

a 62359



WHO/Mal/344  
27 avril 1962

ORIGINAL : ANGLAIS

ETUDE DES PARASITES DU PALUDISME PAR LES ANTICORPS FLUORESCENTS<sup>1</sup>

par

A. Voller  
Service de Parasitologie,  
London School of Hygiene and Tropical Medicine

Depuis sa mise au point par Coons (1942), la coloration immuno-fluorescente est très utilisée pour l'étude des bactéries, mais son application aux parasites du paludisme est beaucoup plus récente : en effet, Brooke (1961) montra qu'elle pouvait s'appliquer à Plasmodium berghei. De même, Ingram et al. (1961) constatèrent qu'elle permettait de différencier P. cynomolgi bastianellii de P. gallinaceum et plus récemment, Tobie & Coatney (1961) l'utilisèrent pour colorer P. vivax.

Les lignes qui suivent exposent des travaux préliminaires visant à différencier des espèces et des souches de Plasmodium par la technique des anticorps fluorescents.

Matériel et méthodes

Nous avons utilisé, pour préparer les anticorps fluorescents, la méthode de conjugaison habituelle (Coons & Kaplan, 1950).

On dilue 10 ml de sérum par 10 ml de solution physiologique refroidie à 4°C dans un bécher placé dans un bain de glace. L'agitation est assurée mécaniquement

---

<sup>1</sup> Rapport préliminaire sur des recherches entreprises avec l'assistance financière de l'OMS. Le rapport complet, accompagné de micro-photographies, sera publié plus tard.

et l'on prend soin d'éviter la formation d'écume. On ajoute lentement (en 20 minutes) 20 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à 4°C et l'on poursuit l'agitation 90 minutes. La suspension est alors centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes. Le précipité est lavé avec 20 ml de sulfate d'ammonium à demi-saturation. On centrifuge à nouveau et le précipité de globuline est dissous dans de l'eau distillée.

La solution de globuline est mise à dialyser une nuit en présence d'une solution physiologique tamponnée à pH 7 par un tampon au phosphate 0,01 M (TP), puis elle est filtrée sur une colonne Sephadex G-25; la fraction protéique est récupérée et l'on s'assure au moyen de réactif de Nessler que tout le sulfate d'ammonium a bien été éliminé. On détermine alors le contenu protéique au spectrophotomètre, en mesurant l'absorption à 280 m $\mu$ .

On dilue ensuite la globuline par une solution physiologique et un tampon bicarbonate/carbonate 0,5 M de pH 9 pour obtenir une concentration en globuline de 10 mg/ml et une quantité de tampon égale au quart du volume total. La globuline tamponnée est agitée à 4°C, puis on ajoute lentement, à la surface du mélange de conjugaison, de l'isothiocyanate de fluorescéine en poudre, à raison de 1 mg/20 mg de protéine, et l'on continue l'agitation pendant 18 heures. Le colorant non combiné est séparé du produit de conjugaison par passage sur une colonne Sephadex. Le conjugué ainsi préparé est alors conservé à -20°C dans des flacons miniature. Avant emploi, le produit est absorbé deux fois sur de la poudre de foie de pigeon (100 mg/ml) séchée à l'acétone, puis agité pendant 30 minutes à la température du laboratoire et centrifugé 30 minutes à 25 000 g. Après centrifugation, on ajoute de l'azoture de sodium (0,3 %) et on conserve le produit à 4°C.

#### Préparation des étalements de sang

Des étalements minces ont été séchés à l'air, fixés en une minute par l'acétone à la température du laboratoire, puis séchés rapidement à l'air. Les lames ainsi préparées pouvaient se conserver à 4°C et, sur du chlorure de calcium pendant deux semaines, à la température ambiante, elles devenaient rapidement inutilisables. Immédiatement avant la coloration, les étalements ont été plongés 20 secondes dans le TP.

La coloration directe a été effectuée par application d'anticorps marqués aux étalements pendant 30 minutes, dans une enceinte humide à la température ambiante; les étalements étaient ensuite lavés et montés dans le TP. On a constitué des témoins en testant des sérums marqués non immuns avec des étalements de sang d'animaux infectés et d'animaux non infectés. La coloration indirecte a été faite en appliquant aux étalements, pendant 30 minutes, du sérum (ou de la globuline) immun non marqué. Après lavage, les préparations ont été recouvertes d'anticorps conjugué préparé à partir de la globuline du premier sérum. On a utilisé comme témoins, au premier stade de cette méthode, du sérum non immun non marqué ou de la solution physiologique.

Les sérums témoins proviennent d'animaux ne présentant aucun signe clinique d'infection. Les antisérums ont été obtenus comme l'indique le tableau 1; les étalements ont été faits avec du sang très infecté de rats et de souris (P. berghei et P. vinckei), de poulets (P. gallinaceum souches 8A et 8B et P. juxtannucleare souches 14C et 14A), de singes (P. bastianellii, P. gonderi, P. osmaniae) et d'hommes (P. vivax).

### Résultats

Les résultats de la coloration immuno-fluorescente avec sérums témoins et antisérums homologues ou hétérologues figurent dans les tableaux 2 à 6. C'est la méthode directe qui a donné, en général, les meilleurs résultats car la méthode indirecte produisait une plus grande coloration de fond.

Dans la coloration de P. berghei par le sérum homologue, le cytoplasme du parasite était fluorescent, mais non le noyau (Brooke, 1961). Dans notre travail, les cellules infectées de l'hôte présentaient des granulations fluorescentes bien visibles. Celles-ci étaient plus grandes mais moins nombreuses que celles qu'on a observées dans les étalements provenant de singes infectés après coloration par des anticorps de P. bastianellii ou P. vivax. La granulation était particulièrement nette dans les étalements de P. bastianellii et P. osmaniae.

Les sérums marqués de poulet ont donné une forte coloration du parasite et une très faible fluorescence de fond quand on les a appliqués à des espèces homologues. La coloration n'a pas révélé les granulations antigéniques fluorescentes observées dans le cas des parasites de mammifères.

TABLEAU 1

Production d'antisérums pour différentes espèces de Plasmodium

<u>Espèce de Plasmodium</u>	Hôte	Mode d'infection
<u>P. berghei</u>	Rat 240-260	Inoculation sanguine. Contrôles répétés.
<u>P. gallinaceum 8B</u>	Poulet 96	Inoculation sanguine.
<u>P. juxtannucleare 14C</u>	Poulet 97	Inoculation sanguine.
<u>P. bastianellii</u>	Singe 200	Infection par sporozoïtes. Contrôle par du sang infecté.
<u>P. bastianellii</u>	Singe 227	Infection par sporozoïtes. Contrôle par du sang infecté.
<u>P. bastianellii</u>	Sujet humain 1	Infection par des sporozoïtes.
<u>P. vivax</u>	Sujet humain 1 (Européen)	Infection par piqûre de moustique. Contrôle par sporozoïtes.
<u>P. vivax</u>	Sujet humain* 4 (Africain)	Piqûre de moustiques infectés. Contrôle par du sang infecté.
<u>P. ovale</u>	Sujet humain 6 (Européen)	Infection par piqûre de moustique.

\* On n'a pas trouvé de parasites dans les étalements de sang du sujet humain 4.

TABLEAU 2

Résultats de la coloration obtenue par la méthode directe,  
après contact des étalements de sang avec du sérum de rats marqué à la fluorescéine.  
Le sérum provenait de rats infectés par P. berghei ou de témoins non infectés.

Étalement	Hôte	Sérum	
		Immun à <u>P. berghei</u>	Témoin
<u>P. berghei</u>	Rat	+++	-
<u>P. berghei</u>	Souris	+++	-
<u>P. vinckei</u>	Rat	<u>+</u>	-
<u>P. vinckei</u>	Souris	<u>+</u>	-
<u>P. gallinaceum 8B</u>	Poulet	-	-
<u>P. juxtannucleare 14C</u>	Poulet	-	-
<u>P. bastianellii</u>	Singe	-	-
<u>P. gonderi</u>	Singe	-	-
<u>P. osmaniae</u>	Singe	-	-
<u>P. vivax</u>	Homme	-	-

L'intensité de la fluorescence a été appréciée à l'œil, +++ indique la plus vive coloration; - indique l'absence de coloration; ++, +, + représentent des intensités intermédiaires décroissantes.

TABLEAU 3

Résultats de la coloration obtenue par la méthode indirecte,  
après contact des étalements de sang avec de l'antisérum de rats  
(individus infectés par P. berghei ou témoins non infectés)  
puis avec de la globuline de lapin anti-rat marquée à la fluorescéine

Étalement		Sérum	
Parasite	Hôte	Immun à <u>P. berghei</u>	Témoin
<u>P. berghei</u>	Rat	+++	<u>+</u>
<u>P. vinckei</u>	Rat	+	<u>+</u>
<u>P. gallinaceum 8B</u>	Poulet	+	<u>+</u>
<u>P. juxtannucleare 14C</u>	Poulet	-	-
<u>P. bastianellii</u>	Singe	+	<u>+</u>
<u>P. gonderi</u>	Singe	+	<u>+</u>
<u>P. osmaniae</u>	Singe	+	<u>+</u>

TABLEAU 4

Résultats de la coloration obtenue par la méthode directe,  
après contact d'étalements de sang avec de l'antisérum de poulet marqué à la fluorescéine.  
Les poulets étaient des sujets infectés par P. gallinaceum 8B ou par P. juxtancleare 14C  
ou des témoins non infectés.

Etalement		Sérum		
Parasite	Hôte	Immun à <u>P. gallinaceum</u>	Immun à <u>P. juxtancleare</u>	Témoin
<u>P. gallinaceum 8B</u>	Poulet	+++	-	-
<u>P. gallinaceum 8A</u>	Poulet	+++	-	-
<u>P. berghei</u>	Rat	-	-	-
<u>P. vinckei</u>	Rat	-	-	-
<u>P. bastianellii</u>	Singe	-	-	-
<u>P. gonderi</u>	Singe	-	-	-
<u>P. juxtancleare 14A</u>	Poulet	-	+++	-
<u>P. juxtancleare 14C</u>	Poulet	-	+++	-

TABLEAU 5

Résultats de la coloration obtenue par la méthode indirecte,  
après contact d'étalements de sang avec de l'antisérum de sujets humains infectés  
par P. vivax, P. bastianellii ou P. ovale ou de témoins non infectés  
et avec de la gamma-globuline de lapin anti-homme marquée à la fluorescéine

Etalement		Sérum				
Parasite	Hôte	Immun à <u>P. vivax</u> (1)	Immun à <u>P. vivax</u> (4)	Immun à <u>P. bastia-</u> <u>nellii</u> (2)	Immun à <u>P. ovale</u> (6)	Témoin (3)
<u>P. bastianellii</u>	Singe	+++	++	+++	<u>+</u>	-
<u>P. vivax</u>	Homme	+++	++	+++	N.T.	-
<u>P. osmaniae</u>	Singe	+++	+	+++	<u>+</u>	-
<u>P. gonderi</u>	Singe	+++	+	+++	<u>+</u>	-
<u>P. berghei</u>	Rat	+	N.T.	+	N.T.	<u>+</u>
<u>P. gallinaceum 8B</u>	Poulet	-	N.T.	-	N.T.	-

N.T. signifie qu'aucun test n'a été entrepris.

TABLEAU 6

Résultats de la coloration obtenue par la méthode indirecte, après contact d'étalements de sang avec de l'antisérum entier ou de la gamma-globuline de singes infectés par *P. bastianellii* ou de témoins non infectés et avec de la gamma-globuline de lapin anti-homme marquée à la fluorescéine

Etalement		Sérum			
Parasite	Hôte	Immun à <u><i>P. bastianellii</i></u> (227)	Témoin	Gamma-globuline immune à <u><i>P. bastianellii</i></u> (200)	Gamma-globuline témoin
<u><i>P. bastianellii</i></u>	Singe	+++	-	+++	-
<u><i>P. vivax</i></u>	Homme	+++	-	+++	-

## Discussion

Les fortes réactions croisées observées entre les parasites du paludisme des primates P. vivax, P. bastianellii, P. gonderi et P. osmaniae (tableau 5) font penser que ces parasites ont des antigènes communs, ce qui est assez étonnant, vu les résultats des tests d'immunité croisée. Garnham (1959) n'a même pas constaté d'immunité croisée entre les sous-espèces P. cynomolgi cynomolgi et P. bastianellii. L'absence de toute coloration des espèces précitées lorsqu'elles sont exposées à du sérum immun à P. ovale ne saurait être considérée comme significative tant que ce sérum n'aura pas été appliqué au parasite homologue. Nos observations rejoignent celles de Tobie & Coatney (1961) qui ont constaté une forte réaction croisée entre P. vivax et P. bastianellii, et une plus faible entre ces espèces et P. berghei.

La faible réaction obtenue avec le sérum du sujet humain 4, un Africain, est intéressante car elle pourrait s'expliquer, si on la compare à la réaction plus forte provoquée par le sérum du sujet humain 1 (un Européen), par une immunité génétique naturelle. Les deux malades étaient également immuns à une réinfection par P. vivax.

Les sérums marqués provenant de poulets infectés par P. gallinaceum ou P. juxtannucleare (tableau 4) se sont révélés spécifiques d'espèce mais non de souche. Ceci indiquerait que ces espèces n'ont pas d'antigènes communs et ne possèdent aucun des antigènes des plasmodiums parasites des mammifères. Ingram et al. (1961) ont constaté que les antisérums produits chez le lapin par injection de sporozoïtes de P. gallinaceum pouvaient, une fois marqués, colorer les formes érythrocytaires de P. gallinaceum, mais pas celles de P. bastianellii.

Les hématies infectées ont toutes présenté des granulations fluorescentes chez les mammifères, mais non chez les oiseaux. Tobie & Coatney (1961) ont émis l'hypothèse que les granulations qu'ils ont observées dans des infections à P. vivax et P. bastianellii étaient des grains de Schüffner. Pour notre part, nous avons trouvé des granules fluorescents plus étendus dans des infections à P. berghei où le colorant de Giemsa ne révélait pas de grains de Schüffner. Il est évident que la granulation indique la position du matériel antigénique sur, ou dans, les cellules infectées de l'hôte.

Résumé

On a coloré plusieurs espèces de parasites du paludisme avec des sérums de convalescents par la technique de l'immunofluorescence. On a observé de fortes réactions croisées entre les parasites suivants des primates P. vivax, P. bastianellii, P. gonderi et P. osmaniae. Ces espèces donnaient avec P. berghei des réactions croisées moins fortes. P. gallinaceum et P. juxtannucleare, parasites du paludisme des oiseaux, ont été colorés par des sérums homologues, les réactions étant spécifiques d'espèce mais non de souche. Chez les mammifères, on a observé, dans les cellules infectées de l'hôte, des granulations fluorescentes de nature immunologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brooke, M. M., Melvin, M. & Healey, G. R. (1961) Proceedings of the Sixth International Congress on Tropical Medicine and Malaria, Lisbonne
- Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N., & Berliner, E. (1942) J. Immunol., 45, 159
- Coons, A. H., & Kaplan, M. H. (1950) J. exp. Med., 91, 1
- Garnham, P. C. C. (1959) Riv. Parassit., XX, 4, 273
- Ingram, R. L., Otken, L. B., & Jumper, J. R. (1961) Proc. Soc. exp. Biol. Med., 106, 52
- Tobie, J. E., & Coatney, G. R. (1961) Exp. Parasitol., 11, 128

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur P. C. C. Garnham qui m'a aidé de ses encouragements et de ses conseils, le Dr Cohen qui a procédé à la séparation de la gamma-globuline de singe, et M. P. G. Shute qui m'a fourni les sérums humains.

Le but des documents de la Série WHO/MAL est le suivant :

- a) mettre le personnel de l'OMS, les instituts nationaux, les chercheurs et les travailleurs de la santé publique au courant de l'évolution des recherches sur le paludisme et des progrès de l'éradication du paludisme au moyen d'exposés succincts relatifs à quelques problèmes en cause;
- b) distribuer, aux catégories de lecteurs indiquées ci-dessus, les rapports d'opérations et autres communications qui présentent un intérêt particulier, mais qui ne sont pas normalement imprimés dans les publications de l'OMS;
- c) communiquer aux intéressés différents articles qui sont destinés à la publication mais qui, en raison de leur actualité, méritent d'être rapidement connus.

La parution d'un article dans cette série ne constitue donc pas une publication officielle et un tel article peut donc, avec l'accord de l'auteur et de l'OMS, être publié dans un périodique de l'OMS ou ailleurs.

Les articles signés n'engagent que leurs auteurs. La mention des manufactures et des produits commerciaux n'implique pas que ces maisons ou leurs produits soient recommandés ou approuvés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres.