

asexué. Le stade inductible n'est peut-être pas le même pour toutes les espèces, car, chez *Plasmodium vivax*, on observe parfois *in vivo* une rosace et un gamétocyte simultanément présents dans la même hématie.

La mise en observation d'une gamétocytogenèse synchrone déclenchée dès le début de la culture d'une souche de *P. falciparum* a permis de mesurer le délai de maturation des gamétocytes. Entre le premier stade différenciable de la lignée sexuée (stade II de la gamétocytogenèse) et la forme mûre en croissant (stade V), il s'écoule un délai minimum de 8 jours.

La maturité, évaluée par la capacité des gamétocytes mâles à ex-flageller, est obtenue au 13^e jour de l'évolution sexuée. Observée en microscopie à fond noir sur un échantillon de la culture placé entre lame et lamelle, l'ex-flagellation survient après 30 à 40 mn, temps nécessaire à l'alcalinisation spontanée de la préparation par départ du gaz carbonique dissous.

La poursuite du cycle plasmodial chez l'anophèle a été recherchée chez deux espèces, *A. gambiae* et *A. stephensi*, vectrices naturelles de *P. falciparum*. Pour chaque essai, 50 femelles à jeun de 3 à 7 jours sont mises en présence de l'échantillon de culture (1,4 ml) placé dans une chambre thermostatée à 38° C, et se gorgent à travers une peau de souris fraîchement sacrifiée. Les anophèles gorgés sont ensuite placés à 26° C dans un insectarium à 70 % d'humidité. La dissection, effectuée entre le 14^e et le 20^e jour suivant le repas infestant, permet d'observer un développement folliculaire variable avec une fois sur quatre la présence d'œufs. Dans une première série d'infestations portant sur 180 anophèles, il n'a pas été observé d'ocystes, ni de sporozoïtes.

Une des difficultés de l'essai de passage de souche

chez l'anophèle est le maintien en attente des gamétocytes parvenus à maturité, la maturation n'étant que rarement synchrone. Une fraction des gamétocytes mûrs s'active spontanément *in vitro* (circularisation), peut-être même lors des opérations de renouvellement de milieu. Cette sortie prématurée de quiescence des gamétocytes les rend alors non infestants.

Pour apprécier les facteurs susceptibles de moduler la production sexuée *in vitro*, il est nécessaire de mesurer le taux de conversion des formes asexuées. On peut, pour cela, estimer la proportion relative de gamétocytes de stade II dans une culture et de jeunes trophozoïtes non différenciés 2 jours plus tôt dans la même culture.

La production de gamétocytes est optimale en l'absence de renouvellement des hématies avec le milieu RPMI 1640 enrichi par addition de 50 % de sérum humain. Une production similaire peut cependant être obtenue avec un autre milieu (NCTC 135) ou avec un autre sérum (lapin). Le sérum de lapin permettant d'obtenir des gamètes mûrs, un facteur sérique humain n'est donc pas indispensable au développement de la voie sexuée.

A l'heure actuelle, aucun facteur déclenchant spécifique n'a pu être mis en évidence. Deux éventualités restent envisageables :

— simple commutation du cycle après un certain nombre de schizogonies sous la dépendance d'un facteur génétique dont l'expression pourrait être accélérée ou retardée en fonction des conditions d'environnement ;

— intervention d'un signal externe au parasite qui déclencherait la gamétocytogenèse à partir d'une forme asexuée.

Interactions hôte-parasite dans le cycle érythrocytaire des *Plasmodium*

L. PEREIRA DA SILVA

Unité de Parasitologie Expérimentale, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur-Roux, 75725 Paris Cedex 15

La phagocytose est toujours envisagée comme un mécanisme central de défense des organismes animaux par l'ingestion et la destruction intracellulaire des agents pathogènes. On oublie souvent qu'elle fournit le moyen de pénétration chez les cellules d'une

série de parasites à habitat intracellulaire. C'est bien le cas particulier des plasmodies parmi les sporozoaires en général.

La localisation des plasmodies à l'intérieur des phagosomes pendant tout son cycle érythrocytaire est

maintenant bien établie (1) (*). Il a été également démontré que l'entrée du parasite dans le globule rouge se développe par un processus d'endocytose (2, 3, 4). Si l'on retient les termes de pynocytose pour décrire toute intériorisation par la cellule avec la formation de vésicules, de molécules en solution, ou de petites particules (précipités protéiques, colloïdes, ferritine, etc.), et de phagocytose pour décrire l'intériorisation de grandes particules (5), l'endocytose du mérozoïte par le globule rouge est le fait d'une phagocytose par un phagocyte non professionnel (6, 5).

Cette optique actuelle du processus de pénétration des parasites dans les cellules hôtes s'éloigne de celle que l'on a sur la pénétration des virus. Pour un certain nombre de virus animaux et surtout pour les virus bactériens, on sait actuellement que la pénétration dépend premièrement d'une interaction moléculaire précise entre une structure virale et un récepteur localisé dans la membrane de la cellule hôte. Secondement, on assiste à l'activation de structures contractiles du virion qui résulte dans l'injection de l'acide nucléique viral dans le cytoplasme cellulaire. Cela ne se produit apparemment pas par une perforation de la double couche lipidique de la membrane. Dans le cas de certains bactériophages où l'analyse du phénomène a été poussée à l'échelle moléculaire (7) le récepteur est une protéine transmembranaire dont la fonction cellulaire est de perméase pour des substrats particuliers, le « canal » étant probablement utilisé pour la pénétration de l'acide nucléique viral. Pour des virions animaux, des récepteurs spécifiques ont également été définis, comme pour les virus de la poliomyélite et de l'influenza dans l'érythrocyte humain.

Des récepteurs spécifiques sont également définis dans les deux conditions les mieux étudiées parmi les différents types d'endocytose : la phagocytose par les macrophages de mammifères avec médiation d'immunoglobulines et/ou de facteurs du complément et la pynocytose de protéines sériques (lipoprotéine, α -2-macroglobuline) et certaines hormones (insuline, facteur de croissance de l'épiderme) par des cellules de mammifère en culture.

Dans la phagocytose, deux phases peuvent être distinguées (6) : (a) la fixation de la particule à la membrane par les récepteurs ; (b) l'intégration de la particule. La deuxième phase dépend d'une activité métabolique cellulaire qui résulte dans l'invagination de la membrane qui intériorise la particule (ou l'émission de pseudopodes qui l'englobent). Elle comprend plusieurs événements, peu compris au niveau moléculaire, dont résulte l'activation des éléments contractiles (actine, myosine). Pour expliquer l'ingestion des par-

ticules couvertes d'IgG ou C3b, Griffin *et al.* (8) ont proposé un modèle — de la fermeture éclair — selon lequel elle se développe par l'interaction séquentielle des récepteurs Fc ou C3b de la surface des phagocytes avec les ligands distribués à la surface de la particule.

Davies *et al.* (9), pour leur part, proposent un autre modèle pour expliquer l'endocytose d'hormones polypéptidiques et α -2-macroglobuline, selon lequel la fixation des ligands à des récepteurs mobiles et diffusés dans la membrane provoque son agglomération, ce qui détermine des altérations dans le flux de Ca^{++} , l'activation d'une transglutaminase qui à son tour produit la formation de « cross linkage » de protéines sous-membranaires attachées au système du cytoskélète.

On ne sait pas si la phagocytose de particules assez diverses comme de latex, de silice, zymosan et de débris cellulaires ou cellules sénescents sont dépendantes de la présence des récepteurs. Puisqu'il a été montré que le traitement par trypsine affecte l'ingestion de certaines de ces particules (10) sans affecter pour autant la phagocytose d'autres, il faut conclure à la participation de facteurs membranaires dans les phagocytes auxquels Silverstein *et al.* proposent le nom de récepteurs phagocytaires non spécifiques (5).

La participation de récepteurs spécifiques dans l'interaction mérozoïte-globule rouge a été postulée pour expliquer le phénomène de spécificité parasitaire reconnu depuis longtemps par les parasitologistes parmi les sporozoaires en général et les plasmodies en particulier. Cette spécificité est d'une double nature : d'abord en relation à l'espèce animale parasitée ensuite en relation à la population cellulaire cible de l'invasion par le parasite.

Récemment la description morphologique détaillée du processus de pénétration des mérozoïtes de *P. knowlesi* dans l'érythrocyte (4, 11) a apporté des éléments en faveur de l'idée que l'interaction mérozoïte-érythrocyte dépend de l'interaction entre récepteurs présents dans la membrane des érythrocytes et des ligands situés à la surface du mérozoïte. L'événement se passe en deux étapes : d'abord on observe le contact entre érythrocyte et mérozoïte qui débute par n'importe quel point du parasite, suivi d'un glissement libre du parasite sur la surface du globule jusqu'à ce que, éventuellement, la région apicale du mérozoïte contacte la membrane du globule. Cela déclenche la deuxième étape qui consiste dans la formation d'une jonction interne des membranes du parasite et du globule et l'invagination de la membrane de l'érythrocyte provoquant l'internalisation du parasite. Pendant toute la pénétration, le parasite et le globule restent

(*) (1 à 22, voir Bibliographie.)

en contact intime par la jonction membranaire qui se déplace au long de l'orifice de pénétration (11).

Des études pour déterminer la nature chimique de tels récepteurs n'ont pas pour l'instant permis de les identifier. Les études les plus intéressantes à ce sujet ont été développées par Miller *et al.* (12, 13) sur la corrélation entre le facteur globulaire Duffy et la résistance à l'invasion par les mérozoïtes de *P. knowlesi*. Une corrélation clinique et épidémiologique avait, auparavant, été établie entre la résistance des populations d'Afrique de l'Ouest au *P. vivax* et le facteur Duffy (13). Miller et ses collaborateurs ont d'abord montré *in vitro* que les érythrocytes humains Duffy négatifs sont résistants à l'infection par *P. knowlesi*. Cette résistance peut-être induite chez les globules Duffy positifs par traitement par la chimiotrypsine, mais non par la trypsine.

Les mérozoïtes de *P. knowlesi* sont capables de se fixer sur les globules rouges humains Duffy négatifs mais ne forment pas la jonction apicale caractéristique du début de pénétration. Le fait remarquable est que le traitement des globules Duffy négatifs (résistants) par la trypsine (qui n'induit pas la résistance chez les globules sensibles) les rendent sensibles à l'infection. La jonction apical-mérozoïte-érythrocyte est alors formée et la pénétration s'ensuit (14).

Ces résultats montrent que le facteur Duffy n'est pas le récepteur pour *P. knowlesi* mais que chez les globules Duffy négatifs le(s) récepteur(s) seraient cachés par des protéines de la membrane et révélés à la suite de la digestion par la chimiotrypsine.

Les résultats d'expériences similaires réalisées avec *Plasmodium falciparum* indiquent que les récepteurs de surface des érythrocytes humains seraient différents de ceux pour *P. knowlesi* puisque les premiers sont résistants au traitement par la chimiotrypsine et sensibles au contraire au traitement par la trypsine surtout si en association avec la neuraminidase (15).

Si les études citées apportent des éléments importants favorables à l'existence de récepteurs spécifiques responsables pour la fixation et la pénétration des mérozoïtes il en résulte toutefois que beaucoup d'observations et de résultats expérimentaux sont contradictoires avec cette interprétation.

Il faut rappeler par exemple que le concept de spécificité chez les *Plasmodium*, comme chez les sporozoaires en général n'est pas obligatoirement si strict. Pour parler du plus important des plasmodies humains, *P. falciparum*, son caractère strict a été mis en cause par la découverte d'un spectre assez large de primates sensibles (16) en particulier les singes et les marmosets du Nouveau Monde. C'est vrai qu'on peut penser à des récepteurs de structure assez conservée évolutivement chez les érythrocytes de primates. Il est déjà

plus difficile de comprendre l'observation de Welde *et al.* (17) qui a adapté le *P. berghei* à des primates. Plus déconcertantes sont les vieilles expériences de Mc Ghee (18) qui, par des transferts successifs de sang d'embryon de poulet infecté à la souris a réussi à adapter à celui-ci le *P. lophurae* parasite d'oiseaux. Également difficiles à comprendre sont quelques résultats de Greenberg (13) concernant la virulence de *P. berghei* chez différentes souches co-sanguines de souris : *P. berghei* comme l'on sait parasite préférentiellement les réticulocytes. Dans une série de travaux les auteurs ont d'abord mis en évidence que la capacité d'invasion précoce des érythrocytes mûrs par *P. berghei* varie avec la souche de souris considérée. Dans les souches sensibles près de 50 % des érythrocytes sont infectés autour du 6^e jour pour tomber après à des chiffres très faibles. Des souches résistantes montrent moins de 5 % d'érythrocytes infectés au 6^e jour. Les différences peuvent être expliquées par des particularités génétiques des souches déterminant la persistance plus ou moins durable de récepteurs propres aux réticulocytes dans les érythrocytes circulants. Il est pourtant difficile de comprendre comment, après transfert du parasite d'une souche de souris sensible à une souche résistante, celle-ci se comporte comme sensible aux premiers deux transferts pour reprendre le cours normal après 3 ou 4 passages.

Malgré la spécificité adaptative que les *Plasmodium* ont soumis pendant leur évolution, ils gardent leur caractère de vrais coccidies et la structure des mérozoïtes garde les caractéristiques générales des formes infectantes de tous les Telosporae. Ils montrent un complexe apical bien développé où l'on distingue la paire de rhoptries et les micronèmes.

Dans *P. lophurae*, Kiledjan (20) a isolé une protéine très riche en histidine capable d'activer *in vitro* l'endocytose chez les érythrocytes. Cette protéine est probablement un des composants du contenu des rhoptries (21) qui semble se vider lors de la formation de la jonction mérozoïte-érythrocyte (14). La participation active du mérozoïte dans l'endocytose semble donc être essentielle comme le montre, en plus, l'absence d'invasion par des mérozoïtes traités à la cytochalasine, capables pourtant de former des jonctions avec des érythrocytes sensibles (14).

Si l'on admet que la pénétration, elle-même, est le résultat d'une endocytose induite par le parasite une fois fixé sur la membrane elle n'aurait en elle-même aucune spécificité et la pénétration du parasite dans une population cellulaire particulière dépendrait seulement d'une première étape de reconnaissance permettant l'attachement du mérozoïte.

La phagocytose d'une « particule » orientée et participant activement à la pénétration est difficile à

harmoniser avec un modèle du genre de la « fermeture éclair. » D'autre part, l'extension de la région de jonction et l'intimité des interactions membranaires exigeraient, dans un modèle à la Davies *et al.*, une grande densité de récepteurs et une grande affinité d'interaction, difficile à harmoniser avec la préservation évolutive de la sensibilité à l'infection sur un large spectre d'espèces assez éloignées.

La continuation des recherches s'impose donc pour éclaircir la nature du processus de reconnaissance. Une alternative, qui à notre avis peut rendre compte des contradictions soulevées, c'est la participation d'un médiateur dans le processus de reconnaissance et de fixation. De nombreuses protéines sériques sont capables de se fixer sur certaines populations cellulaires. Si les parasites intracellulaires capables d'induire l'endocytose sont sélectionnés pour interagir avec des protéines capables elles d'interagir avec des populations cellulaires précises, ils développent ainsi des enveloppes « souscrites » à l'avance. Les possibilités de souplesse pour avoir la spécificité requise dans l'inter-action parasite-globules rouges sont dans ce cas élargies.

Nous travaillons actuellement sur cette hypothèse. Des travaux en cours nous ont permis de confirmer l'existence, dans la fraction macromoléculaire du sérum, de facteurs (5) qui favorisent l'invasion de globules rouges humains en culture par les mérozoïtes de *P. falciparum* (22).

RÉFÉRENCES

1. RUDZINKA (M. A.) & VICKERMAN (K.), 1978. — In *Infections Blood Diseases of Man and Animals*, Weinman and Ristic ed., vol. 1 : 217, Academic Press, New York.
2. LADDA (R.), AIKAWA (M.) & SPRING (H.), 1969. — *J. Parasitol.*, 65 : 633.
3. DVORAK (J. A.), MILLER (L. H.), WHITEHOUSE (W. C.) & SHIROISHI (T.), 1975. — *Science*, 187 : 748.
4. BANNISTER (L. H.), BUTCHER (G. A.), DENNIS (E. D.) & MITCHELL (G. H.), 1975. — *Parasitology*, 71 : 483.
5. SILVERSTEIN (S. C.), STEINMAN (R. H.) & COHN (Z. A.), 1977. — *Ann. Rev. Biochem.*, 46 : 669.
6. RABINOVITCH (M. P.), 1967. — *Exp. Cell. Res.*, 46 : 19.
7. SCHWARTZ (M.), 1980. — Interactions of phages with their receptor proteins (sous presse).
8. GRIFFIN (F. M.) JR., GRIFFIN (J. A.) & SILVERSTEIN (S. C.), 1976. — *J. Exp. Med.*, 144 : 788.
9. DAVIES (P. J. A.), DAVIES (D. R.), LEVITZKI (A.), MAXFIELD (F. R.), MILHAUD (P.), WILLINGHAM (M. C.) & PASTAN (I. H.), 1968. — *Nature*, 233 : 162.
10. RABINOVITCH (M. P.), 1968. — *Semin. Hematol.*, 5 : 134.
11. AIKAWA (M.), MILLER (L. H.), JOHNSON (J.) & RABBEGE (J.), 1978. — *J. Cell. Biol.*, 77 : 72.
12. MILLER (L. H.), MASON (S. J.), DVORAK (M.), MC GINISS (H.), & ROTHMAN (I. K.), 1975. — *Science*, 189 : 561.
13. MILLER (L. H.) & CARTER (R.), 1976. — *Exp. Parasitol.*, 40 : 132.
14. MILLER (L. H.), AIKAWA (M.), JOHNSON (J. G.) & SHIROISHI (T.), 1979. — *J. Exp. Med.*, 149 : 172.
15. MILLER (L. H.), HAYNES (J. D.), MC AULIFFE (F. M.), SHIROISHI (T.), DUROCHER (J. R.), & MC GINISS (M. H.), 1977. — *J. Exp. Med.*, 146 : 277.
16. YOUNG (M. D.), BAERG (D. C.) & ROSSAN (R. N.) 1975. — *Exp. Parasitol.*, 38 : 136.
17. GARNHAM (P. C. C.), 1966. — *Malaria parasites and other haemosporidia*. Blackwell Sc. Publ. Oxford ; U.K.
18. MC GHEE (R. B.), 1951. — *J. infect Dis.*, 88 : 86.
19. GREENBERG (J.) & KENDRICK (L. P.), 1957. — *J. Parasitol.*, 43 : 420.
20. KILEJIAN (A.), 1976. — *J. Protozool.*, 23 : 272.
21. KILEJIAN (A.), 1978. — In *Biochemistry of Parasites and Host Parasite Relationship*, H. van der Bossche Ed., North Holland, Amsterdam.
22. NIVET (C.) & PEREIRA DA SILVA (L.), en préparation.

Comportement de *Plasmodium falciparum* in vitro

J. LE BRAS
M. PAYET

Institut de Médecine et d'Épidémiologie Africaines, hôpital Claude-Bernard, 75019 Paris

Quatre ans après le premier établissement en culture continue du cycle endoérythrocytaire de *P. falciparum* par l'équipe de William Trager, les perspectives offertes par ce nouveau modèle d'étude du premier agent infectieux mondial apparaissent riches de promesses.

Après une brève revue des conditions de cette culture, nous envisagerons quelques-unes des applications pratiques les plus immédiates de cette nouvelle technique.

Trois facteurs ont une importance primordiale dans le maintien en culture *in vitro* de *P. falciparum*.