

Article de synthèse

Les protéases chez les helminthes

Catherine TRAP, Pascal BOIREAU*

UMR 956 INRA AFSSA ENVA, Biologie Moléculaire et Immunologie Parasitaires et Fongiques,
22 rue Pierre Curie, 94700 Maisons-Alfort, France

(Reçu le 8 février 2000 ; accepté le 15 juin 2000)

Abstract – Proteases in helminthic parasites. Proteases catalyse the cleavage of internal peptide bonds within peptides and proteins. They are classified into four major classes and are involved in a broad range of eukaryotic processes. Proteases have also been found to play a number of critical roles in the virulence of pathogenic agents, particularly of nematode parasites. Parasitic proteases are involved in different aspects of host-parasite interactions. They facilitate the invasion of host tissues and allow nutrition as well as the survival of the parasite in its host. Proteases also participate in the parasite's evasion from the host's immune response. The functional diversity and complexity of these enzymes are described in this review, with a particular focus on the principally identified proteases of four helminths: *Schistosoma* sp., *Fasciola* sp., *Taenia* sp. and *Haemonchus* sp. Some of these proteases, especially the cysteine proteases secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*, have been successfully tested in experimental immunodiagnosis. Proteases identified in different parasites are currently under study for a use as recombinant vaccines. In this respect, proteases are proposed as major potential targets for immunotherapy and chemotherapy against parasitic diseases.

protease / virulence / helminth / therapy / vaccination

Résumé – Les protéases catalysent le clivage de liaisons peptidiques internes au sein de peptides et protéines. Classées en quatre grandes familles, ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses fonctions des cellules eucaryotes. De plus, elles jouent un rôle critique dans la virulence des pathogènes et plus particulièrement des parasites. Elles interviennent à différents niveaux de l'interaction hôte-parasite. Elles facilitent la pénétration du parasite au sein de l'hôte et y assurent sa nutrition ; elles participent également à l'échappement du parasite vis à vis du système immunitaire de l'hôte. La diversité et la complexité fonctionnelle de ces molécules sont illustrées dans cette revue qui décrit les principales protéases identifiées chez quatre helminthes : *Schistosoma* sp., *Fasciola* sp., *Taenia* sp. et *Haemonchus* sp. Certaines de ces protéases et notamment plusieurs cystéine protéases du trématode *Fasciola hepatica* semblent être de bons candidats pour l'immunodiagnostic. De même des protéases identifiées chez différents parasites et utilisées comme vaccin recombinant font actuellement l'objet d'études. Ainsi les protéases apparaissent comme des cibles potentielles majeures en thérapie et vaccination antiparasitaire.

protéase / virulence / helminthe / thérapie / vaccination

* Correspondance et tirés-à-part

Tél. : (33) 1 49 77 13 28 ; fax : (33) 1 49 77 13 16 ; e-mail : p.boireau@alfort.afssa.fr

Plan

1. Introduction	462
2. Les protéases de <i>Schistosoma</i> sp.	464
3. Les protéases de <i>Fasciola hepatica</i>	465
4. Les protéases de <i>Taenia</i> sp.	466
5. Les protéases d' <i>Haemonchus contortus</i>	467
6. Conclusion.....	468

1. INTRODUCTION

Les protéases ou endopeptidases catalysent le clivage de liaisons peptidiques internes au sein de peptides et protéines. Elles sont exprimées dans les règnes animal et végétal.

Les endoprotéases catalysent l'hydrolyse d'une liaison peptidique interne alors que les exopeptidases catalysent le clivage d'un ou deux acides aminés situés aux extrémités aminée et carboxylique de la protéine ; elles sont alors plus spécifiquement désignées aminopeptidases et carboxypeptidases.

Leur séquence primaire et la spécificité des acides aminés de leur site actif ont permis leur classification en quatre grandes familles [30]. Les sérine protéases constituent le groupe majoritaire avec des enzymes comme la trypsine, la chymotrypsine, des facteurs de la coagulation, des éléments du complément. Les cystéine protéases, autre grande famille, comprennent entre autre les cathepsines du complexe lysosomal, la papaïne. Les métalloprotéases (dont les élastases des macrophages) et les aspartyl protéases (pepsine, rénine) sont deux groupes plus réduits.

De nombreux inhibiteurs protéasiques naturels et synthétiques ont été identifiés, les premiers jouant un rôle important dans la régulation post-traductionnelle des activités protéolytiques, les seconds permettant la classification des protéases dans les quatre grands groupes décrits ci-dessus.

Les protéases sont mises en évidence expérimentalement par migration de l'échantillon protéique en conditions natives sur un

gel de polyacrylamide renfermant un substrat protéique (gélatine...). Après réactivation des protéases, coloration du gel au bleu de Coomassie puis décoloration, une ou plusieurs bandes blanches non colorées apparaissent et indiquent une dégradation du substrat, révélant ainsi une ou plusieurs activités protéasiques [39]. L'utilisation de substrats fluoromarkés et d'inhibiteurs spécifiques des différentes classes de protéases permet également l'identification et la classification de ces molécules.

Ces enzymes sont impliquées dans diverses fonctions des eucaryotes : la nutrition, les communications intercellulaires, la coagulation sanguine, l'activation hormonale et enzymatique, la maturation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II [9, 35].

De nombreux travaux ont montré le rôle clé des protéases dans la pathogenèse des maladies parasitaires et en particulier des helminthoses.

Ainsi, elles facilitent l'invasion de l'hôte par catalyse de la dégradation des tissus conjonctifs : activité fibronectinolytique chez *Trichostrongylus vitrinus* [29], activité élastinolytique chez *Strongyloides stercoralis* [34], dégradation des matrices extracellulaires dermiques par une cystéine protéase produite par les larves L4 d'*Haemonchus contortus* [45] et par des sérine protéases et métalloprotéases des stades microfilaire et adulte du parasite *Onchocerca volvulus* [19], activité collagénolytique d'une cystéine protéase présente dans le tractus digestif de *Paragonimus westermani* [58].

Elles assurent la nutrition du parasite grâce à la dégradation des protéines de l'hôte rencontrées dans l'environnement du parasite (activité hémoglobineuse chez *Necator americanus* [2] et chez *Teladorsagia circumcincta* [60]). Elles peuvent participer à la modulation du système immunitaire (*Onchocerca ochengi* [26]), par dégradation ou activation de molécules immunogènes de l'hôte (*Taenia crassiceps* [55], *Paragonimus westermani* [6]). Les protéases interagissent également avec le système

Tableau I. Fonction(s) des protéases exprimées par les helminthes étudiés.

Classe de protéase	Fonction	Parasite	Localisation	Rôle	Références
Sérine protéase	Dégradation matrice	<i>S. mansoni</i> (cercaire)	?	Pénétration	[32, 33]
		<i>T. saginata</i> (oncosphère)	?		[54]
Cystéine protéase (dont cathepsine L-like, cathepsine B-like)	Hémoglobino-lyse	<i>S. mansoni</i> (schistosomule et adulte)	Lumière intestinale	Nutrition	[18, 47, 51]
		<i>S. japonicum</i> (adulte)	Paroi et lumière intestinale		[3]
		<i>F. hepatica</i>	Granules cellules épithélium intestinal		[59]
		<i>T. solium</i> (métacestode)	?		[53]
		<i>H. contortus</i> (L4 et adulte)	?		[8, 16, 41, 44]
	Dégradation matrice	<i>F. hepatica</i> (ts stades)	?	Pénétration	[1]
		<i>T. saginata</i> (oncosphère)	?		[54]
		<i>H. contortus</i> (L4 et adulte)	?		[45]
	Hydrolyse Ig	<i>F. hepatica</i> (ts stades)	?	Echappement immunitaire	[5, 56]
		<i>T. crassiceps</i> (cysticerque)	?		[20, 22, 25, 50, 55]
<i>T. solium</i> (metacestodes)		?	[53]		
Métalloprotéase	Fonctions digestives	<i>H. contortus</i> (L4 et adulte)	Apex cellules intestinales	Nutrition	[43]
		<i>T. solium</i> (métacestode)	?		[53]
	Hydrolyse Ig	<i>T. solium</i> (métacestode)	?	Echappement immunitaire	[53]
		Production des œufs et pigmentation intestinale	<i>S. mansoni</i> (adulte)		?
	Aspartyl protéase (dont cathepsine D-like)	Hémoglobino-lyse	<i>S. mansoni</i> (adulte)	Lumière intestinale	Nutrition
<i>T. solium</i> (métacestode)			?	[53]	
<i>H. contortus</i> (L4 et adulte)			?	[28]	
Hydrolyse Ig		<i>T. solium</i> (metacestode)	?	Echappement immunitaire	[53]

fibrinolytique ou le système de coagulation du sang de l'hôte et assurent le remodelage parasitaire lors de la transition d'un stade à un autre.

L'ensemble de ces rôles clés dans la virulence parasitaire en font des cibles potentielles en thérapie et vaccination antiparasitaire. Des essais vaccinaux contre la leishmaniose utilisant la gp63, une métalloprotéase à zinc, ont été réalisés [46], cette molécule étant impliquée dans les stades précoces de l'invasion parasitaire. De même, des vaccinations avec un cocktail de protéases (cathepsine L1, cathepsine L2 et hémoglobine) exprimées par *Fasciola hepatica* ont été expérimentées avec succès chez le bovin [11].

Nous aborderons dans cette revue une description des principales protéases caractérisées chez différents helminthes (Tab. I). Ainsi les protéases élaborées par *Schistosoma* sp., *Fasciola hepatica*, *Taenia* sp. et *Haemonchus contortus*, vont illustrer la complexité des fonctions de ces molécules au sein des interactions hôtes-parasites. Nous aborderons également leurs applications potentielles ou actuelles dans la lutte antiparasitaire.

2. LES PROTÉASES DE *SCHISTOSOMA* SP.

Les Schistosomes sont des trématodes parasites des vaisseaux sanguins de l'appareil digestif ou urinaire de la plupart des mammifères domestiques et de l'homme. Le cycle biologique du parasite nécessite le passage par un hôte intermédiaire, un mollusque (*Biomphalaria* pour *S. mansoni*, *Bulinus* pour *S. haematobium* et *S. intercalatum*). La transmission à l'hôte définitif s'effectue par pénétration transcutanée du stade cercaire.

Différentes protéases sont exprimées à des stades précis du cycle biologique de *Schistosoma* sp., y assurant une fonction spécifique indispensable au développement du trématode.

Le stade cercaire pénètre à travers l'épiderme de son hôte grâce en partie à l'émission de sécrétions par les glandes post-acétabulaires. Ces sécrétions renferment des protéases qui digèrent les macromolécules de la peau [17]. Une sérine protéase isolée à partir d'extraits de cercaires de *Schistosoma mansoni* possède une activité élastase [32] qui permettrait la dissociation des membranes basales et des tissus conjonctifs [33]. L'enzyme induit la formation de pseudotunnels dans l'épiderme avec un relâchement des matrices extracellulaires dermiques. L'inhibiteur le plus spécifique de la molécule (Suc-Phe-Gly-Ala-Leu-Chlorométhyl cétone) ne bloque pas la fixation de la cercaire sur la peau de l'hôte mais inhibe sa pénétration.

Les vers adultes possèdent une activité hémoglobino-lytique essentiellement due à l'expression chez *S. mansoni*, d'une cathepsine L-like [47]. Une seconde étude présente l'identification d'une cathepsine B-like nommée Sj31 comme hémoglobino-lyse majeure chez *S. japonicum* [3]. Des coupes de mâles adultes ont permis d'établir par immunofluorescence la localisation de la Sj31 au niveau de la paroi et de la lumière intestinale. Cette cathepsine B-like présenterait de grandes analogies avec la cystéine protéase Sm31 identifiée chez *Schistosoma mansoni* [18] et celle de *Schistosoma haematobium*.

Au stade schistosomule, l'inhibition irréversible de la Sm31 par certains inhibiteurs [51] induit une inhibition de l'hémoglobino-lyse, une réduction de la charge parasitaire et du nombre d'œufs ainsi qu'une diminution de l'hépatomégalie chez la souris. In vitro, ces molécules entraînent la mort des schistosomules, la dégradation de l'hémoglobine étant la source métabolique et nutritionnelle majeure de *Schistosoma* sp.

La protéase Sm31 présenterait une action synergique avec une autre protéase, une cathepsine D-like (aspartyl protéase) [57] localisée également dans la lumière intestinale du parasite, lieu hypothétique de dégradation de l'hémoglobine de l'hôte.

La phénanthroline, inhibiteur des métalloprotéases (chélateurs des ions Zn^{2+}), bloque *in vitro*, la production des œufs et à forte concentration entraîne la mort des schistosomes adultes. La molécule injectée chez la souris induit une diminution de l'accouplement des adultes, une dégénérescence des femelles et une perte de la pigmentation intestinale [12]. L'ensemble de ces pertes fonctionnelles souligne l'importante implication des métalloprotéases dans de nombreuses fonctions du parasite.

3. LES PROTÉASES DE *FASCIOLA HEPATICA*

La fasciolose dont les agents étiologiques appartiennent au genre *Fasciola* présente une distribution mondiale et infeste potentiellement tous les animaux de pâturage. Suite à l'ingestion de végétaux contaminés par des métacercaires, les formes juvéniles libérées pénètrent dans la paroi intestinale et migrent jusqu'au foie où elles se transforment en stade immature. Le parasite gagne ensuite les canalicules et la vésicule biliaire où il achève sa maturation. Le passage par un hôte intermédiaire (*Lymnaea truncatula* en Europe tempérée) est indispensable pour la pérennisation du cycle de développement du trématode.

Plusieurs analyses biochimiques ont montré que les stades juvénile, immature et adulte de *Fasciola hepatica* expriment un nombre considérable de protéases, majoritairement de la famille des cystéine protéases [10]. Le stade adulte du parasite produit, par exemple, au moins cinq activités de type cathepsine L et au moins deux activités de type cathepsine B [21], certaines étant codées par des familles multigéniques.

Ces différentes enzymes possèdent selon le stade parasitaire où elles sont exprimées, des fonctions différentes.

Les activités protéasiques (dont les cathepsines CL1 et CL2) des produits d'excrétion-sécrétion du stade juvénile invasif ont la capacité de dégrader les collagènes

de type I, III et IV, la fibronectine et la laminine [1]. Ces activités lytiques faciliteraient la pénétration et la migration du trématode au travers de la paroi intestinale et au travers de la masse hépatique.

Une cathepsine B-like, présente au stade immature, est capable de cliver *in vitro* les immunoglobulines de souris, rats, lapins et moutons [5], une (ou plusieurs) cathepsine L identifiée(s) dans les produits d'excrétion-sécrétion de douves adultes possède aussi cette activité lytique [56]. Cette même molécule empêche *in vitro* l'attachement des éosinophiles au stade juvénile du parasite [4]. Le parasite étant au cours de ses différents stades migratoires au contact de la circulation sanguine et donc du système immunitaire hôte, *Fasciola hepatica* développerait ainsi plusieurs mécanismes d'évasion immune, mécanismes qui ont également été suggérés chez plusieurs autres helminthes.

Une autre cystéine protéase présentant une activité hémoglobolytique a été localisée par immunohistochimie au niveau des granules des cellules de l'épithélium intestinal et au niveau du contenu « extraparasitaire » (erythrocytes hôtes) de l'intestin. Cette molécule serait sécrétée comme une enzyme digestive dans la lumière de l'intestin et participerait à la dégradation extracellulaire des protéines hôtes dont l'hémoglobine [59].

L'utilisation de certaines protéases de *Fasciola hepatica* comme réactifs antigéniques dans des tests de diagnostic de fasciolose humaine semble donner des résultats fiables.

Ainsi, la cathepsine L1 (CL1) de 27 kDa sécrétée par les juvéniles et les adultes a été testée en Bolivie, pays où la prévalence de fasciolose humaine est élevée et a permis une bonne discrimination des individus séro-négatifs et des individus séropositifs. Aucune réaction croisée n'a été observée vis-à-vis de *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus granulosus*, *Taenia* sp. et *Trypanosoma cruzi* [38]. Les cathepsines CL1 et CL2, très immunogènes sont reconnues

précocement au cours de l'infestation et sont capables d'induire une réponse humorale spécifique assez forte pour neutraliser au moins partiellement leur activité enzymatique [40].

CL2 a été purifiée à partir du surnageant de milieu de culture d'adultes [13]. La molécule native [14] ainsi que la molécule recombinante obtenue par criblage immunologique [15] présentent la même capacité de clivage du fibrinogène aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine.

Deux autres cystéine protéases Fas1 (26 kDa) et Fas2 (25 kDa) ont été utilisées comme antigènes d'immuno-détection [7], offrant une grande sensibilité et spécificité du diagnostic de fasciolose humaine.

Des essais vaccinaux ont également été menés [49]. Un essai vaccinal réalisé avec la combinaison CL1-hémoglobine de *Fasciola hepatica* offre 52 % de protection chez le bovin, tandis qu'avec la combinaison CL2-hémoglobine la protection atteint 72,4 % [11]. Les animaux qui ont reçu ces deux formulations vaccinales présentent des lésions hépatiques réduites et la viabilité des œufs est diminuée. De plus 98 % des œufs ne se transforment pas en miracidium après une vaccination avec la combinaison CL2-hémoglobine.

4. LES PROTÉASES DE *TAENIA SP.*

Liés à la consommation de viande de porc ou de bœuf, les ténias sont cosmopolites. L'homme s'infeste en ingérant des cysticerques contenus dans de la viande crue ou insuffisamment cuite. Le cestode à l'état adulte vit dans l'intestin grêle. L'hôte intermédiaire (le porc pour *Taenia solium* ou le bovin pour *Taenia saginata*) héberge le parasite dans ses muscles.

Taenia solium infeste au stade cysticerque le système nerveux central et est à l'origine de la neurocysticercose humaine. *Taenia crassiceps* peut exceptionnellement

être responsable d'une telle pathologie chez des patients immunodéprimés.

Une cystéine protéase de 43 kDa a été purifiée à partir de cysticerques de *Taenia crassiceps* et présente la propriété de dégrader les immunoglobulines IgG de l'hôte [55]. Les immunoglobulines hôtes seraient internalisées par les cysticerques selon un processus d'endocytose et les acides aminés issus de leur dégradation seraient incorporés dans les protéines parasitaires. Les vésicules ressemblant à des lysosomes et qui sont formées lors de l'endocytose possèdent une activité cystéine protéase (celle de 43 kDa) [25].

De nombreuses études ont montré la persistance des cysticerques pendant plusieurs mois dans les tissus de l'hôte intermédiaire. Leur survie est dépendante de la présence d'une source nutritionnelle apportée par la dégradation des immunoglobulines de l'hôte. Ainsi, l'analyse de cysticerques a révélé l'existence d'immunoglobulines hôtes avec un poids moléculaire altéré [20]. Des récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines ont été purifiés à partir d'homogénats de manteaux de cysticerques [22]. Les kystes produisent une glycoprotéine qui augmente la production d'immunoglobulines hôtes, servant ensuite de source nutritionnelle pour le parasite [50].

La cystéine protéase de 43 kDa ne serait pas la seule protéase impliquée dans cette dégradation puisqu'en présence d'E-64 (N-[N-(L-3transcarboxyoxiran-2-carbonyl)-L-Leucyl]-agmatine) inhibiteur spécifique et irréversible de cette famille d'enzymes, les immunoglobulines hôtes subissent une digestion partielle. En fait cette fonction fait intervenir une cystéine protéase et plus minoritairement une aspartyl protéase.

Par cette activité, l'helminthe serait également capable d'inhiber la réponse immunitaire de l'hôte.

L'espèce *Taenia saginata* exprime dans les produits d'excrétion-sécrétion du stade oncosphère (stade infestant de l'hôte intermédiaire), des cystéine et sérine protéases

qui ont été identifiées par incubation avec des substrats peptidiques fluoromarkés en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques des différentes familles de protéases [54]. Leur hypothétique implication dans l'invasion de la muqueuse intestinale de l'hôte intermédiaire comme cela a été montré chez d'autres parasites reste à confirmer.

Chez *Taenia solium*, les métacestodes persistent plusieurs années dans le système nerveux central humain. Leur examen a permis l'identification de différentes activités protéasiques ; des métalloprotéases, cystéine protéases et aspartyl protéases [53]. La capacité de ces enzymes à digérer l'hémoglobine et les immunoglobulines IgG hôtes (dégradation préférentielle de la chaîne lourde) souligne leur implication dans la survie du parasite au sein de son hôte intermédiaire.

Un inhibiteur protéasique a été caractérisé dans des extraits de métacestodes de *Taenia pisiformis* ainsi que dans le milieu de culture de métacestodes maintenus vivants in vitro [36]. Cette molécule de 7 kDa est un inhibiteur de la trypsine et de la chymotrypsine et n'affecte pas l'activité de molécules telles que les élastases, collagénases, pepsine, rénine et papaïne. Cet inhibiteur dont le rôle n'a pas encore été clairement démontré, fonctionnerait comme un système de défense vis-à-vis d'enzymes hydrolytiques de l'hôte potentiellement nuisibles pour le parasite [37].

5. LES PROTÉASES D'*HAEMONCHUS CONTORTUS*

Haemonchus contortus est un nématode parasite de la caillette des moutons, chèvres et autres petits ruminants. Il se nourrit du sang de son hôte et est à l'origine d'anémies sévères dans les troupeaux, (1 ver prélevant quotidiennement 0,05 mL de sang), d'une perte de poids et parfois de la mort des animaux. Cette parasitose a une importance économique considérable.

La pénétration dans les tissus hôtes et l'utilisation du sang de l'hôte comme source nutritionnelle sont médiées par des processus mécaniques et par la libération de produits histolytiques par le nématode.

L'analyse des produits d'excrétion-sécrétion potentiellement histolytiques des vers adultes sur gel de polyacrylamide en présence de gélatine a permis l'identification de quatre fractions protéasiques [23] de 32, 35, 38 et 40 kDa dont l'activité cystéine protéase a été identifiée. Des aspartyl protéases et métalloprotéases ont pu être également mises en évidence dans ces produits d'excrétion-sécrétion. Cette grande diversité de familles protéasiques exprimées par les nématodes adultes permet d'envisager des fonctions très diverses pour ces molécules. Une cystéine protéase de 35 kDa [8, 41] est fortement exprimée au stade adulte alors que les résultats de transfert de Northern montrent des expressions faibles aux stades larvaires L3 et L4 suggérant son implication dans la digestion du repas sanguin. Les gènes de trois autres cystéine protéases ont ensuite été clonés [42] et révèlent des différences significatives dans leur séquence primaire. Ces cystéines protéases hydrolyseraient des substrats différents et posséderaient des fonctions parasitaires différentes.

La capacité d'*Haemonchus contortus* à dégrader les tissus conjonctifs a été montrée in vitro. Des larves L3 du parasite ne dégradent pas une matrice extracellulaire composée de glycoprotéines, d'élastine et de collagène avec laquelle elles sont cultivées pendant 24 h. En revanche, les larves L4 et les adultes dégradent respectivement 42 % et 100 % de la matrice. Les produits d'excrétion-sécrétion des vers adultes dégradent 64 % de la matrice, ce pourcentage étant augmenté en présence de dithiothreitol (activateur des cystéine protéases). A l'inverse la dégradation matricielle est inhibée lorsque ces mêmes produits d'excrétion-sécrétion sont co-incubés avec un inhibiteur spécifique des cystéine protéases [45]. Une ou plusieurs cystéine protéase(s) possèdent donc la capacité de dégrader des

composants majeurs de la matrice extracellulaire (élastine et collagène) dans des conditions physiologiques et participeraient à la lyse des tissus hôtes. Cette activité favoriserait la pénétration dans la caillette de l'hôte et/ou dans les capillaires sanguins.

D'autres travaux ont révélé l'aptitude des cystéine protéases à digérer l'hémoglobine de l'hôte. Une activité cathepsine L-like (cystéine protéase), identifiée aux stades larve L4 et adulte, inhibe la coagulation du sang chez le mouton par hydrolyse du fibrinogène et présente une fonction hémoglobolytique [44]. De l'hémoglobine radiomarquée a été utilisée pour étudier l'incorporation d'éléments radiomarqués dans les protéines parasitaires. En présence d'inhibiteurs de cystéine protéases ajoutés à une concentration élevée (1M), l'incorporation est réduite de 78 % et la viabilité parasitaire diminue. Cette incorporation est diminuée de 40 % avec un inhibiteur de sérine protéases [16]. L'incorporation de molécules issues de l'hydrolyse de l'hémoglobine hôte dans les macromolécules d'*Haemonchus* résulterait en partie de l'action conjointe de différentes protéases qui joueraient un rôle critique dans la nutrition du ver.

Une aspartyl protéase identifiée à l'aide d'un criblage immunologique et exprimée aux seuls stades larve L4 et adulte pourrait également participer à la digestion du repas sanguin [28].

Une métalloprotéase à zinc (ADNc codant nommé MEP1), localisée à l'apex des cellules intestinales d'*Haemonchus contortus*, est exprimée tardivement au cours de son développement (expression aux stades L4 et adulte) [43] et serait nécessaire pour l'alimentation du parasite. La molécule fait partie d'un complexe H-Gal-GP (glycoprotéine renfermant du galactose) qui contient entre autres des activités aspartyl protéases. Ce complexe génère une bonne protection chez des moutons, mise en évidence lors d'une infestation d'épreuve avec le parasite. Les animaux deviennent réfrac-

taires à l'infestation avec une diminution de la charge parasitaire de plus de 72 % et une réduction du nombre d'œufs excrétés dans les fécès de plus de 93 % [48].

Des extraits protéiques d'adultes d'*Haemonchus contortus* renfermant majoritairement des activités cystéine, sérine et métalloprotéases, ont servi à immuniser de jeunes agneaux. Lors d'une infestation d'épreuve avec le parasite menée sur ces animaux, la charge parasitaire est réduite de 47 % et le nombre d'œufs excrétés dans les fécès est diminué de 77 % par rapport aux animaux témoins. Les anticorps sériques produits après vaccination des agneaux sont spécifiquement dirigés contre la surface du tube digestif du parasite [27]. L'hypothèse d'une protection médiée par inhibition d'enzymes digestives parasitaires est donc suggérée.

L'étude des protéases exprimées par *Haemonchus contortus* apparaît très complexe quand on sait que les produits d'excrétion-sécrétion du stade adulte de tous les isolats étudiés ne présentaient, jusqu'en 1997, aucune protéase commune. La variabilité intragéographique et intergéographique des profils protéasiques a alors été clairement démontrée [24].

6. CONCLUSION

Schistosoma, *Fasciola*, *Taenia* et *Haemonchus* expriment une grande variété d'enzymes protéasiques. Ces helminthes sont des modèles qui illustrent parfaitement la diversité fonctionnelle de ces molécules qui vont agir aussi bien en permettant la pénétration du parasite chez son hôte qu'en y assurant ensuite son maintien, le déroulement de son cycle biologique et dans certains cas la sortie de l'hôte. Les protéases parasitaires sont des acteurs majeurs de l'échappement au système immunitaire de l'hôte par clivage des immunoglobulines hôtes (*Fasciola*, *Taenia*) et par inhibition de l'attachement des éosinophiles sur le parasite (*Fasciola*). D'autres mécanismes d'inactivation immunitaire leur sont attribués

tels que l'inactivation du complément ou celle des médiateurs cytotoxiques exprimés par les leucocytes comme l'interféron, les interleukines [52]. Cependant la fonction précise de certaines protéases reste à ce jour inconnue.

« L'expression protéasique au cours du cycle de développement de *Schistosoma* est une affaire multifonctionnelle parfaitement orchestrée » [31]. Les parasites ont appris au cours de leur interaction avec l'hôte à élaborer des molécules remplissant des fonctions très diverses, métaboliques, d'immunomodulation, histolytiques, qui leur assurent la survie. Cependant les mammifères expriment des inhibiteurs impliqués dans le blocage de protéases parasitaires, bactériennes, virales... La présence ou l'absence de tels inhibiteurs pourrait expliquer en partie le phénomène de résistance ou de sensibilité développé par différentes espèces hôtes vis-à-vis du même parasite.

L'action critique des protéases à différents niveaux de l'interaction hôte-pathogène en fait des candidats potentiels en immunodiagnostic. L'utilisation de certaines enzymes protéasiques dans des tests de diagnostic de fasciolose humaine, par exemple, semble prometteuse, de même que les essais vaccinaux avec des combinaisons de différentes protéases. Ces candidats vaccinaux représentent une voie sérieuse dans la lutte contre un certain nombre de parasitoses dont les helminthoses.

RÉFÉRENCES

- [1] Berasain P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J.P., Frangione B., Carmona C., Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components, *J. Parasitol.* 83 (1997) 1-5.
- [2] Brown A., Burleigh J.M., Billet E.E., Pritchard D.I., An initial characterization of the proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*, *Parasitology* 110 (1994) 555-563.
- [3] Caffrey C.R., Ruppel A., Affinity isolation and characterization of the cathepsin B-like proteinase Sj31 from *Schistosoma japonicum*, *J. Parasitol.* 83 (1997) 1112-1118.
- [4] Carmona C., Dowd A.J., Smith A.M., Dalton J.P., Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles, *Mol. Biochem. Parasitol.* 62 (1993) 9-17.
- [5] Chapman C.B., Mitchell G.F., Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*, *Vet. Parasitol.* 11 (1982) 165-178.
- [6] Chung Y.B., Yang H.J., Kang S.Y., Kong Y., Cho S.Y., Activities of different cysteine proteases of *Paragonimus westermani* in cleaving human IgG, *Korean J. Parasitol.* 35 (1997) 139-142.
- [7] Cordova M., Reategui L., Espinoza J.R., Immunodiagnostic of human fasciolosis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93 (1999) 54-57.
- [8] Cox G.N., Pratt D., Hageman R., Boisvenue R.J., Molecular cloning and primary sequence of a cysteine protease expressed by *Haemonchus contortus* adult worms, *Mol. Biochem. Parasitol.* 41 (1990) 25-34.
- [9] Cresswell P., Proteases, processing and thymic selection, *Science* 280 (1998) 394-395.
- [10] Dalton J.P., Hefferman M., Thiol protease released in vitro by *Fasciola hepatica*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 35 (1989) 161-166.
- [11] Dalton J.P., McGonigle S., Rolph T.P., Andrews S.J., Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin, *Infect. Immun.* 64 (1996) 5066-5074.
- [12] Day T.A., Chen G.Z., The metalloprotease inhibitor 1,10-phenanthroline affects *Schistosoma mansoni* motor activity, egg laying and viability, *Parasitology* 116 (1998) 319-325.
- [13] Dowd A.J., Smith A.M., McGonigle S., Dalton J.P., Purification and characterization of a second cathepsin L proteinase secreted by a parasitic trematode *Fasciola hepatica*, *Eur. J. Biochem.* 223 (1994) 91-98.
- [14] Dowd A.J., McGonigle S., Dalton J.P., *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase cleaves fibrinogen and produces a novel type of fibrin clot, *Eur. J. Biochem.* 232 (1995) 241-246.
- [15] Dowd A.J., Tort J., Roche L., Ryan T., Dalton J.P., Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 88 (1997) 163-174.
- [16] Fetterer R.H., Rhoads M.L., The in vitro uptake and incorporation of hemoglobin by adult *Haemonchus contortus*, *Vet. Parasitol.* 69 (1997) 77-87.
- [17] Fishelson Z., Amiri P., Friend D.S., Marikovsky M., Petitt M., Newport G., McKerrow J.H., *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae, *Exp. Parasitol.* 75 (1992) 87-98.

- [18] Ghoneim H., Klinkert M.Q., Biochemical properties of purified cathepsin B from *Schistosoma mansoni*, *Int. J. Parasitol.* 25 (1995) 1515-1519.
- [19] Haffner A., Guilavogui A.Z., Tischendorf F.W., Brattig N.W., *Onchocerca volvulus*: microfilariae secrete elastolytic and matrix-degrading serine and metalloproteases, *Exp. Parasitol.* 90 (1998) 26-33.
- [20] Hayunga E.G., Summer M.P., Letonja T., Evidence for selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia taeniaeformis*, *J. Parasitol.* 75 (1989) 638-642.
- [21] Heussler V.T., Dobbelaere D.A.E., Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction, *Mol. Biochem. Parasitol.* 64 (1994) 11-23.
- [22] Kalinna B., McManus D.P., An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with Schistosome paramyosin, *Parasitology* 106 (1993) 289-296.
- [23] Karanu F.N., Rurangirwa F.D., McGuire T.C., Jasmer D.P., *Haemonchus contortus*: identification of proteases with diverse characteristics in adults worm excretory-secretory products, *Exp. Parasitol.* 77 (1993) 362-371.
- [24] Karanu F.N., Rurangirwa F.D., McGuire T.C., Jasmer D.P., *Haemonchus contortus*: inter- and intrageographic isolate heterogeneity of proteases in adult worm excretory-secretory products, *Exp. Parasitol.* 86 (1997) 89-91.
- [25] Khalil A.I., Burns A.R., White A.C. Jr., Demonstration of *Taenia crassiceps* cysteine proteinase activity in tegumentary lysosome-like vesicles, *J. Parasitol.* 84 (1998) 513-515.
- [26] Klager S.L., Hagen H.E., Bradley J.E., Effects of an *Onchocerca*-derived cysteine protease inhibitor on microfilariae in their simuliid vector, *Parasitology* 118 (1999) 305-310.
- [27] Knox D.P., Smith S.K., Smith W.D., Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus*, *Parasite Immunol.* 21 (1999) 201-210.
- [28] Longbottom D., Redmond D.L., Russell M., Liddell S., Smith W.D., Knox D.P., Molecular cloning and characterization of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 88 (1997) 63-72.
- [29] MacLennan K., Gallagher M.P., Knox D.P., Stage specific serine and metalloproteinase release by adult and larval *Trichostrongylus vitrinus*, *Int. J. Parasitol.* 27 (1997) 1031-1036.
- [30] McDonald J.K., An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification, *Histochem. J.* 17 (1985) 773-785.
- [31] Mc Kerrow J.H., Doenhoff M.J., Schistosome proteases, *Parasitol. Today* 4 (1988) 334-339.
- [32] McKerrow J.H., Pino-Heiss S., Lindquist R., Werb Z., Purification and characterization of an elastolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3703-3707.
- [33] McKerrow J.H., Jones P., Sage H., Pino-Heiss S., Proteinases from invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective tissue and basement-membrane macromolecules, *Biochem. J.* 231 (1985) 47-51.
- [34] Mc Kerrow J.H., Brindley P., Brown M., Gam A.A., Staunton C., Neva F.A., *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae, *Exp. Parasitol.* 70 (1990) 134-143.
- [35] Nakagawa T., Roth W., Wong P., Farr A., Deussing J., Villadangos J.A., Ploegh H., Peters C., Rudensky A.Y., Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus, *Science* 280 (1998) 450-453.
- [36] Nemeth I., Juhasz S., A trypsin and chymotrypsin inhibitor from the metacestodes of *Taenia pisiformis*, *Parasitology* 80 (1980) 433-446.
- [37] Nemeth I., Juhasz S., Properties of a trypsin and chymotrypsin inhibitor secreted by larval *Taenia pisiformis*, *Int. J. Parasitol.* 11 (1981) 137-144.
- [38] O'Neill S.M., Parkinson M., Strauss W., Angles R., Dalton J.P., Immunodiagnostic of *Fasciola hepatica* infection (fasciolosis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine protease, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58 (1998) 417-423.
- [39] Perkins P.S., Haley D., Rosenblatt R., Proteolytic enzymes in the blood-feeding parasitic copepod, *Phrixocephalus cincinatus*, *J. Parasitol.* 83 (1997) 6-12.
- [40] Piacenza L., Acosta D., Dowd A., McGonicle S., Dalton J., Carmona C., Proteinases secreted by *Fasciola hepatica*: time course of the inhibitory effect of serum from experimentally infected rabbits demonstrated by gelatin-substrate polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Helminthol.* 71 (1997) 333-338.
- [41] Pratt D., Cox G.N., Milhausen M.J., Boisvenue R.J., A developmentally regulated cysteine protease gene family in *Haemonchus contortus*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 43 (1990) 181-191.
- [42] Pratt D., Armes L.G., Hageman R., Reynolds V., Boisvenue R.J., Cox G.N., Cloning and sequence comparisons of four distinct cysteine proteases expressed by *Haemonchus contortus* adult worms, *Mol. Biochem. Parasitol.* 51 (1992) 209-218.
- [43] Redmond D.L., Knox D.P., Newlands G., Smith W.D., Molecular cloning and characterization of a developmentally regulated putative metallo-peptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 85 (1997) 77-87.
- [44] Rhoads M.L., Fetterer R.H., Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*, *J. Parasitol.* 81 (1995) 505-512.

- [45] Rhoads M.L., Fetterer R.H., Extracellular matrix degradation by *Haemonchus contortus*, J. Parasitol. 82 (1996) 376-383.
- [46] Russell D.G., Alexander J., Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes, J. Immunol. 140 (1988) 1274-1279.
- [47] Smith A.M., Dalton J.P., Clough K.A., Kilbane C.L., Harrop S.A., Hole N., Brindley P.J., Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin L proteinase activity, Mol. Biochem. Parasitol. 67 (1994) 11-19.
- [48] Smith W.D., Smith S.K., Murray J.M., Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*, Parasite Immunol. 16 (1994) 231-241.
- [49] Spithill T.W., Piedrafita D., Smooker P.M., Immunological approaches for the control of fasciolosis, Int. J. Parasitol. 27 (1997) 1221-1235.
- [50] Villa O.F., Kuhn R.E., Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena, Parasitology 112 (1996) 561-570.
- [51] Wasilewski M.M., Lim K.C., Phillips J., McKerrow J.H., Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo, Mol. Biochem. Parasitol. 81 (1996) 179-189.
- [52] Wes Leid R., Suquet C.M., Tanigoshi L., Parasite defense mechanisms for evasion of host attack; a review, Vet. Parasitol. 25 (1987) 147-162.
- [53] White A.C. Jr., Molinari J.L., Pillai A.V., Rege A.A., Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacystode proteases, J. Parasitol. 78 (1992) 281-287.
- [54] White A.C. Jr., Baig S., Robinson P., *Taenia saginata* oncosphere excretory/secretory peptidases, J. Parasitol. 82 (1996) 7-10.
- [55] White A.C. Jr., Baig S., Chapell C.L., Characterization of a cysteine proteinase from *Taenia crassiceps* cysts, Mol. Biochem. Parasitol. 85 (1997) 243-253.
- [56] Wilson L.R., Good R.T., Panaccio M., Wijffels G.L., Sandeman R.M., Spithill T.W., *Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke, Exp. Parasitol. 88 (1998) 85-94.
- [57] Wong J.Y., Harrop S.A., Day S.R., Brindley P.J., Schistosomes express two forms of cathepsin D, Biochim. Biophys. Acta 1338 (1997) 156-160.
- [58] Yamamoto M., Yamakami K., Hamajima F., Cloning of a cDNA encoding a neutral thiol protease from *Paragonimus westermani* metacercariae, Mol. Biochem. Parasitol. 64 (1994) 345-348.
- [59] Yamasaki H., Kominami E., Aoki T., Immunocytochemical localization of a cysteine protease in adult worms of the liver fluke *Fasciola* sp., Parasitol. Res. 78 (1992) 574-580.
- [60] Young C.J., Mc Keand J.B., Knox D.P., Proteinases released in vitro by the parasitic stages of *Teladorsagia circumcincta*, an ovine abomasal nematode, Parasitology 110 (1995) 465-471.