

# ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Volume 60

1985

N° 6

© Masson, Paris, 1985.

*Ann. Parasitol. Hum. Comp.*,  
1985, 60, n° 6, pp. 645-652.

## MÉMOIRES ORIGINAUX

### ANTIGÈNES SPÉCIFIQUES DE STADE A LA SURFACE DES HÉMATIES PARASITÉES PAR *PLASMODIUM FALCIPARUM*

#### Étude préliminaire

G. TRONCHIN, P. DELPLACE et A. VERNES

**RÉSUMÉ.** L'immunofluorescence et l'immunocytochimie ultrastructurale ont été utilisées pour localiser des antigènes présents à la surface d'hématies parasitées par *Plasmodium falciparum*. Deux classes d'antigènes ont ainsi été mises en évidence : 1) l'une présente sur des hématies intactes au voisinage du site d'invasion ; 2) l'autre détectée après traitement par la saponine et distribuée sur l'ensemble de la surface des hématies parasitées. Ces antigènes sont exprimés différemment en fonction du stade parasitaire.

#### **Stage specific surface antigens on *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes.**

**SUMMARY.** Immunofluorescence microscopy, and ultrastructural immunolabelling have been used to localize antigens determinants present on the surface of prefixed erythrocytes infected by *P. falciparum*. Two classes of antigens have been demonstrated : 1) one located on intact erythrocytes close to the site of invasion ; 2) another detected after saponin treatment, and distributed over the entire surface of infected erythrocytes. Such antigens appeared to have a variable expression according to the stage of the parasite.

INSERM U42, Unité de Biologie et de Biochimie Parasitaires et Fongiques, Domaine du Certia, 369, rue Jules-Guesde, F 59650 Villeneuve-d'Ascq.

Accepté le 2 février 1985.

## Introduction

Les stades érythrocytaires des *Plasmodium* expriment certains de leurs antigènes au niveau de la membrane plasmique des hématies hôtes (voir la revue de Deans et Cohen, 1983). En ce qui concerne *Plasmodium falciparum*, la présence d'antigènes à la surface des hématies parasitées a été le plus souvent associée à l'existence de protubérances membranaires appelées « knobs » (Kilejian et coll., 1977 ; Langreth et Reese, 1979). Ces formations apparaissent tardivement lors du développement érythrocytaire, principalement aux stades trophozoïtes et schizontes.

Utilisant l'immunofluorescence indirecte sur des hématies fraîches parasitées par *Plasmodium falciparum*, Hommel et coll. (1982) et Mendis et coll. (1983) ont toutefois rapporté l'existence d'antigènes membranaires à la surface d'hématies dépourvues de knobs. Plus récemment, avec la même technique pratiquée sur des frottis de globules rouges humains fixés par le glutaraldéhyde et séchés, Perlmann et coll. (1984) ont identifié des antigènes sur les hématies contenant de jeunes stades parasitaires, dès l'invasion de la cellule hôte.

En vue d'obtenir des informations complémentaires sur la distribution des antigènes membranaires chez des hématies parasitées par *Plasmodium falciparum*, une étude immunocytochimique portant sur différents stades érythrocytaires a été entreprise. Nous en rapportons ici les résultats préliminaires, en particulier ceux obtenus après perméabilisation des membranes par la saponine, un traitement connu pour faciliter l'accès des différents réactifs aux compartiments membranaires et cytoplasmiques (Bohn, 1978 ; Willingham, 1983).

## Matériel et méthodes

### 1 - PARASITES

Cette étude a été réalisée sur la souche FCR<sub>3</sub> de *Plasmodium falciparum* entretenue *in vitro*. Des cultures asynchrones et synchrones (Lambros et Vandenberg, 1979 ; Vernes et coll., 1984) ont été utilisées.

### 2 - IMMUNoSÉRUM

Nous avons utilisé le sérum d'un donneur européen vivant en zone d'endémie (Madagascar), choisi pour sa capacité d'inhibition sur la croissance *in vitro* de la souche FCR<sub>3</sub> (Delplace et coll., 1984).

### 3 - MARQUAGES IMMUNOLOGIQUES

Les cellules sont lavées 2 fois en tampon cacodylate et fixées 15 min par le glutaraldéhyde 0,1 % en tampon cacodylate de Na 0,1 M, pH 7,2. Après lavage, une partie du matériel est traité par une solution de saponine à 0,1 mg/ml, lavé, et incubé 30 min sous agitation constante dans l'immunsérum dilué au 1/100 avec du PBS, pH 7,2. Les cellules sont alors lavées 3 fois en PBS avant d'être préparées pour l'immunofluorescence ou la microscopie électronique.

### a - *Immunofluorescence*

Les sites antigéniques sont révélés par un conjugué anti-immunoglobulines G humaines marqué à la fluorescéine (Institut Pasteur Production), et dilué au 1/50 dans du PBS contenant du bleu Evans au 1/50 000. Après 2 lavages, une goutte de la suspension est examinée à l'aide d'un microscope Leitz Orthoplan équipé d'un dispositif d'épifluorescence.

### b - *Microscopie électronique*

Les cellules sont incubées pendant 1 heure sous agitation constante dans un sérum anti-immunoglobulines G humaines conjuguées à la ferritine (Laboratoires Miles) ou à la peroxydase (Nordic) diluées au 1/100 en PBS. La peroxydase est révélée par un mélange de peroxyde d'hydrogène et de diaminobenzidine selon Graham et Karnovsky (1966). Le matériel est ensuite postfixé par le glutaraldéhyde 1 % 30 min. et l'O<sub>s</sub>O<sub>4</sub> 1 % 15 min en tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,2, déshydraté et inclus dans l'épon.

Les expériences de contrôle sont effectuées en remplaçant l'immunsérum par du PBS seul ou par un sérum non immun. Les sections sont examinées au microscope électronique Jeol 120 CX, sans coloration, ou contrastées 2 min à l'acétate d'uranyle.

## Résultats

### 1 - *Immunofluorescence*

Après préfixation glutaraldéhydique et traitement par la saponine, une fluorescence intense et uniforme est généralement observée à la surface des hématies parasitées (*fig. 1*). Occasionnellement, certains parasites font également l'objet d'un marquage. L'observation simultanée en contraste de phase révèle que seules les hématies hébergeant des formes jeunes (stades en anneau ou « ring »), identifiables par l'absence de pigment malarique visible, présentent une réaction membranaire (*fig. 2*). Les hématies parasitées par des stades plus âgés (trophozoïtes et schizontes), ne montrent aucune fluorescence de membrane (*fig. 3 et 4*).

En l'absence de tout traitement par la saponine, seule une fluorescence discrète et irrégulière est observée à la surface des hématies parasitées par de jeunes stades (*fig. 5*). En présence de sérum d'individu non immun, aucune réaction n'est décelée.

### 2 - *Microscopie électronique*

Les résultats ultrastructuraux obtenus avec la ferritine et la peroxydase confirment ceux apportés par l'immunofluorescence. Chez les hématies préfixées non traitées par la saponine provenant de culture synchrone, le marquage de la surface érythrocytaire demeure limité à la proximité des jeunes parasites (*fig. 6, 7 et 8*). Ces derniers font le plus souvent saillie à la surface de la cellule hôte, où ils apparaissent associés à des débris parasitaires extracellulaires également marqués (*fig. 6*). Aucune réaction n'est observée sur les hématies parasitées par des formes âgées.

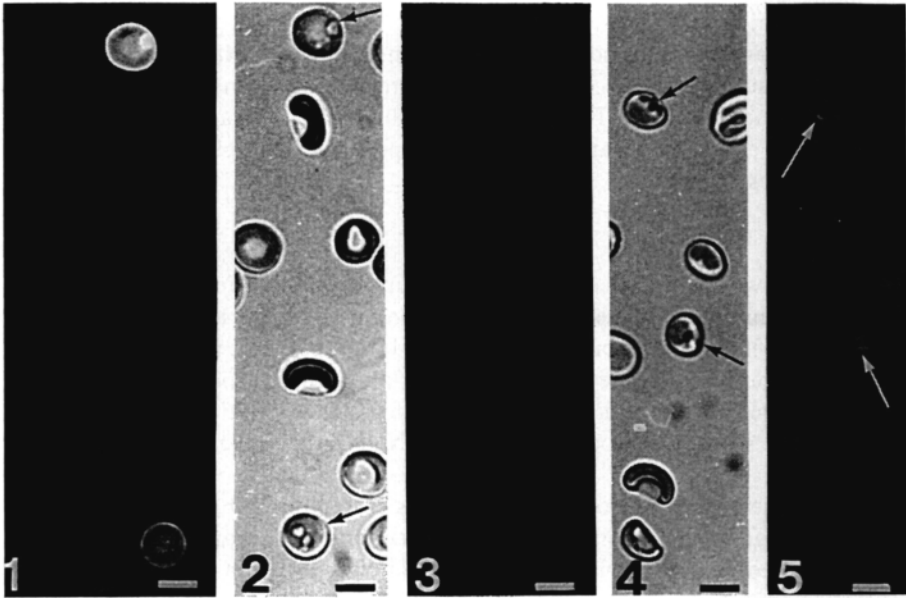


FIG. 1 à 4. — Hématies préfixées traitées par la saponine. Fluorescence membranaire (*fig. 1*) de globules rouges parasités par des formes jeunes (stade en « anneau »), identifiables par l'absence de pigment malarique en microscopie de contraste de phase (*fig. 2*, flèches). Noter l'absence de réaction (*fig. 3*) sur la membrane plasmique d'hématies envahies par des stades âgés, présentant des amas de pigment (*fig. 4*, flèches). Échelle 5  $\mu\text{m}$ .

FIG. 5. — Hématies préfixées non traitées par la saponine. Seules les cellules infestées par des stades jeunes montrent une fluorescence inconstante à leur surface (flèches). Échelle = 5  $\mu\text{m}$ .

Lorsque la détection ultrastructurale est réalisée après traitement par la saponine, la surface des hématies envahies par de jeunes stades est entièrement recouverte par un précipité de  $\text{DAB-O}_2\text{O}_4$  dense aux électrons (*fig. 9 et 10*). Celui-ci se présente parfois sous forme d'amas associés à des extraits membranaires ou cytoplasmiques, et séparés par des zones dépourvues de marquage correspondant aux interruptions membranaires induites par la saponine. De la même manière, ce traitement résulte en un dépôt régulier de particules de ferritine à la surface des hématies récemment infestées (*fig. 11 et 12*). Les cellules avoisinantes parasitées par des stades âgés (trophozoïtes et schizontes) sont dépourvues de tout marquage, en dépit d'altérations membranaires identiques provoquées par la saponine à leur surface (*fig. 12*).

FIG. 6 à 8. — Hématies préfixées, parasitées par des formes jeunes, non traitées par la saponine.

Quelques amas de particules de ferritine (*fig. 6 et 7*, flèches) et des précipités uniformes de  $\text{DAB-O}_2\text{O}_4$ , opaques aux électrons (*fig. 8*) sont détectés dans la zone de la surface érythrocytaire étroitement associée au parasite, et sur les débris parasitaires (double flèche).

Remarque l'absence totale de marquage sur la majeure partie de la surface de l'hématie. Échelle = 0,5  $\mu\text{m}$ .

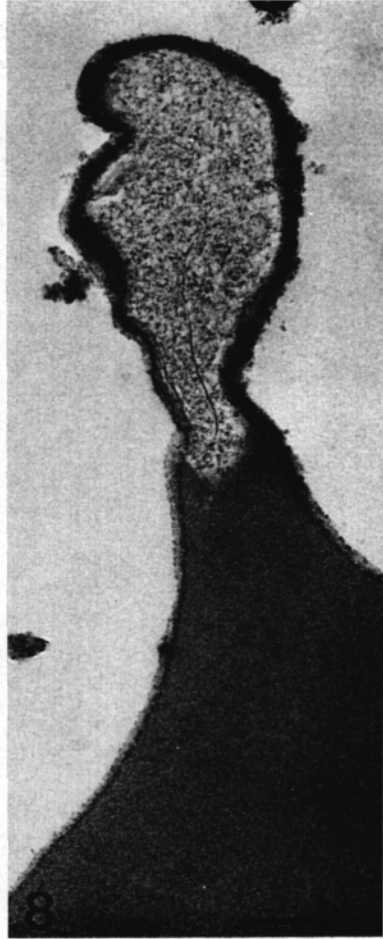
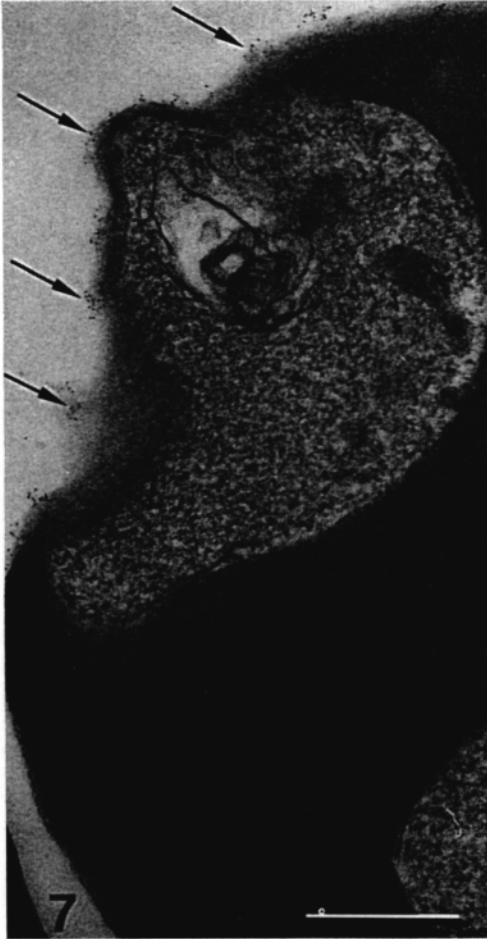
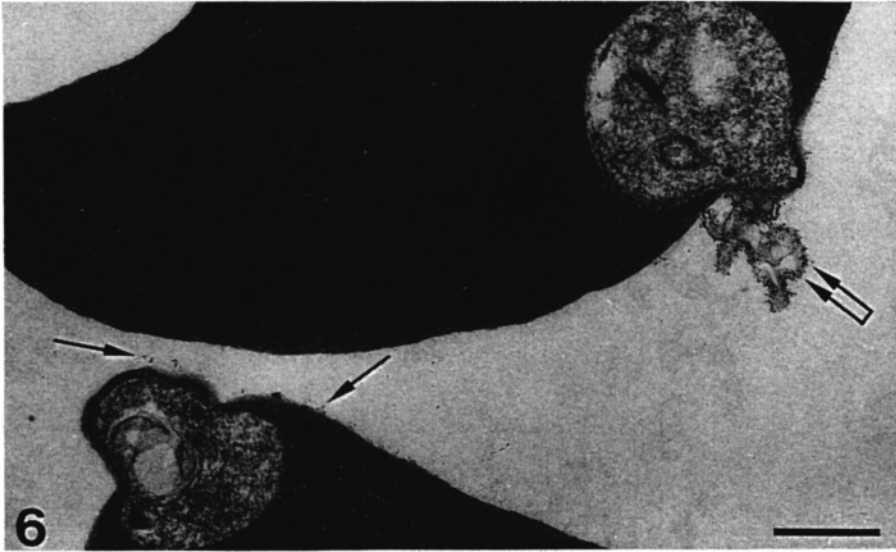


FIG. 6 à 8.

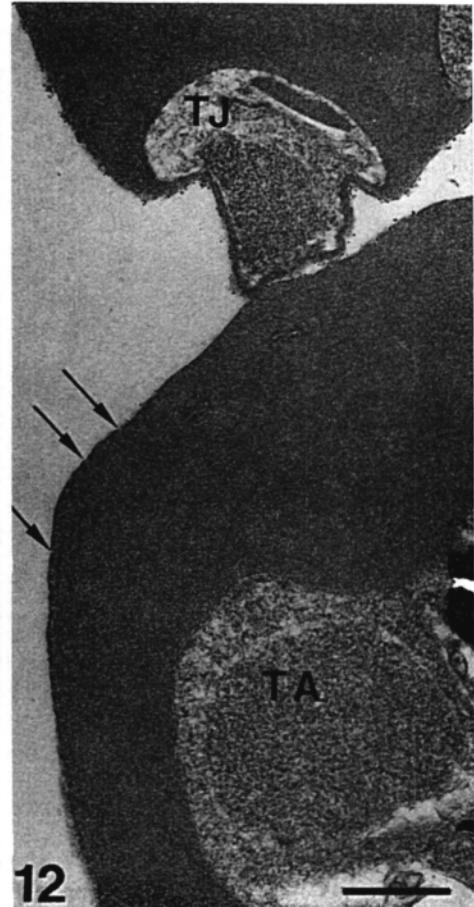
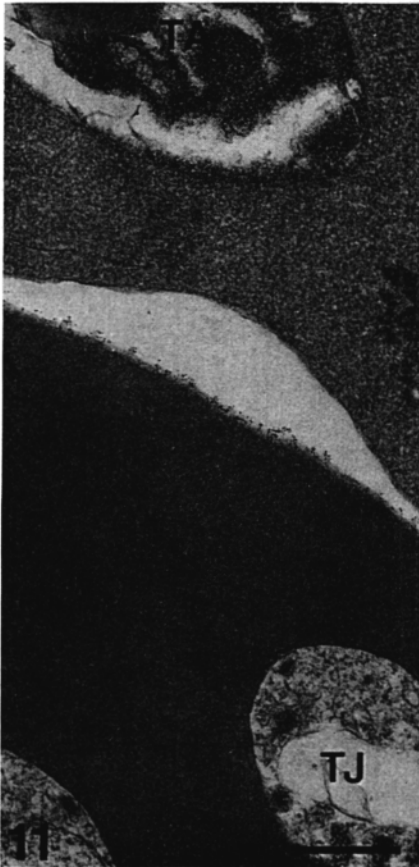
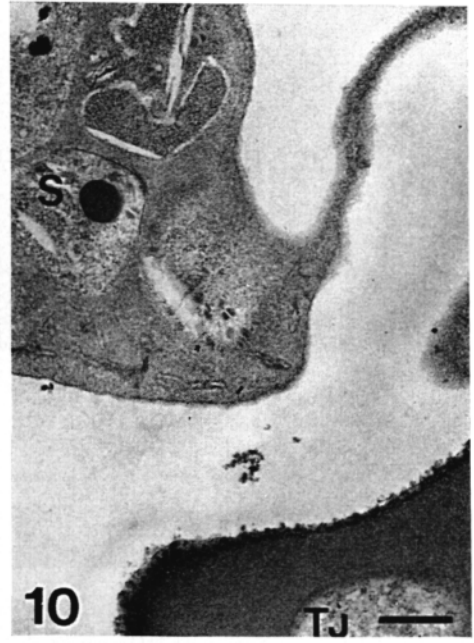
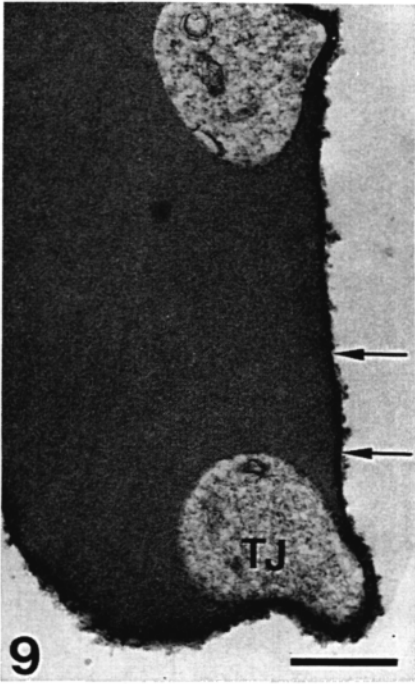


FIG. 9 à 12.

## Discussion

L'existence de différents antigènes à la surface de réticulocytes ou d'hématies parasitées par des *Plasmodium* a déjà été rapportée (Kilejian et coll., 1977 ; Langreth et Reese, 1979 ; Hommel et Davis, 1981 ; Hommel et coll., 1982 ; Brown et coll., 1982 ; Mendis et coll., 1983). Chez *Plasmodium falciparum*, ils ont été décrits au niveau des knobs, et à des stades avancés du cycle érythrocytaire. Les présents résultats tendent à démontrer :

1) Qu'une classe d'antigènes, directement accessible après fixation glutaral-déhydrique, est exprimée sur la membrane érythrocytaire dès l'invasion, à proximité du site de pénétration. L'existence de tels antigènes peut passer inaperçue avec des techniques conventionnelles telles que l'immunofluorescence (Mendis et coll., 1983 ; Perlmann et coll., 1984) probablement parce qu'ils concernent une zone peu étendue et sont exprimés à un taux très faible.

2) Qu'une autre classe d'antigènes, localisée sur toute la surface des hématies envahies par des jeunes stades, n'est accessible qu'après traitement par la saponine. Ces antigènes pourraient correspondre à ceux détectés par Perlmann et coll. (1984), puisque le séchage à l'air des hématies et le traitement par la saponine semblent agir de la même manière, à savoir exposer aux réactifs immunologiques des molécules préalablement inaccessibles : la saponine est en effet connue pour se complexer avec le cholestérol, et former des micelles globulaires présentant des pores centraux de 8 nm de diamètre (Ohtsuki et coll., 1978). Nous ignorons si ces 2 classes d'antigènes supportent des déterminants communs. Puisque la saponine permet l'accès au compartiment intramembranaire, nous pouvons supposer que les antigènes révélés après ce traitement comprennent ceux observés en (1), et d'autres déterminants plus profondément insérés dans ou sous la membrane érythrocytaire. Ces différents antigènes pourraient représenter des produits d'origine parasitaire déposés lors de la pénétration du mérozoïte, en particulier une protéine de PM 155 000 se fixant spécifiquement sur des récepteurs de la membrane érythrocytaire tels que la glycophorine (Perkins, 1984). Des études complémentaires avec des anticorps monospécifiques sont nécessaires pour élucider cette hypothèse.

Notre incapacité à détecter des antigènes dans les membranes plasmiques d'hématies parasitées par des stades âgés ne semble pas imputable à des insuffisances techniques, puisque le traitement par la saponine produit des altérations similaires de la membrane érythrocytaire à tous les stades du développement. Par ailleurs, certains auteurs (Howard et coll., 1984 ; Oka et coll., 1984) ont récemment montré que l'utili-

FIG. 9 à 12. — Hématies préfixées traitées par la saponine.

Les dépôts de peroxydase (fig. 9 et 10) et de ferritine (fig. 11 et 12) sont largement distribués à la surface des hématies parasitées par des stades jeunes (TJ = trophozoïtes jeunes), tandis que les hématies envahies par des formes plus âgées (S = schizonte ; TA = trophozoïte âgé) ne montrent aucune réaction. Les flèches indiquent les altérations de la membrane érythrocytaire provoquées par la saponine.

Échelle = 0,5 µm.

sation de saponine était compatible avec la démonstration d'antigènes à la surface de trophozoïtes et de schizontes isolés.

Dans ce cas, il reste à déterminer si nos observations reflètent une différence dans le nombre de sites antigéniques, ou dans leur présentation. Il est en effet concevable que des molécules soient perdues ou modifiées au cours des altérations membranaires de la cellule hôte qui surviennent pendant la croissance du parasite (Hommel et coll., 1983). A moins qu'une spécificité de souche ou une sensibilité particulière de certains antigènes de surface au glutaraldéhyde puissent expliquer les différences observées.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BOHN W. : A fixation method for improved antibody penetration in electron microscopical immunoperoxidase studies. *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, 26, 293-297.
- BROWN K. N., McLAREN D. J., HILL L. A., JARRA W. : The binding of antipicant from *Plasmodium berghei* infected rats and parasite specific antigenic sites on the surfaces of infected reticulo-cytes. *Parasite Immunol.*, 1982, 4, 21-31.
- DEANS J. A., COHEN S. : Immunology of malaria. *An. Rev. Microbiol.*, 1983, 37, 25-49.
- DELPLACE P., DUBREMETZ J. F., VERNES A. : A *Plasmodium falciparum* culture medium antigen specific of the merozoite release-reinvasion stage is recognized by immune human IgG. *Mol. Biochem. Parasitol.* (Soumis pour publication).
- GRAHAM R. C., KARNOVSKY M. K. : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 1966, 14, 291-302.
- HOMMEL M., DAVID P. H. : *Plasmodium knowlesi* variant antigens are found on schizont infected erythrocytes but not on merozoites. *Infect. Immun.*, 1981, 33, 275-284.
- HOMMEL M., DAVID P. H., OLIGINO L. D., DAVID J. R. : Expression of strain specific surface antigens on *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Parasite Immunol.*, 1982, 4, 409-419.
- HOMMEL M., DAVID P. H., OLIGINO L. D. : Surface alterations of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Antigenic variation, antigenic diversity, and the role of the spleen. *J. Exp. Med.*, 1983, 157, 1137-1148.
- HOWARD R. J., LYON J. A., DIGGS C. L., HAYNES J. D., LEECH J. H., BARNWELL J. W., ALEY S. B., AIKAWA M., MILLER L. H. : Localization of the major *Plasmodium falciparum* glycoprotein on the surface of mature intraerythrocytic trophozoites and schizonts. *Mol. Biochem. parasitol.*, 1984, 11, 349-362.
- KILEJIAN A., ABATI A., TRAGER W. : *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium coatneyi* : Immunogenicity of « Knob-like protrusions » on infected erythrocyte membranes. *Experiment. Parasitol.*, 1977, 42, 157-164.
- LAMBROS C., VANDERBERG J. P. : Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.*, 1979, 65, 418-420.
- LANGRETH S. G., REESE R. T. : Antigenicity of the infected erythrocyte and merozoite surfaces in *Falciparum* malaria. *J. Exp. Med.*, 1979, 150, 1241-1254.
- MENDIS K. N., DAVID P. H., HOMMEL M., CARTER R., MILLER L. H. : Immunity to malarial antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983, 32, 926-930.
- OKA M., AIKAWA M., FREEMAN R. R., HOLDER A. A., FINE E. : Ultrastructural localization of protective antigens of *Plasmodium yoelii* merozoites by the use of monoclonal antibodies and ultrathin cryomicrotomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1984, 33, 342-346.
- OSTSUKI I., MANZI R. M., PALADE G. E., JAMIESON J. D. : Entry of macromolecular tracers into cells fixed with low concentrations of aldehydes. *Biol. Cell.*, 1978, 31, 119-126.
- PERKINS M. E. : Binding of glycoporphins to *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1984, 10, 67-68.
- PERLMANN H., PERZINS K., WAHLGREN M., CARLSSON J., BJORKMAN A., PATARROYO M. E., PERLMANN P. : Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Experiment. Med.*, 1984, 159, 1686-1704.
- VERNES A., HAYNES J. D., TAPCHAISRI P., WILLIAMS J. L., DUTOIT E., DIGGS C. L. : *Plasmodium falciparum* strain specific human antibody inhibits merozoite invasion of erythrocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1984, 33, 197-200.
- WILLINGHAM M. C. : An alternative fixation processing method for preembedding ultrastructural immunocytochemistry of cytoplasmic antigens : The GBS (glutaraldehyde - borohydride - saponin) procedure. *J. Cytochem. Histochem.*, 1983, 31, 791-798.