



a 66394

INDEXED

MISE EN EVIDENCE, PAR UNE MICROMETHODE IMMUNO-ENZYMOLOGIQUE (ELISA),
 D'ANTIGENES METABOLIQUES PRODUITS IN VITRO PAR PLASMODIUM FALCIPARUM EN CULTURE¹

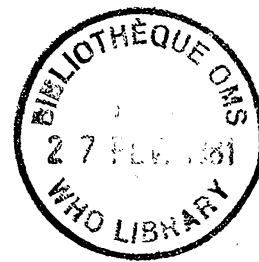
par

Immuno-enzymologie

Pierre Ambroise-Thomas, Xavier Billiault, Pierre T. Desgeorges et M. Bouttaz
 Laboratoire de Parasitologie et Pathologie exotique
 Faculté de Médecine, Université scientifique et médicale de Grenoble
 38700 La Tronche, France

Table des matières

	<u>Pages</u>
1. MATERIEL ET METHODES	2
1.1 Obtention des suspensions de mérozoïtes	2
1.2 Isolement d'immunoglobulines et préparation de conjugués anti- <u>Plasmodium falciparum</u>	2
1.3 Réalisation du test ELISA	3
2. RESULTATS ET DISCUSSION	3
SUMMARY	4
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	4
FIGURE	5



¹ Travail réalisé avec l'aide financière de l'Organisation mondiale de la Santé.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

L'étude antigénique de Plasmodium falciparum est maintenant considérablement facilitée par la possibilité de réaliser des cultures in vitro des parasites, depuis les travaux de Trager et Jensen (Jensen & Trager, 1977; Trager & Jensen, 1976, 1978). Cependant, cette étude s'est jusqu'ici limitée presque entièrement à l'extraction et à la caractérisation d'antigènes somatiques.

Nous rapportons ici les premiers résultats obtenus quant à la cinétique de production d'antigènes métaboliques issus des mérozoïtes libres de P. falciparum.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Obtention des suspensions de mérozoïtes

Les mérozoïtes libres proviennent d'une souche de P. falciparum cultivée in vitro suivant la technique du "candle-jar" (dessiccateur avec bougie de paraffine). D'après une méthode précédemment décrite (Billiault & Ambroise-Thomas, 1980a,b), la suspension d'hématies parasitées est injectée dans une colonne renfermant de la concanavaline A liée à des billes de Sépharose. Les mérozoïtes libérés par éclatement naturel des schizontes mûrs sont élués hors de la colonne par un courant de milieu RPMI 1640 additionné de sérum humain du groupe A+. Par contre, les membranes et les débris érythrocytaires restent fixés à la colonne.

On recueille dans les tubes d'un collecteur de fractions des suspensions pures de mérozoïtes intacts dont la vitalité est vérifiée aussi bien par l'observation en microscopie optique que par la réalisation de subcultures. Le pourcentage de mérozoïtes viables est d'environ 60 %.

Chaque fraction recueillie correspond à une durée d'une heure et demi. Dans cette étude, les mérozoïtes libres sont restés 6 heures environ en suspension dans du milieu RPMI 1640. Dans chaque fraction, on a parallèlement effectué une numération des mérozoïtes et une détection d'antigènes métaboliques. Pour cela, toutes les fractions recueillies sont dans un premier temps stockées à +4°C pour arrêter la multiplication des parasites et la production de métabolites. Ces milieux sont ensuite centrifugés (5000 tours par minute pendant 10 minutes, à +4°C), puis chaque surnageant est filtré sur une membrane de porosité de 0,45 µ. Les filtrats recueillis sont stockés à +4°C jusqu'à la réalisation du test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

1.2 Isolement d'immunoglobuline et préparation de conjugués anti-Plasmodium falciparum

Les immunoglobulines anti-P. falciparum ont été préparées à partir d'un mélange de 4 sérums humains prélevés chez des malades ayant une infection à P. falciparum confirmée avec des titres d'anticorps fluorescents élevés (1/320 à 1/640 en immunofluorescence indirecte face à l'antigène homologue).

Les immunoglobulines ont été extraites par trois précipitations successives par le sulfate d'ammonium à 50 %, puis le précipité ainsi obtenu a été remis en suspension et dialysé contre une solution de NaCl 0,15 M.

Une moitié de ces immunoglobulines a été à nouveau dialysée, cette fois contre une solution de bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 9,6 puis elle a servi à sensibiliser des plaques de microtitration.¹

L'autre moitié des immunoglobulines a permis la préparation du conjugué anti-P. falciparum avec marquage par la peroxydase suivant la technique en deux temps d'Avrameas & Ternyck (1971).

¹ Plaques de microtitration en polystyrène COOK M2908.

1.3 Réalisation du test ELISA

Les dosages ont été réalisés en double aveugle avec une méthode précédemment décrite pour la recherche d'antigènes circulants dans les candidoses profondes (Desgeorges & Ambroise-Thomas, 1979).

Les plaques de microtitration sont sensibilisées pendant une nuit à +4°C par la solution d'immunoglobulines humaines anti-P. falciparum.¹ Ces plaques sont ensuite lavées trois fois avec une solution de NaCl à 9‰ additionnée de Tween 20 (0,05%). On dépose alors, dans chaque alvéole de la plaque de microtitration, 100 µl de filtrat de suspension de mérozoïtes non dilués. Après 60 minutes de contact à 27°C, les plaques sont lavées comme précédemment, puis le conjugué anti-P. falciparum est réparti à raison de 100 µl par cupule.² Après une incubation d'une heure à 27°C les plaques sont lavées puis on ajoute le substrat chromogène, l'orthotolidine, révélateur de la peroxydase (Ambroise-Thomas & Desgeorges, 1978). La lecture est réalisée après 30 minutes, directement dans les plaques de microtitration, à la longueur d'ondes de 630 nm.³

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Pour chacune des 90 fractions recueillies à partir des cultures de P. falciparum, la numération des mérozoïtes ainsi que le dosage des antigènes ont été réalisés à deux reprises, par deux manipulateurs différents. Les résultats (Fig. 1) montrent qu'il existe une corrélation très étroite entre la cinétique d'apparition des mérozoïtes et celle des exo-antigènes. Certes, les densités optiques (DO) mesurées pour le dosage de ces exo-antigènes sont dans l'ensemble très faibles (0,2 au maximum) mais il faut signaler que les réactions témoins réalisées avec des échantillons de milieux recueillis dans les mêmes conditions mais sans contact avec des mérozoïtes ont donné des DO absolument nulles. En outre, avec le dispositif expérimental que nous utilisons et qui permet directement la lecture dans les plaques de microtitration, les DO sont mesurées sur un trajet de 3,3 mm et non pas de 1 cm comme c'est habituellement le cas avec le spectrophotomètre généralement utilisé.

Par ailleurs, le temps d'incubation des mérozoïtes isolés dans du milieu RPMI 1640 additionné de sérum a été volontairement très limité (6 heures environ). Nous souhaitons en effet étudier préférentiellement les antigènes métaboliques élaborés par les plasmodiums et non pas l'ensemble des exo-antigènes libérés dans le milieu après un temps assez long, cet ensemble pouvant aussi bien comprendre des produits d'excrétion ou de sécrétion des parasites que des antigènes cataboliques résultant de la destruction des mérozoïtes. Dans nos conditions expérimentales, il semble bien que seuls les antigènes métaboliques aient pu être décelés puisque les échantillons de milieux ont été soigneusement débarrassés de toute trace de mérozoïtes ou de fragments de mérozoïtes (filtration sur filtre à porosité 0,45 µ) et que par ailleurs la viabilité des mérozoïtes provenant de tous ces échantillons ait été soigneusement vérifiée.

Ces résultats préliminaires demandent à être complétés notamment par l'étude du nombre optimal de mérozoïtes, du volume de milieux de survie fournissant les meilleurs résultats ainsi que de l'étude de différents temps et de conditions variées de contact (température, agitation, etc.). Il est en outre possible que nos résultats aient été en partie faussés par la fixation d'une partie des antigènes métaboliques sur la paroi des tubes ou des boîtes de Pétri en polystyrène utilisées dans ce travail. Une comparaison est en cours avec les résultats fournis par du matériel en verre ordinaire.

¹ Après titrage en damier, on a utilisé une solution d'immunoglobulines à 100 µg/ml dans du tampon bicarbonate de sodium 0,1 M pH 9,6.

² Le conjugué a été employé à la dilution de 1/500 dans du tampon PBS pH 7,2, cette dilution optimale ayant été également déterminée après titrage en damier.

³ Spectrophotomètre VERNON PHI 5.

Malgré ces réserves, il semble bien que cette étude corresponde à la première mise en évidence d'antigènes métaboliques dans des cultures de P. falciparum. Si ces observations étaient vérifiées, il resterait à apprécier l'intérêt de ce type d'antigène pour les études immunologiques (immunodiagnostic, immunisation) dans le paludisme.

SUMMARY

From in vitro culture of Plasmodium falciparum, nearly pure suspensions of free merozoites were obtained after passage through a concanavalin A-Sepharose column. After 6 hours of incubation in RPMI 1640 medium supplemented with human serum, metabolic antigens could be detected using the microtechnique of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). It seems that the antigenic fractions detected are in fact excreted or secreted by the parasite and are not to be considered as catabolic antigens. For each sample, the viability of the parasites was verified. Further investigations are in progress to try to optimize production of the metabolic antigens, to define more precisely their biochemical composition and to assess their value in immunological tests for the study of malaria.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambroise-Thomas, P. & Desgeorges, P. T. (1978) Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. I. Modalités et technique. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 56 : 609-613
- Avrameas, S. & Ternyck, T. (1971) Peroxydase labelled antibodies and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochemistry, 8 : 1175-1179
- Billiault, X. & Ambroise-Thomas, P. (1980) Isolation of Plasmodium falciparum merozoites from cultivated schizonts bound to concanavalin A. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 74 : 249-250
- Billiault, X. & Ambroise-Thomas, P. (1980) Isolation of Plasmodium falciparum merozoites from in vitro cultures by passage through a concanavalin A-Sepharose column (Document non-publié WHO/MAL/80.917)
- Desgeorges, P. T. & Ambroise-Thomas, P. (1979) Détection par immuno-enzymologie (ELISA) d'anticorps et d'antigènes circulant dans les candidoses profondes. Lyon Médical, 241 : 653-657
- Jensen, J. B. & Trager, W. (1977) Plasmodium falciparum in culture : use of outdated erythrocytes and description of the candle-jar method. Journal of Parasitology, 63 : 883-886
- Trager, W. & Jensen, J. B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. Science, 193 : 673-675
- Trager, W. & Jensen, J. B. (1978) Cultivation of malarial parasites. Nature, 273 : 621-622

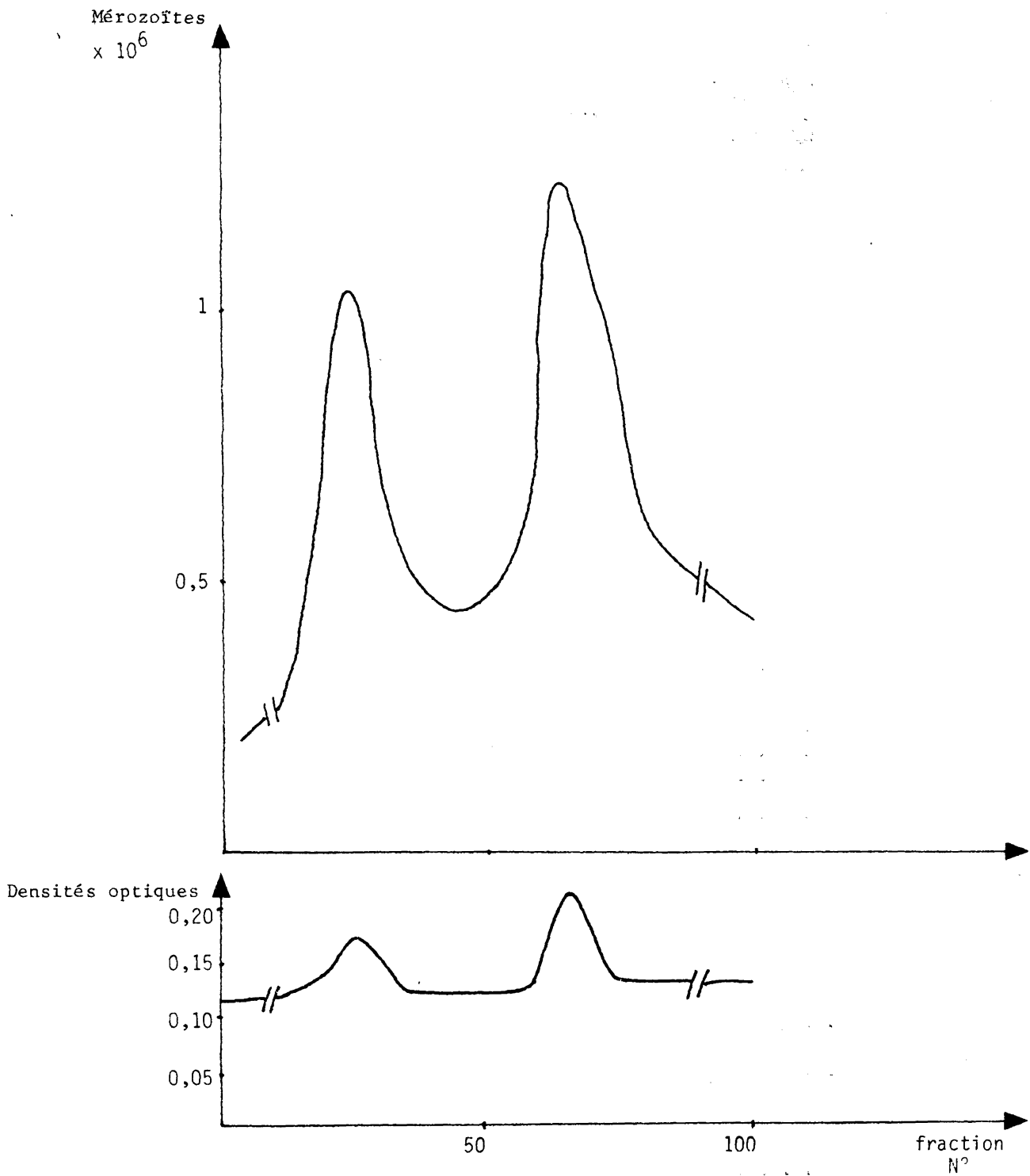


Fig. 1. COURBE D'ELUTION DES MEROZOITES PRODUITS PAR UNE CULTURE DE P. FALCIPARUM ET CINETIQUE DE PRODUCTION D'ANTIGENES METABOLIQUES DECELES EN ELISA

= = =