



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude morphologique des stades érythrocytaires d'une souche PLF3 de Plasmodium falciparum (Laveran 1903) maintenue depuis plus de quatre ans en culture in vitro

Dupont, Claudine

Award date:
1989

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Telex 59222 facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Contribution à l'étude morphologique des stades érythrocytaires d'une souche PLF3 de *Plasmodium falciparum* (Laveran 1903), maintenue depuis plus de 4 ans en culture *in vitro* .

Dupont Claudine

Résumé :

Ce travail est consacré à l'étude en microscopie électronique de la souche PLF3 de *Plasmodium falciparum* (Laveran 1903), cette souche, isolée chez un patient en Ouganda, est actuellement cultivée depuis plus de quatre ans sur globules rouges humains à l'Institut de Médecine Tropicale, à Anvers.

Il paraissait important de rechercher si le fait d'être maintenu en culture depuis quelques années, ne modifiait pas la morphologie du plasmodium comme c'est le cas de nombreux haemoflagellés tels les leishmanies, par exemple.

Nos observations morphologiques ont été comparées à celles de la littérature concernant *P. falciparum* présent dans le sang de patients.

Nous avons observé un aspect particulier concernant le corps multilamellaire et la vacuole chez le trophozoïte. Nous avons également étudié en coupes sériées, un gamétoocyte tout à fait remarquable.

Nous espérons avoir apporté des éclaircissements quant au rôle tenu par le corps multilamellaire et les interactions que peut avoir le trophozoïte avec la cellule hôte.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Septembre 1989

Promoteur : le Dr J.M. Jadin.

Co-promoteur : le Père P. Devos.

REMERCIEMENTS.

Au terme de ce mémoire, je désire exprimer ma profonde gratitude envers le Docteur J.M. JADIN qui m'a guidée et conseillée tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Professeur M. WERY de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers pour ses judicieux conseils et pour la souche de Plasmodium qu'il a mise à ma disposition.

Qu'il me soit permis également de remercier le Professeur R. Leloup pour m'avoir accueillie dans le laboratoire interfacultaire de microscopie électronique, Madame Ch. Devignon et Monsieur Y. Houbion pour leur disponibilité et leur aide précieuse.

Je remercie également le Père P. Devos et les Professeurs E.Feytmans et E. Depierreux, qui m'ont permis l'accès à leur laboratoire.

Un merci tout particulier à Madame M. Charlier, à Mademoiselle M.C. Willem, et à Monsieur Guy François, pour leur collaboration et leur sympathie.

Je remercie aussi mon époux, et ma famille pour leur soutien durant mes études universitaires.

Je remercie enfin tous ceux qui d'une manière ou d'une autre ont participé à la réalisation, la rédaction et plus spécialement l'impression de ce travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.

A. A propos des plasmodiums.

- A.1. Classification.
- A.2. Définition.
- A.3. Cycle évolutif des plasmodiums humains.
- A.4. Morphologie des stades intra-érythrocytaires de *P. falciparum*.

B. A propos du paludisme.

- B.1. Définition.
- B.2. Historique.

C. A propos des recherches sur les plasmodiums.

- Recherches sur la culture de *P. falciparum*.
- La culture *in vitro* de *P. falciparum*.
- Remarques.

CHAPITRE 1 : BUT DU MEMOIRE.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.

- 2.1. Le parasite.
- 2.2. Techniques de culture.
- 2.3. Techniques de microscopie.

CHAPITRE 3 : RESULTATS.

- 3.1. Etude en microscopie optique de *P. falciparum*.
- 3.2. Etude en microscopie électronique de *P. falciparum*

CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION.

INTRODUCTION.

A. A Propos des plasmodiums.

A.1. classification.

Le genre *Plasmodium* fait partie de la classe des Sporozoa, ordre des Coccidiida, famille des Plasmodiidae.

L'ordre des Coccidiida se subdivise en deux sous-ordres : les *Haemosporiidea* (dont font partie les plasmodiums) et les *Eimeriidea* (les coccidies).

Les *Haemosporiidea* ont besoin d'un arthropode vecteur pour être véhiculés dans le sang d'un vertébré où se produira leur schizogonie.

Les *Eimeriidea* passent, quant à eux, tout leur cycle dans l'intestin d'un hôte; la transmission se fait par les spores libérés dans le milieu extérieur.

Le genre *Plasmodium* est subdivisé en 9 sous-genres dont:

- 2 sous-genres parasites de sauriens.
- 4 sous-genres parasites d'oiseaux.
- 3 sous-genres parasites de mammifères.

Les 3 sous-genres parasites des mammifères sont:

- Plasmodium* (*Plasmodium*)
Schizontes érythrocytaires grands, gamétocytes arrondis, parasites des primates.
- Plasmodium* (*Vinckeia*)
Schizontes érythrocytaires petits, gamétocytes arrondis, parasites des antilopes, rongeurs et autres mammifères à l'exclusion des primates.
- Plasmodium* (*Laverania*)
Schizontes érythrocytaires grands, gamétocytes allongés (falciformes), parasites des primates.

A.2. Définition.

Un plasmodium est un parasite amiboïde, intracellulaire, producteur de pigment et dont le cycle reproductif présente une alternance de schizogonie (reproduction asexuée) chez un hôte vertébré et de sporogonie (reproduction sexuée) chez un hôte invertébré.

Les spécificités d'hôtes sont très étroites.

BOYD, cité par WERY (1983) dénombre 146 espèces parasites de différents vertébrés dont seulement quatre espèces se retrouvent dans le sang de l'homme : *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* et surtout *P. falciparum*.

A.3. Cycle évolutif des plasmodiums humains.

Il faut distinguer deux parties dans le cycle du plasmodium :

La schizogonie (reproduction asexuée) chez l'homme et la sporogonie (reproduction sexuée) chez l'anophèle.

-Cycle chez l'homme :

Développement exo-érythrocytaire.

Lors de la piqûre, l'Anophèle femelle inocule, avec sa salive, des sporozoïtes qui sont la forme infestante; ceux-ci ne font que transiter dans les capillaires sanguins (30 à 60 minutes) pour pénétrer dans les cellules du foie.

Dans les hépatocytes, les sporozoïtes s'arrondissent et grandissent, leur noyau se divise un grand nombre de fois avant que le cytoplasme ne se divise à son tour (schizogonie).

Ainsi se forme un schizonte exo-érythrocytaire, rempli de mérozoïtes. Ces derniers seront déversés dans la circulation sanguine où ils poursuivront le cycle après envahissement des globules rouges.

Remarque : il existe des sporozoïtes particuliers qui pénètrent les hépatocytes, mais ne poursuivent pas le cycle habituel. Ils mettront plusieurs semaines, voir plusieurs mois, pour arriver à produire un schizonte mûr. Ce sont des hypnozoïtes.

Ces formes dormantes de plasmodium, particulièrement bien étudiées par P. C. C. GARNHAM, sont présentes chez *P. vivax* et *P. ovale*, mais ne se retrouvent pas chez *P. falciparum*.

Les hypnozoïtes sont responsables du syndrome appelé "malaria à rechutes".

Développement endo-érythrocytaire.

Le mérozoïte qui pénètre dans un globule rouge se transforme en trophozoïte. Celui-ci grandit en phagocytant l'hémoglobine.

Le trophozoïte passe par un stade appelé "forme amiboïde" ou "trophozoïte âgé" dont le cytoplasme est plus abondant mais le noyau toujours unique. Ensuite, son noyau se multiplie; il en résulte un schizonte intra-érythrocytaire.

Ce dernier, occupe habituellement tout le globule rouge.

Ensuite, le cytoplasme du parasite se divise en autant de morceaux qu'il y a de noyaux présents. Les mérozoïtes ainsi formés sont libérés dans la circulation sanguine par la déhiscence de la cellule hôte. Ils vont gagner d'autres hématies pour redevenir des trophozoïtes.

La nouvelle génération de mérozoïtes va donc propager et amplifier l'infestation dans la circulation sanguine.

D'autres mérozoïtes pénètrent aussi les hématies, mais ne s'y divisent pas. Ils se différencient en formes sexuées :

- les macrogamétocytes ou gamétocytes femelles.
- les microgamétocytes ou gamétocytes mâles.

Ces formes sexuées mûrissent en quelques jours à l'intérieur des globules rouges.

Quant les gamétocytes ne sont pas repris par un anophèle avec le sang ingéré, ils dégènèrent et disparaissent, car ils ne savent pas poursuivre leur développement chez l'hôte vertébré.

- Cycle chez l'Anophèle femelle :

Lors de son repas sanguin sur un paludéen, l'Anophèle femelle ingurgite du sang parasité.

Dans son estomac, les formes évolutives asexuées de plasmodium dégènèrent rapidement et sont digérées. Les cellules sexuées mûres résistent aux sucs digestifs et se transforment en cellules aptes à la fécondation sous l'influence des changements de température et de milieu.

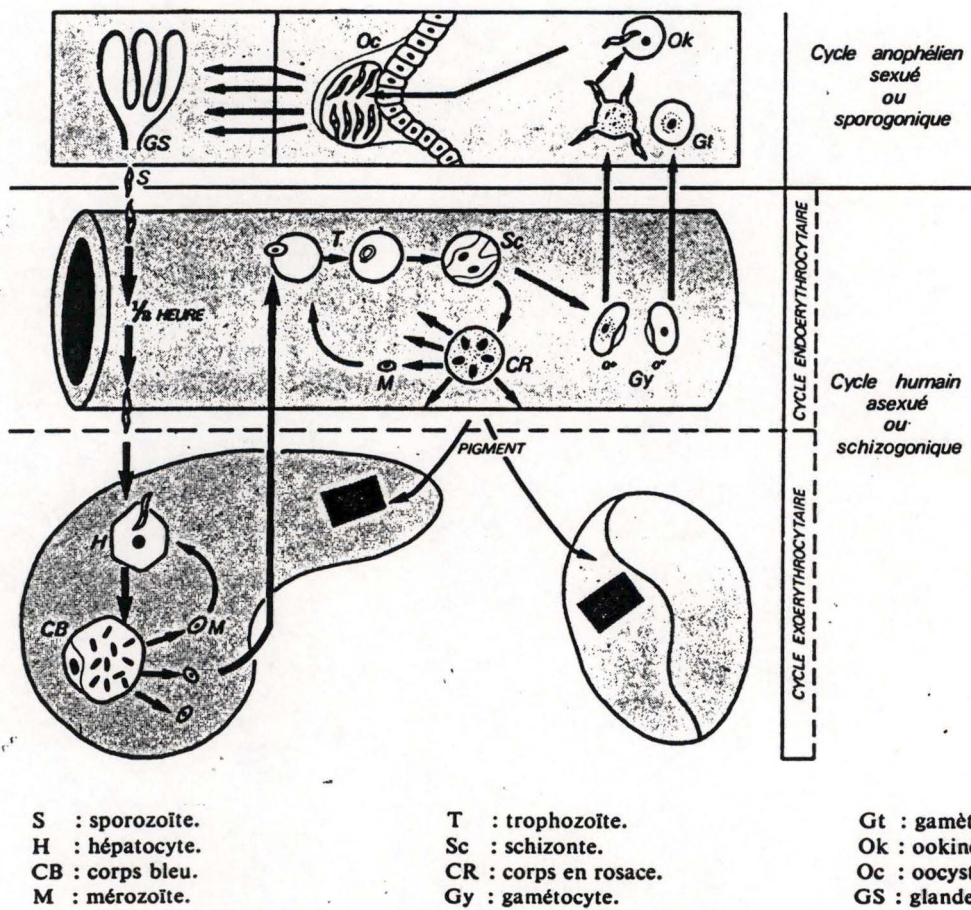
En quelques minutes, le microgamétocyte subit l'exflagellation qui produit en moyenne 8 microgamètes; et le macrogamétocyte, sans subir de modifications importantes, devient réceptif et exerce un pouvoir d'attraction sur les microgamètes. La pénétration d'un microgamète dans un macrogamétocyte ou fécondation, produit un "ookinète".

Cet organisme mobile, ne séjourne pas longtemps dans l'estomac du moustique. Il migre sous la membrane séreuse qui enveloppe l'estomac, pour se transformer en oocyste. Ce dernier grandit sur place. A l'intérieur de l'oocyste, les cellules se divisent un grand nombre de fois pour aboutir à la formation de centaines de sporozoïtes filiformes.

Quand l'oocyste mûr éclate, il libère les sporozoïtes. La majorité d'entre-eux, gagne les glandes salivaires.

VOIR SCHEMA DU CYCLE EVOLUTIF DES PLASMODIUMS HUMAINS.
FIG. A.3.

FIG.A3 SCHEMA DU CYCLE DES PLASMODIUMS HUMAINS.



A.4. Morphologie des stades intra-érythrocytaires de P.falciparum.

A.4.1. Stade trophozoïte :

Le stade trophozoïte jeune est caractérisé par la forme en anneau du parasite dans l'érythrocyte. Cette forme parasitaire est petite (1-2 microns de diamètre).

La couronne de cytoplasme est extrêmement fine et le noyau est proéminent.

Il est fréquent de rencontrer deux ou trois parasites dans une hématie.

Ultrastructure du trophozoïte :

Le trophozoïte est délimité par deux membranes unitaires selon Robertson.

L'espace inter-membranaire fait 200 à 300 Å de large.

La membrane interne qui délimite le contenu cytoplasmique est une membrane plasmique classique.

La membrane limitante externe ou membrane de la vacuole parasitophore provient de l'invagination de la membrane de la cellule hôte (Ladda et al 1969).

La membrane de la vacuole parasitophore s'étend avec le développement du parasite et reste jusqu'à la formation de la prochaine génération de mérozoïtes.

Les trophozoïtes jeunes sont amiboïdes, les pseudopodes entourés par la membrane de la vacuole parasitophore apparaissent souvent en dehors du cytoplasme parasitaire comme des extensions tubulaires ou fissures de Maurer dans le stroma de l'hématie.

Le cytoplasme est composé d'un grand nombre de particules de ribonucléoprotéine (R N P) pouvant se lier en fins filaments, ainsi que du réticulum endoplasmique.

Le trophozoïte comprend plusieurs organelles tels que:

le micropyle :

c'est une structure observée en microscopie électronique.

Il s'agit d'une dépression de la membrane plasmique entourée par deux anneaux denses aux électrons avec un diamètre de 50-60 micromètre.

la mitochondrie :

les parasites malariques de mammifères ne possèdent pas de vraie mitochondrie. Il s'agit d'une structure limitée par une double

membrane, renfermant parfois un matériel granuleux dispersé dans la matrice. C'est l'équivalent d'une mitochondrie (Aikawa et al 1966).

Excepté dans de rares occasions, cette structure ne présente pas de crêtes tubulaires typiques comme celles rencontrés chez les plasmodiums d'oiseaux et de reptiles.

l'appareil de Golgi :

cette structure est rarement mentionnée par les auteurs, exceptés dans le cadre de descriptions de la vacuole multilamellaire.

la vacuole nutritive :

cette vacuole de grande dimension est généralement localisée au milieu du plasmodium. Elle est limitée par une double membrane et contient une portion du cytoplasme de l'érythrocyte. (Voir schéma A.4.1.).

les vésicules à pigment :

les vésicules délimitées par une ou deux membranes sont généralement situées en périphérie le long de la membrane limitante interne du parasite. Elles renferment du pigment malarien sous forme de cristaux.

le noyau :

Il est limité par une double membrane.

Il ne possède pas de nucléole.

Le nucléoplasme présente une réticulation homogène avec de nombreuses particules éparpillées ressemblant à celles du cytoplasme. Ces dernières, sont éminemment attachées à la membrane nucléaire externe qui est souvent dilatée.

le corps multilamellaire :

Il s'agit d'une structure formée de double membrane concentrique (Rudzinska et Trager 1959), que l'on rencontre fréquemment dans le cytoplasme.

les corps multilamellaires sont généralement situés près du noyau et de la vacuole nutritive. Ils peuvent également être associés avec la membrane plasmique de la cellule.

Il semble que cet organite est soit attaché à la membrane unitaire interne du parasite, soit est une invagination des deux membranes unitaires dans le cytoplasme du trophozoïte. (Theakston, Fletcher, Maegraith .1968).

Différentes hypothèses sont émises quant à la fonction de cette organelle:

- Permettre la prolifération des membranes.
- Tenir le rôle d'une mitochondrie, ou celui d'un type de Golgi pour servir au transport à l'intérieur du parasite (Theakston, Fletcher et Maegraith).

En 1968, Jadin, Creemers et Le Ray suggèrent une autre interprétation:

- ce corps serait le résidu de la vacuole alimentaire.

Au cours de la digestion, le contenu de la vacuole alimentaire se répartit entre les phagosomes. Cette vacuole vidée ne serait pas rejetée ni même assimilée mais stockée comme les déchets d'hémoglobine.

La paroi de cette vacuole ainsi vidée se replie, offrant l'image d'une vacuole multimembranaire. Voir schéma A.4.1.

Les réactions ne se font pas attendre:

- En 1969, Howells indique une éventuelle présence de cytochrome oxydase dans le corps multilamellaire et long de la membrane plasmique. Cela lui permet de spéculer que le corps multilamellaire pourrait être l'équivalent d'une mitochondrie.

Mais en 1970, Blackburn et Vinijchaikul refusent cette hypothèse. Pourquoi le parasite comporterait-il deux structures dissemblables ayant la même fonction ?

- Ils pensent plutôt que cette structure semblable à de la myéline devrait être très probablement un artéfact de fixation.

Aikawa en 1968, suggère une autre hypothèse:

- cette structure multilamellaire pourrait jouer le rôle de réservoir énergétique pour la mitochondrie.

En effet, les mitochondries sont connues pour être localisées près d'une réserve de substrat facilement disponible.

Actuellement, le rôle du corps multilamellaire n'est toujours pas connu.

Remarque:

Au delà du stade trophozoïte, dans le cas d'infection à *P. falciparum*, la membrane plasmique de la cellule hôte développe des protubérances (ou knobs).

Celles-ci possèdent une antigénicité différente du reste de la membrane (Kilejian et al 1977), (Langreth et Reese 1979).

Elles permettent au globule rouge parasité d'adhérer à la paroi endothéliale des veines. Cette séquestration va augmenter leur survie.

2. Le stade schizonte:

La forme du schizonte mûr est ovale ou irrégulière.

Le schizonte est généralement défini comme un parasite possédant plus d'un noyau (16 grands noyaux en moyenne chez le schizonte mûr). Il est plus large que le trophozoïte, mais il ne remplit pas complètement le globule rouge.

Le pigment est rassemblé au centre du parasite.

Ultrastructure du schizonte :

Les deux évènements majeurs visibles durant la schizogonie sont:

-la division nucléaire et la différenciation des organelles cytoplasmiques.

La prolifération du réticulum endoplasmique dans le trophozoïte mature et dans la phase précoce du schizonte suggère l'augmentation de l'activité métabolique avant et durant la division, sans doute dû à l'utilisation de nourriture accumulée durant la phase trophozoïte à des fins de division et pour la formation du mérozoïte. (Theakston, Fletcher, Maegraith 1968)

Le premier stade schizogonique est caractérisé par l'apparition d'une plaque centriolaire dans la membrane nucléaire(Aikawa 1972) Cette région opaque aux électrons est située dans un fuseau de microtubules aux extrémités desquels se dressent les kinétochores.

Au fur et à mesure que la division progresse, le noyau acquiert une forme semblable à un haltère.

Un nucléole apparaît et éventuellement, les microtubules disparaissent.

Finalement, deux noyaux sont formés.

Durant cette division nucléaire, la membrane nucléaire reste présente, excepté à l'endroit où la plaque centriolaire est localisée.

Pendant que la division nucléaire se produit, on assiste à la différenciation des organelles cytoplasmiques.

les régions couvertes par une membrane interne font protrusion dans l'espace laissé par la vacuole parasitophore pour former de nouveaux mérozoïtes.

Avec la progression du bourgeonnement, on a migration des organelles (noyau, mitochondrie, corps sphérique, reticulum endoplasmique, ribosomes) dans le mérozoïte.

Lorsque les mérozoïtes se développent, la taille du schizonte original diminue pour n'être plus finalement qu'un corps résiduel entouré d'une membrane unitaire et rempli de pigment malarique.

Lors de la rupture de l'érythrocyte parasité, on a dispersion des mérozoïtes et du corps résiduel.

3. Stade gamétocyte (forme sexuée).

Les gamétocytes matures de *P. falciparum* se distinguent de ceux des autres espèces plasmodiales par leur forme en croissant.

Arrivé à maturité, le gamétocyte mâle présente des extrémités arrondies, qui lui donnent un aspect en "Banane". Il mesure 9 à 11 micromètres de long. Le gamétocyte femelle est plus arqué et plus élancé, il mesure 8 à 9 micromètres et présente des extrémités plus fines.

Le pigment est rassemblé autour du noyau central.

Le micro- et le macrogamétocyte sont différenciés en microscopie électronique.

Ultrastructure du gamétocyte :

Le gamétocyte est entouré par plusieurs membranes.

La membrane externe semble être la membrane de la vacuole parasitophore. Elle est soutenue par une pellicule composée d'une membrane unitaire externe suivie d'un espace irrégulier et enfin d'une paire de membranes unitaires discontinues intimement apposées de 15 à 18 micromètres d'épaisseur.

On observe également chez différentes espèces, une rangée de microtubules sous pelliculaire.

Le cytoplasme est finement granuleux avec des ribosomes éparpillés qui sont très nombreux chez le macrogamétocyte mature.

Le gamétocyte comprend plusieurs organelles tels que:

-Des micropyles.

-Des vacuoles nutritives :

formées à partir du micropyle. Elles sont entourées par une double membrane et peuvent contenir du pigment malarique.

-Des " mitochondries ":

localisées près du noyau.

-Le noyau :

le microgamétocyte possède un gros noyau de forme irrégulière sans nucléole. Tandis que le macrogamétocyte possède un noyau dense avec un nucléole distinct à la maturité. Chez le gamétocyte mature, on observe des centrioles près du noyau (Aikawa et al 1969), (Sinden et al 1976).

-Des corps denses aux électrons :

1. Sphérules denses aux électrons. Elles sont souvent associées au corps de Golgi et aux vacuoles nutritives. Elles peuvent être à l'origine des lysosomes.

2. Corps osmiophiles. Ils sont observés dans le cytoplasme près de la pellicule. Ils sont entourés par une membrane simple, et fréquemment, ils projettent des extensions vers la membrane interne de la pellicule. Ces corps peuvent avoir une fonction similaire à celle des rhoptries et micronèmes du mérozoïte et sporozoïte. Leur nombre est plus important chez le macrogamétocyte.

B. A propos du paludisme.

B.1. Définition.

Le paludisme ou malaria est une maladie parasitaire endémo-épidémique provoquée par des protozoaires du genre *Plasmodium*.

Ces hématozoaires sont transmis par la piqure d'un moustique vecteur, l'anophèle femelle.

B.2. Historique.

L'historique du paludisme est extrêmement riche. Il montre bien à quel point les progrès de la médecine sont, à chaque époque, directement liés aux améliorations techniques, aux pressions socio-économiques et aux impératifs militaires.

En fait, la première individualisation réelle du paludisme est d'ordre thérapeutique. Elle est liée à la conquête de l'Amérique latine. En 1630, Don Francisco Lopez découvre les vertus de l'écorce de quinquina. Très vite, le conditionnement de la poudre et l'exportation deviennent le monopole des Pères jésuites.

En 1820, Pelletier et Caventou isolent à Paris l'alkaloïde actif: la quinine .

Maillot en fera usage au cours de la campagne d'Algérie en 1830.

C'est en 1880 que Laveran, un chirurgien militaire, découvre le parasite responsable dans les globules rouges des paludéens.

En 1897, la transmission de cette affection par les anophèles est découverte par Ross ; Grassi la confirme en 1898.

Sur le plan thérapeutique, la situation est demeurée pratiquement inchangée de 1820 jusqu'à 1935, on se contente de la quinine. C'est un bon médicament, fiable, bon marché et peu toxique.

Il faut attendre les guerres, accompagnées de difficultés d'approvisionnement en écorce de quinquina pour voir la recherche thérapeutique se mettre en action, aboutissant à la mise au point en Allemagne, en 1924, du premier anti-paludéen de synthèse, la Pamaquine (Schuleman). D'autres produits suivirent avec la quinacrine (Mausse et Mietsh) et la chloroquine (Andersag). Entre 1948 et 1950, Burckhalter découvre l'amiodiaquine et la primaquine, Hitchings la pyriméthamine et Curd le chloproguanyl.

Entre 1950 et 1970, l'Organisation Mondiale de la Santé a adopté un programme global d'éradication du paludisme, basée exclusivement sur la lutte antivectorielle.

Dès avant 1960, certains anophèles deviennent résistants au D.D.T. et les produits de remplacement sont plus chers, parfois plus toxiques et moins efficaces.

Entre 1962 et 1970 l'apparition, dans certaines régions du monde, de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine relance la recherche de nouvelles molécules actives, mais les résultats sont assez décevants.

En 1969, l'O.M.S. révisé sa stratégie devant les nombreux échecs, en adoptant des projets de lutte plus concrets.

Les 20 dernières années ont été, par ailleurs, marquées par l'extraordinaire prolifération des travaux concernant l'immunologie du paludisme, en vue d'obtenir une immuno-prophylaxie ou une immuno-thérapie qui devraient dans l'esprit d'un grand nombre de malariologistes prendre tôt ou tard, le pas sur la chimiothérapie.

En matière de vaccination, de très sérieux espoirs existent actuellement.

Aujourd'hui, le paludisme est encore l'un des fléaux les plus dévastateurs de l'humanité. On ne dispose pas de chiffres exacts pour le nombre de décès directement dus à cette maladie, mais pour l'Afrique seule, on estime que la malaria est responsable chaque année de la mort d'un million de nourrissons et de jeunes enfants.

Il est évident que de nouvelles approches sont nécessaires telles que :

- Rechercher des médicaments avec des mécanismes d'action entièrement nouveaux .

- Mettre au point des vaccins à effet étioprophy lactique (qui agissent directement sur la cause de la maladie), et des vaccins capables d'atténuer les manifestations cliniques de la maladie et de bloquer la transmission.

Ces nouvelles approches ne peuvent se concevoir qu'en association avec des recherches sur le parasite lui-même.

C. A propos des recherches sur les plasmodiums.

Toutes les recherches faites sur des plasmodiums ont eu des répercussions en chimiothérapie humaine surtout avant l'utilisation de cultures *in vitro* de plasmodium pathogènes pour l'homme.

Des centaines de milliers de drogues ont été testées de façon systématique en vue de leur découvrir une action éventuelle contre les plasmodiums .

Citons par exemple la "Screening Procedure Based on Mortality" avec des sporozoïtes de *P. gallinaceum* chez le poussin (RANE L. & RANE D.S., 1972).

Mentionons aussi les milliers de travaux réalisés avec des souches de *Plasmodium* de rongeurs isolées en Afrique Centrale après la deuxième guerre mondiale, par le Professeur Ignace VINCKE tels *P. berghei* et *P. vinckei*, puis les différentes autres souches telles *P. berghei yoelii*.

Il faut également mentionner les travaux fait avec *P. lophurae* et *P. knowlesi*.

Recherches sur la culture de *P. falciparum*.

P. falciparum est un parasite propre à l'homme. Il peut se développer chez le chimpanzé splénectomisé ou chez un petit singe sud américain, l'*Aotus trivirgatus* (GEIMAN et MEAGHER, 1967). Ce n'est qu'à partir de ce moment que les cultures *in vitro* de *P. falciparum* ont pu se faire (SIDDIQUI et al, 1970).

Avant cette période, les essais de chimiothérapie se faisait uniquement sur des plasmodiums d'oiseaux ou de rongeurs, et lorsque les résultats étaient satisfaisants, ont expérimentait chez des patients, en tenant naturellement compte des problèmes d'éthique que cela posait.

En fait, ce n'est que depuis peu d'années que les problèmes techniques posés par la culture de *P. falciparum* sont plus ou moins maîtrisés.

La culture *in vitro* de *P. falciparum* permet d'effectuer des recherches sur la production à grande échelle d'antigènes vaccinaux. Ces recherches pourraient conduire à l'obtention de vaccins suffisamment bon marché pour être utilisés dans les pays les moins développés.

Actuellement, de très sérieux espoirs existent en matière de vaccination.

La Culture *in Vitro* de *P. falciparum*.

En 1976, TRAGER réussit une culture continue *in vitro* de *P. falciparum*.

Grâce à cette nouvelle technique, différents problèmes furent résolus tel que : la faible parasitémie dans la circulation périphérique des humains volontaires qui posait des limites importantes pour l'étude de l'ultrastructure des formes parasitaires intra-érythrocytaires.

Cette technique a aussi permis d'étudier les conditions de l'environnement sur les stades érythrocytaires.

Il existe deux méthodes bien connues pour la culture des stades érythrocytaires.

-The flow-vessel technic :

Elle est semi automatique. elle consiste à assurer un écoulement lent et permanent du milieu sur une couche de globules sanguins décantés.

Cette méthode est utilisée pour la production à grande échelle de parasites et n'exige pas de surveillance quotidienne.

-The petry dish/candle jar method:

Elle est exécutée sur des boîtes de Pétri. Elle nécessite un renouvellement manuel du milieu environ 2 à 3 fois par semaine.

Cette méthode facile et offrant une certaine souplesse, est utilisée pour des expériences qui requièrent de nombreux réplicats.

En effet, elle permet d'évaluer les conditions de culture optimales en ce qui concerne : le milieu de culture, le mélange gazeux, les tampons, les types et concentrations de sérum (etc...).

Pour ces deux méthodes, on utilise des érythrocytes humains de groupe sanguin A+, disposés en fine couche dans une solution à base de milieu RPMI 1640 sous une atmosphère de 90% N₂ 5% O₂ et 5% CO₂ et à une température de 37°C. (RPMI = Roswell Park Memorial Institute).

La solution est composée de milieu RPMI 1640, de sérum humain, de bicarbonate de soude 5% et d'antibiotique (gentamicine ou pénicilline).

Des hématies "fraîches" mélangées à ce milieu sont ajoutées régulièrement à la culture.

Auparavant, on effectue un prélèvement de la suspension infectée qui servira à lancer de nouvelles cultures, ou à d'autres expériences.

Remarques sur la culture *in vitro* de *P. falciparum*.

1. Le sérum humain se stocke à -20°C .

On l'utilise pour obtenir des gamétocytes.

Sinon, du plasma suffit pour avoir des formes asexuées.

2. Sachant que *P. falciparum* montre une préférence pour les hématies mûres, on utilise des érythrocytes ayant séjournés 21 à 28 jours dans un tampon citrate. Dès lors on a un optimum de croissance du parasite, et par ailleurs on utilise du sang vieilli des services de Transfusion, car après 3 semaines, le sang humain est inutilisable pour les banques de sang.

3. Pour des expériences à petite échelle, il est préférable de s'approvisionner en sang chez le même donneur. Car la principale source de variabilité du taux de développement de *P. falciparum* semble être lié à un caractère inhérent aux hématies "fraîches" du donneur. (JENSEN et TRAGER 1978).

4. Il semble que le taux de diffusion passif du glucose dans la couche d'érythrocytes et le taux concomitant d'acide lactique s'y accumulant soient les principaux facteurs, limitant la quantité et la qualité de la croissance parasitaire (JENSEN et TRAGER 1978). Donc, plus la couche cellulaire sera fine et plus le taux de croissance parasitaire sera important.

Si l'on désire, malgré tout, augmenter la valeur hématocrite, un système d'agitation est indispensable. Etant donné l'extrême fragilité des érythrocytes renfermant des parasites mûres, l'agitation sera modérée. D'ailleurs, on utilise des érythrocytes humains car il sont moins fragile que ceux de rhésus ou d'autres singes. Cette résistance serait liée à la concentration en spectrine et autres protéines de soutien, appartenant à la membrane limitant les globules rouges. (JENSEN- TRAGER, 1978).

Une des plus grandes applications de la culture *in vitro* en continu et à grande échelle, serait la création d'un vaccin anti-malarique.

Le problème est de savoir si les parasites de la malaria sont suffisamment immunogéniques pour être utilisés comme vaccin.

Un autre problème serait la mise en oeuvre d'une production à grande échelle d'antigène malarien.

Chapitre 1. But du mémoire.

Le but de ce travail est de comparer la morphologie de *P. falciparum* maintenu en culture *in vitro* depuis plus de quatre ans, avec des données de la littérature concernant le *P. falciparum* dans le sang de patients.

Chapitre 2. Matériels et Méthodes.

2. 1. le parasite.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la souche de *Plasmodium falciparum* (Ouganda Palo Alto PLF3 , clône B11).

Elle nous a été fournie par le professeur Marc Wéry de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers.

2. 2. Techniques de culture.

Le maintien de la souche se fait par culture *in vitro* dans des boîtes de pétry sous une atmosphère de 5% O₂, 5% CO₂ et 90% N₂.

Le renouvellement du milieu de culture a lieu deux fois par semaine .

La valeur hématocrite de la culture est de 1%.

La parasitémie est de 1 à 2 % le premier jour du renouvellement, pour atteindre un taux de 10 à 15 % après 3 jours.

Préparation des produits.

Solution concentrée de RPMI:

On dissout de la poudre de RPMI 1640 pour 5 litres, dans 4650 ml d'eau bidistillée.

A cette solution on ajoute : 250 mg d'hypoxanthine, 10 g de glucose, 29,7 g d' HEPES (N2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-éthane-sulfonic acid.)

On porte à 5650 ml et on obtient la solution concentrée de RPMI à PH : 6,81.

Solution sans sérum: (RP)

On prend 100 ml de la solution concentrée RPMI, on ajoute 4 ml de Na H CO₃ 5% et 1 ml de gantamycine 2%.

Solution prête à l'emploi:

On prend RP et on y ajoute 10 ml de sérum humain (type A+).

On obtient (RP+HS).

Préparation des érythrocytes "frais":

Ils sont obtenus à partir de sang humain (type A+).

Le sang est recueilli et conservé dans du citrate phosphate dextrose (CPD) à 4°C.

Après 3 à 4 semaines, on prélève un volume approprié de sang que l'on centrifuge 10 minutes à 800 g.

On resuspend le culot contenant les hématies, dans du RP et on centrifuge à nouveau. On répète l'opération. Les cellules fraîchement lavées dans RP sont alors resuspendues dans RP+HS.

2. 3. Techniques de microscopie.

2.3.1. Etude de la souche de *P. falciparum* en Microscopie Optique.

Des frottis préalablement fixés au méthanol et colorés au Giemsa, ont été observés au MO ZEISS (grossissement: 1000 x).

2.3.2. Etude de la souche de *P. falciparum* en Microscopie électronique

Microscopie à transmission:

- Fixation: glutaraldéhyde 2,5% tamponée : 15 min.
lavage au tampon Phosphate 0,1M, sucrose 0,18M. PH 7.2
- Post-fixation: tétr oxyde d'osmium 1% dans du tampon phosphate 0,1M à PH 7,2 : 60 min (4°C)
lavage au tampon phosphate 0,1M PH 7,2.
- Déshydratation: les culots sont déshydratés par passages successifs dans des bains d'alcool de concentrations croissantes:
alcool à 25° 2x 10 min. (4°C)
50° 2x 10 min. (4°C)
70° 2x 10 min. (4°C)
- Inclusion : Dans l'oxyde de propylène 4x5 min.
Dans un mélange oxyde de propylène/EPON 2 x15 min.
Dans l'épon pur à 37°C durant 12 h.
- Coloration: les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine et les coupes ultrafines destinées à la microscopie électronique sont contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de Plomb selon la méthode de Millonig (1961) et de Reynolds (1963).
- Observations: les grilles sont examinées au microscope électronique à transmission PHILIPS EM 301 sous une différence de potentiel de 60 KV.

CHAPITRE 3 . RESULTATS.

3.1. Etude en microscopie optique de *P. falciparum*.

-Les trophozoïtes de *P. falciparum* présentent la forme classique en bague, dont la lumière est occupée par la vacuole nutritive et la couronne est ornée par le noyau.

Nous observons du pigment malarien dans le cytoplasme du parasite.(FIG. 3.1.1.)

Il s'agit en fait d'un hématozoaire replié, enroulé sur lui-même.

-Nous observons aussi des schizontes qui ont une taille supérieure au trophozoïte.

-Nous observons au centre de la FIG. 3.2.1., un gamétocyte immature, de forme allongée.

(remarque : ces photographies ont été prises à l'Institut de Médecine Tropicale d' Anvers. Il s'agit d'une souche de *P. falciparum* maintenue en culture *in vitro* depuis plusieurs années.)

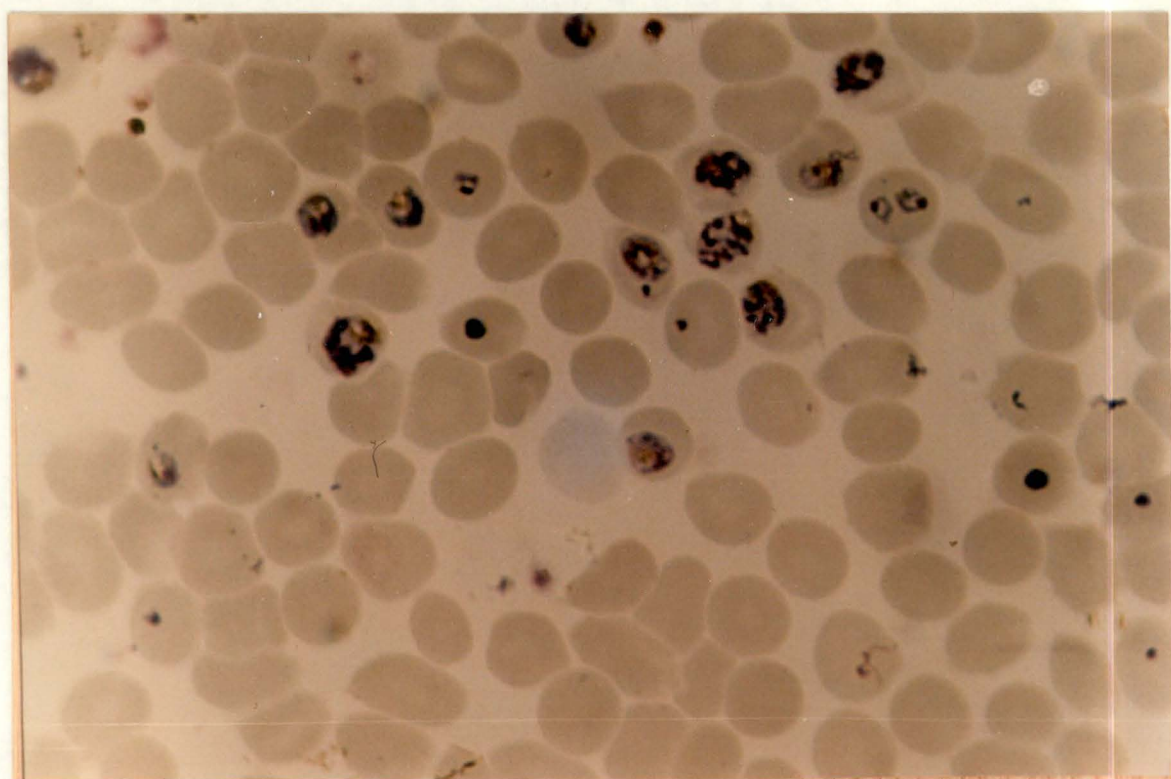


FIG. 3.1.1.

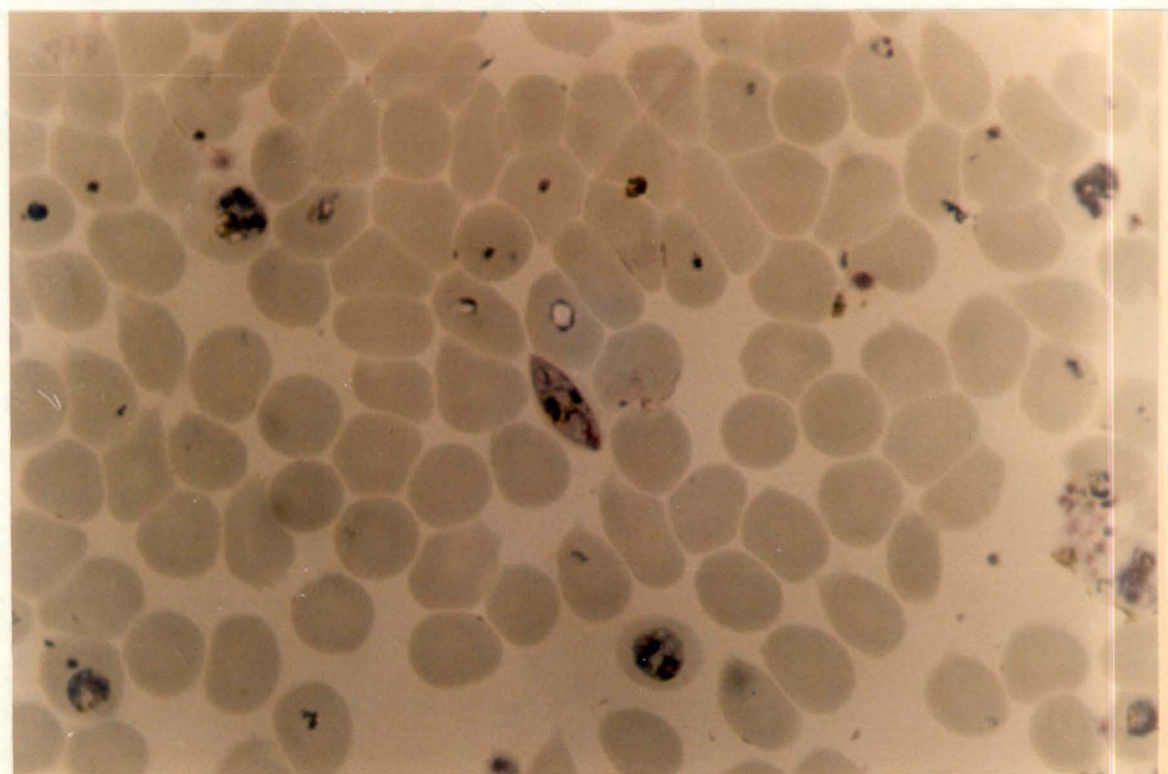


FIG. 3.1.2.

3.2. Etude en microscopie électronique de *P. falciparum*.

LE TROPHOZOITE.

1. La paroi cellulaire :

P. falciparum est entouré par deux membranes :

-Une membrane externe correspondant à la membrane de la vacuole parasitophore de la cellule hôte.

-Une membrane limitante interne, la membrane plasmique du parasite.

FIG.3.2.35., FIG. 3.2.4., FIG. 3.2.28 A., FIG. 3.2.34. et FIG.3.2.16.

2. Le cytoplasme :

Il est composé d'un grand nombre de particules de ribonucléoprotéine dont la majorité sont libres dans le cytoplasme.

Le réticulum endoplasmique est composé pour la plupart de petites vésicules ou de petits canalicules liés à des ribosomes.

FIG. 3.2.18. , FIG. 3.2.8., FIG. 3.2.9., FIG. 3.2.20., FIG. 3.2.15., FIG. 3.2.16., FIG.3.2.36.

3. Le corps multilamellaire :

Il est composé d'anneaux concentriques ou consiste en une spirale de double membrane unitaire lisse. Nous le retrouvons dans tous les stades de développements.

FIG. 3.2.4., FIG. 3.2.11., FIG. 3.2.28, FIG. 3.2.28 A., FIG. 3.2.26., FIG. 3.2.23., FIG.3.2.33., FIG. 3.2.15.

4. Le noyau :

Il baigne dans le cytoplasme. Il est de forme ronde ou légèrement ovale, la matrice peu dense aux électrons, est finement granuleuses . Nous n'observons pas de nucléole.

Le noyau est limité par une double membrane montrant des pores.
FIG. 3.2.2., FIG. 3.2.5., FIG.3.2.28., FIG. 3.2.34.

5. Le micropyle :

Cet organite a rarement été observé au cours de se travail, sur les FIG. 3.2.18. et FIG.3.2.44 A.

Nous remarquons les densifications de membranes de part et d'autre de l'orifice.

6. La vacuole nutritive :

Nous observons fréquemment une ou plusieurs vacuoles nutritives souvent situées en périphérie du trophozoïte. Elles contiennent du stroma érythrocytaire. Chaque vacuole nutritive est limitée par une double membrane.

FIG. 3.2.17.,

7. Vésicules à pigment :

Elles renferment des cristoïdes rectangulaires montrant une structure régulière en treillis. Elles sont souvent situées en périphérie. Nous observons les liens qui unissent la vacuole nutritive et les vésicules à pigment.

FIG. 3.2.1., FIG.3.2.11., FIG. 3.2.8., FIG. 3.2.36.

8. Corps denses aux électrons :

Nous avons observés des corps denses aux électrons, de forme ronde ou ovale, souvent situés en périphérie du trophozoïte.

FIG. 3.2.15., FIG. 3.2.37.

EVOLUTION DE LA SCHIZOGONIE.

1. Nous avons observés la présence de plusieurs noyaux.

FIG. 3.2.47. et FIG. 3.2.49.

2. Nous avons observés des épaissements membranaires.

FIG. 3.2.50. et FIG. 3.2.48.

LE GAMETOCYTE.

1. Nous avons observés des mitochondries et des corps denses.

FIG. 3.2.56. et FIG. 3.2.57.

2. Nous observons des microtubules.

FIG. 3.2.58. et FIG.3.2.58 A.

FIG. 3.2.1.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons : un noyau (N), deux vacuoles nutritives (vn) et une vésicule à pigment (p) chez le parasite.

Nous remarquons les liens entre l'enveloppe nucléaire et la double membrane des vacuoles nutritives (flèches).

Dans le milieu extérieur, nous observons une vacuole à double membrane (dm) qui est reliée aux hématies par des ponts (flèches).

(G. 22750 X)

FIG. 3.2.2.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons : Plusieurs vésicules à pigment (p), un noyau (N) dont l'enveloppe présente des circonvolutions au contact de la vacuole nutritive (vn).

(G. 27500 X)

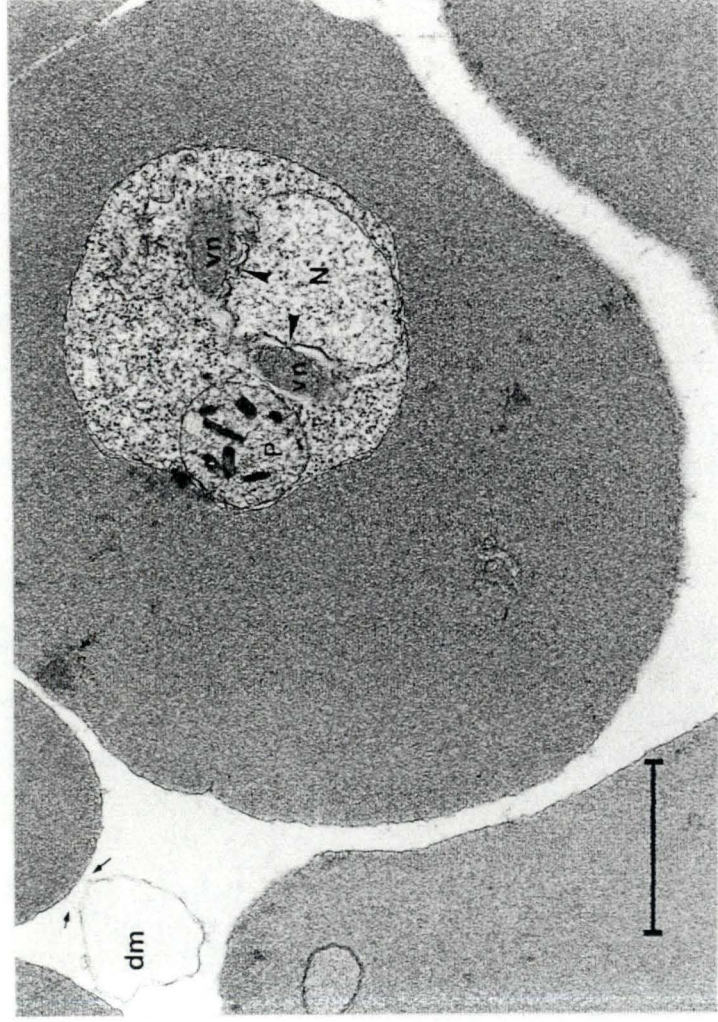


FIG. 3.2.1.

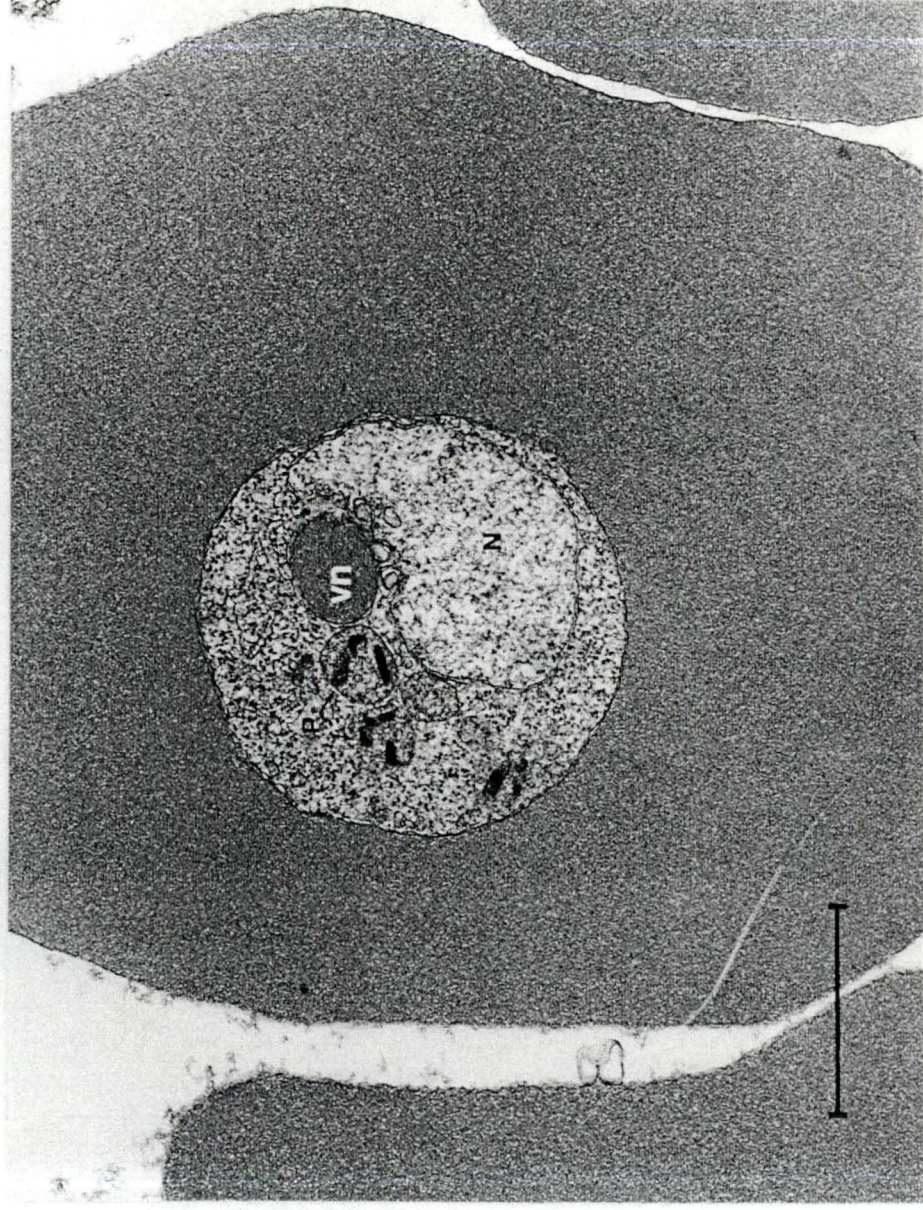


FIG. 3.2.2.

FIG. 3.2.3.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Les vésicules à pigment (p) sont alignées en périphérie du parasite.

(G. 22750 X)

FIG. 3.2.4.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons un corps multilamellaire (cm) étroitement lié à la double membrane nucléaire.

(G. 22750 X)

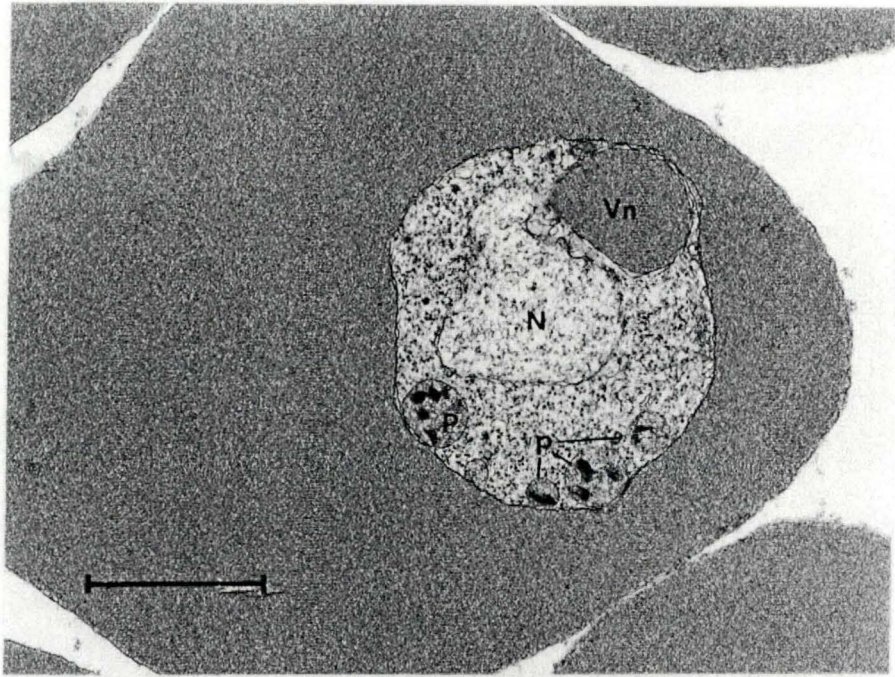


FIG. 3.2.3.

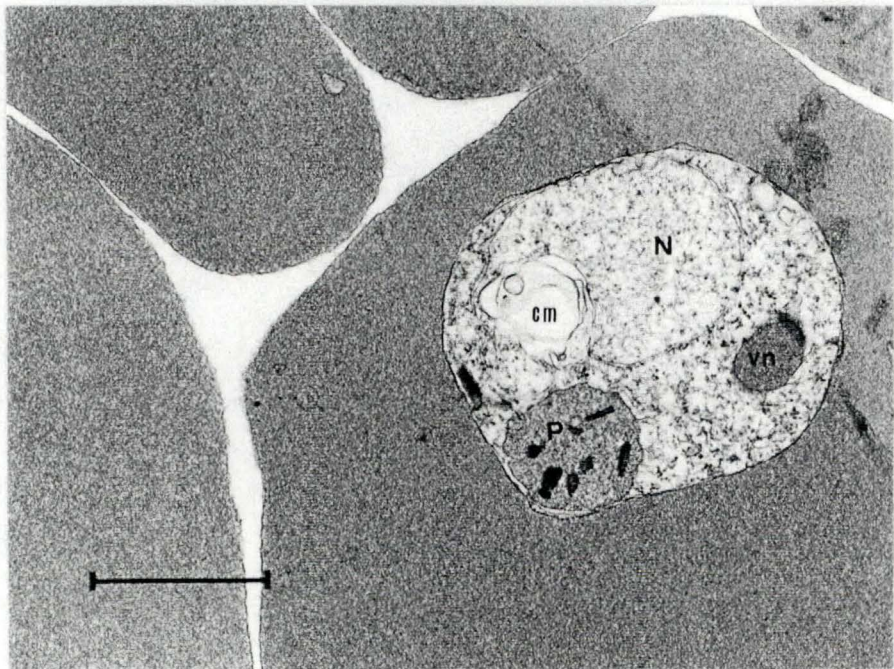


FIG. 3.2.4.

FIG. 3.2.5.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons : un noyau (N) étroitement accolé le long de la membrane limitante du parasite et un pore (pn), dans l'enveloppe nucléaire.

Nous remarquons les ponts (flèches) reliant l'hématie et un système vacuolaire situé dans le milieu extérieur.

(G. 27500 X)

FIG. 3.2.6.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Une portion de cytoplasme du parasite se projette vers la périphérie de l'érythrocyte. Dans ce bras (B), nous observons une vésicule à pigment (p).

(G. 27500 X)

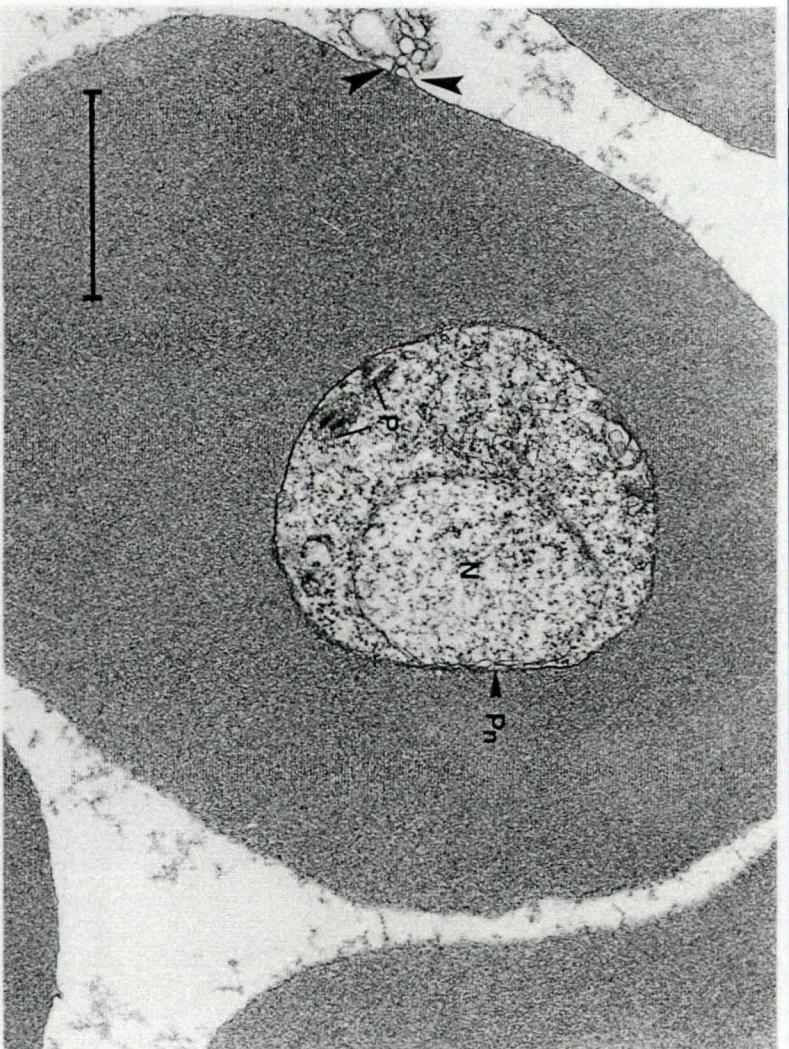


FIG. 3.2.5.

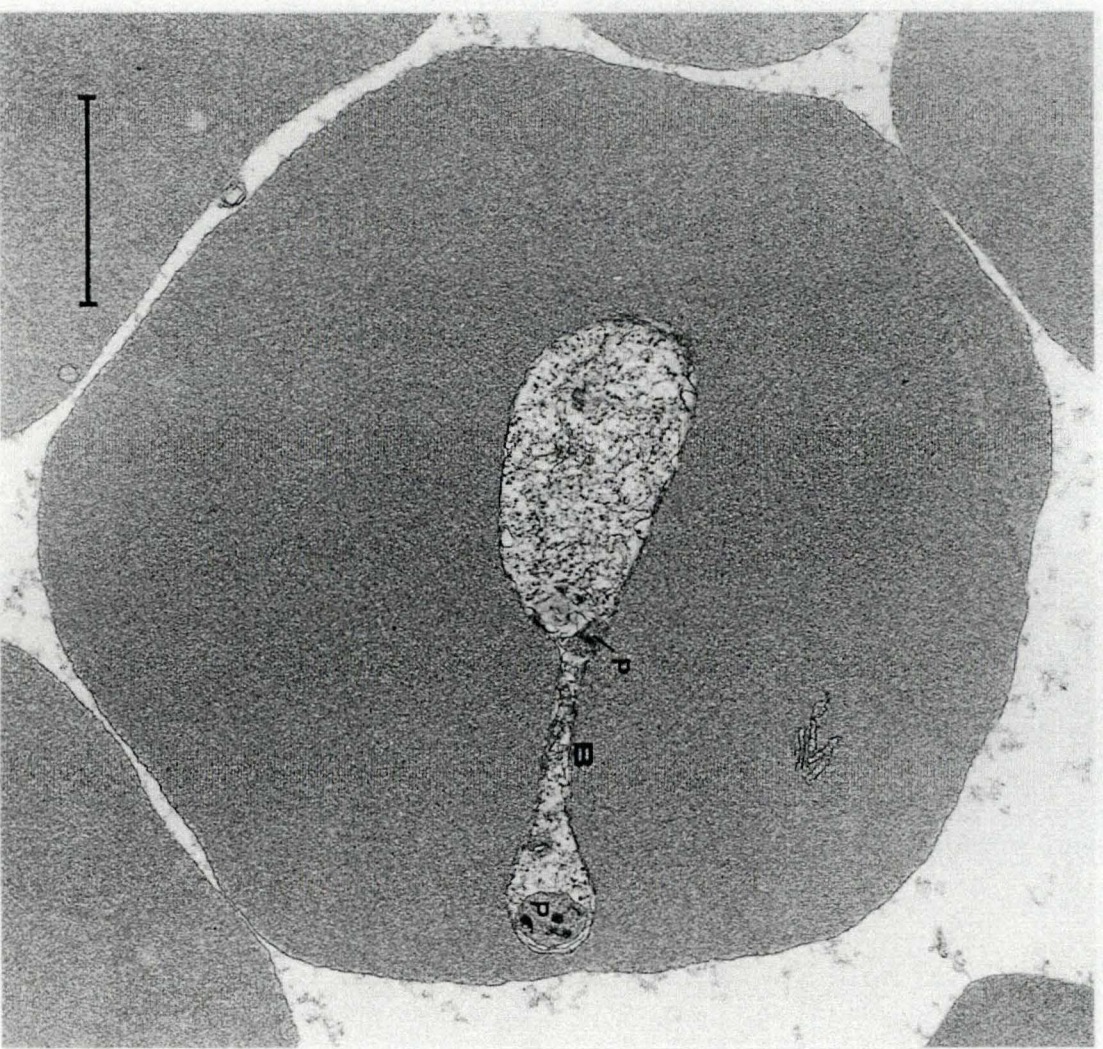


FIG. 3.2.6.

FIG. 3.2.7.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.
Nous observons des extensions formées par le parasite.
(G. 37500 X)

FIG. 3.2.7A.

Cet agrandissement permet d'observer les corps multilamellaires (cm),
aux extrémités des bras limités par une double membrane.
(G. 62500 X)

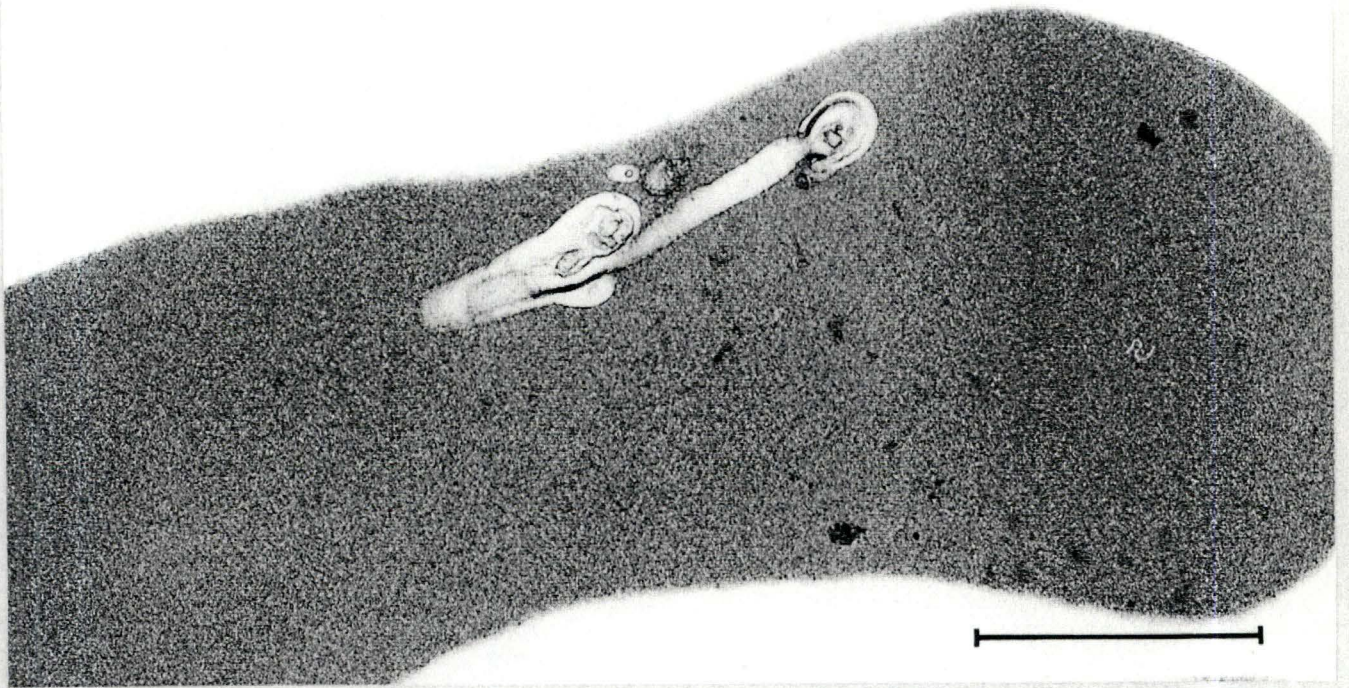


FIG. 3.2.7.

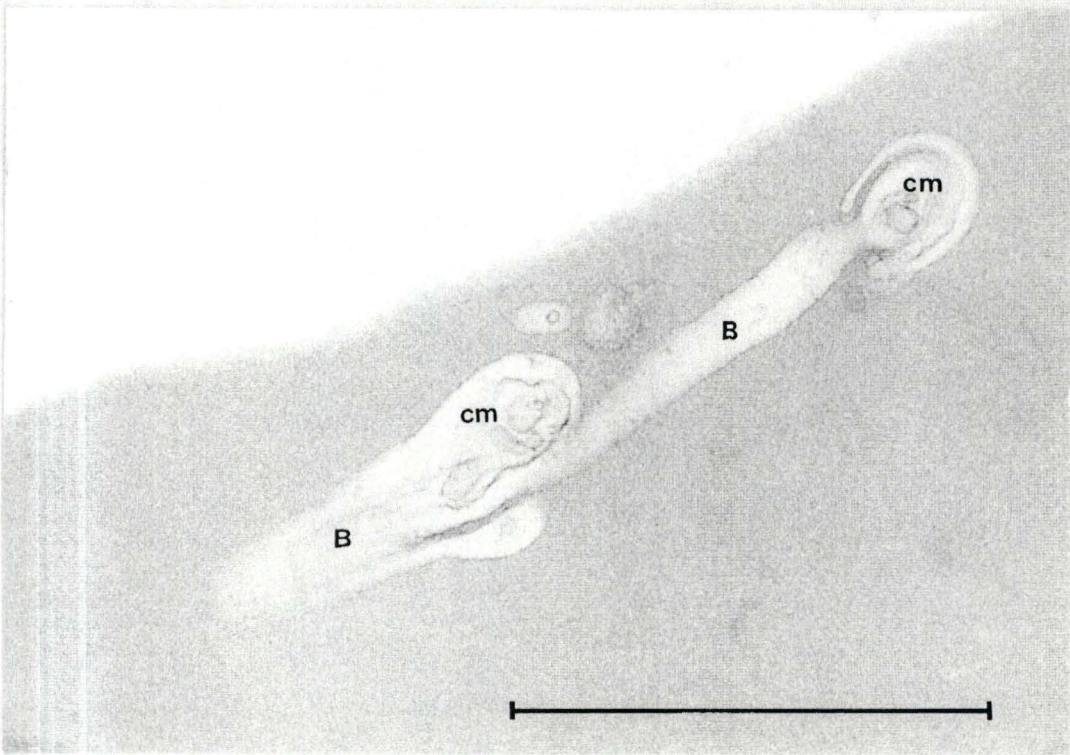


FIG. 3.2.7A.

FIG. 3.2.8. et FIG. 3.2.9.

Section d'un érythrocyte parasité par trois trophozoïtes de *P.falciparum*.

Sur la FIG. 3.2.8., nous observons des vésicules à pigment (p) situées en périphérie du parasite.

Nous remarquons un grand nombre de particules de ribonucléoprotéine et du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme du parasite.

(G. 47500 X)

Sur la FIG. 3.2.9., nous observons : un corps multilamellaire (cm) logé dans une dépression de l'enveloppe nucléaire, et une vacuole limitée par une double membrane (dm) située en périphérie du parasite.

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.9.

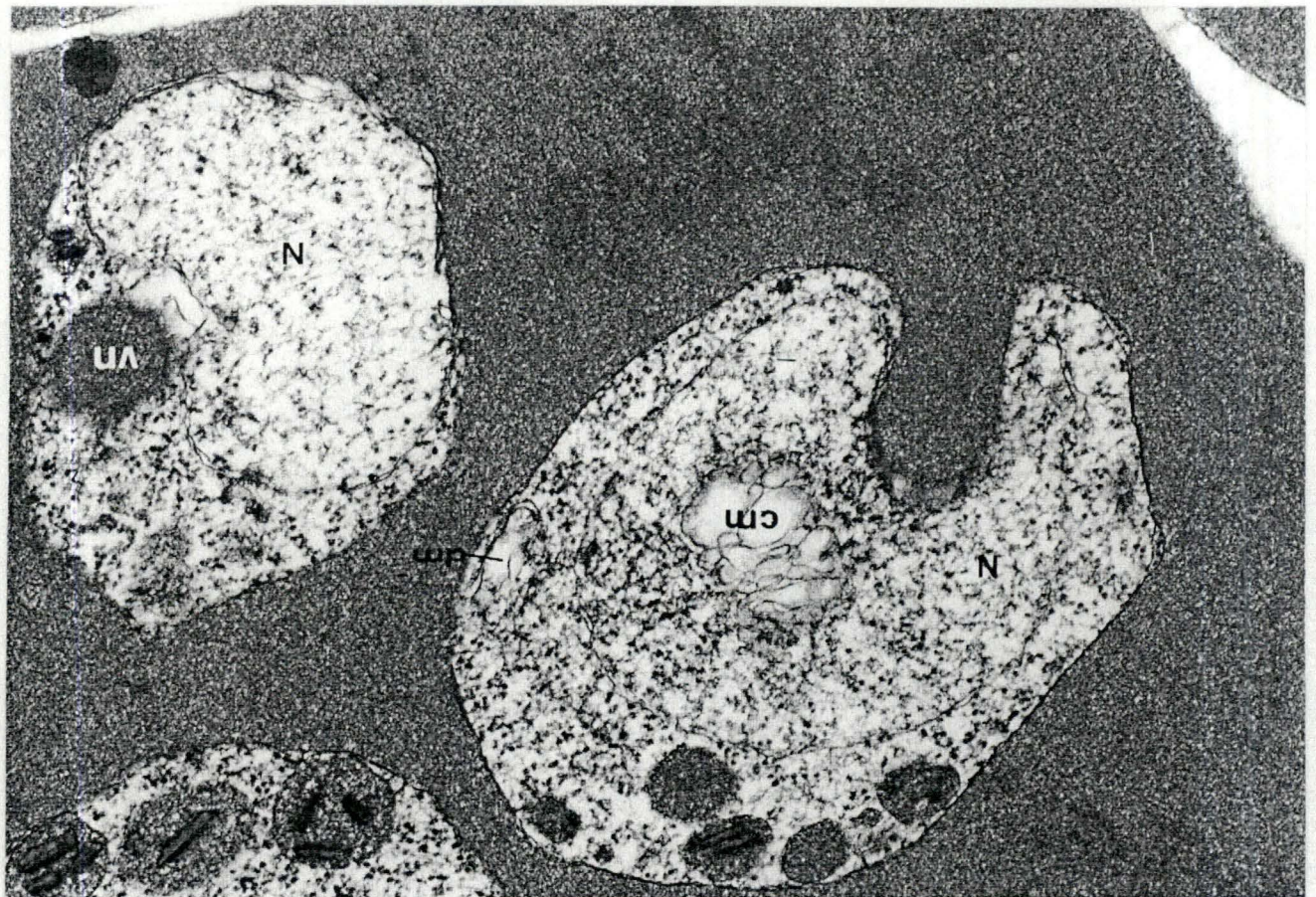


FIG. 3.2.8.

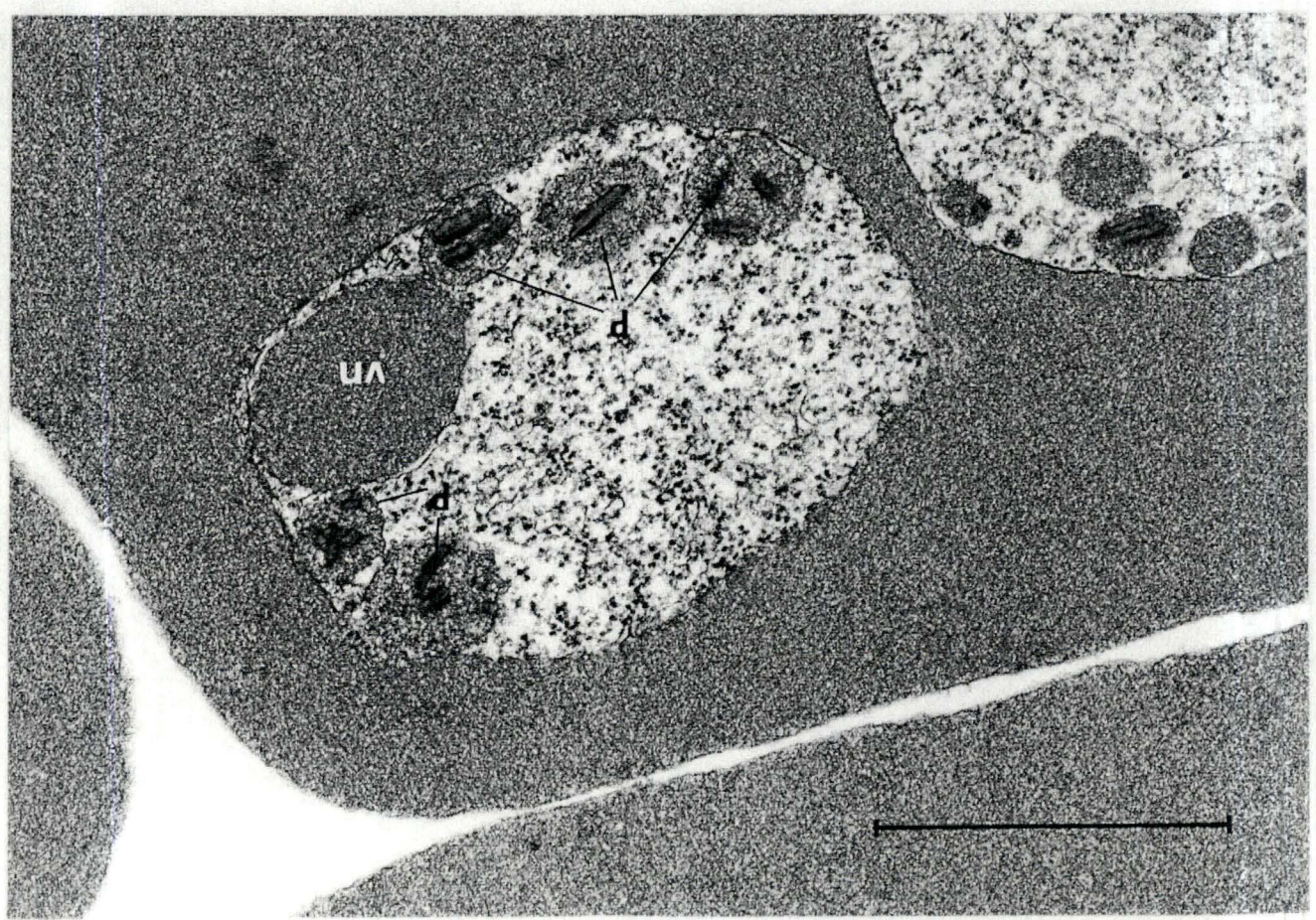


FIG. 3.2.10. et FIG. 3.2.10 A.

Sections d'un érythrocyte parasité par trois trophozoïtes de P. falciparum.

Ces deux sections sériées nous montrent que :

- La vacuole nutritive (vn) n'est pas fermée.
- Des vésicules à pigment sont étroitement accolées à la membrane du parasite.

Nous observons des épaisissements (flèches) entre le noyau et la vacuole nutritive.

(G. 22750 X).



FIG. 3.2.10.

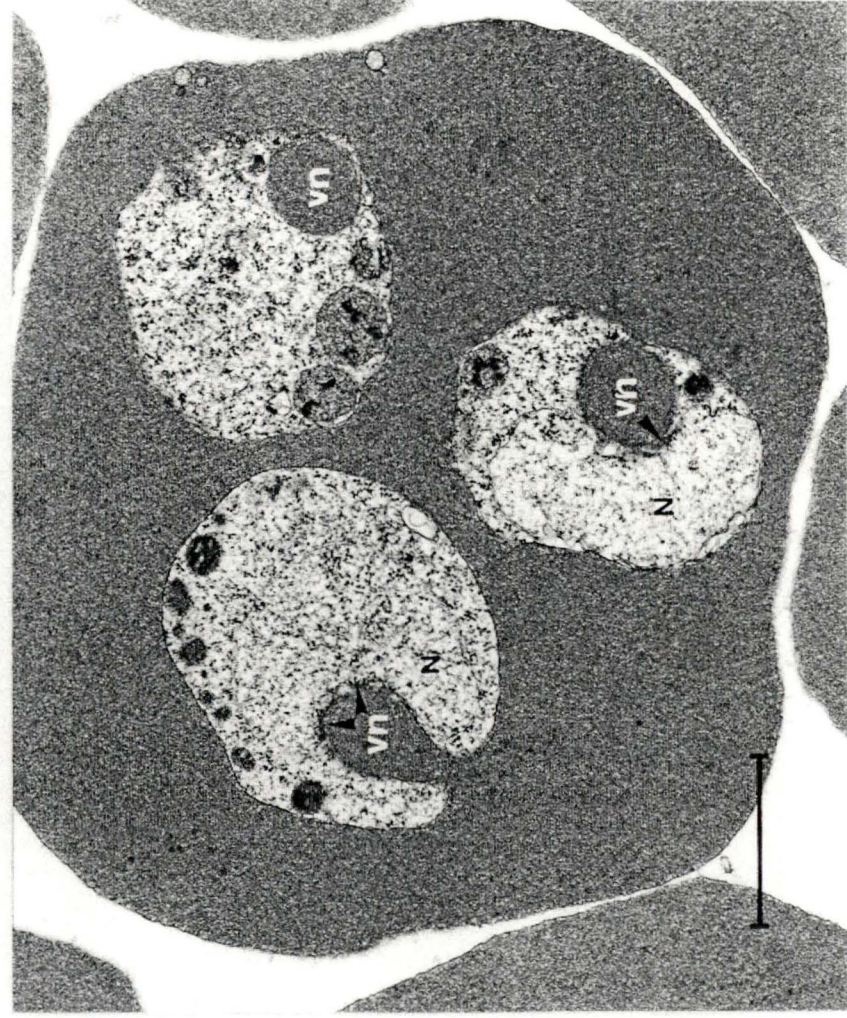


FIG. 3.2.10A.

FIG. 3.2.11.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

-deux vésicules à pigment (p). Un corps multilamellaire (cm) situé dans une dépression du nucléoplasme.

-Une partie de ce corps multilamellaire s'étend le long de la membrane limitante, pour rejoindre la vacuole nutritive (vn).

Nous remarquons des épaisissements membranaires (flèches).

(G.47500 X)

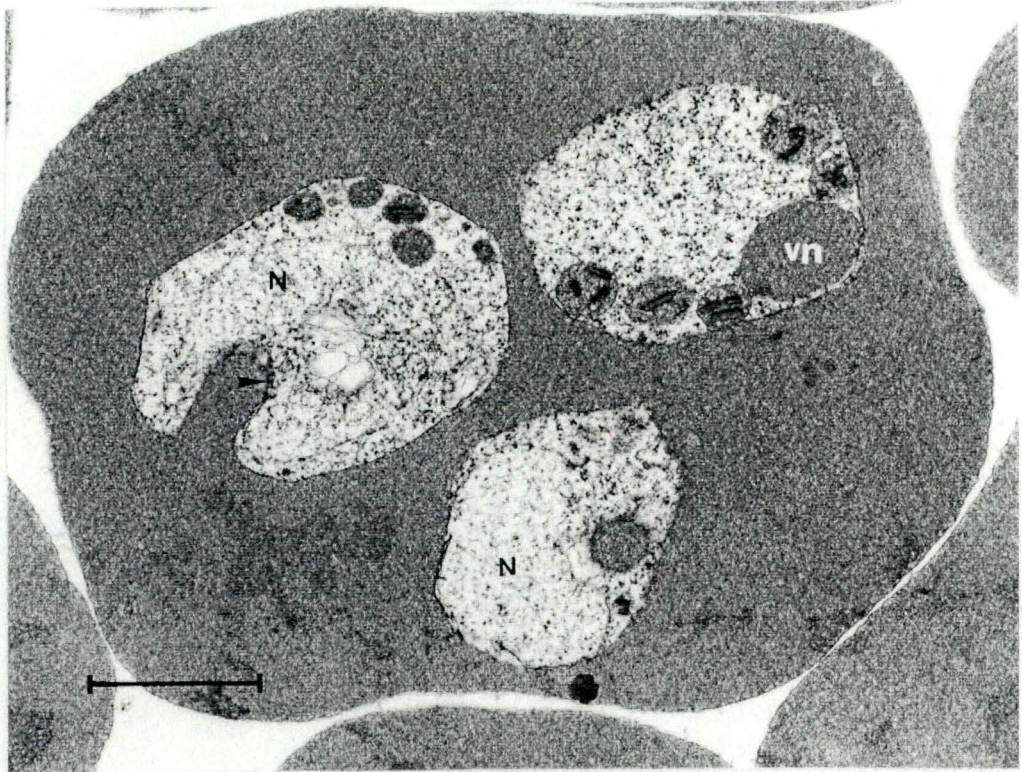


FIG. 3.2.10.

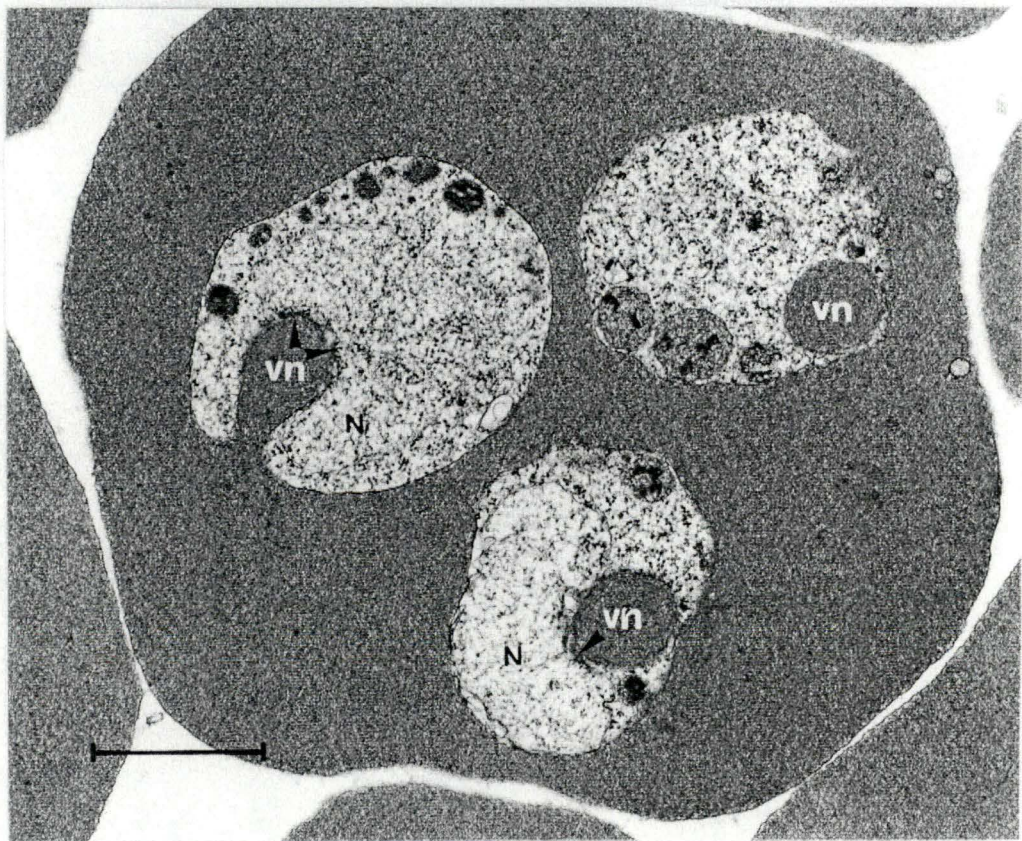


FIG. 3.2.10A.

FIG. 3.2.11.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

-deux vésicules à pigment (p). Un corps multilamellaire (cm) situé dans une dépression du nucléoplasme.

-Une partie de ce corps multilamellaire s'étend le long de la membrane limitante, pour rejoindre la vacuole nutritive (vn).

Nous remarquons des épaisissements membranaires (flèches).

(G.47500 X)

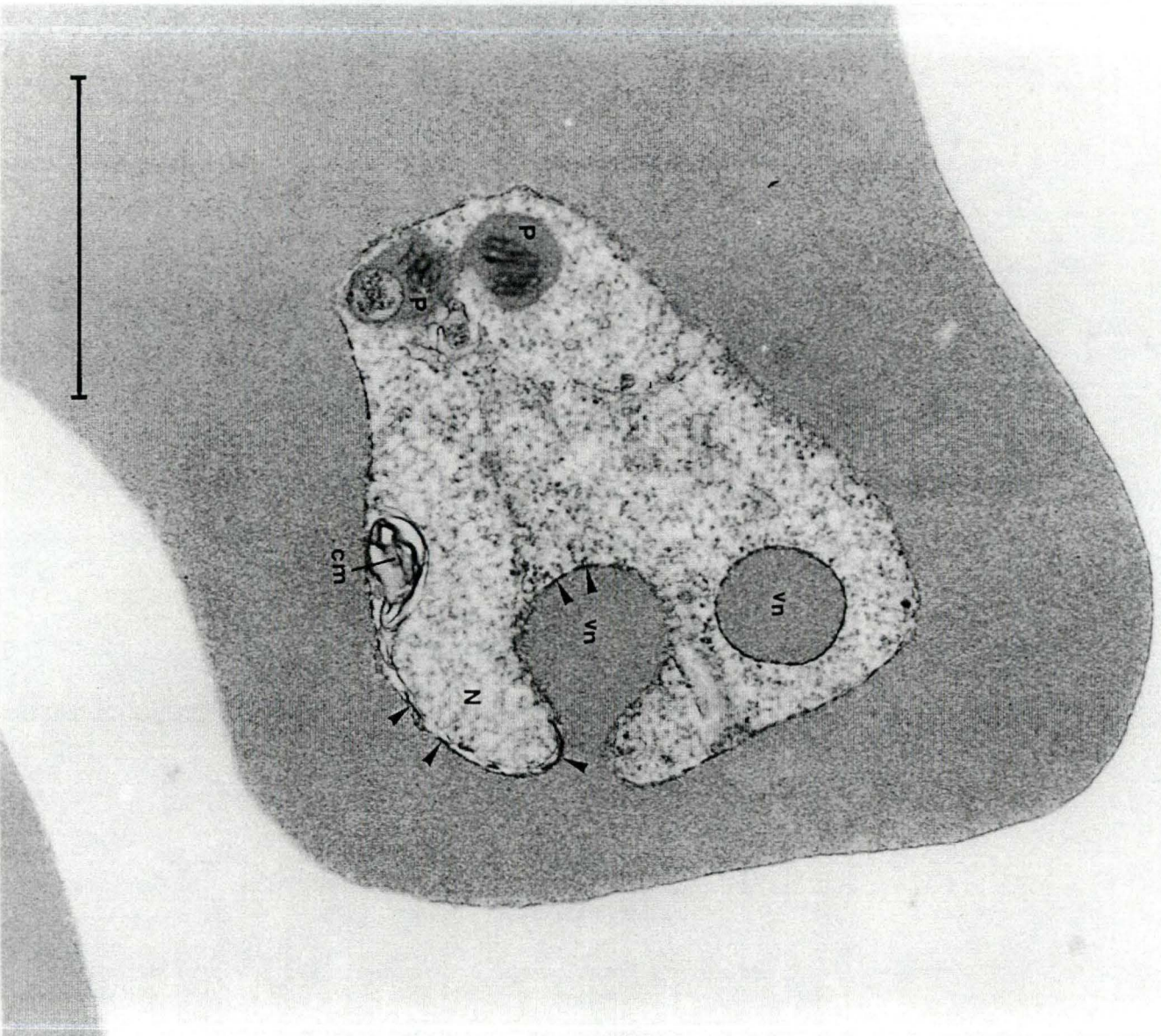


FIG. 3.2.11.

FIG. 3.2.12., FIG. 3.2.12A. et FIG. 3.2.12B.

Il s'agit de trois sections d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Sur la FIG. 3.2.12., nous observons qu'il peut y avoir plusieurs corps multilamellaires (cm) chez un trophozoïte.

Sur la FIG. 3.2.12A., nous remarquons une dépression de la membrane limitante du parasite (flèche).

Sur la FIG. 3.2.12B., nous observons du pigment malarique (p) contre la membrane limitante du parasite.

Ces trois sections nous montrent un système vacuolaire composé de petites vacuoles alignées, d'un tube allongé (formé par la réunion des petites vacuoles) et d'une portion de stroma érythrocytaire invaginé dans le parasite.

(G. 47500 X)

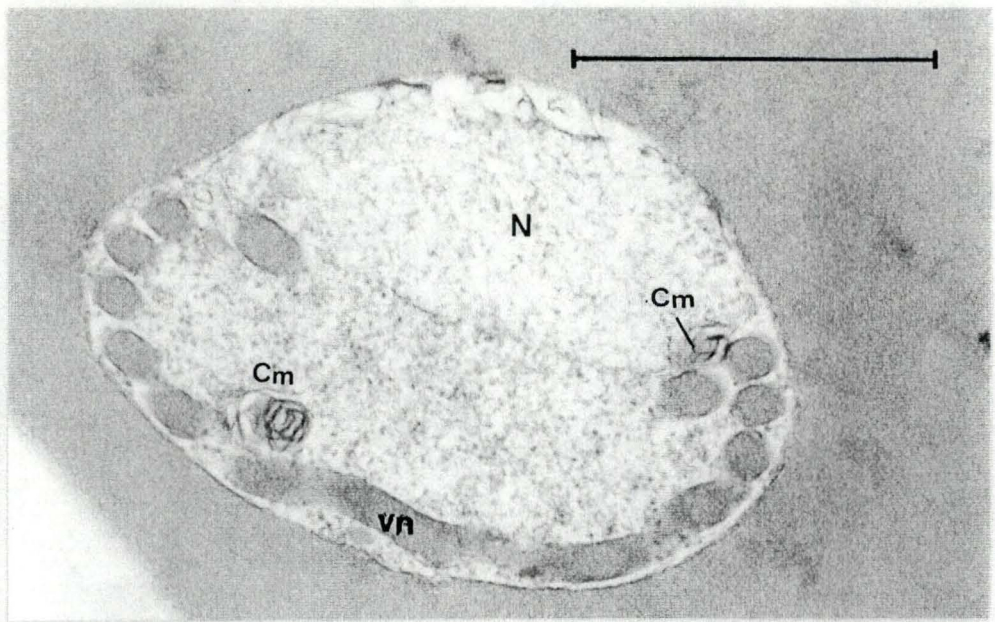


FIG. 3.2.12.

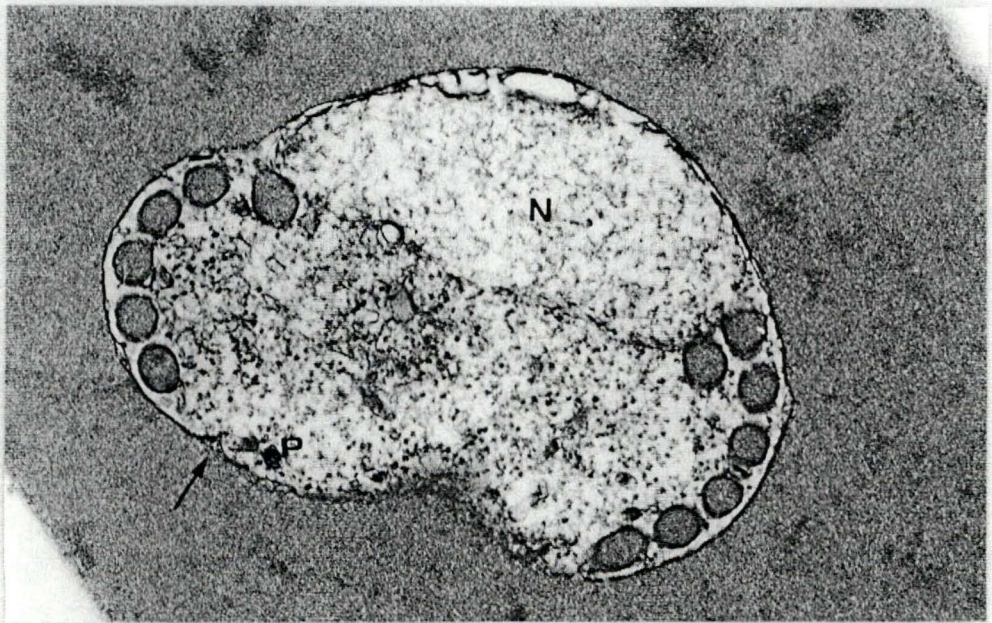


FIG. 3.2.12A.

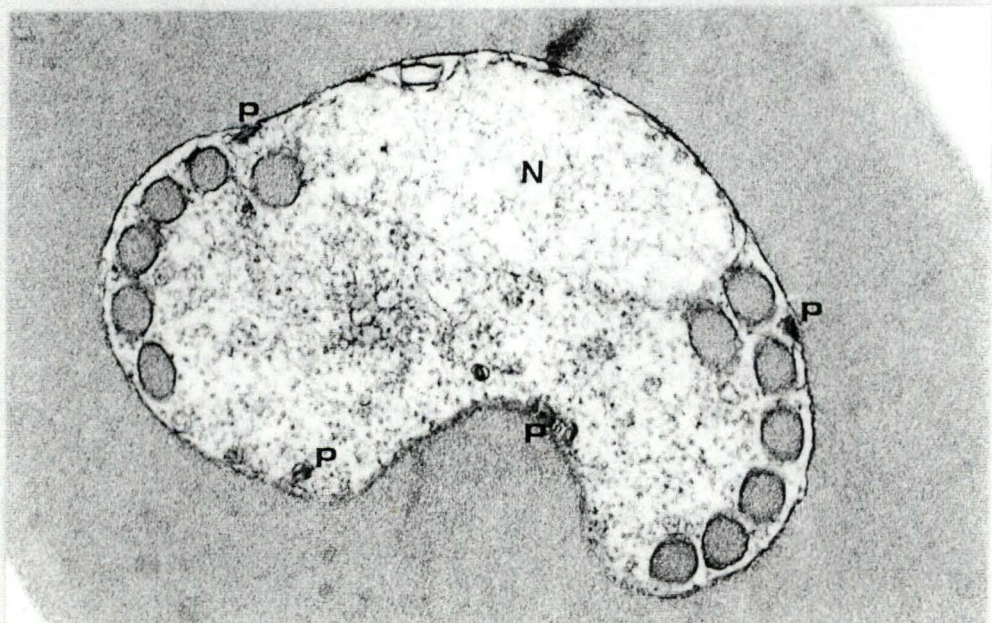


FIG. 3.2.12B.

FIG. 3.2.13.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons plusieurs vacuoles nutritives (vn) en contact étroit avec le stroma érythrocytaire (flèches).

(G. 37500 X)

FIG. 3.2.14.

Sur cet agrandissement , nous observons :

-Des épaissements membranaires localisés entre le corps multilamellaire (cm) et l'enveloppe nucléaire (flèche).

-Un corps multilamellaire situé entre le noyau (N) et la vacuole nutritive (vn) et un autre situé entre la membrane limitante du parasite et la vacuole nutritive.

(G. 62500 X)

FIG. 3.2.14.

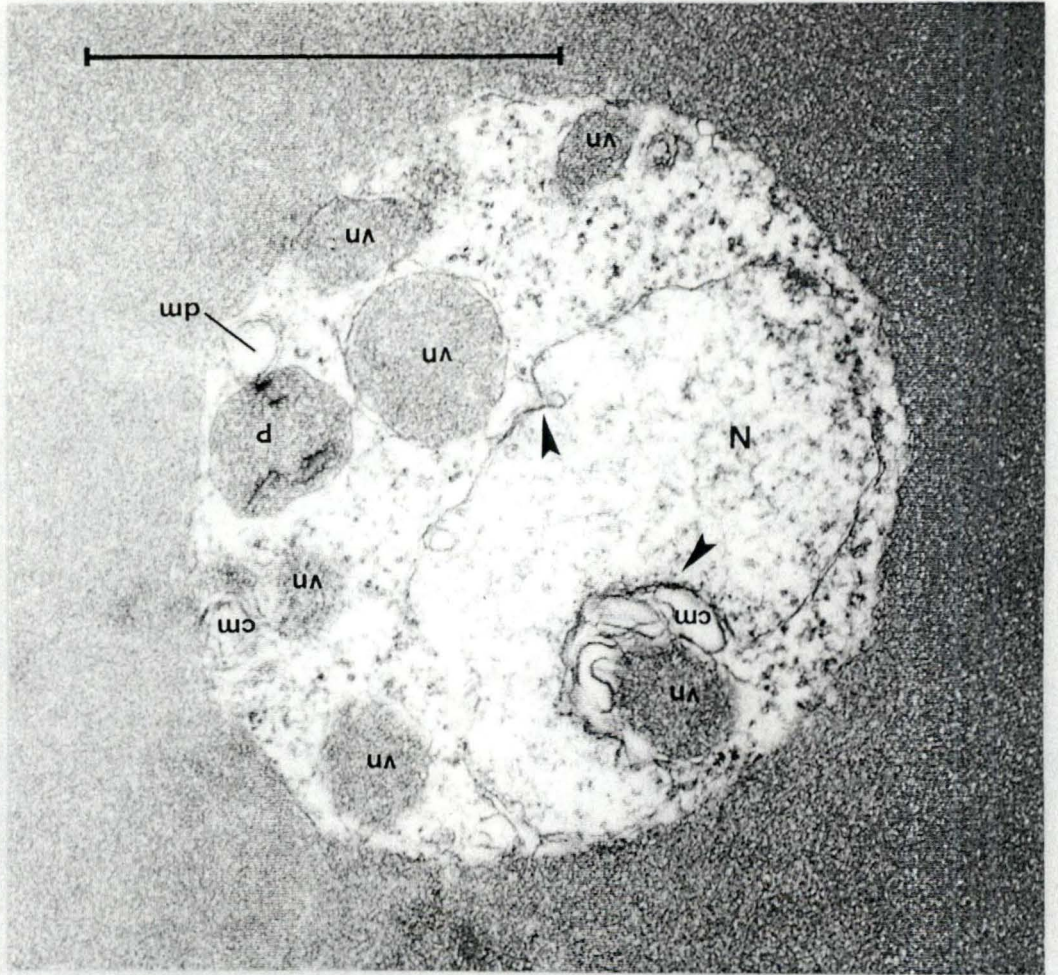


FIG. 3.2.13.

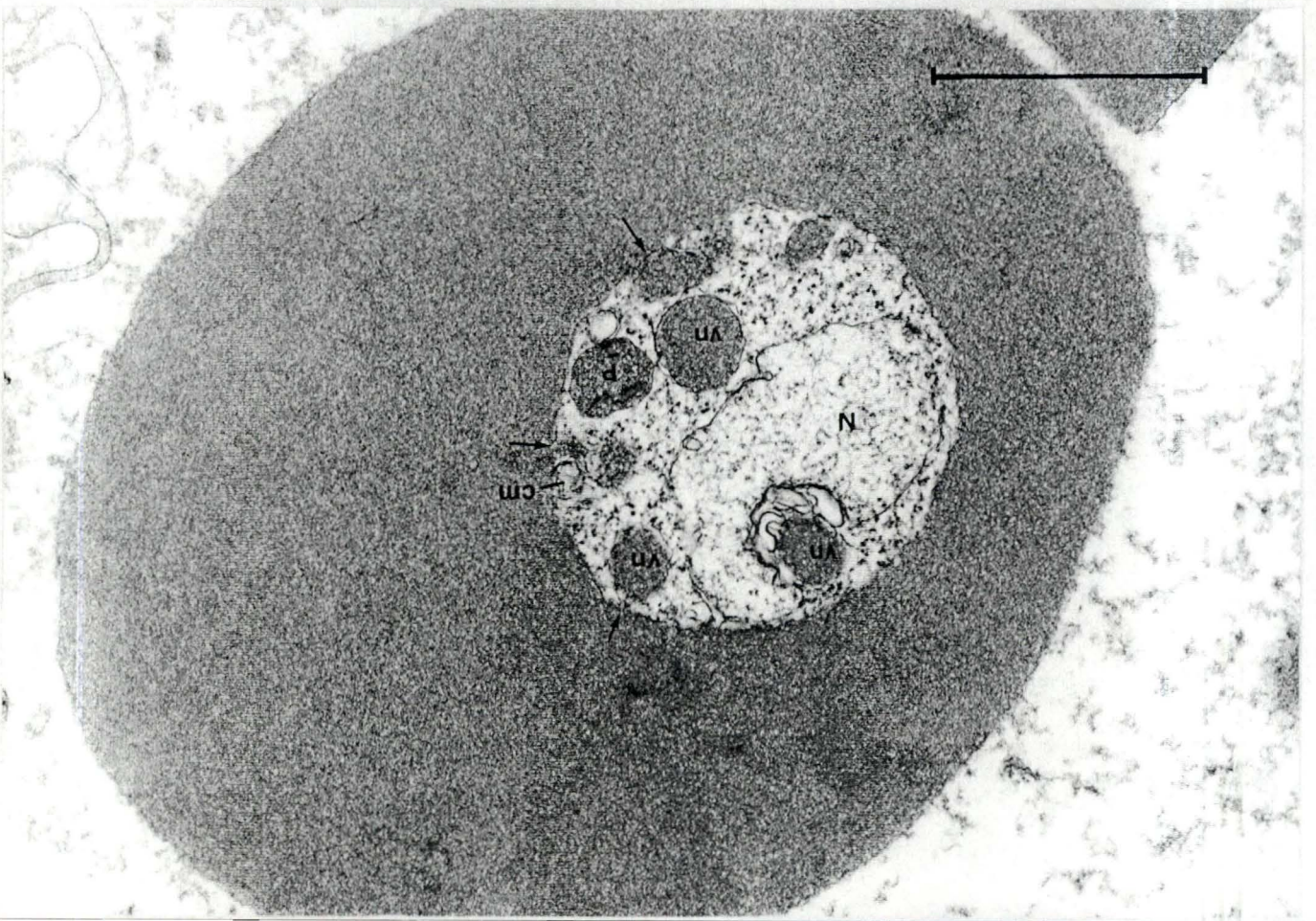


FIG. 3.2.15.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons un corps multilamellaire (cm), bordant une dépression en regard de la vacuole nutritive (vn). Cette vacuole est cachée en son centre par le noyau (N).

Le noyau est limité par une double membrane : la membrane nucléaire interne (mni) et la membrane nucléaire externe (mne).

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.16.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

-Une vacuole limitée par une double membrane (dm) en contact étroit avec la membrane limitante (ml) du parasite.

-Un noyau (N) limité par une double membrane, la membrane nucléaire interne (mni) et la membrane nucléaire externe (mne).

-Du réticulum endoplasmique (re) dans le cytoplasme du parasite.

(G. 47500 X)

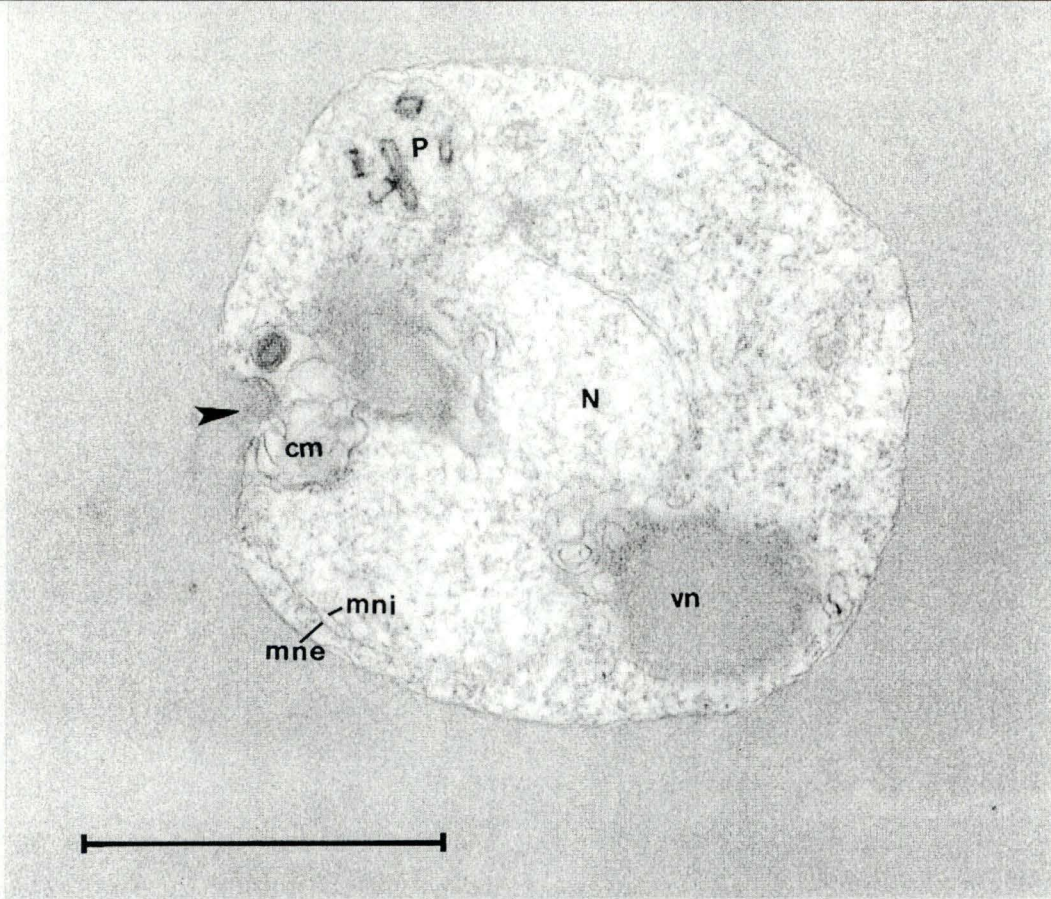


FIG. 3.2.15.

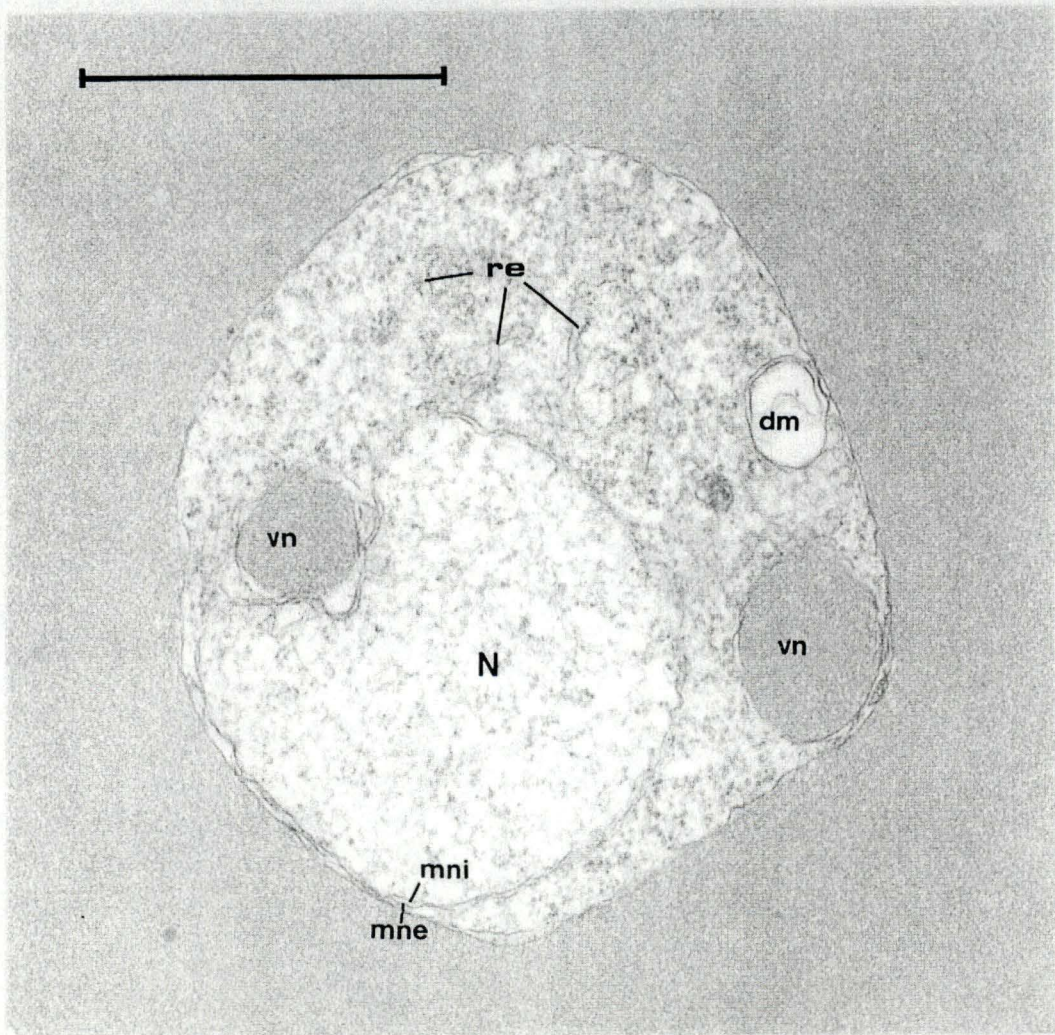


FIG. 3.2.16.

FIG. 3.2.17.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

- Le trophozoïte envacualise une large portion de stroma érythrocytaire formant la vacuole nutritive (vn).
 - Nous observons des vésicules à pigment (p) situées en périphérie.
- (G. 37500 X)

FIG. 3.2.18.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons un micropyle (mp) et une évagination cytoplasmique du parasite (flèche). Nous noterons ici, l'abondance de particules de ribonucléoprotéine et le réticulum endoplasmique (re) dans le cytoplasme du parasite.

(G. 47500 X)

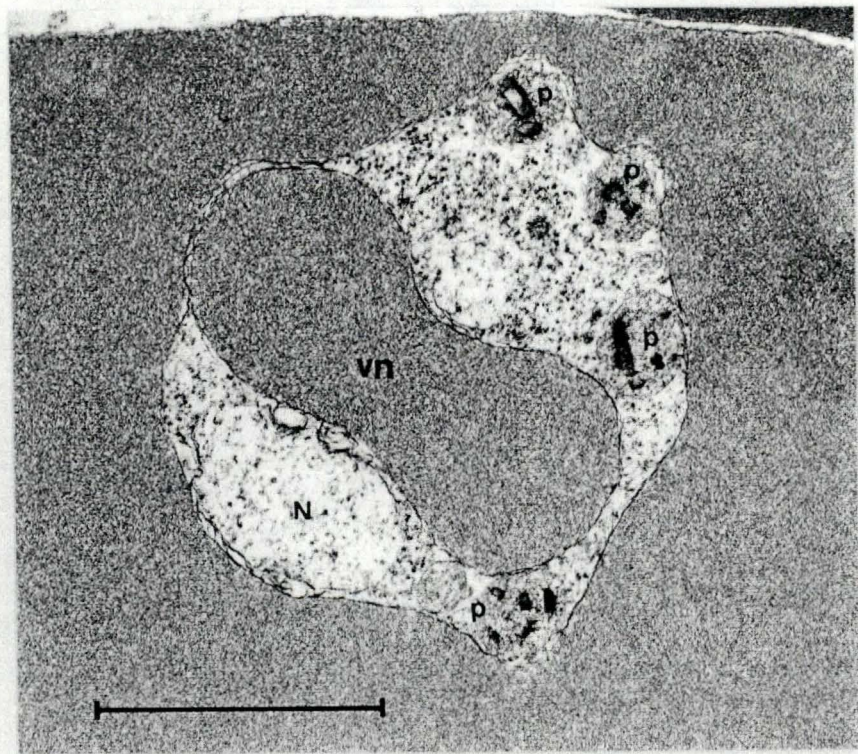


FIG. 3.2.17.

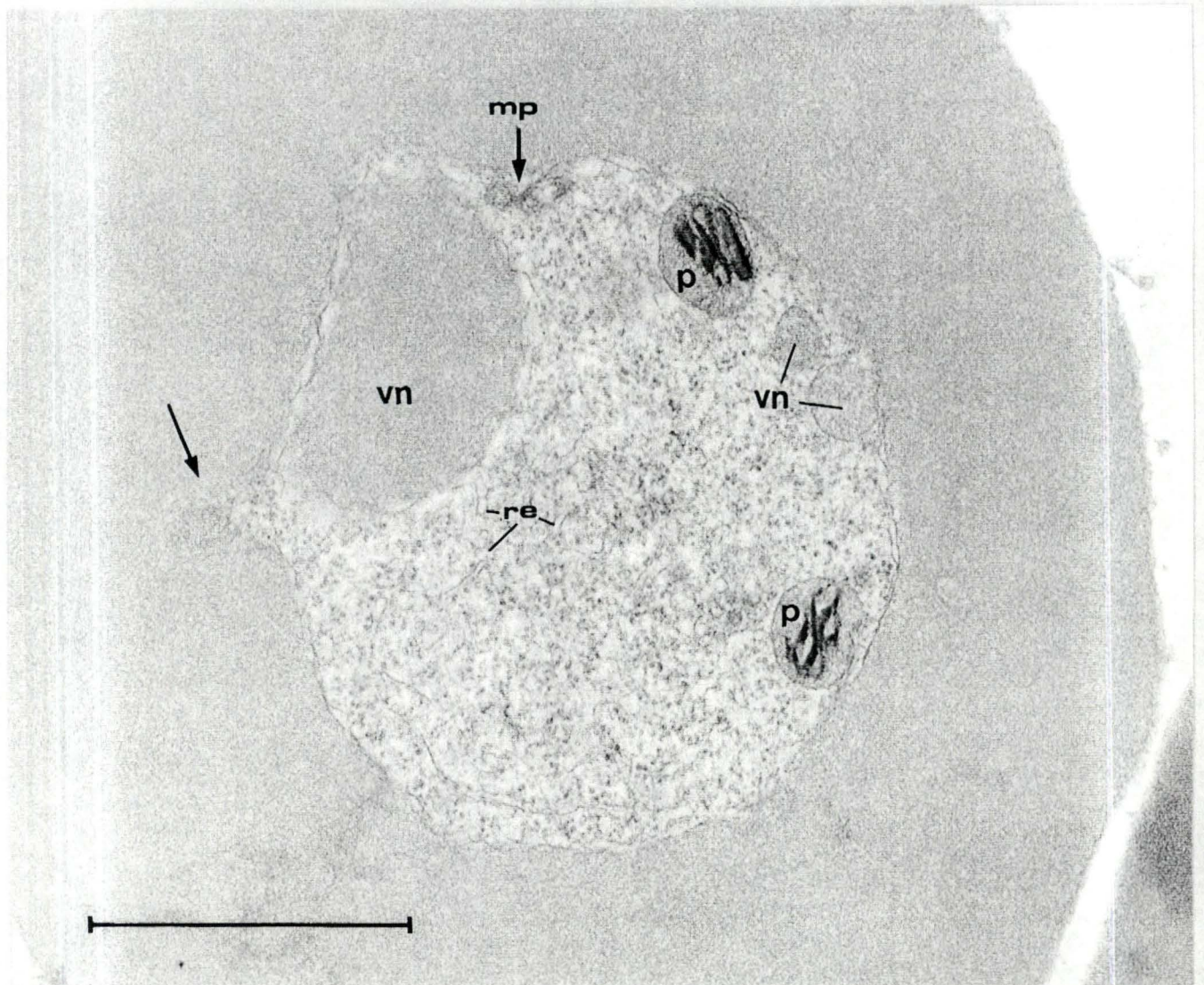


FIG. 3.2.18.

FIG. 3.2.19.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

- Nous observons une évagination de la membrane limitante du parasite (flèche).
- Nous remarquons le noyau volumineux (N), avec une invagination de l'enveloppe nucléaire (in).

(G. 62500 X)

FIG. 3.2.20.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Des vésicules à pigment (p).
- Un noyau (N) situé en périphérie du parasite.
- Un corps multilamellaire (cm) logé entre le noyau et la membrane limitante du trophozoïte.
- Du réticulum endoplasmique (re), dans le cytoplasme du parasite.

(G. 62500 X)

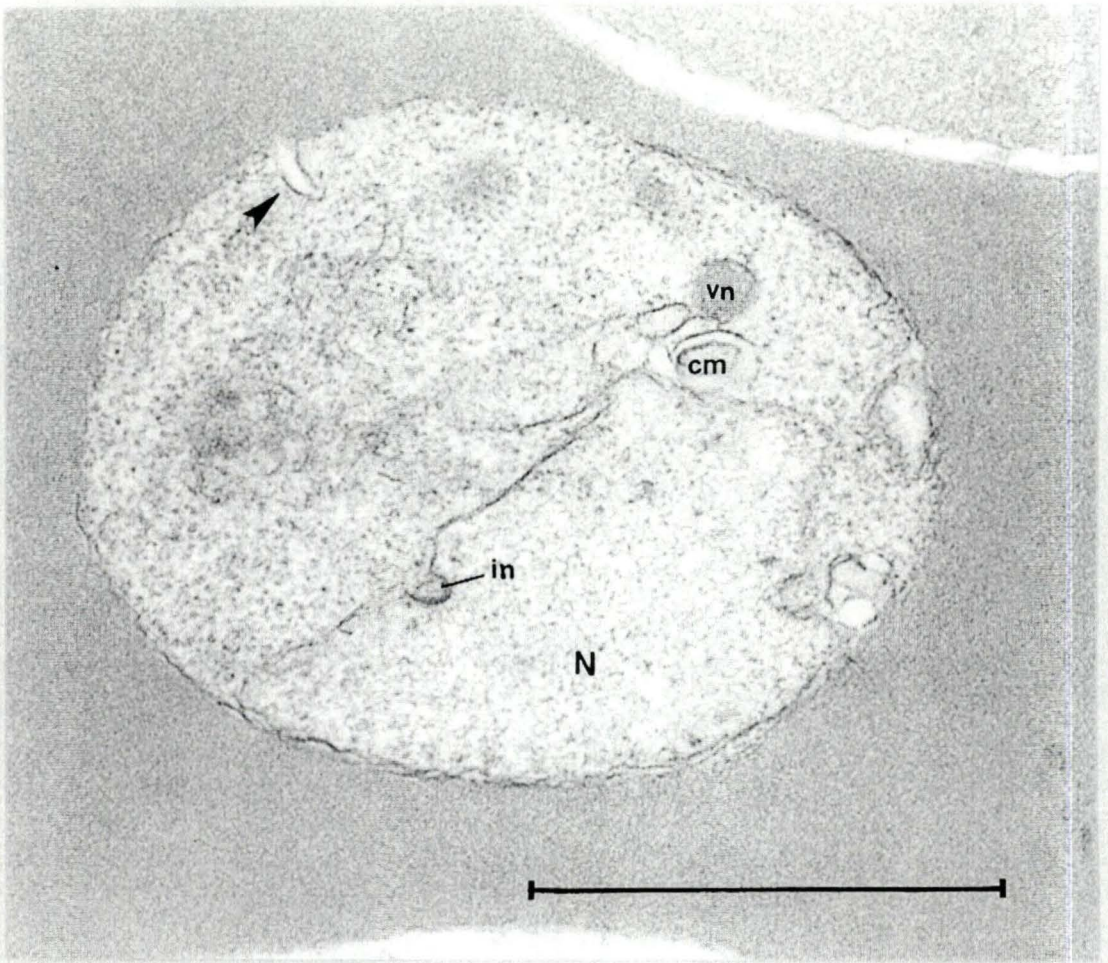


FIG. 3.2.19.

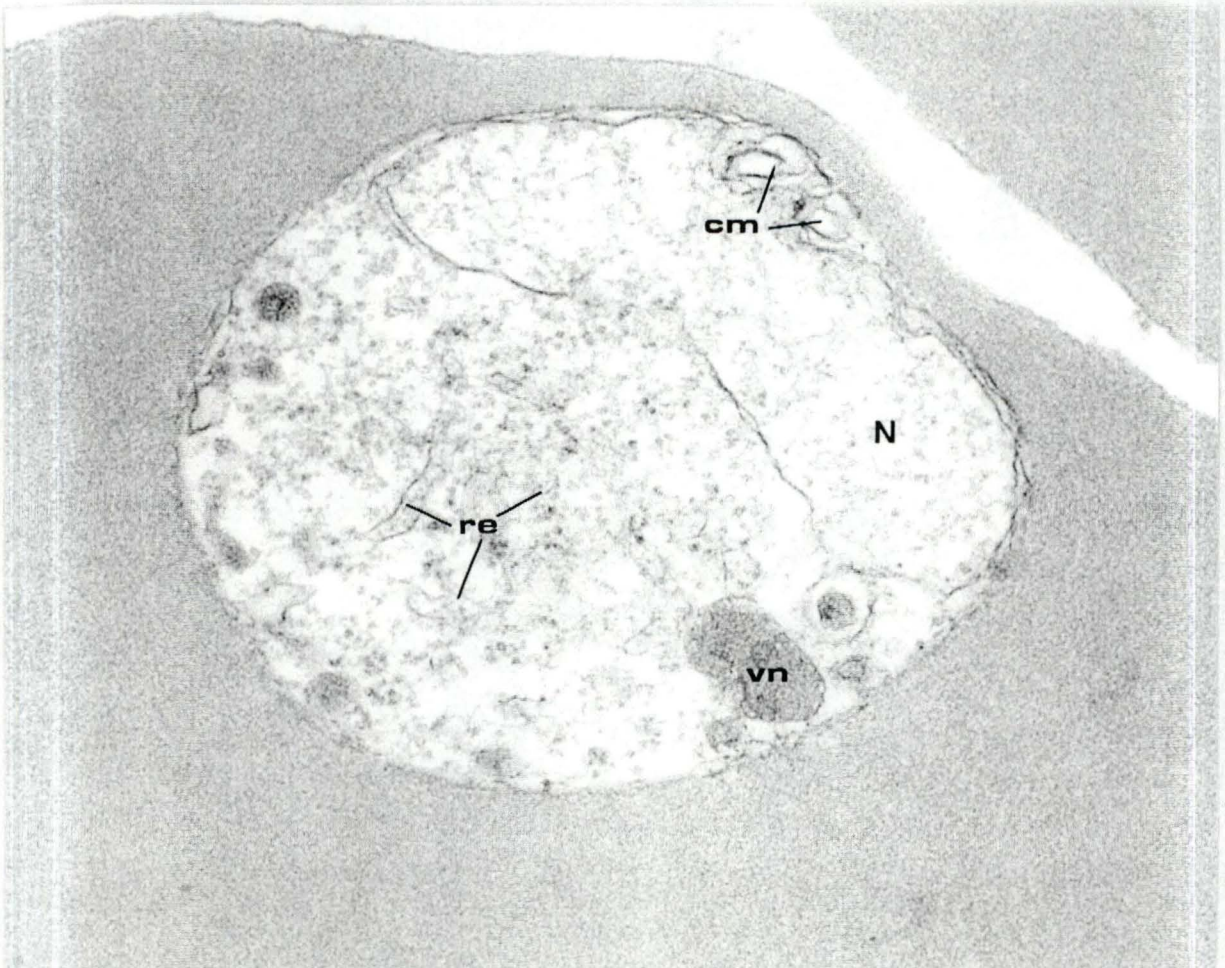


FIG. 3.2.20

FIG. 3.2.21.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons une dépression dans le stroma érythrocytaire (flèche), et du réticulum endoplasmique (re) dans le cytoplasme du parasite.

(G. 62500 X)

FIG. 3.2.22.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons une vacuole nutritive (vn) délimitée par une double membrane. La membrane vacuolaire externe (me) et la membrane vacuolaire interne (mi).
Noter la dépression dans le stroma érythrocytaire (flèche).

(G. 47500 X)

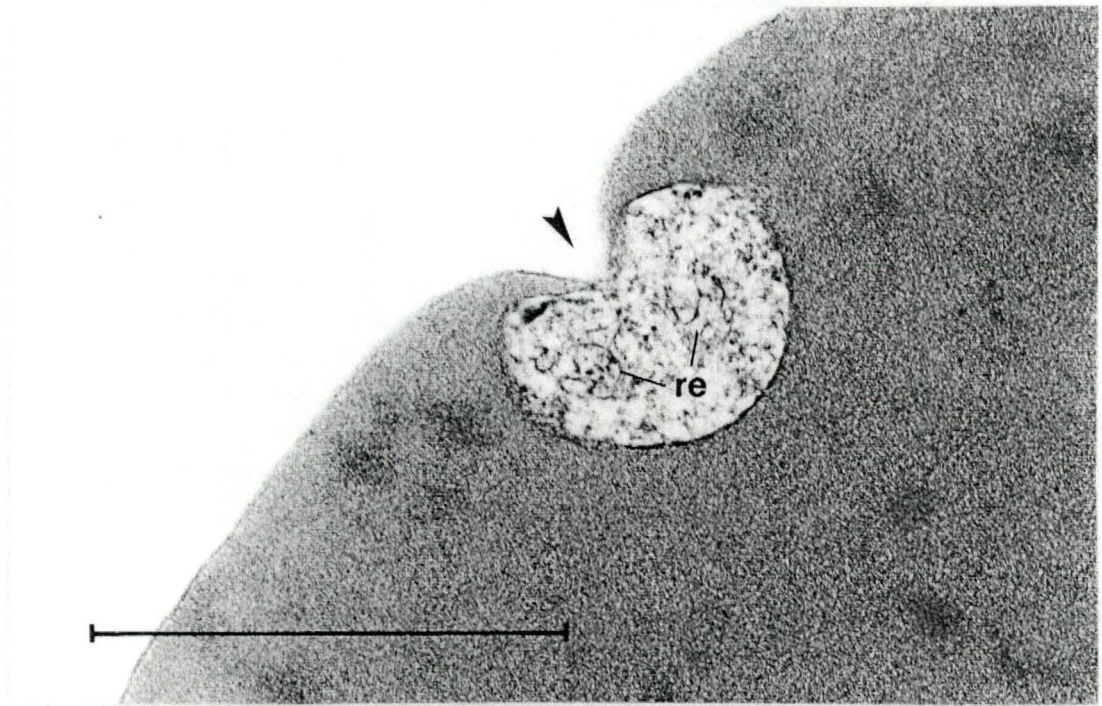


FIG. 3.2.21.

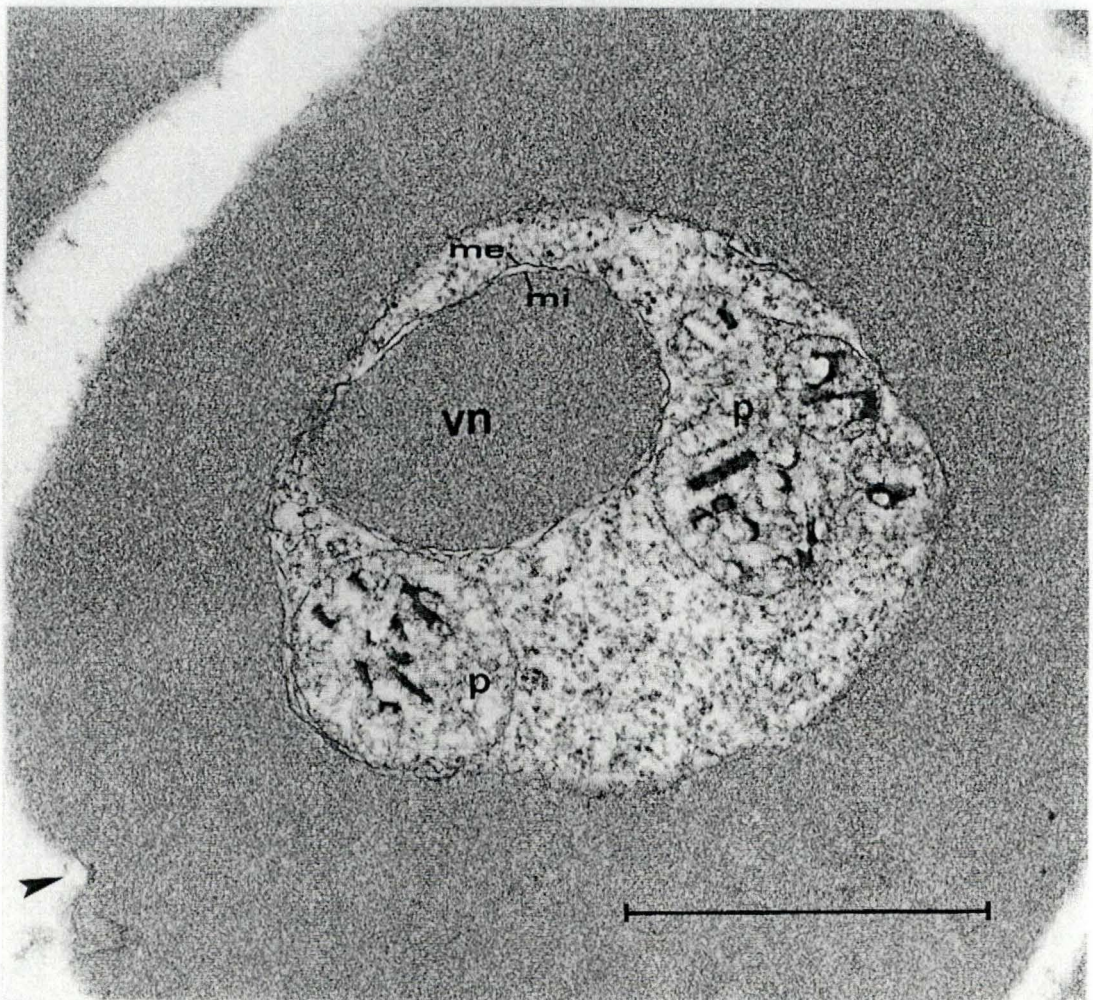


FIG. 3.2.22.

FIG. 3.2.23.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous remarquons :

- un corps multilamellaire placé entre une vacuole nutritive (vn) et une vésicule à pigment (p).

- Une vacuole limitée par une double membrane (dm).

(G. 62500 X)

FIG. 3.2.24.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Deux vésicules à pigment (p).

- Un noyau (N) placé entre une vacuole nutritive (vn) et un corps multilamellaire (cm).

Dans le stroma du globule rouge, nous remarquons une vacuole limitée par une double membrane (dm), dont le contenu a l'aspect du cytoplasme érythrocytaire.

(G. 47500 X)

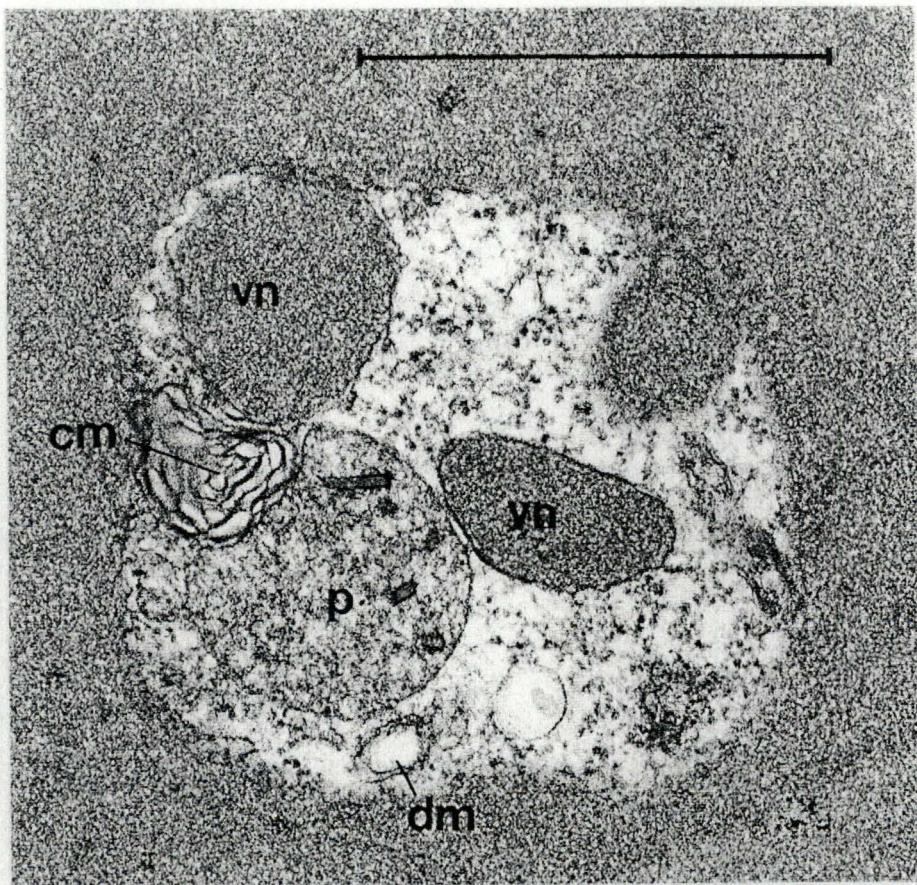


FIG. 3.2.23.

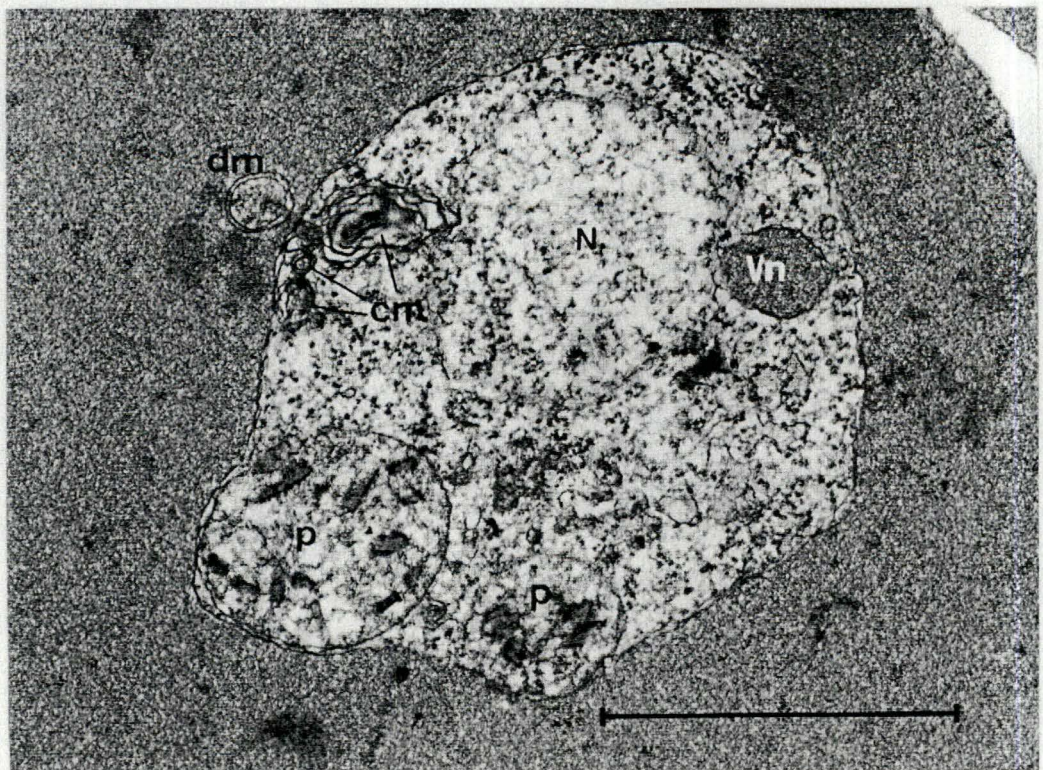


FIG. 3.2.24.

FIG. 3.2.25.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Cet érythrocyte est en partie détruit. Néanmoins, nous observons un corps multilamellaire (cm) logé dans une dépression de l'enveloppe nucléaire.

Dans le stroma de l'hématie, nous remarquons les fissures de Maurer (fm). Ces dernières sont délimitées par une double membrane.

Dans le milieu extérieur, nous observons un complexe formé de double membrane (dm), rappelant le corps multilamellaire.

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.26.

Cet agrandissement permet de détailler l'épaississement membranaire.

Nous observons l'accolement de 4 membranes.

Nous observons la double membrane limitant le noyau , et celles appartenant au corps multilamellaire (flèches).

Nous observons également la double membrane qui délimite la cellule hôte (mh).

(G. 85000 X)

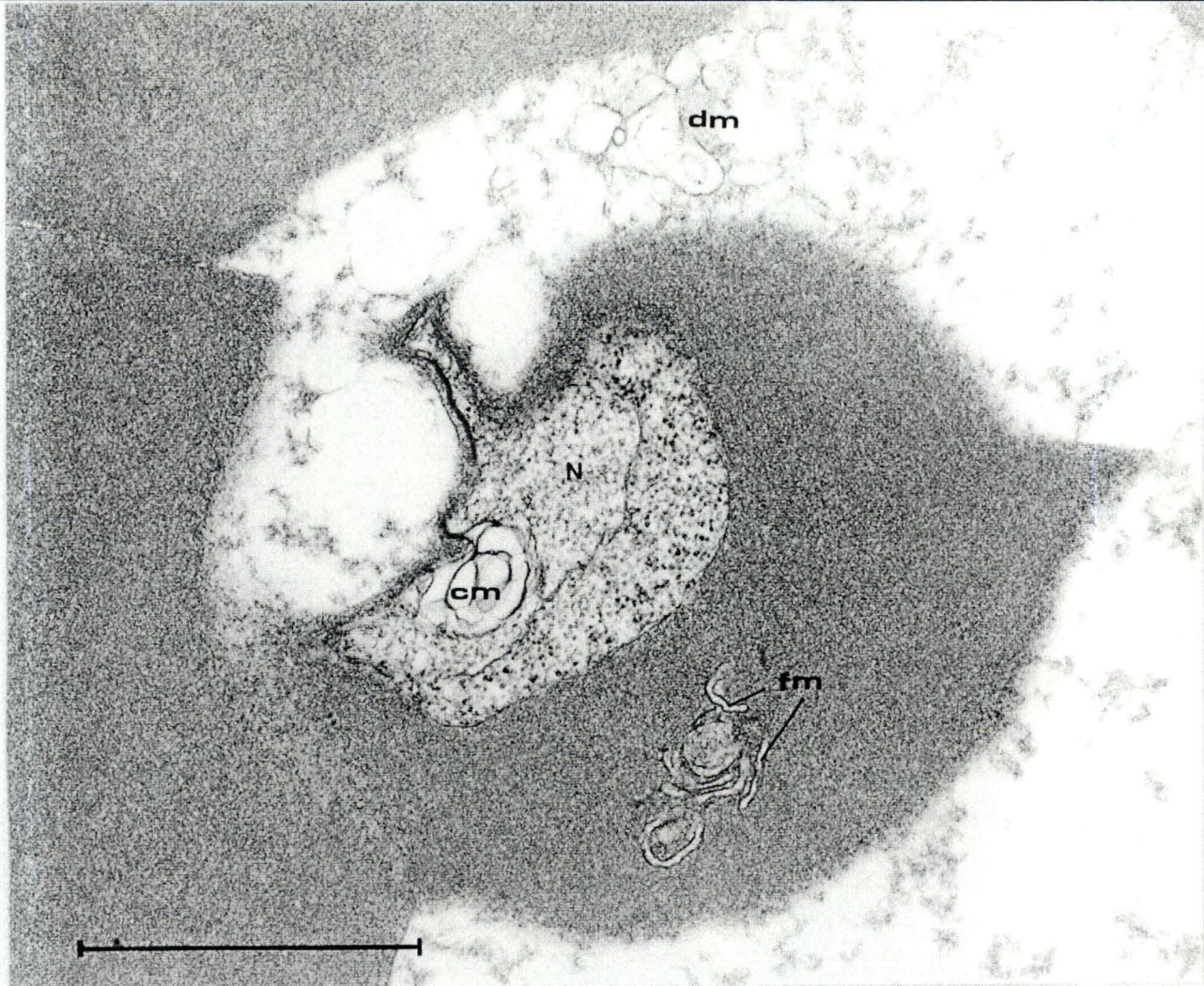


FIG. 3.2.25.

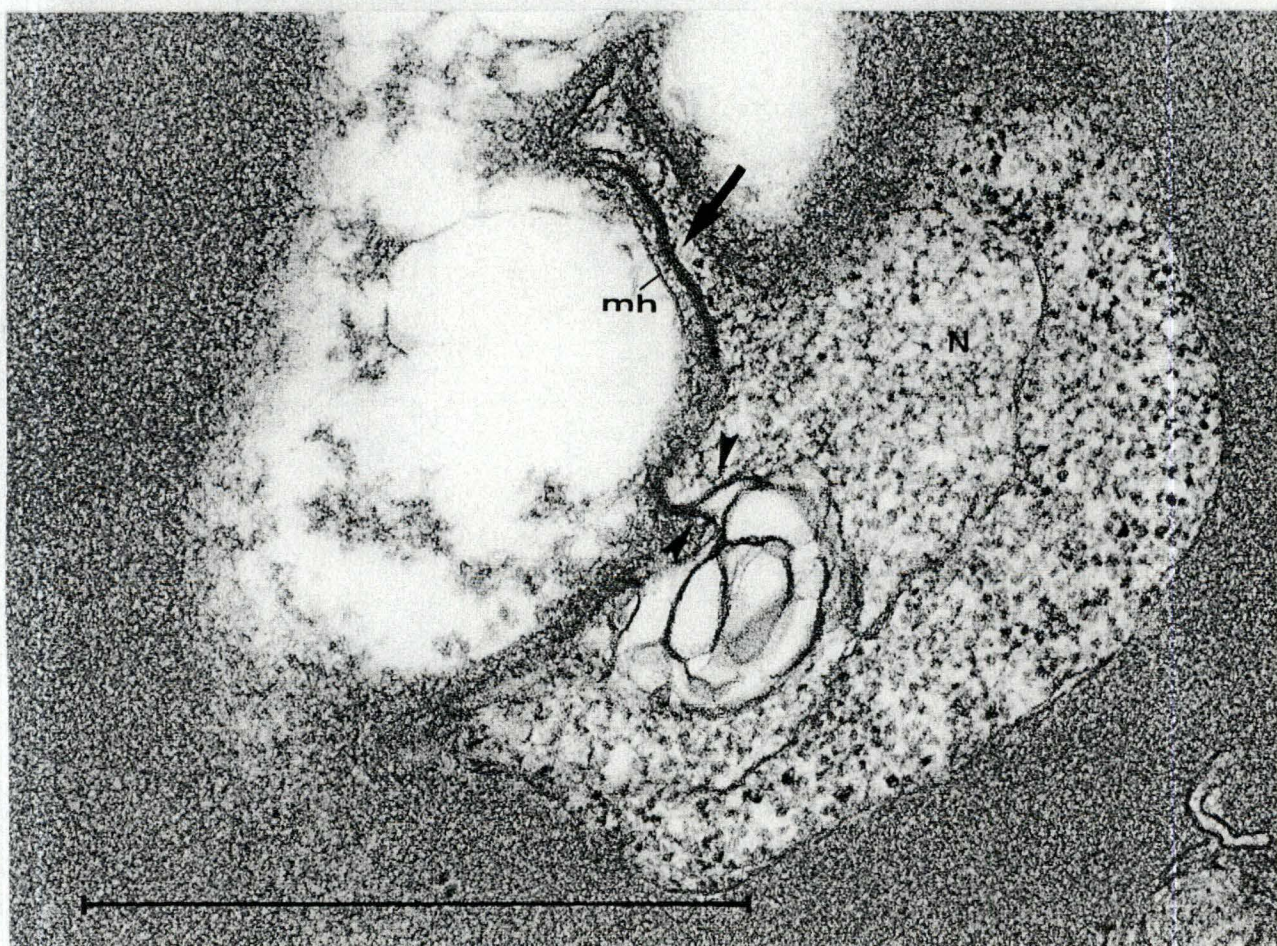


FIG. 3.2.26.

FIG. 3.2.27. et FIG. 3.2.27 A.

Sections d'une hématie parasitée par un trophozoïte de P. falciparum.

Le noyau présente une large dépression centrale lui donnant une forme en haltère.

Grâce aux coupes sériées, nous pouvons observer l'évolution du corps multilamellaire dans l'espace. Il se présente sous forme de vacuoles limitées par une double membranes(dm) ou d'un corps composé de deux doubles membranes (cm).

Nous observons les vésicules à pigment (p).

(G. 62500 X)

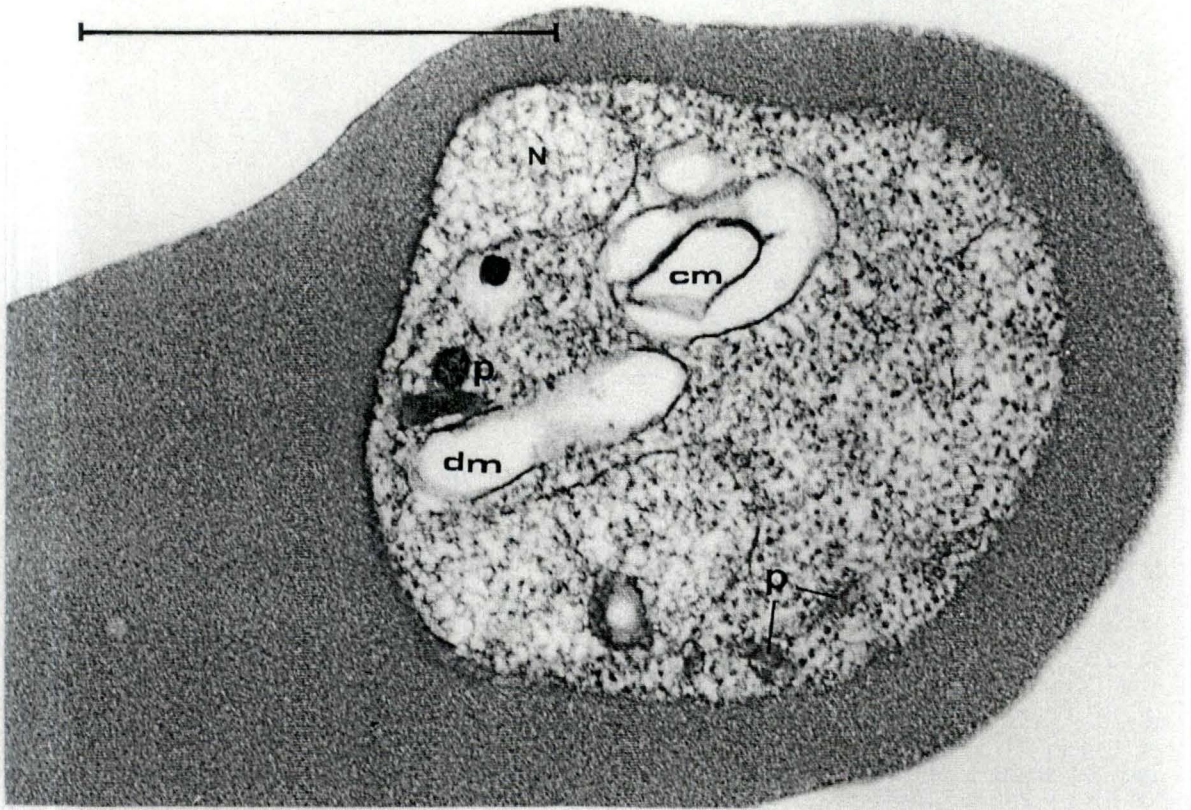


FIG. 3.2.27.

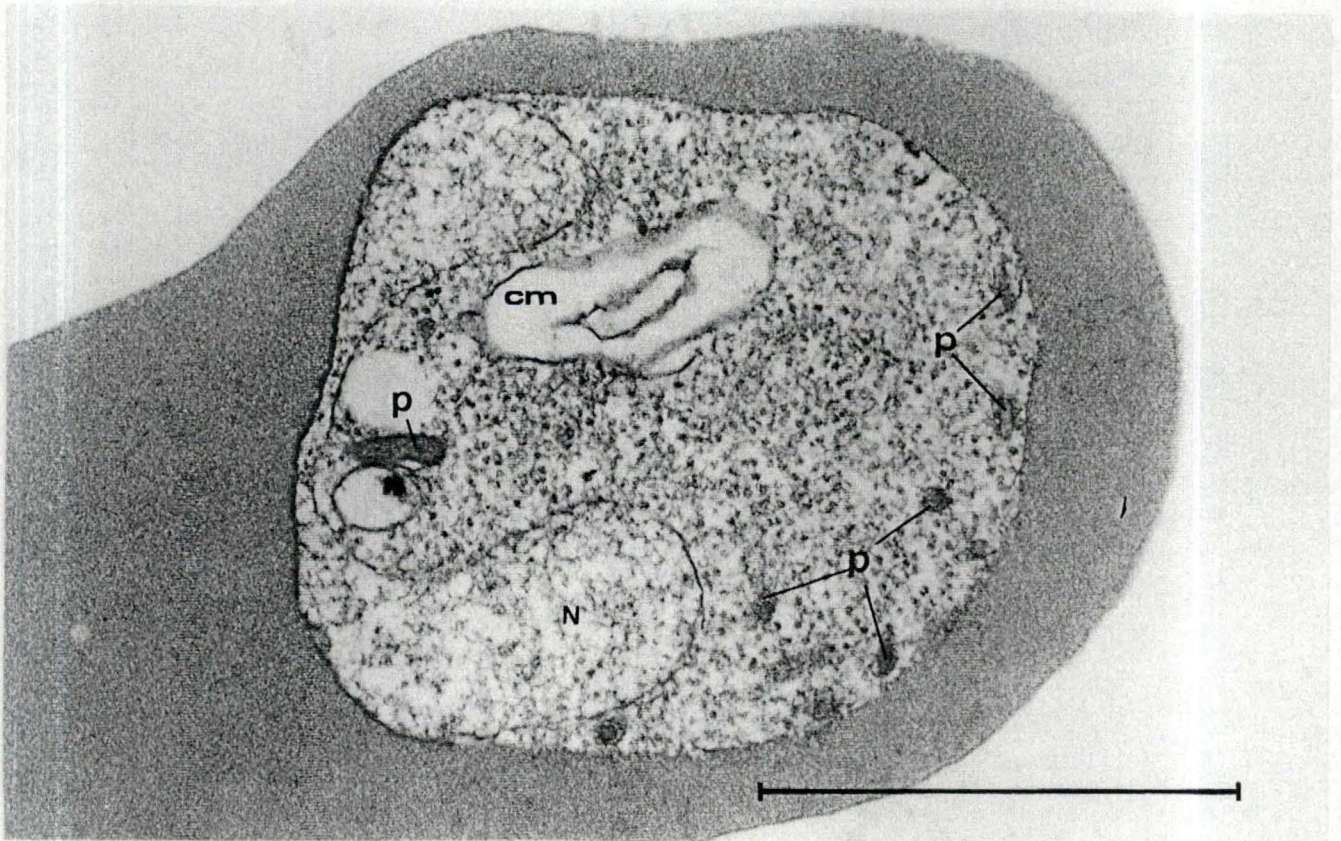


FIG. 3.2.27A.

FIG. 3.2.28.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons un corps multilamellaire (cm) situé entre le noyau (N) et la membrane limitante du parasite.

Le noyau est limité par une membrane nucléaire interne (mni) et une membrane nucléaire externe (mne).

Dans le cytoplasme érythrocytaire, nous remarquons du réticulum endoplasmique (re) et des petites vésicules à pigment (p).

(G.47500 X)

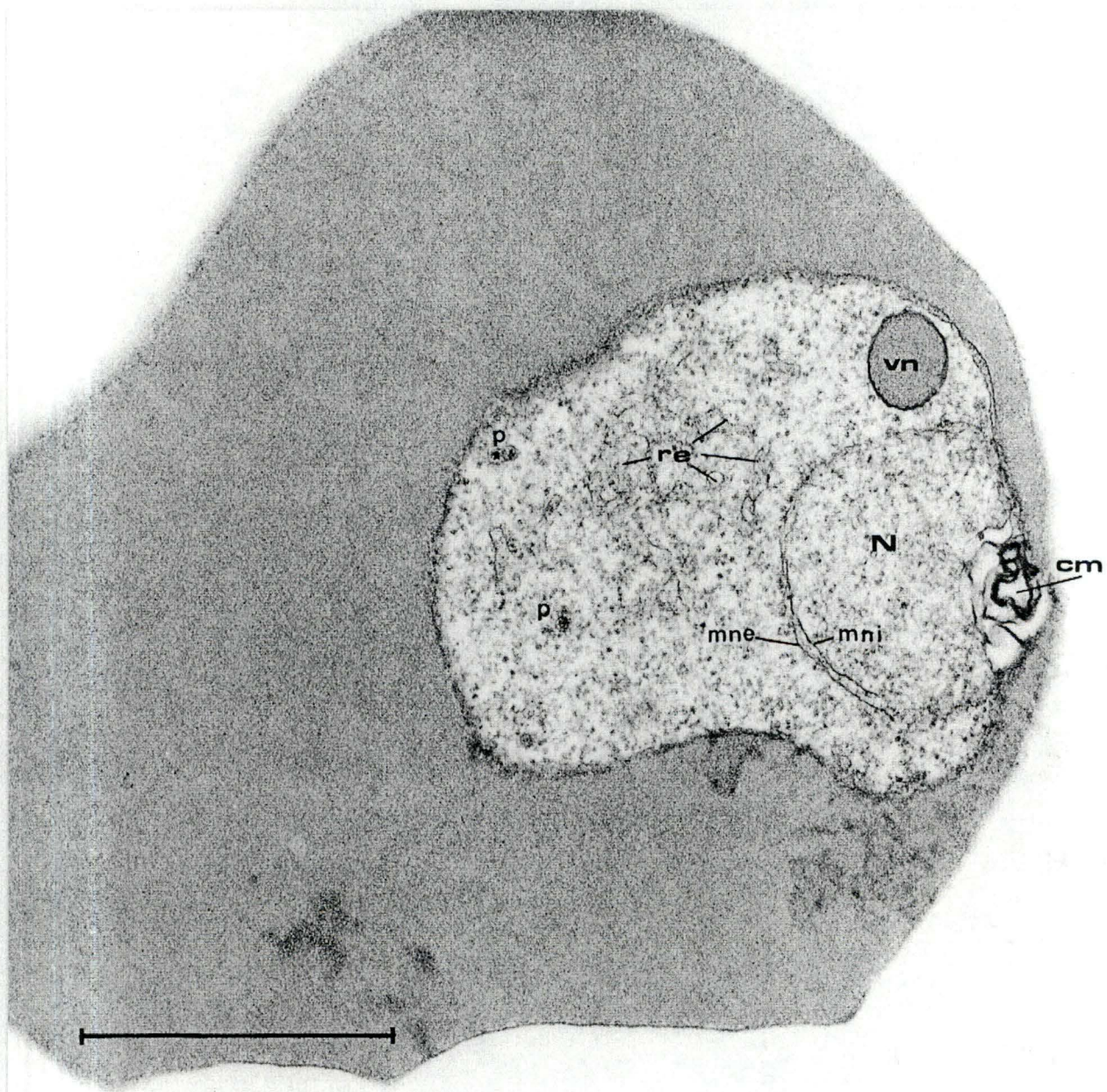


FIG. 3.2.28.

FIG. 3.2.28A.

Le parasite est délimité par une membrane plasmique (mi) et la membrane de la vacuole parasitophore (me). L'espace compris entre ces deux membranes représente la vacuole parasitophore (vp).

Nous observons une vacuole nutritive (vn). Une partie de sa membrane limitante, intimement accolée au corps multilamellaire (cm), forme un épaissement membranaire.

Une double membrane appartenant au corps multilamellaire semble encercler la vacuole en formant des ponts par endroits avec cette dernière (flèche).

(G. 37500 X)

FIG. 3.2.28A.

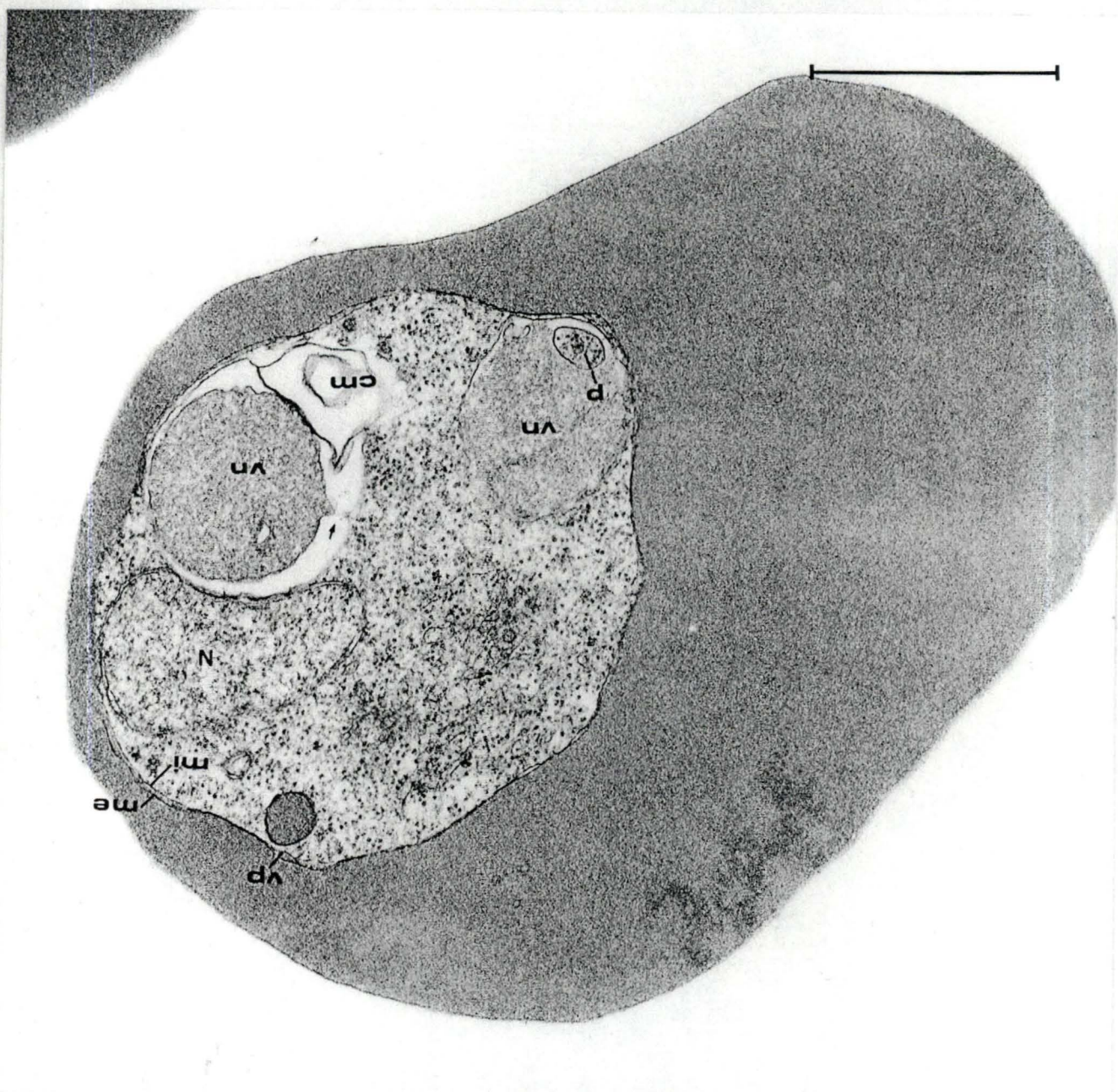


FIG. 3.2.29. et FIG. 3.2.29A.

Ces deux sections s riees nous montrent :

-Que la vacuole nutritive (vn) est encerclée en partie par le noyau (N).

Des membranes appartenant au corps multilamellaire (cm), s'interposent entre la vacuole et le noyau. D'une part elles forment des ponts avec la double membrane limitant la vacuole, et d'autre part, elles s'accolent intimement contre l'enveloppe nucléaire.

-Que ce trophozoite présente au moins deux corps multilamellaires.

(G. 22750 X)

FIG. 3.2.29A.

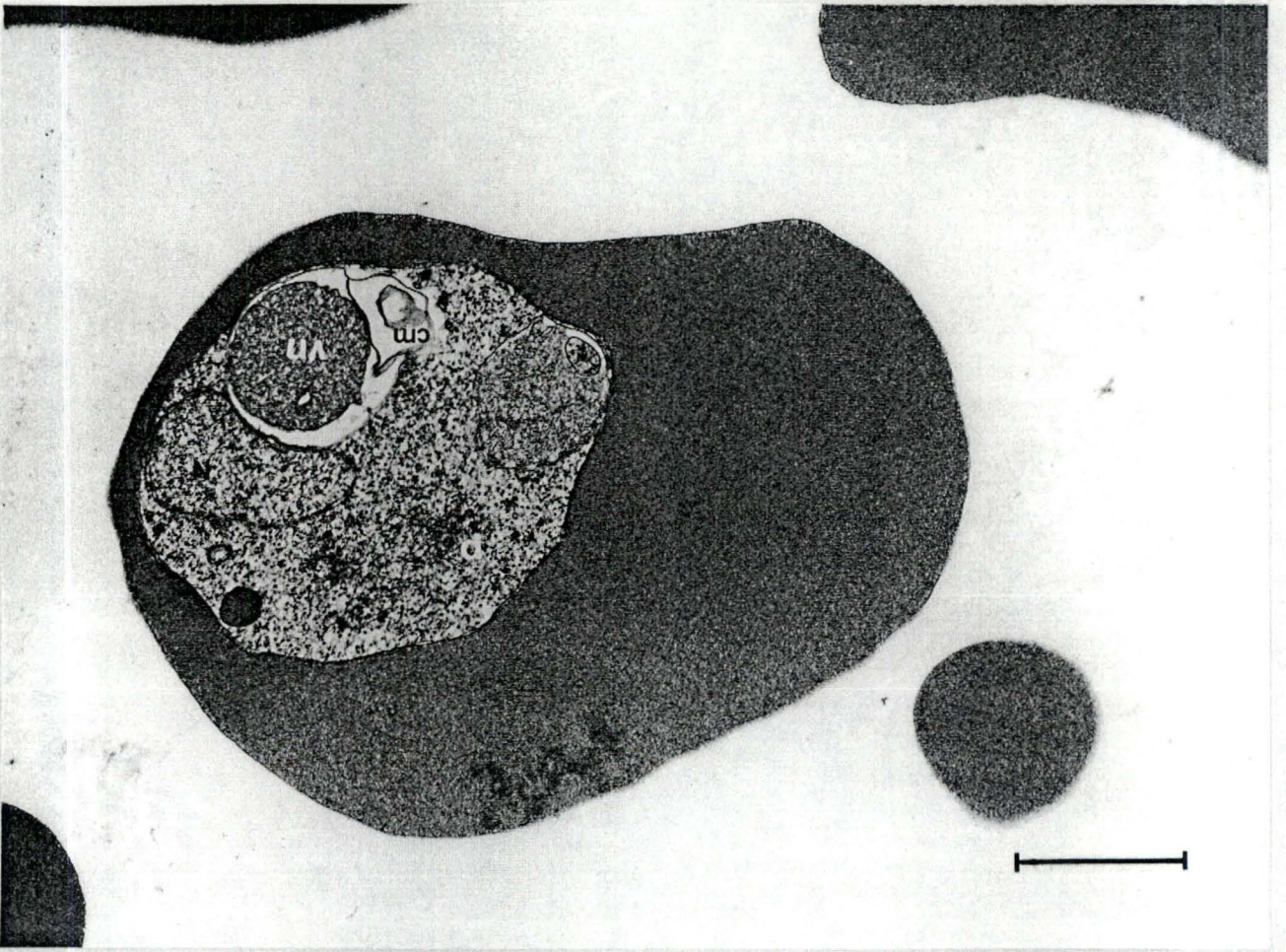


FIG. 3.2.29.

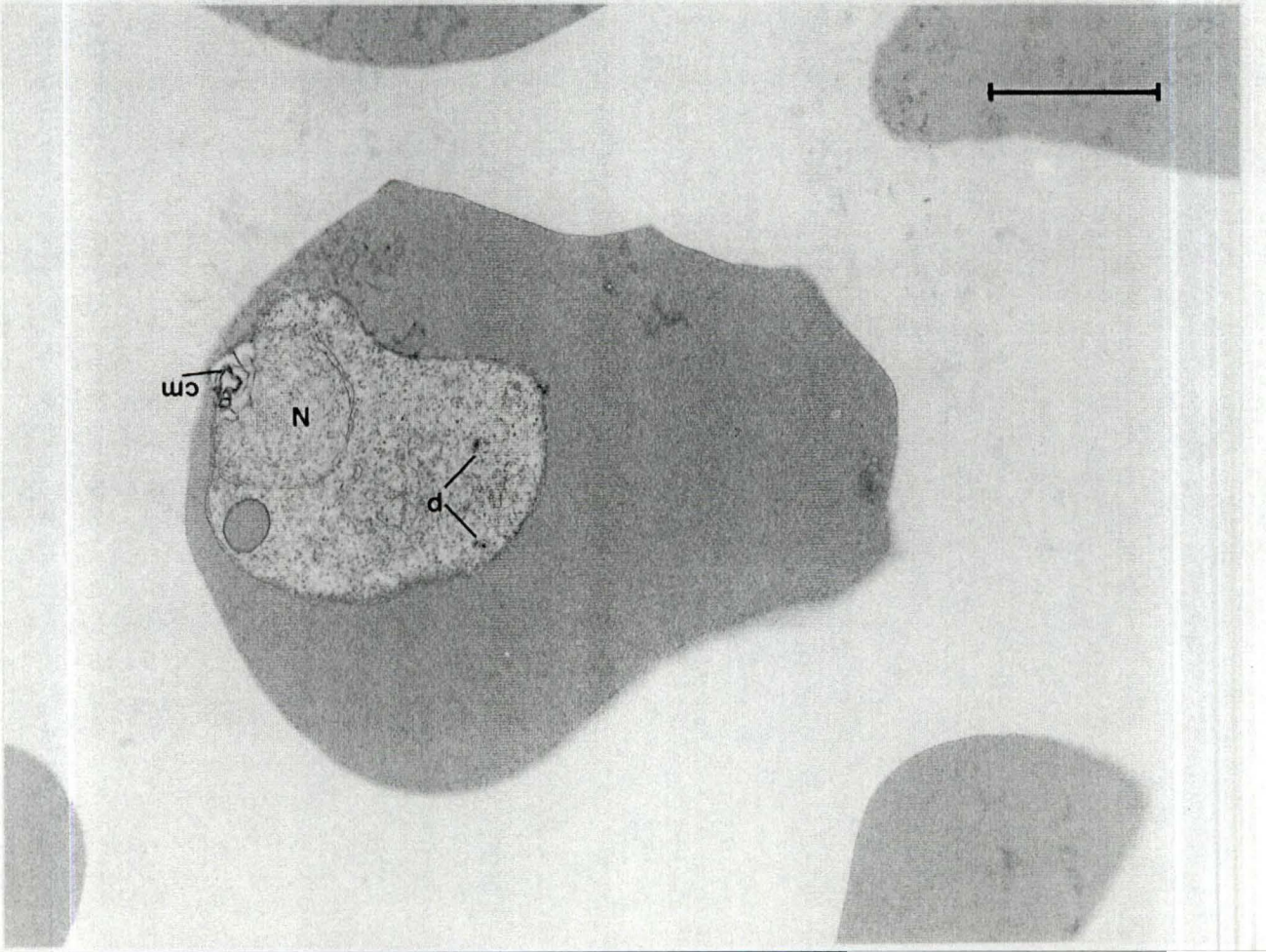


FIG. 3.2.30. et FIG. 3.2.30 A.

Sections d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

La FIG. 3.2.30. nous montre que, suivant la section effectuée dans le parasite, le corps multilamellaire peut apparaître sous forme de vacuoles limitées par une double membrane (dm).

(G. 22750 X)

Sur la FIG. 3.2.30 A., nous observons une vacuole nutritive entourée par des membranes appartenant au corps multilamellaires (cm).

Par endroit, ces membranes sont intimement accolées à la double membrane de la vacuole nutritive formant ainsi des épaissements membranaires.

Nous remarquons des ponts (flèches), qui semblent relier le contenu vacuolaire au cytoplasme du parasite et au stroma érythrocytaire.

Nous distinguons une vésicule à pigment (p) accolée au noyau (N), et une évagination du stroma (es) de la cellule hôte.

(G. 37500 X)

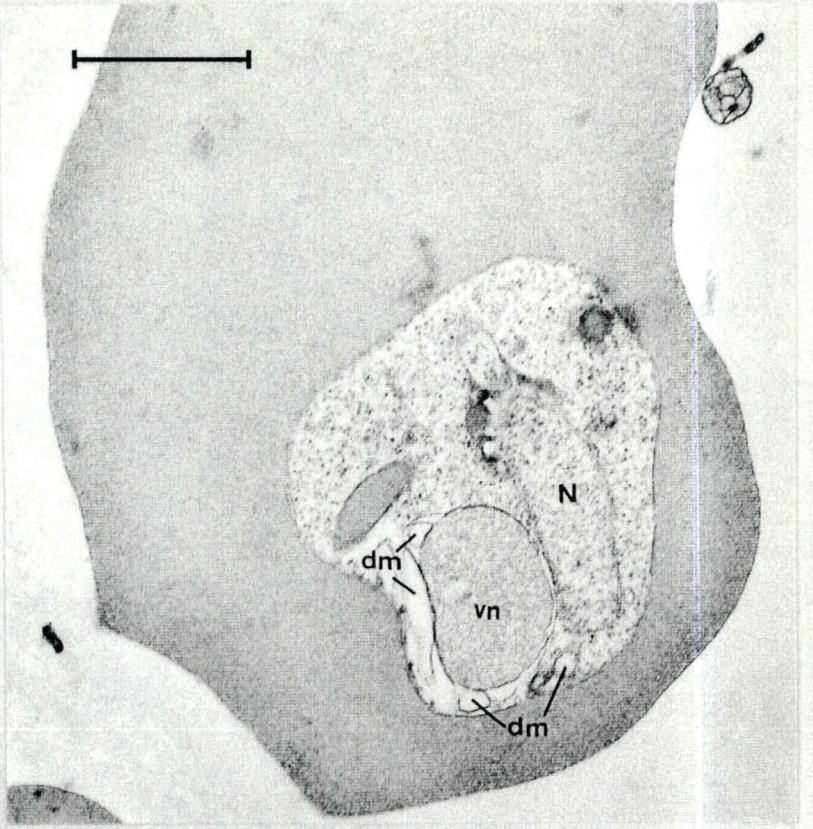


FIG. 3.2.30.

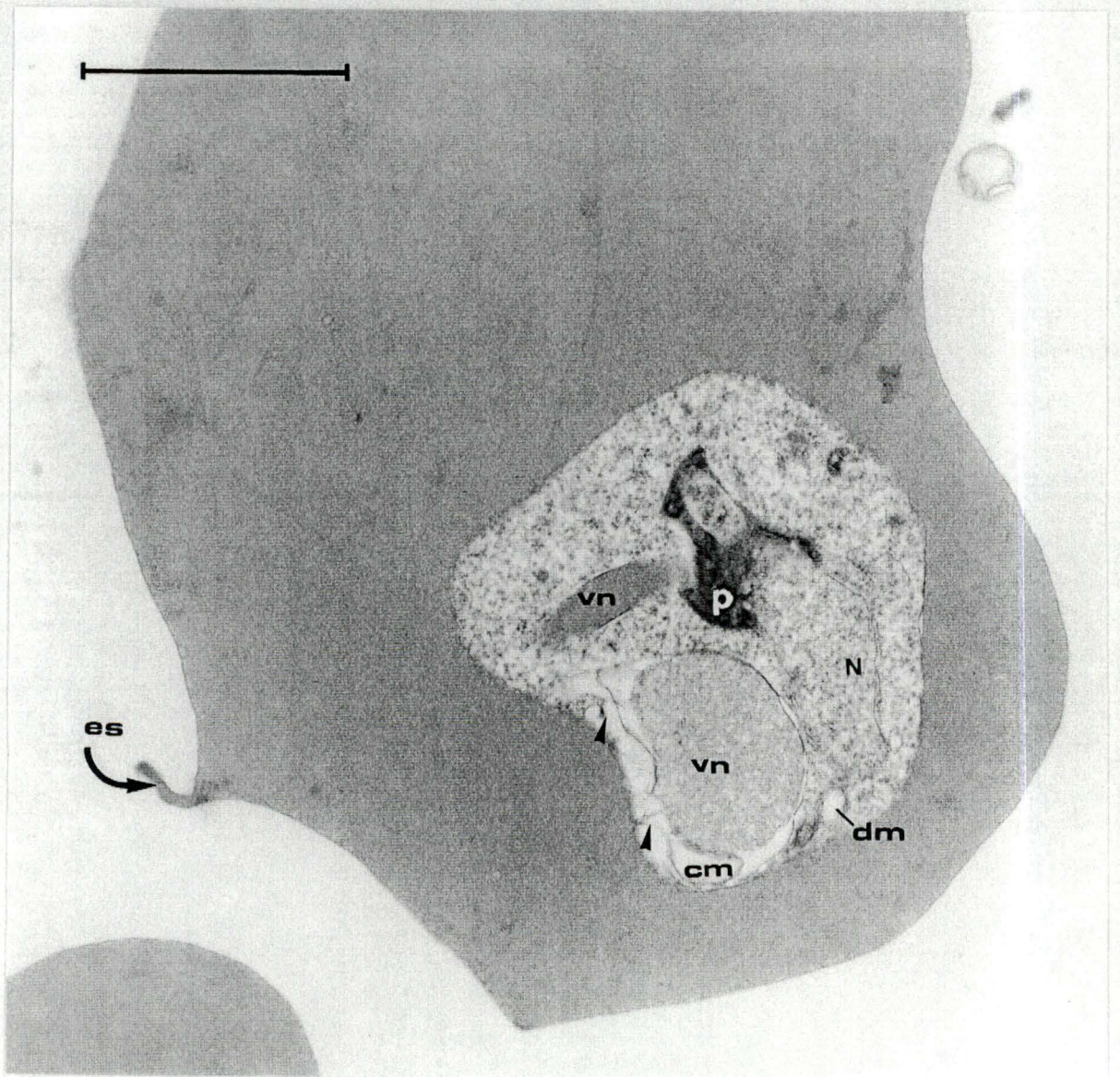


FIG. 3.2.30A.

FIG. 3.2.31.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Ce trophozoïte est situé en périphérie du globule rouge.

Nous observons un corps multilamellaire (cm), situé le long de la membrane limitante du parasite.

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.32.

Une coupe longitudinale du trophozoïte de la FIG. 3.2.31. au niveau du corps multilamellaire peut expliquer ce que nous observons sur la FIG. 3.2.32., c'est à dire un enchevêtrement de double membrane concentrique.

(G. 62500 X)

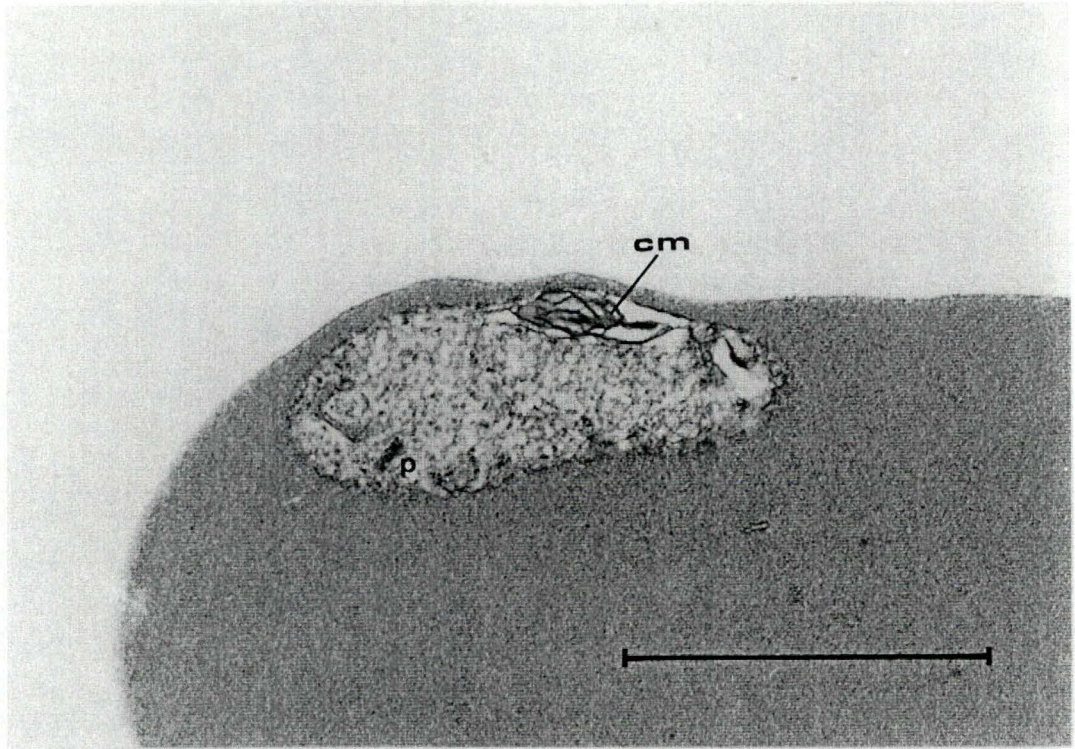


FIG. 3.2.31.

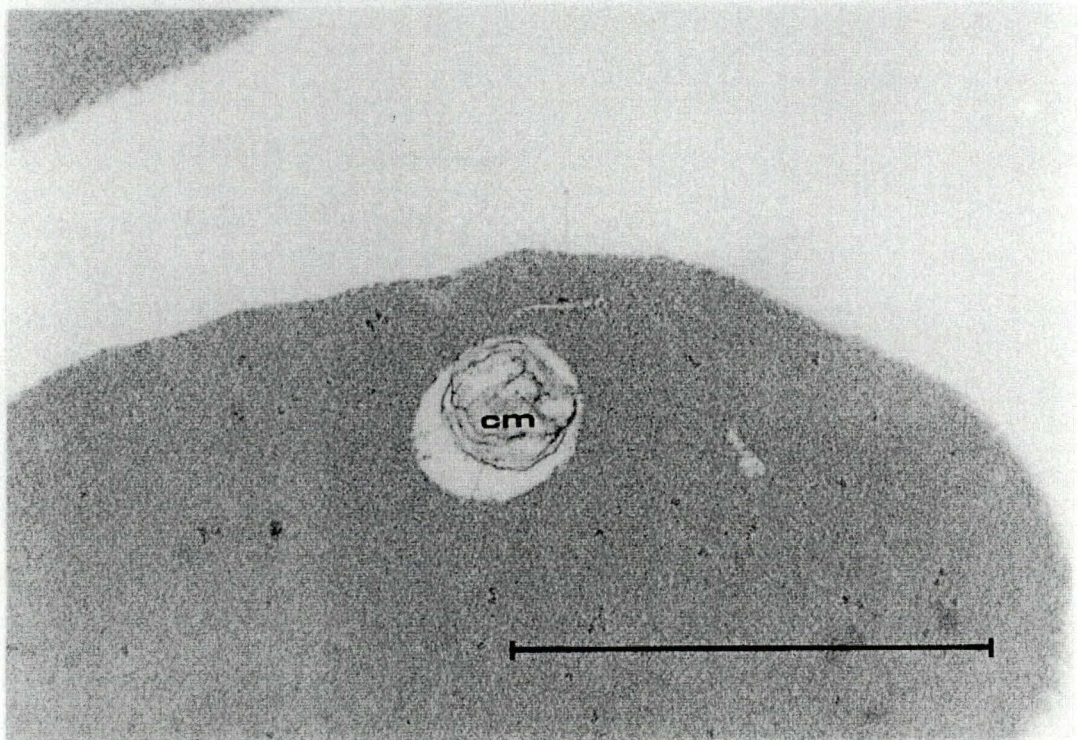


FIG. 3.2.32.

FIG. 3.2.33.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Un corps multilamellaire (cm) faisant face à une dépression (flèche).
- Deux vacuoles limitées par une double membrane (dm), situées entre la vacuole nutritive (vn) et la membrane limitante du parasite.

(G. 62500 X)

FIG. 3.2.34.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous remarquons :

- Le noyau (N) limité par une double membrane.
- Un corps multilamellaire (cm) situé entre le noyau et la vacuole nutritive (vn).

(G. 62500 X)

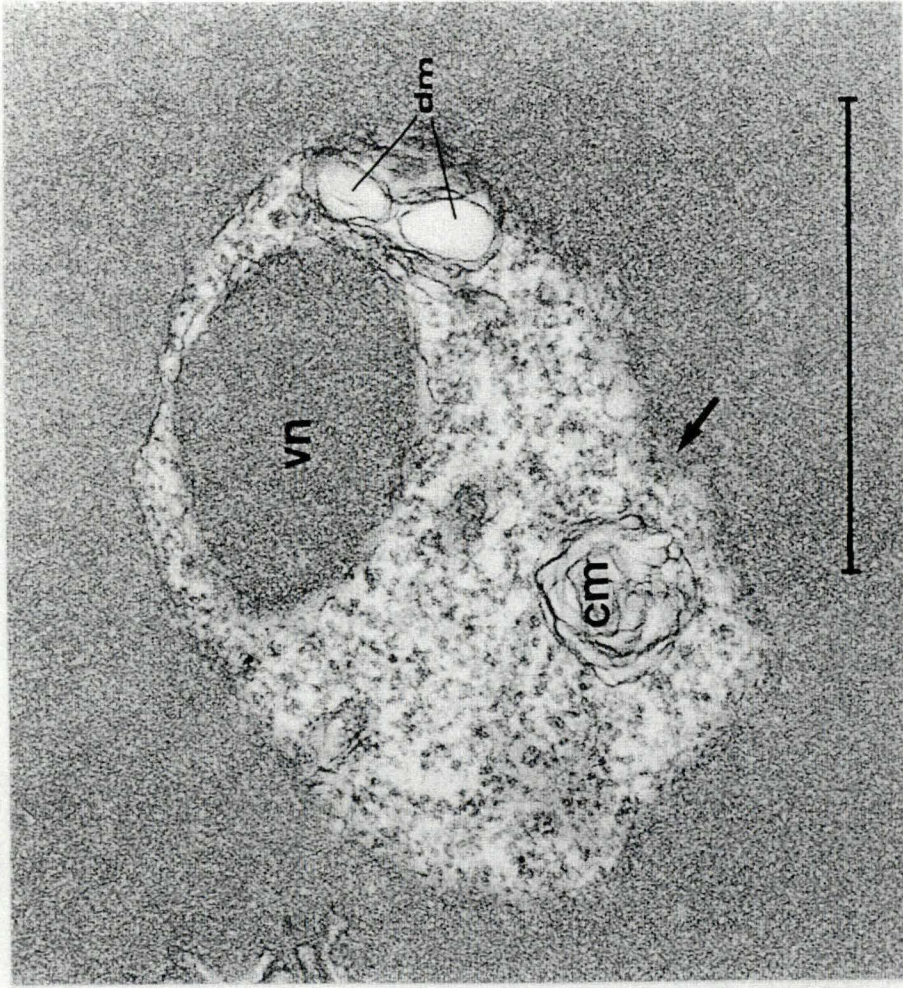


FIG. 3.2.33.

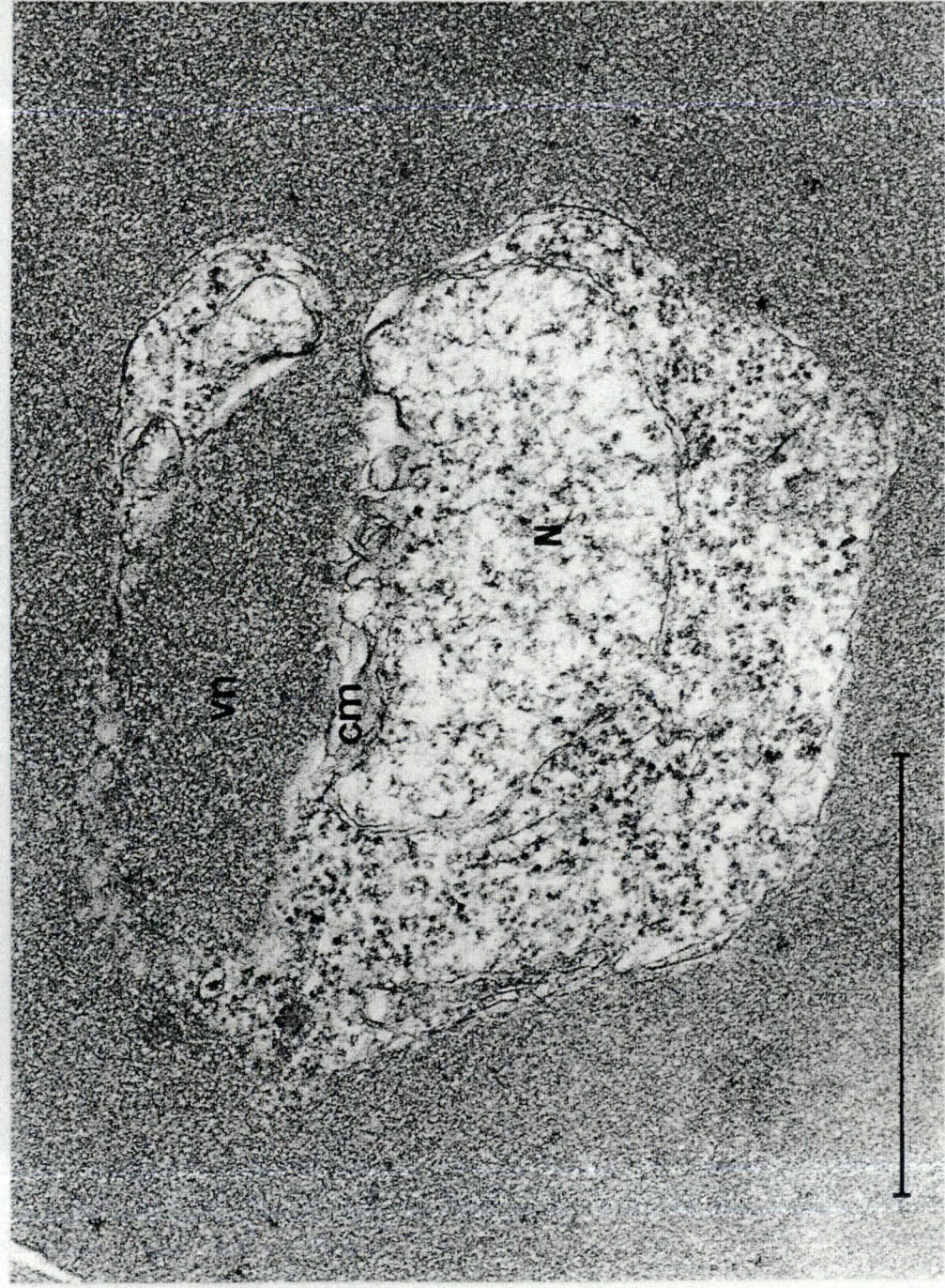


FIG. 3.2.34.

FIG. 3.2.33A.

Nous observons :

- Des fissures de Maurer (fm) dans le stroma de la cellule hôte.
- Une vacuole limitée par une double membrane, dans le milieu extérieur.

(G. 22750 X)

FIG. 3.2.34A.

Nous observons une vacuole limitée par une double membrane dans le milieu extérieur.

(G. 17750 X)

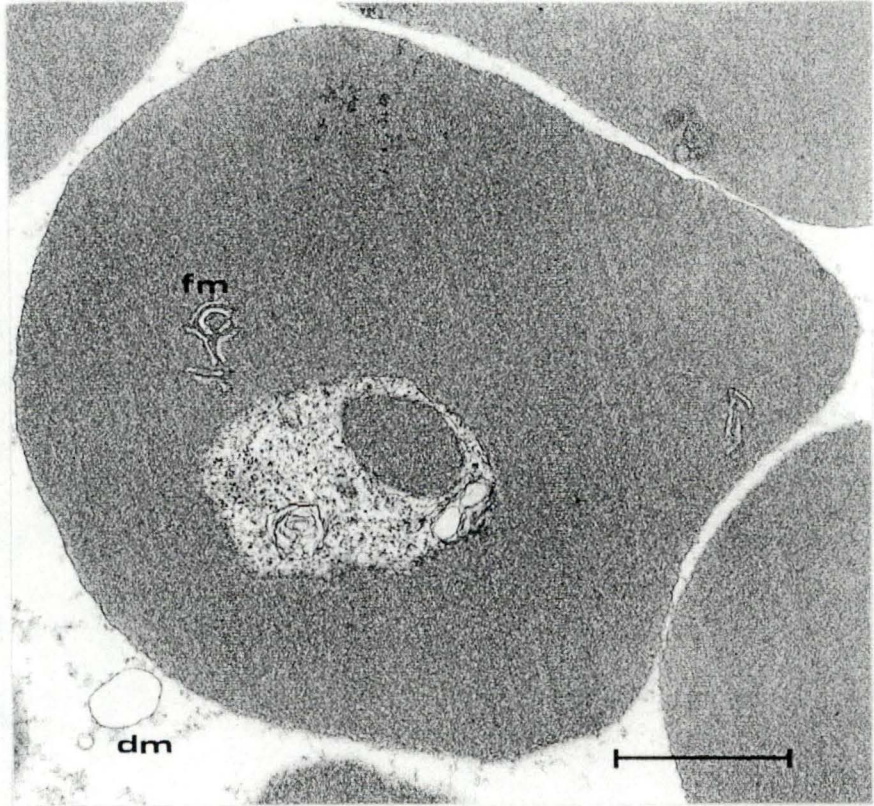


FIG. 3.2.33A.

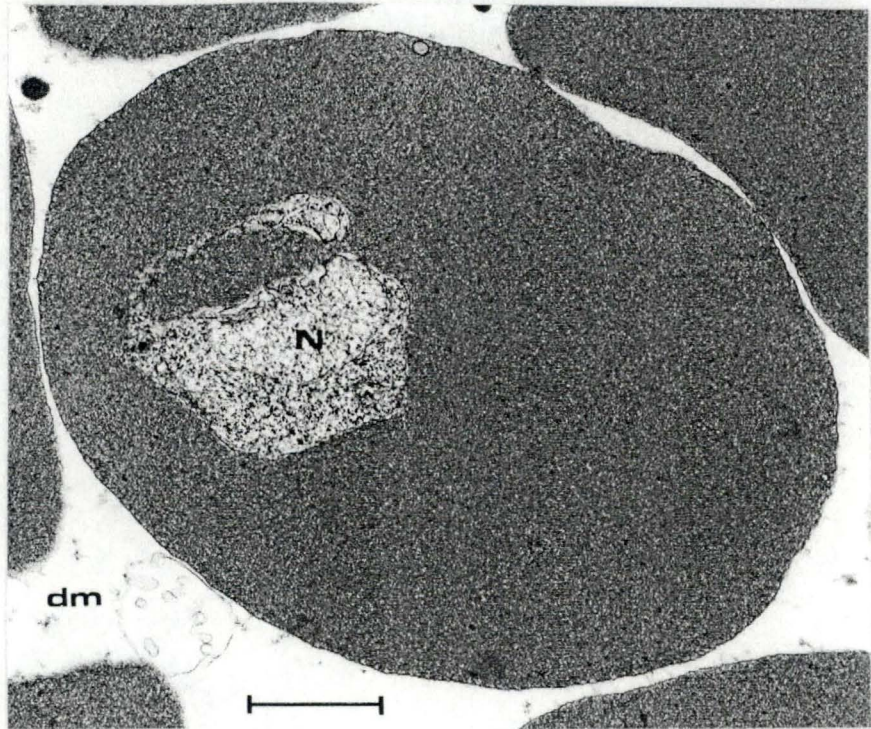


FIG. 3.2.34A.

FIG. 3.2.35.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Une vacuole nutritive (vn), entourée par un noyau de grande taille (N), entre les deux, s'interpose un corps multilamellaire (cm).
- La vacuole parasitophore (vp) limitée par une membrane (me).

(G.85000 X)

FIG. 3.2.35.

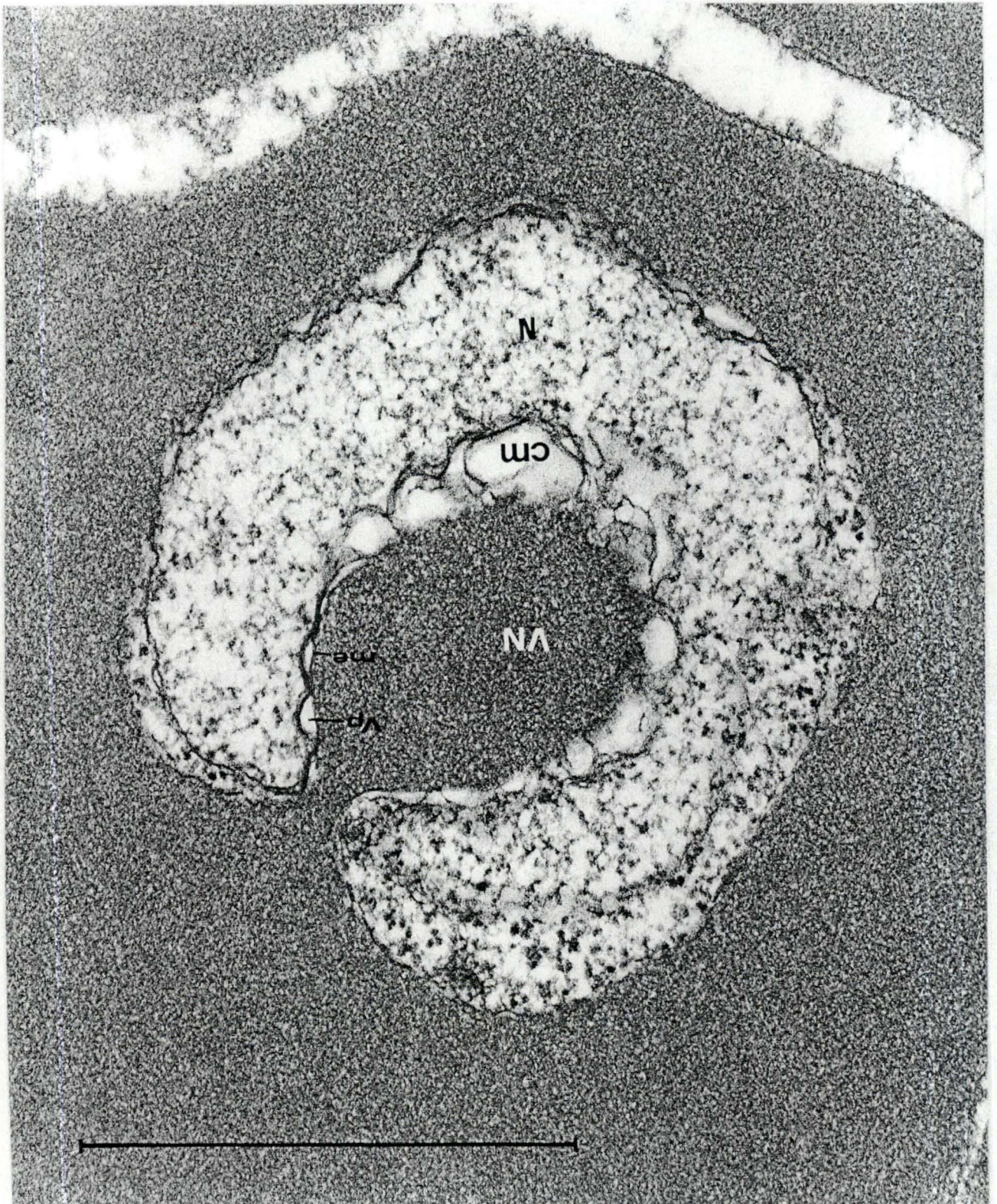


FIG. 3.2.36.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons le noyau (N) situé à proximité de la vacuole, et le réticulum endoplasmique (re) dans le cytoplasme du parasite.

(G.47500 X)

FIG.3.2.37.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous remarquons :

- Une invagination de la membrane limitante du globule rouge (flèche).
- Des liens entre la membrane de la vacuole parasitophore et un épaississement membranaire (flèche).
- Un corps dense (cd).
- Deux vacuoles accolées (limitées par une double membrane (dm)), ayant l'aspect d'une mitochondrie.

(G.62500 X)

FIG. 3.2.37.

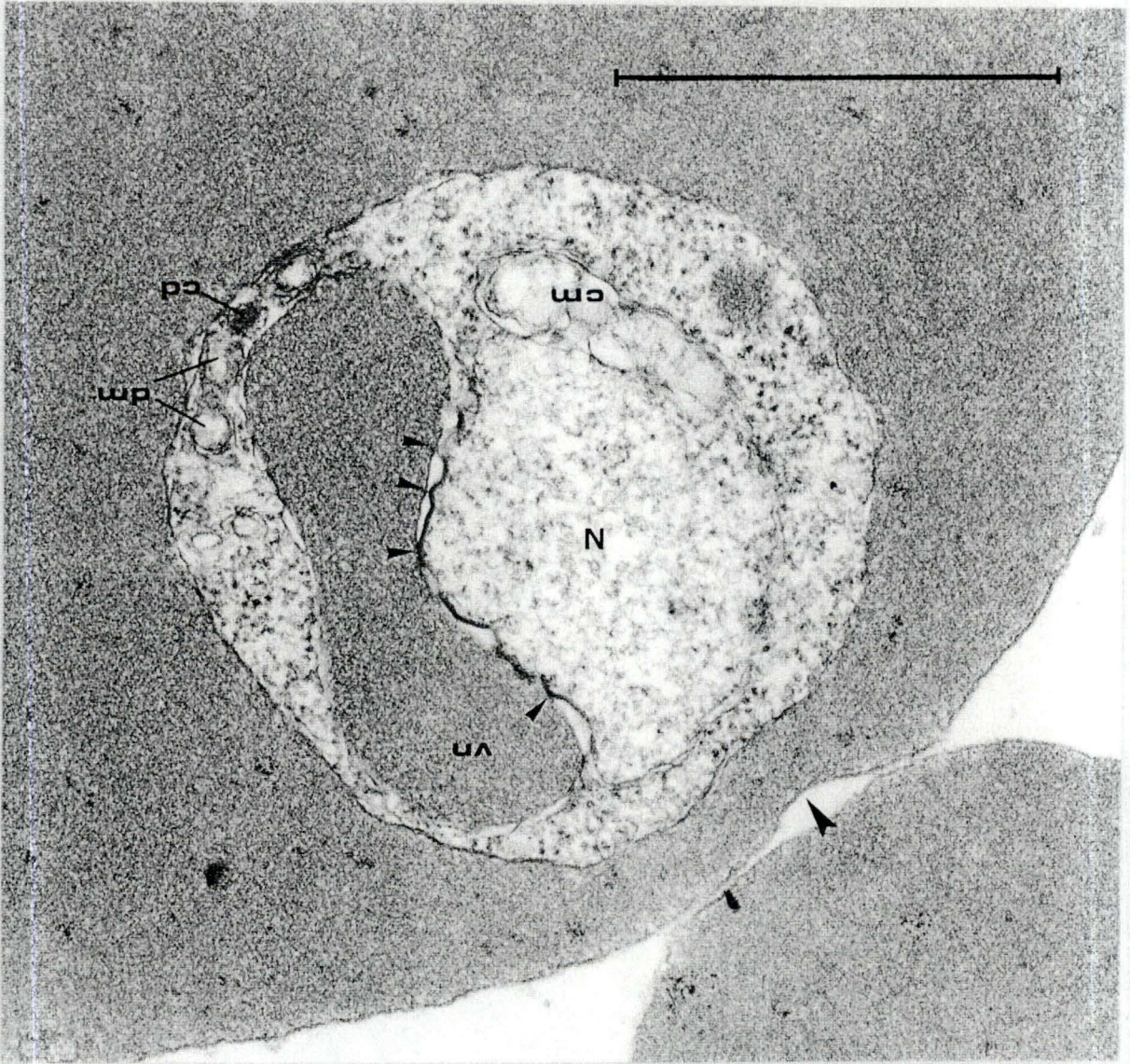


FIG. 3.2.36.

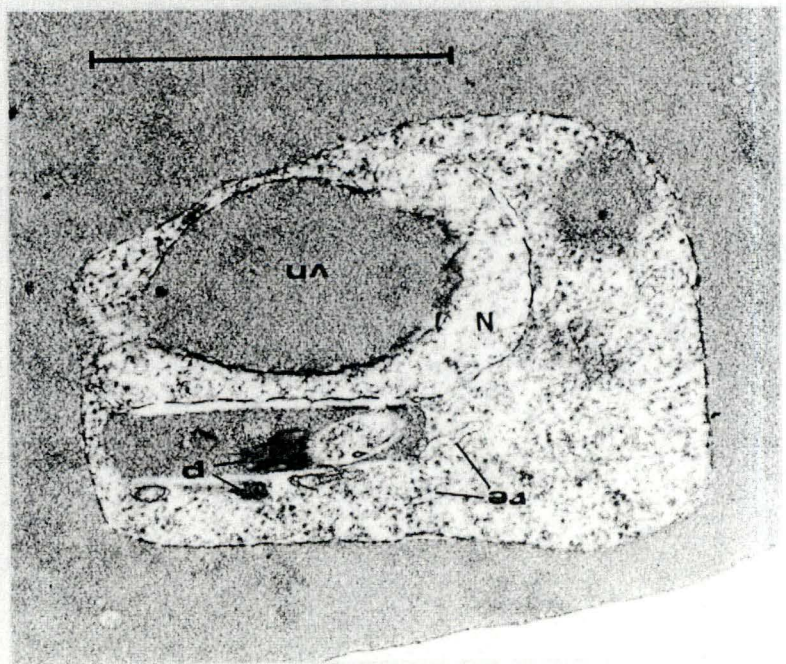


FIG. 3.2.38. et FIG. 3.2.38A.

Sections d'un trophozoïte de *P. falciparum*, dans une hématie.

Sur la FIG. 3.2.38., nous remarquons de nombreux ribosomes associés au réticulum endoplasmique (re).

Sur la FIG. 3.2.38A., nous observons :

- Des vésicules à pigment (p). Une de ces vésicules (flèche) est encore unie à la vacuole nutritive (vn), dont elle est très probablement issue.

- Un corps dense aux électrons (cd) situé près d'une vacuole limitée par une double membrane (dm). Cette dernière ressemble à une mitochondrie.

(G. 37500 X)

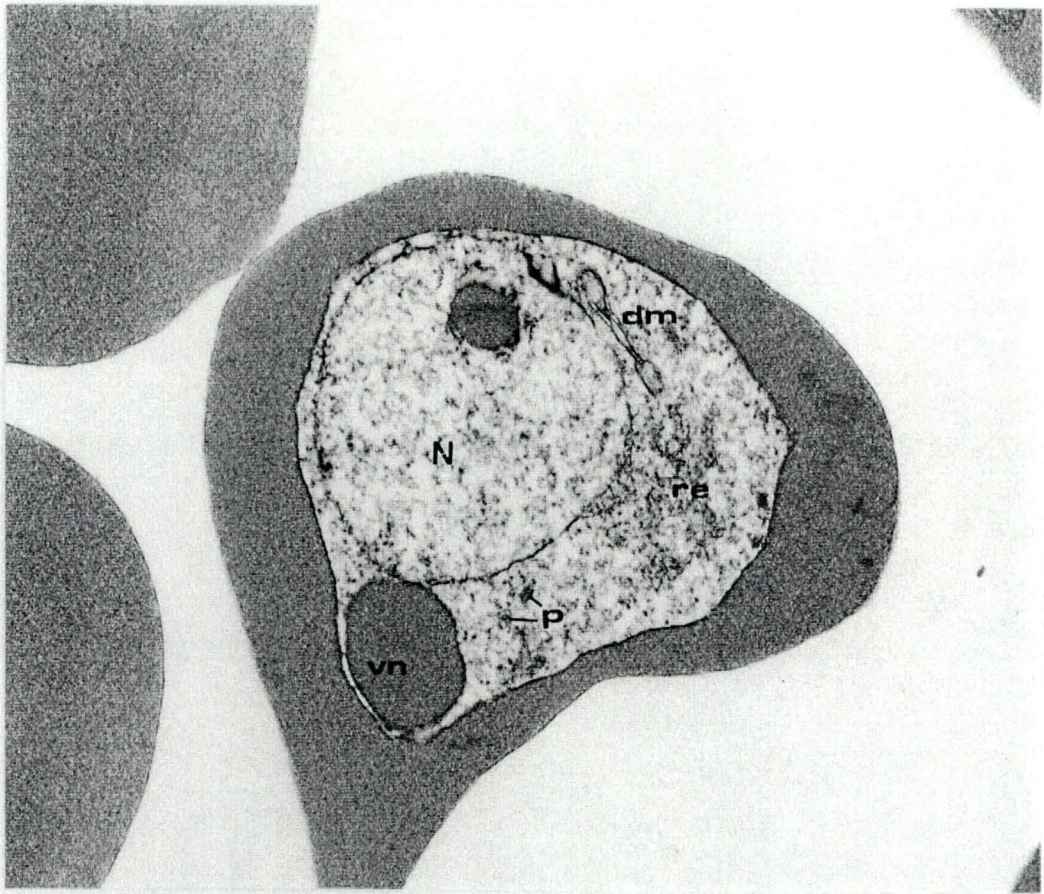


FIG. 3.2.38.

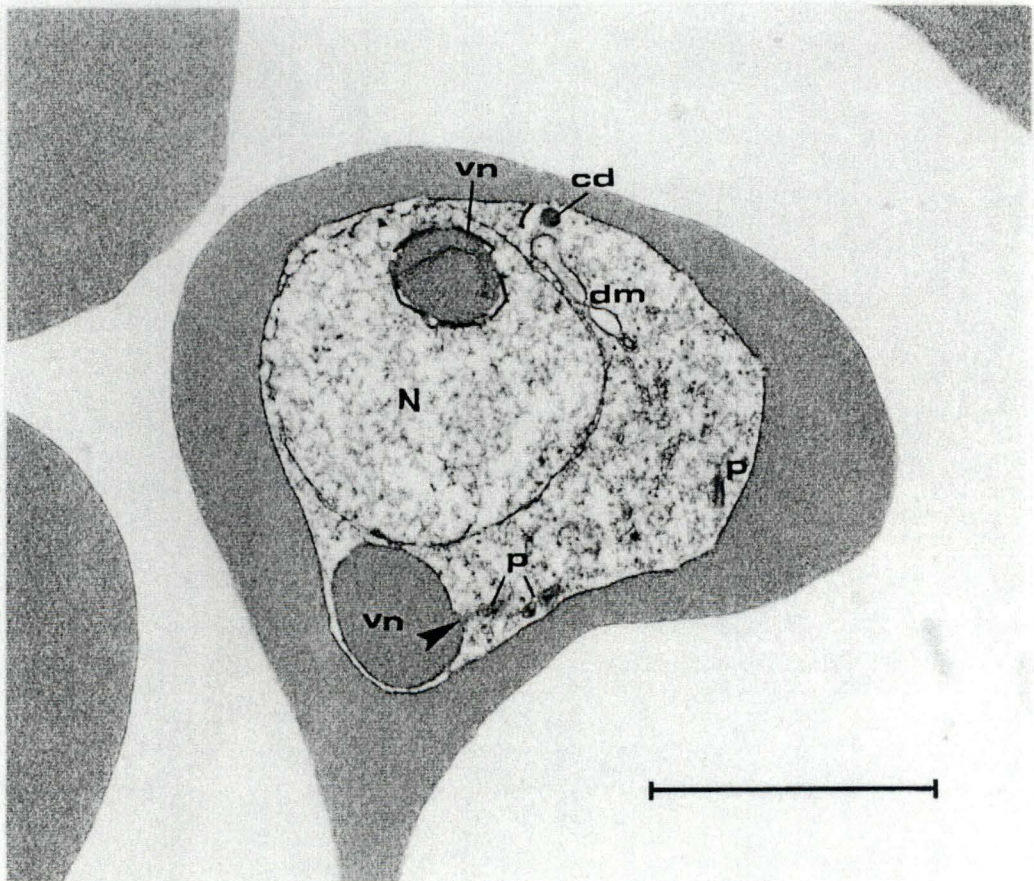


FIG. 3.2.38A.

FIG. 3.2.39.

Section d'un globule rouge parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Des vésicules à pigment (p) situées en périphérie du parasite.
- Une vacuole limitée par une double membrane (dm).
- Des liens entre la membrane de la vacuole parasitophore et l'enveloppe nucléaire (flèches).

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.40.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Un corps dense aux électrons (cd).
- Des épaisissements membranaires (flèches).

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.40.

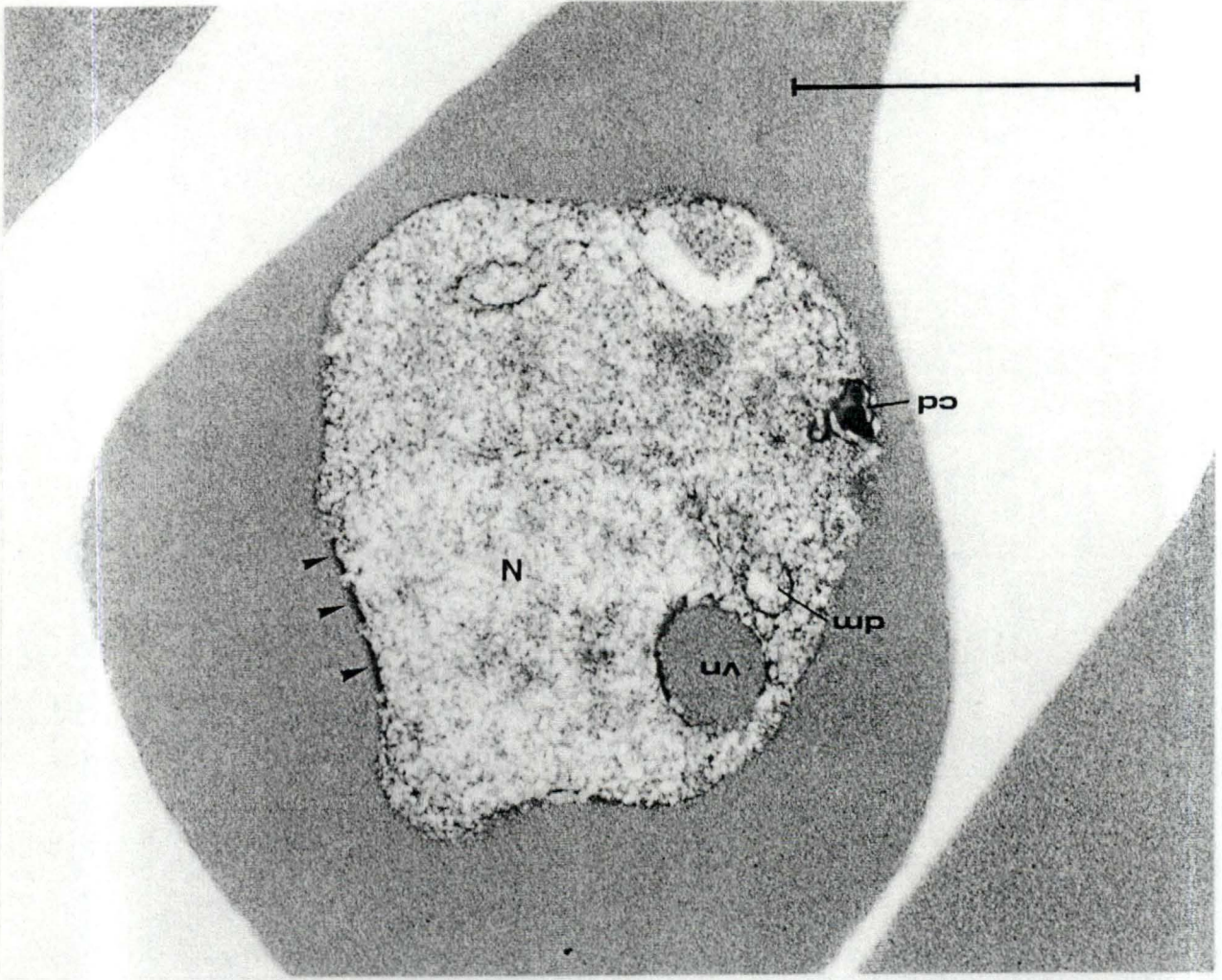


FIG. 3.2.39.

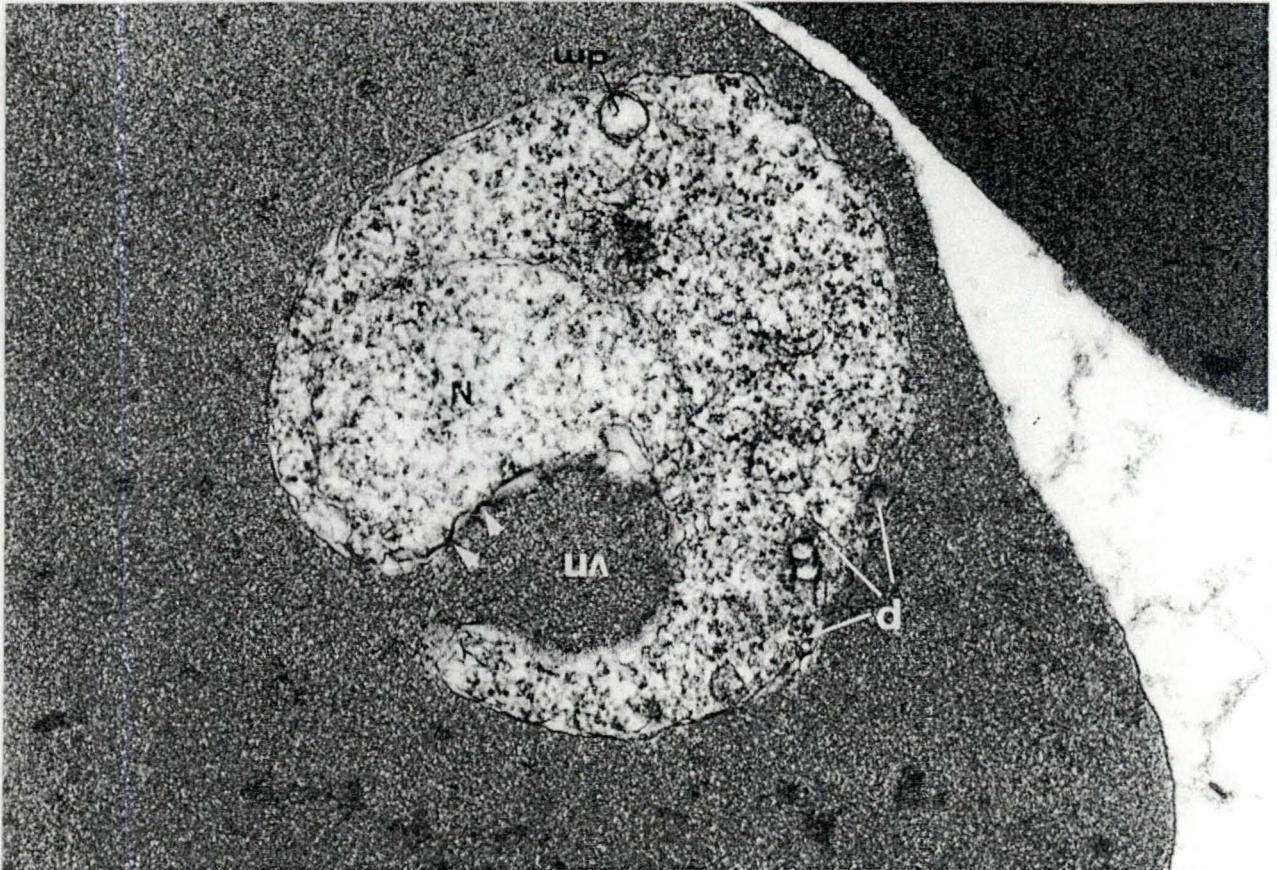


FIG. 3.2.41.

Section d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous distinguons :

- Le micropyle (mp).
- Deux vacuoles limitées par une double membrane (dm).
- Du réticulum endoplasmique (re).

Nous remarquons une continuité entre des vésicules à pigment (p) et la vacuole nutritive (vn), (flèche).

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.42.

Section d'une hématie parasitée par un trophozoïte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Le micropyle (mp).
- Le noyau allongé (N), placé au centre du parasite.
- Un corps multilamellaire intimement accolé au noyau.

(G. 62500 X)

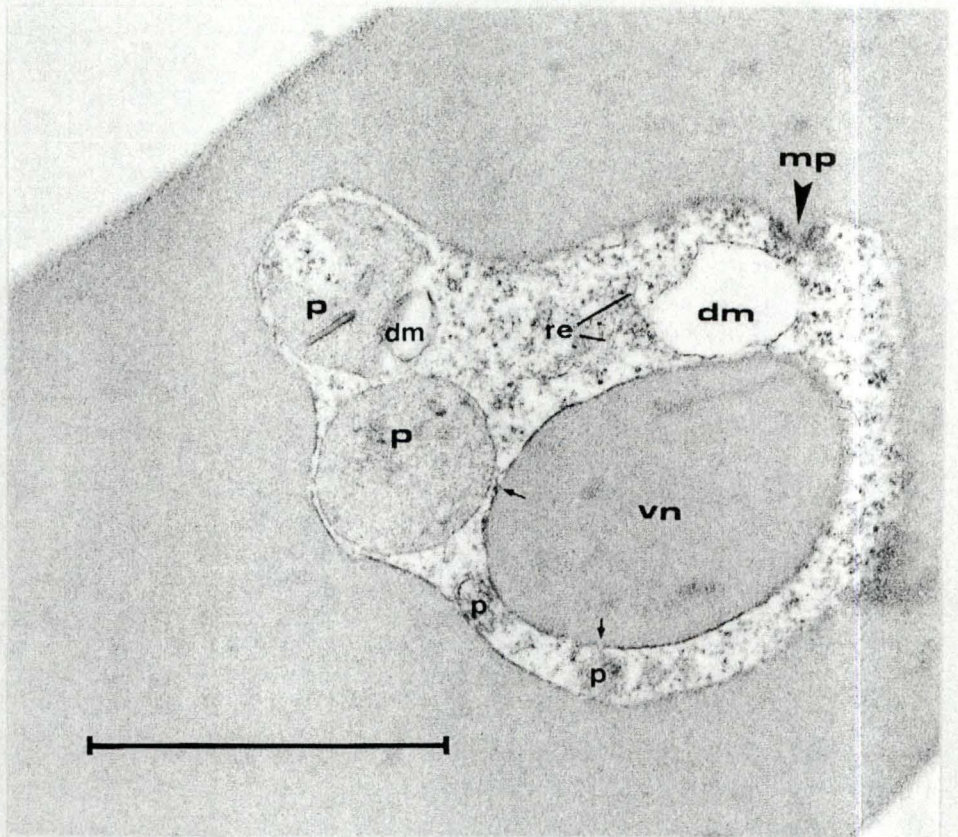


FIG. 3.2.41.

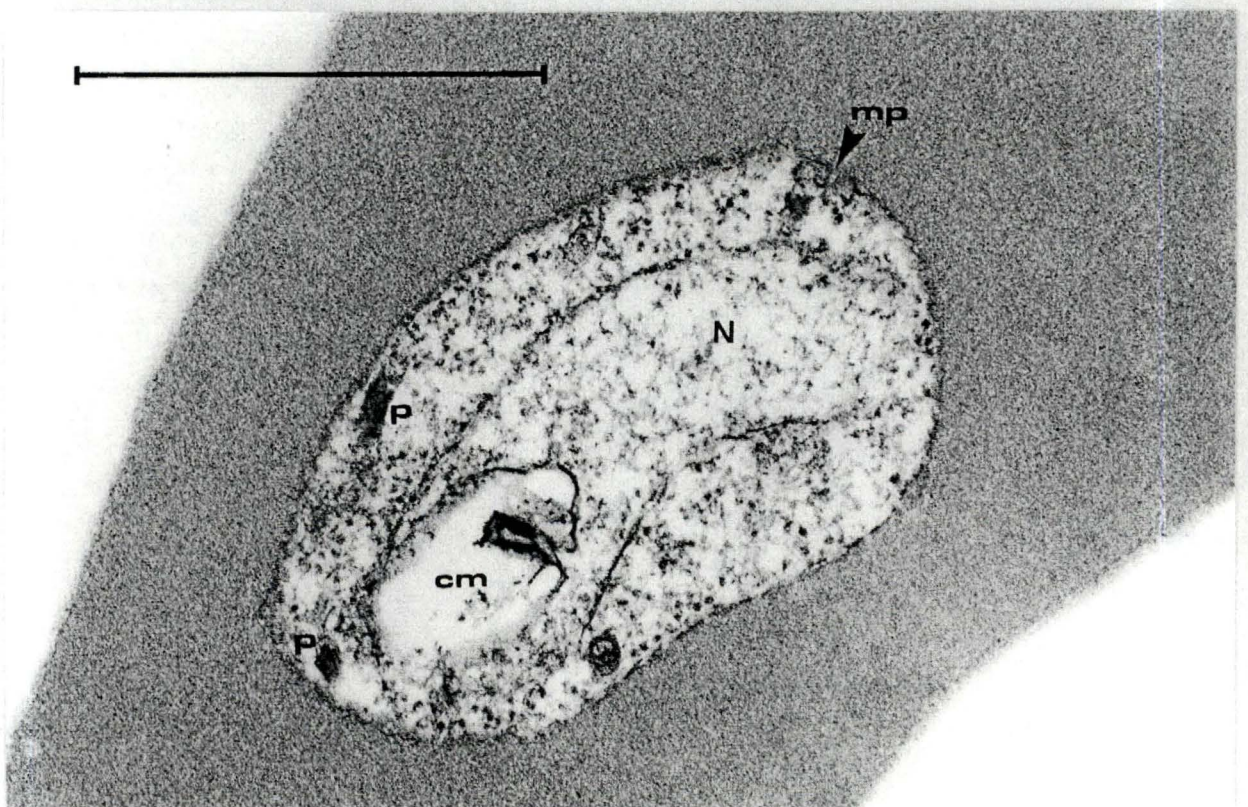


FIG. 3.2.42.

FIG. 3.2.43. et FIG. 3.2.43A.

Sections d'un érythrocyte parasité par un trophozoïte de *P. falciparum*.

FIG.3.2.43.

Nous remarquons :

- Les fissures de Maurer (fm), dans le stroma de la cellule hôte.
- Trois évaginations du cytoplasme du parasite, dont deux sont situées de part et d'autre du micropyle (mp).

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.43A.

Nous observons une vésicule à pigment allongée (p), située en périphérie du parasite, près du micropyle (mp).

(G. 47500 X)

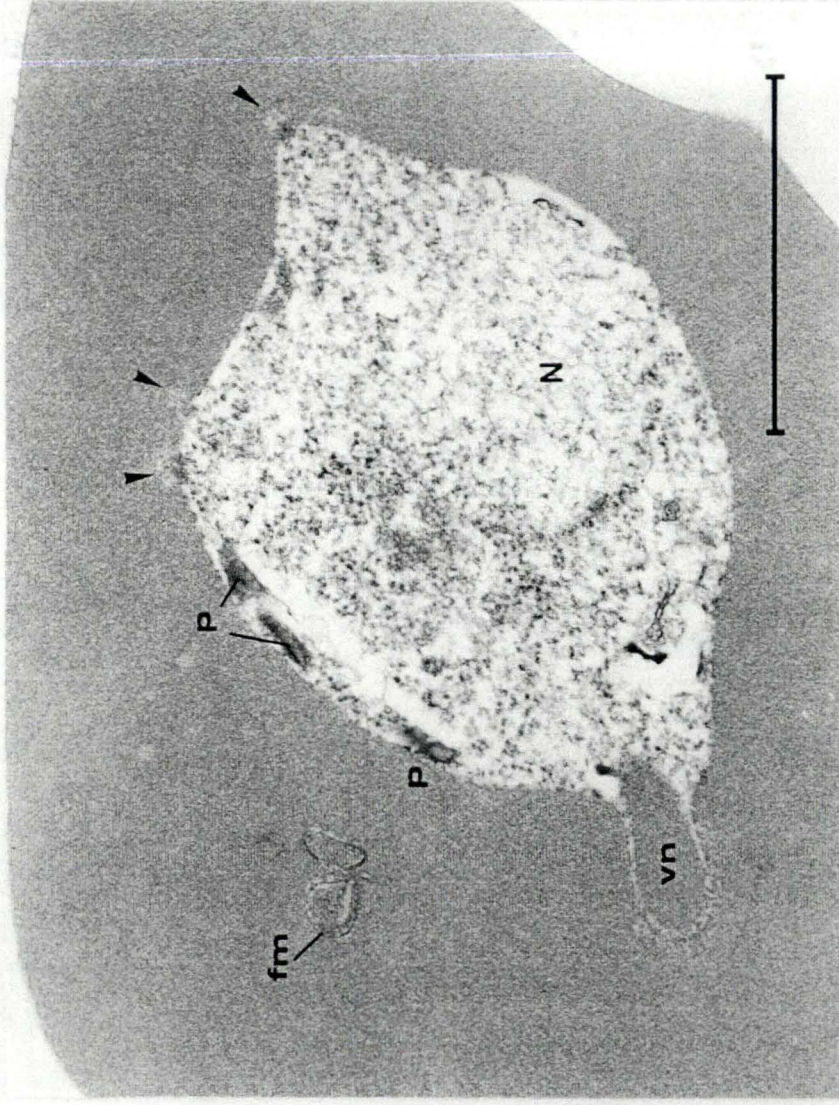


FIG. 3.2.43.

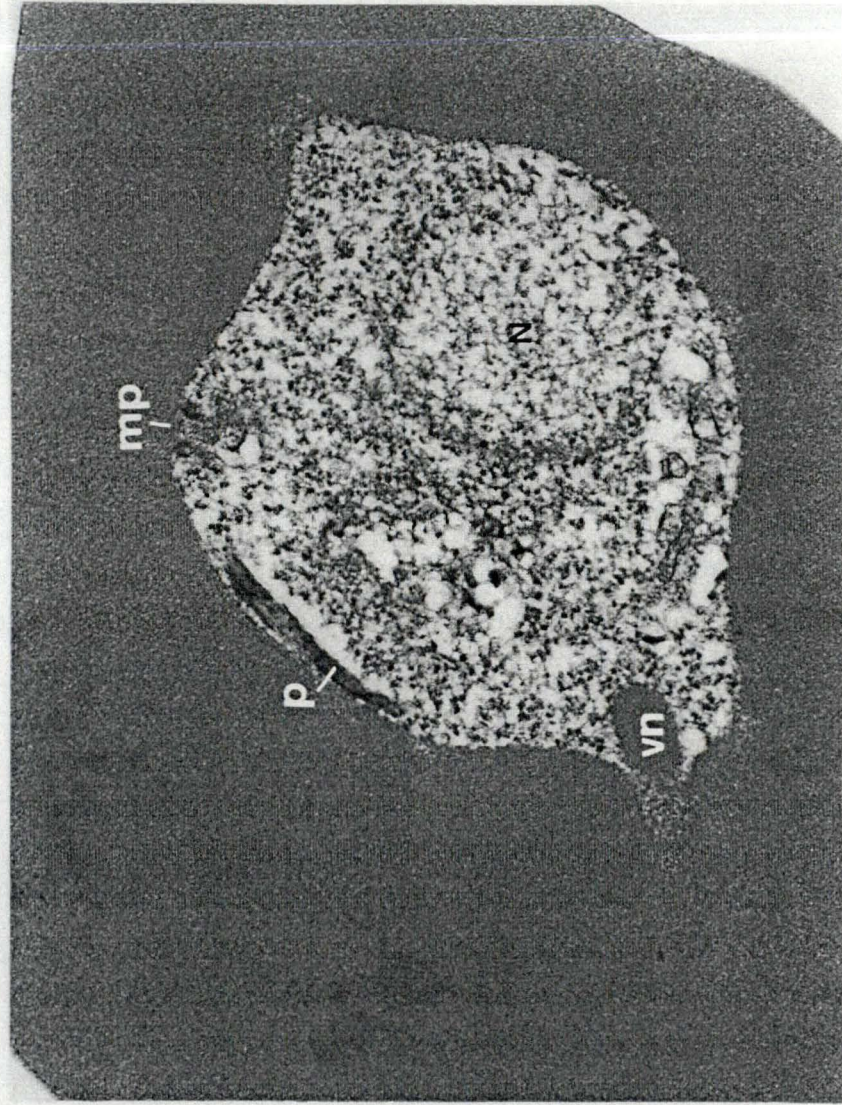


FIG. 3.2.43A.

FIG. 3.2.44. et FIG. 3.2.44 A.

Section d'un globule rouge parasité par *P. falciparum*.

FIG. 3.2.44.

Nous observons des évaginations de la membrane limitante de la cellule hôte (flèches).

(G. 17750 X)

FIG. 3.2.44 A.

Nous observons :

- un micropyle (mp).
- De nombreuses particules de ribonucléoprotéine dans le cytoplasme du parasite.
- Une vacuole limitée par une double membrane (dm), renfermant une portion de cytoplasme du parasite.

(G. 62500 X)

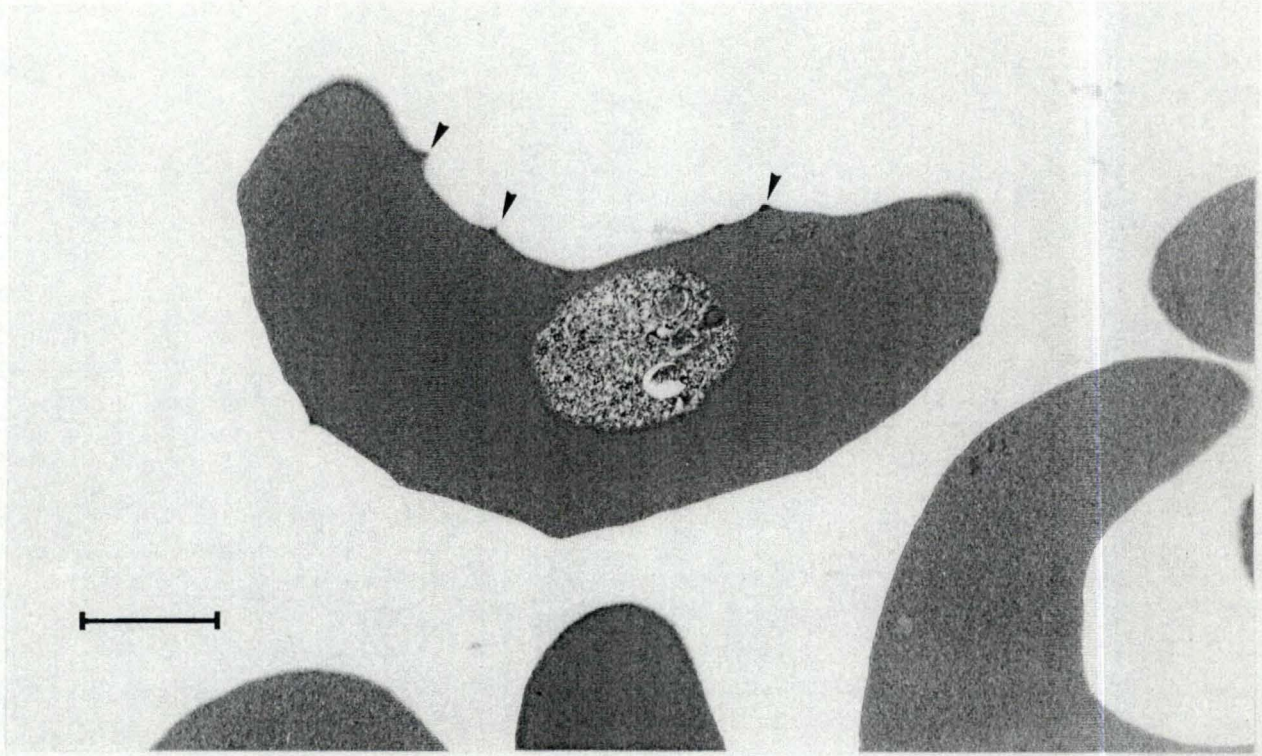


FIG. 3.2.44.

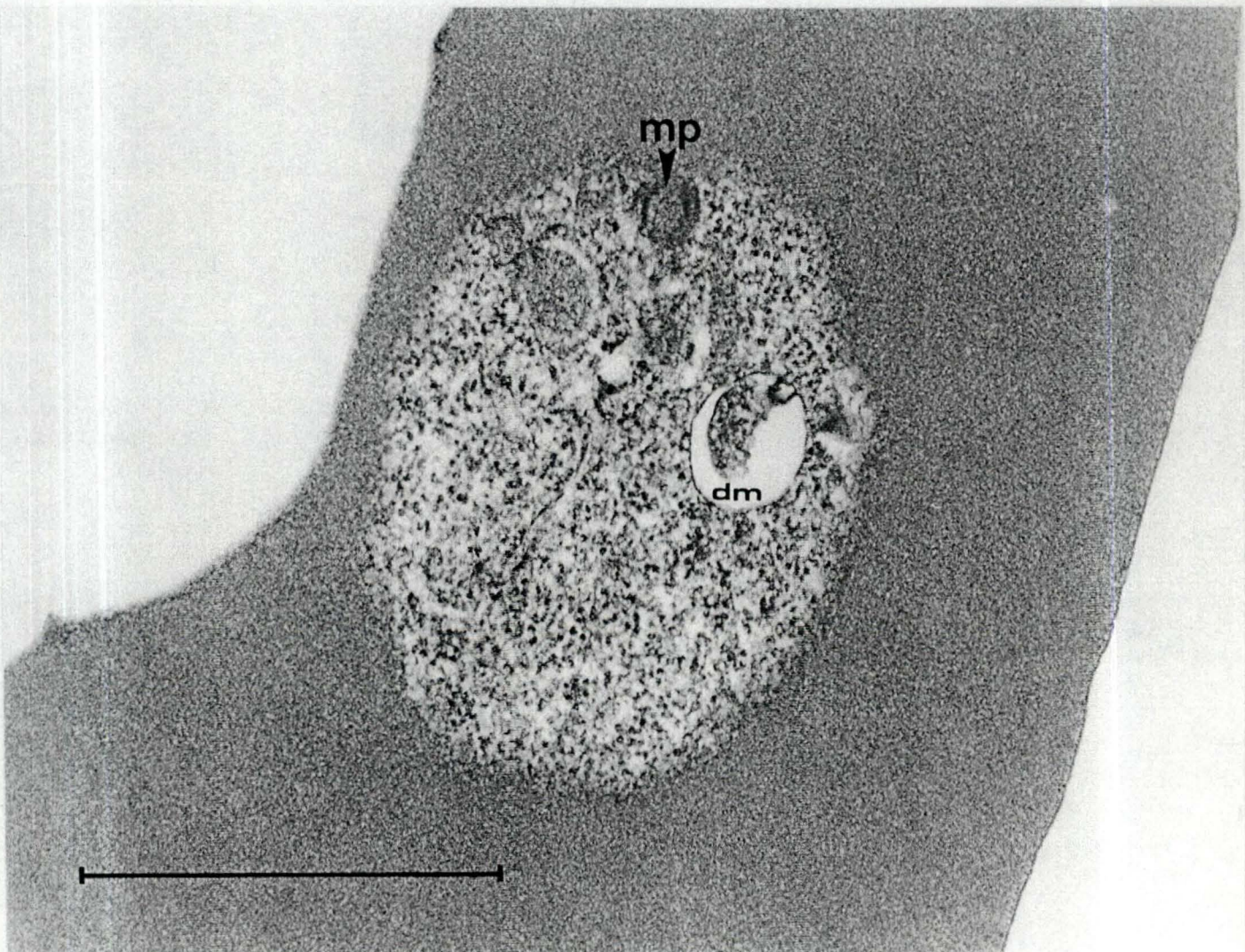


FIG. 3.2.44A.

FIG. 3.2.45.

Section d'un globule rouge parasité par un schizonte de *P. falciparum*.
Nous distinguons deux noyaux (N).
(G. 22750 X)

FIG. 3.2.46.

Section d'un érythrocyte parasité par un schizonte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Une vésicule à pigment (p), située entre une vacuole limitée par une double membrane (dm) ayant l'aspect d'une mitochondrie, et une vacuole allongée avec un contenu de même densité et de même structure que le stroma érythrocytaire.

- La présence d'au moins deux noyaux (N).

Dans le milieu extérieur, nous remarquons :

- une vacuole limitée par une double membrane (dm) qui est accolée à deux hématies (flèche).

- Des ponts entre deux érythrocytes (flèches).

(G. 22750 X)

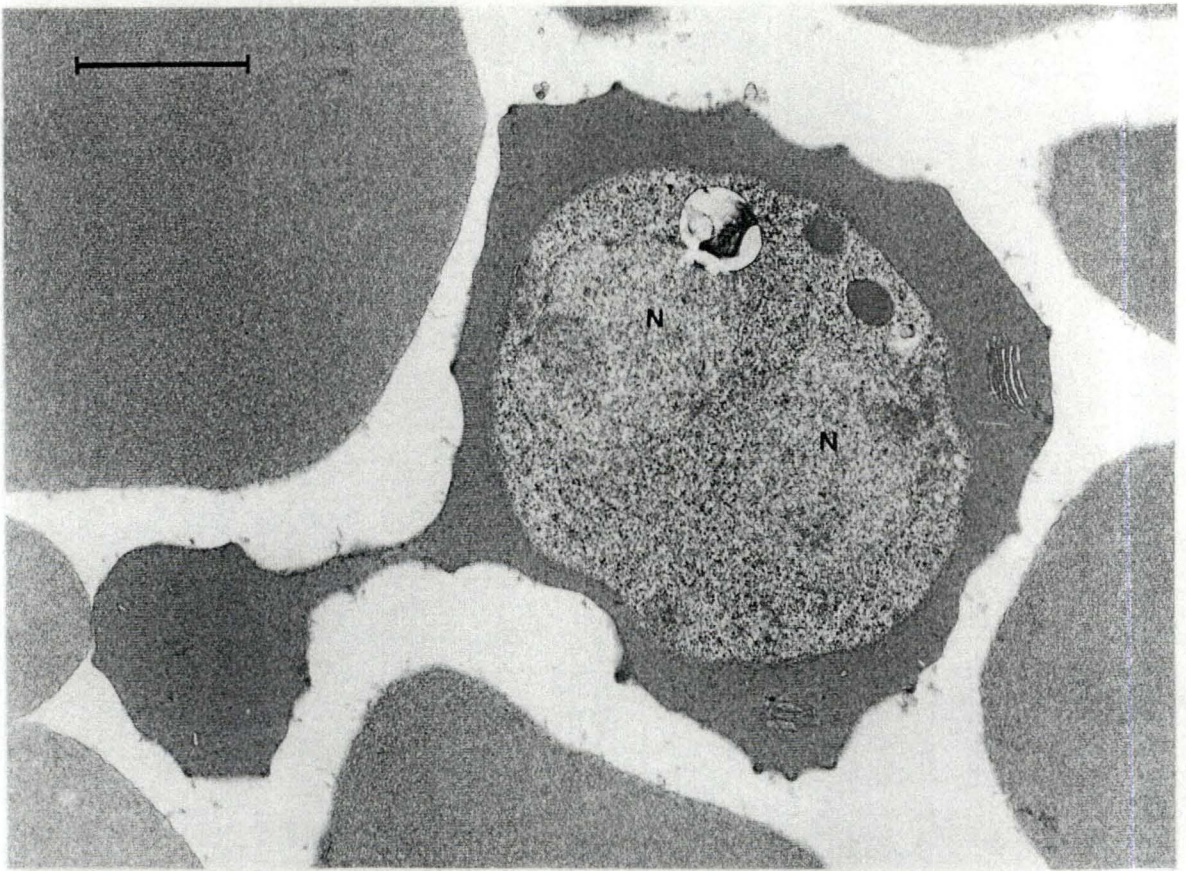


FIG. 3.2.45.

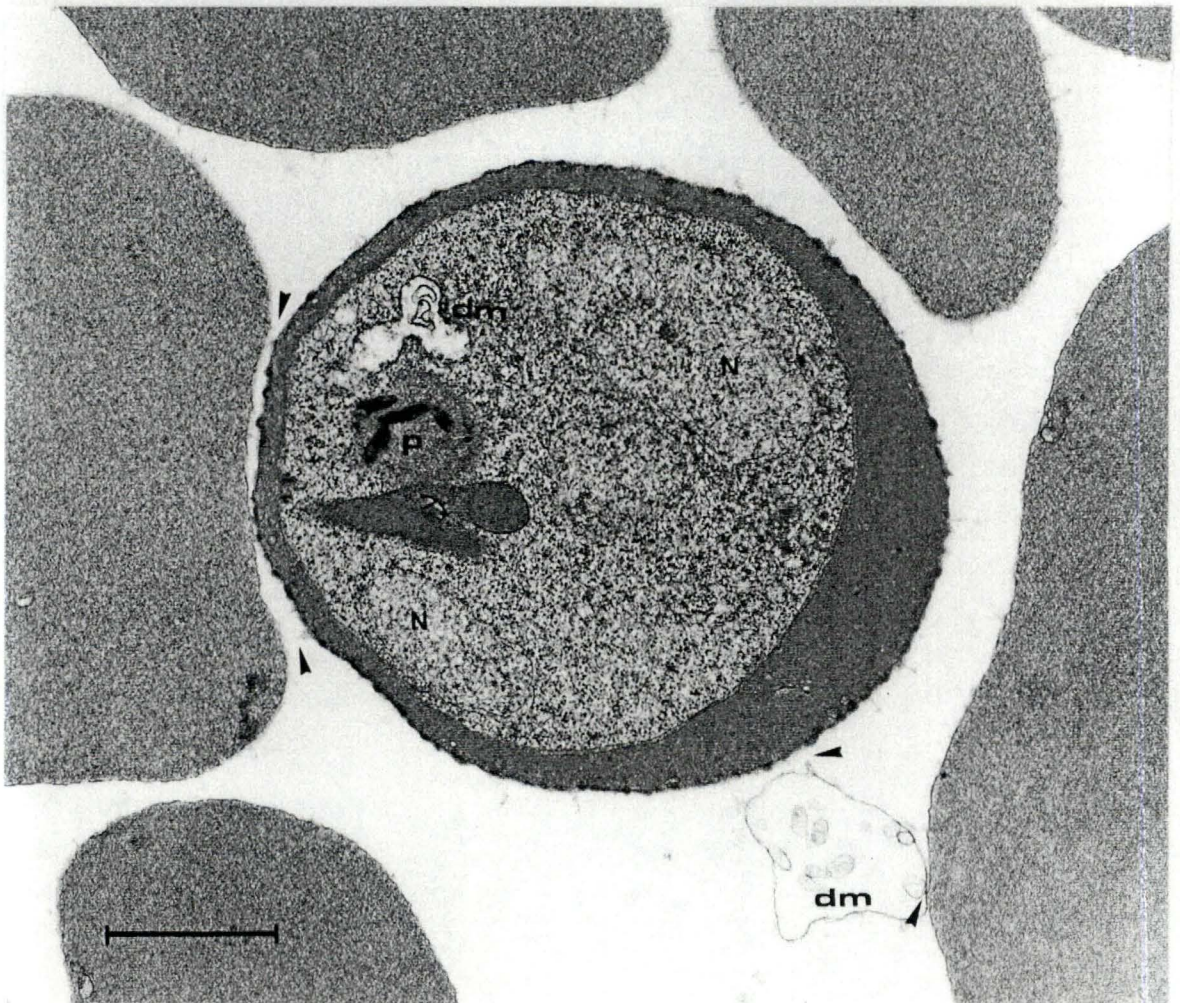


FIG. 3.2.46.

FIG. 3.2.47.

Cet agrandissement de la FIG. 3.2.45., permet de détailler les pointes ou knobs à la surface de la cellule hôte (flèche).

Nous observons :

- Une vacuole limitée par une double membrane renfermant du pigment (p).
- Des fissures de Maurer (fm) dans le stroma de la cellule hôte.

(G. 47500 X)

FIG. 3.2.47.

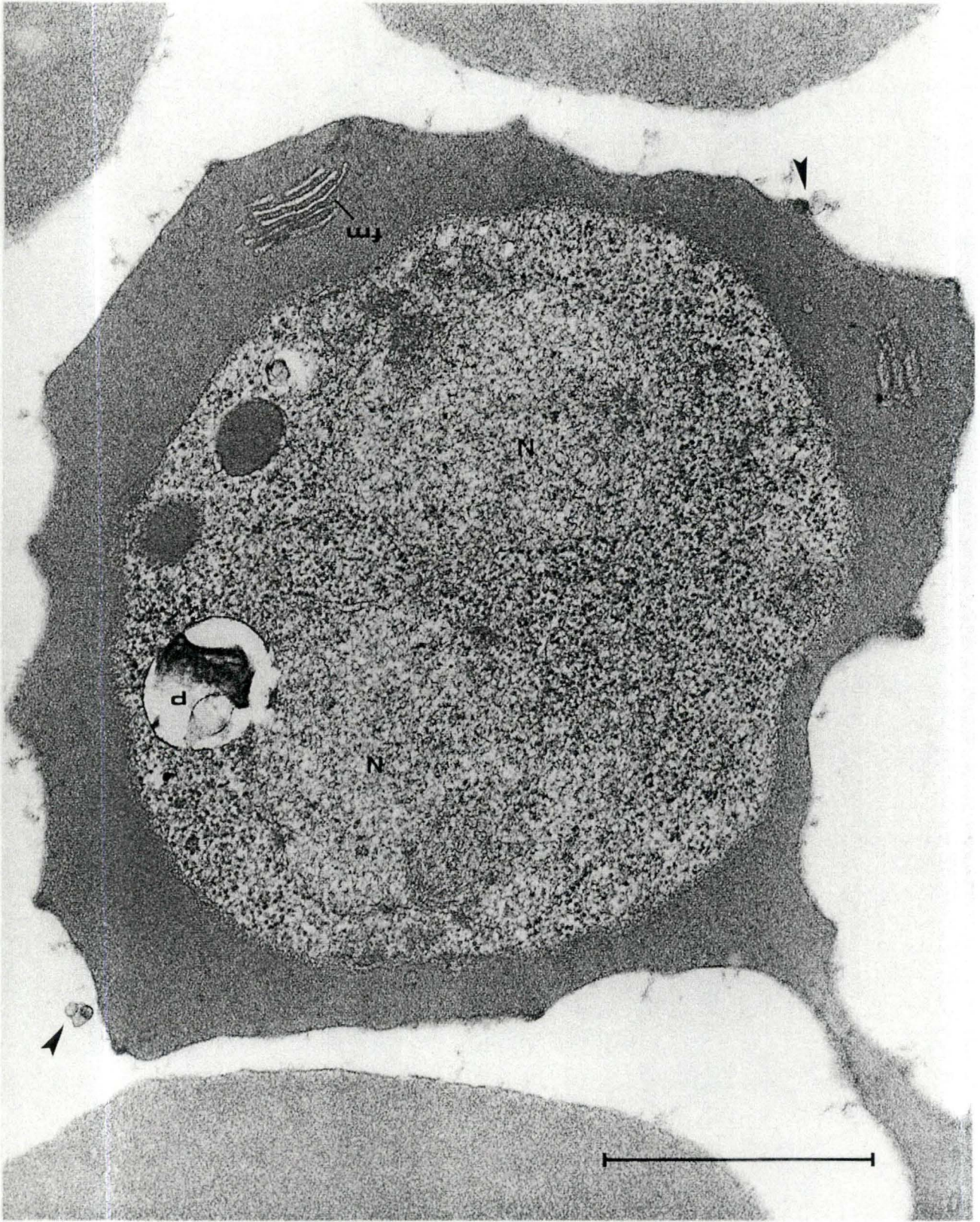


FIG. 3.2.48.

Section d'une hématie parasitée par un schizonte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- une grande vacuole renfermant du pigment (p).
- Des noyaux (N).
- Des liens, entre la membrane limitante de cette hématie et les autres globules rouges.

(G. 17750 X)

FIG. 3.2.49.

Section d'un érythrocyte parasité par un schizonte de *P. falciparum*.

Nous observons :

- Plusieurs vacuoles limitées par une double membrane (dm) dont certaines ont l'aspect d'une mitochondrie.
- Un corps multilamellaire (cm).
- Des rhoptries (rh), près des épaissements membranaires.

Dans le strome de la cellule hôte, nous remarquons des fissures de Maurer (fm), dont une qui se prolonge jusqu'à la jonction entre deux érythrocytes.

(G. 22750 X)

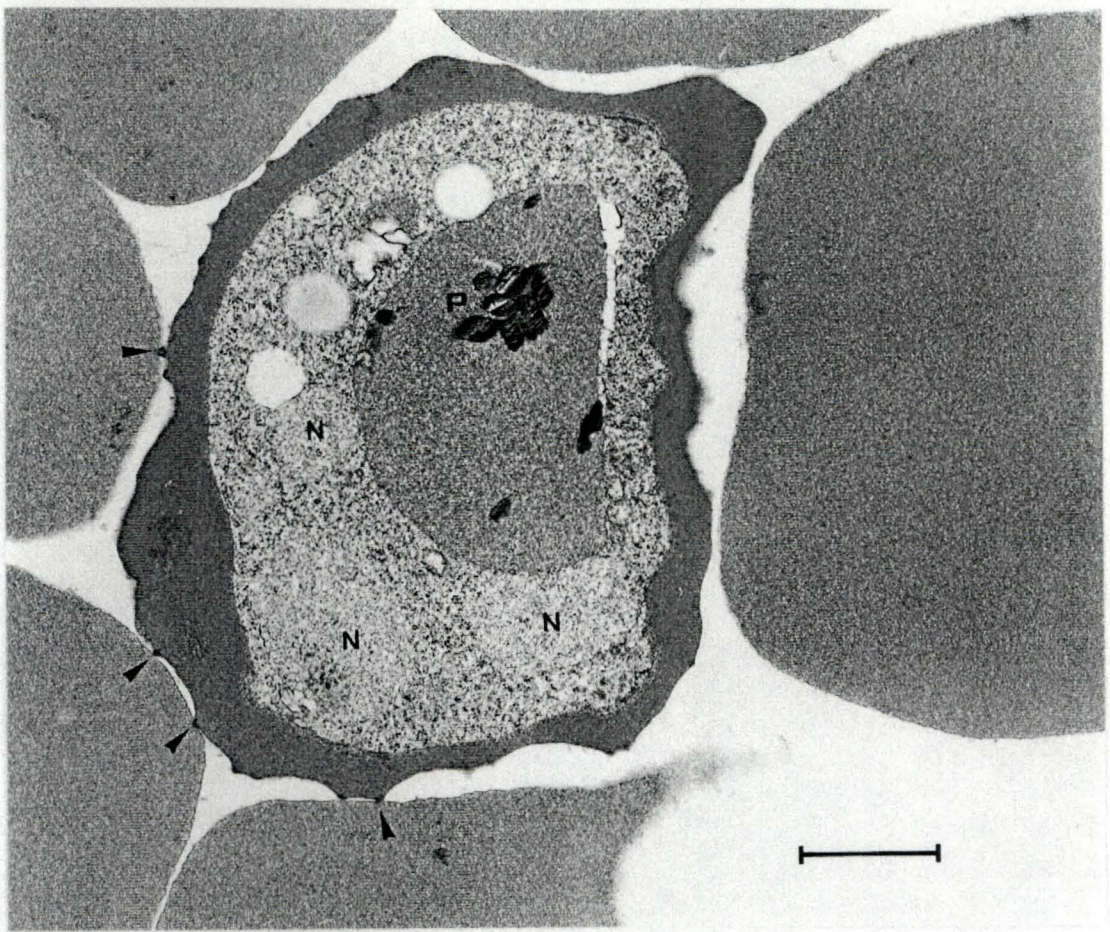


FIG. 3.2.48.

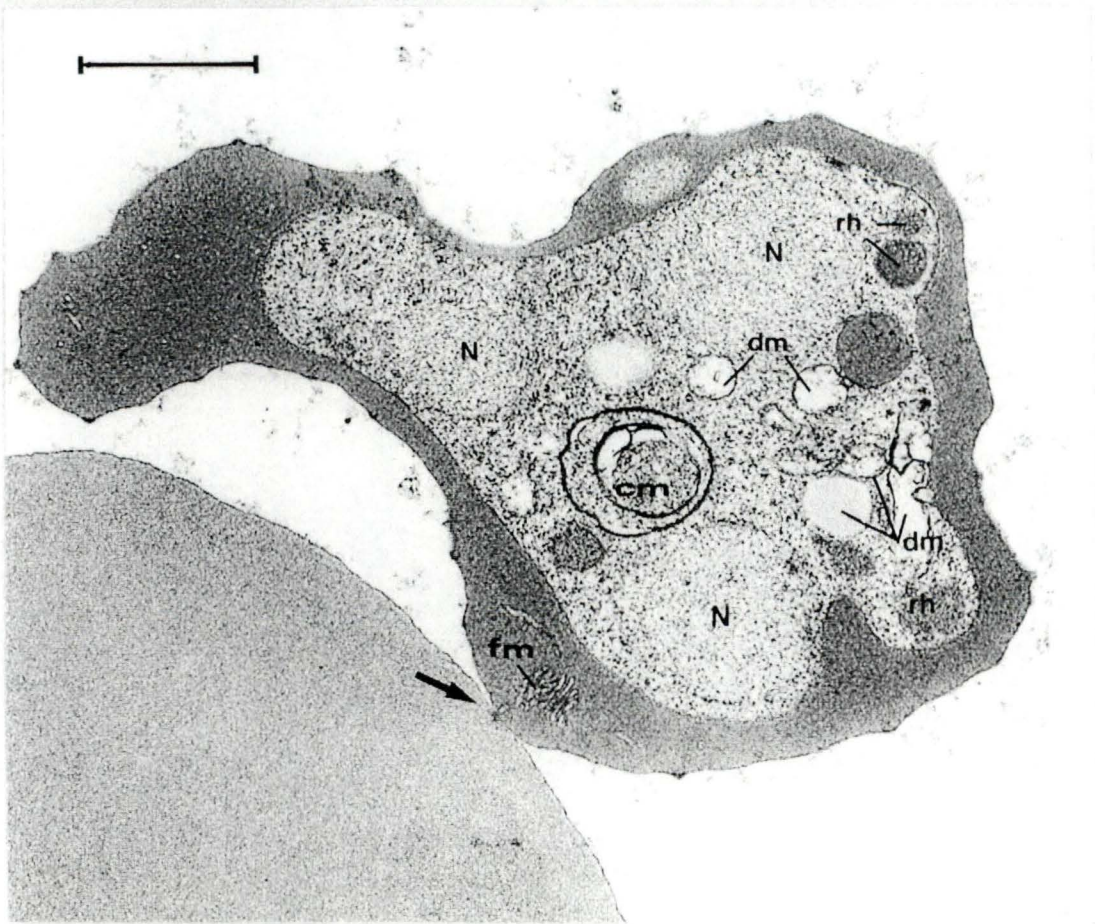


FIG. 3.2.49.

FIG. 3.2.50.

Section d'un globule rouge, parasité par un *P. falciparum*, qui subit une schizogonie.

Nous observons :

- Des rhoptries (rh), près des épaissements membranaires (flèche) situés en périphérie du parasite.
- Des noyaux (N).
- Une mitochondrie de forme allongée (Mi).

(G. 22750 X)

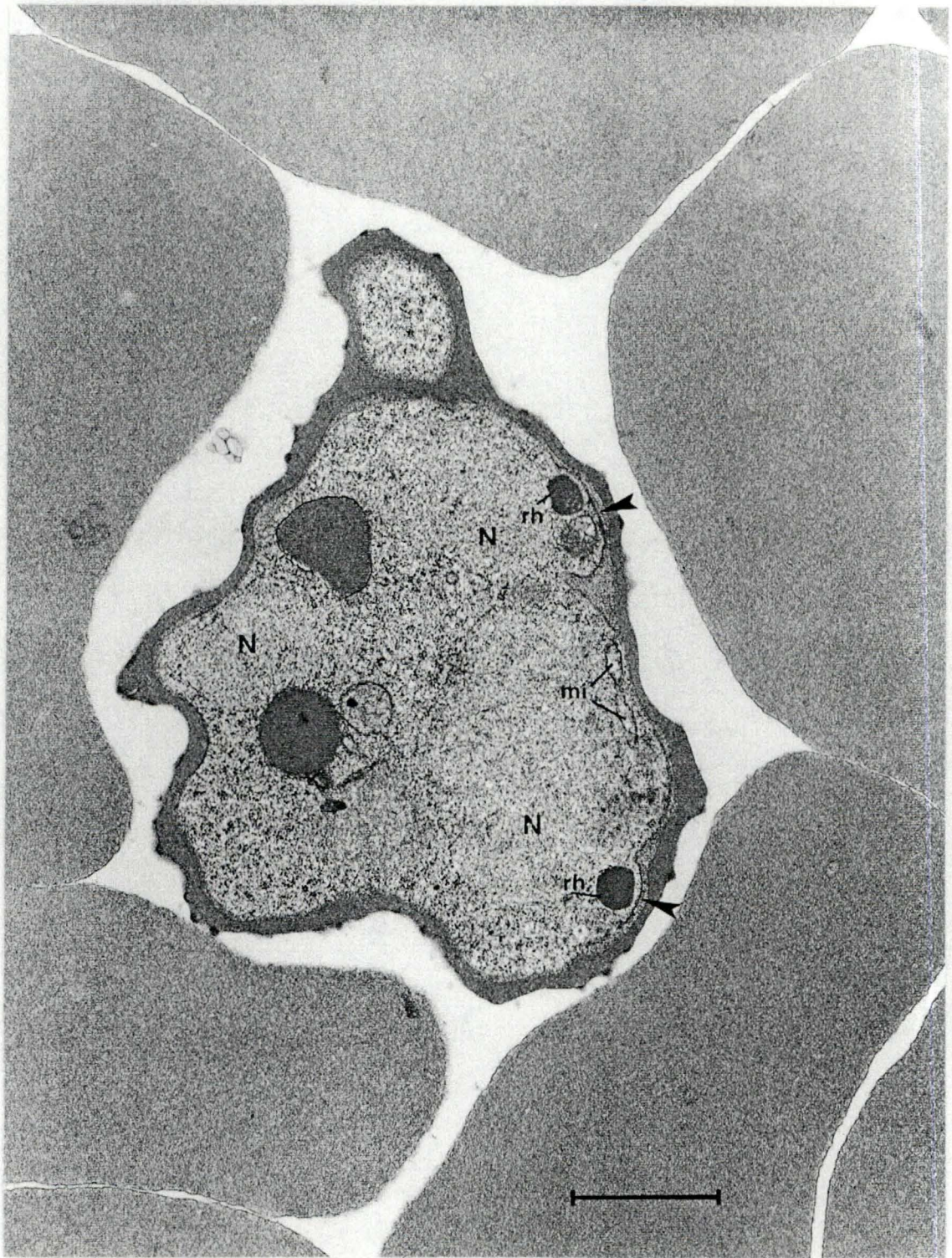


FIG. 3.2.50.

FIG. 3.2.51.

Section d'une hématie parasitée par un *P. falciparum* en voie de schizogonie.

Nous observons :

- Une vacuole renfermant du pigment (p), entourée par d'autres vacuoles limitées par une double membrane (dm).
- Des noyaux (N).

(G. 22750 X)

FIG. 3.2.52.

Section d'un globule rouge parasité par un schizonte de *P. falciparum*.

Nous observons des vacuoles limitées par une double membrane (dm) qui ressemblent aux mitochondries. Elles sont localisées près des granules de pigment (p).

(G. 22750 X)

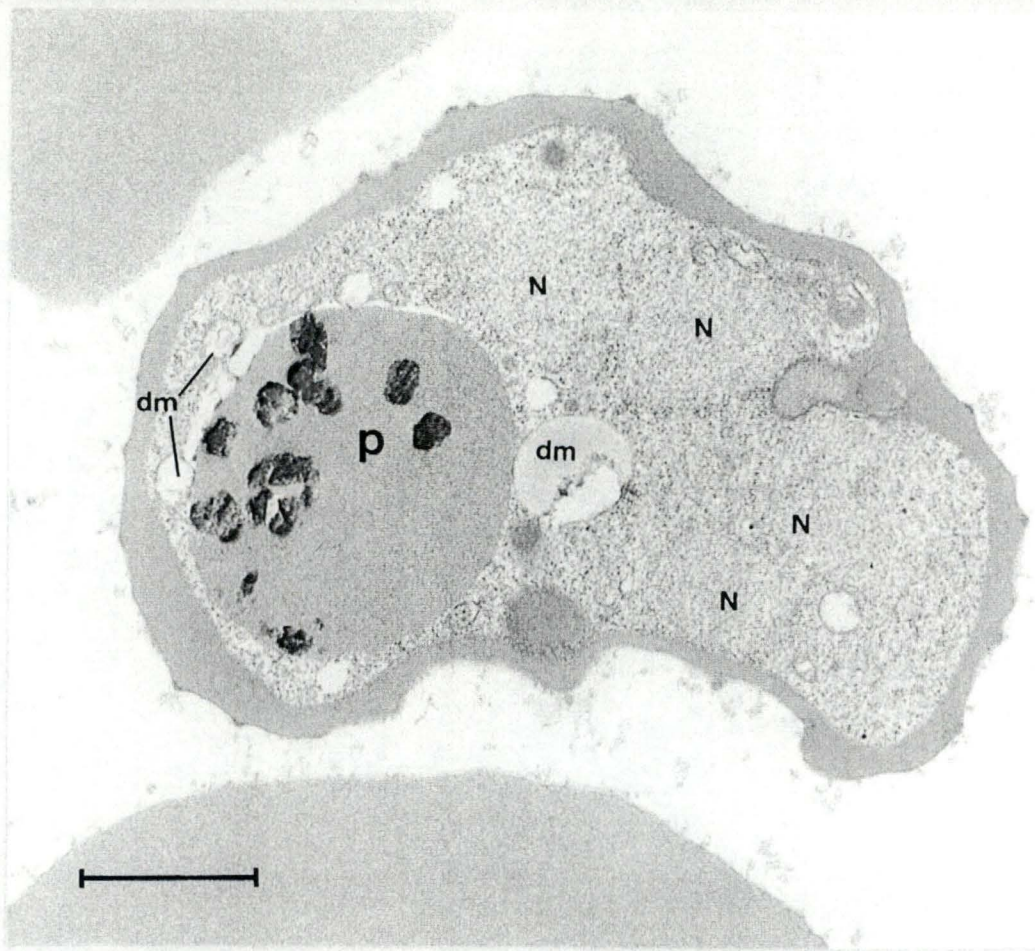


FIG. 3.2.51.

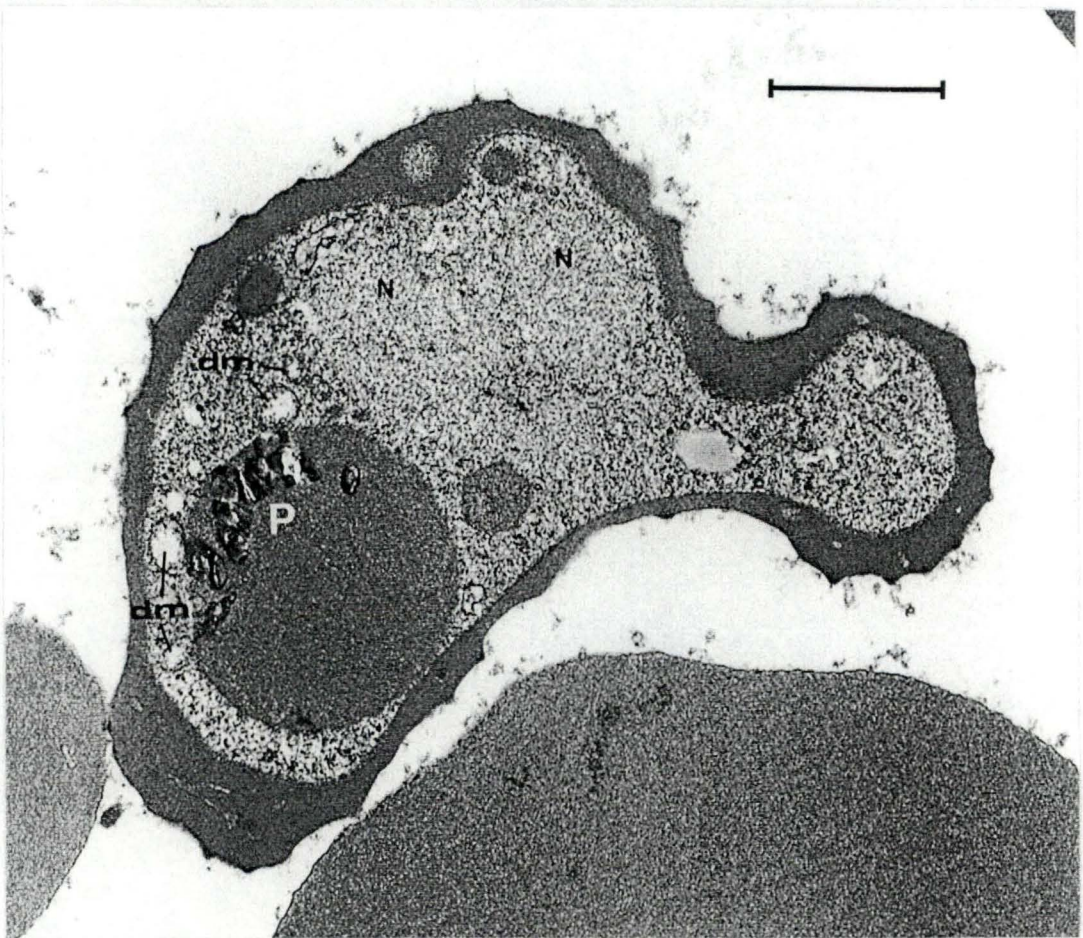


FIG. 3.2.52.

FIG. 3.2.53.

Section d'un érythrocyte parasité par un gamétocyte de *P. falciparum*.

Nous observons les vacuoles à pigment (p) et le noyau en position centrale (N).
(G. 22750 X)

FIG. 3.2.54.

Section d'un globule rouge parasité par un gamétocyte de *P. falciparum*.

Nous remarquons :

- Les vacuoles à pigment (p).
- Les microtubules (Mt) aux extrémités du parasite.
- Un corps dense (cd) en périphérie.

(G. 37500 X)

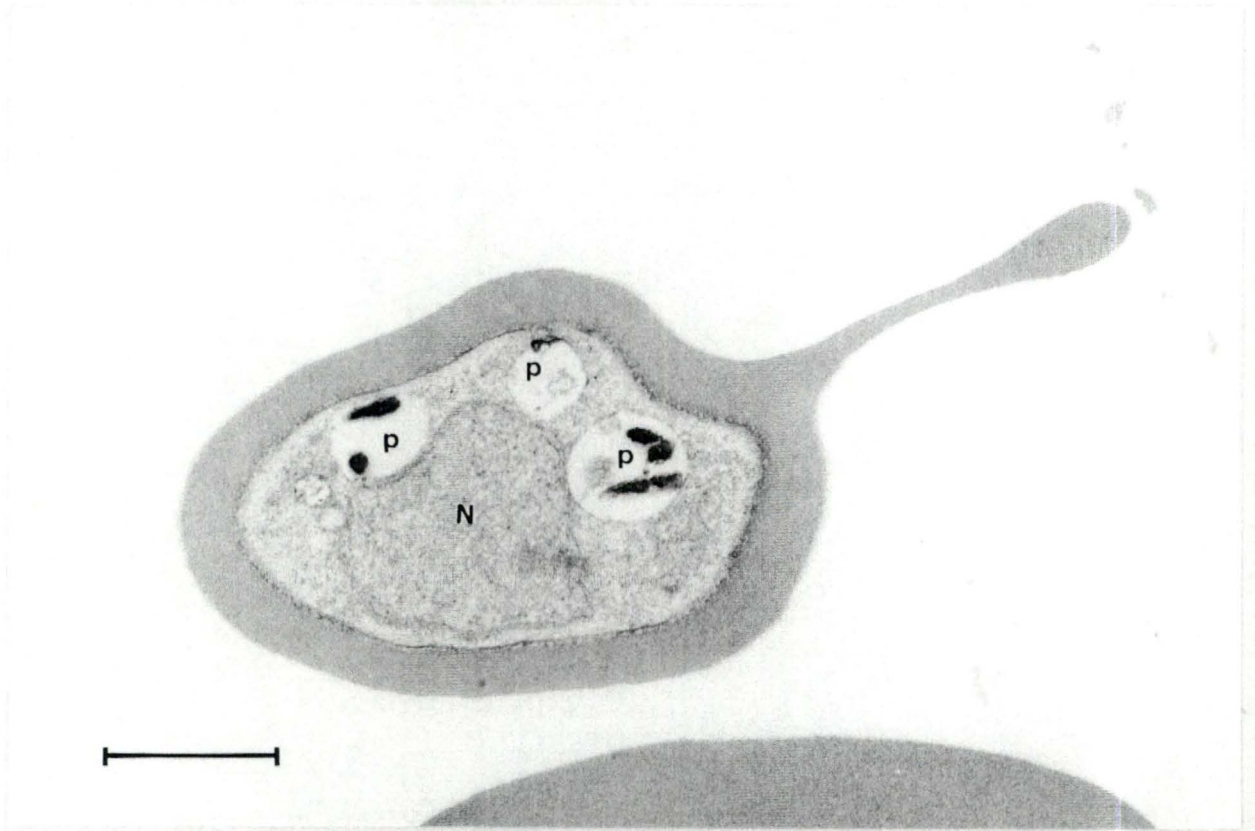


FIG. 3.2.53.

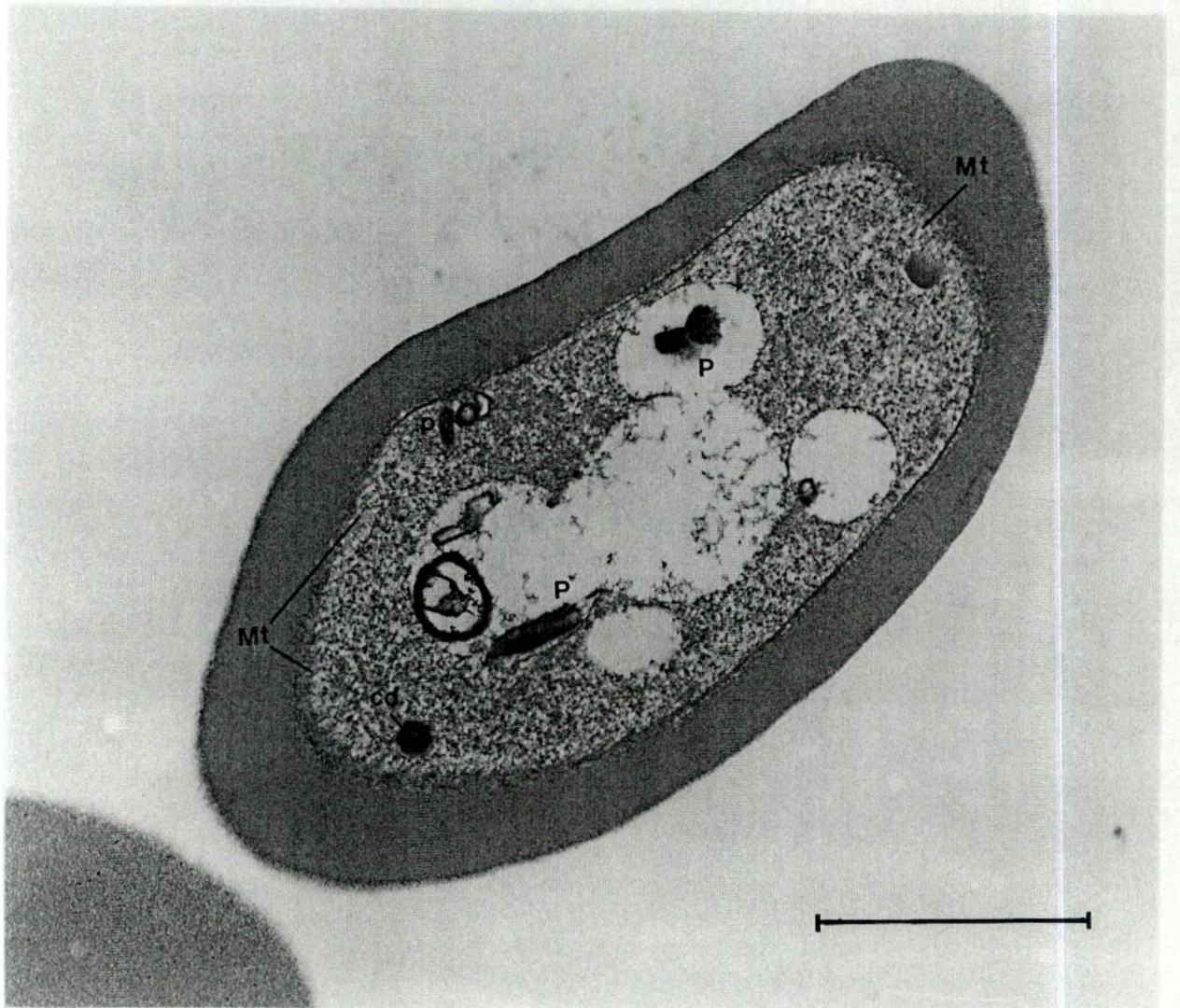


FIG. 3.2.54.

FIG. 3.2.55.

Sections d'un érythrocyte parasité par un m crogamétocyte de *P. falciparum*.

Au centre de cette forme parasitaire, nous observons des mitochondries (Mi) et deux corps denses aux électrons (cd).

Nous remarquons des vacuoles à pigment (p) et des microtubules (Mt).

Noter les invaginations de la membrane limitant l'érythrocyte (flèche).

(G. 14250 X)

FIG. 3.2.55.

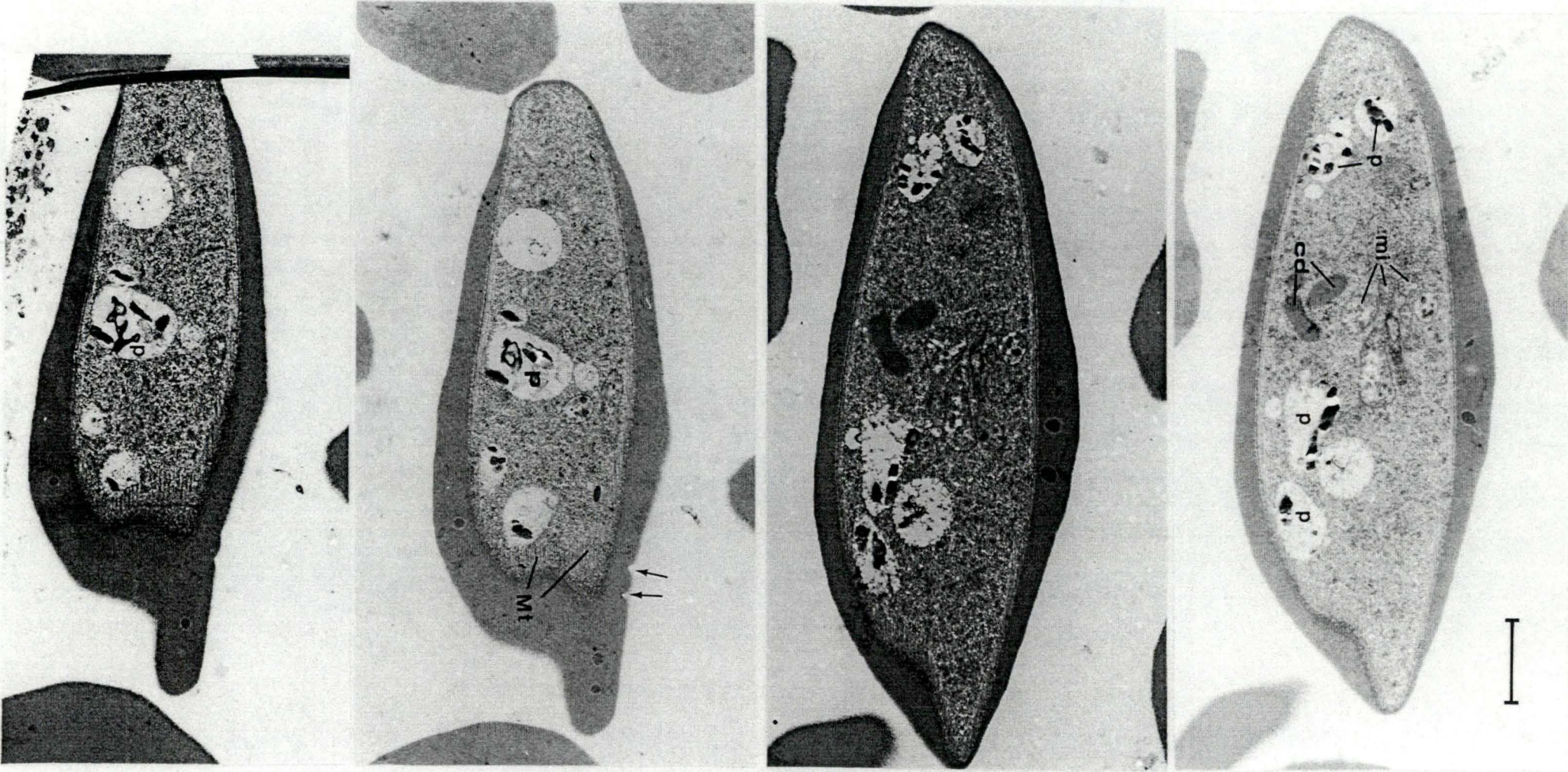


FIG. 3.2.56.

Nous observons le complexe entourant le m crogamétocyte.

Il est formé de la membrane de la vacuole parasitophore (vp), d'un espace inter-membranaire (es) et d'une pellicule.

Cette dernière est composée d'une membrane plasmique externe (mpe) et d'une paire de membranes unitaires intimement accolées (mu).

Nous remarquons :

- Des mitochondries (Mi).
- Des vacuoles à pigment (p).
- Des corps denses (cd), limités par une double membrane.
- Des microtubules (Mt) situés le long de la membrane limitant le parasite.

(G. 37500 X)

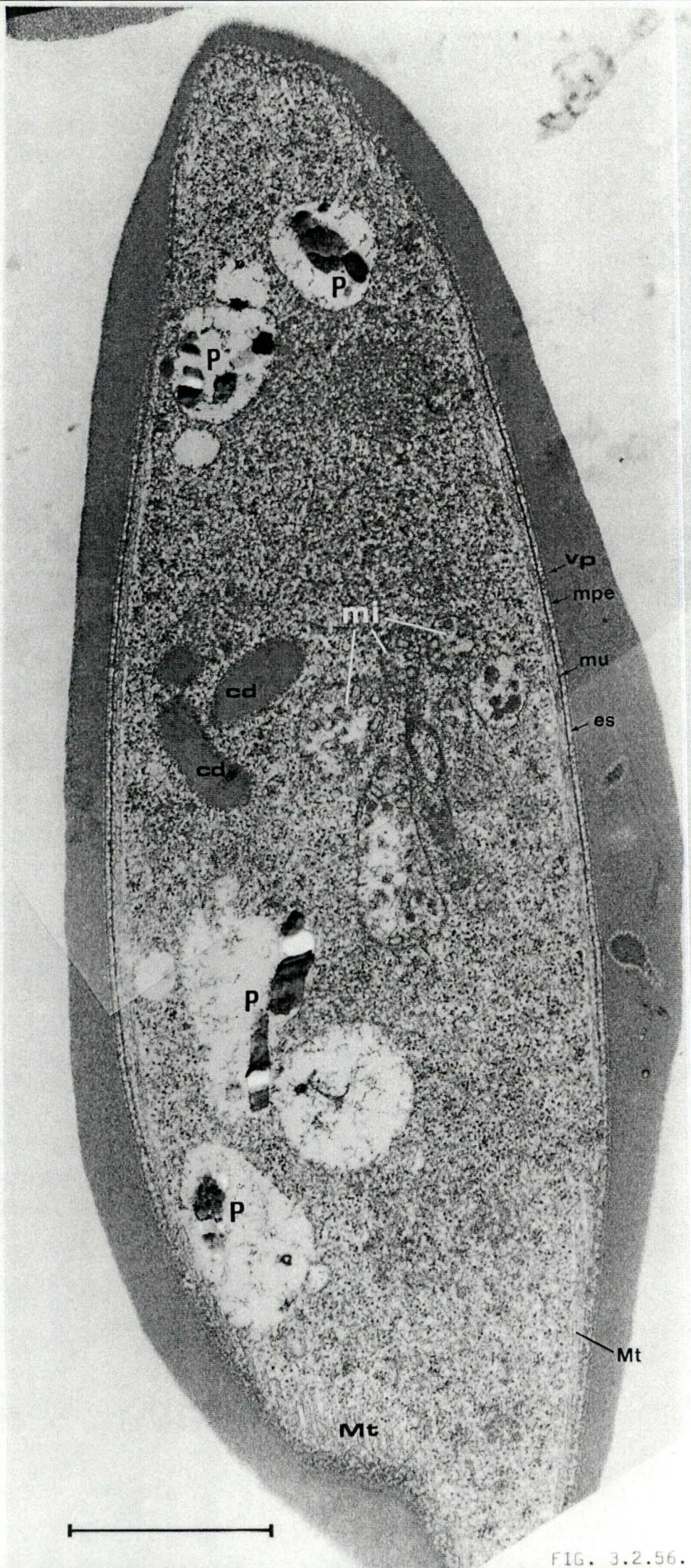


FIG. 3.2.56.

FIG. 3.2.57.

Nous observons :

- Des vacuoles à pigment (p).
- Des mitochondries (Mi) situées au centre du parasite. Leur membrane interne présente des projections digitées ou des microvillosités.
- Deux corps denses aux électrons (cd).
- Des microtubules (Mt) le long de la membrane limitant le parasite.
- un pore dans la pellicule entourant le gamétocyte (flèche).
(Des microtubules (Mt) convergent vers cet endroit.)

Noter les fissures de Maurer (fm) dans le stroma érythrocytaire.

(G. 27500 X)

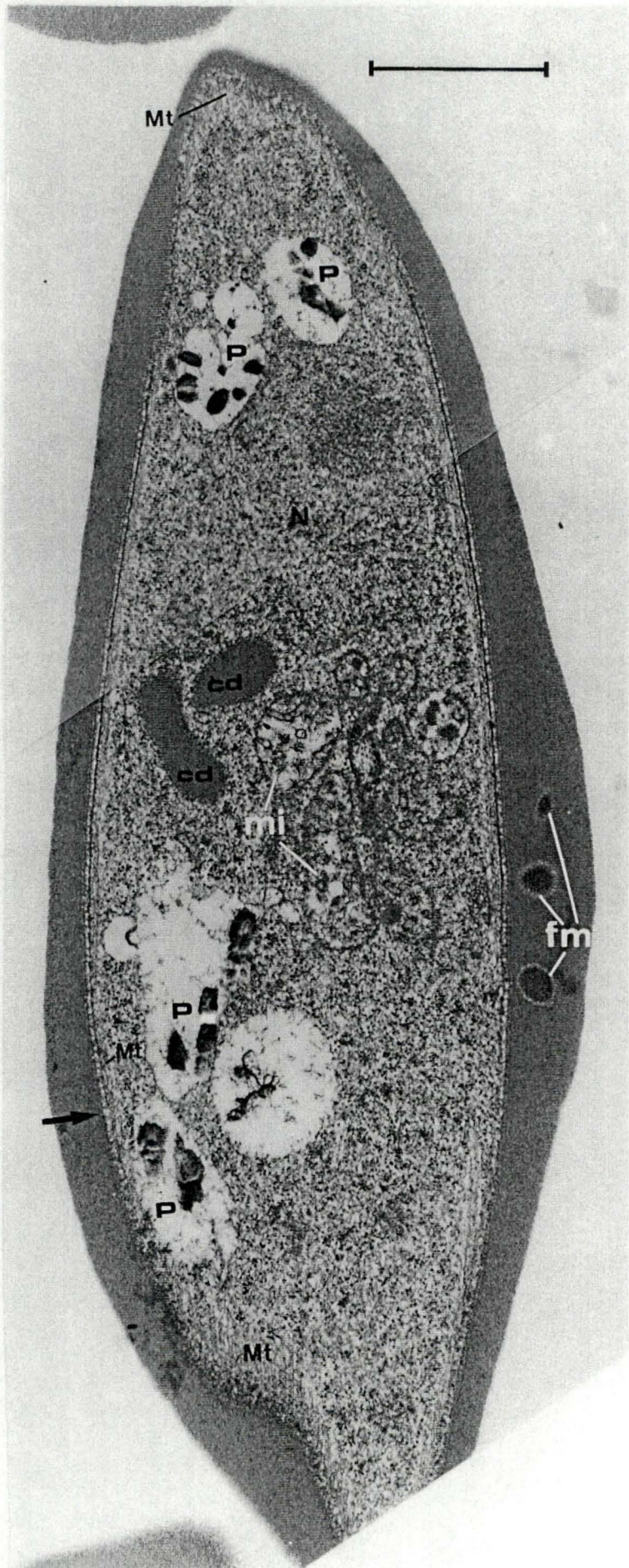


FIG. 3.2.57.

FIG.3.2.58.

Nous observons : des vacuoles à pigment (p), des mitochondries (Mi), des microtubules (Mt), et des corps denses aux électrons (cd).

Noter les dépressions de la membrane limitant la cellule hôte (flèche) et les fissures de Maurer (fm) dans le cytoplasme érythrocytaire.

(G. 27500 X)

FIG. 3.2.58 A.

Nous observons : un corps dense aux électrons (cd) et des microtubules (Mt) en coupe transversale et longitudinale.

Noter la dépression (flèche) en regard d'une vacuole renfermant du pigment.

(G. 27500 X)

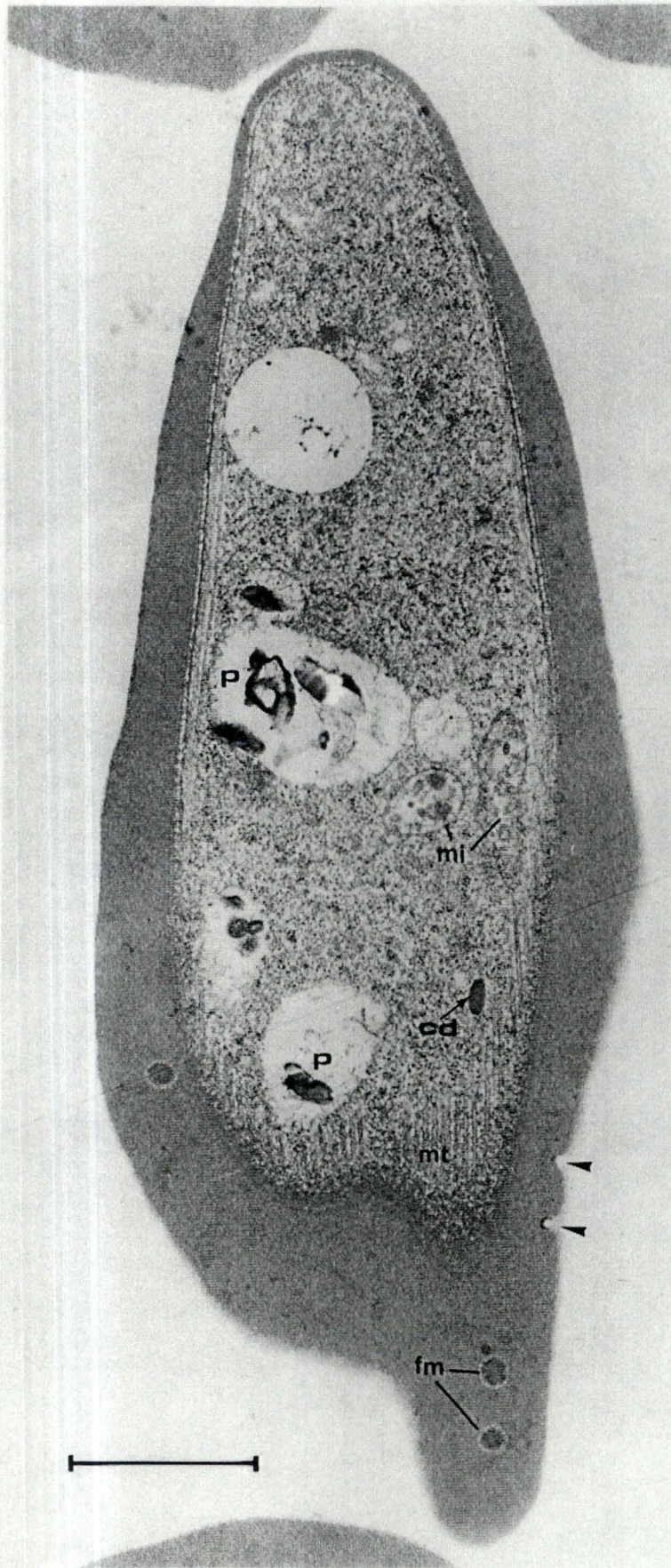


FIG. 3.2.58.

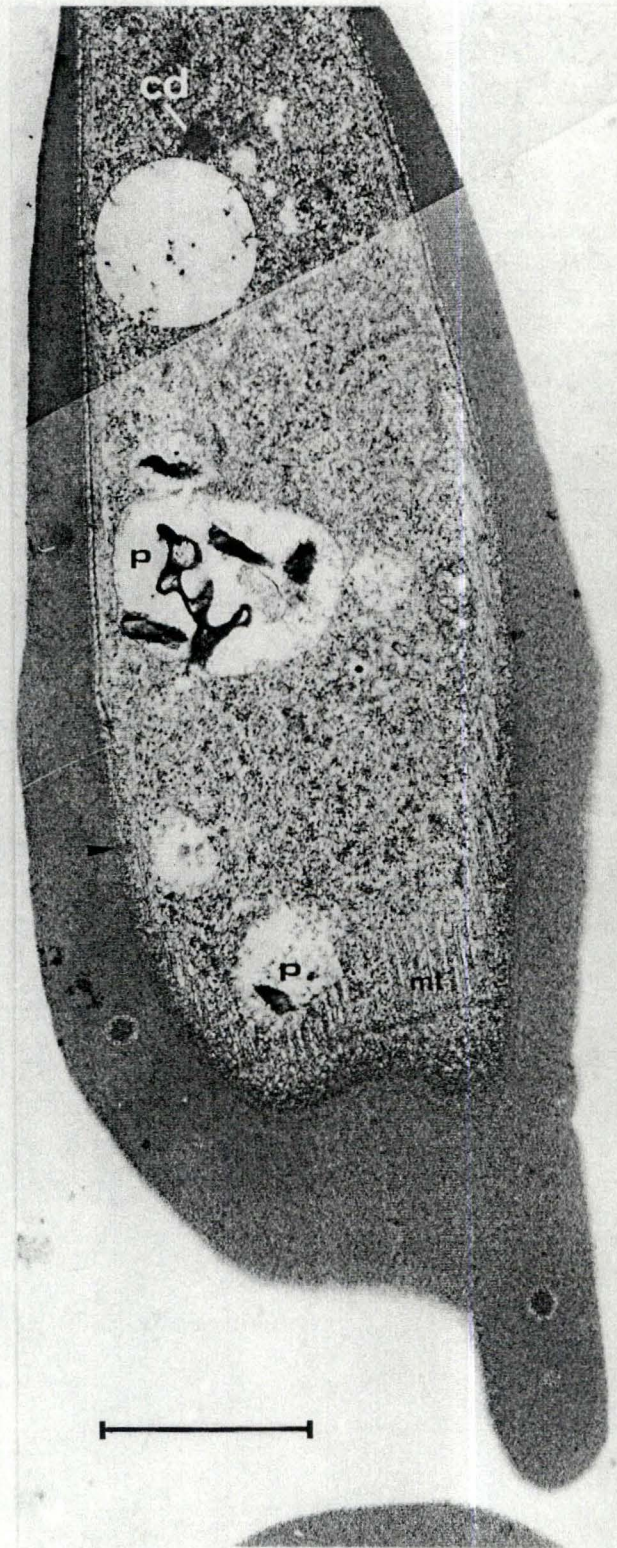


FIG. 3.2.58A.

BIBLIOGRAPHIE.

AIKAWA.M.,(1966).

The fine structures of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites, Plasmodium fallax , P.lophurae and P.cathemerium.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 449-471.

AIKAWA.M., COOK. J., SAKODA. J. et SPRINZ. H.(1966).

Fine structure of erythrocytic stages of Plasmodium knowlesi; a comparaisn between intracellular and free forms.

Z + Schr. Zellforsch., 100, 271-284.

AIKAWA. M., HEPLER. P. K., HUFF. C. G., et SPRINZ. H. (1966)

J. Cell. Biol., 28, 355.

AIKAWA. M., HUFF. C. G., et SPRINZ. H. (1966)

Milit. Med., 131, Suppl., 969.

AIKAWA. M., and JORDAN. H. (1968)

Fine structure of reptilian malarial parasites.

J. Parasitol. 54, 1023-1033.

AIKAWA. M., HUFF. C. G. and SPRINZ. H.(1969)

Comparative fine structure study of the gametocytes of avian, reptilian and mammalian malarial parasites.

J. Ultrastruct. Res. 26. 316-331.

AIKAWA. M. (1971)

Parasitological Review.

Plasmodium: The fine structure of malarial parasites.

Exp. Parasit, 30, 284-320.

AIKAWA, M. (1972)

Parasitological review. Plasmodium: The fine structure of malarial parasites.

Ex. Parasitol. 30, 284-320.

AIKAWA. M. RABBEGE. R. J. WELLDE. B. T. (1972)

Junctional Apparatus in erythrocytes infected with malarial parasites.

Z. Zellforsch., 124, 72-75.

- AIKAWA (M.), (1977)
Variation in structure and function during the life cycle of malarial parasite.
Bull. W. H. O., 55, 139-156.
- AIKAWA. M. MILLER. L. H., JOHNSON. J., RABBEGE. J. (1978)
Erythrocyte entry by malarial parasites.
A moving junction between erythrocyte and parasite.
J. Cell. Biol. 77, 72-82.
- AIKAWA. M., MILLER. L. H., RABBEGE. J. R., et EPSTEIN. N. (1981)
Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion.
J. Cell. Biol., 95, 55-62.
- AIKAWA. M., RABBEGE. J. R., UDEINYA. I., et MILLER. L. H. (1983)
Electron microscopy of knobs in P. falciparum-infected erythrocytes.
J. Parasitol., 62, 435-437.
- AIKAWA. M., UDEINYA. I. J., RABBEGE. J., DAYAN. M., LEECH. J. H., HOWARD. R. J., and MILLER. L. H. (1985)
Structural Alteration of the Membrane of Erythrocytes Infected with Plasmodium falciparum.
J. Protozool., 32(3), 424-429.
- AIKAWA. M., UNI. Y., ANDRUTIS. A. T., and HOWARD. R. J. (1986)
Membrane- Associated electron-dense material of the asexual stages of Plasmodium falciparum: evidence for movement from the intracellular parasite to the erythrocyte membrane.
Am. j. Trop. Med. Hyg., 35 (1), 30-36
- ARNOLD. J. D., BALCERZAK, and MARTIN. D. C. (1969)
Studies on the red cell-parasite relationship.
Mil. Med. Spe. Iss., 962-971.
- ATKINSON. C. T., AIKAWA. M., ROCK. E. P., MARSH. K., ANDRYSIAK. P. M., CAMPBELL. G. H., COLLINS. W.E., and HOWARD . R. J. (&clè)
Ultrastructure of the erythrocytic stages of Plasmodium malariae.
J. Protozool., 34 (3), 267-274.
- BAKER. J. R. (1970)
Fine structure of Plasmodium in relation to locomotion.
Proceedings of the IInd International Congress of Parasitology
Washington, D. C., 16.

- BALCERZAK S. P., ARNOLD. J. D., MARTIN. D. C. (1972)
Anatomy of red cell damage by Plasmodium falciparum in man.
Blood,40, 98-104.
- BALL. E. G., McKEE. R. W., ANFINSEN. C. B., CRUZ. W. O., and GEIMAN. Q. M. (1948)
Studies on malarial parasites. IX. Chemical and metabolic changes during growth and multiplication in vivo and in vitro.
J. Biol. Chem., 175, 547-571.
- BASS. C. C., and JOHNS. F. M. (1912)
The cultivation of malarial plasmodia (Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum) in vitro.
J. Exp. Med., 16, 567-579.
- BRUMPT. E. (1897)
Précis de parasitologie.
Collect. de Pre. Med, 1, 424-525.
- CHARET. P., SLOMIANNY. C., PRENSIER. G., MOREAU. S. (1984)
Plasmodium sp. et dégradation de l'Hémoglobine.
Mécanisme et relations avec les antimalariques.
Ann. Biol. 23, 32-60.
- DVORAK. J. A., MILLER, L. H., W. C., and SHIROISHI.T.(1975)
Invasion of erythrocytes by malarial merozoites .
Science 187, 748-750
- FAWCETT. D. W.(1966)
The Cell, Its Organelles and Inclusions.
W. B. Saunders Co, Philadelphia.
- FOGEL. B. J., SHIELDS. C. E., and von DOENHOFF. A. E., Jr., (1966)
The osmotic fragility of erythrocytes in experimental malaria.
Amer. J. Trop. Med., 15, 269-275.
- FULTON. J. D., et FLEWETT. T. H. (1956)
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 50, 150.
- GARNHAM. P. C. C., BIRD. R. G., BAKER. J. R., and BRAY. R. S. (1961)
Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites.
II. The fine structure of the sporozoïte of Laverania (Plasmodium) falciparum.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 55, 98-102.

GARNHAM. P. C. C., BIRD. R. G., and BAKER. J. R. (1963)
Electron microscope studies of motile stages of malarial
parasites. IV. The fine structure of sporozoite of four species of
Plasmodium.
Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg., 61, 58-68., and , 57, 27-31.

GARNHAM. P. C. C., BIRDG. R. G. BAKER. J. R. KILLICK-KENDRICK (1969)
Electron microscope studies on the motile stage of malaria parasite
VII. The fine structure of the merozoites of exocrythrocytic
schizonts of Plasmodium Berghei yoelii.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 63, 328-332.

GEIMAN. Q. M. and M. J. MEAGHER. (1967)
Susceptibility of a new world monkey to Plasmodium falciparum
from man.
Nature., 215, 437-439.

GEORGE. J. N., STOKES. E. F., WICKER. D. J., and CONRAD. M. E. (1966)
Studies of the mechanism of hemolysis in experimental malaria.
Mil. Med., 131, 1217.

GRAMMICIA. G. (1947)
R. C. Ist. Sup. Sanita., 10, 419.

GYANG F. N., POOLE B., TRAGER W. , (1982).
Peptidases from P. falciparum cultured in vitro.
Molec. Biochem. Parasit., 5, 263-273.

HADLEY. T. J., LEECH. J. H., GREEN. T. J., DANIEL. W. A., WAHLGREN. M.,
MILLER. L. H., and HOWARD. R. J. (1983)
Plasmodium falciparum : A comparison of knobby (K+) and knobless
(K-) parasites of two strains.
Mol. Biochem. Parasitol., 9, 271-278.

HAYNES. J. D. et AL. (1976)
Culture of human malaria parasites ; Plasmodium falciparum.
Nature. 263, 767-769.

HICKMAN. R. L. (1969)
The use of subhuman primates for experimental studies of human
malaria.
Mil. Med. 134, 741-756.

HOMEWOOD. C. A., JEWSBURY. J. M., and CHANCE. M. L. (1972)
The pigment formed during haemoglobin digestion by malarial and schistosomal parasites.
Comp. Biochem. Physiol., 43B, 517-523.

HOMEWOOD. C. A., MOORE. G. A., WARHURST. D. C., and ATKINSON. E. M. (1975)
Purification and some properties of malarial pigment.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 69, 283-287.

HOMMEL. M. , DAVID. P. H., and OLIGINO. L. D. (1983)
Surface alterations of erythrocytes in Plasmodium falciparum malaria.
J. Exp. Med., 157, 1137-1148.

HOWARD. R. J. (1982)
Alterations in the surface membrane of red cells during malaria.
Immunol. Rev., 61, 67-107.

HOWELLS. R. E., PETERS. W., and THOMAS. E. A. (1968)
Host-parasite relationships. Part 3: the relationship between haemozoin formation and the age of the host cell.
Ann. Trop. Med. Parasit., 62, 267-270.

HOWELLS. R. E. (1975)
Host Parasite Relationships in malaria.
Bull. WLD. HLTH. ORG., 9, 1-8.

HUFF. C. G., (1947)
Life cycle of malaria parasites.
Ann. Rev. Microbiol., 1, 43-60

JADIN. J. M., CREEMERS. J., LE RAY. D., (1968)
Ultrastructure et biologie de Plasmodium vinckei, Rodhain 1952.
1. L'absorption et la digestion de l'hémoglobine chez les trophozoïtes.
Ann. Soc. Belge. Méd. Trop. 48, 497-502.

JAMES . B. and TRAGER. W. (1977)
Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method.
Jour. of parasit., 63, 883-886.

JAMES. B. and TRAGER. W. (1978)
Some recent advances in the cultivation of Plasmodium falciparum
Isr. Jour. of Med. Sciences., 14, 563-570.

- JENSEN. J. B. (1976)
Human malaria parasites in continuous culture.
Science., 193, 674-675.
- KARNOVSKY. M. J. (1961)
Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 11, 729-32.
- KASS. L. et AL.(1971)
Plasmodium falciparum gametocytes.
Electron microscopic observations on material obtained by a new method.
American journal of tropical medicine and hygiene,20, 187-194.
- KIKUTH. W., (1935)
L'immunologie expérimentale et la chimiothérapie du paludisme.
Riv. Malar.,Suppl. 14, N° 6, 71-80.
- KILEJIAN. A., ABATI. A., and TRAGER. W. (1977)
Plasmodium falciparum and Plasmodium coatneyi: Immunogenicity of "knob-like protrusions" on infected erythrocyte membrane.
Exp. Parasitol., 42, 157-164.
- KILEJIAN. A., and JENSEN. J. B. (1977)
A histidine-rich protein from Plasmodium falciparum and its interaction with membrane.
Bull. W. H. O., 55, 191-198.
- KILEJIAN. A. (1979)
Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4650-4653.
- KUTNER. S., GINSBURG. H., and CABANTCHIK. Z.I. (1983)
Permeability changes in malaria (Plasmodium falciparum) infected red blood cell membranes.
J. Cell. Physiol., 114, 245-251.
- LADDA. R., ARNOLD. J., and MARTIN. D. (1966)
Electron microscopy of P. falciparum.
The structure of trophozoites in erythrocytes of human volunteers.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 369.

LADDA. R. L. (1969)

New insights into the fine structure of rodent malaria parasites.
Mil. Med. ,134, 825-864.

LANGRETH. S. G., and TRAGER. W. (1973)

Fine structure of the malaria parasite. Plasmodium lophurae
developing extracellularly in vivo.
J. Protozool., 20, 606-613.

LANGRETH. S. G.(1977)

Electron microscope cytochemistry of host-parasite membrane
interactions in malaria.
Bull. O. M. S., 55 (2-3): 171-178.

LANGRETH. S. G., JENSEN. J. B., REESE. R. T., and TRAGER. W. (1978)

Fine structure of human malaria in vitro.
J Protozool., 25, 443-452.

LANGRETH. S. G., and REESE. R. T. (1979)

Antigenicity of the infected erythrocyte and merozoite surface in P.
falciparum malaria.
J; Exp. Med., 150, 1241-1254.

LEECH. J. H., BARNWELL. J. W., MILLER. L. H., and HOWARS. R. J. (1984)

Identification of a strain-specific malarial antigen on the surface of
Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.
J. Exp. Med., 159, 1567-1575.

LEWIS. S. M., DANON. D., et MARIKOVSKY. Y. (1965)

Brit. J. Haemat., 11, 689.

MARTIN. D. C., and ARNOLD. J. D. (1965)

Studies on East African strain of Plasmodium falciparum.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 331-339.

MERYMAN. H. T., and HORNBLOWER. M. (1972)

A method for freezing and washing red blood cells using a high
glycerol concentration.
Transfusion., 12, 145-156.

MILLER. L. H.(1969)

Distribution of mature trophozoites and schizonts of Plasmodium
falciparum in the organs of Aotus trivirgatus, the night monkey.
Am. J. Trop. Med. & Hyg., 18, 860-865.

MILLER. L. H. (1977)

Evidence for differences in erythrocyte surface receptors for the malarial parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium knowlesi.

J. Exp. Med., 146, 277-281.

MILLER. L. H., AIKAWA. M., JOHNSON. J., and SHIROISHI. T.(1978)

Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and red cells: Attachment and junction formation.

J. Exp. Med. 149, 172-184.

PALADE. G. E. (1955)

A small particulate component of the cytoplasm.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1, 59-68.

PALADE. G. E. (1956)

The endoplasmic reticulum.

J. Biochem. Cytol., 2 (Suppl.), 85-98.

PORCHET-HENNERE E. et VIVIER E.,(1971).

Ultrastructure comparée des germes infectieux (sporozoïtes, mérozoïtes, schizozoïtes, endozoïtes) chez les sporozoaires.

Ann. Biol., 10, 77-113.

PORTER. K. R., et BLUM. J. (1953)

A study in microtomy for electron microscopy.

Anat. Rec., 117, 685-712.

ROWE. A. W., EYSTER. E., and KELLNER. A. (1968)

Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion.

Cryobiology., 5, 119-128.

RUDZINSKA .M. A. and TRAGER. W.(1957)

Intracellular phagotrophy by malarial parasites : An electron microscope study of P. lophurae.

J. Protozool. 4, 190-199.

RUDZINSKA. M. A., et TRAGER. W. (1959)

J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 103.

RUDZINSKA. M. A., et TRAGER. W. (1959)

Etude des parasites du Paludisme au microscope électronique.

Triangle., 4, 104.

RUDZINSKA. M. A., BRAY. R. S., et TRAGER. W. (1960)
Intercellular phagotrophy in Plasmodium falciparum and Plasmodium gonderi.

J. Protozool., 7, (Suppl.), 24-5.

RUDZINSKA. M., TRAGER. W., and BRAY. R. S. (1965)
Pinocytotic uptake and the digestion of hemoglobin in malaria parasites.

J. Protozool, 12 (4), 563-576.

RUDZINSKA. M. A. (1969)

The fine structure of malaria parasites.

Int. Rev. Cytol., 25, 161

SCHOLTISECK. E., et MEHLHORN. H. (1970)

Ultrastructure study of characteristic organelles(paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms.

Z. Parasitenk,34, 97-127.

SEED. T. M., AIKAWA. M., and STERLING. C.R. (1973)

An electron microscope-cytochemical method for differentiating membranes of hony red cells and malaria parasites.

J. Protozool., 20, 603-605.

SHEN. S. C., FLEMMING. E. M., and CASTLE. W. B. (1946)

Osmotic and mechanical fragilities of erythrocytes of monkeys infected with P. knowlesi malaria.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 63, 419-422.

SIDDIQUI. W. A., J. V. SCHNELL, and Q. M. GEIMAN .(1970)

In vitro cultivation of Plasmodium falciparum .

Am. J. Trop. Med. & Hyg.,19, 586-591.

SIDDIQUI. W. A. (1977)

An immunization of experimental monkeys against a human malaria parasite, Plasmodium falciparum.

Science., 197, 388-389.

SINTON. J. A. (1922)

The situation of the malarial parasite in relation to the red blood corpuscle.

Indian. Med. Gaz., 57, 367.

STANLEY.P., BALCERZAK. J. D.A. and MARTIN . D. C.(1972)

Anatomy of red cell damage by Plasmodium falciparum in man.

Blood., 40, 98-104.

STERLINGCK, AIKAWA, NUSSENZWEIG. (1972)

Morphologie divergence in mammalian malarial parasite; The fine structure of Plasmodium brasilianum.

The Helminthological society of Washington, 39, 109-129.

TRAGER.W. (1964)

The cytoplasm of protozoa, in Brachet, J. et Mirsky. A. E. (eds.).

The Cell VI, Academic Press, New York., 81-137.

TRAGER W., RUDZINSKA M. A. et BRADBURY P. C.; (1966).

The fine structure of Plasmodium falciparum and its host erythrocytes in natural malarial in man.

Bull. W. H. O., 35, 883-885.

TRAGER. W. (1966)

Milit. Med., 131, Suppl., 1009.

TRAGER. W. et JENSEN. J. B.(1976)

Human malaria parasites in continuous culture.

Science, 193, 673-675.

UDEINYA. I. J., SCHMIDT. J. A., AIKAWA. M., MILLER. L. H., and GREEN. I. (1981)

Falciparum malaria infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells.

Science., 213, 555-557.

VIVIER. E., DEVAUCHELLE. G., PETITPREZ.A., PORCHET. E.,

PRENSIER. G., SCHREVEL. J., et VINCKIER. D. (1970)

Observations de cytologie comparée chez les sporozoaires .

I. Les structures superficielles chez les formes végétatives.

Protistologica, 6, 127-147.

VIVIER. E. et PETITPREZ. A. (1972)

Etude du système vacuolaire de l'hématozoaire Anthemiosoma garnhami à l'aide de coupes sériées et de reconstitutions tridimensionnelles.

J. Ultrastruct. Res., 41, 219-237.

VIVIER . E. (1979)

Données nouvelles sur les sporozoaires : cytologie-cycles systématiques

Bull. de la Soc.Zool. de France., 104 (4), 345-381.

WERY. M. (1983)
Notes de protozoologie médicale.
Ed. J. Goemaere. Bruxelles., 141-188.