

Cycle exoérythrocytaire asexué des plasmodiums humains : une découverte laborieuse

Characterisation of the exoerythrocytic stage of the asexual cycle of the human plasmodia: a painstaking process

J.F. Pays

Reçu le 29 avril 2010 ; accepté le 21 mai 2010
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2010

Résumé L'auteur relate l'histoire de la découverte laborieuse du cycle exoérythrocytaire asexué des plasmodiums inféodés à l'homme en rappelant combien la déférence vis-à-vis de l'*establishment* scientifique du moment et une certaine timidité dans la contestation et la critique peuvent être préjudiciables aux avancées de la connaissance.

Mots clés Paludisme · Plasmodium · Cycle asexué exoérythrocytaire · Paludisme aviaire · Malariathérapie · Hypnozoïte · Schizogonie intrahépatique · Rechute tardive · Reviviscence · Histoire de science

Abstract The difficulties encountered in the discovery of the exoerythrocytic stage of the asexual cycle of the human plasmodia are described. These illustrate how deference towards scientific orthodoxy and a degree of reluctance to question and to criticise can delay advances in knowledge.

Keywords Malaria · Plasmodium · Exoerythrocytic stage of asexual cycle · Avian malaria · Antimalarial therapy · Hypnozoite · Intrahepatic schizogony · Late relapse · Revivification · History of science

Introduction

L'histoire de la découverte du cycle complet des agents du paludisme inféodés à l'homme s'est déroulée sur exactement 100 ans, entre 1880, date de l'observation princeps de Lave-

ran, et 1980, date de la publication de Krotoski concernant la mise en évidence, par immunofluorescence, du premier hypnozoïte, forme intermédiaire latente entre sporozoïte et schizonte intrahépatique, responsable des rechutes tardives observées dans les paludismes à *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*. La mémoire des non-spécialistes n'a retenu que le nom des acteurs de premier plan et a oublié naturellement les nombreux seconds rôles, dont certaines observations furent cependant déterminantes, ainsi que les recherches parallèles menées sur les plasmodiums animaux, d'abord aviaires, comme celles d'Aragão [1], puis de primates et de rongeurs, sans lesquels les progrès de la paludologie médicale auraient été encore bien plus lents et difficiles.

Ronald Ross, comme son mentor Patrick Manson, ne connaissait pratiquement rien des moustiques lorsqu'il accepta de ce dernier la mission de prouver que la transmission du paludisme faisait bien intervenir un de ces insectes. Deux ans passés en Inde à travailler le sujet lui avaient malgré tout permis de constater qu'il y avait deux sortes de moustiques, des « moustiques gris » et des « moustiques aux ailes tachetées » qu'il avait dénichés par hasard dans les montagnes bleues du Tamil Nadu (collines Nilgiris), mais qu'il n'avait jamais été capable d'identifier comme étant des anophèles. Être médecin-major de l'armée des Indes à la fin du XIX^e siècle avait pas mal d'avantages mais aussi quelques inconvénients. Ross en fit l'expérience à ses dépens. Mis par sa hiérarchie dans une situation qui l'empêchait de continuer ses recherches sur la transmission des plasmodiums humains par les moustiques, il dut se tourner vers le paludisme aviaire. C'est en suivant l'évolution des oocystes de *Plasmodium relictum* (*Proteosoma relictum*), principal élément du cycle sexué du parasite, dans la paroi de l'estomac d'un *grey mosquito*, qu'il vit successivement apparaître, à l'intérieur des oocystes, des centaines de petits bâtonnets, les sporozoïtes, qui commencèrent à migrer en direction du thorax, puis des glandes salivaires de l'insecte. D'autres « moustiques gris », probablement des *Culex*

J.F. Pays (✉)
Faculté de médecine Necker, 156, rue de Vaugirard,
F-75015 Paris, France
e-mail : pays@necker.fr

Université du Nordeste, Cenpetrop, Corrientes, Resistencia,
Argentina

pipiens fatigans, se révélèrent par la suite capables de transmettre *P. relictum* d'un moineau malade à un oiseau sain [42,55,56].

En se référant aux oocystes de *Plasmodium falciparum* qu'il avait vus un an auparavant sans trop savoir ce que c'était, dans l'estomac de ces fameux « moustiques aux ailes tachetées » qui semblaient être les seuls capables de permettre le développement de *P. falciparum*, Ross pensa naturellement que les plasmodiums humains avaient un cycle sexué identique à celui qu'il venait de décrire pour *P. relictum*. Encore fallait-il le prouver. Il ne le put. Ce sont les Italiens Grassi et Bignami qui s'en chargèrent en réussissant le 1^{er} novembre 1898, quelques mois après l'observation de Ross, la première transmission expérimentale à l'homme de *P. vivax* par *Anopheles claviger* (*An. maculipennis labranchiaie*) à l'hôpital Santo Spirito de Rome [27].

Grassi, professeur de zoologie à la Sapienza, n'était pas, comme Ross, un amateur passionné par un sujet pour lequel il n'avait guère de compétence, mais un entomologiste éminent qui avait une approche scientifique des problèmes, ce qui lui permettait généralement de les résoudre avec un maximum d'efficacité et en un minimum de temps. Dans la continuité des infections expérimentales qui furent répétées avec succès à plusieurs reprises et avec différentes espèces de plasmodiums, Grassi, Bignami et Bastianelli décrivent successivement les cycles sporogoniques de *P. vivax* [26], de *P. falciparum* et de *Plasmodium malariae* [4,5] et précisèrent que seuls les anophèles pouvaient transmettre, sans qu'il y ait obligatoirement un lien strict entre espèce de plasmodium et espèce d'anophèle vectrice.

En 1902, quatre ans après les observations de Ross et le succès des transmissions expérimentales de Grassi et de son équipe, Schaudinn (Fig. 1), un protozoologiste allemand de



Fig. 1 Fritz Schaudinn. Photo parue dans *The third great plague*. WB Saunders Company, 1920

grand renom, publia une série de dessins étonnants illustrant ce que le microbiologiste avait cru voir sous son microscope : la pénétration directe d'un sporozoïte de *P. vivax* dans une hématie (Fig. 2) [58].

Malgré d'innombrables tentatives, personne ne réussit à refaire cette observation qui liait de la manière la plus simple, pour ne pas dire simpliste, le cycle sexué et le cycle asexué des plasmodiums, mais personne n'osa contester les affirmations de Schaudinn tant l'autorité de l'homme était forte, sa personnalité peu ouverte à la discussion et l'air du temps peu favorable à la contestation. Le prestige de l'Allemagne, au tout début du XX^e siècle, était immense en matière de médecine scientifique dont Schaudinn était considéré comme un des plus illustres représentants [67]. Même Grassi, qui n'avait pourtant pas l'habitude de s'en laisser conter, et qui pensait que les différences de structure qu'il avait remarquées entre noyaux des sporozoïtes et des trophozoïtes ne pouvaient s'expliquer que par l'existence d'un stade intermédiaire, n'osa lancer de recherches dans cette direction pour ne pas déplaire au jeune kaiser de la biologie. Il s'était déjà mis à dos Robert Koch qui n'était guère plus commode que Schaudinn, en montrant que les œufs des moustiques n'étaient pas infectés par les plasmodiums et ne transmettaient donc pas le paludisme comme le pensait le savant allemand [57] qui semble n'avoir pas manqué de se venger de ce crime de lèse-majesté lors de l'attribution des prix Nobel [9]. Quant à Golgi, qui croyait aussi à l'existence d'un cycle exoérythrocytaire [25], il fit la même chose que Grassi et, pour les mêmes raisons, se tint coi.

Rapidement devenue un dogme, l'observation erronée de Schaudinn verrouilla donc toute velléité de recherches concernant le devenir du sporozoïte et ce verrou resta fermé bien après la mort du savant allemand survenue en 1906, à la suite d'un abcès de l'intestin dû à des amibes avec lesquelles Schaudinn s'était infecté, probablement volontairement, à titre expérimental. De nos jours, où l'on s'accorde à considérer que les conclusions tirées d'une observation ou d'une expérimentation n'ont de valeur que si elles peuvent être reproduites et confirmées par d'autres équipes, cette déférence vis-à-vis de l'*establishment*, cette timidité dans la contestation et ce manque de goût pour la critique sont presque incompréhensibles.

Il fallut donc attendre la fin de la Seconde Guerre mondiale pour que, dans une Europe ravagée par le conflit, où tout, par la force des choses, était remis en question, l'observation de Schaudinn le soit aussi, d'autant que de nombreux arguments et de nombreuses observations plaidaient depuis longtemps en faveur de l'existence d'un cycle exoérythrocytaire intermédiaire entre cycle sporogonique et cycle asexué endoérythrocytaire.

Ces arguments étaient de trois types : ceux tirés de l'existence de rechutes dans les infections à *P. vivax*, et accessoirement à *P. ovale* découvert par Stephens en 1922 [68], ceux

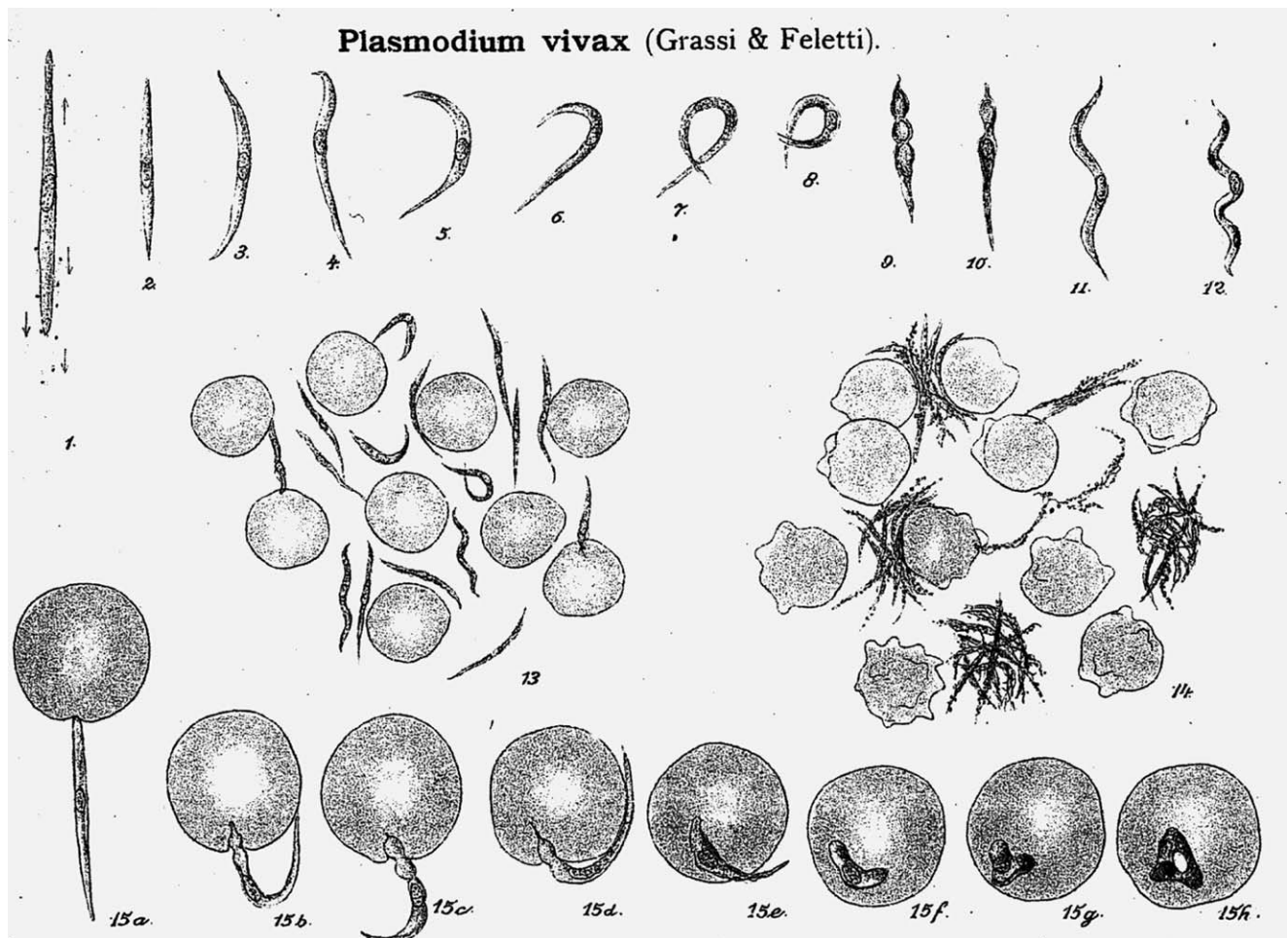


Fig. 2 Dessin de la main de F. Schaudinn illustrant la pénétration d'un sporozoïte de *P. vivax* dans une hématic. Extrait de « Schaudinn F. (1902) Studien über krankheitserregende Protozoen. II. *P. vivax* (Grassi et Feletti) der Erregeres Tertianfiebers beim Menschen. *Arch Kaiser Gesundheitsamte* (Berlin), 19:169–250. »

tirés des observations des chercheurs travaillant sur le paludisme aviaire, ceux enfin tirés du déroulement des infections expérimentales et de l'efficacité de la thérapeutique en fonction du mode d'inoculation.

Rechutes

Les rechutes, qui avaient toujours beaucoup intrigué les esprits curieux, étaient à l'origine de la croyance populaire en l'existence d'un paludisme dont on ne guérissait jamais. Dès 1886, Pel avait proposé de les expliquer par le fait que le parasite, incapable de se reproduire, attendait quelque part, en dehors du sang, que les conditions deviennent plus favorables à sa multiplication ou à sa transformation en une forme capable de parasiter les globules rouges et de provoquer la maladie [50]. Pour sa part, Golgi pensait que le parasite avait une phase tissulaire insensible à la quinine et que cette phase se déroulait dans les cellules endothéliales où il

avait cru voir, à plusieurs reprises, des formes apigmentées [25]. Cette opinion était partagée par Thayer [69] qui, se basant sur l'observation clinique bien documentée d'une rechute survenue 23 mois après l'accès de primo-invasion, évoquait la possibilité, pour le parasite, de rester caché pendant deux ans, et peut-être plus, dans les cellules du système réticuloendothélial.

En 1926, Marchoux [43] faisait état de trois mécanismes possibles pour expliquer les rechutes : la réactivation d'une forme sanguine enkystée, une parasitémie à minima associée à une immunité suffisante pour la contrôler, mais insuffisante pour l'éliminer [6], une parthénogenèse des gamétocytes présents dans le sang de manière continue, mais en nombre trop réduit pour y être détectés. C'est cette dernière hypothèse, basée sur une autre observation erronée de Schaudinn [58], qui avait la préférence de Marchoux, bien que Bignami et Bastianelli aient été incapables, 25 ans auparavant, de transmettre l'infection par une injection de sang ne contenant que des gamétocytes [7].

Paludisme aviaire

Jusqu'à la découverte de *P. berghei* en 1948, tous les chercheurs qui s'intéressaient au paludisme se servaient de plasmodiums d'oiseaux comme modèles expérimentaux. À la suite des travaux d'Aragão sur *Haemoproteus columbae* [1], et après un intervalle libre de 30 ans pendant lequel pratiquement personne n'avait cherché à en savoir davantage sur le sujet, la commission malaria de la Société des Nations avait enfin pris position, en 1933, en faveur de l'existence d'un cycle exoérythrocytaire se déroulant dans les cellules des vertébrés. Raffaella, l'année suivante, fut l'un des premiers à signaler la présence et la multiplication de *Plasmodium elongatum* dans les cellules de la moelle osseuse des oiseaux, puis de *P. relictum* dans les cellules réticuloendothéliales de la moelle, du foie et de la rate du canari [51–53]. Ses observations concernant *P. elongatum* furent rapidement et brillamment confirmées et complétées par Huff et Bloom [30] et celles concernant *P. relictum* par Kikuth et Mudrow [35] : il existait bien une période de latence pendant laquelle le sang des oiseaux infectés n'était pas infectieux. Il ne le devenait qu'à partir du quatrième jour, contrairement aux broyats de moelle, de foie ou de rate, qui eux, l'étaient pratiquement immédiatement. La description de *P. gallinaceum* par Brumpt [8] permit à James et Tatt de proposer la même année le terme de « cycle exoérythrocytaire » pour désigner la schizogonie qui se déroulait dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux du poulet [33,34].

En 1943, Paraense, au Brésil, qui raconte très bien comment, en allant contre l'observation de Schaudinn, il avait l'impression de commettre un sacrilège [49], et Reichnow et Mudrow en Allemagne, firent état de l'existence d'une schizogonie primaire exoérythrocytaire dans les macrophages de l'espace cellulaire sous-cutané, au point d'injection des sporozoïtes et à distance, respectivement chez *P. gallinaceum* et *P. relictum*, observations confirmées l'année suivante par Huff et Coulston à partir de travaux faits pendant la guerre [31,48,54]. Mais il fallut attendre encore trois ans pour que Garnham, en rapportant la présence d'un cycle exoérythrocytaire chez *Hepatozostis kochi*, un hématozoaire des cercopitèques et des cynocéphales très proches des plasmodiums confirme pour la première fois de manière indiscutable l'idée de plus en plus répandue qu'il existait bien, comme chez les oiseaux, un cycle exoérythrocytaire chez les primates [21,22].

Infections expérimentales dans le cadre de la malariathérapie

La pratique de la malariathérapie qui consistait à provoquer des chocs thermiques générés par une infection palustre induite pour traiter la paralysie générale des syphilitiques,

était très en vogue dans les années 1920. Elle permit de constater assez rapidement que toutes les souches de *P. vivax* utilisées n'avaient pas le même potentiel de rechutes et qu'il existait une différence de réponse à la quinine selon que l'inoculation se faisait à l'aide de sporozoïtes, comme au Royaume-Uni, ou par injection de sang contenant des formes asexuées, comme cela se pratiquait habituellement sur le continent. Dans le premier cas, il y avait des rechutes alors qu'il n'y en avait pas dans le second [71,72]. De plus, dans le premier cas, un traitement donné pendant la phase d'incubation était incapable de prévenir l'apparition des accès, ce qui avait conduit James à proposer, pour les plasmodiums humains, dès 1931, l'existence d'un cycle préérythrocytaire comportant une période de multiplication dans les cellules du système réticuloendothélial [32].

Le dernier coup de boutoir à l'observation erronée de Schaudinn fut porté par une expérience sur volontaires qui montra que les sporozoïtes de *P. vivax* et de *P. falciparum* ne restaient infectieux dans le sang que pendant une trentaine de minutes, après quoi le sang devenait stérile et ne redevenait infectieux que six ou huit jours plus tard, selon que l'on avait affaire à *P. falciparum* ou à *P. vivax* [20]. Ces résultats étaient la preuve indirecte de l'existence d'un cycle préérythrocytaire sur lequel d'ailleurs certains biguanides et surtout les amino-8-quinoléines se révélaient efficaces [10,19].

Travaux de Shortt et Garnham

La même année (1948), Shortt et Garnham firent piquer un singe rhésus par 500 *Anopheles maculipennis* infectés par *Plasmodium cynomolgi*. Un broyat de ces mêmes moustiques fut ensuite injecté en intrapéritonéal et en intramusculaire au singe qui fut sacrifié sept jours plus tard. Un second singe fut traité de la même manière et sacrifié le sixième jour. C'est dans les coupes de foie de l'un comme de l'autre singe que Shortt et Garnham purent mettre en évidence les

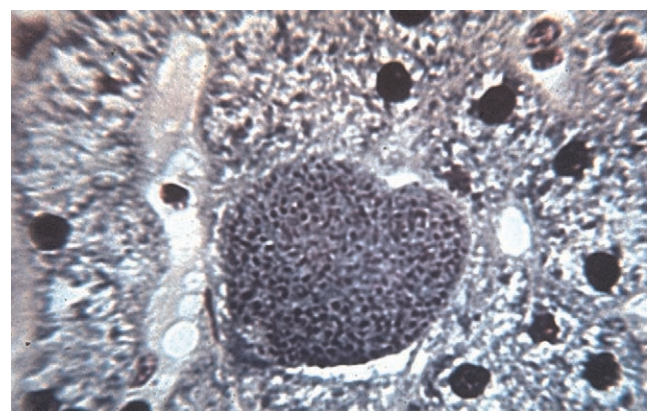


Fig. 3 Schizonte intrahépatique de *P. cynomolgi*. Photo J.F. Pays

premières formes exoérythrocytaires d'un plasmodium de primate non humain [60,63] (Fig. 3).

La bonne volonté d'un patient atteint de paralysie générale permit de prouver que ce cycle exoérythrocytaire existait également chez l'homme. En raison d'une immunité qu'il avait acquise à l'occasion d'une précédente infection à des fins thérapeutiques 23 mois auparavant, et qui avait donné lieu à 13 rechutes, le patient ne présenta ni manifestation clinique, ni parasitémie, après avoir été piqué par plus de 2 000 anophèles infectés par *P. vivax* et avoir reçu, en intramusculaire, un broyat de 200 glandes salivaires de ces mêmes moustiques. Par contre, l'examen de la biopsie hépatique faite à j7 permit de mettre en évidence des schizontes identiques à ceux trouvés chez les deux singes inoculés avec *P. cynomolgi* [61].

Les résultats de ces expériences prouvaient donc l'existence d'un cycle exoérythrocytaire précédant le cycle érythrocytaire et échappant au contrôle de l'immunité induite par celui-ci. Pour qu'il puisse être responsable des rechutes, comme le pensèrent alors Shortt et Garnham, il fallait maintenant prouver que ce cycle n'était pas seulement préérythrocytaire au sens strict, mais continuait à tourner après la disparition de la parasitémie. On crut à tort que cela avait été fait par la mise en évidence de deux schizontes intrahépatiques dans le foie d'un macaque de 3 livres, trois mois et demi après que celui-ci a été piqué par quelques 700 anophèles infectés par *P. cynomolgi* [62].

Schizogonie exoérythrocytaire continue ou formes latentes à l'origine des rechutes

En montrant que la transfusion d'une importante quantité de sang provenant d'un donneur traité d'un accès à *P. vivax* ne transmettait pas l'infection au receveur, bien que l'infection du donneur ait rechuté quelques mois plus tard, Cooper et al. confirmèrent bientôt cliniquement l'implication des formes exoérythrocytaire dans la survenue des rechutes, sans toutefois préjuger de son mécanisme [16].

Pour Shortt et Garnham, ce mécanisme était celui d'une schizogonie tissulaire continue insensible aux antimalariques, avec destruction par le système immunitaire des mérozoïtes dès leur passage dans le sang. Quant à l'inefficacité du système immunitaire vis-à-vis des formes tissulaires, elle était due, selon les mêmes auteurs, au fait que les schizontes exoérythrocytaires étaient protégés par leur position intracellulaire, tout comme les quelques mérozoïtes qui en étaient issus et qui réussissaient à se réfugier immédiatement dans un autre hépatocyte [62].

Cette hypothèse, contrairement à la découverte des schizontes exoérythrocytaires, fut accueillie avec réserve, car elle n'expliquait pas certains faits et allait à l'encontre de quelques autres :

- lors d'une infection expérimentale, le nombre et la fréquence des rechutes étaient apparemment corrélés au nombre des sporozoïtes injectés [73] ;
- le nombre et le délai d'apparition des rechutes variaient selon les souches, certaines ne se manifestant qu'après une très longue latence [11,12,15,47,66] ;
- les individus étaient réceptifs à une infection induite par transfusion au cours de la période de latence, ce qui allait à l'encontre de la présence d'une immunité capable d'empêcher l'envahissement des globules rouges par d'éventuels mérozoïtes issus des schizontes exoérythrocytaires [16] ;
- il n'y avait aucune raison pour que la schizogonie exoérythrocytaire ne dure pas toute la vie s'il n'existait pas de mécanisme immunitaire capable de la contrôler [23] ;
- il n'y avait pas davantage de raison pour que l'immunité active sur les formes sanguines connaisse une défaillance, puisqu'elle était stimulée en permanence par des tentatives d'invasion des globules rouges par des mérozoïtes en provenance des schizontes hépatiques.

Corradetti, qui refusait de faire une différence entre rechute, c'est-à-dire réapparition d'une parasitémie à partir d'un schizonte intrahépatique, et reviviscence schizogonique, c'est-à-dire réapparition d'une parasitémie détectable à partir d'une parasitémie indétectable, dite a minima, ajoutait à ces critiques que l'absence totale de forme sanguine entre primo-invasion et rechute n'avait jamais été prouvée et ne pourrait jamais l'être, à moins qu'on ne transfuse pendant cette période jusqu'à la dernière goutte de sang du sujet infecté à un sujet sain. Il ajoutait que, s'il y avait bien schizogonie continue dans le foie, on devrait trouver une grande abondance de parasites à l'endroit où un schizonte primaire était arrivé à maturité, ce qui n'était pas le cas [17].

Pour expliquer les discordances existant entre les observations de Shute et al., pour qui la longueur de la période d'incubation d'une souche de *P. vivax* originaire des pays tempérés (souche nord-coréenne) était d'autant plus importante que le nombre des sporozoïtes injectés avait été faible [66], et d'autres observations portant sur des souches de *P. vivax* d'origine tropicale (souche Chesson) qui ne montraient pas de corrélation entre ces deux paramètres, Ungureanu et al. proposèrent alors une hypothèse séduisante qui postulait que la schizogonie exoérythrocytaire n'était pas un phénomène cyclique et que longue latence et rechutes n'étaient en fait que deux aspects d'un même phénomène liés à l'existence d'au moins deux populations de sporozoïtes, l'une à développement lent et l'autre rapide [70]. Une partie des idées d'Ungureanu et al., inspirées elles-mêmes de celles de Moshkoski, fut reprise par Lysenko et al., pour qui l'extrême variation dans la fréquence, le nombre et la cinétique des rechutes n'étaient que l'expression du polymorphisme génétique des sporozoïtes, étant entendu que



Fig. 4 Hypnozoïte. D'après « Impact malaria (Sanofi-Aventis) : Formation Médicale Continue, 1. Biologie du Plasmodium, 1.4 Stades exoérythrocytaires »

les souches utilisées en laboratoire ne rendaient que très imparfaitement compte de la diversité qui pouvait se rencontrer dans les infections naturelles [41,46].

Toutes ces critiques amenèrent Garnham à abandonner, contrairement à Shortt, l'hypothèse d'une schizogonie exoérythrocytaire continue à l'origine des rechutes pour celle dite de la latence, soit du sporozoïte, soit de la forme dans lequel il était amené à se développer. Mais Garnham était bien obligé de convenir qu'il n'avait jamais rencontré de signe de latence dans les formes exoérythrocytaires vues dans les biopsies hépatiques examinées jusqu'à 250 jours après l'infection tant avec *P. vivax*, qu'avec *P. cynomolgi* et même *P. ovale* [23].

À la recherche des formes latentes

La solution du problème vint finalement des progrès accomplis dans le domaine de l'immunofluorescence. Garnham fit part à Krotoski, un spécialiste américain du diagnostic sur coupes par immunofluorescence, des difficultés rencontrées par son équipe pour trouver des formes exoérythrocytaires jeunes (de moins de cinq jours) et surtout très jeunes (de moins de 48 heures) [3] dans les biopsies hépatiques. Les deux hommes décidèrent de collaborer [23].

Un macaque fut inoculé en intraveineux avec une suspension de 12 millions de sporozoïtes de *P. cynomolgi bastianelli* et le foie biopsié à la 1^{ère}, 12^e, 24^e et 48^e heure, ainsi qu'au 7^e, 50^e et 102^e jour pour examen en immunofluorescence. C'est lors d'un contrôle technique, avant tout examen systématique, que Krotoski et al., sur des coupes de la biopsie faites à j7, eurent la surprise de voir, parmi les schizontes exoérythrocytaires, une forme brillante contenue dans un hépatocyte, mesurant quelques 5 μ de diamètre et qu'une mauvaise coloration au Giemsa révéla pourvue d'un noyau unique et d'un peu de cytoplasme [36] (Fig. 4).

Un examen très attentif, hépatocyte par hépatocyte, sur coupe colorée par le Giemsa, permit de retrouver plusieurs de ces éléments sans le secours de la fluorescence dans la même biopsie, ainsi que dans une biopsie de foie pratiquée à j7, 25 ans auparavant, sur un singe infecté par une grande quantité de sporozoïtes de *P. cynomolgi bastianelli* [37,38]. Des expériences ultérieures permirent de montrer que ces éléments pouvaient être détectés dès le troisième jour et restaient inchangés pendant au moins 229 jours après inoculation [2]. Ils furent baptisés à juste titre hypnozoïte par Garnham, en référence aux dormozoïtes de Markus, aux corps X de Schute et aux formes dormantes de Lysenko et al. dont l'existence avait été pressentie par ces différents auteurs, mais n'avait jamais pu être prouvée [41,44,65]. Fait capital enfin, ces hypnozoïtes n'existaient pas chez les plasmodiums de primates ne donnant pas de rechutes, comme *Plasmodium knowlesi* [39], mais existaient par contre chez *Plasmodium simiovale* [13,14], espèce proche de *P. ovale*, et surtout chez au moins deux souches de *P. vivax* inoculées à des chimpanzés splénectomisés, la souche Chesson, caractérisée par des rechutes fréquentes, et la souche nord-coréenne caractérisée par une longue latence avec, dans les deux cas, une concordance entre le nombre des rechutes attendu et le nombre des hypnozoïtes présents dans le foie [40].

Compte tenu de la spécificité des sérums utilisés, de la taille des hypnozoïtes par rapport aux mérozoïtes, de la différence morphologique existant entre sporozoïtes et hypnozoïtes, et de la présence d'hypnozoïtes dès j3, alors que les schizontes exoérythrocytaires n'avaient pas encore atteint leur maturité, il était difficile de prendre en compte les réserves faites par Shortt puis Corradetti concernant une éventuelle confusion entre hypnozoïtes et microsporidies de moustiques, ou hypnozoïtes et mérozoïtes issus de schizontes exoérythrocytaires [64], ou encore hypnozoïtes et sporozoïtes [18].

Par contre, l'existence d'une corrélation positive entre le nombre des hypnozoïtes et le nombre des schizontes exoérythrocytaires, tant chez les souches à fréquence de rechute élevée que chez les souches à faible fréquence de rechute, confortait bien l'hypothèse de la responsabilité des hypnozoïtes dans l'apparition de ces rechutes [24], de même que le

fait que la fréquence de celles-ci soit positivement corrélée au nombre des sporozoïtes inoculés et décline au fur et à mesure de la progression de l'infection [59].

Après les premières tentatives de culture de schizontes hépatiques de *P. vivax* sur hépatocytes isolés d'un foie humain [45], ce sont Hollingdale et al. qui réussissent les premiers à obtenir sur cellules d'hépatome tous les éléments du cycle exoérythrocytaire à partir de sporozoïtes de *P. vivax* : des mérozoïtes, des schizontes et très probablement des hypnozoïtes, formes uninuclées qui restent inchangées pendant plus de 15 jours, alors que le dernier mérozoïte avait été produit à j12. Il put même observer, trois heures après mise en culture, la pénétration d'un sporozoïte dans un hépatocyte et sa transformation en trophozoïte [28] ! La rareté des formes âgées de moins de cinq jours dans les biopsies simplement colorées au Giemsa, et l'absence de formes âgées de moins de 24 heures dans les biopsies examinées en fluorescence avaient donné lieu à bien des spéculations que cette observation rendait désormais sans objet. La culture sur hépatome permit également aux mêmes auteurs de constater que les sporozoïtes de la souche nord-coréenne donnaient naissance à une majorité d'hypnozoïtes alors que les sporozoïtes de la souche Chesson donnaient naissance à une proportion égale d'hypnozoïtes et de schizontes [29].

Conclusion

S'il ne peut y avoir de point final à la recherche, il faut savoir en mettre un à son histoire, au moment où celle-ci rejoint l'actualité, ou tout au moins s'en approche de trop près, empêchant de démêler les épiphénomènes du fondamental, l'idée d'avenir de l'hypothèse sans lendemain. En ce qui concerne la découverte des cycles des plasmodiums, nous avons choisi de placer ce point après la découverte des hypnozoïtes pour deux raisons : tout d'abord parce que les 100 ans de recherche qui précèdent cette date forment un tout et que les années 1980 apportent la réponse qui manquait encore aux questions posées 100 ans plus tôt ; la seconde, parce qu'à partir de cette date, l'évolution des moyens d'investigation et des techniques, notamment la montée en surpuissance de la biologie moléculaire, changent totalement la donne en matière d'échelle, de thèmes de recherche envisageables et de possibilités de les mener à bien.

Conflit d'intérêt : aucun.

Références

- Aragão H de B (1908) Über den Entwicklungsgang und die Übertragung von Haemoproteus columbae. Arch Protistenkd 12:154-67
- Bray RS, Krotoski WA, Cogswell FB et al (1985) Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. III. Further attempts to find early forms and to correlate hypnozoites with growing exoerythrocytic schizonts and parasitaemic relapses in *Plasmodium cynomolgi bastianellii* infections. Trans Roy Soc Med Hyg 79(2):269-73
- Bray RS (1957) Additional notes on the tissue stages of *Plasmodium cynomolgi*. Trans R Soc Trop Med Hyg 51(3):248-52
- Bastianelli G, Bignami A (1898) Sullo sviluppo dei parassiti della terzana nell'Anopheles claviger. Bull R Accad Med Roma. Anno 25 fasc 3
- Bastianelli G, Bignami A, Grassi GB (1898) Coltivazione delle semilune malariche dell'uomo nell' Anopheles claviger Fabr. (Sinonimo, Anopheles maculipennis Meig.) Nota preliminare. R. Accad dei Lincei vii, 2 s, 5a, 11, p 313
- Bignami A (1910) Sulla patogenesi delle recidive nelle febbri malariche. Atti Soc Studi Malar 11:731-46
- Bignami A, Bastianelli G (1900) Sulla inoculazione delle sangue di semiluna malariche d'uomo. Atti Soc Studi Malar 1:15-20
- Brumpt E (1935) Paludisme aviaire : *Plasmodium gallinacum nsp* de la poule domestique. C R Hebd Seances Acad Sci, 200:783-86
- Capanna E (2006) Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? Int Microbiol 9(1):69-74
- Coatney GR, Cooper WC (1948) Symposium on exoerythrocytic forms of malarial parasites. III. The chemotherapy of malaria in relation to our knowledge of exoerythrocytic forms. J Parasitol 34(4):275-89
- Coatney GR, Cooper WC, Ruhe DS et al (1950) Studies in human malaria. XVIII. The life pattern of sporozoite-induced Saint Elisabeth strain vivax malaria. Am J Hyg 51:200-15
- Coatney GR, Cooper, Young MD (1950) Studies in human malaria. XXX. A summary of 204 sporozoite-induced infections with the Chesson strain of *Plasmodium vivax*. J Natl Mal Soc 9:381-96
- Cogswell FB (1991) Hypnozoites of *Plasmodium simiovale*. Am J Trop Med Hyg 45(2):211-13
- Cogswell FB (1992) The hypnozoite and relapse in primate malaria. Clin Microbiol Rev 5(1):26-35
- Contacos PG, Collins WE, Jeffery GM, et al (1972) Studies on the characterization of *Plasmodium vivax* strains from Central America. Am J Trop Med Hyg 21(5):707-12
- Cooper WC, Ruhe DS, Coatney GR (1949) Studies in human malaria. XVI. Results of massive subinoculation during latency from patients infected with Saint Elisabeth strain vivax malaria. Am J Hyg 50(2):189-93
- Corradetti A (1966) The origin of relapses in human and simian malaria. WHO/Mal 66:565
- Corradetti A (1985) About the hypnozoites of vivax-like group of Plasmodia. Trans R Soc Trop Med Hyg 79(6):879-80
- Fairley NH (1945) Chemotherapeutic suppression and prophylaxis in malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 38(5):311-65
- Fairley NH (1947) Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments. Trans R Soc Trop Med Hyg 40(5):621-76
- Garnham PC (1947) Exoerythrocytic schizogony in *Plasmodium kochi* Laveran; a preliminary note. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 40(5):719-22
- Garnham PC (1966) Malaria parasites and other hemosporidies. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Garnham PC (1980) Les rechutes du paludisme. Cahiers. ORSTOM, Entomologie médicale, XVIII 2:103-95
- Garnham PC, Krotoski WA, Bray S et al (1983). Relapses in primate malaria: a reply. Trans R Soc Trop Med Hyg 77:734-36
- Golgi C (1983) Sulle febbri malariche estivo-autunnali di Roma. Gazz Med Pavia 2:481-559
- Grassi GB, Bastianelli G, Bignami A (1898) Ulteriori ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani nel corpo del zanzarone. Rend Accad dei Lincei 8:21-8
- Grassi GB, Bignami (1898) La malaria propagata per mezzo di peculiari insetti. Atti Accad Naz Linnei Rc 7:234

28. Hollingdale MR, Collins WE, Campbell CC, Schwartz A (1985) In vitro culture of two populations (dividing and nondividing) of exoerythrocytic parasites of *Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg 34(2):216–22
29. Hollingdale MR, Collins WE, Campbell CC (1986) In vitro culture of exoerythrocytic parasites of the North Korean strain of *Plasmodium vivax* in hepatoma cells. Am J Trop Med Hyg 35(2):275–76
30. Huff CG, Bloom WL (1935) A malarial parasite infecting all blood and blood-forming cells of birds. J Inf Dis 57:315–36
31. Huff CG, Coulston F (1944) The development of *Plasmodium gallinaceum* from sporozoite to erythrocytic trophozoite. J Infec Dis 75:231–40
32. James SP (1931) The use of plasmoquine in the prevention of the malarial infections. Proc R Acad Sci Amsterdam 34:1424–25
33. James SP, Tatt P (1937) New knowledge of the life cycle of malaria parasite. Nature (London) 139:545–49
34. James SP, Tate P (1938) Exoerythrocytic schizogony in *Plasmodium gallinaceum*. Brumpt 1935. Parasitology 30:128
35. Kikuth W, Murdow L (1937) Über pigmentlose Schizogonieformen bei Vogel-malaria. Klin Wschr 16:1690–91
36. Krotoski WA, Krotoski DM, Garnham PC et al (1980) Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. Br Med J 280(6208):153–54
37. Krotoski WA, Garnham PC, Bray RS, et al (1982) Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24-hour after infection. Am J Trop Med Hyg 31(1):24–35
38. Krotoski WA, Bray RS, Garnham PC, et al (1982) Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. II. The hypnozoite of *Plasmodium cynomolgi bastianellii* from 3 to 105 days after infection, and detection of 36-to 40-hour pre-erythrocytic forms. Am J Trop Med Hyg 31(2):211–25
39. Krotoski WA, Collins WE (1982) Failure to detect hypnozoites in hepatic tissue containing exoerythrocytic schizonts of *Plasmodium knowlesi*. Am J Trop Med Hyg 31(4):854–56
40. Krotoski WA, Garnham PC, Cogswell FB et al (1986) Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. IV. Pre-erythrocytic schizonts and/or hypnozoites of Chesson and North Korean strains of *Plasmodium vivax* in the chimpanzee. Am J Trop Med Hyg 35(2):263–74
41. Lysenko AY, Beljaev AE, Rybalka BM (1977) Population studies of *Plasmodium vivax* I. The theory of polymorphism of sporozoites and epidemiological phenomena of tertian malaria. Bull World Health Organ 55(5):541–49
42. Manson P (1898) Surgeon-major Ronald Ross's recent investigations on the mosquito-malaria theory. Br Med J 1(1955):1575–77, 849–53
43. Marchoux E (1926) Paludisme. JB Baillière, Paris
44. Markus MB (1976) Possible support for the sporozoite hypothesis of relapse and latency in malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 70(5–6):535
45. Mazier D, Landau I, Druilhe P et al (1984) Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. Nature 307(5949):367–69
46. Moshkoski SD (1973) Explanation of the difference of the incubation type and features of alternation of acute periods of tertian malaria associated with different strains of *Plasmodium vivax*. Med Parazitol (Mosk) 42(4):393–400
47. Nicolaiev BP (1949) Subspecies of the parasite of tertian malaria (*Plasmodium vivax*). Dokl Akad Nauk (USSR) 67:201–10
48. Paraense WL (1943) Aspectos parasitarios observados no local inoculado com esporozoitos de *Plasmodium gallinaceum*. Mem Inst Oswaldo Cruz 38:352–59
49. Paraense WL (2004) A fragment of malaria history. Mem Inst Oswaldo Cruz 99(4):439–42
50. Pel PK (1886) Mededeengen uit de Geneeskundige kliniek. Malaria infectie. Ned Tijdschr Geneesk, 22:341–58
51. Raffaele G (1934) Un ceppo italiano di *Plasmodium elongatum*. Riv Malariol 13:332–37
52. Raffaele G (1936) Presumbili forme iniziali di evoluzione di *Plasmodium relictum*. Rev Malariol 15:318–24
53. Raffaele G (1936) Poter infettante del sangue durante l'incubazione della malaria aviara. Riv Malariol 15:318–24
54. Reichenow E, Mudrow PL (1943) Der Entwicklungsgang von *Plasmodium praecox* im Vogelskörper. Deut Tropfen Zeitsch 47:289–99
55. Ross R (1898) Report on the cultivation of Proteosoma Labbey in grey mosquitoes. Ind Med Gaz 33:491–08
56. Ross R (1905) Nobel lectures. Physiology or Medecine. Elsevier, Amsterdam 1967
57. Russel PF (1955) Man's mystery of malaria. Oxford University Press, London
58. Schaudinn F (1902) Studien uber krankheitserregende Protozoen. II. *Plasmodium vivax* (Grassi et Feletti) der Erregeres Tertianfiebbers beim Menschen. Arb Kaiser Gesundheitsamte (Berlin) 19:169–250
59. Schmidt LH (1986) Compatibility of relapses patterns of *Plasmodium cynomolgi* infections in rhesus monkeys with continuous cyclical development and hypnozoite concepts of relapse. Am J Trop Med Hyg 35(6):1077–99
60. Shortt HE, Garnham PC (1948) Pre-erythrocytic stage in mammalian parasites. Nature 161(4082):126
61. Shortt HE, Garnham PC, Covell G, Shute PG (1948) The pre-erythrocytic stage of human malaria *Plasmodium vivax*. Br Med J 1(4550):547
62. Shortt HE, Garnham PC (1948) Demonstration of a persisting exo-erythrocytic cycle in *Plasmodium cynomolgi* and its bearing on the production of relapses. Br Med J 1(4564):1225–28
63. Shortt HE, Garnham PC, Malamos B (1948) The pre-erythrocytic stage of mammalian malaria. Br Med J 1(4543):192–94
64. Shortt HE (1983) Relapse in primate malaria: its implication for the disease in man. Trans R Soc Trop Med Hyg 77:734–36
65. Shute PG (1946) Latency and long term relapses in benign tertian malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 40:189–94
66. Shute PG, Lupascu G, Branzei P et al (1976) A strain of *Plasmodium vivax* characterized by prolonged incubation: the effect of numbers of sporozoites on the length of the prepatent period. Trans R Soc Trop Med Hyg, 70(5–6):474–81
67. Smith DC, Sanford LB (1985) Laveran's germ: the reception and use of a medical discovery. Am J Trop Med Hyg 34 (1): 2–20
68. Stephens JWW (1922) A new malaria parasite of man. Ann Trop Med Parasite 16:383–88
69. Thayer W (1887) Lectures on the malaria fevers. D. Appleton and Co., New York p 326
70. Ungureanu E, Killick-Kendrick R, Garnham PC et al (1976) Prepatent periods of a tropical strain of *Plasmodium vivax* after inoculations of tenfold dilutions of sporozoites. Trans R Soc Trop Med Hyg, 70(5–6):482–83
71. Yorke W, Macfie JWS (1924) Observations on malaria made during treatment of general paralysis. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 18(1):13–33
72. Yorke W (1925) Further observations on malaria made during treatment on general paralysis. Trans R Soc Trop Med Hyg 19:108–22
73. Warren M, Powers G, Garnham PC, Shiroishi T (1974) *Plasmodium cynomolgi*: influence of x-irradiation and sporozoite dilution on relapse patterns in infected rhesus monkeys. Exp Parasitol, 35(2):266–71