

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*.

Ces facteurs sont le milieu de culture, les hématies infestables et l'atmosphère de croissance.

Le milieu de culture le plus fréquemment utilisé est le milieu RPMI 1640. Ce milieu synthétique renferme 21 acides aminés, 11 vitamines ou cofacteurs vitaminiques, 5 anions et 4 cations essentiels ainsi que 2 g/l de glucose. Cette formule relativement simple ne suffit pas aux besoins de l'hématie et du *Plasmodium in vitro* et il est nécessaire d'y ajouter au moins 5 % de sérum humain.

Cette addition de sérum humain est un obstacle, non seulement à la compréhension des besoins du couple érythrocyte-*Plasmodium*, mais aussi à la production en abondance du matériel parasitaire nécessaire aux purifications d'antigènes ou de fractions cellulaires pour les études immunologiques ou biochimiques. Actuellement, seul le sérum de lapin ou plus imparfaitement le sérum de cheval peuvent remplacer le sérum humain. Dans notre expérience, le sérum de lapin est apparu équivalent au sérum humain dans la culture de plusieurs lignées de *P. falciparum*. La nature du ou des facteurs dont la présence (ou l'absence) est nécessaire à la culture reste à déterminer. Il peut s'agir d'un métabolite indispensable au plasmodium, mais peut-être d'un élément maintenant l'intégrité fonctionnelle de l'hématie humaine *in vitro*.

Il faut, en effet garder en mémoire qu'à la différence d'autres cultures de protozoaires, le maintien *in vitro* du cycle asexué de *Plasmodium* consiste à cultiver des hématies humaines en présence de leur parasite spécifique.

Si on utilise le milieu NCTC 135, on apporte en plus du milieu précédent, les précurseurs des acides nucléiques, et plusieurs acides aminés et cofacteurs vitaminiques. Il suffit alors d'ajouter une faible quantité de sérum à ce milieu (0,5 %) pour maintenir la schizogonie *in vitro*. On peut espérer la prochaine adaptation de souches à des milieux entièrement synthétiques, ce qui devrait permettre d'élucider plus aisément le métabolisme intraérythrocytaire de *Plasmodium falciparum*.

Le second facteur essentiel après le milieu est donc l'hématie. C'est en grande partie à ce niveau que réside la spécificité hôte-parasite, une des plus étroites qui soit dans le monde parasitaire.

Considérons séparément la membrane et le stroma érythrocytaire. Le contenu de l'hématie importe peu au *Plasmodium*, pourvu qu'il subvienne à ses besoins en acides aminés. Pour cela, il dégrade l'hémoglobine S aussi bien que l'hémoglobine A. Ainsi que d'autres auteurs, nous avons maintenu une souche de *P. falciparum* dans des hématies de drépanocytaires pendant plusieurs semaines. Tout au plus peut-on évoquer, pour appuyer l'hypothèse de la sélection de la tare

drépanocytaire par le paludisme, une destruction prématurée des schizontes intradrépanocytaires. La diminution de pH consécutive au développement du parasite accélérerait la falciformation et ainsi son élimination. Si ce phénomène limite les effets graves consécutifs à une schizogonie rapide, il est difficilement décelable au niveau de l'individu, et la sélection de la tare n'a pu s'effectuer que très lentement.

En ce qui concerne la réelle préférence du parasite pour les hématies fœtales, la jeunesse membranaire en est certainement plus la cause que la richesse du contenu en hémoglobine F.

La membrane érythrocytaire est par contre essentielle à la pénétration et au développement du *Plasmodium* et elle est le centre d'intérêt de nombreux travaux sur le cycle intra-érythrocytaire. Le mode de pénétration du mérozoïte est maintenant structuralement élucidé, entre autres grâce aux remarquables observations ultrastructurales d'Aikawa. Deux facteurs restent cependant à définir, c'est d'une part la nature et le niveau de spécificité du récepteur sur lequel adhère le glycocalyx épaissi de la partie apicale du mérozoïte et d'autre part la nature d'une éventuelle substance produite au niveau du conoïde plasmodial susceptible d'entraîner les modifications membranaires érythrocytaires à l'origine de l'endocytose du parasite.

Certaines structures membranaires associées au facteur Duffy semblent indispensables à la pénétration de *P. vivax* ou de *P. knowlesi* dans l'hématie humaine. D'autre part, le traitement par des protéases réduit notablement l'infestation des hématies humaines par *P. falciparum* (trypsine mais non chymotrypsine) ou de singe rhésus par *P. knowlesi* (chymotrypsine mais non trypsine).

Des protéines ou glycoprotéines structurales externes à la membrane érythrocytaire semblent donc indispensables à la pénétration du mérozoïte. En outre, ces structures pourraient n'être présentes que sur certains types érythrocytaires pour une même espèce.

Les composants membranaires de l'hématie impliqués dans la pénétration de *P. falciparum* ne semblent pas être les déterminants ou structures associés à un des groupes érythrocytaires humains connus. En effet, des hématies ne possédant aucun de ces déterminants sont parfaitement susceptibles d'être infestées *in vitro*.

Après la pénétration du mérozoïte, la membrane érythrocytaire garde un rôle essentiel dans la constitution de la vacuole parasitophore. Cette dernière est délimitée par la membrane plasmodiale et celle issue de l'invagination membranaire de l'hématie, toutes deux étant fortement remaniées et leurs composants mêlés comme l'a montré Susan Langreth.

La première conséquence est qu'une membrane érythrocytaire incomplète (déficitaire en glucose 6 phosphatédéshydrogénase par exemple) gêne le métabolisme du parasite qui emprunte probablement à l'hématie des systèmes enzymatiques qu'il ne possède pas.

La membrane externe de l'hématie parasitée est elle aussi modifiée lors du développement parasitaire. L'excroissance de microsphérules et de prolongements myéliniques, si elle est plus fréquente chez les hématies parasitées, n'est pas un phénomène spécifique et survient naturellement *in vitro* et *in vivo* en dehors de toute infestation. Par contre, des glycoprotéines et des protéines transmembranaires disparaissent et d'autres, synthétisées par le *Plasmodium*, sont ajoutées à la membrane.

Certaines d'entre elles sont groupées pour former des protubérances (knobs) à la surface de l'hématie. Ces protubérances représentent l'essentiel de l'antigénicité parasitaire présente à la surface de l'hématie hôte. Elles sont le site préférentiel de la fixation des anticorps qui capteront à leur tour le complément sans permettre la cytolyse, mais cette opsonisation favorisera leur phagocytose *in vivo*. *In vitro*, l'ensemble de cette séquence a pu être reproduite pour *P. falciparum*. Il faut cependant noter qu'à long terme, certaines souches perdent, en culture, cette capacité naturelle à former des protrusions antigéniques à la surface de l'hématie hôte.

Il est possible que de tels remaniements membranaires puissent entraîner la reconnaissance non-soi de la membrane érythrocytaire, phénomène qui viendrait alors s'ajouter au recrutement de cellules K dans la genèse de l'érythrophagocytose et de l'hémolyse anémiantes qui s'observent fréquemment à la suite d'accès à *P. falciparum*.

Les protéines mises à part, des lipides d'origine plasmodiale sont incorporés à la membrane érythrocytaire, ce qui aurait pour conséquence une augmentation de la perméabilité de l'hématie hôte.

La membrane érythrocytaire a donc un double rôle dans la pénétration du parasite et dans son métabolisme qui rend compte de l'étroite spécificité plasmodiale. On ne sait pas si les mérozoïtes conservent des déterminants antigéniques d'origine érythrocytaire, ce qui entraînerait le risque de troubles auto-immuns lors de leur éventuelle utilisation vaccinale. Cette difficulté viendrait alors s'ajouter à la variation antigénique intraspécifique de la surface du parasite.

Le troisième facteur essentiel, après le milieu de culture et l'hématie hôte, est d'ordre respiratoire. La culture n'est permise *in vitro* qu'en atmosphère appauvrie en oxygène (0,5 à 20 %) et enrichie en gaz carbonique (1 à 8 %). L'étude des conditions respiratoires

de croissance de *P. falciparum in vitro* a conduit l'an passé Léonard Sheibel à évoquer un métabolisme de type microaérophile. Ceci s'accorde avec l'observation d'une glycolyse qui aboutit à la formation d'acides organiques sans que semble intervenir un cycle de l'acide citrique, donc sans consommation d'oxygène. Le métabolisme énergétique de *P. falciparum* n'est cependant pas encore élucidé ; son imbrication étroite dans celui de l'hématie hôte rend l'étude difficile.

Si ce métabolisme de type microaérophile était une caractéristique d'espèce du plasmodium, on pourrait peut être évoquer la nécessité pour *falciparum* de rechercher les organes profonds de son hôte naturel pour y rencontrer les conditions optimales à sa croissance.

Le *Plasmodium* est peut être à l'origine du quatrième facteur important de la culture. Nous pensons qu'un produit du métabolisme du parasite, c'est-à-dire un composant présent dans le surnageant d'une culture est activateur de la schizogonie. L'addition en faible quantité de filtrat de culture d'une lignée très active a un effet stimulant sur une lignée se multipliant peu.

Parmi les applications pratiques de la culture *in vitro* de *P. falciparum*, trois domaines viennent immédiatement à l'esprit, il s'agit de la vaccination, du diagnostic et de la thérapeutique.

Le premier domaine, bien que bénéficiant de la majorité des efforts de recherche, ne semble pas promettre une application prochaine.

L'intérêt diagnostic de la culture de *P. falciparum* est essentiellement de fournir des quantités importantes d'antigène pour l'immunodiagnostic. Dans ce domaine, des fractions antigéniques spécifiques d'espèce et de stade fourniront peut-être un réactif diagnostique intéressant, à la condition que ces fractions soient antigéniques dans les conditions naturelles de l'infestation et donc que les anticorps correspondants existent chez une majorité de sujets impaludés.

Actuellement, la culture est une source de matériel antigénique de grande sensibilité utilisable en immunofluorescence indirecte, hémagglutination et ELISA pour l'appréciation globale de la trace humorale d'un paludisme. Les préparations standardisées d'antigène *P. falciparum* devraient permettre de limiter la variabilité dans l'appréciation des taux d'anticorps palustres. L'obtention d'immuns sérums de haute affirméité chez l'animal à partir d'extraits plasmodiaux de culture, devrait permettre, par la recherche d'antigènes circulants, de diagnostiquer plus aisément les pauciparasitémies dans les stades précoces de l'invasion.

Mais l'intérêt diagnostic principal devrait être la mesure des anticorps protecteurs. En effet, la pré-

sence d'anticorps palustres dans un sérum rend celui-ci plus ou moins impropre à permettre la croissance *in vitro* de *Plasmodium*. En standardisant ce test, nous espérons pouvoir étudier la relation entre le niveau d'immunité naturelle, le titre des anticorps antiplasmodiaux et le titre d'anticorps inhibant la croissance *in vitro* et ainsi, peut-être, d'apprécier les anticorps protecteurs, bien que les mécanismes cellulaires soient probablement les plus importants dans l'immunité anti-plasmodiale.

L'intérêt pharmacologique, enfin, se situe essentiellement au niveau de l'appréciation de la sensibilité des différentes souches de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines.

Ces substances inhibant, probablement par élévation du pH, les enzymes métaboliques de la paroi de la vacuole nutritive bloquent la croissance des jeunes trophozoïtes. Certaines souches semblent avoir adapté leurs enzymes à fonctionner dans une gamme de pH plus étendue, ce qui serait à l'origine des résistances de souche. Il est donc possible *in vitro*, soit par numération différentielle des trophozoïtes et schizontes, soit par appréciation biochimique de l'activité parasitaire dans une culture, de mesurer la dose minimum inhibitrice de chloroquine sur une souche en culture. Ce test a une application clinique évidente

car il permet, dans une certaine mesure, un paludogramme, plus difficile à effectuer et à interpréter cependant qu'un test d'inhibition de croissance bactérienne.

Nous avons montré récemment que la chimiosensibilité d'une souche n'était pas une valeur fixe et qu'il fallait tenir compte de l'interférence des facteurs d'hôte dans sa mesure à partir du sang du malade. Par contre, après son établissement en culture, la dose de chloroquine inhibitrice de la croissance d'une souche reste stable.

Il faut donc se garder, après avoir considéré les arguments cliniques comme peu fiables dans l'appréciation de résistance de souches, de concéder une valeur absolue à la mesure *in vitro* de la chimiosensibilité à partir de sang du malade. La chimiosensibilité de souche après son passage en hématies et sérum de sujet sain nous semble d'un plus grand intérêt.

Hormis la question des résistances de *P. falciparum* de la chloroquine, l'étude de chimiosensibilité *in vitro* devrait être une méthode d'avenir dans l'étude de nouvelles substances anti-palustres.

Nous concluons, en remarquant cependant que la culture *in vitro* de *P. falciparum* n'est qu'un modèle expérimental qui ne saurait rendre compte de la complexité du paludisme chez son hôte naturel.

### Experience with several isolates of continuous *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum* with special emphasis on the development of mature gametocytes

J. H. E. Th. MEUWISSEN  
T. PONNUDURAI  
A. D. E. M. LEEUWENBERG  
J. P. VERHAVE

*Institute of Medical Parasitology, University of Nijmegen, the Netherlands*

Experience since the fall of 1977 with continuous *in vitro* cultures of *P. falciparum* are briefly reviewed. All cultures were started from cases of *P. falciparum* malaria imported into Holland. 14 Isolates have been established in continuous culture; one of these (NF 7) has been maintained in culture for about 2 1/2 years. We use plastic petri dishes in a modified CO<sub>2</sub> incubator supplied with a gas mixture, consisting of 3 % O<sub>2</sub>, 4 % CO<sub>2</sub> and 93 % N<sub>2</sub>.

Many parameters which influence the growth of the asexual stages of the parasite were studied. These included the composition of the culture medium, the age of the red cells used, the storage conditions of red cells, the gas phase and the pH of the cultures. Comments are made especially in view of their relevance for the production of mature sexual stages of the parasites, i.e. the primary objectives of these cultures.

Optimal induction of gametocytogenesis is tempo-