

PLASMODIUM FALCIPARUM : TAXONOMIE ET GÉNÉTIQUE, APERÇU DES QUESTIONS ACTUELLES.

MOLEZ J. F.

LA SITUATION DU GENRE PLASMODIUM

Le *Plasmodium* responsable du paludisme est un protozoaire parasite intracellulaire, amiboïde, colonisant les hématies et produisant du pigment. Il présente au cours du cycle évolutif, une alternance de reproduction asexuée (schizogonie) évoluant chez l'hôte vertébré et de reproduction sexuée (sporogonie) ayant lieu chez l'hôte invertébré.

Cet hématozoaire fait partie des Coccidies de vertébrés, il appartient au Genre *Plasmodium*, à l'embranchement des SPOROZOA, et à la Sous-classe des HEMATOZOEAE:

- Sous-classe des HEMATOZOEAE
 - Ordre des HAEMOSPORIDA
 - Famille des HEMOPROTEIDAE
 - Genre *Haemoproteus*
 - Genre *Leucytozoon*
 - Famille des PLASMODIIDAE
 - Genre *Plasmodium*
 - Ordre des PIROPLASMIDA
 - Famille des BABESIIDAE
 - Genre *Babesia*
 - Genre *Anthemiosoma*
 - Famille des THELERIIDAE
 - Genre *Theileria*
 - Genre *Hematoxenus*

CLASSIFICATION DES SPOROZOAIRES

Chaque espèce et chaque genre occupe une place bien déterminée au sein d'une Famille, d'un Ordre, d'une Classe et d'un Embranchement. Chez les protozoaires, l'embranchement des Sporozoa est ainsi structuré (Puytorac *et al.*, 1987):

- Embranchement des SPOROZOA (APICOMPLEXA)
 - Classe des BLASTOGREGARINEA
 - Classe des GREGARINEA
 - Sous-classe des ARCHIGREGARINIA
 - Sous-classe des EUGREGARINIA
 - Sous-classe des NEOGREGARINIA

- Classe des COCCIDEA
 - Sous-classe des PROTOCOCCIDIA
 - Sous-classe des EUCCOCCIDIA
 - Ordre des ADELEIDA
 - Ordre des EIMERIIDA
 - Ordre des COELOTROPHIDA
 - Sous-classe des HEMATOZOEAE
 - Ordre des HAEMOSPORIDA
 - Ordre des PIROPLASMIDA

HYPOTHÈSES SUR LA PHYLOGÉNIE DES COCCIDEA

Les Coccidies de vertébrés seraient issues de parasites du coelome ou de dérivés mésoblastiques d'invertébrés qui se seraient adaptés chez les hôtes vertébrés, à des localisations de même origine, puis à des tissus plus spécialisés. La prédation serait le mécanisme de base de la transmission (Landau, 1974), en effet de nombreuses espèces de Coccidies effectuent leur développement complet dans des tissus non digestifs. Aussi il existe une forme de latence disséminée dans tout l'organisme, qui est infectante par prédation pour l'hôte définitif, ces stades sont tantôt le sporozoïte, tantôt un kyste endogénique. Par ailleurs l'acquisition d'une paroi résistante de l'oocyste lui permettant de survivre dans le milieu extérieur serait une adaptation secondaire. Pour certaines Coccidies l'épithélium intestinal constitue un lieu de développement privilégié, non pas semble-t-il parce qu'il représente la première barrière rencontrée par le sporozoïte, mais plutôt une localisation secondaire correspondant à une adaptation à l'expulsion dans le milieu extérieur d'oocystes devenus résistants.

Ainsi les Coccidies intestinales étaient considérées autrefois comme les plus primitives, alors que ce sont elles qui ont atteint le degré d'évolution le plus poussé (ainsi par exemple chez *Toxoplasma* les kystes doivent être considérés comme un phénomène régulier et non pas comme des déviations du cycle).

Chercheur ORSTOM
Laboratoire de Paludologie BP 1386 DAKAR SENEGAL

Il est apparemment plus logique d'imaginer une évolution de complexité croissante que décroissante (Landau, 1974).

LA CONQUÊTE DES VERTÉBRÉS À SANG CHAUD

Les Haemosporida constituent un groupe très diversifié, dont le cycle biologique possède des caractéristiques uniques parmi les Coccidiomorphes de vertébrés, l'ookinète est mobile, les sporozoïtes sont fragiles et le sexe des gamétocytes est souvent bien différenciable morphologiquement. Comme l'a proposé I. Landau (1974), on peut ainsi schématiser (de 1 à 3, ou à 4) l'évolution des sporozoaires :

OOCYTES

1. asporés, se rompant chez l'hôte ou ils ont été formés et libèrent des sporozoïtes qui restent souvent nus
2. asporés et excrétés non rompus dans le milieu excréteur ou sporés mais avec une enveloppe peu résistante
3. asporés, entourés d'une enveloppe protectrice permettant de résister dans le milieu extérieur

FORME DE LATENCE CHEZ L'HÔTE VERTEBRE:

1. sporozoïtes en diapause
2. kystes issus directement des sporozoïtes
3. kystes précédés d'une multiplication endogénique de tachyzoïtes
4. absence de forme de diapause ou latence du sporozoïte

MODE DE TRANSMISSION :

1. uniquement prédation (vertébré/vertébré, ou vecteur/vertébré)
2. mixte : par prédation par l'intermédiaire du milieu extérieur
3. uniquement par le milieu extérieur ou par un vecteur

HOTE VERTEBRE

1. uniquement vertébrés apparus à l'aire secondaire
2. vertébrés à sang froid de l'aire tertiaire
3. vertébrés à sang froid et à sang chaud
4. uniquement des mammifères

La conquête des vertébrés à sang chaud par les Coccidies est le fait des groupes plus évolués qui ont des oocystes résistants. En ce qui concerne les

Haemosporida, on pense à une origine à partir de parasites d'insectes, dont une partie du cycle s'est établie chez des hôtes vertébrés. Ils ont des oocytes polyzoïques asporés, se rompant chez un insecte piqueur et libérant des sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires. La transmission se fait par piqûre de vecteur uniquement. Les formes de latence sont parfois mal connues, ce sont des schizontes à évolution retardée et sont surtout présentes chez les espèces à rechute saisonnière.

LES PROBLÈMES ACTUELS DE LA TAXONOMIE

L'observation au microscope permet en général de décrire les protozoaires avec suffisamment de détails (structure et ultra structure) pour les placer dans un tableau de classification. Interviennent également dans la taxonomie les modalités du cycle évolutif du parasite et sa physiologie. Cependant, malgré l'observation microscopique (optique ou électronique) certains parasites sont indissociables l'un de l'autre par la recherche de critères morphologiques et physiologiques, alors qu'ils peuvent différer par leur pathogénicité, la virulence, la distribution géographique ou le type d'hôte auquel ils sont adaptés. Depuis plusieurs années la taxonomie s'est enrichie de méthodes immunologiques et biochimiques très utiles et performantes. Ces méthodes modernes permettent de connaître la composition biochimique de chaque cellule et de faire l'inventaire du patrimoine génétique d'une lignée de parasites. Elles fournissent un moyen beaucoup plus précis et plus objectif d'identifier un parasite, ce qui reste le but du taxinomiste.

Pour l'hématozoaire *P. falciparum*, à partir des nombreux travaux utilisant la gamme des techniques de typage biochimique, on a montré qu'il existait plusieurs souches de cet hématozoaire. Ces résultats vont dans le sens des remarques effectuées sur la variabilité morphologique de certains stades, les différences de virulence (constatées dans les infections chez l'homme, ou des différences dans le pouvoir infectant selon les espèces anophéliennes), la facilité ou non de production des gamétocytes, etc....

LA CARACTÉRISATION DE L'HÉMATOZOAIRE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

C'est l'apport de toutes les techniques de typage génétique, avec la mise au point de la culture in vitro de cette espèce plasmodiale et des protocoles de clonage, qui ont permis de caractériser des différences géographiques chez ce parasite, mais en restant toujours fidèle au dogme de base qu'il n'existe qu'une seule espèce de *Plasmodium falciparum*. Chaque technique employée a démontré et prouvé la diversité génétique de cet hématozoaire, avec des variations et des fréquences qui peuvent être particulières pour certaines régions.

Les principales techniques utilisées sont :

- les techniques d'isoenzymes en électrophorèse
- les caractérisations antigéniques
- l'électrophorèse des protéines en deux dimensions
- les techniques de PCR
- les variations de structure du génome
- les variations de sensibilité aux différents antipaludéens

Tous les travaux se rapportant à l'étude de la distribution des génotypes de *Plasmodium* ont été réalisés à partir des formes sanguines haploïdes de l'hématozoaire. Ces études ont été réalisées après clonage à partir d'une culture in vitro, quand cela était possible, ou bien sur des prélèvements non clonés («isolats»), lesquels ont montré que chaque infection était une association de plusieurs souches (mélange de plus d'un génotype).

ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ DES SOUCHES DE *P. FALCIPARUM*

• Les isoenzymes

Les formes électrophorétiques des enzymes intracellulaires, sont très utilisées comme marqueur génétique, car elles obéissent à la loi de Mendel. Dans les isolats les isoenzymes sont des marqueurs très pratiques pour affirmer que les infections sont multisouches. Comme la forme intraérythrocytaire du *Plasmodium* est haploïde, après clonage, nous avons par division asexuée une population issue d'un seul individu, qui présentera une seule forme électrophorétique d'un enzyme donné. Ce sont surtout les distributions des formes enzymatiques de la GPI (glucose phosphate isomérase), de la PEP-E

(peptidase-E) et de l'ADA (adénosine désaminase), qui montrent des variations géographiques (Walliker, 1982; Walliker, 1985; Walliker *et al.*, 1987; Beale *et al.*, 1988b).

• Les antigènes monoclonaux

L'utilisation des antigènes monoclonaux contre certains antigènes spécifiques de *P. falciparum* a démontré l'existence de ces variants antigéniques et précisé certains épitopes. Par ailleurs, l'utilisation des sondes d'ADN a permis d'isoler les antigènes de certains gènes, et d'en étudier les séquences d'acides aminés. Ces techniques d'études antigéniques ont aussi permis de démontrer la diversité des souches de cet hématozoaire.

Comme exemple d'études d'antigènes polymorphiques de *P. falciparum*, nous avons un antigène élaboré au cours de la schizogonie intraérythrocytaire, c'est l'antigène S, qui est sécrété dans la vacuole parasitophore puis adsorbé à la surface du mérozoïte. On retrouve cet antigène dans le sérum des paludéens ou dans le surnageant de cultures. On pourra trouver plusieurs antigènes correspondant à l'ag-S, en rapport avec le fait qu'une infection à *Plasmodium* est toujours mixte (multiclone, antigéniquement distincts). Un même ag-S peut être retrouvé sur différents continents, et présenter une variabilité régionale. L'autre exemple de polymorphisme antigénique concerne un antigène qui est ancré à la surface des schizontes, le PMMSA (alias MSA), qui est le précurseur d'un antigène de surface des mérozoïtes. Cet antigène a montré un caractère de variabilité considérable, on a ainsi constaté qu'il existait plusieurs sérotypes distincts, chacun possédant sa propre combinaison d'épitopes variants (Walliker *et al.*, 1987; Beale *et al.*, 1988b; Creasey *et al.*, 1990).

Dans un isolat donné de parasites en culture, il a été démontré que l'antigène-S et l'antigène polymorphique du schizonte et du mérozoïte, sont stables sur une longue période, ainsi il est possible de les retenir et de les utiliser pour la caractérisation et l'étude de la variabilité antigénique des différentes souches de *Plasmodium falciparum*.

• L'électrophorèse des protéines

La technique d'électrophorèse des protéines en deux dimensions (2D-PAGE), permet de caractériser et de comparer les protéines d'après leur point isoélectrique et leur poids moléculaire. Chaque pro-

téine variable est désignée par une lettre (A, B, C, etc....) et chaque variant de chacune de ces protéines et identifié par un nombre (A1, A2, A3, etc....).

La protéine B correspondrait à l'antigène-S, et la protéine A à l'antigène polymorphique retrouvé à la surface des schizontes et des mérozoïtes. Ainsi A1, A2, A3 etc.... seraient les variants alléliques d'une même protéine, les plus connus et les plus étudiés sur le plan de la variabilité sont le MSA 2 (alias «gp 46-53»), et le MSA 1 (alias «gp 190-195»). On a montré pour ce dernier, que les gènes de tous les isolats étudiés jusqu'à présent pouvaient être regroupés en deux familles alléliques, qui correspondraient à deux allèles ; au sein d'une famille il existe de faibles variations de séquence nucléotique, et l'on connaît plusieurs exemples de recombinaison entre les deux allèles (Walliker *et al.*, 1987; Creasey *et al.*, 1990)

CONSIDÉRATIONS SUR LA GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Toutes ces techniques ont montré qu'il existait une variabilité génétique considérable chez l'hématozoaire *P. falciparum*. Toutes les recombinaisons entre les gènes caractérisant les enzymes cellulaires, l'intensité de la virulence, la gamétocytogénèse etc.... sont certainement possibles et se produisent dans la nature. Le fait qu'il existe des concentrations de certains caractères selon les régions fait dire qu'un certain isolement géographique et des différences de pression de sélection permettent à certaines souches de prédominer localement. Par ailleurs la découverte de populations de parasites similaires au point de vue des variants isoenzymatiques ou/et des variants antigéniques, dans des zones géographiques éloignées et différentes, peut faire penser que nous avons affaire à une population panmictique concernant cet hématozoaire. Pour cela il suffirait de vérifier le fait qu'une souche importée à partir d'un continent sur un autre, devrait être capable de subsister et de supporter un échange génétique avec les souches locales, comme cela a été démontré à une échelle géographique moindre pour des populations de *Plasmodium yoelii* de rongeurs (Beale *et al.*, 1988b).

Pour les généticiens de la protozoologie issus principalement de l'Université d'Édimbourg, la reproduction sexuée est majoritairement utilisée chez

les protozoaires (Walliker *et al.*, 1987; Beale *et al.*, 1988a). Ainsi chez *Plasmodium* le modèle qui prévaut à l'heure actuelle est un modèle selon lequel les populations seraient librement panmictiques, les seuls obstacles au flux génique entre populations du parasite sont des obstacles géographiques (Walliker, 1991). Selon ce modèle, rien dans les propriétés biologiques essentielles du parasite ne conduit à un isolement génétique entre souches, l'unité taxinomique utile en recherche appliquée est l'espèce entière et il est vain de chercher à distinguer des «souches» en son sein. L'hématozoaire cumulant les deux avantages de la multiplication sexuée chez le vecteur anophélien et asexuée chez l'hôte humain, l'énorme diversité génétique que présente cet hématozoaire cosmopolite est essentiellement liée au fait que les infections sont toujours multisouches (multisouche dans l'inoculat de l'anophèle et fréquence des piqûres infectantes, parfois multiples par nuit). Comme l'étape de la reproduction sexuée du *Plasmodium* s'effectue chez le vecteur, les possibilités de recombinaisons génétiques sont inévitables et multiples (elles n'intéresseront pas qu'un seul gène) chez l'anophèle qui puise des gamétocytes haploïdes dans une mixture de clones (Dye, 1991; Walliker, 1991).

Cependant ces mécanismes intimes supposés ayant généré cette diversité antigénique ne sont pas encore (ou ne sont plus) bien admis par tous. L'idée d'une hypothèse clonale pouvant être satisfaisante pour expliquer la diversité géographique et la structure génétique des populations de *P. falciparum* est récemment apparue (Keymer *et al.*, 1990; Tibayrenc *et al.*, 1991). En effet les populations de certains protozoaires sont subdivisées en clones naturels, stables dans l'espace et dans le temps, qui constituent l'unité taxinomique au lieu de l'espèce entière, ainsi ce mode de multiplication clonal peut se rencontrer chez certaines familles ou certains genres de *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Entamoeba* et *Giardia* (Tibayrenc *et al.*, 1991). De même la reproduction asexuée uniparentale pourrait être prédominante au sein des populations naturelles *P. falciparum*, et elle serait suffisante pour produire assez de clones stables dans l'espace et dans le temps; la reproduction sexuée ne prévaut pas, elle ne serait qu'accessoirement utilisée, et l'hématozoaire n'y aurait pas systématiquement recours (alors qu'elle est supposée présente dans chaque génération).

Cependant pour les protozoologistes «classiques», plutôt que d'envisager la possibilité d'une apposition de souches distinctes, il est plus satisfaisant d'admettre que la diversité de *P. falciparum* est liée à un échange de gènes. Néanmoins ce qui prévaut toujours actuellement en protozoologie (Dye, 1991) est que ce *Plasmodium* reste bien une espèce unique, où existe un libre échange de gènes au sein d'une population qui est cosmopolite.

BUT ET ORIENTATION DES PERSPECTIVES DE RECHERCHE À VENIR

La méthode employée dans la recherche d'une hypothèse clonale, est l'étude de la fréquence de génotypes au sein d'une population naturelle dans une zone géographique restreinte. Il faut analyser ces fréquences, pour voir si elles correspondent à un mode de reproduction sexué (à partir des fréquences alléliques, faire une interprétation en terme de génétique mendélienne), ou si elles correspondent à un mode de recombinaison libre (absence ou déficit de certains recombinants, ségrégation, fréquence anormalement basse ou élevée de certains génotypes), mettant en évidence un mode de reproduction clonal.

D'assez nombreuses études isoenzymatiques ont été produites ces dernières années concernant *Plasmodium falciparum*, mais les résultats ont été publiés sous une forme qui ne renseigne a priori que fort peu sur la structuration des populations naturelles (fréquences alléliques communiquées séparément pour chaque locus). Les résultats sont très parcellaires du fait de la rareté des données exploitables, cependant pour Tibayrenc *et al.* (1991), ils sont suffisants pour penser que le modèle potentiellement panmictique classique doit faire l'objet d'une révision critique poussée, des indices de structuration de populations de cet hématozoaire sont apparents, et sont actuellement compatibles avec plusieurs hypothèses (cycle uniparental inconnu, espèces jumelles).

S'il existe bien des données sur la génétique formelle de *Plasmodium falciparum*, et si les résultats disponibles sont trop restreints pour réfuter le modèle classique (Dye, 1991), ces renseignements sont très parcellaires en particulier sur la variabilité génétique

concernant des populations naturelles. Aussi il faut maintenant développer une nouvelle approche focalisée sur le mode de reproduction des parasites dans leurs populations naturelles, et visant explicitement à évaluer dans quelle mesure ces populations se structurent en souches stables dans l'espace et dans le temps, génétiquement isolées les unes des autres par des propriétés biologiques intrinsèques. C'est une approche sur le terrain qu'il faut maintenant développer. Elle pourrait combiner deux niveaux d'études : un niveau macrogéographique pour estimer la stabilité des souches dans le temps et dans l'espace sur de vastes aires géographiques (études des variétés géographiques en provenance de différents continents), et un niveau microgéographique (dans une zone limitée d'endémie palustre) pour tester les hypothèses en sympatrie étroite, et cerner les biaisages occasionnés par la distance géographique (qui en elle-même, génère constamment un certain degré d'isolement génétique).

Par ailleurs une étape supplémentaire pourrait être envisagée concernant *P. falciparum*, en appliquant les techniques de typage génétique à des oocystes, qui seraient récoltés sur des estomacs d'anophèles sauvages. Comme ces zygotes sont diploïdes (Cornelissen, 1988), ces typages génétiques pourraient permettre aux généticiens une bonne étude des fréquences des allèles et de rechercher s'il n'existe pas de déviation à la loi d'équilibre de Hardy-Weinberg.

La structure génétique des populations naturelles de *Plasmodium falciparum* est actuellement mal connue, et la nouvelle hypothèse générale concernant l'importance de la reproduction clonale chez les protozoaires parasites qui est maintenant proposée pour ce *Plasmodium* par certains protozoologistes, peut apporter une nouvelle vision des structures de populations de cet hématozoaire. Si elle se confirme, cette hypothèse aura obligatoirement de grandes conséquences taxinomiques et médicales, surtout concernant la compréhension du mode d'apparition, du maintien, ou de la disparition de certaines souches ou de certains caractères (virulence, résistance aux antipaludéens etc....).

BIBLIOGRAPHIE

1. Cornelissen A.W.C.A., 1988 - Sex determination and sex differentiation in malaria parasites. *Biol. Rev.*, 63, 379-394.
2. Beale G.H. and Walliker D., 1988a - Genetics of malarial parasites. *in* : Malaria: Principles and Practice of Malariology. Wernsdorfer W.H. & McGregor I. Ed., Churchill Livingstone London, 1, 379-393.
3. Beale G.H. and Walliker D., 1988b - Biological characterization of malaria parasites of malarial parasites. *in* : Malaria: Principles and Practice of Malariology. Wernsdorfer W.H. & McGregor I. Ed., Churchill Livingstone London, 1, 395-409.
4. Creasey A., Fenton B., Walker A., Thaithong S., Oliveira S., Mutambu S. and Walliker D., 1990 Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 42, (5), 403-413.
5. Day K.P., Koella J.C., Nee S., Gupta S. and Read A.F., 1992 - Population genetics and dynamics of *Plasmodium falciparum*: an ecological view. *Parasitology*, 104, S35-S52.
6. Dye C., 1991 - Population Genetics of Nonclonal, Nonrandomly Mating Malaria Parasites. *Parasitology Today*, 7, (9), 236-Z40.
7. Keymer A.E. and Read A.F., 1990 - The Evolutionary Biology of Parasitism. *Parasitology Today*, 6, (1), 2-3.
8. Landau I., 1974 - Hypothèses sur la phylogénie des Coccidiornorphes de vertébrés. *Z. Parasitenk.*, 45, 63-75.
9. Puytorac (de) P., Grain J. et Mignot J.-P., 1987 - Précis de Protistologie. Société Nouvelle des Editions Boubée & Fondation Singer-Polignac, Paris, ISBN: Z-85004-049-5.
10. Tibayrenc M. and Ayala F.J., 1991 - Towards a Population Genetics of Micro-Organisms: The Clonal Theory of Parasitic Protozoa. *Parasitology Today*, Vol. 7, N° 9, 228-232.
11. Walliker D., 1982 - Genetic variation in Malaria Parasites. *British Med. Bull.*, 38, (2), 123-128.
12. Walliker D., 1985 - Characterization of *Plasmodium falciparum* of different countries. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 65, Suppl. 2, 69-77.
13. Walliker D., Quakyi I.A., Wellems T. E., Mc Cutchan T.F., Szarfman A., London W.T., Corcoran L.M., Burkot T.R. and Carter R., 1987 - Genetic analysis of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 236, (Reports) 1661-1666.
14. Walliker D., 1991 - Malaria Parasites : Randomly Interbreeding or «Clonal» Populations ? *Parasitology Today*, 7, (9), 232-235.