

Antigènes excrétés-sécrétés par *Plasmodium falciparum* en cultures *in vitro*. Etude comparée avec les antigènes somatiques et les antigènes figurés*

J. THELU,¹ P. AMBROISE-THOMAS,² M. CONTAT,³ & P. KUPKA³

Au cours de sa multiplication in vitro, Plasmodium falciparum libère dans le milieu de culture des antigènes excrétés-sécrétés. Présents en quantités infinitésimales, ces antigènes sont en grande partie masqués par les différents constituants du milieu, notamment ceux qui sont apportés par le sérum humain. Une technique finalement assez simple permet de les isoler par chromatographie échangeuse d'ions. Il a été ainsi possible de caractériser, parmi les très nombreuses fractions obtenues, un ensemble de fractions (antigène E) dont l'activité paraît d'autant plus importante que sa concentration protéinique est faible. Cet antigène E a été comparé en immuno-enzymologie avec des antigènes somatiques extraits par ultrasonication de P. falciparum isolés. Parallèlement, une autre comparaison a été effectuée en immunofluorescence indirecte (IFI) sur des étalements d'hématies parasitées par des schizontes de P. falciparum (antigènes figurés) provenant également de cultures in vitro.

L'utilisation des antigènes somatiques et de l'antigène E en ELISA et en IFI a donné des résultats très similaires avec 300 sérums humains recueillis en zone d'endémie palustre. On a observé une grande stabilité à la chaleur de l'antigène E, alors que les antigènes somatiques sont partiellement thermolabiles.

Au cours des différents stades intraérythrocytaires de son développement, *Plasmodium falciparum* produit plusieurs types d'antigènes. Ces antigènes ont été étudiés à partir de différents matériels de base: sérums de malades (12, 15), sérums de singes *Aotus* (14) ou de chimpanzés expérimentalement infestés (9), hématies provenant de placentas humains fortement parasités (13). Par la suite, la culture *in vitro* de *P. falciparum* (11) a facilité l'obtention de matériel antigénique abondant (4, 5, 7, 8, 10). Cependant, il faut souligner que peu d'études (4) ont été rapportées sur les antigènes libérés dans le milieu de culture par les parasites. Pourtant, ces antigènes étaient susceptibles de présenter des similitudes avec les produits retrouvés dans le sérum de malades atteints de paludisme, ceci pouvant déboucher sur des applications pratiques dans la réalisation de tests de sérodiagnostic.

L'obtention de ces exoantigènes ou antigènes

* Cette étude a été réalisée sous les auspices du Programme d'action antipaludique de l'Organisation mondiale de la Santé et du Programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de recherche et de formation concernant les maladies tropicales.

¹ Attaché scientifique, Laboratoire de parasitologie et pathologie exotique, Faculté de Médecine de Grenoble, France.

² Professeur de parasitologie, Faculté de Médecine de Grenoble, La Tronche 38700, France. Les demandes de tirés à part doivent être envoyées à cette adresse.

³ Laboratoire de parasitologie et pathologie exotique, Faculté de Médecine de Grenoble, France.

excrétés-sécrétés est malaisée à cause de la faible concentration de ces produits dans un milieu très riche en différents constituants (en particulier en sérum humain). Pour remédier à cette difficulté, nous avons mis en œuvre une méthode qui se prête au traitement de volumes importants: la chromatographie échangeuse d'ions. Par le test immunoenzymatique ELISA, nous avons ensuite mesuré face à de nombreux sérums l'activité et la spécificité des antigènes ainsi obtenus. Ces résultats ont été comparés avec ceux d'une étude analogue conduite avec des antigènes somatiques et, en immunofluorescence indirecte, avec des antigènes figurés.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Culture

La souche de *P. falciparum* (SGE 1^a) est cultivée *in vitro* à Grenoble depuis plus de 3 ans suivant la technique de Trager et Jensen (*candle jar*) sur des hématies humaines A⁺. Le milieu RPMI 1640 est complété par 100 ml de sérum humain A⁺ par litre, l'hématocrite est abaissée à 0,08 et le développement est synchronisé par action du sorbitol selon la technique de Lambros et Vanderberg (6).

^a Souche amicalement fournie par le Dr L. H. Perrin de l'Hôpital cantonal de Genève.

Antigènes somatiques

Ils sont préparés selon une technique proche de celle décrite par Williams (13). Les hématies parasitées par des schizontes de *P. falciparum* sont lavées dans du sérum physiologique, puis lysées par une solution de saponine à 10 g/litre (20 min au bain-marie à 37 °C). Les parasites recueillis par centrifugation (8 min à 10 000 g à 4 °C) sont lavés à 4 reprises dans du sérum physiologique. Les schizontes sont ensuite ultrasonés (fréquence 20 KHz, amplitude 6 μ m pic à pic) 15 fois 1 min avec des intervalles de 1 min. Après élimination des débris membranaires par centrifugation (10 min à 10 000 g à 4 °C), le surnageant clair est recueilli. Il contient par ml 0,65 mg de protéines dosées par la méthode de Bradford (3).

Antigènes excrétés-sécrétés

Le milieu de culture est collecté quotidiennement, puis centrifugé, et le surnageant est conservé dans de l'azote liquide. Quand un volume suffisant (500 ml au moins) est réuni, ce milieu est décongelé, concentré 10 fois sur un appareil à fibres creuses (Amicon, fibres HP 10, limite d'exclusion : molécules de masse moléculaire relative supérieure à 10 000), puis soumis à une filtration stérilisante (0,45 μ m). La fraction concentrée est précipitée par le sulfate d'ammonium à 330 g/litre afin d'éliminer les immunoglobulines

humaines, puis elle est centrifugée et dialysée 12 heures. Le milieu est alors fractionné par chromatographie échangeuse d'ions à l'aide d'un gel de QAE Sephadex A 50.^b La colonne a un volume initial de 500 ml (diamètre interne 6 cm, hauteur 18 cm). Le gel est saturé, puis équilibré par du tampon Tris HCl (50 mmol/l, pH 7,6). Le dépôt de milieu concentré à un volume de 20 ml (protéines 55 mg/ml). L'éluution (débit 90 ml/h) est effectuée par un gradient de force ionique de contre-ions ($\text{Cl}^- - \text{NaCl}$ de 0 à 0,5 mol/l) dans du tampon Tris HCl (50 mmol/l, pH 7,6). L'éluat est collecté par fractions de 14 ml, qui ont d'abord été testées séparément (126 fractions étudiées). Par la suite, toutes les fractions présentant une activité antigénique ont été rassemblées (antigène E) et dialysées contre du tampon PBS (50 mmol/l, pH 7,2), afin d'éliminer l'excès de chlorure de sodium. L'antigène E est ensuite réparti en échantillons de 2 ml et conservé sous forme congelée (-70 °C) jusqu'à l'emploi.

Sérums étudiés

Il s'agit de sérums ou de microéchantillons sanguins recueillis en zone d'endémie palustre et notamment lors d'une enquête effectuée en Tanzanie par le Dr E. Onori de l'OMS.

^b Pharmacia, Uppsala, Suède.

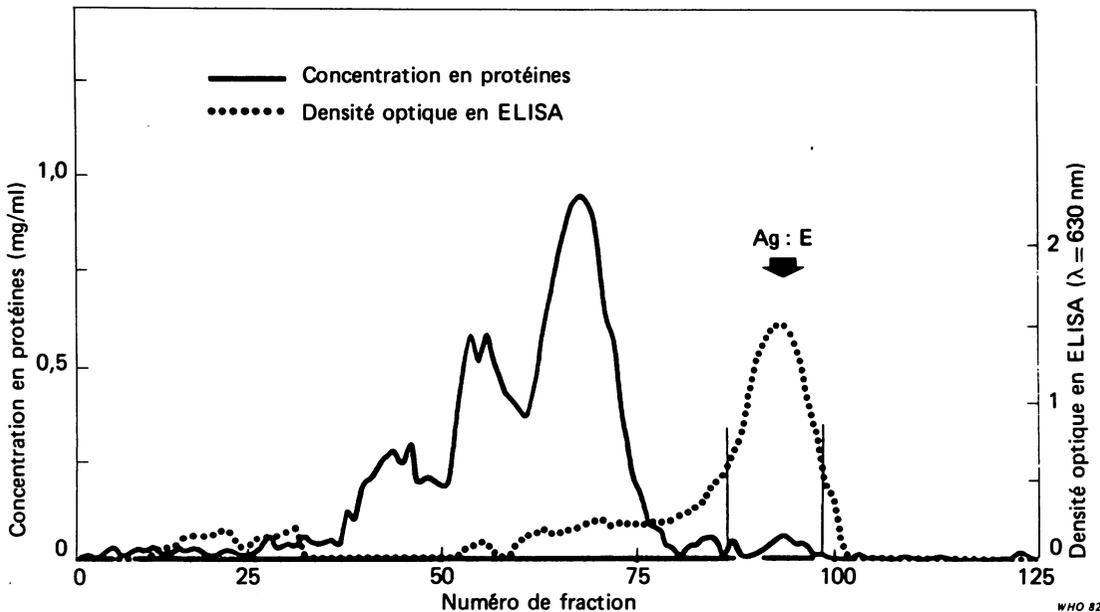


Fig. 1. Chromatographie sur gel QAE Sephadex A 50.

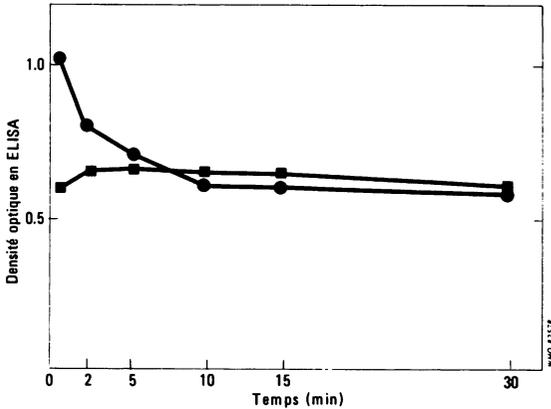


Fig. 2. Thermosensibilité des antigènes à 80 °C pendant des temps variables (● antigènes somatiques; ■ antigènes excrétés-sécrétés).

Immunofluorescence indirecte

Le test est réalisé suivant une méthode décrite précédemment (1). Comme antigène on a utilisé des étalements de sang humain parasité par des schizontes de *P. falciparum* (souche SGE 1) obtenus en cultures *in vitro* synchronisées. Les sérums sont étudiés aux dilutions 1/20, 1/40 etc., et le conjugué marqué à la fluorescéine,^c après titrage préalable, a été employé à la dilution de 1/50.

Test ELISA

Le microtest ELISA est conduit selon la méthode décrite en 1978 (2) avec des concentrations d'antigène et de conjugué^d déterminées par titrage en damier. Le repérage du pic antigénique sur la sortie de colonne est effectué en ELISA face à un mélange de sérums humains très positifs. Parmi les contrôles, on a notamment réalisé pour chacune des fractions dosées des réactions témoins face à différents sérums humains négatifs et des «blancs» sans sérums.

RÉSULTATS

La séparation des constituants du milieu de culture par chromatographie sur gel QAE Sephadex permet d'obtenir de façon simple l'ensemble des fractions antigéniques principales (antigène E) (Fig. 1). La présence de ce pic mis en évidence par le test ELISA a également été confirmé par électrosynérèse (contre-

^c Anticorps de mouton, anti-IgG humaines marquées à la fluorescéine. Institut Pasteur, lot 16 74 511.

^d Sérum de chèvre anti-IgG humaines marquées à la peroxydase. Laboratoires Miles, lot S 808. Dilution optimale d'emploi : 1/1500.

immunoélectrophorèse) face au mélange de sérums humains positifs utilisé pour les déterminations en ELISA. Par ailleurs, nous avons évidemment vérifié l'absence d'activité antigénique dans les extraits de milieu traités exactement dans les mêmes conditions que les cultures mais non parasités.

La thermosensibilité de l'antigène E et celle des antigènes somatiques ont été étudiées par exposition à une température de 80 °C (bain-marie) pendant des temps variables (Fig. 2). On a ainsi observé une grande stabilité à la chaleur de l'antigène E, alors que les antigènes somatiques sont partiellement thermolabiles.

L'étude comparée de ces deux types d'antigène et des antigènes figurés a été réalisée en ELISA et en immunofluorescence indirecte à partir de 300 sérums humains prélevés en zone d'endémie. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une relation linéaire entre les densités optiques mesurées en ELISA et les titres en IFI (Fig. 3). Cette corrélation est retrouvée

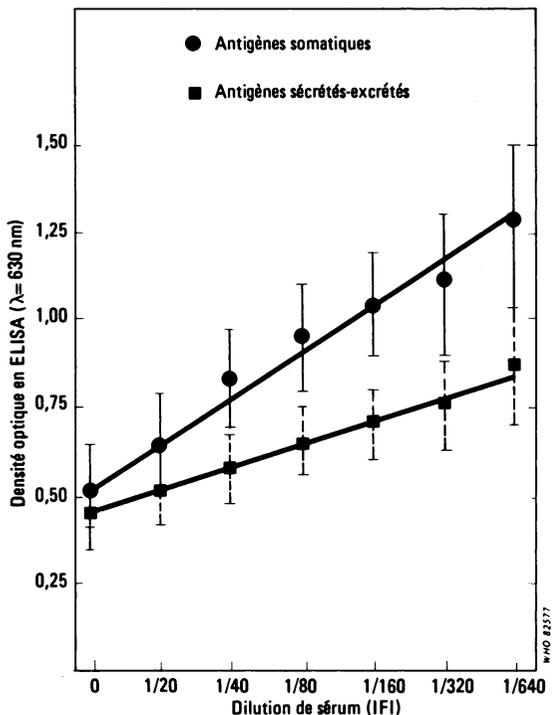


Fig. 3. Comparaison du titre d'anticorps anti-*Plasmodium* mesuré en IFI et en ELISA. Les segments verticaux représentent la valeur de l'écart type. Les nombres d'échantillons sur lesquels les moyennes ont été calculées étaient pour les sept dilutions (de la gauche à la droite) de 103, 36, 43, 47, 25, 27 et 18. (● antigènes somatiques; ■ antigènes excrétés-sécrétés).

aussi bien pour les antigènes somatiques que pour l'antigène E.

En représentant cette fois les résultats par rapport à l'âge des sujets examinés (Fig. 4), on met également en évidence la similitude des antigènes étudiés. En particulier, la sérologie des enfants de moins de 5 ans

est négative ou très faiblement positive. Après l'âge de 5 ans, les titres d'anticorps augmentent et se stabilisent environ après la trentième année.

DISCUSSION

Les gels échangeurs d'ions ayant de grandes capacités d'adsorption permettent de traiter des volumes importants de milieux de culture à fortes concentrations protéiniques. Cette capacité peut être améliorée en effectuant une séparation préliminaire en *batch* avec le même type de gel. D'autre part, la très faible quantité de protéines correspondant aux pics antigéniques (antigène E) met l'accent sur l'efficacité de la méthode. Cette technique de mise en œuvre rapide (l'étape de précipitation des immunoglobulines sériques peut être supprimée sans inconvénient) peut éventuellement être suivie d'une chromatographie d'affinité pour parfaire la purification.

Cependant, la séparation obtenue sur le gel QAE Sephadex permet déjà d'utiliser l'antigène E pour le sérodiagnostic en ELISA. Le rendement obtenu est important puisque, à partir de 200 ml de milieu de culture, il est possible de préparer assez de fractions d'antigène E pour sensibiliser environ 90 plaques de microtitration, c'est-à-dire—compte tenu des réactions témoins pratiquées dans chaque plaque—pour étudier plus de 8000 sérums. Utilisé lors d'une enquête épidémiologique, l'antigène ainsi préparé a fourni des résultats tout à fait comparables à ceux qui ont été obtenus avec les antigènes somatiques et avec les antigènes figurés. Cette similitude permet, d'une part, de confirmer l'intérêt de l'antigène E et, d'autre part, elle impose de comparer ses caractéristiques physico-chimiques avec celles des autres antigènes. Les résultats préliminaires de cette comparaison (thermosensibilité) tendent à montrer que l'antigène somatique (brut) est en fait la somme d'un constituant thermolabile et de fractions thermostables, alors que l'antigène E est totalement thermostable. Ces antigènes pourraient donc correspondre aux antigènes L et S observés par Wilson (16) dans des sérums de malades.

L'étude analytique de l'antigène E (nature, masse moléculaire relative, point isoélectrique, propriétés immunologiques) de *P. falciparum* est actuellement en cours. Dans un premier temps, nous n'avons étudié que l'antigène E produit par l'ensemble des stades évolutifs de *P. falciparum*, tels qu'ils sont obtenus dans des cultures asynchrones de 72 h dont le milieu est quotidiennement renouvelé. Ces antigènes ont très certainement des origines diverses. Ils peuvent en effet correspondre aussi bien à des produits excrétés par les parasites (antigènes métaboliques) qu'à des substances libérées par les *Plasmodium* en cours de destruction (antigènes cata-

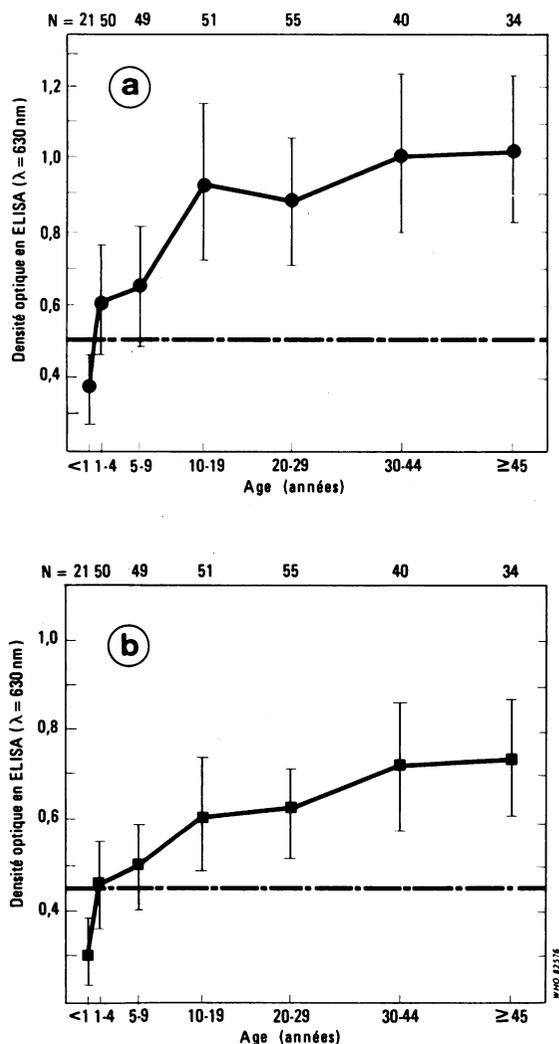


Fig. 4. Mesure de la corrélation entre le taux d'anticorps anti-*Plasmodium* et l'âge des individus. Le taux d'anticorps est mesuré en ELISA en utilisant a) l'antigène somatique et b) l'antigène métabolique. Les segments verticaux représentent la valeur de l'écart type. Les nombres d'échantillons sur lesquels les moyennes ont été calculées étaient pour les sept groupes d'âge (de la gauche à la droite) de 21, 50, 49, 51, 55, 40 et 34.

boliques), à des substances libérées au moment de la lyse des hématies parasitées, ou enfin à des *coat antigens* laissés dans le milieu de culture par des mérozoïtes lors de leur pénétration dans les hématies.

Nous tentons actuellement de préciser l'importance

relative, la nature et l'activité antigénique de chacun de ces antigènes en utilisant des cultures synchronisées de *P. falciparum* et en recueillant les milieux après des phases bien précises du développement parasitaire.

SUMMARY

EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* PRODUCED IN *IN VITRO* CULTURE : A COMPARATIVE STUDY WITH SOMATIC AND WHOLE PARASITE ANTIGENS

During its multiplication *in vitro*, *Plasmodium falciparum* releases excretory-secretory antigens into the culture medium. Since these antigens are present in minute quantities they are for the most part masked by the different components of the medium, in particular those of the human serum. The excretory-secretory antigens have been isolated by a simple technique using ion-exchange chromatography, and in this way it was possible to characterize a series of fractions ("antigen E"), among the many fractions obtained, whose antigenic activity was higher and whose

protein concentration was relatively low. This antigen E was compared, using immuno-enzymology, to somatic antigens extracted from isolated *P. falciparum* by sonication. It was also compared, using the indirect immunofluorescence assay (IFA), with a whole parasite antigen preparation. In the two tests, the somatic antigen and antigen E gave very similar results with 300 human sera collected in an endemic area. Antigen E was stable on exposure to a temperature of 80 °C for up to 30 min.

REFERENCES

1. AMBROISE-THOMAS, P. *Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immuno-fluorescence*. Thèse Sciences, Lyon, 1969.
2. AMBROISE-THOMAS, P. & DESGEORGES, P. T. Diagnostic immuno-enzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. 1. Modalités techniques. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, **56**: 609-613 (1978).
3. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**: 248-254 (1976).
4. JEPSEN, S. & ANDERSEN, B. J. Immunoabsorbent isolation of antigens from the culture medium of *in vitro* cultivated *Plasmodium falciparum*. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, Sect. C, **89**: 99-103 (1981).
5. KILEJIAN, A. Stage-specific proteins and glycoproteins of *Plasmodium falciparum* : identification of antigens unique to schizonts and merozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**: 3695-3699 (1980).
6. LAMBROS, C. & VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of parasitology*, **65**: 418-420 (1979).
7. MACKEY, L. ET AL. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection using a solid-phase radioimmunoassay for the detection of malaria antigens. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, **58**: 439-444 (1981).
8. PERRIN, L. H. ET AL. Characterization of antigens from erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* reacting with human immune sera. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **75**: 163-165 (1981).
9. SADUN, E. H. & GORE, R. W. Mass diagnostic test using *Plasmodium falciparum* and Chimpanzee erythrocyte lysate. *Experimental parasitology*, **23**: 277-285 (1968).
10. SIDDIQUI, W. A. ET AL. *In vitro* production and partial purification of *Plasmodium falciparum* antigen. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, **57** (Suppl. 1): 75-82 (1979).
11. TRAGER, W. & JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**: 673-675 (1976).
12. WILLIAMS, A. I. O. & HOUBA, V. Soluble serum antigens of *P. falciparum* in Nigerians. 1. Local incidence of malarial soluble serum antigens and antibodies. *African journal of medical sciences*, **3**: 295-307 (1972).
13. WILLIAMS, A. I. O. Preparation and use of malarial placenta antigen for immunodiffusion studies in a Nigerian population. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**: 621-630 (1973).
14. WILSON, R. J. M. & VOLLER, A. Malarial S-antigens from man and owl monkey infected with *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, **61**: 461-464 (1970).

15. WILSON, R. J. M. ET AL. The stability and fractionation of malarial antigens from the blood of Africans infected with *Plasmodium falciparum*. *International journal for parasitology*, 3: 511-520 (1973).
 16. WILSON, R. J. M. The production of antigens by *Plasmodium falciparum* in vitro. *International journal for parasitology*. 4: 537-547 (1974).
-