

Variations enzymatiques
chez *Plasmodium falciparum*
à Brazzaville
(République Populaire du Congo)⁽¹⁾

Jean-François MOLEZ⁽²⁾, Pierre CARNEVALE⁽²⁾,
Andrew SANDERSON⁽³⁾, Marie-France BOSSÉNO⁽⁴⁾

Résumé

Les auteurs étudient le type électrophorétique de six enzymes (GPI, GDH, 6-PGD, LDH, ADA et PEP-E) chez l'hématozoaire Plasmodium falciparum responsable des cas de paludisme grave dans les régions tropicales.

Les hématozoaires sont extraits de placentas parasités, récoltés dans deux maternités de Brazzaville. 815 placentas ont été examinés, 603 d'entre eux présentaient une parasitémie érythrocytaire.

*Après extraction et lyophilisation du concentré d'hématozoaires, des zymogrammes ont été réalisés pour 25 souches de Plasmodium (*P. falciparum*). Toutes les électrophorèses ont été effectuées sur gélose d'amidon.*

*Les différents allozymes de *P. falciparum*, pour les six enzymes étudiés, sont comparés aux mêmes allozymes retrouvés en Gambie et en Tanzanie, le Congo occupant une situation géographique intermédiaire entre ces deux pays africains.*

Mots-clés : *Plasmodium falciparum* — Placentas — Électrophorèse — Isoenzymes — Congo.

Summary

ENZYME TYPING OF PLASMODIUM FALCIPARUM IN CENTRAL AFRICA (BRAZZAVILLE, CONGO POP. REP.).
The spreading of resistance of Plasmodium falciparum strains to the usual antimalarial drugs actually available, and the epidemiological diversity of malaria situations lead to the necessity to develop specially designated surveys in order to precise the subspecific taxonomy, or strains of this species. It appeared that enzyme screening could be used as excellent biochemical markers for investigations into genetics, comparative pathogenicity, and a better understanding of epidemiological different studies.

For the present study, the Plasmodium falciparum parasites were extracted from placentae collected in two maternity hospitals in Brazzaville (Congo Pop. Rep.). 815 pregnant women were examined, 603 out of them had a placental malaria.

Parasited erythrocytes were concentrated, lysed and lyophilised or frozen. Isoenzyme patterns were made on extracts of twenty six Plasmodium falciparum strains, analysed by starch gel electrophoresis.

(1) Cette étude a bénéficié d'un crédit incitatif du Ministère français de l'Industrie et de la Recherche.

(2) Entomologistes médicaux, Centre O.R.S.T.O.M. de Brazzaville, République Populaire du Congo. Adresse actuelle : Mission O.R.S.T.O.M. auprès du Centre Muraz, B.P. 171, Bobo-Dioulasso, Haute-Volta.

(3) Institute of Animal Genetics (Protozoan Unit), University of Edinburgh, West Main Road, Edinburgh EH9 3 JN.

(4) Technicienne d'Entomologie médicale. Adresse : cf. (2).

We studied the enzyme patterns of six enzymes, Glucose phosphate isomerase (GPI), 6-Phosphogluconate deshydrogenase (6-PGD), Lactate deshydrogenase (LDH), Glutamate deshydrogenase (GDH), Adenosine desaminase (ADA) and Peptidase-E (PEP-E).

The pattern of *Plasmodium falciparum* allozymes for the six enzymes studied were compared with the same allozymes found in *P. falciparum* strains from Gambia and Tanzania, because Congo is geographically situated half way between these two african endemic countries.

After comparing the different studies carried out in Africa, it appeared that the Peptidase-E enzyme could be the best marker for presently available african strains, as it showed some specific isoenzymatic variations according to these three african areas.

Key words : *Plasmodium falciparum* — Placental Malaria — Enzyme Typing — Congo popular Republic.

L'existence d'un polymorphisme chez *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, est soupçonnée depuis longtemps sur le vu des degrés variables de virulence (Yoeli *et al.*, 1974) et de sensibilité aux antipaludéens (Rieckmann *et al.*, 1971) entre des souches géographiques ou écologiques distinctes. L'extension actuelle de ces phénomènes de résistance confirme l'existence de nombreux « variants » et souligne la nécessité de mieux caractériser les différentes souches plasmodiales.

Au plan morphologique les protozoaires ne présentent que peu de variations infraspécifiques décelables par les moyens optiques disponibles. En microscopie électronique Aikawa *et al.* (1974) ont relevé des modifications au niveau des microtubules entre deux souches asiatiques (Vietnam et Malaisie) et les ont considérées comme étant d'origine génétique.

Mais les difficultés techniques d'obtention et d'interprétation de telles observations morphologiques ont suscité la recherche d'autres critères de diagnose et, notamment, le choix de caractères biochimiques. En effet, l'étude des isoenzymes intracellulaires des protozoaires, permet d'effectuer un « typage biochimique » caractérisant certaines variétés taxonomiques même au niveau infraspécifique. Ainsi, à l'issue des travaux isoenzymologiques sur les *Plasmodium murins* (Carter, 1978 ; Momen, 1979) une véritable clé de détermination de ces hématozoaires a pu être élaborée.

Les recherches concernant les *Plasmodium* humains, et notamment *P. falciparum*, ont débuté récemment (Carter et Mac Gregor, 1973 ; Carter et Voller, 1975) et devraient pouvoir s'amplifier grâce aux possibilités de cultures *in vitro* (Trager et Jensen, 1978 ; Yisunsri *et al.*, 1980).

Nos analyses ont été instaurées sur le vu d'une patence parasitémique de *P. falciparum* apparemment moins longue en Afrique centrale qu'en Afrique de l'ouest ou de l'est (Carnevale et Mouchet, 1980) et dont l'ensemble des modalités épidémiolo-

giques de transmission est actuellement en cours d'étude.

Nous rapportons ici des résultats des typages enzymatiques des souches de Brazzaville et les comparons aux premiers résultats relatifs aux souches de Gambie et de Tanzanie.

1. Matériel et méthodes

1.1. CHOIX DU MATÉRIEL D'ÉTUDE

Même en zone d'endémie palustre, les prélèvements de sang circulant ne permettent pas d'obtenir une concentration parasitaire suffisante pour réaliser des zymogrammes.

Dans ces conditions, nous nous sommes intéressés aux placentas humains infectés par *P. falciparum* qui ont tous été recueillis lors de la délivrance normale. Cet organe représente en effet trois avantages importants :

— c'est le seul « organe profond » où s'effectue la schizogonie de *P. falciparum* qui puisse être facilement « prélevé » sans dommage pour l'organisme humain,

— il réalise une très forte concentration de parasites dûe au phénomène de séquestration bien connu (Bray *et al.*, 1979 ; Galbraith *et al.*, 1980),

— les hématozoaires sont rencontrés à tous les stades de maturation (photos 1 et 2) ; les grandes formes parasitaires comme les schizontes âgés et les rosaces, procurent un matériel de choix pour les zymogrammes.

Dans la présente étude, nous avons récolté les placentas de deux maternités choisies dans les cités populaires de Brazzaville (quartier de Talangai et Makelekele) pour atteindre des femmes n'ayant que peu accès à une chimioprophylaxie antipalustre régulière.

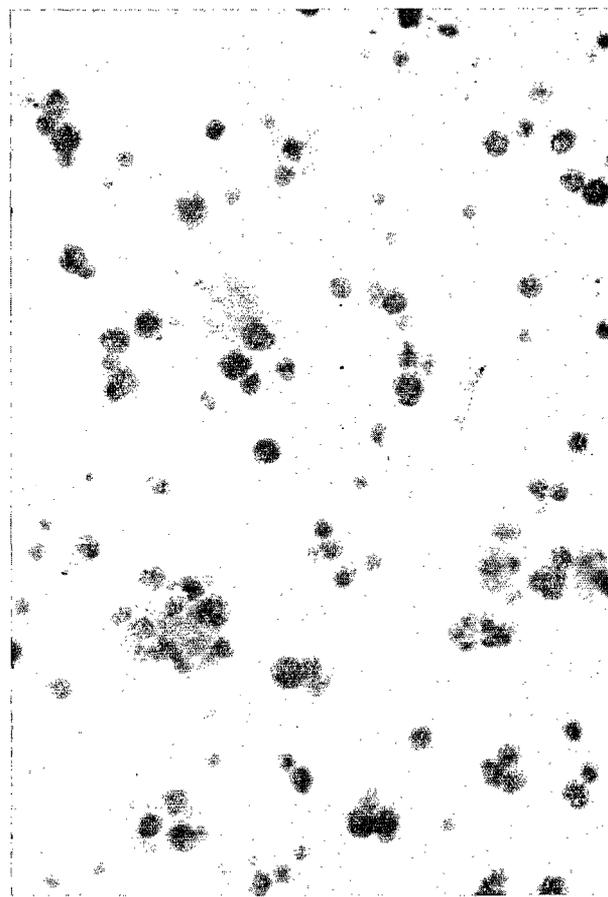


PHOTO 1. — Aspect d'un placenta fortement parasité par *P. falciparum* : présence d'hématozoaires à tous les stades (apposition sur lame, coloration au Giemsa).

PHOTO 2. — Concentration des hématozoaires après lyse des érythrocytes par la saponine.

1.2. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

Au laboratoire nous pratiquons une incision profonde du placenta et prélevons un petit morceau qui sert à faire une série d'appositions sur lames. Celles-ci permettent alors d'évaluer la parasitémie éventuelle et de sélectionner les placentas ayant une parasitémie érythrocytaire $\geq 50\%$.

Ce placenta choisi est alors débarrassé du cordon, des membranes, des caillots, et, après découpage dans un bac hépariné, on effectue un pressurage à la main des morceaux à travers deux épaisseurs de gaze.

Le sang exprimé du placenta est récolté dans un flacon contenant un peu de Ringer à 4°C et de l'héparine.

On sédimente ensuite les globules rouges par une centrifugation légère (1 500 t/mn) et on enlève le surnageant. Le culot de globules rouges est mis à lyser avec une solution de saponine (1/2 volume du culot) dans un bain-marie à 37°C pendant 25 minutes, avec agitation douce. On obtient, après trois ou quatre lavages avec du Ringer physiologique et une dernière centrifugation à 4 000 t/mn, une couche de parasites libres (couche plus ou moins grisâtre selon l'importance du pigment palustre) au-dessus d'un culot rouge constitué des débris érythrocytaires.

On récupère cette couche de parasites (hématozoaires à tous les stades) et on effectue trois ou quatre congélations et décongélations successives à -20°C pour lyser les parasites. Le concentré pla-

centaire de *P. falciparum* est ensuite fractionné et congelé une dernière fois à - 80°C pour la conservation, avec cryodessiccation.

Le matériel lyophilisé est conservé à - 20°C, sous vide, dans un dessiccateur contenant du silicagel. Le vide est refait dans le dessiccateur après chaque prélèvement d'échantillon pour un zymogramme.

Le matériel lyophilisé est utilisé directement, après réhydratation (1 vol. dans 4 vol. d'eau distillée) ; il est absorbé sur un petit morceau d'acétate de cellulose que l'on introduit dans l'épaisseur du gel d'amidon.

Des pertes d'activités enzymatiques ont pu être constatées, elles pourraient provenir d'un défaut de manipulation à 4°C, dans la chaîne du froid, certains enzymes étant plus sensibles à la chaleur que d'autres.

Par ailleurs, la lyophilisation paraît mal supportée par certains enzymes.

1.3. MÉTHODE D'ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE

Les électrophorèses pour les différents zymogrammes sont effectués sur gel d'amidon. Cette technique est largement employée pour étudier les variants génétiques (Smith, 1976).

Nous utilisons de l'amidon hydrolysé (Connaught Laboratories R. Ontario), une cuve à électrophorèse Shandon[®] et un générateur Shandon[®] Southern SAE 2761. Pour refroidir la gélose pendant la durée de migration, la cuve d'électrophorèse est placée à 4°C dans un réfrigérateur.

Les protocoles pour les différents zymogrammes sont ceux employés et décrits par Carter (1978).

Nous avons typé quatre isoenzymes dans notre laboratoire :

- GPI = Glucose phosphate isomérase,
- GDH = Glutamate déshydrogénase,
- 6-PGD = 6-phosphogluconate déshydrogénase,
- LDH = Lactate déshydrogénase.

Un certain nombre d'échantillons lyophilisés ont été expédiés au Laboratoire de Génétique des Protozoaires de l'Université d'Édimbourg, pour un deuxième typage, en parallèle, de ces quatre enzymes. Dans ce laboratoire, deux autres typages enzymatiques sont réalisés :

- ADA = Adénosine désaminase,
- PEP-E = Peptidase-E.

1.4. PRÉCAUTIONS

Nous utilisons un concentré d'hématozoaires qui n'est jamais pur ; les activités enzymatiques

révélées n'appartiennent pas toutes au *Plasmodium falciparum* infectant le placenta. Nous allons donc trouver un certain nombre de bandes (variables selon les enzymes) qui appartiennent à l'hôte humain (fig. 1 et 2) ; elles correspondent aux enzymes intracellulaires qui proviennent des érythrocytes et des autres cellules peuplant le placenta.

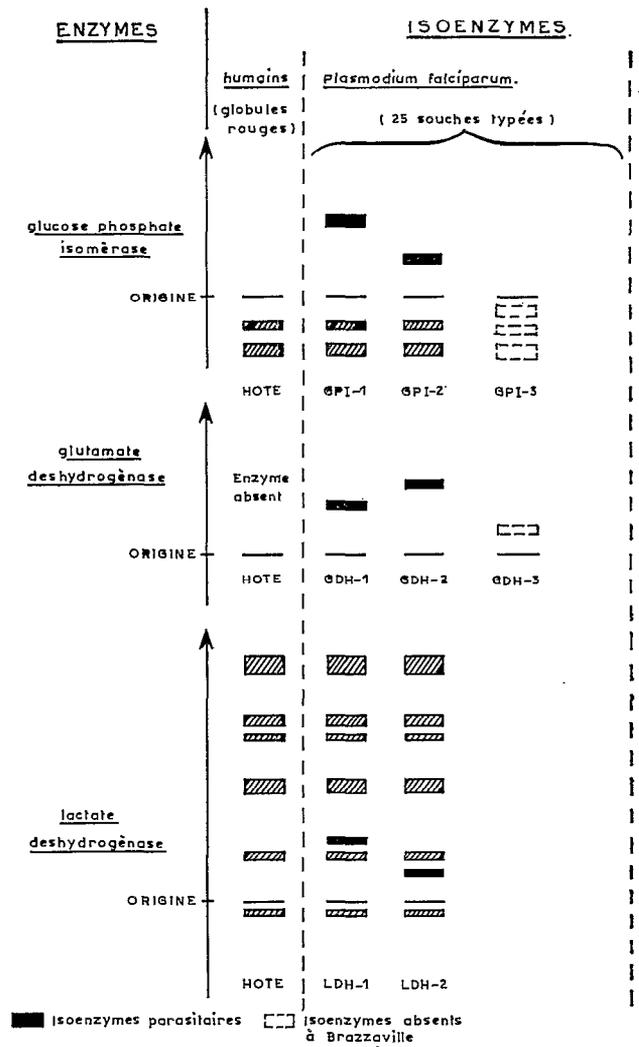


FIG. 1. — Zymogrammes de GPI, GDH et LDH.

Mais, après migration, les bandes d'isoenzymes parasites et les bandes d'isoenzymes humains ont une distribution dans la gélose qui est cons-

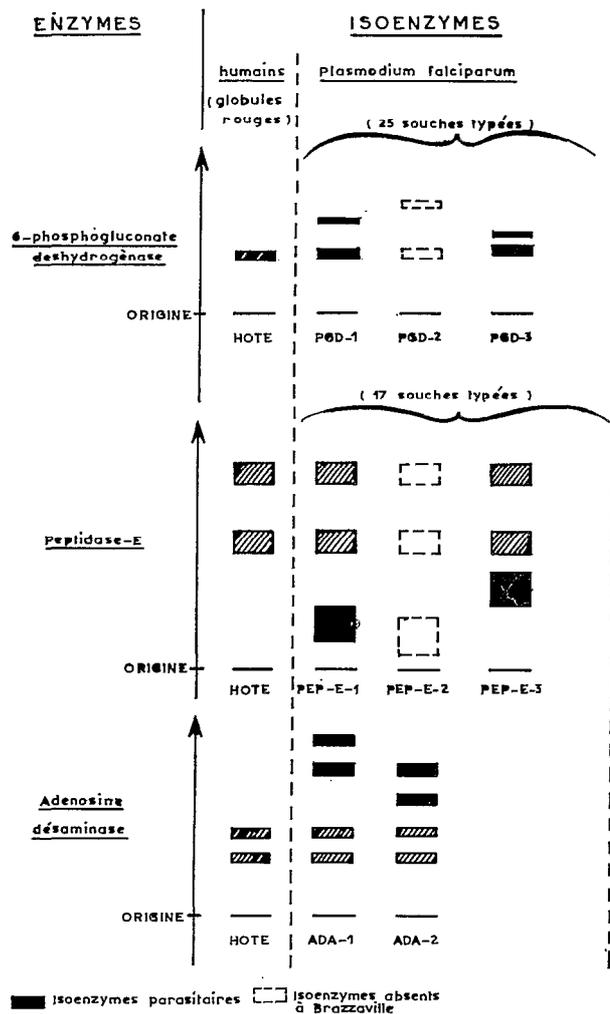


Fig. 2. — Zymogrammes de PGD, PEP-P et ADA.

tante pour un enzyme. Leur position est définie par rapport à l'origine de la migration, elle est toujours la même lorsque les conditions d'électrophorèse sont fidèlement reproduites et en utilisant toujours le même protocole pour chaque enzyme à typer.

2. Résultats et observations

Sur les 815 placentas examinés, 603 (74 %) étaient parasités par l'hématozoaire *P. falciparum*. Les zymogrammes de *Plasmodium* ont été

effectués à Brazzaville sur 25 souches pour quatre enzymes ; à Édimbourg 17 souches ont été typées pour ces mêmes zymogrammes, et pour deux enzymes supplémentaires.

Les résultats des électrophorèses sont très variables d'un enzyme à l'autre, mais un certain nombre de résultats fondamentaux (tabl. I) peuvent être relevés pour chacun (fig. 1 et 2) :

GPI (E.C. 5.3.1.9) deux isozymes

Il sont faciles à discerner car les isoenzymes humains migrent en sens inverse. L'isozyme GPI-3 n'est pas présent en Afrique. A trois reprises, on a décelé l'association GPI-1 avec GPI-2.

LDH (EC. 1.1.1.27) deux isozymes

Très difficile à étudier, car les bandes qui appartiennent au parasite sont noyées dans la série de cinq bandes successives des LDH humaines. Les deux variantes LDH-1 et LDH-2 sont présentes à Brazzaville.

6-PGD (EC. 1.1.1.44) trois isozymes

Cet enzyme est difficile à révéler, car il supporte mal la cryopréservation. L'isozyme 6-PGD-2 n'a pas été retrouvé au Congo.

GDH (EC. A.4.1.4) trois isozymes

Seul GDH-1 est présent à Brazzaville.

ADA (EC. 3.5.4.4.) deux isozymes

Les deux formes ADA-1 et ADA-2 sont présentes, la première est nettement plus fréquente. ADA-1 a été trouvé une seule fois associé à ADA-2.

PEP-E (EC. 3.4.11, EC. 3.4.13) trois isozymes

L'isozyme PEP-E-2 semble absent à Brazzaville. Le PEP-E-3 n'a été trouvé qu'une seule fois.

3. Discussion et conclusion

L'hétérogénéité des situations palustres observées, par exemple, en Afrique Sud-Saharienne selon les biotopes et les conditions de transmission, ne pourra s'expliquer que dans la mesure où les parasites seront parfaitement connus, comme cela a été le cas pour le vecteur principal *Anopheles gambiae*.

La première étape consiste à préciser les aires de distribution de chaque souche plasmodiale définie par ses critères biochimiques. Notre étude complémentarise donc celles de Carter *et al.*, (*op. cit.*),

TABLEAU I

Allozyme de *P. falciparum* rencontrés à Brazzaville.

Enzyme et isoenzymes	Fréquence numérique	Identification des souches		
<u>GPI</u>	1	5	/M10/T1/T12/TA/TE/	Pour 25 souches typées * avec chaque enzyme
	2	7	/M7/M14/T13/T14/TF/ME/TB/	
	3	0		
	1+2	3	/M12/T15/MB/	
<u>LDH</u>	1	11	/M1/T10/T12/T13/T14/ M12/T15/TB/MB/TF/TA/	
	2	6	T9/M14/M10/M9/ME/TE/	
<u>6-PGD</u>	1	9	/M12/T12/T15/M16/ M19/TA/MA/TB/	
	2	0		
	3	3	/M37/M9/M2/	
<u>GDH</u>	1	14	/TE/M2/M7/M10/M12/M14/ T10/T12/T13/T15/TD/MB/TB/	
	2	0		
	3	0		
<u>PEP-E</u>	1	8	/T15/T13/T12/T10/ M12/M7/M2/	Pour 17 souches typées *
	2	0		
	3	1	/M14/	
<u>ADA</u>	1	8	/M2/M7/M10/M12/ M14/T12/T13	
	2	1	/T15/	
	1+2	1	/T10/	

* Certaines souches ne révèlent pas d'activité enzymatique pour un ou plusieurs enzymes.

Sanderson *et al.* (1981), Thaithong *et al.* (1981); elle s'inscrit dans le cadre normal de la réalisation d'une carte de répartition africaine puis mondiale, des multiples souches de *P. falciparum*.

Actuellement il semble que la Peptidase-E soit l'enzyme le plus intéressant pour différencier les

souches de *P. falciparum* du Congo de celles de Gambie et de Tanzanie (tabl. II).

En effet :

— l'isoenzyme 1 est présent au Congo et en Gambie, mais absent en Tanzanie ;

— l'isoenzyme 2 est absent au Congo et en Gambie, mais présent en Tanzanie ;

— l'isoenzyme 3 est absent en Gambie, mais présent au Congo et en Tanzanie.

Par ailleurs, il faut savoir que dans une infection palustre naturelle, la population de parasites

peut être homogène ou hétérogène, et dans ce cas, l'association de plusieurs clones peut alors être mise en évidence par les typages d'isoenzymes.

Beale *et al.* (1978) ont montré que, dans le cas du paludisme murin, il n'y avait pas plus de deux ou trois clones de parasites génétiquement distincts chez un rongeur parasité.

TABLEAU II

Fréquence numérique et répartition géographique des différents allozymes de *P. falciparum* en Afrique.

Enzymes	Pays	GAMBIE	CONGO	TANZANIE	Observations
GPI	1	+++	++(+)	+++	L'isoenzyme 3 n'a été trouvé qu'en Thaïlande (SANDERSON).
	2	++	+++	++	
	3	0	0	0	
LDH	1	+++	+++	++	En Tanzanie l'isoenzyme 2 a seulement été trouvé en association avec la forme 1.
	2	++	++	+	
6-PGD	1	+++	+++	+++	L'isoenzyme 1 est le plus fréquent dans ces trois pays.
	2	+	0	0	
	3	(+)	++	(?)	
GDH	1	+++	+++	+++	
	2	(?)	0	(?)	
	3	(?)	0	(?)	
PEP-E	1	+++	++	0	Cet isozyyme semble être le plus intéressant pour caractériser <i>P. falciparum</i> en Afrique.
	2	0	0	++	
	3	0	+	+	
ADA	1	+++	+++	+	L'isozyme 1 est le plus fréquent.
	2	++	+	(+)	

Dans la présente étude, un mélange de clones de *P. falciparum* n'a pas été mis en évidence dans les parasitémies placentaires. En effet, une association de deux isoenzymes n'a été relevée que trois fois pour les GPI et une fois pour l'ADA, sans qu'aucune autre association ne soit retrouvée pour les autres zymogrammes.

Il faut toutefois souligner que dans nos conditions de travail, chaque placenta fournit, en une seule opération, une grande quantité de parasites qui proviennent tous, au même moment, du même organe d'un même hôte. Cette notion est impor-

tante à retenir pour spécifier les souches naturelles de *P. falciparum* qui peuvent être différentes des souches obtenues *in vitro*. Dans ce dernier cas, il est vraisemblable qu'un certain nombre de clones, sont éliminés et sélectionnés par les conditions de culture et que très peu se développent régulièrement.

Les marqueurs biochimiques devraient également permettre de préciser les potentialités d'évolution du parasite sous l'action des mécanismes de protection naturels (réponses immunitaires *sensu lato*) et exogènes (chimio prophylaxie).

Ainsi il a été possible d'étudier l'hybridation d'un clone de *Plasmodium murin* résistant à un antipalustre avec un clone sensible (Walliker *et al.*, 1976). On a pu démontrer que la transmission du caractère de résistance, et celui de plus forte virulence, se font selon les lois de Mendel (Beale *et al.*, *op. cit.*).

Des typages isoenzymatiques systématiques et exhaustifs des souches plus ou moins virulentes,

résistantes ou sensibles aux divers antipalustres devraient permettre une meilleure compréhension des paludismes dus à *P. falciparum*, et par là même, de parvenir à l'élaboration de protocoles de lutte réellement adaptés à la dynamique des relations hôte/parasite.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.,
le 3 avril 1984.

BIBLIOGRAPHIE

- AIKAWA (M.) et WARD (R. A.), 1974. — Intraspecific variation in *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23, 4 : 570-573.
- BEALE (G. H.), CARTER (R.) et WALLIKER (D.), 1978. — Genetics, p. 213-245, in *Rodent Malaria*. Killick-Kendrick (R.) et Peters (W.) ed., Academic Press.
- BRAY (R. S.) et SINDEN (R. E.), 1979. — The sequestration of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in the placenta. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 73 : 716-719.
- CARNEVALE (P.) et MOUCHET (J.), 1980. — Le paludisme en zone de transmission continue en région afrotropicale. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 18, 2 : 149-186.
- CARTER (R.), 1978. — Studies on enzyme variation in the murine malaria parasites *Plasmodium berghei*, *P. yoelii*, *P. vinckei* and *P. chabaudi* by starch gel electrophoresis. *Parasitology*, 76 : 241-267.
- CARTER (R.) et Mc GREGOR (I. A.), 1973. — Enzyme variation in *Plasmodium falciparum* in the Gambia. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 67, 6 : 830-837.
- CARTER (R.) et VOLLER (A.), 1975. — The distribution of enzyme variation in population of *Plasmodium falciparum* in Africa. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 68, 4 : 371-376.
- GALBRAITH (R. M.), FAULK (W.), GALBRAITH (G. M. P.), HOLBROOK (T. W.) et BRAY (R. S.), 1980. — The human materno-foetal relationship in malaria. I. Identification of pigment and parasites in the placenta. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 74, 1 : 52-60.
- MOMEN (H.), 1979. — Biochemistry of intraerythrocytic parasites. I. Identification of enzymes of parasite origin by starch-gel electrophoresis. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 73, 2 : 109-115.
- RIECKMANN (K. H.), POWELL (R. D.), Mc NAMARA (J. V.), WILLERSON (D.), KASS (L.) FISHER (H.) et CARSON (P. E.), 1971. — Effects of tetracycline against chloroquine resistant and chloroquine sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20 : 811-815.
- SANDERSON (A.), WALLIKER (D.) et MOLEZ (J. F.), 1981. — Enzyme typing of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 75, 2 : 263-267.
- SMITH (I.), 1976. — Chromatographic and Electrophoretic Techniques (II. Zone Electrophoresis), Fourth Ed., William Heinemann Medical Books Ltd., 485 p.
- THAITHONG (S.), SUEBLINWONG (T.) et BEALE (G. H.), 1981. — Enzyme typing of some isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 75, 2 : 268-270.
- TRAGER (W.) et JENSEN (J. B.), 1978. — Cultivation of malarial parasites. *Nature*, 273 : 621-622.
- WALLIKER (D.), CARTER (R.) et SANDERSON (A.), 1975. — Genetic studies on *Plasmodium chabaudi* : recombination between enzyme markers. *Parasitology*, 70 : 19-24.
- WALLIKER (D.), SANDERSON (A.), YOELI (M.) et HARGREAVES (B. J.), 1970. — A genetic investigation of virulence in a rodent malaria parasite. *Parasitology*, 72 : 183-194.
- YISUNSI (L.) et RIECKMANN (K.), 1980. — *In vitro* micro-technique for determining the drug susceptibility of cultured parasites of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 74, 6 : 809-810.
- YOELI (M.) et HARGREAVES (B. I.), 1974. — Brain capillary blockage produced by a virulent strain of rodent malaria. *Science*, New York, 184 : 572-573.