

EFFET DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES SUR LA PÉNÉTRATION DU *TRYPANOSOMA CRUZI* DANS LES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX DE SOURIS

A. OSUNA, F. GAMARRO, S. CASTANYS et L. M. RUIZ-PEREZ*

RÉSUMÉ. Dans ce travail nous étudions les modifications produites par trois enzymes protéolytiques, sur la pénétration des formes métacycliques de *Trypanosoma cruzi* de culture dans des macrophages péritonéaux non stimulés de souris. Les enzymes protéolytiques employées sont : trypsine, papaïne et collagenase. Quand les formes métacycliques ou les macrophages sont prétraités avec les enzymes protéolytiques, le taux de pénétration diminue, mais le phénomène n'est pas complètement inhibé. De plus, nous observons que le nombre des parasites par cellule demeure stable au cours des expériences.

Effect of treatment with proteolytic enzymes on the interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mice peritoneal macrophages

SUMMARY. The present study deals on the modifications produced by three proteolytic enzymes in the interiorization of cultured metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages of non-stimulated mice. The proteolytic enzymes used were trypsin, papain and collagenase. Pretreatment of metacyclic forms or macrophages with the enzymes resulted in lower penetration ratios with respect to controls. On the other hand, percentages of parasitization were maintained throughout the periods of time assayed.

Introduction

Les macrophages se comportent comme des cellules-hôtes pour *Trypanosoma cruzi*. Dans ces cellules, les parasites se multiplient sous la forme amastigote et deviennent des trypomastigotes qui sont libérés après la lyse de la cellule-hôte et qui sont capables d'envahir des nouvelles cellules.

L'étude des interactions de *Trypanosoma cruzi*-macrophage est particulièrement intéressante, car cette dernière cellule est un effecteur de la réponse immunitaire.

Bien qu'il n'existe pas encore une opinion unanime, la plupart des évidences favorisent l'idée suivante : les formes cultivées de *Trypanosoma cruzi* pénètrent dans les macrophages à la faveur d'un processus de phagocytose.

Weiss (1969), en tenant compte que la surface cellulaire des Vertébrés a une charge nette négative, a postulé que la phagocytose et l'adhérence étaient liées à des phénomènes de surface.

* Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18001 Granada, España.

Accepté le 14 août 1984.

Pereira (1983) a étudié l'activité neuraminidase de *Trypanosoma cruzi*. Il est possible que cette enzyme joue un rôle important dans l'adhérence, la pénétration et dans la libération ultérieure du flagellé.

Alcantara et Brener (1980) démontrèrent au moyen d'un traitement à la pronase, que les macrophages péritonéaux de souris ont des composants membraneux qui interviennent dans l'endocytose des formes sanguines de *Trypanosoma cruzi*.

Les modifications de la composition de la membrane du parasite comme celle de la cellule-hôte pourraient influencer la pénétration (Piras et coll., 1981 ; Henriquez et coll., 1981a, b ; Osuna et coll., 1984).

Dans ce travail nous étudions l'influence de certaines enzymes protéolytiques sur la pénétration de *Trypanosoma cruzi* dans les macrophages péritonéaux, non sensibilisés de la Souris.

Matériel et méthodes

— *Macrophages péritonéaux*

Les macrophages péritonéaux non stimulés ont été prélevés de la souris BALB/c selon la technique de Cohn et Benson (1965) et cultivés en microplaques dans le milieu 199 (Gibco) complété avec 10 % de sérum bovin fœtal inactivé (SBFI). Les microcultures sont effectuées dans un atmosphère de 5 % de CO₂ à 37° C.

— *Parasite*

Nous avons travaillé avec la souche Y de *T. cruzi*, originaire de Cali (Colombie). Les formes métacycliques ont été obtenues en milieu Grace (Gibco) complété avec 10 % de SBFI (Osuna et coll., 1979).

— *Traitement des formes métacycliques et des macrophages avec des enzymes protéolytiques*

Les enzymes qui ont été utilisées sont les suivantes : trypsine (1:250, Difco), papaïne (13 U/mg, Sigma), collagénase (213 U/mg, Worthington).

Deux sortes d'expériences ont été réalisées :

- a) des macrophages prétraités avec les enzymes ont été mis en contact avec des formes métacycliques non traitées ;
- b) des formes métacycliques traitées avec les enzymes ont été mises en contact avec des macrophages non traités.

Les concentrations finales des enzymes étaient les suivantes : trypsine, 0,4 µg/ml en PBS ; papaïne, 10 µg/ml en PBS ; collagénase, 1 mg/ml en milieu de Hanks.

Les macrophages ont été traités pendant 30 minutes à 37° C et les formes métacycliques 60 minutes à la même température.

Après le traitement avec trypsine et papaïne, les parasites et les macrophages ont été lavés 3 fois en Hanks et mis dans le milieu 199 (10 % SBFI). Les parasites et les macrophages traités par la collagénase sont lavés dans du PBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺, puis mis dans du milieu 199 (10 % SBFI).

Dans les deux groupes expérimentaux, la période d'interaction parasite-cellule était de 4 h à 37° C dans une atmosphère de 5 % de CO₂, le rapport parasite-cellule étant de 1:1. Après cette période les cultures cellulaires ont été soumises à trois lavages dans du Hanks en y ajoutant du milieu 199 (10 % SBF1).

A 8, 24, 48 et 72 heures post-infection, les cultures ont été lavées dans du Hanks, fixées au Carnoy et colorées au Giemsa, pour déterminer le pourcentage de cellules parasitées et le nombre de parasites par macrophage parasité. Ces comptages ont été réalisés dans, au moins, 500 cellules de chaque culture.

On a appliqué aux données obtenues le test statistique de « preuve de comparaison de deux proportions, en groupes de données indépendantes », afin de vérifier la signification des résultats.

Résultats

Nous avons étudié l'influence des enzymes protéolytiques sur la pénétration et nous avons suivi l'évolution des parasites intracellulaires. Les résultats apparaissent sur les *tableaux I et II* (moyennes de 4 expériences).

TABLEAU I. — Effet du traitement des formes métacycliques de *T. cruzi* par des enzymes protéolytiques, sur leur pénétration dans des macrophages péritonéaux*.

Traitements	Temps post-infection			
	8 h		24 h	
	% p	p/c	% p	p/c
A	10,4 ± 2,1	1,2 ± 0,1	10,0 ± 2,3	1,2 ± 0,2
B	8,3 ± 1,9	1,2 ± 0,2	8,7 ± 2,5	1,0 ± 0,1
C	4,0 ± 1,1 ⁺	1,0 ± 0,1	4,9 ± 1,1 [#]	1,0 ± 0,1
D	3,7 ± 0,9 ⁺	1,0 ± 0,1	4,6 ± 1,2 [#]	1,0 ± 0,3

Traitements	Temps post-infection			
	48 h		72 h	
	% p	p/c	% p	p/c
A	10,0 ± 1,7	2,4 ± 1,1	10,8 ± 2,6	2,5 ± 1,3
B	7,7 ± 1,5	1,8 ± 0,7	8,6 ± 2,1	2,6 ± 1,1
C	4,8 ± 1,3 [#]	1,4 ± 0,6	5,7 ± 1,6	1,5 ± 0,8
D	4,3 ± 1,1 [#]	1,5 ± 0,3	4,9 ± 1,3 [#]	2,2 ± 1,2

* Moyenne de 4 expériences ± E.S.M.

% p : Pourcentage de pénétration

p/c : Nombre de parasites intracellulaires par cellule (moyenne ± E.S.M.)

A : Témoins : formes métacycliques non traitées

B, C et D : Formes métacycliques traitées respectivement à la trypsine, à la papaïne et à la collagénase.

Différence significative pour $p \leq 0,01$ (+) et $p \leq 0,05$ (#) par rapport aux formes métacycliques non traitées.

TABLEAU II. — Effet du traitement de macrophages péritonéaux par des enzymes protéolytiques sur la pénétration de formes métacycliques de *T. cruzi**

Traitements	Temps post-infection			
	8 h		24 h	
	% p	p/c	% p	p/c
A	10,9 ± 1,2	1,2 ± 0,1	10,6 ± 1,1	1,2 ± 0,3
B	4,1 ± 1,0#	1,0 ± 0,3	3,8 ± 0,7#	1,0 ± 0,2
C	2,4 ± 0,7+	1,0 ± 0,5	2,9 ± 0,4#	1,6 ± 0,3
D	4,6 ± 0,8*	1,2 ± 0,2	4,0 ± 1,1*	1,0 ± 0,1

Traitements	Temps post-infection			
	48 h		72 h	
	% p	p/c	% p	p/c
A	10,3 ± 1,3	2,4 ± 1,3	11,4 ± 2,0	2,5 ± 1,1
B	1,8 ± 0,3+	1,2 ± 0,1	3,6 ± 0,8#	1,4 ± 0,4
C	2,5 ± 0,6#	1,8 ± 0,8	8,2 ± 1,6	2,0 ± 1,1
D	3,6 ± 0,3#	2,0 ± 1,4	4,2 ± 1,4#	2,2 ± 1,3

* Moyenne de 4 expériences ± E.S.M.

% p : Pourcentage de pénétration

p/c : Nombre de parasites intracellulaires par cellule (moyenne ± E.S.M.)

A : Témoins : cellules-hôtes non traitées

B, C et D : Macrophages péritonéaux traités respectivement à la trypsine, à la papaïne et à la collagénase

Différence significative pour $p \leq 0,001$ (+), $p \leq 0,01$ (#) et $p \leq 0,05$ (*) par rapport aux cellules-hôtes non traitées.

Discussion

Nogueira et Cohn (1976) ont étudié les mécanismes de pénétration de *T. cruzi* dans la cellule-hôte. Ils ont traité les macrophages péritonéaux avec trypsine et chimotrypsine. Ces traitements inhibent l'adhésion du parasite à la membrane du macrophage.

Pourtant, Alcantara et Brener (1977), en utilisant le même modèle expérimental, ont montré qu'il y a un accroissement du taux de pénétration quand les trypanosomes provenant du sang de souris, sont exposés aux macrophages prétraités avec les mêmes enzymes. Ils suggèrent que cet accroissement du taux de pénétration pourrait être dû aux récepteurs glycoprotéiques de la Fc ou la fraction C3 du complément. Alcantara et Brener (1980), après avoir traité les macrophages avec trypsine, chimotrypsine et pronase, ont vérifié que les deux premières bloquaient la pénétration des parasites provenant de la culture, mais au contraire pour les formes sanguines le traitement à la trypsine semblait stimuler la pénétration. La pronase, au contraire, inhibe presque complètement la pénétration des formes sanguines. Ils suggèrent que le récepteur de C3 n'intervient pas dans le processus d'endocytose des formes sanguines dans les macrophages.

Les récepteurs de la Fc pourraient ne pas être concernés dans la phagocytose des formes trypomastigotes, car le traitement à la pronase diminue nettement le nombre de parasites intracellulaires (Arend et Mannik, 1972).

Krettli et Nussenzeig (1977) observèrent que les trypanosomes obtenus des rats irradiés manquaient de Ig sur leurs membranes et qu'ils étaient capables de pénétrer dans les macrophages normaux et les macrophages traités avec trypsine.

L'influence sur la pénétration de l'action des enzymes protéolytiques sur les cellules-hôtes a été étudiée par Henriquez et coll. (1981b) en cellules Vero, et par Osuna et coll. (1984) en cellules HeLa.

Le traitement de ces cellules avec la trypsine, réduit remarquablement le taux de pénétration. Cependant 12 heures plus tard environ, les cellules HeLa étaient aussi parasitées que les témoins. Cela pourrait indiquer qu'il faut un délai minimum de 12 à 14 heures pour la résynthèse des récepteurs spécifiques.

Récemment Ouassi et coll. (1984), ont démontré que *T. cruzi* présente des récepteurs face à la fibronectine, qui jouent un rôle important sur l'adhésion du parasite avec sa cellule. Cette glyco-protéine de la surface cellulaire est sensible à la trypsine et à la papaïne, et la diminution du taux de pénétration, après le traitement des cellules avec ces enzymes, pourrait être due à l'élimination de cette glyco-protéine de la surface cellulaire.

Les résultats exposés dans le *tableau I*, indiquent que lorsque les formes métacycliques sont traitées avec des enzymes protéolytiques, le taux de pénétration diminue par rapport aux témoins non traités. Cette réduction est plus accusée après le traitement des formes métacycliques à la papaïne ou à la collagénase.

Nous pouvons aussi observer que les pourcentages de pénétration demeurent stables au cours des expériences. Cela prouve que le mécanisme de défense du parasite, face aux lysosomes des cellules phagocytaires, ne dépend pas des protéines de surface de *Trypanosoma cruzi*. Quand l'interaction se fait avec des macrophages traités avec des enzymes protéolytiques (*tableau II*) le taux de pénétration est réduit, mais cette diminution n'atteint pas le degré d'inhibition rapporté par Nogueira et Cohn (1976), et par Alcantara et Brener (1977), pour les formes epimastigotes. De la même façon, il ne se produit pas non plus, un accroissement de la pénétration après le traitement des macrophages avec trypsine, comme celui qu'ont trouvé Alcantara et Brener (1977) lorsqu'ils étudiaient l'interaction entre ces cellules et les formes sanguines du parasite.

En conclusion, le processus de l'attraction et la pénétration du *T. cruzi* dans les macrophages est un phénomène complexe, qui dépend des formes infectieuses du Trypanosome, ainsi que des protéines de surface du macrophage-hôte.

REMERCIEMENTS. Les auteurs remercient Mlle A. Lozano Cantero et Mme Monique Boy pour la version française du manuscrit. Ce travail a pu être réalisé grâce à l'aide de la Comision Asesora de Investigación Científica y Técnica.

BIBLIOGRAPHIE

- ALCANTARA A., BRENER Z. : The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophage. *Acta Trop.*, 1977, 35, 209-221.
- ALCANTARA A., BRENER Z. : *Trypanosoma cruzi* role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. *Exp. Parasitol.*, 1980, 50, 1-6.
- AREND W. P., MANNIK M. : *In vitro* adherence of soluble immune complexes to macrophages. *J. Exp. Med.*, 1972, 136, 514-531.
- COHN Z. A., BENSON B. : The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, cytochemistry and biochemistry. *J. Exp. Med.*, 1965, 121, 153.
- DVORAK J. A., SCHMUÑIS G. A. : *Trypanosoma cruzi* : interaction with mouse peritoneal macrophages. *Exp. Parasitol.*, 1972, 32, 289-300.
- HENRIQUEZ D., PIRAS R., PIRAS M. M. : The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1981a, 2, 359-366.
- HENRIQUEZ D., PIRAS R., PIRAS M. M. : Surface membrane interaction of *Trypanosoma cruzi* and Vero cells : dissociation of the adhesion and penetration steps. *J. Cell Biol.*, 1981b, 91, 108-112.
- KRETTLI A. V., NUSSENZWEIG R. : Presence of immunoglobulins on the surface of circulating trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* resulting in activation of the alternative pathway. In : *Chagas Disease. PAHO Scientific Publication*, 1977, 347, 71-73.
- NOGUEIRA N., COHN Z. : *Trypanosoma cruzi* : mechanism of entry and intracellular fate in mammals cells. *J. Exp. Med.*, 1976, 143, 1402-1420.
- OSUNA A., JIMENEZ-ORTIZ A., LOZANO J. : Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* : I. *Rev. Iber. Parasitol.*, 1979, 39, 129-133.
- OSUNA A., ORTEGA G., GAMARRO F., CASTANYS S., MASCARO M. C. : Some factors affecting the *in vitro* invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, 1984, 14, 253-258.
- OUASSI M. A., AFCHAIN D., CAPRON A., GRIMAUD J. A. : Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature*, 1984, 308, 380-382.
- PEREIRA M. E. A. : A developmentally regulated Neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*, 1983, 219, 1444-1446.
- PIRAS R., HENRIQUEZ D., PIRAS M. M. : *In vitro* transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote into an extracellular amastigote form. III *Pan-American Biochemistry Congress, Mexico*, 1981, p. 72.
- WEISS L. : The cell periphery. *Int. Rev. Cytol.*, 1969, 26, 63-105.