

## APOPTOSE ET MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE, UN NOUVEAU PARADIGME DE LA RELATION HÔTE/PARASITE

S. PICOT

• Travail de l'EA 37-32 (S.P., Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Chef de service) Virulence et résistance des *Plasmodium*, Faculté de Médecine, Université Claude Bernard, Lyon, France

• Correspondance : S. PICOT, Service de Parasitologie, Mycologie Médicale et Maladies Tropicales, Faculté de Médecine, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon • Courriel : picot@sante.univ-lyon1.fr • Fax : 33 +478777229 •

*Med Trop* 2006 ; 66 : 111-117

**RÉSUMÉ** • L'apoptose et la mort cellulaire programmée sont parmi les plus passionnants des nouveaux concepts de la relation hôte-parasite. L'accumulation des résultats à ce propos pose la question de l'impact de la mort d'un parasite isolé sur la survie de la population parasitaire dans son ensemble. Le parasite induit-il la mort de la cellule de l'hôte comme une expression de sa virulence, ou inhibe-t-il cette mort comme un facteur de sa transmissibilité ? L'évidence que ses effets sont régulés par des mécanismes très spécifiques permet de supposer que la connaissance de la mort cellulaire programmée pourrait apporter de nouveaux moyens de lutte contre les parasitoses.

**MOTS-CLÉS** • Apoptose - Mort cellulaire programmée - Caspase - Parasite - Trypanosomatidés - Plasmodium - Médicaments.

### APOPTOSIS AND PROGRAMMED CELL DEATH. HOST PARASITE RELATIONSHIP NEW PARADIGM

**ABSTRACT** • Apoptosis and programmed cell death are amongst the most fascinating new concepts for understanding the host-parasite relationship. A growing body data is raising questions about the impact of the death of an individual parasite on the survival of the parasite population as a whole. Does the parasite induce the death of the host cell as an expression of virulence or does it inhibit that death as a factor for transmissibility? Current evidence that these effects are mediated through specific highly regulated mechanisms suggest that deciphering programmed cell death could provide new tools for control of parasitic diseases.

**KEY WORDS** • Apoptosis - Programmed cell death - Caspase - Parasite - Trypanosomatidae - Plasmodium - Drugs.

Initialement considérée comme la fin d'un processus biologique, l'apoptose offre de nouvelles clés de compréhension de la relation des parasites avec leur environnement.

### La mort programmée des cellules

La mort d'une fraction des cellules d'un organisme est une condition essentielle à sa croissance, son adaptation et sa survie. La forme la plus classique de cette mort, la nécrose, est la conséquence d'un accident, d'une agression ou d'une souffrance. Le suicide cellulaire par apoptose est une mort cellulaire programmée, adaptative et normale.

La mort cellulaire programmée, reconnue au XIX<sup>e</sup> siècle par Vogt puis Flemming sous le terme de « chromatolyse », a été décrite chez les insectes par Richard Lockshin dans les années 60 puis chez les mammifères en 1972 par John Kerr et Andrew Wyllie, introduisant le terme apoptose. En 2002, le prix Nobel de physiologie a été attribué à Bob Horvitz,

Sydney Brenner et John Sulston pour avoir identifié le contrôle génétique de la mort cellulaire programmée. Cette mort programmée fait partie intégrante de la biologie des cellules, qu'elles soient organisées au sein d'un tissu ou isolées chez un hôte.

La dérégulation ou l'inhibition de la mort cellulaire programmée interviennent de façon majeure dans la cancérisation des cellules. La résistance des cellules cancéreuses à certains médicaments est probablement causée en partie par une résistance à l'apoptose. Le processus de vieillissement, l'athérosclérose et d'autres manifestations normales ou pathologiques de la physiologie cellulaire ont un lien étroit avec la régulation de l'apoptose. Depuis un peu plus d'une décennie, des chercheurs se sont intéressés à la place que pourrait occuper l'apoptose dans la biologie des parasites et la physiopathologie des maladies parasitaires. Un champ d'exploration passionnant et complexe s'est ouvert, d'où pourront peut-être émerger de nouveaux concepts.

Lutter contre les maladies causées par

des microbes implique souvent de chercher à cultiver *in vitro* ces agents pathogènes, en utilisant parfois des systèmes complexes, comme c'est le cas pour certains parasites, et donc de s'intéresser aux mécanismes biologiques de leur survie. Comprendre comment ces organismes meurent pourrait peut-être raccourcir le chemin vers cet objectif. De nouveaux médicaments pourraient être destinés, non pas à bloquer des mécanismes essentiels pour la vie du parasite, mais plutôt à favoriser les conditions de son suicide.

### Qu'est ce que l'apoptose ?

La multitude des travaux consacrés depuis une dizaine d'années aux différentes formes d'apoptose permet de disposer aujourd'hui d'une vision complète des mécanismes biochimiques et moléculaires de la mort programmée des cellules. Pourtant, ce flux incessant de découvertes ne permet pas de donner une vision exhaustive des mécanismes mis en jeu lors de l'apoptose. Seuls quelques aspects

# Avancée en Avancée

seront évoqués ici, et tout d'abord les définitions les plus simples.

- La nécrose se manifeste par une augmentation de volume de la cellule avec rupture de la membrane et libération brutale de son contenu.

- L'apoptose est une forme de mort caractérisée par la condensation de la cellule et du noyau et la préservation de l'intégrité membranaire. L'apoptose se caractérise aussi par l'exposition à la surface de la membrane des phosphatidylsérines qui déclenche la phagocytose par d'autres cellules. Les modifications observées au cours de l'apoptose sont largement expliquées par l'activation des caspases, enzymes appartenant à la famille des protéases spécifiques des cystéine-aspartates.

- Le terme «mort cellulaire programmée» fait référence au fait que les étapes

de la mort peuvent être prévues à un stade où celle-ci peut être prévenue et que la cellule possède les gènes et les protéines responsables de cette mort (1).

Ces descriptions sont à distinguer de l'autophagie, qui est un processus normal de renouvellement des constituants cellulaires et qui est associé à un processus de mort de la cellule qui peut être altéré au cours du cancer (2).

Il est important de comprendre qu'il n'existe pas de barrières nettes entre ces différentes formes de mort cellulaire qui partagent des mécanismes et des facteurs déclenchants nombreux. Par exemple les lysosomes, directement impliqués dans l'autophagie, pourraient également déclencher l'apoptose par activation mitochondriale (3).

De nombreuses caractéristiques sépa-

rent la mort cellulaire programmée par apoptose de la nécrose, mais la conséquence physiopathologique la plus notable de la mort des cellules par apoptose est l'absence de réaction inflammatoire et donc le caractère «discret» de cette élimination. Comme rapporté par Jean-Claude Ameisen, l'un des premiers à avoir deviné l'intérêt de ce phénomène dans la compréhension de la physiologie cellulaire, l'origine grecque du terme apoptose désigne la chute des feuilles ou la fanaison des pétales de fleurs (4).

## Déroulement de l'apoptose

Le déclenchement de l'apoptose passe soit par la fixation d'un ligand à des récepteurs spécifiques à la membrane des cel-

Tableau I - Acronymes et principales fonctions des protéines de l'apoptose

Apaf-1	Apoptotic protease Activating factor-1	- Dans le cytoplasme. Son oligomérisation est induite par le cytochrome c - Active la procaspase 9 via l'interaction CARD-CARD - Recrute et clive la procaspase-3
Apoptosome		Cytochrome c + Apaf-1 + pro-caspase 9
Bcl2	B cell lymphoma	- Famille de plus de 20 membres - Anti-apoptotiques (contiennent au moins BH1 & BH2) Bcl2, Bcl-Xl, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl1), NR13, Boo (Diva) - Pro-apoptotiques (BH4) Bax, Bak, Bok (Mtd) Bnip3, Biml, Noxa - BH3 only : pro-apoptotiques Bid, Bad, Bim, Blk, Hrk
Bax		- Sa translocation de la mitochondrie libère le cytochrome c - Altération de l'ADN et apoptose induite par la privation en neurotrophine
Bid		- Sa translocation de la mitochondrie libère le cytochrome c - Apoptose médiée par Fas - Clivé par la caspase-8
Bad		- Sa translocation de la mitochondrie libère le cytochrome c - Apoptose induite par la privation en lymphokine
BIR	Baculovirus IAP repeat	- Séquence conservée de 70 aa répétés en tandem
BH	Bcl2 homology	- Caractérise les domaines de BH1 à BH4
CAD	Caspase-activated Dnase	- Responsable de la fragmentation de l'ADN
CARD	Caspase-recruitment domain	- Domaine permettant l'activation en cascade des zymogènes
CASPASE	Cysteine aspartate-specific proteinase	- Motifs QACXG - 3 domaines - Activation par formation d'un tetramère
DISC	Death-initiating signalling complex	- Activé par le couplage du ligand à un récepteur de mort
FADD	Fas-associated death domain	- Recrute la procaspase-8 et activation - Inhibition par c-FLIP (identique de pro-caspase-8 mais sans site protéinase actif)
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins	- Tous les IAP de mammifères ont 3 BIR, sauf la survivine - Domaines RING agissent par ligation de l'ubiquitin pour la dégradation de IAP
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase	
ICE	IL 1 beta converting enzyme (= caspase 1)	- Impliquée dans l'inflammation
IMM	Inner mitochondrial membrane	- Beaucoup de protéines apoptogènes sont localisées au niveau mitochondrial
Mitochondrial pathway		- Bcl2 family + mitochondrie + cytochrome c + Apaf-1 + caspase-9
OMM	Outer mitochondrial membrane	- VDAC et membres de la famille Bcl2
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspase / direct inhibitor of apoptosis-binding proteins with low pl	- Libéré de la mitochondrie avec le cytochrome c - Empêche l'inhibition des caspases par fixation aux IAPs
TRADD	TNF receptor-1-associated death domain	- Fixation au TNFR1 par interaction DD-DD - Recrutement et activation de la procaspase-8
VDAC	Voltage-dependant anion channel = porine	- Sur la membrane mitochondriale externe, transport bidirectionnel - Changement de conformation par Bid, Bim, Bak, Bax - Prévention de l'ouverture par Bcl2 anti-apoptotiques

# Avancée en Avancée

lules (par exemple la superfamille des TNF récepteurs), soit par d'autres agents stimulants externes ou internes généralement inducteurs de stress cellulaire et d'altération mitochondriale. L'état physiologique propre de la cellule peut intervenir dans le déclenchement de l'apoptose et le rôle de la mitochondrie est essentiel dans ce processus. Une fois l'apoptose initiée, une succession de réactions enzymatiques faisant intervenir une cascade de caspases, aboutit au niveau nucléaire à l'activation d'une endonucléase responsable de la dégradation oligonucléosomale de l'ADN. A chacune de ces étapes de très nombreux mécanismes de régulation interviennent pour limiter ou favoriser la poursuite de ce phénomène. Une liste non exhaustive des principaux acteurs intracellulaires de l'apoptose est donnée dans le tableau I.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par certains membres pro-apoptotiques de la famille des bcl-2 (Bax/bak) entraîne la libération de protéines, dont le cytochrome c, de l'espace inter-membranaire vers le cytosol. Le cytochrome c se lie alors avec d'autres protéines pour permettre le recrutement de la caspase 9 et pour former un complexe appelé l'apoptosome. Ce complexe activé présente une fonction enzymatique qui va permettre le clivage et l'activation d'autres enzymes, les caspases 3 et 7, à l'origine d'une cascade aboutissant au déclenchement de la fragmentation de l'ADN. Même s'il existe de nombreux mécanismes permettant de réguler l'action de ces enzymes, la perte du potentiel mitochondrial est presque toujours suivie de la mort de la cellule (5). Ce processus d'activation de la voie finale des caspases à partir de la mitochondrie dure environ dix minutes, mais le temps nécessaire entre le message de mort et l'apoptose finale de la cellule peut demander quelques heures. Dans tous les cas, il s'agit d'un processus rapide et fugace, difficile à mettre en évidence dans un tissu.

D'autres protéines de la famille bcl-2, dont le bcl-2 lui-même, sont des inhibiteurs de l'apoptose en bloquant la dépolarisation mitochondriale. Il existe donc une sorte de « thermostat » au niveau de la membrane de la mitochondrie qui régule très finement les processus moléculaires de l'apoptose. Une telle organisation existe à chacune des étapes critiques du processus : recrutement des caspases initiales après activation du récepteur, formation de l'apoptosome en présence des IAPs (protéines inhibitrices de l'apoptose), activation enzymatique des caspases effectrices, translocation nucléaire de l'endonucléase G... Un tel niveau de

contrôle d'un processus cellulaire est peu fréquent et en accord avec l'importance de la balance vie/mort.

Il a été souvent tenté de catégoriser l'apoptose ou la mort cellulaire programmée selon qu'elles font intervenir majoritairement tel ou tel mécanisme, mais il semble clair que les connexions existant entre les différentes voies impliquent de considérer la mort cellulaire programmée comme un phénomène complexe (6). Les distinctions entre voie intrinsèque ou extrinsèque, voie mitochondriale ou apoptose dépendante ou indépendante des caspases sont difficiles et ne reflètent pas toujours la complexité d'un phénomène régulé de façon très sophistiquée.

## A quoi sert l'apoptose ?

La mort cellulaire programmée est un moyen efficace d'éliminer les cellules qui ne sont plus nécessaires au cours d'un processus d'évolution de l'espèce ou de l'individu. Cette évolution peut être nécessaire au moment de l'embryogenèse afin de donner leurs formes aux futurs organes en éliminant les structures vestigiales (7). Ameisen utilise la métaphore de la sculpture pour montrer comment, en éliminant des fragments de matière, on arrive à une forme définitive. Au-delà de l'embryogenèse, la plupart des cellules de l'adulte subissent une apoptose au cours de leur évolution normale, avec une chronologie différente selon les besoins et les caractéristiques de l'organe. Ces mécanismes sont supposés permettre à l'organisme unicellulaire de contrôler ses propres fonctions de développement et de survie. Chaque cellule possède donc les armes qui vont lui permettre de s'autodétruire en cas de besoin. Au cours de la nécrose, phénomène accidentel, ces armes sont libérées dans le tissu environnant et entraînent une réaction inflammatoire et une cicatrisation, contrairement à l'apoptose qui reste invisible.

Le caractère programmé de cette mort ne doit pas laisser la place à une ambiguïté : la programmation n'est mise en application que si la cellule est placée dans un environnement qui « autorise » la poursuite du programme, et la sentence peut être levée par un changement de cet environnement. La mort cellulaire programmée n'est donc pas inéluctable. Pourtant, la connotation anthropomorphe du terme de suicide cellulaire donne à penser que la cellule « décide » de déclencher sa propre apoptose (4). Il s'agit en fait d'une réponse biologique à une situation complexe qui associe des messages provenant du milieu, à un moment au sens temporel,

spatial et physiologique, où les voies de régulation cellulaire « autorisent » la mise en œuvre d'une lourde machinerie génomique, enzymatique et biochimique.

## L'apoptose des parasites unicellulaires

La mort cellulaire programmée a été initialement comprise comme un phénomène de régulation au sein d'un organisme pluricellulaire, mais la démonstration de son existence chez les unicellulaires et en particulier les protozoaires a été faite au cours de la dernière décennie. De plus, on sait maintenant que les mécanismes d'autodestruction existaient probablement dans les cellules avant même les premiers organismes pluricellulaires. L'apoptose pourrait être apparue au cours de l'évolution en même temps que les processus de symbiose qui ont permis l'apparition des eucaryotes, donc bien avant l'apparition de la multicellularité. Le dogme de la restriction de l'apoptose aux organismes pluricellulaires doit donc maintenant être abandonné.

La notion de « contrôle social » de l'apoptose provient du fait que la mort de ces cellules est soumise à la production par d'autres cellules de signaux qui vont déclencher le phénomène. D'autres signaux sont aussi produits pour « dire » aux cellules de rester en vie. C'est l'équilibre entre ces signaux de vie et de mort qui détermine l'évolution de la cellule.

Les organismes unicellulaires, comme les cellules d'un tissu, évoluent chez un hôte comme des populations en interaction, communiquant entre elles, et réagissant de façon coordonnée à des modifications de leur environnement. Le *quorum sensing* a été bien décrit pour certaines bactéries et la complexité de la relation hôte-parasite est depuis longtemps la démonstration de cette interdépendance. Il est donc licite de considérer un groupe de parasites au sein d'un hôte comme un « organisme dispersé » (8). La question de l'existence et donc de l'utilité d'un mécanisme d'autorégulation d'une population chez les parasites peut donc être posée. Cette évolution peut intervenir aussi au cours du cycle parasitaire où les modifications morphologiques rapides et importantes ne peuvent être obtenues que par une sélection drastique de clones ayant cette capacité de différenciation. L'apoptose pourrait avoir un rôle à plusieurs étapes du cycle parasitaire en sélectionnant les clones de parasites aptes à passer d'un insecte vecteur vers un hôte

# Avancée en Avancée

mammifère ou en limitant la prolifération du parasite afin de favoriser la survie de l'hôte par l'établissement d'un équilibre hôte/parasite. L'évolution de cette relation par la modulation de la réponse immune est également une des manifestations indirectes de la mort cellulaire programmée des parasites.

## La mort programmée des trypanosomatidés

Les équipes travaillant sur *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma brucei* ont été parmi les premières à s'intéresser à l'apoptose des parasites unicellulaires. L'un des objectifs était de démontrer que la sélection des clones parasitaires capables de passer de l'insecte vecteur vers l'hôte mammifère implique qu'une partie de cette population se différencie en une forme capable de vivre dans un milieu complètement différent et que l'autre partie de la population, devenue inutile pour la survie de l'espèce disparaît rapidement. L'existence d'un cycle digénique serait donc rendue possible par cette sélection préalable des parasites les mieux adaptés ou les plus infectieux. Il est intéressant de rappeler que *Leishmania* et *Trypanosoma* sont parmi les plus anciens parasites à avoir divergé sur le plan phylogénétique, il y a 1,5 à 2 milliards d'années et donc la conservation d'un mécanisme d'apoptose proche de celui des eucaryotes supérieurs témoigne de l'importance de ce mécanisme pour la survie de l'espèce (9).

De manière similaire à l'inhibition de contact des cellules eucaryotes supérieures et au quorum sensing de certains procaryotes, les parasites semblent recevoir une information leur indiquant que le niveau d'infection maximum supporté par l'hôte est atteint et que la prolifération doit être limitée. Dans le cadre des trypanosomoses, cela conduit à une sortie du cycle cellulaire des trypanosomes et une phase de stagnation de l'infection. Cet arrêt du cycle de replication, sous la forme de trypanomastigotes, est irréversible et doit être suivie de la transmission au vecteur (10). L'espérance de vie de ces formes parasitaires est de 2 à 3 jours avant qu'elles ne présentent des signes comparables à ceux de l'apoptose. La finalité apparente de la persistance des mécanismes d'apoptose chez les trypanosomatidés serait donc de favoriser la poursuite du cycle digénique en permettant une infection chronique chez le mammifère et en réorientant les parasites excédentaires

vers des formes devant être transmises aux vecteurs.

Les manifestations de la mort cellulaire programmée ont été décrites également chez l'insecte vecteur pour *Leishmania* et *Trypanosoma*, où une régulation de la multiplication du parasite est probablement rendue nécessaire par la limitation des substrats comme la proline (10, 11). Il est en effet important que les formes infectieuses qui vont être transmises au mammifère bénéficient de l'ensemble des ressources disponibles chez l'insecte en particulier les acides aminés essentiels qui sont en quantité limitée.

Les mécanismes de déclenchement de la mort cellulaire programmée des trypanosomatidés sont nombreux : carence nutritionnelle, carence de signaux de vie, choc thermique, stress oxydatif et espèces réactives de l'oxygène, exposition aux médicaments ou au sérum humain (12).

Les principales caractéristiques de l'apoptose ont pu être décrites chez ces parasites, dont la dépolarisation du potentiel mitochondrial, la libération de cytochrome c dans le cytosol, l'exposition de phosphatidylsérines à la surface de la membrane, l'activation de cystéine protéinases et la fragmentation de l'ADN (13). Ces caractéristiques ont été observées chez les glossines pour *Trypanosoma brucei rhodensiense* ou à l'intérieur des macrophages pour *Leishmania donovani*. La fragmentation oligonucléosomale de l'ADN a été démontrée pour différentes espèces de *Leishmania* (*donovani*, *major*, *mexicana*) avec une intensité plus grande chez les promastigotes (12, 14). Il n'a pas encore été démontré que les protéines de la famille Bcl-2 ou des homologues de caspases existent chez *Trypanosoma*, mais au moins 5 métacaspases ont été décrites et leurs fonctions sont en cours d'exploration. Des substances inhibitrices des caspases bloquent une partie de la mortalité de *Leishmania*, suggérant l'existence d'une apoptose caspase-dépendante, mais avec des différences selon les espèces, traduisant probablement le caractère encore partiel des données dont nous disposons.

C'est donc en favorisant la survie du clone de parasites chez un hôte et au cours du cycle, plutôt que la survie de chaque parasite individuellement, que la régulation de la mort cellulaire programmée intervient. Ce « choix » implique une communication permanente entre chacune des cellules parasitaires, et la diffusion de signaux de vie vers certaines, et de mort vers d'autres. Il est enthousiasmant d'imaginer que la connaissance de ces signaux, que l'on peut espérer très spécifiques du parasite, puisse ouvrir, dans le champ des possibles, une nouvelle voie thérapeutique.

## La mort programmée de Plasmodium

L'idée de la possibilité d'un mécanisme d'apoptose est apparue dès 1995 à partir d'analogies observées entre la résistance aux médicaments de *Plasmodium* et des cellules cancéreuses (Picot, communication personnelle). Cela s'est traduit par la première démonstration de la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN des formes intra érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* en 1997 (15). L'hypothèse explorée par ce travail était que l'action de la chloroquine sur les formes érythrocytaires du parasite favorisait son apoptose et que cette capacité peut être altérée pour les clones de *Plasmodium* résistants. Depuis, nous avons mis en évidence successivement les différents aspects typiques de l'apoptose, c'est-à-dire l'exposition des phosphatidylsérines, la dépolarisation mitochondriale et la fragmentation nucléaire par la méthode Tunel. Même si chacune de ces caractéristiques ne suffit pas isolément, leur conjonction est un argument sérieux pour qualifier définitivement ce phénomène d'apoptose.

Le passage des formes sexuées de *Plasmodium* chez le moustique est une étape difficile pour le parasite, étape qui s'accompagne de modifications physiologiques (adaptation à un milieu et une température défavorables), morphologiques (transformation des gamétocytes en oocystes puis en sporozoïtes) et spatiales (passage du tube digestif du moustique vers les glandes salivaires). Ces étapes s'accompagnent d'une forte mortalité et la place de l'apoptose dans cette régulation a été étudiée chez *P. berghei* (16). Ces travaux ont démontré que plusieurs caractéristiques de l'apoptose pouvaient être retrouvées au stade ookinète et que cette apoptose pouvait être reliée à une activité de type caspasiq. De plus, l'utilisation de substances inhibitrices des caspases a entraîné une baisse de la mortalité des ookinètes, confirmant la place de cette activité enzymatique essentielle à la définition de l'apoptose (17). Ces résultats doivent encore être analysés avec précaution dans la mesure où la spécificité supposée de certains inhibiteurs de caspases est controversée.

De nombreux mécanismes effecteurs de l'apoptose mettent en jeu des cystéinase-aspartate protéinases, les caspases, qui participent à une cascade enzymatique complexe et finement régulée. Les gènes codant la plupart des caspases ont été décrits pour les eucaryotes supérieurs (Tableau II) mais leurs orthologues n'ont pas encore pu être mis en évidence dans le

# Avancée

Tableau II - Liste des caspases des mammifères et principales caractéristiques

Caspase	Particularité	Action	Prodomaines	Substrat
1	ICE	inflammation	CARD	WEHD
2	ICH-1	apoptose initiation	CARD	DEHD
3	CPP32	apoptose exécution		DEVD
4	ICEREL -II	inflammation	CARD	(W/L)EHD
5	ICEREL-III	inflammation	CARD	(W/L)EHD
6		apoptose exécution		VEHD
7	ICE-LAP3	apoptose exécution		DEVD
8	FLICE	apoptose initiation	DED	LETD
9	ICE-LAP6	apoptose initiation	CARD	LEHD
10		apoptose initiation	DED	LEXD
11	Souris		CARD	
12			CARD	
13		inflammation	CARD	WEHD
14	Souris			WEHD

génomique de *Plasmodium falciparum* ni d'aucun protozoaire. Cependant plusieurs études phylogénétiques ont démontré que, compte tenu de l'ancienneté de la divergence entre les protozoaires et les eucaryotes supérieurs, les séquences de type métacaspase ou paracaspase pourraient être impliquées dans la production d'enzymes ayant une activité comparable à celle des caspases (18). Un gène codant une métacaspase est décrit sur le chromosome 13 de *Plasmodium falciparum*, cependant il ne semble pas coder une protéine ayant une structure de zymogène et sa fonction réelle est inconnue. Notre équipe vient d'identifier au moins une séquence de métacaspase dans le génome de *Plasmodium falciparum* (Meslin *et Coll* en préparation). Nous avons retrouvé la présence de 2 sous-unités interagissant pour donner un complexe enzymatique. Il reste encore des incertitudes concernant le rôle exact de cette métacaspase dans l'apoptose de *Plasmodium*, mais sa présence et sa conservation dans un génome aussi plastique est probablement le signe de son implication dans un processus important de la biologie du parasite.

L'exploration *in silico* nous a également permis de mettre en évidence d'autres séquences codant des éléments essentiels dans le déclenchement et la régulation de l'apoptose (Meslin *et Coll* en préparation). Ces résultats, obtenus par l'utilisation de profils spécifiques créés à partir de séquences conservées dans de nombreuses espèces et de méthodes d'analyse moins restrictives, complètent les premières observations publiées indiquant l'absence de découverte des gènes codant des protéines intervenant dans la voie mitochondriale de l'apoptose (19).

La démonstration de la capacité d'apoptose des *Plasmodium* pour les

formes intra-érythrocytaires et pour les formes sexuées chez les moustiques permet de supposer que le mécanisme existe également pour les formes pré-érythrocytaires pour lesquelles le transit intra-hépatocytaire fait l'objet de nombreux travaux. Au-delà de la compréhension des mécanismes intimes de la régulation des populations de *Plasmodium* chez leur hôte, la démonstration de la possibilité de la mort cellulaire programmée du parasite permet d'ouvrir une voie de recherche vers de nouvelles drogues capables de stimuler spécifiquement le suicide de *Plasmodium*. Ces produits, que nous proposons d'appeler « médicaments inducteurs d'apoptose » ou « apoptos-inducing drugs », auront probablement l'avantage d'être spécifiques des eucaryotes inférieurs car les métacaspases n'existent pas chez l'homme, et efficaces sur les kinétoplastides et les protozoaires, dont plusieurs semblent posséder ces métacaspases. Ceci pourrait contredire l'adage de Jacques Monod, rapporté récemment par Ameisen, selon lequel « ce qui est vrai pour la bactérie est vrai pour l'éléphant » !

## La mort programmée d'autres parasites

Les caractéristiques de la mort cellulaire programmée ont été recherchées avec succès au cours de l'étude de nombreux parasites, qu'ils soient uni ou pluricellulaires, qu'ils possèdent une mitochondrie ou non, qu'ils soient pathogènes ou opportunistes. Il faut rappeler que c'est en étudiant un nématode, *Caenorhabditis elegans*, que les premières descriptions de la mort organisée et programmée des cellules ont été faites. C'est souvent la mort cellulaire programmée induite par le parasite

sur les cellules de l'hôte qui est décrite. Mais la place occupée par la mort cellulaire reprogrammée du parasite au cours de son cycle et le lien avec sa transmissibilité est un champ d'étude de plus en plus important.

## Induction médicamenteuse de la mort cellulaire programmée des parasites

Certains médicaments anticancéreux agissent en induisant l'apoptose des cellules cibles, souvent en inhibant des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, telle que les topo-isomérases. Il est connu depuis longtemps que ces produits anticancéreux peuvent avoir une action antiparasitaire efficace, même si leur utilisation chez l'homme est limitée pour des raisons évidentes. De plus, certains antiparasitaires ont été développés ou utilisés dans le traitement de certaines tumeurs, comme par exemple la difluorométhylornithine (DFMO) et le mélaropréd pour la trypanosomose africaine (20). Certains flavonoïdes, substances présentes dans une majorité de plantes, induisent l'apoptose de *Trypanosoma brucei* (21) et ont aussi démontré une activité antiplasmodiale *in vitro* (22). Parmi les antipaludiques, l'action de la chloroquine peut être également revue à l'aune de ses effets potentiels sur l'apoptose. En effet, la chloroquine agit sur le facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui est impliqué dans la régulation de l'expression des molécules anti-apoptotiques, en particulier celles de la famille des Bcl2. De plus, la chloroquine a été largement utilisée dans le traitement de maladies auto-immunes par son action sur l'apoptose de clones de lymphocytes T anormaux. Surtout, nous avons démontré qu'une relation existe entre la résistance à la chloroquine et la présence de fragmentation de l'ADN chez *Plasmodium falciparum* (15). S'il est évident que cela ne remet pas en cause les modes d'action déjà démontrés pour la chloroquine, cela conforte l'idée qu'il sera utile dans l'avenir de chercher des molécules capables d'induire spécifiquement l'apoptose du parasite.

## Mort cellulaire programmée des cellules de l'hôte déclenchée par les parasites

L'apoptose des cellules de l'hôte joue un rôle essentiel dans la maturation et la régulation de la réponse immunitaire. Elle intervient lorsque la réponse immunitaire a été efficace et qu'il faut arrêter ce pro-

# Avancée en Avancée

cessus. Les clones de cellules effectrices activées s'éliminent alors sans aggraver la réaction inflammatoire. L'un des mécanismes de cette régulation est appelé « Activation-Induced Cell Death » (AICD) et aboutit soit au « suicide » du lymphocyte, soit à la mort d'un lymphocyte proche (23). L'AICD est dépendant de l'activation de récepteurs membranaires comme le système Fas (CD95)/Fas ligand, retrouvé sur de nombreuses cellules.

Cette régulation immunitaire prend un sens particulier dans les sites privilégiés comme la chambre antérieure de l'œil. L'apoptose des lymphocytes en cas d'infection locale prévient le développement de la réaction inflammatoire aux conséquences désastreuses sur la rétine, mais aussi permet l'induction d'une tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes (24).

Au cours de cette réponse immune, l'apoptose est un moyen d'action efficace des lymphocytes T cytotoxiques qui utilisent notamment des molécules de type perforine et granzyme pour déclencher l'apoptose de leurs cellules cibles. L'apoptose des cellules hôtes au cours d'une infection par un microorganisme intra-cellulaire pourrait représenter une forme archaïque de réponse immunitaire. En détruisant les cellules hôtes d'un parasite intra-cellulaire obligatoire, l'apoptose limite ou inhibe la répllication et la dissémination de ce parasite. Dans certains cas les microorganismes se sont adaptés à la capacité d'apoptose des cellules hôtes et ont acquis des mécanismes permettant de manipuler cette mort cellulaire programmée à leur bénéfice. L'hypothèse a été pro-

posée d'une similitude entre l'acquisition de la résistance aux médicaments inducteurs d'apoptose tels que la chloroquine, et l'acquisition des mécanismes de résistance à l'apoptose des cellules hôtes. Ce mécanisme croisé de résistance à l'apoptose conférerait donc un avantage considérable au parasite en lui permettant de se multiplier et d'échapper aux traitements. Cette hypothèse demande à être plus complètement documentée.

Dans certains cas, la présence des protozoaires peut induire l'apoptose des cellules de la réponse immunitaire par la production de facteurs spécifiques, comme au cours du paludisme où on observe dans un modèle murin la destruction préférentielle des lymphocytes T (25). Dans d'autres circonstances, les parasites expriment une partie de leur pouvoir pathogène par l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Cela a été très clairement démontré au cours du neuropaludisme où la rupture de la barrière hémato-encéphalique est déclenchée par la séquestration des hématies parasitées, la surproduction locale de TNF- $\alpha$ , l'action du TGF- $\beta$  produit par les plaquettes, et les substances libérées dans le sérum au cours de la réaction inflammatoire (26, 27). C'est le cas aussi au cours de la trypanosomose africaine où la rupture de la barrière hémato-encéphalique est associée à la production de Fas Ligand soluble et d'anticorps anti-Fas, dont l'origine précise est méconnue (28).

*Toxoplasma gondii* échappe en partie aux cellules de la réponse immunitaire en favorisant l'apoptose des lymphocytes au

niveau des plaques de Peyer et après inoculation intra-oculaire. En revanche, *T. gondii* bloque l'apoptose des macrophages ou des cellules dendritiques parasitées afin de prolonger sa survie.

## Perspectives

Quels sont les facteurs qui régulent l'apoptose du parasite et l'apoptose des cellules de l'hôte induite par le parasite ? Existe-t-il un équilibre entre ces deux phénomènes ? Est-ce en faisant pencher la balance plutôt vers l'apoptose des cellules de l'hôte que s'exprime la pathogénicité du parasite, alors que dans l'autre sens, les défenses prennent le dessus et limitent l'infection ? Les réponses à ces questions sont encore très spéculatives mais l'idée que c'est un mécanisme de mort cellulaire programmée plutôt que de survie qui régit la physiopathologie de certaines maladies parasitaires pourrait correspondre à un déplacement du paradigme de la relation hôte/parasite.

Il a fallu du temps pour que les « Sciences de la Vie » s'intéressent à la mort cellulaire programmée en l'envisageant comme un élément de progression et de diversité des organismes. Que cette mort soit programmée, codée dans le patrimoine génétique et fasse donc partie de ce qui constitue, pour Jacob ou pour Monod la définition même du vivant, est un anachronisme singulier. Dans sa « Nostalgie Divine », Goethe lançait déjà ce mot d'ordre : « Meurs et deviens ! » ■

## RÉFÉRENCES

- 1 - LOCKSHIN RA, ZAKERI Z - Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 ; **36** : 2405-19.
- 2 - KROEMER G, JAATTELA M - Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005 ; **5** : 886-97.
- 3 - BOYA P, GONZALEZ-POLO RA, PONCET D *et Coll* - Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene* 2003 ; **22** : 3927-36.
- 4 - AMEISEN JC - Apologie du suicide cellulaire. *La Recherche* 2001 ; **338** : 105-9.
- 5 - GREEN DR - Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005 ; **121** : 671-4.
- 6 - KROEMER G, MARTIN SJ - Caspase-independent cell death. *Nat Med* 2005 ; **11** : 725-30.
- 7 - AMEISEN JC - Looking for death at the core of life in the light of evolution. *Cell Death Differ* 2004 ; **11** : 4-10.
- 8 - AMEISEN JC - La mort et la sculpture du vivant. In «LENOIR F, DE TONNAC JP - La mort et l'immortalité». Bayard éd, 2004, Paris, France.
- 9 - NGUEWA PA, FUERTES MA, VALLADARES B *et Coll* - Programmed cell death in trypanosomatids : a way to maximize their biological fitness ? *Trends Parasitol* 2004 ; **20** : 375-80.
- 10 - TYLER KM - Maintenance of parasitaemia - Is it to die for ? *Kinetoplastid Biol Dis* 2003 ; **2** : 2.
- 11 - BARCINSKI MA, DOSREIS GA - Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Braz J Med Biol Res* 1999 ; **32** : 395-401.
- 12 - ZANGGER H, MOTTRAM JC, FASEL N - Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 2002 ; **9** : 1126-39.
- 13 - DEBRABANT A, LEE N, BERTHOLET S *et Coll* - Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol* 2003 ; **33** : 257-67.
- 14 - LEE N, BERTHOLET S, DEBRABANT A *et Coll* - Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite Leishmania. *Cell Death Differ* 2002 ; **9** : 53-64.

# Avancée en Avancée

- 15 - PICOT S, BURNOD J, BRACCHI V *et Coll* - Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997 ; **91** : 590-1.
- 16 - AL-OLAYAN EM, WILLIAMS GT, HURD H - Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int J Parasitol* 2002 ; **32** : 1133-43. Erratum in: *Int J Parasitol* 2003 ; **33** : 105.
- 17 - HURD H, CARTER V - The role of programmed cell death in Plasmodium-mosquito interactions. *Int J Parasitol* 2004 ; **34** : 1459-72.
- 18 - UREN AG, O'ROURKE K, ARAVIND LA *et Coll* - Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 2000 ; **6** : 961-7.
- 19 - DEPONTE M, BECKER K - *Plasmodium falciparum* - do killers commit suicide? *Trends Parasitol* 2004 ; **20** : 165-9.
- 20 - BARRETT SV, BARRETT MP - Anti-sleeping sickness drugs and cancer chemotherapy. *Parasitol Today* 2000 ; **16** : 7-9.
- 21 - MAMANI-MATSUDA M, RAMBERT J, MALVY D *et Coll* - Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrob agents chemother* 2004 ; **68** : 924-9.
- 22 - DE MONBRISON F, MAITREJEAN M, LATOUR C *et Coll* - *In vitro* antimalarial activity of flavonoid derivatives dehydrosilybin and 8-(1;1)-DMA-kaempferide. *Acta Trop* 2006 ; **97** : 102-7.
- 23 - DOSREIS GA, BARCINSKI MA - Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. *Adv Parasitol* 2001 ; **49** : 133-61.
- 24 - GRIFFITH TS, YU X, HERNDON JM, GREEN DR, FERGUSON TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 1996 ; **5** : 7-16.
- 25 - PIED S, VOEGTLE D, MARUSSIG M *et Coll* - Evidence for superantigenic activity during murine malaria infection. *Int Immunol* 1997 ; **9** : 17-25.
- 26 - PINO P, VOULDOUKIS I, KOLB JP *et Coll* - *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis* 2003 ; **187** : 1283-90.
- 27 - WASSMER SC, de SOUZA JB, FRERE C *et Coll* - TGF- $\beta$ 1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J Immunol* 2006 ; **176** : 1180-4.
- 28 - GIRARD M, BISSER S, COURTILOUX B *et Coll* - *In vitro* induction of microglial and endothelial cell apoptosis by cerebrospinal fluids from patients with human African trypanosomiasis. *Int J Parasitol* 2003 ; **33** : 713-20.

## En ligne, les anciens numéros de Médecine Tropicale

Les anciens numéros de *Médecine Tropicale* (2000 à 2004) sont accessibles en texte intégral sur le site [actu-pharo.com](http://actu-pharo.com)

[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com) • [www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com) • [www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)

[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)



[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)  
[www.actu-pharo.com](http://www.actu-pharo.com)