

CONFÉRENCES SCIENTIFIQUES

BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Les rechutes de paludisme

P. C. C. GARNHAM, F. R. S.

Imperial College Field Station, Silwood Park Ascot Berkshire (G.B.)

M. le Président, distingués Confrères,
Chers Amis, Mesdames et Messieurs,

Presque toute ma vie a été consacrée à l'étude du paludisme. Mon maître était Émile Brumpt, mon livre de classe était le manuel de Marchoux et mon héros, bien sûr, était Alphonse Laveran. Vous ne pouvez imaginer, Monsieur le Président, à quel suprême degré j'ai apprécié l'aimable invitation à participer à cette réunion pour célébrer le centenaire de la découverte des parasites du paludisme par Laveran.

Pendant bien des années je me suis intéressé aux rechutes du paludisme. Beaucoup de chercheurs, dès l'époque des Anciens Grecs, se sont occupés de ce phénomène. Je n'ai pas l'intention de discuter les vieilles idées sur ce sujet, même pas la théorie que le colonel Shortt et moi-même avançâmes en 1948. Nous avions pensé que le problème était résolu. Mais bientôt, nous avons pris conscience de certaines choses qui ne se sont pas accordées avec notre théorie de cycles *répétés* de schizogonie exoérythrocytaire dans le foie. Nous l'avons remplacée par l'hypothèse de latence, soit du sporozoïte lui-même, soit de la forme dans laquelle il se développe. Vous vous rappelez que Shortt et moi-même avons signalé la schizogonie exoérythrocytaire du sporozoïte dans les cellules parenchymateuses du foie après infection, soit par piqûre de moustique, soit par inoculation après la dissection des glandes salivaires. Le seul organe qui agit comme hôte de ce stade du parasite est le foie. Personne ne signale d'autres lieux de croissance. Néanmoins, plusieurs personnes pensent qu'il y a un cycle primaire ou cryptozoïte dans un autre organe.

L'intérêt de ma communication aujourd'hui se trouve dans un exposé de nos recherches des dernières années. Celles-ci sont encore en cours. Cependant, nous pensons que la fin de ces recherches approche.

Avant de décrire ce dernier travail, je dois vous donner quelques définitions des termes — particulièrement du mot « rechute ». Une vraie rechute est la reprise d'activité d'une infection paludéenne survenant après un intervalle variable après la première atteinte. L'origine en est toujours les parasites issus des formes tissulaires latentes. On l'appelle aussi une récurrence. La recrudescence est tout le contraire ; elle est la reprise d'activité, soit clinique, soit parasitaire, que l'on attribue à la survie des formes érythrocytaires.

Dans l'intervalle entre la première atteinte et la rechute, les parasites manquent dans le sang — aussi bien qu'entre une rechute et la suivante. Dans l'intervalle entre les recrudescences, le sang contient toujours des parasites, si peu que ce soit.

Donc la rechute est le résultat de la segmentation d'un schizonte tissulaire du foie ; la recrudescence est le résultat de la multiplication, dans le sang, des parasites érythrocytaires.

Voici quelques caractéristiques de la vraie rechute :

1. Des rechutes sont produites *sporodiquement* par l'infection par sporozoïtes, jamais par des parasites sanguins.

2. L'observation de la réponse de l'infection aux médicaments antipaludiques est un procédé simple de différenciation entre la rechute et la recrudescence. Les schizontocides sanguins comme la quinine ou les 4-aminoquinoléines (chloroquine par exemple) stéri-

lisent complètement les recrudescences, mais assez souvent les vraies rechutes ne sont pas empêchées.

3. Les rechutes se présentent seulement avec certaines espèces de plasmodies qui sont les suivantes :

P. vivax, *P. ovale* chez l'homme ;
P. cynomolgi, *P. simium*, *P. schwetzi*, *P. fieldi*
chez le singe.

Quel est le facteur commun à toutes ces espèces ? Un seul exemple se présente à moi. Dans les globules rouges infectés par ces espèces exclusivement, on trouve des granulations de Schüffner. Il s'agit probablement d'un facteur fortuit.

4. Les rechutes ne se produisent pas dans les infections à *P. malariae* ni à *P. falciparum* chez l'homme ni à *P. inui*, *P. brasilianum*, *P. knowlesi* chez les singes.

Le paludisme à *P. malariae* (fièvre quarte) présente un intérêt considérable. Cette espèce a une vie très prolongée, même de 40 ou 50 ans. Des cas authentiques ont été bien corroborés (j'en ai décrit plusieurs dans mon livre « Malaria Parasites »). Laveran montrait un certain scepticisme à l'égard des cas de latence de 19 ans ou plus ; très justement il a dit que l'on doit vérifier la présence des parasites de paludisme dans un frottis du sang.

Récemment encore, tout le monde croyait que la longévité de la fièvre quarte était infailliblement le résultat de la schizogonie exoérythrocytaire *secondaire*.

Brumpt et Marchoux, tous deux, ont étudié le problème. Marchoux a affirmé qu'il existe d'ailleurs au sujet de la fièvre quarte, une sorte de mystère non encore pénétré. Depuis cette époque, le mystère s'est lentement clarifié. Je vous expose les observations suivantes :

1. *P. malariae* de l'homme et *P. inui* des singes persistent longtemps après l'inoculation de trophozoïtes (par sang infecté). D'ailleurs, le parasite trouvé le plus fréquemment dans les cas provoqués par transfusion de sang est *Plasmodium malariae* ; par exemple, en Roumanie, plusieurs années après l'éradication de l'infection naturelle.

2. Après l'impaludation thérapeutique par *P. malariae*, l'infection est guérie rapidement par l'administration d'un schizontocide sanguin, même après l'inoculation de sporozoïtes.

3. Des chimpanzés inoculés avec des millions de sporozoïtes, ne montrent jamais de formes tissulaires tardives.

4. Les auteurs américains (Collins *et al.*) ont constaté les mêmes résultats avec *P. brasilianum* chez l'homme après piqure de moustiques infectés.

Permettez-moi maintenant de revenir à nos expériences plus récentes.

Depuis longtemps, on a mis en évidence les formes tardives de *P. vivax* dans des coupes de foie de chimpanzés aussi bien que *P. cynomolgi* chez le singe. M. Bray a également signalé la présence de formes semblables de *P. ovale*. Toutes celles-ci ont été trouvées après l'inoculation de millions de sporozoïtes jusqu'à 250 jours auparavant et même plus. En quelques expériences, la découverte des formes tardives a coïncidé avec le jour d'une rechute.

Ces schizontes exoérythrocytaires montrent quelques petites singularités, mais les noyaux sont toujours en cours de division. Il n'y a aucune évidence de latence ; en effet, les schizontes sont semblables à ceux de 7 ou 8 jours, sauf peut-être du fait que leurs contours soient convolutés. Malheureusement, les formes tardives ne sont pas suffisamment nombreuses pour comparer leurs dimensions dans un cas individuel. On ne voit aucune forme de segmentation, ni schizontes plus petits que 5 jours, seulement des schizontes de diamètre de 20 à 40 μm , ronds ou ovales, avec noyaux nombreux et cytoplasme quelquefois flocculé.

Par conséquent, nous sommes arrivés à un point d'interrogation ; nous étions sûrs que les formes latentes existaient mais nous ne connaissions ni leur aspect, ni la sorte de détente qui les rend actives. Plus tard, au Congrès de Parasitologie de Varsovie en 1977, j'ai discuté du problème avec M. Krotoski de la Nouvelle-Orléans : il m'a demandé de collaborer avec lui pour quelques expériences afin de sortir de cette impasse. C'est un expert de la technique d'immuno-fluorescence, surtout pour la mise en évidence des parasites dans des coupes — par exemple les stades exoérythrocytaires de *Plasmodium cynomolgi*. Il pensait que cette technique serait tout à fait adaptée pour la démonstration des jeunes stades des schizontes exoérythrocytaires.

Bien entendu, j'étais tout à fait d'accord. Nous nous sommes donc mis d'accord pour faire une moitié du travail (l'immuno-fluorescence) chez lui, et l'autre moitié en Angleterre, par l'utilisation des colonies de singes et de moustiques de l'École de Médecine Tropicale de Londres.

A Ascot, M. Bray, M. Killick-Kendrick et moi-même ferions les colorations des coupes, etc.

Enfin, avec quelque peine, nous avons obtenu une souche de *Plasmodium cynomolgi bastianellii* (ma propre souche que j'ai isolée en 1959), nous avons acheté, à grands frais, quelques singes (*Macaca mulatta*) et pour finir, ce qui est de la plus grande importance, nous avons augmenté les colonies de moustiques, *A. atroparvus*, *A. stephensi*, *A. balabacensis*, *A. freeborni*. Un grand nombre de ces Anophèles s'était nourri d'un singe infecté. Après 12 jours, les sporo-

zoïtes ont envahi les glandes salivaires ; nous avons disséqué les glandes et une suspension de sporozoïtes a été inoculée à un autre singe. Puis nous avons pris des biopsies de foie après 1 heure, 12 heures, 24 heures, 48 heures, 7 jours, 50 jours, 102 jours et finalement 105 jours (à l'autopsie).

Une moitié de chaque biopsie était conservée chez nous pour faire la coloration de *Giemsa Colophonium*, l'autre moitié était expédié à M. Krotoski de sorte qu'il puisse appliquer sa technique de l'immunofluorescence. Tout le tissu était fixé, soit par la solution de Carnoy, soit par formaline. Nous avons examiné tout de suite nos coupes de biopsie de 7 jours, pour vérifier qu'elles montraient d'abondants schizontes exoérythrocytaires. Nous avons trouvé une moyenne de 38 schizontes par coupe, nombre convenant parfaitement au but fixé.

Nous avons cherché les jeunes formes mais sans succès. Nous avons bien sûr trouvé les formes ordinaires tardives à 50, 102 et 105 jours. Les schizontes contiennent beaucoup de noyaux, plusieurs en division, et des floccules ou grandes vacuoles dans le cytoplasme.

Je laisse la description des résultats décisifs de ces expériences à M. Bray qui s'est rendu aux États-Unis l'an passé pour discuter des progrès étonnants réalisés par M. Krotoski. Cependant, je voudrais dire quelques mots au sujet de l'absence apparente des jeunes formes. Krotoski affirmait leur absence, à l'exception d'un petit nombre de formes signalé dans la biopsie à 48 heures, une moitié du nombre estimé. Où sont les autres ?

Pendant plusieurs années, quelques hérétiques ont avancé l'hypothèse que le sporozoïte n'entraîne pas dans les cellules nobles du foie, mais que le sporozoïte effectuait un cycle primaire dans un autre organe ou tissu. Les cryptozoïtes voyageraient ensuite par le sang jusqu'au foie pour donner naissance à une deuxième génération. Je vous rappelle que certains sporozoaires se développent en deux phases : la première dans les nodules lymphatiques, par exemple *Isoospora*, la deuxième par la pénétration dans les cellules épithéliales de l'intestin. Les parasites du paludisme des oiseaux évoluent également en deux cycles exoérythrocytaires, cryptozoïte et métacryptozoïte, avant l'envahissement des érythrocytes. Chaque phase se déroule environ sur 48 heures. Je crois que nos collègues hollandais ont également constaté une localisation préliminaire de *P. berghei* dans les cellules de Kupffer.

Néanmoins, les plasmodies des primates sont tout à fait différents. A mon avis, il serait fallacieux de comparer les parasites de primates avec ceux des rongeurs ; à plus forte raison avec les espèces aviaires.

Alors comment peut-on examiner ce problème ? La solution m'est venue dans un rêve à Calcutta au mois de janvier ! Il faut inoculer des sporozoïtes de *P. cynomolgi bastianellii* à un singe. Ensuite, il faut prendre des échantillons de son sang environ 48 heures plus tard, par exemple toutes les deux heures entre 40 et 50 heures. Ces échantillons doivent être inoculés à un autre singe. Ces intervalles s'accorderaient avec les heures hypothétiques où les cryptozoïtes se déplacent. Si les singes receveurs sont impaludés, il faut répéter l'expérience pour chercher le lieu où les sporozoïtes effectuent leur premier cycle. Si les singes restent négatifs, on supposera que l'explication de la rareté ou de l'absence de parasites fluorescents à 48 heures se trouve dans le manque d'antigénicité des stades de cet âge. Nous envisageons de faire ces expériences le mois prochain, au cours du projet plus vaste dont M. Bray vous parlera demain.

Je viens de recevoir une lettre très importante du grand malariologue Augusto Corradetti. Il est curieux de savoir pourquoi j'ai nommé les formes tardives : « rechutes ». Il affirme avec raison que celles-ci sont les formes tardives de la première infection. Il les pose en comparaison exacte avec les formes dormantes de sporozoïtes de *P. vivax hibernans*, toutes les formes de cette sous-espèce russe montrent une période d'incubation bien prolongée. Elles ne peuvent donner naissance à une « rechute », parce qu'il n'y a aucune atteinte de première invasion. Corradetti est en désaccord avec notre différenciation stricte entre les termes rechute et recrudescence, et dit qu'on ne peut les distinguer qu'avec peine.

BIBLIOGRAPHIE

- BRUMPT (E.), 1936. — Précis de Parasitologie, 5^e éd., vol. 1. Masson, Paris.
- COLLINS (W. E.), 1978. — Personal Communication.
- GARNHAM (P. C. C.), 1959. — A new subspecies of *Plasmodium cynomolgi*. *Riv. Parassit.*, 20 : 273-278.
- GARNHAM (P. C. C.), 1977. — The continuing mystery of relapses in malaria. *Protozool. Abs.* 1 : 1-12.
- KROTOSKI (W. A.), KROTOSKI (D. M.), GARNHAM (P. P. C.), BRAY (R. S.), KILLICK-KENDRICK (R.), DRAPER (C. C.), TARGETT (G. A. T.) and GUY (M.), 1980. — Relapses in primate malaria : History of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary Note. *Br. Med. J.*, 1 : 153-154.
- KROTOSKI (W. A.), COLLINS (W. E.), BRODERSON (J. R.), WARREN (M.) and KROTOSKI (D. M.), 1978. — The two-day exoerythrocytic form of *Plasmodium cynomolgi* : detection by immunofluorescence. *Proc. 4th inter. Congr. Parasit.* C-2 : 60-61.
- LAVÉLAN (A.), 1893. — *Paludisme*. Traduit par J. W. Martin. New Sydenham Soc., London.

MARCHOUX (E.), 1926. — Paludisme. Baillière, Paris.
 Organisation mondiale de la santé, 1964. — Terminologie du Paludisme et de l'Éradication du Paludisme. Geneva.
 SHORTT (H. E.) and GARNHAM (P. C. C.), 1948. — Demons-

tration of a persisting exoerythrocytic cycle in *Plasmodium cynomolgi* and its bearing on the production of relapses. *Br. Med. J.*, 1 : 1225-1228.
 VERHAVE (P.), 1980. — *Journal Nuclear Research*. (in press).

L'hypnozoïte de *Plasmodium cynomolgi*

R. S. BRAY

Department of Zoology and Applied Entomology, Imperial College, London (G.B.)

M. Garnham a exposé les grandes lignes de notre expérience visant à trouver les formes exo-érythrocytaires très jeunes dans le foie, c'est-à-dire les formes vues deux, douze, vingt-quatre et quarante-huit heures après l'inoculation de beaucoup de sporozoïtes. Une de nos intentions était de voir si les cellules de Kupffer étaient impliquées.

Douze millions de sporozoïtes de *Plasmodium cynomolgi bastianellii* ont été inoculés intraveineusement à un singe rhésus et les biopsies du foie faites à deux heures, douze heures, un jour, deux jours, sept jours, cinquante jours, cent jours et cent cinq jours après l'inoculation.

Ces biopsies ont été fixées au Carnoy et coupées pour la coloration avec le Giemsa et pour la coloration immunofluorescente avec, pour les deux, le sérum anti-sporozoïte et le sérum anti-trophozoïte par M. Krotoski à New Orleans aux États-Unis.

À notre surprise la première découverte a été effectuée quand M. Krotoski a coloré les formes de sept jours pour vérifier les techniques et pour connaître le nombre de formes normales de sept jours à voir dans les coupes. Pendant que M. Krotoski trouvait de nombreuses formes de sept jours normales par les techniques d'immunofluorescence, il trouvait aussi une forme qui se colorait brillamment et qui mesurait approximativement cinq microns de diamètre. Quand cette forme a été colorée avec le Giemsa elle s'est révélée être un petit organisme avec un noyau unique et situé dans un hépatocyte. Malheureusement le lavage avec le sérum physiologique tamponné pendant la coloration immunofluorescente n'a pas permis une coloration satisfaisante du cytoplasme par le Giemsa.

Des formes semblables ont été trouvées dans la biopsie cinquante jours mais moins nombreuses. Quelques grandes formes étaient trouvées aussi à cinquante jours.

Une recherche soigneuse, hépatocyte par hépatocyte, des coupes colorées par le Giemsa, mais sans la coloration immunofluorescente, a mis en évidence plusieurs de ces formes avec une meilleure coloration du cytoplasme.

Après cette découverte nous avons regardé une coupe d'une biopsie de sept jours d'un singe très fortement infecté avec les sporozoïtes de *Plasmodium cynomolgi cynomolgi* il y a vingt-cinq ans. Nous avons trouvé encore onze autres petites formes avec un aspect un peu différent. Donc, voici les formes que nous avons nommé les hypnozoïtes et que nous croyons être la cause des rechutes du paludisme. Nous pensons que ces formes dérivent des sporozoïtes. Ils adoptent une forme ronde dans l'hépatocyte, mais ils ne poussent pas immédiatement. Quelque temps plus tard une partie de ces hypnozoïtes commence à grandir, puis ils se rompent et entraînent une nouvelle infection érythrocytaire. Plus tard une autre partie commence à pousser ce qui entraîne une autre rechute et ainsi de suite. Les intervalles entre le début de l'évolution pour chaque groupe différeraient selon les espèces.

Mais, il y a un problème, c'est que nous n'avons pas trouvé les formes de deux heures, douze heures et vingt-quatre heures dans le foie par l'immunofluorescence et nous préparons de nouvelles expériences destinées à nous apporter plus d'information sur l'activation des groupes des hypnozoïtes et sur les formes exo-érythrocytaires qui commencent leur développement.