IDENTIFICATION CHEZ *PLASMODIUM FALCIPARUM* D'UNE PROTÉINE SE LIANT SPÉCIFIQUEMENT A LA FIBRONECTINE HUMAINE

S. TOMAVO*, M. A. OUAISSI**, J. F. DUBREMETZ*,
A. CAPRON**, A. VERNES*

RÉSUMÉ. Une protéine liant la fibronectine (PLFn) a été identifiée et purifiée à partir des schizontes de *Plasmodium falciparum* marqués à l'isoleucine tritiée. La purification a été réalisée par chromatographie d'affinité sur de la fibronectine plasmatique humaine couplée à la Sépharose 4B CNBr. Après incubation d'un lysat parasitaire avec la fibronectine-Sépharose, l'élution est faite par un tampon d'électrophorèse Laemmli. L'analyse des protéines éluées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) montre une bande protéique majeure de 70 000 daltons. Cette bande n'est pas trouvée quand des IgG humaines ou des IgG de lapin couplées à la Sépharose 4B ou de la Sépharose 4B seule sont utilisés comme contrôle.

Mots-clés : *Plasmodium falciparum*. Fibronectine humaine.

Identification of a human fibronectin binding protein in *Plasmodium falciparum*.

SUMMARY. A Fibronectin Binding protein (FnBp) was identified in ³H isoleucine labeled *P. falciparum* schizonts using affinity chromatography on human fibronectin (Fn) coupled to Sepharose 4B. After incubation of Nonidet-P 40 parasite lysate with Fn-Sepharose, elution was performed with SDS-PAGE buffer. Analysis of FnBp by SDS-PAGE demonstrated a major band which migrated with an apparent Mr of 70,000 under reducing conditions. This band was not found when human or rabbit IgG coupled Sepharose 4B were used instead of Fn as control.

Key-words : *Plasmodium falciparum*. Human fibronectin.

Introduction

Des études antérieures ont montré que l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes de *P. falciparum* fait intervenir l'attachement des mérozoïtes à la membrane érythrocytaire (Hermentin *et al.*, 1984). Cette interaction surface mérozoïte-érythrocyte met en jeu des ligands érythrocytaires et des récepteurs de surface

* Unité 42 INSERM, 369, rue J.-Guesde, F 59650 Villeneuve-d'Ascq.

** Unité 167 INSERM, UA 624 CNRS, CIBP, Institut Pasteur, boulevard Louis-XIV, F 59000 Lille.

Accepté le 18 août 1987.

des mérozoïtes (Perkins, 1982, 1984) ou des molécules parasitaires pouvant jouer le rôle de ponts entre parasite et cellule-hôte (Perlman *et al.*, 1984 ; Camus et Hadley, 1985). Ces interactions ont donc un rôle potentiel important dans l'invasion et tout système interférant avec elles peut être exploité dans un but protecteur.

Récemment une inhibition *in vitro* de l'invasion par la fibronectine humaine a été observée et une étude par immunofluorescence indirecte a montré que la fibronectine se fixait sur les schizontes (Ouaissi *et al.*, 1985). Par ailleurs, les observations de Soulier *et al.* à propos d'un cas d'accès pernicieux à *P. falciparum* ont montré l'existence d'une relation inverse entre la concentration plasmatique de fibronectine et la parasitémie, ce qui suggère également une interférence entre cette molécule et la multiplication du parasite. Ces auteurs évoquent, en outre l'existence d'un dépôt de fibronectine à la surface des érythrocytes parasités qui pourrait intervenir dans le mécanisme de séquestration des parasites. Ces résultats suggéraient l'existence de molécules liant la fibronectine chez *P. falciparum* mais celles-ci n'avaient pas été identifiées.

Nous reportons dans cet article l'isolement par chromatographie d'affinité d'une protéine de *P. falciparum* qui se lie spécifiquement à la fibronectine plasmatique humaine.

Matériel et méthodes

CULTURE « IN VITRO » DE « *P. FALCIPARUM* » ET SYNCHRONISATION

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé la souche FCR₃ (Jensen et Trager, 1978). Les parasites sont cultivés à 37° C dans des hématies du groupe O Rh+ en milieu RPMI 1640 contenant 10 % du sérum humain A+ (Trager et Jensen, 1976).

La culture (12 % de parasitémie) est synchronisée par un traitement au sorbitol (Lambros et Vanderberg, 1979) suivi huit heures plus tard d'une incubation pendant 16 heures dans un milieu contenant 1,5 µg/ml d'aphidicoline (Inselburg *et al.*, 1984).

On procède à un lavage et une réincubation de la culture pendant six heures avant le marquage.

MARQUAGE A L'ISOLEUCINE TRITIÉE

Un culot de 500 µl de globules rouges contenant les parasites synchronisés (8 % de parasitémie) est lavé avec du RPMI 1640 dépourvu d'isoleucine (Gibco, Sélectamine Kit), puis incubés pendant 6 heures avec le même milieu (10 ml) renfermant 80 µCi/ml d'isoleucine tritiée (NEN, 100 Ci/mM). A la fin du marquage, la culture est centrifugée à 500 *g* pendant 5 minutes. On élimine le surnageant, le culot est lavé avec du PBS et stocké à - 80°C .

PRÉPARATION DES COLONNES D'AFFINITÉ

La fibronectine humaine (Sigma) est couplée avec de la Sépharose 4B CNBr (Pharmacia, Uppsala, Sweden) à raison de 7 mg de protéines/ml de gel selon les indications du fabricant. Des matrices d'IgG humaines et de lapin ont été également préparées selon la même procédure à partir d'IgG de lapin ou d'IgG humaines purifiées.

PURIFICATION DE LA PLFN

Un culot de 50 μ l d'hématies parasitées (marqués à l'Isoleucine tritiée) est lysé avec 1 ml de PBS contenant 1 % de NP40, 10 μ g/ml de leupeptine, 100 U/ml d'aprotinine, 1 mM de PMSF, 2 mM d'EDTA et 20 mM d'Isoleucine pendant 30 minutes à 4° C.

Après centrifugation à 10 000 *g* pendant 10 minutes à 4° C on récupère le surnageant et on mesure la radioactivité d'une fraction aliquote de 10 μ l précipitée à l'acide trichloroacétique. 20 μ l de fibronectine-Sépharose 4B, IgG humaine-Sépharose 4B, IgG lapin-Sépharose 4B ou de Sépharose 4B sont incubés chacun pendant 2 heures à température ambiante avec 200 μ l de lysat. Après 10 lavages au PBS, les éluions sont réalisées par chauffage à 95° C dans du tampon d'électrophorèse (Tris 62,5 mM pH 6,8 renfermant du SDS 2 %, saccharose 10 %, DTT 0,1 M) (Laemmli, 1970).

DÉSORPTION OU ÉLUTION SPÉCIFIQUE DE LA PLFN PAR LA FIBRONECTINE SOLUBLE

40 μ l de Fn-Sépharose 4B sont incubées avec 400 μ l de lysat parasitaire radioactif comme décrit précédemment. Le gel est divisé en deux volumes égaux. L'une des deux fractions est incubée avec de la fibronectine humaine soluble (7 mg/ml dans du PBS) pendant 10 minutes à température ambiante. Les deux gels sont lavés 10 fois avec du PBS et élués avec du tampon d'électrophorèse Laemmli.

ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE ET FLUOROGRAPHIE

L'analyse des constituants de l'éluat est faite par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Le gel de séparation contient 8 % en acrylamide. En parallèle nous avons déposé dans le gel un échantillon de lysat de globules rouges parasités et des protéines témoins de masses moléculaires connues (Sigma, HMW). Les gels sont colorés au Bleu de Coomassie et les protéines radioactives sont identifiées par fluorographie (Laskey et Mills, 1975).

Résultats

La fibronectine-Sépharose 4B retient une protéine radioactive majeure de masse moléculaire apparente 70 000 daltons (*fig. 1, pistes B, E, H*). Cette molé-

cule (PLFn) ne se lie pas à la Sépharose 4B, ni aux IgG lapin-Sépharose 4B (fig. 1, pistes C et D).

Sur IgG humaine-Sépharose 4B une bande mineure de mobilité électrophorétique comparable à la précédente a été identifiée (fig. 1, piste F); sa masse moléculaire est cependant légèrement plus élevée (72 000 daltons approximativement).

Les colonnes IgG humaines et de lapin fixent d'autres protéines parasites qui sont distinctes de la PLFn.

La chromatographie d'affinité avec des lysats de schizontes marqués à la ^{35}S -méthionine dans les mêmes conditions que le marquage à l'isoleucine tritiée donne des résultats identiques (résultat non présenté).

Lorsque la PLFn radioactive fixée sur Fn-Sépharose 4B est incubée avec de

FIG. 1. — Analyse en gel de polyacrylamide et fluorographie de *P. falciparum* marqué à l'isoleucine tritiée.

- Piste A. Extrait total en Nonidet-P40 (NP40) des parasites métaboliquement marqués.
 Piste B à H. Matériel élué des différentes matrices d'affinité après incubation avec l'extrait PN40 présenté en A.
 Piste B, E, H. Matériel élué de la fibronectine-Sépharose 4B.
 Piste C, D, F. Matériel élué de la Sépharose 4B (C), de l'IgG lapin-Sépharose 4B (D), de l'IgG humaine-Sépharose 4B (F).
 Piste G. Matériel élué de la fibronectine-Sépharose 4B après incubation avec de la fibronectine humaine soluble. La piste H est le contrôle sans incubation avec la fibronectine humaine.
 Les protéines témoins de masses moléculaires connues sont la myosine (205 kDa), la galactosidase (116 kDa), la phosphorylase B (97 kDa), l'albumine bovine (66 kDa), ovalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique (29 kDa).

la fibronectine humaine soluble on observe, après élution de la matrice par le tampon électrophorèse, une diminution importante du signal correspondant à cette molécule par rapport au témoin non incubé (*fig. 1, piste G comparée à la piste H*).

Discussion

La fibronectine qui est une glycoprotéine de haut poids moléculaire, présente dans le sang et dans le ciment intercellulaire, participe à de nombreuses interactions entre la surface cellulaire et le milieu extracellulaire (Yamada, 1983).

Elle intervient dans l'attachement de différents agents pathogènes tels que *Treponema pallidum* (Thomas *et al.*, 1985), *Trypanosoma cruzi* (Ouaissi *et al.*, 1984), et *Leishmania* sp. (Wyler, 1985) aux cellules hôtes. Nous avons récemment montré que la fibronectine pouvait se fixer sur les mérozoïtes se trouvant à l'intérieur des hématies renfermant les schizontes (Ouaissi *et al.*, 1985).

Dans le présent travail, nous avons identifié une protéine de *P. falciparum* de masse moléculaire apparente 70 000 daltons, qui se lie spécifiquement à la fibronectine-Sépharose 4B (PLFn). Cette spécificité est démontrée par l'absence de fixation de cette protéine sur d'autres adsorbants (Sépharose 4B, IgG humaine et de lapin) et aussi par son élution spécifique par la fibronectine humaine soluble.

Les différents essais d'inhibition de la fixation de la PLFn sur la fibronectine-Sépharose 4B par des anticorps antifibronectine humaine se sont révélés négatifs, ce qui suggère une forte affinité de la PLFn pour la fibronectine humaine. Cette affinité reste à démontrer dans les conditions biologiques car nous ne pouvons exclure d'éventuelles modifications de la fibronectine dues à sa purification.

Les résultats obtenus antérieurement par Ouaissi *et al.*, par Soulier *et al.* pourraient être interprétés si la PLFn était localisée en surface des mérozoïtes ou sécrétée lors de l'invasion et si son interaction avec la fibronectine circulante interférait avec le mécanisme d'invasion. Nous tentons actuellement de vérifier cette hypothèse.

Une autre possibilité envisagée par Soulier *et al.* était que la fibronectine pouvait se fixer sur les globules parasités et intervenir dans la séquestration au niveau des endothéliums vasculaires. Cette fixation n'avait pas été observée par Ouaissi *et al.* sur les globules parasités issus de culture *in vitro*. Dans la mesure où la PLFn a été obtenue à partir de tels globules, sa présence en surface des hématies parasitées est donc très improbable.

BIBLIOGRAPHIE

- CAMUS D., HADLEY T. J. : A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science*, 1985, 230, 553-556.
HERMENTIN P., ENDERS B. : Erythrocyte invasion by malaria (*Plasmodium falciparum*) merozoites: recent advances in the evaluation of receptor sites. *Behring Inst. Mitt.*, 1984, 76, 121-141.
INSELBURG J., BANYAL H. S. : *Plasmodium falciparum*: synchronization of asexual development with Aphidicolin, a DNA synthesis inhibitor. *Exp. Parasitol.*, 1984, 57, 48-54.

- JENSEN J. B., TRAGER W. : *Plasmodium falciparum* in culture: establishment of additional strains. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 27, 743-746.
- LAEMMLI U. K. : Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- LAMBROS L., VANDERBERG J. P. : Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages culture. *J. Parasitol.*, 1979, 65, 418-420.
- LASKEY R. A., MILLS A. D. : Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gel by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, 1975, 56, 335-341.
- OUAISSI M. A., AFCHAIN D., CAPRON A., GRIMAUD J. A. : Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature*, 1984, 380-382.
- OUAISSI M. A., DUTOIT E., VERNES A., GUERRET-STOCKER S., CAPRON A. : *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* merozoite invasion by human plasma fibronectin. *Parasitology*, 1985, 90, 227-236.
- PERKINS M. E. : Surface proteins of schizont-infected erythrocytes and merozoites of *P. falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1982, 5, 55-64.
- PERKINS M. E. : Surface proteins of *Plasmodium falciparum* merozoites binding to the erythrocyte receptor, glycophorin. *J. Exp. Med.*, 1984, 160, 768-798.
- PERLMAN H., BERZINS K., WAHLGREN M., CARLSON J., BJORK A. N. A., PATARROYO M. E., PERLMAN P. : Antibodies in malarial sera to antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Exp. Med.*, 1984, 159, 1686-1704.
- SOULIER J. P., PROU O., DUBARRY M., LUILIER M., CANAVAGGIO M., LEE H. : Étude immunologique du paludisme à l'aide d'anticorps monoclonaux. A propos d'un cas d'accès pernicieux à *Plasmodium falciparum*. *Sem. Hop. Paris*, 1984, 24, 1660-1663.
- THOMAS D. D., BASEMAN J. B., ALDERETE J. F. : Fibronectin mediates *Treponema pallidum* cytoadherence through recognition of fibronectin cell-binding domain. *J. Exp. Med.*, 1985, 161, 514-524.
- TRAGER W., JENSEN J. B. : Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 1976, 193, 673-675.
- WYLER D. J., SYPEK J. P., McDONALD J. A. : *In vitro* parasite-monocyte interactions in human *Leishmaniasis*: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect. Immun.*, 1985, 49, 305-311.
- YAMADA K. M. : Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, 32, 761-799.