Etudes sur les gamétocytes des *Plasmodium* du groupe «vivax»:

morphologie, évolution prise par les Anophèles
et infectivité des microgamétocytes
de *Plasmodium yoelii* (1)

par Irène LANDAU, F. MILTGEN, Y. BOULARD, A.-G. CHABAUD
et D. BACCAM

Laboratoire de Zoologie (Vers) associé au C.N.R.S.
Muséum national d'Histoire naturelle
43, rue Cuvier, F 75231 Paris Cedex 05.

Résumé.

L'analyse morphologique des gamétocytes de *Plasmodium yoelii* a permis de différencier quatre types morphologiques (O, I, II et III) qui se succèdent chronologiquement et, à l'intérieur de chaque type, des gamétocytes sains et des gamétocytes altérés. Ces données morphologiques représentent un instrument de travail pour aborder une étude plus approfondie de la biologie des gamétocytes du groupe «vivax».

Des expériences préliminaires ont fourni des renseignements sur l'évolution des gamétocytes et sur les mécanismes de leur infectivité.

1 — Au cours des infections expérimentales de la Souris blanche les gamétocytes de *P. y. nigeriensis* sont infectants jusqu'aux 3^e, 4^e jours, ceux de *P. y. yoelii* jusqu'aux 5^e, 6^e jours. Ces délais peuvent être raccourcis dans les infections très virulentes ou prolongés dans les infections chroniques.

2 — La diminution de l'infectivité coïncide avec l'apparition en nombre de plus en plus élevé de gamétocytes de morphologie altérée.

3 — La perte d'infectivité est liée à l'état du sang qui, lorsque la parasitémie est élevée, devient rapidement impropre à une évolution normale des gamétocytes : ainsi des gamétocytes non infectants acquièrent une forte infectivité moins de 2 heures après leur transfert à une Souris neuve.

(1) Travail effectué grâce à une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Accepté le 12 décembre 1978.

4 — Les Anophèles prélèvent, lors de leur repas, du sang capillaire dont la composition en gamétocytes peut être très différente de celle du sang prélevé à la queue du Rongeur.

Lors des parasitémies précoces, au moment où les Rongeurs sont le plus infectants pour les Anophèles, il y a un enrichissement considérable en gamétocytes O-I du sang ingéré par l'Anophèle par rapport à celui qui est prélevé avec les techniques habituelles.

Ce phénomène pourrait s'expliquer par la plus grande taille des gamétocytes de ces stades qui seraient retenus dans les capillaires de l'hôte.

5 — La grande infectivité des formes O et I est confirmée par le fait qu'aucune infection n'est obtenue chez l'Anophèle lorsqu'ils sont absents du sang ingéré.

6 — Le vieillissement des gamétocytes semble rapide puisque des gamétocytes issus des schizontes pré-érythrocytaires ont atteint le type II 29 heures et le type III 35 heures après la rupture des tout premiers schizontes hépatiques.

Summary.

Study on gametocytes of *Plasmodium* from the « vivax » group : morphology, evolution of gametocytes and mechanisms of their infectivity.

The study of the gametocytes of *Plasmodium yoelii* enabled the differentiation of 4 morphological types : O, I, II and III (in a chronological order) and amongst each of these types the differentiation of healthy and altered gametocytes. These morphological data represent a tool for investigations on the biology of the gametocytes of the « vivax » group.

Preliminary experiments bring informations on the evolution of gametocytes and the mechanisms of their infectivity.

1 — In experimentally infected white mice gametocytes of *P. y. nigeriensis* are infective up to the 3rd-4th day, those of *P. y. yoelii* until the 5th-6th days. These periods can be shorter when the infection is very virulent or longer when chronic.

2 — The drop in infectivity coincides with the increase in number of the altered gametocytes.

3 — The loss of infectivity is connected with the condition of the blood : when parasitaemiae are high, it becomes rapidly unsuitable to a normal evolution of the gametocytes : thus, non infective gametocytes acquire a good infectivity in less than two hours when transferred to a clean mouse.

4 — The gametocytic composition of the blood taken up by the Anopheles in the capillaries can be very different from that taken at the tail of a Rodent. In the young parasitaemiae, when the Rodents are most infective to the Mosquitoes, there is a considerable enrichment in gametocytes O-I of the blood ingested by the Anopheles as compared to that taken from the Rodents by the usual techniques. This phenomenon could perhaps be explained by the larger size of gametocytes O and I and their retention in the capillaries of the host.

5 — The strong infectivity of gametocytes O and I is confirmed by the fact that no infection develops in the Mosquitoes when no such gametocytes are present in the ingested blood.

6 — The ageing of gametocytes appears to be very rapid for gametocytes arising from exo-erythrocytic schizonts reach stage II, 29 hours and stage III, 35 hours, after the rupture of the very first hepatic schizonts.

Le Professeur Garnham indique volontiers à ses élèves que le meilleur jour pour gorger les Anophèles sur un animal infecté par un *Plasmodium* est « la veille du jour où les premiers gamétocytes sont observés dans le sang ».

A la suite des travaux de Hawking, Worms et Gammage (1968), nous avons tenté, en nous appuyant avant tout sur des bases morphologiques, de préciser différentes notions concernant la périodicité, le pouvoir infectant des gamétocytes, ainsi qu'un curieux phénomène adaptatif qui renforce considérablement le mécanisme de transmission par l'Anophèle. Il apparaît ainsi que la recommandation du Professeur Garnham n'est pas une boutade un peu paradoxale et correspond aux résultats expérimentaux.

I. - Morphologie (*Pl. I*)

Pour des raisons de commodité, nous avons distingué quatre types morphologiques de micro-gamétocytes : O, I, II et III. Ces types se succèdent, et tous les intermédiaires peuvent donc être observés.

Schématiquement, au cours de son vieillissement normal, le microgamétocyte, qui est tout d'abord de grande taille (types O et I), puisqu'il peut atteindre 9 μm et même 10 μm ou 10,5 μm , se rétracte et devient plus petit, plus dense et chromophile. Son noyau, d'abord relativement petit (type O), augmente de volume pour occuper les 3/4 du parasite (type I), puis se condense et diminue de volume (type II, puis III) ; en outre, les noyaux des stades O et I sont granuleux, ceux des stades II et III homogènes et leur aspect évoque celui d'une colloïde.

Les transformations des macrogamétocytes sont parallèles, mais plus difficiles à observer (noyau de petite taille) que celles des microgamétocytes. Nous ne les avons pas étudiées avec précision, mais il nous semble raisonnable d'admettre que les phénomènes observés sont comparables dans les deux sexes.

I. Gamétocytes sains.

— JEUNES MICROGAMÉTOCYTES (*Pl. I, fig. 1, 2*).

Les premiers gamétocytes identifiables ne remplissent pas l'hématie hôte. Leur cytoplasme est bleu pâle, le pigment fin, le noyau, relativement petit, est rose clair, formé de granules chromatiniens de taille variable, espacés, parfois alignés. Ils siègent toujours dans une hématie mûre.

— TYPE O (*Pl. I, fig. 3, 4, 5*).

Il remplit le globule rouge, qui est hypertrophié et peut atteindre 9 μm et plus. Le noyau, plus grand qu'au stade précédent, est rose plus clair, presque incolore. Cette différence de teinte avec le cytoplasme, rose plus soutenu, est caractéristique. On distingue parfois dans le noyau une, deux ou trois petites masses chromatiniennes très denses. Nous pensons que ces structures sont normales, mais labiles : elles sont inconstantes, mais, lorsqu'elles sont présentes dans un frottis, elles s'observent chez de nombreux gamétocytes. Enfin, la limite noyau - cytoplasme est nette, le pigment est fin.

— TYPE I (*Pl. I, fig. 6, 7, 8*).

Il peut atteindre des tailles élevées (9 μ m jusqu'à 10,5 μ m). Le noyau, très volumineux, occupe les 3/4 du parasite ; il est granuleux, à grains serrés ; sa teinte rose est à peu près la même que celle du cytoplasme. Ce dernier forme une bande périphérique plus ou moins régulière ; le pigment est généralement rassemblé dans le cytoplasme, mais peut fréquemment chevaucher le noyau.

— TYPE II (*Pl. I, fig. 9, 10*).

Il peut atteindre des tailles élevées comme les types précédents, mais c'est rare, et, habituellement, il est plus petit. Le noyau ne représente plus qu'environ la moitié du volume du parasite ; il est très bien limité, homogène, d'aspect colloïdal. Il est plus dense et plus colorable que le cytoplasme, qui est gris clair, bleuté ou rose. Le pigment, abondant, est limité au cytoplasme.

Surtout lorsqu'ils sont de grande taille, les microgamétocytes II sont fragiles et présentent des déformations caractéristiques de ce stade : plissement du noyau, irrégularités des contours, éclatement du parasite dans les frottis, qui est alors représenté par un noyau triangulaire, entouré par du pigment éparpillé.

— TYPE III (*Pl. I, fig. 11 à 16*).

Il est morphologiquement proche du précédent, mais il est plus petit, plus dense et plus chromophile. Le noyau, plus condensé et de teinte plus foncée, n'occupe plus que le tiers du parasite ; il a fréquemment une forme triangulaire ; il peut également être morcelé en deux ou trois masses irrégulières.

Nous avons résumé dans le tableau I les principaux caractères nucléaires permettant de différencier les quatre types.

Tableau I. — Principaux caractères différentiels des noyaux des quatre types de microgamétocytes.

Type	O	I	II	III
Volume approximatif occupé par le noyau dans le gamétocyte	1/3	2/3	1/2	1/3
Noyau granuleux	+	+		
Noyau homogène d'aspect colloïdal			+	+
Intensité relative des colorations du noyau et du cytoplasme	N < C	N = C	N > C	N > C
N = noyau C = cytoplasme				

A partir de cette classification, nous avons établi une formule gamétocytaire qui indique le nombre de gamétocytes de chaque type rencontrés en balayant les frottis horizontalement d'une extrémité à l'autre de la préparation.

Les gamétocytes de grande taille sont souvent rassemblés en queue et en bordure de frottis, les petits plus uniformément répartis.

Planche I : Microgamétocytes de *P. yoelii* classés par ordre chronologique.
 1-2 : Jeunes gamétocytes immatures ; 3-4 : Gamétocytes O sains ; 5 : Gamétocyte O altéré ;
 6-7-8 : Gamétocytes I ; 9-10 : Gamétocytes II (10 est légèrement altéré) ; 11-12-13-14-15 :
 Gamétocytes III (14 et 15 ont un noyau fragmenté) ; 16 : Gamétocyte III altéré.

2. Gamétocytes dégénérés (Pl. I, fig. 5, 10, 16).

Les gamétocytes pris ci-dessus comme type de description sont ceux que nous avons été amenés à considérer comme sains. Ils sont toujours observés précocement au cours de la phase montante de la parasitémie. Dès que l'infection atteint un taux élevé, ils sont progressivement remplacés par des gamétocytes dégénérés.

La dégénérescence des gamétocytes se traduit par un certain nombre d'altérations morphologiques : les quatre types de microgamétocytes peuvent toujours être identifiés, mais ils sont plus petits, plus condensés, ne remplissant souvent pas l'hématie hôte ; ils sont plus chromophiles ; ils sont souvent parsemés de petites vacuoles rondes ; le pigment peut être rassemblé en mottes. Les transformations du macrogamétocyte sont tout à fait comparables à celles observées chez le gamétocyte mâle.

II. - Evolution de la gamétocytemie

1. Facteurs déterminants.

Le taux de gamétocytes dans le sang dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels : a) la souche, b) l'hôte vertébré, c) le type d'inoculation et l'intensité de l'infection ont une grande importance. Ainsi :

a — *Souche* : chez la Souris blanche, certaines souches, telles que *P. y. nigeriensis*, sont très gamétogènes alors que *P. yoelii yoelii* (17 X et 646 X) produit beaucoup moins de gamétocytes.

b — *Hôte vertébré* : la proportion de gamétocytes observés dans le sang du Rongeur *Hybomys univittatus* est considérablement plus élevée que chez la Souris blanche pour des parasitémies comparables.

Par ailleurs, chez le Rat blanc inoculé avec *P. y. nigeriensis*, presque tous les parasites observés le 11^e jour étaient des gamétocytes.

c — *Inoculum* : comme l'ont montré Killick-Kendrick et Warren (1968), les premiers gamétocytes peuvent provenir directement de mérozoïtes libérés par les schizontes hépatiques. La confirmation de ce résultat a été difficile à obtenir, car, parmi les souches utilisées, seul *P. y. yoelii* 17 X a permis de reproduire cette expérience (les tentatives avec *P. y. nigeriensis*, *P. y. yoelii* 646 X, *P. chabaudi adami*, ont échoué). Par contre, avec 17 X chez le *Thamnomys*, nous avons observé des gamétocytes indiscutables, 70 heures, 72 heures et 78 heures après l'inoculation de sporozoïtes. A 72 heures, ils avaient le type II, à 78 heures, le type III.

Dans la plupart des cas, cependant, les premiers gamétocytes ne sont décelables qu'à une date plus tardive, qui dépend, pour les inoculations par passage de sang infecté, de la virulence de la souche et de l'importance de l'inoculum. Ainsi, chez la Souris blanche, la première vague importante de gamétocytes est plus précoce chez une souche virulente telle que *P. y. nigeriensis* (2^e et 3^e jour) que chez des souches plus chroniques, telles que 17 X et 646 X de *P. y. yoelii* (4^e et 5^e jour).

Enfin, ces délais peuvent être avancés ou retardés selon l'importance de l'inoculum et donc de la parasitémie initiale chez le Rongeur inoculé.

2. Périodicité.

Théoriquement, le problème de la périodicité devrait être facilement résolu par la simple observation de l'intervalle de temps qui sépare l'apparition des vagues de gamétocytes jeunes (O-I).

Dans la réalité, nous nous heurtons à de nombreuses difficultés : nous rencontrons fréquemment au cours de l'examen de sang de la queue des gamétocytes de type II avant d'avoir décelé des types O ou I. Il serait nécessaire de suivre ces phénomènes directement sur le sang prélevé par les Anophèles (cf. chapitre suivant). Par ailleurs, tous ces *Plasmodium* déterminent, chez la plupart de nos Rongeurs, des infections aiguës, qui s'assimilent plus à une culture anarchique qu'à une infection naturelle. Les souches de *P. y. yoelii* dites peu virulentes ont une incubation plus lente, mais lorsqu'elles démarrent, seuls les gamétocytes de la première vague ont en majorité une morphologie saine ; très rapidement, on n'observe plus la succession de générations normales : tous les parasites sont morphologiquement altérés et, bien que les quatre stades que nous distinguons puissent encore être assez bien reconnus, ils coexistent en proportions variables, et il devient difficile d'affirmer la réalité d'une nouvelle vague de gamétocytes jeunes.

Les notions que nous avons obtenues sur la périodicité des gamétocytes par l'étude de *P. y. yoelii* ne peuvent donc être considérées que comme des premières approximations. Nous indiquerons simplement que nous avons fréquemment observé un intervalle de 48 h entre deux vagues de microgamétocytes de type O-I au cours de la première semaine de l'infection (tableau III), mais fréquemment ce phénomène est plus ou moins masqué (tableau IV).

III. - Infectivité

1. Données expérimentales (1).

A) TABLEAU II :

Evaluation du nombre d'oocystes chez l'Anophèle en fonction du développement de l'infection chez les Souris.

— *P. y. nigeriensis* : inoculation forte de 10 Souris à partir d'une seule Souris don-neuse ; Anophèles gorgés chaque jour sur une Souris différente ; oocystes comptés le 7^e jour sur une seule face de l'estomac ; les Souris meurent à partir du 7^e jour, d'où l'arrêt de l'expérience le 6^e jour.

(1) L'erreur standard est importante, ce qui s'explique vraisemblablement par la distribution binomiale négative des gamétocytes dans le sang.

Tableau II.

Nombre de jours après l'inoculation	Nombre d'Anophèles disséqués	Nombre d'Anophèles positifs	Moyenne
1	5	5	114 ± 66
2	6	6	282 ± 138
3	2	2	incomptables (trop nombreux)
4	4	3	34 ± 42
5	7	4	16 ± 32
6	7	0	

B) TABLEAU III :

Périodicité des gamétocytes ; corrélations entre l'infectivité, les types de gamétocytes et le développement de l'infection chez la Souris.

— *P. y. nigeriensis* : inoculation forte d'une seule Souris ; 50 Anophèles gorgés tous les jours sur cette Souris jusqu'au 9^e jour ; Souris morte le 11^e jour, mais trop hypothermique dès le 9^e jour pour attirer les Anophèles. Les chiffres fournis et la moyenne d'oocystes (comptés le 7^e jour sur une face de l'estomac) par Moustique peuvent prêter à quelques erreurs, car le tri des Moustiques gorgés n'a pas été fait de façon suffisamment rigoureuse.

A = gamétocytes altérés (petits, vacuolés, très chromophiles).

Tableau III.

Nombre de jours après l'inoculation	Types des gamétocytes			Nombre moyen d'oocystes
	0 - I	II	III	
1	—	—	—	105 ± 93
2	—	++	—	38 ± 53
3	++	+	—	55 ± 81
4	—	++	+++	1 ± 2
5	+++ (A)	—	++ (A)	0
6	—	+(A)	+(A)	0
7	++ (A)	—	+(A)	0
8	+(A)	++ (A)	+(A)	0
9	++ (A)	+(A)	+(A)	
10	—	—	+(A)	
11	—	—	+(A)	

C) TABLEAU IV :

Périodicité des gamétocytes ; corrélations entre l'infectivité, les types de gamétocytes et le développement de l'infection chez les Souris.

— *P. y. yoelii* (646 X) : inoculation faible de 4 Souris A, B, C, D ; lots de 50 Anophèles gorgés du 1^{er} au 15^e jour sur Souris A, du 4^e au 7^e jour sur Souris B, du 8^e au 10^e jour sur Souris C, du 11^e au 14^e jour sur Souris D. Oocystes comptés le 7^e jour sur une seule face de l'estomac.

A = gamétocytes altérés.

D) TABLEAU V :

Comparaison entre les formules gamétocytaires du sang prélevé à la queue et du sang prélevé par les Moustiques dans un capillaire. Corrélations avec l'infectivité.

Les 10 expériences sont présentées sur 3 tableaux :

Les tableaux *a* et *b* indiquent le processus expérimental, soit pour *P. y. yoelii*, souche 646 X (tableau *V a*, expériences 1 et 10), soit pour *P. y. yoelii*, souche 17 X (tableau *V b*, expériences 2 à 9).

• Tableau *V a* - tableau *V b* : généalogie des Souris expérimentées.

— Grand chiffre dans le cercle = N° de l'expérience.

— Jn = Jours après l'inoculation de la Souris.

— Symboles dans le carré : en haut : infectivité ; en bas : G flèche montante ou G flèche descendante = accroissement ou diminution de la proportion de gamétocytes jeunes (O-I) dans le sang de l'Anophèle par rapport à celui du Rongeur.

— S = Souris.

— IV = Inoculation intra-veineuse.

— IP = Inoculation intra-péritonéale.

Le tableau *c* indique pour chacune des expériences le rapport entre les formules gamétocytaires du sang prélevé chez le Vertébré et du sang prélevé chez le Moustique, et la dernière colonne, la corrélation avec le pouvoir infectant chez l'Anophèle. Ainsi, dans l'expérience 1, les pourcentages des gamétocytes O-I, II, III, trouvés dans le sang de la Souris sont respectivement 2 %, 21 % et 77 % ; les pourcentages de gamétocytes O-I, II, III chez le Moustique sont respectivement 97 %, 3 % et 0 %.

• Tableau *V c* : anophèles prélevés pendant qu'ils se gorgent sur Souris infectée peu avant la fin de leur repas ; estomac immédiatement disséqué et sang issu de l'estomac étalé en frottis sur une lame ; il s'écoule ainsi moins d'une minute et demie entre le début du repas et l'étalement du sang ; l'exflagellation n'a pas encore débuté ; les formules gamétocytaires sont comparées avec celles des frottis faits en même temps avec du sang de la queue du Rongeur.

A = gamétocytes altérés.

H = *Hybomys*.

S = Souris.

M = Moustique.

Nombre d'oocystes au 7^e jour :

++++ = incomptables, trop nombreux.

+++ = de 100 à 300 oocystes sur une face de l'estomac.

Tableau IV

Jour de l'Infection	Souris A				Souris B				Souris C				Souris D			
	Types Gamétocytes			Moyenne Oocystes	Types Gamétocytes			Moyenne Oocystes	Types Gamétocytes			Moyenne Oocystes	Types Gamétocytes			Moyenne Oocystes
	O-I	II	III		O-I	II	III		O-I	II	III		O-I	II	III	
1	-	-	-	0	-	-	-		-	-	-		-	-	-	
2	-	-	-	0	-	-	-		-	-	-		-	-	-	
3	+ A	-	-	0	-	+	-		-	-	-		-	-	-	
4	-	+	+	0,1	+	+	+	2,7 ± 5,3	-	-	+		-	-	+	
5	++	+	-	2,4 ± 11	+	++	-	15,7 ± 15	++	++	+		++	+	-	
6	++	++	+++	2,3 ± 7	+	-	+	1 ± 2,6	+++	-	+		+	+	+	
7	-	-	++	0,8 ± 2	-	++	+	7,1 ± 12	-	++	+++		+	+	+	
8	-	-	++	0,35± 0,8	-	++	+++		-	-	++		-	+	+	
9	+A	+A	+A	0	+A	+A	+A		++ A	++A	+A		-	-	-	
10	+A	-	+A	0	-	-	-		++A	++A	++A		++A	-	++A	
11	+A	+A	+A	0	-	-	-		++A	++A	++A		-	-	++A	
12				0	-	-	-		++A	++A	-		-	++A	++A	0
13	+A	-	-	0	-	-	-		-	-	-		-	++A	-	0
14	-	-	-	0	-	-	-		-	-	-		-	++A	-	0
15	+A	-	-	0	+A	-	-		-	-	-		++A	-	-	0

Tableau V

Exp.	hôte	O - I	II	III	Infection Anophèle
1	S/M	2/97	21/3	77/0	+++
2	H/M	0/13	72/18	28/69	++
3	H/M	2/19	7/24	91/57	++
4	S/M	6/31	33/53	61/16	+++
5	S/M	37/65	47/32	16/3	+++
6	S/M	2/68	60/26	38/6	+
7	S/M	70/41	23/26	7/33	+++
8	S/M	47/34 ^A	29/50	24/16	++
9	S/H	10/18 ^A	52/38	38/44	±
10	S/M	16/4 ^A	22/24	62/72	±

C

++ = de 50 à 100 oocystes sur une face de l'estomac.

+ = de 5 à 10 oocystes.

± = pourcentage d'Anophèles infectés très faible : 1 ou 2 oocystes au maximum par Anophèle.

Tableau VI

E) TABLEAU VI :

Récupération de l'infectivité des gamétocytes par transfert à une Souris neuve.

— *P. y. nigeriensis* : Une quantité importante de sang (jusqu'à 1/4 de cc) est prélevée dans le sinus rétro-oculaire d'une Souris donneuse et inoculée à une Souris neuve (receveuse) en intra-veineuse. De 45 minutes à 180 minutes plus tard, les 2 Souris sont présentées à 50 Moustiques. Les oocystes sont comptés sur une face de l'estomac le 7^e jour.

— Gros chiffre dans un cercle = N° de l'expérience.

— Jn = Jours après l'inoculation de la Souris.

— Dans cercle pointillé : nombre de minutes séparant l'inoculation de la Souris receveuse et le début du repas des Anophèles (durée du repas = 1 heure).

— Chiffres dans le rectangle = moyenne du nombre d'oocystes chez un Anophèle.

2. Interprétation.

— L'analyse des tableaux II, III, IV, indique que, pour *P. y. nigeriensis*, l'infectivité débute brutalement dès le 1^{er} jour, est maximale le 3^e jour et retombe pour s'annuler définitivement le 5^e ou le 6^e jour.

On remarquera en particulier que, dans les 2 expériences (tableau II et III), le pouvoir infectant est déjà très grand, alors que le sang est négatif.

Pour *P. y. yoelii*, l'infection commence au 4^e jour, est maximale le 5^e jour, mais quelques rares oocystes peuvent se former jusqu'au 10^e jour.

— *L'analyse du tableau V* est plus complexe :

- dans les expériences 1 à 7, l'examen du sang ne montre pas de gamétocytes altérés et les sept résultats des infections des Moustiques sont bien positifs.
- dans les expériences 8 à 10, tous les gamétocytes se sont altérés (10), ou une partie d'entre eux (8-9). L'infection des Moustiques est nulle ou très faible, à l'exception de l'expérience 8 (voir plus loin).

On constate que des gamétocytes d'aspect sain sont toujours présents lorsque l'on est au début de l'infection dans un sang normal. Nous avons chez la Souris : jour J_1 = expérience 4, jour J_2 = expériences 5 et 6, jour J_3 = expérience 1 ; et, chez l'*Hybomys*, où l'infection est partie plus lentement : jour J_6 = expérience 2, jour J_8 = expérience 3.

Dans toutes ces expériences (1 à 6), nous observons une concentration très forte des gamétocytes jeunes (O-I) chez les Anophèles par rapport à ce qui se trouve dans les gros vaisseaux du Rongeur.

La comparaison des expériences 9 ; 5 et 4 ; 6, (*tableau V b*) semble indiquer qu'une forte réticulocytose a accéléré l'infectivité des gamétocytes. Lorsque la Souris présente une importante réticulocytose (expérience 4), nous observons une très forte concentration des formes jeunes chez l'Anophèle et une très forte infection des Moustiques. Pour la Souris témoin, sans réticulocytose marquée (expérience 9), il n'y a pas d'enrichissement en formes jeunes des Anophèles et ceux-ci s'infectent très faiblement. Au jour J_2 , la Souris à forte réticulocytose (expérience 6) est moins infectante pour l'Anophèle qu'au jour J_1 , alors que, au contraire, la Souris témoin (expérience 5) donne lieu au double phénomène d'enrichissement en formes jeunes et de forte infectivité.

Chez la Souris, la phase de transition semble s'effectuer au jour J_4 , chez l'individu jeune (expérience 7), ou au jour J_6 , chez une Souris âgée, chez laquelle l'infection démarre plus lentement (expérience 8) ; dans les 2 cas, le sang reste très infectant, mais nous n'observons plus de phénomène d'enrichissement en formes jeunes de l'Anophèle.

Chez l'*Hybomys*, au contraire, le sang ne s'est altéré que plus tardivement ; les expériences au jour J_6 (expérience 2) et au jour J_8 (expérience 3) montrent l'enrichissement en gamétocytes jeunes des Anophèles et une bonne infectivité.

— *Le tableau VI* montre que, très peu de temps après le passage, le sang de la Souris receveuse est beaucoup plus infectant que celui de la Souris donneuse, et cela d'autant plus que l'inoculum (1/4 de cc au maximum) aboutit à une forte dilution.

L'infection sanguine dans les expériences 1-2 est plus chronique que dans celle des expériences 3-4, car il s'agit d'une inoculation à partir d'un sang décongelé. Le contraste entre les expériences 2 et 4 fortement positives et les expériences 1-3 faiblement positives s'explique peut-être par la périodicité des gamétocytes.

En conclusion, deux facteurs sont essentiels dans l'infectivité des gamétocytes.

1 — *La formule gamétocytaire* : les expériences 1 et 5 (*tableau V*), indiquent que les gamétocytes jeunes (O ou I) sont très infectants.

2 — *L'état physiologique du gamétocyte* : seuls les gamétocytes de première vague, et, beaucoup plus faiblement, ceux de la seconde vague, sont infectants. Nous n'avons jamais d'infection chez les Moustiques pendant ou après la crise. Cela correspond, sur les frottis, à des altérations plus ou moins profondes de la morphologie, signalées au chapitre I.

Cet état physiologique dégénéré est en relation avec les conditions de croissance qu'il trouve dans le sang, comme le montrent les résultats consignés dans le *tableau VI*. Il suffit de moins de 2 heures de présence dans un sang neuf pour que des gamétocytes inactifs deviennent infectants. Très rapidement, dans les infections de Rongeurs de laboratoire, lorsque le parasitisme se développe, le sang ne permet plus une évolution normale ; le parasite subit des divisions plus ou moins anarchiques et, quel que soit leur âge, les gamétocytes ne sont plus infectants.

Il est important de noter que le test de l'exflagellation ne permet pas de juger de l'infectivité d'un type ou d'un autre de microgamétocytes, car les 4 types (O, I, II et III) peuvent exflageller et rester reconnaissables, même sur des frottis faits au cours de l'exflagellation.

IV. - Prise des gamétocytes par les Anophèles

Nous avons constaté, en étudiant l'infectivité des gamétocytes que, dans les cas où celle-ci est forte (*tableau V c*, expériences 1 à 6), nous observons, en comparant les formules gamétocytaires du sang prélevé par les techniques habituelles chez le Rongeur et du sang prélevé par l'Anophèle au même moment, un phénomène très remarquable. Le pourcentage de formes jeunes O-I, qui se sont révélées très infectantes, est beaucoup plus élevé dans l'estomac du Moustique.

Chez le Rongeur, le sang périphérique provient en réalité de gros vaisseaux ; qu'il s'agisse du sinus rétro-oculaire ou de la queue d'une Souris, l'expérimentateur prélève un sang différent de celui qui se trouve dans les fins capillaires ponctionnés par des Anophèles.

Les travaux de Pichon, Prod'hon et Rivière, 1975 et ceux de Petit, 1979, sur la façon dont les microfilaires sont prélevées par les Culicidés vecteurs, aboutissent aux conclusions suivantes : le nombre de parasites prélevés par les vecteurs ne dépend d'aucun tropisme particulier, mais découle d'une répartition des parasites selon une loi binomiale négative, le diamètre du parasite et celui du vaisseau dans lequel il circule étant seuls en cause (assimilation aux études mathématiques faites sur l'encombrement des voitures au péage d'une autoroute).

Toutes nos données préliminaires paraissent en accord avec ces notions. Les gamétocytes de type O-I atteignant des diamètres de 9,5 μ et même parfois 10,5 μ , seraient plus facilement retenus dans les capillaires.

V. - Comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par Hawking et coll. (1968)

Hawking, Worms and Gammage ont dès 1968 effectué une série de très belles expériences sur la chronologie de la schizogonie sanguine, de la maturité des gamétocytes et du pouvoir infectant, sur 3 espèces de *Plasmodium* : *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* et *P. cathemerium*. Les résultats sur la plus grande infectivité des gamétocytes de *P. cynomolgi* au cours de la nuit ont été confirmés par Garnham et Powers en 1974.

Les résultats que nous obtenons s'accordent avec ceux de Hawking et coll. sur 2 points essentiels : existence d'une périodicité dans la gamétocytémie et extrême brièveté du pouvoir infectant. Nos divergences essentielles portent sur 2 aspects : 1) *la morphologie des gamétocytes* : ceux qui sont figurés pour *P. cynomolgi* (qui nous intéresse plus particulièrement puisqu'il appartient au groupe « vivax ») ne sont pas, à notre avis, des formes infectantes ; les figures 15 et 16 (Planche en couleur face à la page 738) nous paraissent correspondre à des gamétocytes de type III séchés lentement et la figure 17 à des gamétocytes III altérés ; 2) *le mode de prélèvement du sang*, car il nous est apparu que, pour l'étude de ces phénomènes d'infectivité, c'est le sang capillaire (1) qui doit être pris en considération et non celui prélevé par les techniques habituelles chez l'hôte vertébré.

Enfin, les travaux de Hawking et coll. (1972) sur la périodicité des gamétocytes de *P. chabaudi* et *P. yoelii* portent essentiellement sur l'exflagellation, phénomène que nous n'avons pas étudié ici.

VI. - Résumé - Conclusions

L'analyse morphologique des gamétocytes de différentes souches de *Plasmodium yoelii* montre qu'il est possible de différencier 4 types (O - I - II - III) correspondant à l'âge et que de nombreux éléments précis caractérisent le gamétocyte altéré non infectant quel que soit son âge.

Ces données morphologiques nous paraissent constituer un outil de travail très utilisable pour aborder plusieurs problèmes intéressants du point de vue théorique et pratique. En effet, *P. yoelii* appartient au groupe « vivax » (Landau, Miltgen et Chabaud, 1976). Un examen d'autres espèces de ce groupe (*P. vinckei*, *P. chabaudi*, *P. cynomolgi*, *P. vivax*) indique que les différentes caractéristiques morphologiques des gamétocytes de *P. yoelii* se retrouvent chez tous.

(1) Nous admettons à titre provisoire que la composition du sang prélevé par le Moustique est celle du sang capillaire, ce qui n'est probablement qu'une simple approximation.

Une série d'expériences préliminaires nous fournit des données parfois inattendues sur différents problèmes :

1 — Infectivité des gamétocytes : ce sont les grandes formes jeunes qui paraissent les plus infectantes et peut-être même sont les seules infectantes.

2 — *P. yoelii* s'est révélé, au cours des infections expérimentales, n'avoir, chez la Souris blanche, une biologie normale de *Plasmodium* qu'en début d'infection : jusqu'au 3° - 4° jour pour *P. y. nigeriensis* et jusqu'au 5° - 6° jour chez *P. y. yoelii*. Après cette date, la multiplication des parasites devient anarchique et les gamétocytes ne sont plus infectants, bien qu'ils effectuent les différentes étapes de leur maturation.

Des gamétocytes transférés d'une Souris infectée à une Souris neuve acquièrent une forte infectivité moins de 2 heures après ce transfert. Ce phénomène est lié à l'état du milieu (métabolisme ? immunité ?). Les recherches de Gwadz (1976) et de Carter et Chen (1976) montrent que l'on peut bloquer l'évolution des gamétocytes de *P. gallinaceum* chez les vecteurs en immunisant l'hôte vertébré avec des préparations contenant des microgamètes libres. Ils obtiennent chez l'animal immunisé des troubles de l'exflagellation avec immobilisation des microgamètes. Ce phénomène est réversible si les gamétocytes sont transférés dans un sérum non immun où ils redeviennent infectants.

Certaines de leurs constatations rejoignent donc les nôtres : blocage de l'infectivité et non de la production de gamétocytes ; réacquisition d'une forte infectivité après transfert dans un sérum neuf. Cependant, leurs expériences n'ont pas la même signification que les nôtres, car la suppression de l'infectivité est obtenue chez *P. gallinaceum* par vaccination après inoculations répétées de microgamétocytes libres. De plus, nous observons régulièrement des exflagellations apparemment normales de *P. yoelii* entre lame et lamelle, même lorsque les gamétocytes ne sont plus infectants.

3 — Il est démontré que, dans les infections jeunes, la formule gamétocytaire du sang ingéré par l'Anophèle est beaucoup plus riche en formes jeunes que celle du sang du Rongeur prélevé à la queue au même moment. Ce phénomène explique vraisemblablement pourquoi le meilleur moment pour gorger un Anophèle est « la veille du jour où les premiers gamétocytes apparaissent dans le sang ». Ceci paraît correspondre aux particularités de la circulation dans les fins capillaires et non à un tropisme particulier.

4 — Les données sur la périodicité et la longévité des gamétocytes restent préliminaires, mais pourront être mieux précisées en utilisant la faculté d'une souche particulière (17 X) à produire des gamétocytes à partir des schizontes hépatiques (confirmation des travaux de Killick-Kendrick et Warren, 1968).

D'après les données actuelles, la périodicité des gamétocytes de *P. y. nigeriensis* serait courte (2 jours). Celle de *P. y. yoelii* apparaît moins nettement et pourrait être plus longue (3 jours ?).

La maturation jusqu'au stade III est très brève, puisque des gamétocytes de type III sont observés 78 heures après l'inoculation de sporozoïtes, c'est-à-dire 35 heures après la rupture des premiers schizontes hépatiques. La durée pendant laquelle un gaméto-cyte est infectant ne doit donc vraisemblablement pas dépasser une demi-journée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement MM. P. C. C. Garnham, W. Peters, J. Biguet et A. Ver-
nes d'avoir bien voulu relire et critiquer ce travail.

Bibliographie

- Carter R., Chen D.H. (1976) : Malaria transmission blocked by immunization with gametes of the malaria parasite. *Nature*, 263, 57-60.
- Garnham P.C.C., Powers K.G. (1974) : Periodicity of infectivity of Plasmodial gametocytes : the Hawking phenomenon. *Int. J. Parasitol.*, 4, 103-106.
- Gwadz R.W. (1976) : Malaria : Successful immunization against the Sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Science*, 193, 1150-1151.
- Hawking F., Gammage K., Worms M. (1972) : The asexual and sexual circadian rhythms of *Plasmodium vinckei chabaudi*, of *P. berghei* and of *P. gallinaceum*. *Parasitol.*, 65, 189-201.
- Hawking F., Worms M.J., Gammage K. (1968) : 24- and 48- hour cycles of malaria parasites in the blood ; their purpose, production and control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62, 731-761.
- Killick-Kendrick R., Warren M. (1968) : Primary exo-erythrocytic Schizonts of a Mammalian Plasmodium as a Source of gametocytes. *Nature, London*, 220, 191-192.
- Landau I., Miltgen, Chabaud A.G. (1976) : Les différents types de gamétocytes chez les Hémosporidies de Mammifères. Corrélations avec la morphologie des Schizontes tissulaires. Hypothèses sur l'évolution du groupe. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 51, 175-187.
- Petit G. (1979) : La filaire *Dipetalonema dessetae* : phénomènes de régulation et rendement parasitaire chez l'*Aedes* vecteur. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, sous presse.
- Pichon G., Prod'Hon J., Rivière F. (1975) : Recherche d'une loi de distribution des microfilaires ingérées par des Moustiques piquant un Filarien. Premiers résultats. *C.R. Acad. Sci.*, 280, ser. D, 717-719.
-