colique humain.

Coccidie (du grec : en forme de grain) : sporozoaire pouvant parasiter les cellules intestinales de l'homme (*Isospora belli*, *Sarcocystis hominis*, *Cryptosporidium* sp).

Culture axénique : culture stérile.

Diploïde : se dit d'un noyau cellulaire possédant un nombre de chromosomes double de celui des gamètes.

Eucaryote : espèce vivante dont les cellules ont un noyau nettement séparé du cytoplasme.

Filopodia : prolongement cytoplasmique.

Gamètes (du grec : j'épouse) : cellules reproductrices mâles et femelles. Chez les protozoaires, le gamète femelle, de grande taille, est appelé macrogamète et le gamète mâle, filiforme, porte le nom de microgamète.

Gamétocyte : forme sexuée immature qui, dans le cas du paludisme, se transforme en gamète chez le vecteur (voir figure ci-contre).

Hématozoaire : terme désignant toute forme sanguine du paludisme.

Hôte définitif : être vivant hébergeant un parasite sous sa forme la plus élaborée, adulte par exemple, et, quand elle existe, sous sa forme sexuée.

Hôte intermédiaire : être vivant chez lequel le parasite séjourne obligatoirement sous une forme immature (larvaire par exemple), et se transforme en forme infestante pour l'hôte définitif.

Hypnozoïte : forme quiescente intra-hépatique du paludisme (voir figure ci-contre).

Lagomorphes (sous-ordre) : mammifères rongeurs tels le lapin, le lièvre, etc.

Malaria (de l'italien *Mala aria* : mauvais air) : nom anglo-saxon du paludisme.

Mérozoïte : élément unicellulaire et uninucléé libre, résultant de la division d'un schizonte (voir figure ci-contre).

Oocyste : forme résistante et infestante issue du cycle sexué des sporozoaires ; pour les coccidies, il est émis dans les selles ; pour les plasmodies, il est fixé dans la paroi de l'estomac des anophèles.

Phylogénétique : relatif à la recherche de l'origine et de l'évolution des espèces animales et végétales.

Protéine circumsporozoïte : protéine majeure de la surface du sporozoïte des plasmodies.

Protozoaire : être vivant unicellulaire.

Rhoptries : organites présents chez les parasites à vie intracellulaire et intervenant dans le franchissement des membranes des cellules.

Saprophyte : végétal, parasite ou microbe se nourrissant aux dépens de matières organiques en décomposition.

Schizogonie : multiplication asexuée des protozoaires. Pour le paludisme, il existe, chez l'homme, une schizogonie exo-érythrocytaire dans le foie et une schizogonie intra-érythrocytaire dans le sang (voir figure ci-contre).

Schizonte : forme parasitaire multinucléée issue de la multiplication asexuée des sporozoaires (voir figure ci-contre).

Schizonticide : substance détruisant les schizontes ou inhibant leur formation.

Sporozoaire : protozoaire se reproduisant par l'intermédiaire de spores contenant les sporozoïtes, comme les coccidies ou les plasmodies.

Sporozoïte (du grec : semence et animal) : stade parasitaire infestant des sporozoaires : paludisme (voir figure ci-contre), *cryptosporidium*.

Taxonomie ou Taxinomie : théorie de la classification.

Trophozoïte : forme de développement précoce et uninucléé des sporozoaires.

Vacuole digestive : vacuole siège du métabolisme nutritif du trophozoïte.

Vacuole parasitophore : vacuole intracytoplasmique de la cellule hôte, contenant le parasite.

Vecteur : être vivant (arthropode hématophage le plus souvent) prélevant activement les parasites chez un hôte pour l'inoculer, après transformation sous leurs formes infestantes, à un autre hôte.

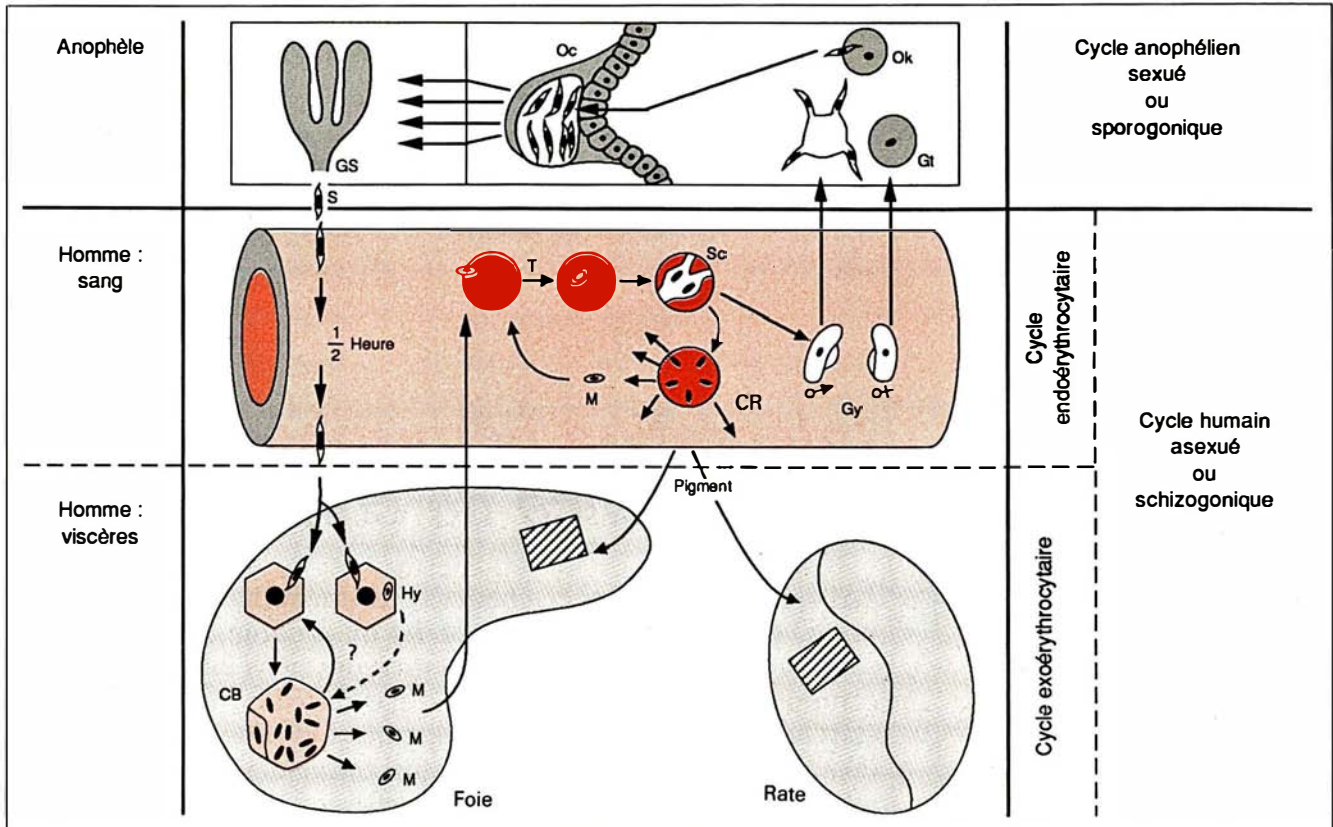


Schéma général du cycle du paludisme. Les sporozoïtes (S) inoculés lors de la piqûre d'un anophèle infesté gagnent les hépatocytes (H). En se multipliant, le parasite se transforme en un schizonte extra-érythrocytaire ou corps bleu (CB), encore appelé schizonte intra-hépatique. Celui-ci, après éclatement, libère des mérozoïtes (M) qui gagnent le sang périphérique et parasitent les globules rouges en devenant, au fur et à mesure de leur croissance, trophozoïte (T), schizonte (Sc), corps en rosace (CR). Ces derniers, à leur tour, éclatent, libérant des mérozoïtes (M). L'apparition des éléments à potentiel sexué, ou gamétocytes (Gy) est plus tardive. Aspiré avec le sang par le moustique, lors de son repas, ils gagnent l'estomac, se transforment en gamètes (Gt). Après fécondation, le gamète femelle devient un ookinète (Ok) libre, puis un oocyste (Oc) fixe. L'éclatement de l'oocyste libère des sporozoïtes qui gagnent les glandes salivaires de l'anophèle (GS). Une forme quiescente intra-hépatique, l'hypnozoïte (Hy), est susceptible de se réveiller et de provoquer de nouveaux accès. S = sporozoïte ; Hy = hypnozoïte ; H = hépatocyte ; CB = corps bleu ; M = mérozoïte ; T = trophozoïte ; Sc = schizonte ; CR = corps en rosace ; Gy = gamétocyte ; Gt = gamète ; Ok = ookinète ; Oc = oocyste ; GS = glandes salivaires. (D'après Gentilini M. et Dufflo B., « Médecine Tropicale », Paris : Flammarion, 1986.)