

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 54

1979

N° 1

© Masson, Paris, 1979.

Annales de Parasitologie (Paris)
1979, t. 54, n° 1, pp. 1-10.

MÉMOIRES ORIGINAUX

Plasmodium chabaudi : Modification des acides sialiques de surface des hématies au cours de l'infestation

par F. FABIA *, L. GATTEGNO *, J.-J. ROUSSET ** et P. CORNILLOT ***

* Laboratoire de Biochimie, ** Laboratoire de Parasitologie, *** Laboratoire de Biochimie,
Faculté de Médecine, F 93000 Bobigny.

Résumé.

Les acides sialiques de surface des hématies de souris infestées par le parasite *Plasmodium chabaudi* sont augmentés comparativement à ceux d'hématies de souris non infestées. Cette augmentation coïncide avec celle des réticulocytes circulants. Une augmentation similaire des acides sialiques de surface est montrée par l'étude des réticulocytes induits par phénylhydrazine. De la même façon, les oses neutres et le fucose sont trouvés en quantité plus importante dans les glycopeptides trypsiques de surface des réticulocytes que dans les glycopeptides trypsiques de surface des hématies. Cette augmentation se retrouve dans les hématies de souris infestées par *Plasmodium chabaudi*, parallèlement à la valeur de la réticulocytémie. Ceci suggère la contribution significative des réticulocytes aux variations biochimiques observées des hématies infestées au cours de la malaria.

Summary.

Plasmodium chabaudi : Changes in the surface sialic acids of red blood cells during infection.

Surface sialic acids of mice red blood cells infected with the malarial parasite *Plasmodium chabaudi* are increased as compared to extracts of red cells from normal mice. This increase occurs coincidentally when reticulocytes increase in the peripheral blood. The same increase of surface sialic acids is shown by studies of reticulocytes from phenylhydrazine treated mice.

Abréviation : P.H.H. - phénylhydrazine hydrochloride.

Accepté le 7 décembre 1978.

Annales de Parasitologie humaine et comparée (Paris), t. 54, n° 1.

1

Similarly, neutral hexoses, fucose, were found in greater quantities in surface glycopeptides obtained after incubation with trypsin of reticulocytes from phenylhydrazine treated mice than in surface glycopeptides of red cells from normal mice. This increase occurs also in *Plasmodium chabaudi* infected red cells with the development of reticulocytosis, in the same way. These facts suggest the contribution of reticulocytes to the biochemical changes observed during malaria infection.

Introduction

Des travaux antérieurs suggèrent que le paludisme induit des modifications de la composition et des propriétés des membranes d'hématies. La fragilité osmotique est accrue Fogel (1966), le transport du sodium, potassium (Dunn 1969) et des acides aminés (Mc Cormick 1970) est modifié et une augmentation prononcée du contenu lipidique a été rapportée (Lawrence 1969). Ces altérations ont été retrouvées dans la plupart des cas à la fois dans les hématies parasitées et dans les hématies non parasitées des animaux infestés.

Weidekamm et al. (1973) ont rapporté des modifications significatives des peptides de membrane d'hématies infestées et les ont rapprochées des altérations de surface cellulaire observées. Ceci pourrait refléter un effet protecteur contre la pénétration ou la croissance du parasite.

Depuis peu on pense que les acides sialiques de surface sont impliqués dans l'organisation structurale et les fonctions de l'enveloppe cellulaire : reconnaissance cellule-cellule et cellule-substrat, adhésion spécifique (Weiss 1969, Winzler 1970, Whaley 1972) ; toute modification de leur taux peut influencer sur les caractéristiques de l'hématie. Il était intéressant de rechercher si les modifications membranaires érythrocytaires déjà citées, étaient associées à des altérations des glucides de surface. Les résidus d'acide sialique terminaux de ces glucides, libérables par la neuraminidase, représentent un paramètre aisément dosable, première évaluation de leur possible modification.

Toutefois, le paludisme détermine une hyperréticulocytose connue, or la taille, la densité, la mobilité électrophorétique et la fragilité osmotique des réticulocytes sont notoirement différentes de celles des hématies matures. De plus, certains constituants chimiques sont présents à concentration plus élevée tels enzymes, lipides ou glucides totaux (Shattil et Cooper 1972, Chigurupati 1976). Il est donc indispensable de tenir compte de leur contribution éventuelle à des variations des taux d'acide sialique dans les infections palustres ; pour détecter plus facilement les modifications liées à l'hyperréticulocytémie et celles dues à la présence des plasmodiums nous avons utilisé *Plasmodium chabaudi* qui contrairement à *Plasmodium berghei* ne parasite pas les réticulocytes (Ott 1968).

Ont donc été dosés les acides sialiques de surface libérés par la neuraminidase des hématies de souris infestées par *Plasmodium chabaudi*. En comparant ces résultats avec ceux obtenus dans les mêmes conditions expérimentales chez des souris où l'hyperréticulocytémie est provoquée par la phénylhydrazine, a pu être mise en

évidence la part de la réticulocytose dans les modifications observées. Ce travail a été complété par une étude comparative des oses des glycopeptides de surface obtenus par protéolyse trypsinique d'hématies de souris non infestées, d'hématies de souris infestées et de réticulocytes de souris soumises à la phénylhydrazine.

Matériels et méthodes

Les animaux d'expérience sont des souris blanches mâles de souche Swiss pesant environ 40 grammes. Ils sont groupés en trois lots :

- a) normal : souris non infestées,
- b) souris infestées par *Plasmodium chabaudi*,
- c) souris traitées par la phénylhydrazine.

La souche de *Plasmodium chabaudi* (864 V.D.) a été aimablement transmise par le Docteur I. Landau du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Elle a été entretenue dans notre laboratoire par inoculation directe de sang de souris infestée à souris saine. L'inoculation expérimentale était effectuée à partir d'un seul animal au moment de l'acmé de la parasitémie.

L'évolution de l'infection était suivie en établissant sur mille hématies le pourcentage d'érythrocytes infestés après coloration d'un frottis selon la méthode de May Grünwald-Giemsa. De façon à obtenir des souris non infestées mais présentant une réticulocytémie semblable à celle des animaux infestés au moment de l'expérimentation, des souris normales furent traitées par l'hydrochlorure de phénylhydrazine (P.H.H.) en solution aqueuse à 1 %, administrée en S.C., 4 jours consécutifs à la dose de 0,03 mg/g/pds. Le pourcentage de réticulocytes par rapport au nombre total d'hématies est établi par comptage après coloration au bleu de crésyl brillant.

Préparation des hématies.

Le sang hépariné de dix souris du premier groupe (groupe témoin normal) est centrifugé à 2 000 g, dix minutes. Plasma et couche leucocytaire sont aspirés et rejetés. Le culot d'hématies est mis en suspension dans NaCl, 0,15 M et lavé trois fois dans ce même tampon, puis deux fois dans un phosphate isotonique (pH 7,4).

Dans le groupe infesté par *Plasmodium chabaudi* et dans celui traité à la phénylhydrazine, les sangs héparinés sont centrifugés à 2 000 g trente minutes. Il est impossible de séparer complètement les hématies parasitées des hématies normales et des réticulocytes ; toutefois les hématies parasitées et les réticulocytes de densité plus faible, constituent les couches supérieures des culots globulaires après centrifugation donnant ainsi des fractions enrichies en hématies parasitées ou en réticulocytes (Fogel 1966, Dunn 1966). Ces couches supérieures sont donc mélangées, lavées comme ci-dessus et regroupées pour déterminations. Une aliquote est prélevée pour les études microscopiques.

Desialidation enzymatique.

Un ml de culot d'hématies est mis en suspension en tampon phosphate isotonique (v/v, pH 7,40). Après addition de 30 unités de neuraminidase de Vibron cholérique (Behringwerke RFA) les cellules sont incubées 90 minutes à 37 °C avec une légère agitation puis immédiatement centrifugées.

Les surnageants sont utilisés pour les dosages : d'acide sialique libre, sans hydrolyse acide préalable selon la technique de Warren (1959), de sucres neutres par la réaction acide sulfurique-orcinol (Winzler 1955) et des acides aminés totaux par la ninhydrine. Pour éliminer l'interférence de l'hémoglobine le surnageant était préalablement déféqué par l'acide trichloracétique aqueux à 12 %, extrait par le diéthyl-éther (Cook 1960). Les valeurs d'acide sialique sont exprimées en μg pour 10^{10} hématies.

Teneur en oses des glycopeptides de surface des hématies.

Les hématies obtenues selon la technique décrite ci-dessus sont lavées cinq fois en NaCl isotonique et incubées 3 h à 37 °C avec la trypsine (EC 3.2.1.4. Sigma Chemical Company, Saint-Louis MO 631.78) à raison de 0,1 mg par ml de culot dans deux volumes de tampon isotonique Na_3PO_4 .

Les contrôles sont effectués avec des hématies incubées en solution tampon soit sans enzyme protéolytique soit avec des enzymes inactivés par la chaleur (1 h à 80 °C). Les surnageants de chaque expérience sont déprotéinisés par l'acide trichloracétique aqueux à 12 % (v/v) extrait au diéthyléther puis étudiés pour leur contenu en hexoses neutres par l'orcinol-acide sulfurique, en fucose selon la technique de Dische et Shettles et en acide sialique lié selon celle de Warren après hydrolyse par H_2SO_4 à 0,05 M pendant 1 h à 80 °C. Les résultats sont exprimés en μg d'oses pour 10^{10} hématies.

Préparation des membranes érythrocytaires.

Les hématies, lavées trois fois avec la solution tampon phosphate isotonique (pH 7,40) sont hémolysées par du Cl_2Ca hypotonique 25 mM. Les membranes roses obtenues après centrifugation de 15 minutes à 3 000 g deviennent blanches après plusieurs lavages dans des solutions tampons de phosphate mM et sont utilisées après hydrolyse acide préalable par H_2SO_4 à 0,05 M pendant 1 h à 80 °C pour le dosage de l'acide sialique (la teneur en protéines était déterminée par la méthode de Lowry et coll.).

Les taux d'acide sialique sont exprimés en μg par mg de membranes.

Résultats

Dans le *tableau I* sont présentés les résultats des déterminations effectuées sur les érythrocytes et réticulocytes de souris normales, infectées et traitées au P.H.H.

Le sang normal est le plus riche en hématies et le plus pauvre en réticulocytes par ml de culot comparé au sang des souris infectées et de celles traitées au P.H.H.

Tableau I. Nombre d'érythrocytes et de réticulocytes dans le sang de souris normales, infestées par le *Plasmodium chabaudi*, ou traitées par la phénylhydrazine.

Groupes d'animaux	Nombre d'observations	Cellules rouges totales (par ml de volume)	Réticulocytes (% des cellules rouges totales)
Normaux	20	1.53×10^{10}	1
<i>Plasmodium chabaudi</i> infestés en acmé	15	0.60×10^{10}	70
Traités par la phénylhydrazine	15	0.86×10^{10}	60

La figure 1 montre l'évolution de la parasitémie et de la réticulocytémie. Après une forte et rapide ascension la parasitémie atteint son maximum vers le 7^e ou le

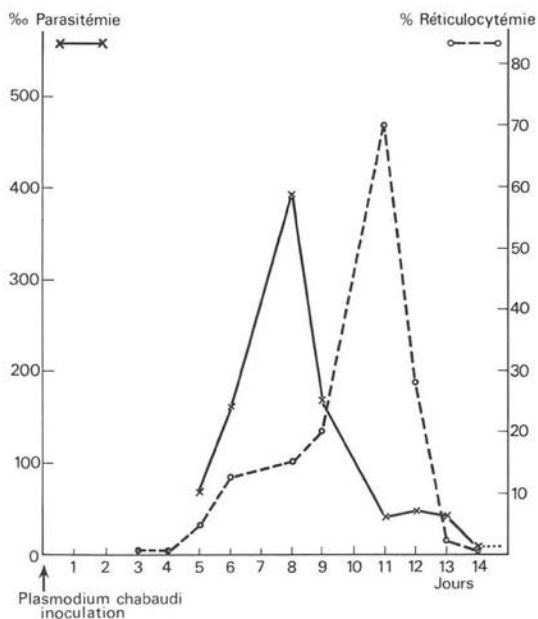


Fig. 1. — Parasitémie et réticulocytémie au cours de l'infestation par *Plasmodium chabaudi*.

8^e jour puis décroît au moment où la réticulocytémie est élevée. La réticulocytémie présente une ascension également rapide mais postérieure à celle de la parasitémie et, au 11^e jour après l'inoculation, près de 70 % des hématies polychromatophiles sont des réticulocytes et les autres hématies des cellules de transition c'est-à-dire des érythrocytes immatures.

Les acides sialiques sont les seuls composants de la membrane des hématies libérés par l'action de la neuraminidase du *Vibrio cholérique* : la réaction orcinol-acide sulfurique montre que les surnageants ne renferment pas d'autres sucres et aucune différence significative ne peut être trouvée entre le taux d'acides aminés du surnageant des hématies traitées à la neuraminidase et de celui des hématies incubées dans un milieu sans neuraminidase. Pour déterminer quelle fraction des acides sialiques totaux cellulaires est sensible à l'enzyme, des dosages sont effectués sur les membranes obtenues après traitement des hématies à la neuraminidase et comparés à ceux des membranes d'hématies intactes. 65 % \pm 5 de l'acide sialique total est libéré. L'enzyme ne pénétrant pas dans les cellules vivantes (Rosenberg et Einstein 1972) ces acides sialiques sensibles à la neuraminidase sont présumés être disposés à l'extérieur de la membrane cellulaire.

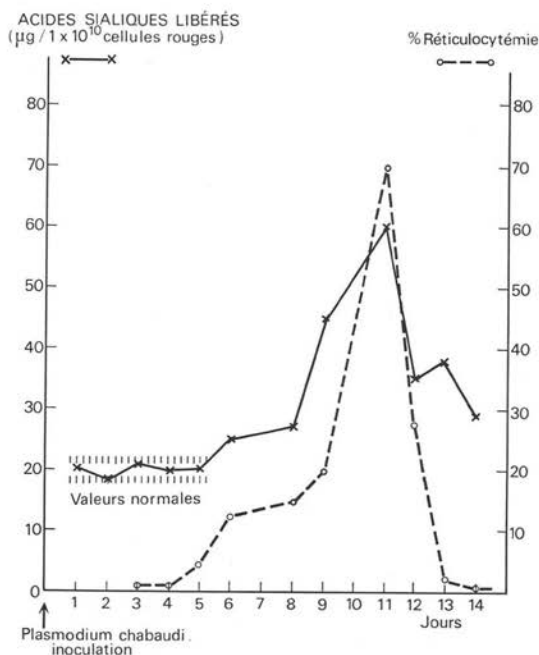


Fig. 2. — Réticulocytémie et taux des acides sialiques de surface libérés par la neuraminidase de 1×10^{10} hématies au cours de l'infestation par *Plasmodium chabaudi*. Chaque point étant la moyenne de trois expériences.

La *figure 2* montre les taux d'acides sialiques libérés de 1×10^{10} érythrocytes traités par la neuraminidase : au cours de l'infection les taux d'acides sialiques de surface libérés sont significativement plus élevés à partir des hématies infectées qu'à partir des hématies des souris normales ($n = 20$, $p < 0,001$).

Une augmentation significative des acides sialiques de surface est également observée à partir des fractions riches en réticulocytes chez les souris traitées à la phénylhydrazine.

Il est possible d'obtenir 10, 20, 30, 40, 50, 60 % de réticulocytes et une relation linéaire est vérifiée entre les taux d'acides sialiques de surface et le pourcentage de réticulocytes ($r = 0,76$, $p < 0,001$ (*fig. 3*)).

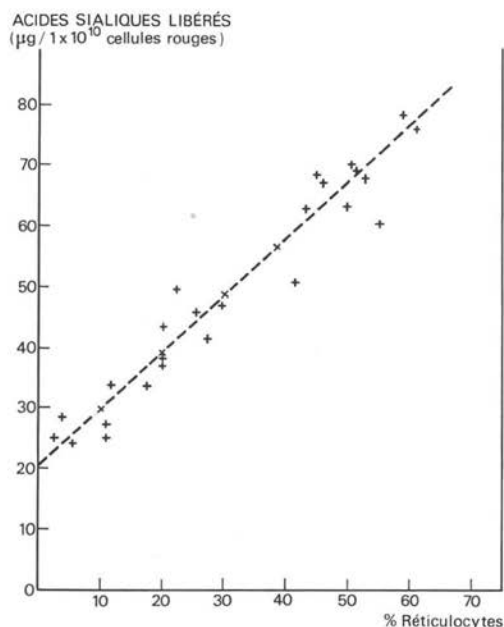


Fig. 3. — Relation linéaire entre la réticulocytémie et le taux d'acides sialiques libérés par la neuraminidase de 1×10^{10} cellules (hématies et réticulocytes).

Les hexoses neutres, le fucose, les acides sialiques des glycopeptides libérés à partir des réticulocytes ou des hématies infectées accompagnées de réticulocytémies comparables sont également augmentés significativement par rapport à ce que l'on observe à partir des érythrocytes intacts normaux (*tableau II*).

Tableau II. Contenu en carbohydrates des glycopeptides de surface libérés par la trypsine à partir d'hématies normales, d'hématies infestées et de réticulocytes.

	Acide sialique	Oses neutres	Fucose
Nombre d'expériences couplées	5	4	3
Erythrocytes normaux *	19,29 ± 2,90	67,13 ± 13,22	6,92 ± 1,85
Erythrocytes infestés* (avec 70 % de réticulocytes)	50,37 ± 10	134,5 ± 21	16,25 ± 5,22
Réticulocytes* (68 %) ..	46,08 ± 6,53	126,84 ± 20,12	15,56 ± 5,11
P des différences observées entre les hématies normales et infestées ou les réticulocytes	0,01 < p < 0,001	0,001	0,01

* Les résultats sont exprimés en ug de carbohydrate par 1×10^{10} cellules.

Discussion

Les résultats présentés soulignent l'anémie des souris infectées et l'hypermétilocytémie compensatoire ; quand le nombre des réticulocytes est élevé la parasitémie décroît ceci lié au fait que *Plasmodium chabaudi* n'envahit pas les réticulocytes (Ott 1968). Au sixième jour un seul réticulocyte pour 1 500 hématies est trouvé infesté.

Les acides sialiques de surface libérés par la neuraminidase augmentent significativement durant l'infection malarique. Ceci pourrait s'expliquer par une action directe du parasite sur ses cellules hôtes soit en induisant une captation des acides sialiques plasmatiques soit en réorientant les motifs glucidiques à la surface cellulaire exposant ainsi de nouveaux résidus à l'action de l'enzyme. Cependant le taux d'augmentation n'apparaît pas évoluer parallèlement à la parasitémie, au contraire les chiffres observés sont faiblement augmentés quand la parasitémie est notable et élevée (2 à 3 fois plus), quand les animaux n'ont plus de parasitémie évidente. Il est donc improbable que l'infestation des hématies soit le facteur responsable de l'augmentation des acides sialiques ici observée ; ce facteur doit être en relation avec la nature de la cellule.

La réticulocytose liée à l'infection doit être étudiée. Pour ce faire une hypermétilocytémie est induite dans un groupe souris témoin par traitement à la phénylhydrazine : des taux croissants de réticulocytes de 10 à 60 % des hématies totales sont obtenus et leurs acides sialiques dosés : une relation linéaire est observée entre le pourcentage de réticulocytémie et les taux des acides sialiques libérés (fig. 3), pour, approximativement, le même degré de réticulocytémie que celui observé en cours

d'infection, des chiffres comparables sont obtenus. La comparaison entre les hématies normales et les hématies infestées par *Plasmodium chabaudi* révèle la même augmentation en hexoses neutres, fucose et acide sialique des glycopeptides de surface que celle observée chez les réticulocytes. Toutefois on doit noter que des modifications minimales dans les proportions relatives des glycoprotéines ne sont pas détectées par analyse des oses totaux. En outre beaucoup de glycoprotéines de membrane des érythrocytes humains ne sont pas attaquées par la trypsine et si ce fait est transposable aux hématies de souris ces glycoprotéines ne seraient pas analysées ici.

Il est actuellement difficile d'étudier séparément le métabolisme des hématies infestées puisqu'il est difficile d'isoler le parasite sans altérer les structures cellulaires mais notre travail semble montrer que le parasitisme des érythrocytes ne contribue pas de façon significative à modifier la structure externe des glucides de leur surface. En même temps il démontre le rôle des autres cellules.

Momen (1975) et Homewood (1976) ont insisté sur les perturbations provoquées par les leucocytes dans des résultats biochimiques telles que les déterminations d'enzymes. L'élimination des leucocytes est certes incomplète mais ils n'ont pas d'effet notable sur les taux d'acide sialique de surface rapportés ici car la valeur moyenne des acides sialiques libérés par neuraminidase de 1×10^{10} leucocytes est de l'ordre de $2 \mu\text{g}$ (Despont 1975).

Les modifications des glycopeptides tryptiques de surface des hématies de souris au cours de l'infestation par *Plasmodium chabaudi* semblent liées à la réticulocytémie, le résultat est notable, car le parasitisme doit induire à la surface de l'hématie des réorganisations structurales reconnues comme nouveaux antigènes dans lesquelles les glycopeptides tryptiques étudiés ici ne joueraient pas de rôle.

Par ailleurs, on ignore si les formes intraérythrocytaires de *Plasmodium chabaudi* possèdent un anabolisme glucidique mais nos résultats suggèrent qu'un tel métabolisme, s'il existe, semble peu actif.

Bibliographie

- Babu C. R. et Azhar S. (1976) : Changes in membrane constituents and membrane-bound enzymes during the maturation of rabbit reticulocytes. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 13, 79-83.
- Cook G. M. W., Heard D. H. et Seaman G. V. F. (1960) : A sialo mucoprotein liberated by trypsin from the human erythrocyte. *Nature, London*, 4755, 1011-1012.
- Despont J. P., Abel C. A. et Grey H. M. (1975) : Sialic acids and sialyl transferases in murine lymphoid cells: indicators of T cell maturation. *Cell. Immunol.*, 17, 487-494.
- Dische Z. et Shettles L. B. (1948) : A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, 175, 595-600.
- Dunn M. J. (1969) : Alterations of red blood cell sodium transport during malarial infection. *J. Clin. Invest.*, 48, 674-684.
- Fogel B. J., Shields C. D. et Von Doenhoff J. (1966) : The osmotic fragility of erythrocytes in experimental malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 15, 269-275.
- Homewood C. A. et Neame K. D. (1976) : A comparison of methods used for the removal of white cells from malaria infected blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 70, 249-251.

- Lawrence C. W. et Cenedella R. J. (1969) : Lipid content of *Plasmodium berghei* infected rat red blood cells. *Exp. Parasitol.*, 26, 181-186.
- McCormick G. J. (1970) : Amino acid transport and incorporation in red blood cells of normal and *Plasmodium knowlesi* infected rhesus monkeys. *Exp. Parasitol.*, 27, 143-149.
- Momen H., Atkinson E. M. et Homewood C. A. (1975) : An electrophoretic investigation of the malate dehydrogenase of mouse erythrocytes infected with *Plasmodium berghei*. *Int. J. Biochem.*, 6, 533-535.
- Ott K. J. (1968) : Influence of reticulocytosis on the course of infection of *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium berghei*. *J. Protozool.*, 15, 365-369.
- Rosenberg S. A. et Einstein A. Jr. (1972) : Sialic acids on the plasma membrane of cultured human lymphoid cells. *J. Cell. Biol.*, 53, 466-473.
- Shattil S. J. et Cooper R. A. (1972) : Maturation of macroreticulocyte membranes *in vivo*. *J. Lab. Clin. Med.*, 79, 215-227.
- Warren L. (1959) : The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.*, 234, 1971-1975.
- Weidekamm E., Wallach D. F. H., Lin P. S. et Hendricks J. (1973) : Erythrocyte membrane alterations due to infection with *Plasmodium berghei*. *Biochem. Biophys. Acta*, 323, 539-546.
- Weiss L. (1969) : The cell periphery. *Int. Rev. Cytol.*, 26, 63-105.
- Whaley W. G., Dauwalder M. et Kephart J. E. (1972) : Golgi apparatus : influence on cell surfaces. *Science*, 175, 596-599.
- Winzler R. J. (1970) : Carbohydrates in cell surface. *Int. Rev. Cytol.*, 29, 77-125.
- Winzler R. J. (1955) : Orcinol sulfuric acid procedure for non nitrogenous sugars assays. *Meth. Biochem. Analysis*, 2, 279-285.
-