

PARASITOLOGIE

Activité protéolytique de l'extrait de vers adultes de l'*Onchocerca volvulus*.

G. Lando, G. Simo, G. Tatchum, J. Donfack, S. Djoha & C. Tume

Département de biochimie et de biologie moléculaire, Faculté de médecine et des sciences biomédicales, (FMBS), Université de Yaoundé I, Cameroun.

Manuscrit n°1947. "Parasitologie" . Reçu le 18 mars 1998. Accepté le 8 septembre 1998.

Summary: Proteolytic Activity of the Adult Worm Extracts of *Onchocerca volvulus*.

Studying proteolytic activity of *Onchocerca volvulus* (nematode causing "river blindness") shows that it is able to digest a variety of substrates such as: azoalbumine, azocoll and elastin-orcein with specific activity of 0.28, 0.57 and 1.48 mg/hour/mg of extract respectively. These enzymes are active at various pH such as pH 5.0, 8.0 and 10.0 with highest activity at pH 8.0. The effect of specific inhibitors and activators indicates that the extract might contain serine, metallo and thio-proteases.

The electrophoresis of the extract on a polyacrylamide gel copolymerised with gelatine shows many proteins with enzymatic activities with molecular weight of 16.6, 43.6, 45.7, 56.2, 60.2, 61.6 and 63.1 KD respectively.

The *Onchocerca volvulus* worm contains proteases of various enzymatic activities: a non specific activity on protein such as on azoalbumin and specific activities on collagen and elastin. These enzymes could play an important role in the survival of parasites in human hosts.

Résumé :

L'étude de l'activité protéolytique de l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus* (nématode responsable de la "cécité des rivières") a montré qu'il contient des enzymes capables de digérer une variété de substrats tels que l'azoalbumine, l'azocoll et l'élastine-orcéine avec des activités spécifiques respectivement de 0,28, 0,57 et 1,48 mg/heure/mg de l'extrait. Ces enzymes étaient actives à différents pH tels que pH 5,0, 8,0 et 10,0 avec une activité maximale au pH 8,0.

L'effet des activateurs et des inhibiteurs spécifiques nous a permis d'avancer que l'extrait renferme les sérines, métallo et thio-protéases. L'électrophorèse de l'extrait sur gel de polyacrylamide copolymérisé avec la gélatine a permis d'identifier plusieurs entités enzymatiques de poids moléculaire respectivement de 16,6, 43,6, 45,7, 56,2, 60,2, 61,6 et 63,1 KD.

Le ver, *Onchocerca volvulus*, renferme des protéases ayant des activités étendues : une activité non spécifique sur les protéines telles que l'azoalbumine et des activités spécifiques sur le collagène et l'élastine. Ces enzymes pourraient jouer un rôle important dans la survie du parasite chez l'hôte.

Key-words: *Onchocerca volvulus* - Protease - Enzyme - Activity - Substrate - Inhibitor

Mots-clés : *Onchocerca volvulus* - Protéase - Enzyme - Activité - Substrat - Inhibiteur

Introduction

L'onchocercose, encore appelée "cécité des rivières", est une maladie parasitaire chronique, causée par un nématode : *Onchocerca volvulus*. Ce parasite est transmis à l'homme (hôte définitif) par l'intermédiaire d'un arthropode femelle du genre *Simulium* lors d'une piqûre sur l'hôte où il injecte la larve infestante (L3). Cette larve pénètre dans le corps et migre dans les tissus en subissant une série de mues pour aboutir au stade de ver adulte. Pour le moment, le mécanisme par lequel ce parasite migre dans les tissus de l'hôte n'est pas encore bien connu. En plus du mécanisme physique, tel que l'effraction de la peau au moment de la piqûre, on pense aussi à l'intervention des protéases dans ce processus (3).

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Suivant la composition de leurs sites actifs, on les groupe en quatre classes : les sérines protéases, les aspartyls protéases, les métalloprotéases et les thioprotéases, chacune ayant une activité bien distincte (15). Ces enzymes ont été impliquées dans la pathogénèse des maladies parasitaires et catalyseraient des réactions telles que la

fibrinolyse, la digestion des immunoglobulines, la destruction des tissus (12) et interviendraient aussi dans la coagulation sanguine (15). Ces protéases se comporteraient alors comme de véritables pénétrants chimiques qui faciliteraient les mouvements du parasite dans les tissus de l'hôte (1). Tout récemment, LUSTIGMAN *et al.* (13) ont identifié une cystéine protéase qui serait impliquée dans le développement de la larve L3 à L4 et JOLODAR et MILLER (9) ont cloné une aspartyl protéase d'*Onchocerca volvulus*. Ces résultats très encourageants suscitent une recherche plus développée dans ce domaine encore peu exploré.

Etant donné le rôle que joueraient ces enzymes dans l'infection, son développement et sa pathologie, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité protéolytique de l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus*, afin de comprendre comment ce parasite vit et se déplace dans les tissus de l'hôte et de pouvoir identifier ces enzymes. Ces enzymes purifiées et caractérisées pourraient constituer une cible pour la chimiothérapie et/ou le développement d'un vaccin contre cette maladie.

Matériel et méthodes

Echantillons biologiques

Les vers adultes ont été obtenus après digestion enzymatique des nodules onchocerciens selon la méthode de SCHULZKEY *et al.* (18). Les vers ainsi obtenus ont été lavés avec le tampon PBS (0,1 M, pH 7.4) avant d'être utilisés dans l'extraction enzymatique.

Préparation de l'extrait.

Deux grammes de vers adultes ont été homogénéisés à froid (refroidis dans un bain de glace) dans 4 ml de tampon PBS (0,1M, pH 7.4) à l'aide d'un homogénéiseur de tissu (Heidolph, Germany). La préparation homogénéisée ainsi obtenue a été centrifugée à 4° C à 12 000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu a été aliquote en portions de 100 µl et conservé à -20° C jusqu'à l'emploi. La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de BRADFORD (2).

Activité enzymatique de l'extrait

Afin de bien comprendre le spectre d'action des enzymes de l'extrait, l'activité enzymatique de celui-ci a été testée sur trois substrats différents : azoalbumine, azocoll et élastine. Pour l'azoalbumine, l'activité enzymatique a été déterminée selon la méthode de PLANTNER (16) comme suit : dans une série de tubes contenant chacun 120 µl d'azoalbumine (0,8 mg/ml) dissous dans l'eau, on a ajouté 80 µl de tampon MOPSO (0,1M, pH 7,0), suivi de 50 µl de l'extrait de vers adultes (1,0mg/ml). Le tout a été bien mélangé et incubé à 37° C pendant 24 heures dans un bain-marie agité. Un témoin positif contenant de la pronase-E à la place de l'extrait de vers et un témoin négatif contenant le tampon au lieu de l'extrait ont été inclus dans l'expérience. Après 24 heures d'incubation, la réaction a été stoppée par l'addition de 40 µl d'acide trichloroacétique (TCA à 50 %), suivie d'une précipitation à 4° C pendant une heure et les tubes ont été centrifugés à 1500 rpm pendant 15 minutes. Deux microlitres du surnageant ont été prélevés et mélangés à 17 µl de NaOH (10N) contenu dans les puits de la plaque de microtitration. Les densités optiques de la réaction ont été déterminées sur spectrophotomètre à 450 nm.

La digestion de l'azoalbumine a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{activité enzymatique} = \frac{\text{absorbance en présence de l'extrait}}{\text{absorbance en présence de la pronase-E}} \times \text{concentration de l'azoalbumine}$$

L'activité collagénolytique a été déterminée en utilisant l'azocoll (5 mg/ml) dissous dans l'eau comme substrat et selon la méthode de WESLEY (20). La collagénase D (Boehringer, Germany) a été utilisée pour le témoin positif et un témoin négatif sans extrait a été préparé comme précédemment. La réaction a été faite dans le tampon PBS (0.1 M, pH 7,0). Les densités optiques ont été déterminées à 540 nm et l'activité enzymatique calculée comme décrit ci-dessus.

L'activité sur l'élastine a été déterminée en utilisant l'élastine-orcéine (5 mg/ml) comme substrat et selon la méthode de KNOX (10) dans le tampon PBS. Comme dans les cas précédents, l'élastase a été utilisée pour le témoin positif et un témoin négatif a été aussi préparé. Les densités optiques obtenues

après digestion du substrat ont été déterminées à 540 nm et l'activité enzymatique calculée comme précédemment.

Etude de l'influence du pH sur l'activité de l'extrait

Afin de déterminer l'influence du pH sur l'activité enzymatique de l'extrait de vers, nous avons préparé différents tampons dont le pH variait de 4,0 à 12,0.

Ainsi, les tampons suivants ont été utilisés :

- tampon citrate (0,1 M à pH 4,0 ; 5,0 ; 6,0)
- tampon phosphate (0,1 M à pH 7,0 ; 7,5 ; 8,0)
- tampon glycine NaOH à pH 8,5 et 9,0)
- tampon Tris-base (0,1 M à pH 11,0 et 12,0).

Pour chaque pH, le mélange contenant 250 µl d'azocoll (5mg/ml), 150 µl du tampon et 50 µl d'extrait de vers a été incubé à 37° C pendant 24 heures.

Après centrifugation à 1500 rpm pendant 15 minutes, 200 µl de surnageant de la solution de chaque tube ont été prélevés et placés dans les puits de la plaque de microtitration et les densités optiques ont été déterminées à 540 nm contre le témoin négatif contenant uniquement l'azocoll dans ce tampon. Les densités optiques obtenues pour ces différents pH ont été utilisées pour tracer une courbe d'activité de l'extrait en fonction du pH.

Effet des inhibiteurs enzymatiques et des sels minéraux sur l'activité de l'extrait

Différents inhibiteurs enzymatiques tels que EDTA, EGTA, DTT, PMSF, Iodoacétamide et des sels minéraux : CuCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, MgCl₂ ont été utilisés dans cette réaction. Dans chacun des cas, l'extrait et l'inhibiteur ont été préalablement mélangés dans un tube, suivi de l'addition du substrat azocoll (250 µl à 5 mg/ml) et de 150 ml de tampon phosphate pH 8,0. Un témoin positif contenant l'extrait et sans inhibiteur a été inclus dans chaque réaction. Les tubes ont été incubés à 37° C pendant 24 heures, puis centrifugés à 1500 rpm, le surnageant (200 µl) a été prélevé et les densités optiques déterminées à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition a été déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{D.O.}_{540\text{nm}} \text{ témoin positif} - \text{D.O.}_{540\text{nm}} \text{ expérience}}{\text{D.O.}_{540\text{nm}} \text{ témoin positif}} \times 100$$

Identification des protéases de l'extrait sur gel de polyacrylamide

Les protéases de l'extrait ont été identifiées sur gel de polyacrylamide (12 %) copolymérisé avec de la gélatine préchauffée, à raison de 250 µg/ml de gel. Après polymérisation du gel de séparation, un gel de concentration ne contenant pas de gélatine a été préparé et ajouté au-dessus du premier. Un mélange de 50 µl de l'extrait et 50 µl du tampon de l'échantillon a été préparé et placé dans chaque puits du gel. L'électrophorèse a été conduite à 10 mA pendant 2 heures. A la fin de l'électrophorèse, le gel a été lavé avec 200 ml de tampon phosphate pH 8,0, contenant 2,5 % de triton X-100 pendant 45 minutes pour enlever l'excès de SDS. Le gel a été ensuite incubé à 37° C pendant 24 heures dans le tampon phosphate pH 8,0 pour faciliter la digestion enzymatique suivi d'une coloration au bleu de Coomassie R-250 et décoloration. L'activité enzymatique a été marquée par l'apparition de bandes claires sur le gel.

Résultats

Activité enzymatique de l'extrait

L'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus* a montré une activité protéolytique importante sur différents substrats enzymatiques à savoir : azoalbumine (0,28 mg/heure/mg de l'extrait), azocoll (0,57 mg/heure/mg de l'extrait), élastine-orcéine (1,48 mg/heure/mg de l'extrait). Ces protéases non seulement peuvent digérer les protéines de façon non spécifiques, vu leur action sur l'azoalbumine, mais agissent aussi préférentiellement sur les protéines du tissu conjonctif (élastine et collagène).

Tableau I.

Activité enzymatique de l'extrait de vers d'*Onchocerca volvulus* sur les différents substrats.

Enzyme activity of *Onchocerca volvulus* worm extract on different substrates.

substrat	activité enzymatique (mg/heure/mg d'extrait)	
	expérience	témoin négatif
azoalbumine	0,28	0,08
azocoll	0,57	0,10
élastine	1,48	0,25

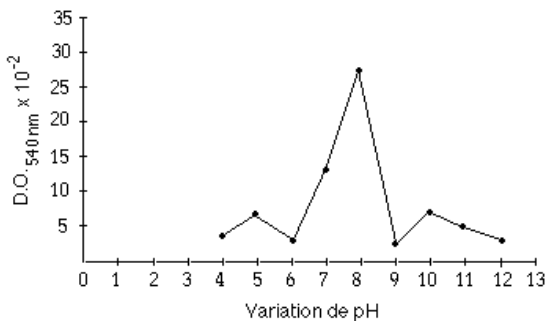
Détermination du pH optimum de l'activité de l'extrait

L'étude de l'activité protéolytique de l'extrait en fonction du pH nous a permis de constater qu'il est actif à trois différents pH (5,0 ; 8,0 et 10,0) avec un maximum d'activité au pH 8,0 (figure 1). Ceci indique que l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus* ne contiendrait pas une seule enzyme, mais différentes classes d'enzymes. Chacune de ces classes d'enzymes aurait un pH d'activité bien défini, ce qui permettrait aux vers de pouvoir s'adapter à tout environnement, qu'il soit acide ou basique.

Figure 1.

Effet du pH sur l'activité collagénolytique de l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus*.

Effect of pH on collagenotic activity of adult *Onchocerca volvulus* worms.



Effet des inhibiteurs et des sels minéraux

L'activité protéolytique de l'extrait a été inhibée par l'EGTA, l'EDTA et le PMSF à la concentration de 1 mM/ml de l'inhibiteur et l'inhibition a été plus importante à une concentration de 10 mM/ml de l'inhibiteur. Par contre, le DTT s'est révélé comme un activateur de cette activité enzymatique.

Tableau II.

Inhibition de l'activité enzymatique des inhibiteurs spécifiques et sels minéraux.

Inhibition of enzyme activity of specific inhibitors and mineral salts.

inhibiteurs	concentration	pourcentage d'inhibition (%)
EDTA	1 mM	36,72
PMSF	1 mM	28,81
EGTA	1 mM	24,29
CaCl ₂	1 mM	42,37
MgCl ₂	1 mM	19,77
ZnCl ₂	1 mM	17,51
Iodoacétamide	1 mM	12,99

Une importante inhibition a été aussi obtenue avec les sels suivants : ZnCl₂, CaCl₂ et MgCl₂. Le résultat est présenté dans le tableau II.

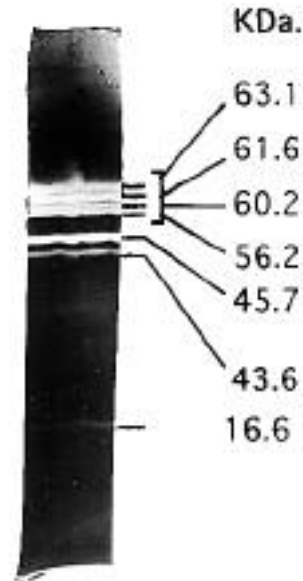
Identification des enzymes de l'extrait

L'électrophorèse de l'extrait sur gel de polyacrylamide copolymérisé avec de la gélatine a permis d'identifier sept bandes protéiques de poids moléculaires respectifs de 16,6 ; 43,6 ; 45,7 ; 56,2 ; 60,2 ; 61,6 ; 63,1 KD. Ce résultat est présenté sur la figure 2.

Figure 2.

Identification des enzymes de l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus*. Les nombres indiquent les différents poids moléculaires.

Identification of enzymes of adult *Onchocerca volvulus* worm extract.



Discussion

Nous avons démontré dans cette étude que l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus* renferme des enzymes douées d'une importante activité protéolytique. Les protéases étant des enzymes bien connues pour leur rôle dans la pathologie des maladies parasitaires (14, 15, 17), elles peuvent jouer diverses fonctions au cours de l'infection et pourraient intervenir :

- dans la pénétration du parasite dans le tissu de l'hôte (6, 8),
- la migration dans les tissus (4, 19),
- la survie et la nutrition du parasite (5, 19),
- enfin dans le développement de la pathologie de ces maladies (15).

La présence de ces enzymes dans l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus* n'a pas encore été bien établie. Nos résultats montrent la présence d'au moins sept protéases dans l'extrait de vers adultes d'*Onchocerca volvulus* ayant les poids moléculaires respectifs de 16,6 ; 43,6 ; 45,7 ; 56,2 ; 60,2 ; 61,6 et 63,1 KD. Ces enzymes ont été actives sur une gamme de substrats tels que : l'azoalbumine, l'azocoll et l'élastine-orcéine ; ceci démontre la capacité de ces enzymes à digérer les différents tissus de l'hôte. Elles digèrent le collagène et l'élastine, protéines du tissu conjonctif, ce qui justifierait l'hypothèse selon laquelle certaines de ces enzymes faciliteraient la migration du parasite dans les tissus de l'hôte (4, 19), ainsi que leur implication dans la pathologie de la maladie (15). Elles seraient

aussi impliquées dans le développement de la larve L3 à L4 (13). Ces enzymes agissent à différents pH dont les pics d'activité se situent aux pH 5,0 ; 8,0 et 10,0. Cela démontre le large spectre d'action de ces enzymes, pouvant permettre au parasite de s'adapter à n'importe quel environnement.

L'étude de l'influence des agents chimiques sur cette activité enzymatique a mis en évidence une activation en présence du DTT (dithiothréitol) qui est un agent réducteur, connu comme activateur des "thio-protéases". Un résultat similaire avait été rapporté sur l'activation de l'extrait des vers adultes de *S. mansoni* (11). Cette activité a été inhibée par l'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique), ce qui témoigne de la présence de "métallo-protéases", enzymes généralement actives au pH alcalin (8). L'existence de "sérines protéases", quant à elles, a été démontrée par l'inhibition en présence de PMSF (phényl méthyl sulfonyl fluoride). Les sels minéraux : CuCl₂, CaCl₂, ZnCl₂ et MgCl₂ ont fortement inhibé cette activité protéolytique. Il ressort que les vers d'*Onchocerca volvulus* renferment au moins 3 groupes de protéases. Ces différents groupes d'enzymes joueraient différents rôles dans la vie du parasite dans son hôte. Les métalloprotéases, non seulement facilitent l'invasion des tissus de l'hôte, mais ont été impliquées dans la pathologie des maladies parasitaires (8, 15). Les sérines protéases ont été elles aussi impliquées dans la facilitation de l'invasion des tissus par les larves des parasites, tel est le cas de la pénétration de cercaires de *S. mansoni*, et aussi dans la migration dans les tissus (6). Quant aux thio-protéases, elles seraient impliquées dans la nutrition du parasite et dans le développement de la pathologie de la maladie (19), ainsi que dans la maturation du parasite (13). En plus de ces différentes actions des protéases, il faut noter que ces enzymes ont été aussi impliquées dans la protection du parasite contre la réponse immunitaire de l'hôte dans la digestion des immunoglobulines.

Compte tenu de l'importance de ces enzymes dans la survie du parasite dans son hôte, il serait intéressant de les isoler et de les caractériser ; elles pourraient constituer une cible non seulement dans la chimiothérapie, mais aussi dans le développement d'un vaccin contre cette maladie.

Références bibliographiques

1. AURIAULT C, OUAISSI MA, TORPER G, ELSEH H & CAPRON A - Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *S. mansoni* Schistosomula. *Parasite Immunology*, 1981, **3**, 3334-3337.
2. BRADFORD MM - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**, 248-254.
3. CHANDLER J - Susceptibles and resistance to helminthic infections. *J Parasitology*, 1982, **28**, 135 - 152.
4. COHEN FE, GREGORET LM, AMIRI P, ALDAPEK R & MCKERROW J - Arresting tissue invasion of parasite by protease inhibitors chosen with the aid of computer modeling. *Biochemistry*, 1991, **30**, 11221-11229.
5. DOENHOFF MJ, CURTIS RH, REZAIZA J & MODHA J - Proteases in the Schistosome life : a paradigm for tumor metastasis. *Cancer Metastasis Review*, 1990, **9**, 381-392.
6. FISHELSON Z, AMIRI P, FRIEND DS, MARIKOVSKY M, PETIT M *et al.* - *Schistosoma mansoni*: all specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. *Exp Parasitol*, 1992, **75**, 87-98.
7. GAMBLE RH, PUCCELL PJ & FETTERER HR - Purification of a 44 Kilo-dalton protease which mediate the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. *Mol Biochem Parasitol*, 1989, **33**, 49-58.
8. HOTEZER P, HAGGERTY J, HAWDON J, MILSTONE L, GAMBLE HR *et al.* - Metalloproteases of infective *Ankylostoma* hookworm larvae and their possible function in tissue invasion and ecdysis. *Infection and Immunity*, 1990, **52**, 3882-3892.
9. JOLODAR A & MILLER JD - Preliminary characterisation of an *Onchocerca volvulus* Aspartic Protease. *Int J Parasit*, 1997, **27**, 1087-1090.
10. KNOX DP & MALCAN KW - Proteases released by the parasitic larvae stages of *Ascaris suum* and their inhibition. *Mol and Biochem Parasitol*, 1988, **28**, 207-216.
11. LINDQUIST NR - *Schistosoma mansoni*: Purification and characterisation of the major acidic protease from adult worm. *Exp Parasit*, 1986, **61**, 398-404.
12. LONSDALES-ECCLES JD & MBINPAZA WN - Thio-dependant protease in african trypanosomes. Analysis by electrophoresis in SDS-PAGE copolymerised with fibrinogen. *Eur J Biochem*, 1985, **155**, 469-476.
13. LUSTIGMAN S, MCKERROW H. J, SHAH K, LUI J, HUIMA T *et al.* - Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J Biol Chem*, 1996, **271**, 30181-30189.
14. MCKERROW JH - Parasite proteases. *Exp Parasit*, 1989, **68**, 11-115.
15. MCKERROW JH, BRADLEY P, BROWN M, GRAM AA, STAUNTON C & NEVA FA - *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. *Exp Parasit*, 1990, **70**, 134-143.
16. PLANTNER JJ - A micro assay for proteolytic activity. *Analytical biochemistry*, 1991, **195**, 129-131.
17. SAKANARY JA, STAUNTON CE, EAKIN AE, CRAIK CS & MCKERROW JH - Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc nat Acad Sciences (USA)*, 1989, **83**, 4863-4867.
18. SCHULZ-KEY M, ALBIEZ EJ & BUTTNER DW - Isolation of adult living *Onchocerca volvulus* from nodules. *Tropenmed Parasit*, 1977, **28**, 428-430.
19. SONG CY & DRESDEN MH - Partial purification and characterisation of cysteine proteinase from various developmental stages of *Paragonimus westermanii*. *Comparative Biochem*, 1990, **95**, 473-476.
20. WESLEY KT, MANGALA R & ALAN LS - Proteolytic cleavage of IgG and other protein substrates by *Dirofilaria immitis* microfilarial enzymes. *J Parasit*, 1987, **73**, 149-154.