DÉVELOPPEMENT *IN VITRO* DE SCHIZONTES EXO-ÉRYTHROCYTAIRES DE PLASMODIUMS DE LÉMURIENS¹

F. HOMO*, L. RABETAFIKA**, I. LANDAU*, D. BACCAM***,
J.-P. LEPERS****, D. MAZIER*****, F. MILTGEN***

RÉSUMÉ. Des sporozoïtes de trois espèces de *Plasmodium* de Lémurien ont été obtenus chez des *Anopheles stephensi* gorgés sur deux *Lemur macaco macaco*, l'un infecté naturellement et l'autre expérimentalement. Ils ont été mis en culture sur des hépatocytes de *Lemur fulvus*, de *Lemur macaco*, de Rats et de *Thamnomys gazellae* d'élevage.

Des schizontes ont été observés dans les cultures d'hépatocytes de *Lemur fulvus fulvus*, 5 et 7 jours après le dépôt de sporozoïtes. Ils présentent une enveloppe externe épaisse, des masses acidophiles à la périphérie du parasite et un découpage interne en cytomères.

Les cellules de Rats et de *Thamnomys* ont été réfractaires.

Seuls les sporozoïtes ayant pénétré dans les glandes salivaires ont été infectants.

Des contaminations par levures n'ont pas permis de poursuivre les cultures au-delà du 7^e jour.

Mots-clés : *Plasmodium*. Lémuriens. Cultures. Schizontes hépatiques.

***In vitro* development of exo-erythrocytic schizonts of Plasmodia from Lemurs in hepatocytes of *Lemur fulvus fulvus*.**

SUMMARY. Sporozoites of 3 species of Lemur Plasmodia were obtained in *Anopheles stephensi* fed on one naturally and the other experimentally infected *Lemur macaco macaco*. They were deposited on cultures of hepatocytes of *Lemur macaco macaco*, *Lemur fulvus fulvus*, and laboratory bred Rats and *Thamnomys gazellae*.

Schizonts were seen in cultured hepatocytes of *Lemur fulvus* at days 5 and 7 after sporozoites being deposited. They presented a thick wall, eosinophilic patches at the periphery of the schizont and cytomeres.

1. Ce travail a bénéficié de l'aide financière du Programme spécial P. N. U. D./Banque mondiale/O. M. S. de Recherche et de Formation concernant les maladies tropicales.

* Laboratoire de Protozoologie et Parasitologie comparée, EPHE et Laboratoire de Zoologie (Vers) associé au CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue de Buffon, F 75231 Paris Cedex 05.

** Laboratoire de Zoologie, E. E. S. Sciences, Université d'Antananarivo, B. P. 906, Antananarivo, 101 Madagascar.

*** Laboratoire de Zoologie (Vers) associé au CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue de Buffon, F 75231 Paris Cedex 05.

**** Institut Pasteur de Madagascar, B. P. 1274, Antananarivo, Madagascar.

***** Département de Parasitologie et Médecine Tropicale, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, F 75251 Paris Cedex 13.

Accepté le 13 décembre 1988.

Rats and *Thamnomys* cells were refractory.

Only sporozoites which had entered the salivary glands were infective.

Contaminations by yeasts prevented the continuation of cultures after day 7.

Key-words : *Plasmodium*. Lemurs. Cultures. Hepatic schizonts.

Introduction

Les *Lemur macaco macaco* Linne, 1766 de Madagascar sont parasités par trois espèces de *Plasmodium* : — *Plasmodium coulangesi* Lepers et coll., 1989, — *P. percygarnhami* Landau et coll., 1989, — *P. bucki* Landau et coll., 1989.

La transmission expérimentale des trois espèces, d'un *Lemur macaco macaco* infecté à un *Lemur macaco macaco* et à un *Lemur fulvus fulvus mayottensis* Schlegel, 1826 sains, a été réalisée par l'intermédiaire d'*Anopheles stephensi*. Les trois espèces se sont développées chez le vecteur et ont été transmises à l'hôte vertébré ; il n'a donc pas été possible de différencier de façon spécifique les stades hépatiques. La sporogonie et la schizogonie pré-érythrocytaire *in vivo* sont décrits ailleurs (Rabetafika et coll., 1989).

L'étude *in vitro*, qui fait l'objet de cet article, a été réalisée parallèlement et avec le même matériel que celle du cycle biologique expérimental.

Matériel et méthodes

Les techniques de culture des stades exo-érythrocytaires dans les hépatocytes sont détaillées ailleurs (Lambiotte et coll., 1981 ; Mazier et coll., 1982 et 1984 ; Millet et coll., 1985).

a — EXPÉRIENCES. Deux expériences sont réalisées avec deux lots de sporozoïtes différents.

Première expérience.

Les *Anopheles stephensi* sont gorgés sur un *Lemur macaco* mâle splénectomisé depuis sept jours. Les sporozoïtes n'ont pas envahi les glandes salivaires de façon massive ; ils étaient néanmoins nombreux autour des glandes et dans le milieu de dissection, à partir du 15^e jour.

Les sporozoïtes sont mis en culture sur les hépatocytes de *Lemur macaco macaco*.

Deuxième expérience.

Les Moustiques sont gorgés sur *Lemur macaco* femelle infecté expérimentalement à partir de sporozoïtes obtenus au cours de l'expérience précédente.

Dans cette expérience, les sporozoïtes entrent massivement dans les glandes salivaires le quinzième jour après le gorgement. Ils sont mis en culture sur hépatocytes de *Lemur fulvus*, de Rat « Wistar » et de *Thamnomys gazellae*.

b — CELLULES. Les hépatocytes sont obtenus par perfusion enzymatique avec une solution de collagénase à 0,05 % (P/V), selon la méthode de Seglen (Seglen, 1973), soit de foie entier (Rats et *Thamnomys*) soit d'une biopsie (Lémurien),

Les biopsies de foie de Lémuriens sont effectuées sur des animaux qui ont été infestés 7 jours et 9 jours plus tôt par des sporozoïtes.

Les hépatocytes sont mis en culture en boîte de Pétri en plastique sur toute la surface d'une boîte de 3,5 cm de diamètre (600 000 cellules) et en disque cellulaire de 5 mm de diamètre (monocouche de 10 à 20 000 cellules).

c — INFESTATION DES CELLULES. Les glandes salivaires des *Anopheles* sont disséquées, recueillies dans du MEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal puis broyées.

Les sporozoïtes sont déposés, à raison de 600 000 par boîte entière et 75 000 par disque, sur les hépatocytes de Lémuriens mis en culture depuis 40 heures, et, sur les hépatocytes de rongeurs cultivés depuis 24 heures.

Après 2 heures d'incubation à 37° C et 5 % de CO₂, 2 ml de milieu sont ajoutés dans chaque boîte.

d — ÉTUDE DES PARASITES. Les cultures sont fixées au méthanol et colorées au Giemsa, 5 jours et 7 jours après le dépôt des sporozoïtes ; une contamination par des levures est apparue le cinquième jour mais est restée faible jusqu'au huitième jour ; elles ont alors commencé à proliférer activement et à provoquer le décollement des cellules nécessitant l'interruption des cultures.

Résultats

Seuls les hépatocytes du *Lemur fulvus* dans l'expérience II ont permis le développement des schizontes.

Aspect morphologique (fig. 1 à 5)

Dans chaque boîte, outre les schizontes plurinucléés et de grande taille décrits ci-dessous, nous notons la présence de quelques petites formes uninucléées de taille inférieure à 10 μm (*fig. 1 et 3*). Ces formes ont un noyau qui est moins chromophile que ceux des schizontes aigus ; il est entouré par une bande de cytoplasme basophile.

A 5 jours, l'aspect des schizontes est très variable et en particulier, on observe une assez grande diversité de tailles ; le plus petit mesure 13,5 μm $\times$ 13,5 μm et le plus grand 34 μm $\times$ 49 μm . La moyenne est approximativement de 26 μm

FIG. 1 à 5. : *fig. 1 et 3* : Formes uninucléées non évolutives à 7 jours ; *fig. 2 et 4* : Schizonte à 5 jours ; masse acidophile (petite flèche) accolée à l'enveloppe épaissie (longues flèches) ; *fig. 5* : Schizonte à 7 jours.

La plupart des schizontes ont de grands noyaux groupés au centre en un amas plus ou moins volumineux et plus ou moins découpé ; les plus grands schizontes présentent déjà une disposition interne en cytomères.

A 7 jours, la variabilité de taille est moins importante. A l'exception d'un schizonte de $30\text{ }\mu\text{m} \times 35\text{ }\mu\text{m}$, leur taille s'est considérablement accrue ($46\text{ }\mu\text{m} \times 59\text{ }\mu\text{m}$). Les cytomères se sont fragmentés et les noyaux sont petits.

Dans les schizontes les plus évolués, les noyaux ont migré vers la périphérie.

Chez tous les schizontes, nous notons la présence d'une ou plusieurs masses acidophiles accolées à la membrane plasmique, à la périphérie du parasite (*fig. 2 et 4*) et d'une enveloppe externe épaisse.

A 7 jours de culture, la morphologie des hépatocytes commence à être altérée. Les noyaux sont plus allongés et les nucléoles ne sont plus visibles.

A 9 jours, il n'y a plus de parasites visibles et beaucoup de cellules se sont décollées en raison de la prolifération des levures.

Discussion

Ne disposant pas d'autres Lémurs, les hépatocytes mis en culture puisensemencés avec des sporozoïtes, provenaient de la biopsie de foie d'un *Lemur fulvus* déjà inoculé 7 et 9 jours plus tôt avec des sporozoïtes. Cependant, nous n'avons trouvé aucun schizonte en culture, avant le dépôt de sporozoïtes ; il nous paraît donc presque certain que les schizontes qui ont évolué par la suite se sont développés à partir des nouveaux sporozoïtes déposés sur les cellules.

Nos résultats confirment ceux obtenus *in vivo*, par Rabetafika et coll. (1989) qui n'observent de schizontes que chez le Lémur.

L'absence de développement dans les cellules de Rongeurs inoculés avec les mêmes sporozoïtes que le Lémur démontre l'existence d'une certaine spécificité des sporozoïtes.

Il peut paraître surprenant que les schizontes ne se soient pas développés dans les hépatocytes de l'hôte naturel, *Lemur macaco macaco* (expérience I) alors qu'ils étaient nombreux dans ceux de *Lemur fulvus* (expérience II). Ce résultat peut s'expliquer cependant par des différences d'infectivité des sporozoïtes dans les deux expériences. Dans l'expérience I avec *Lemur macaco*, les sporozoïtes sont restés dans l'hémocèle, autour des glandes salivaires ; ils étaient vraisemblablement moins infectants que dans l'expérience II avec *Lemur fulvus* où ils avaient envahi massivement les glandes.

REMERCIEMENTS. — Nous remercions très vivement les Docteurs Anne Michelap et Laurent Daumas du Service Chirurgical du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière qui ont accepté de pratiquer la biopsie hépatique du *Lemur macaco*. Nous remercions également le service d'accueil de microscopie électronique, C. N. R. S., Université Paris VI qui a réalisé les tirages photographiques.

RÉFÉRENCES

- LAMBIOTTE M., LANDAU I., THIERRY N., MILTGEN F. : Développement de schizontes dans les hépatocytes de rat adulte en culture après infestation *in vitro* par des sporozoïtes de *Plasmodium yoelii*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1981, 293, série III, 431-433.
- LANDAU I., LEPERS J.-P., RABETAFIKA L., BACCAM D., PETERS W., COULANGES P. : Plasmodies de Lémuriens malgaches. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1989, 64, 171-184.
- LEPERS J.-P., RABETAFIKA L., LANDAU I., PETERS W. : Une nouvelle espèce plasmodiale chez un Lémurien : *Plasmodium coulangesi* n. sp. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1989, 64, 163-170.
- MAZIER D., LANDAU I., MILTGEN F., DRUILHE P., LAMBIOTTE M., BACCAM D., GENTILINI M. : Infestation *in vitro* d'hépatocytes de *Thamnomys* adultes par des sporozoïtes de *Plasmodium yoelii* : schizogonie et libération de mérozoïte infestants. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1982, 294, sér. III, 963-965.
- MAZIER D., LANDAU I., DRUILHE P., MILTGEN F., GUGUEN-GUILLOUZO C., BACCAM D., BAXTER J., CHIGOT J.-P., GENTILINI M. : Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. *Nature*, 1984, 307, 367-369.
- MILLET P., LANDAU I., BACCAM D., MILTGEN F., MAZIER D., PETERS W. : Mise au point d'un modèle expérimental « Rongeur » pour l'étude *in vitro* des schizonticides exo-érythrocytaires. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1985, 60, 211-212.
- RABETAFIKA L., LANDAU I., BACCAM D., LEPERS J.-P., COULANGES P., RAKOTOFIRINGA S. : Sporogonie et schizogonie pré-érythrocytaire de plasmodies de lémuriens malgaches. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1989, 64, 243-250.
- SEGLEN P. O. : Preparation of Rat Liver Cells. III : Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp. Cell. Res.*, 1973, 82, 391-398.
-