MÉMOIRES ORIGINAUX

INHIBITION DE L'INFECTIVITÉ DES GAMÉTOCYTES DE *PLASMODIUM* PAR LE SÉRUM DE L'HÔTE PARASITÉ

Mise au point d'un modèle expérimental¹

P. BASTIEN*, I. LANDAU**, D. BACCAM**

RÉSUMÉ. Au cours de nombreuses infections paludéennes expérimentales, l'inféctivité des gamétoctes pour l'Anophèle diminue brutalement, de façon précoce et indépendamment de la production d'anticorps circulants. Ainsi l'inféctivité de *Plasmodium yoelii nigeriensis* pour *Anopheles stephensi* est maximum le 2^e jour et s'annule dès le 5^e jour de l'infection chez la Souris blanche.

Le comportement de la souche plasmodiale chez l'hôte, et particulièrement le phénomène de « crise », a été étudié dans des conditions expérimentales standardisées.

La perte d'inféctivité débute juste avant le pic de parasitémie et coïncide avec une augmentation importante du nombre de gamétoctes circulants. Ces événements précèdent de peu la « crise ». La perte d'inféctivité est d'autant plus brutale et précoce que la « crise » est sévère et l'infection virulente.

Des travaux antérieurs ayant indiqué que l'inhibition de l'inféctivité des gamétoctes était liée à la présence d'un facteur sérique, les recherches ont été orientées vers la mise au point d'un modèle expérimental permettant l'identification de ce facteur.

L'injection intraveineuse de sérum du 5^e jour directement à des Souris en période de forte inféctivité n'a pas entraîné de perte d'inféctivité des gamétoctes chez les Souris receveuses.

Nous avons alors étudié les effets *in vitro* de l'adjonction de sérum du 5^e jour à du sang de Souris parasitée contenant des gamétoctes infectants chez des *Anopheles stephensi* gorgés par nutrition artificielle. Cette étude a montré une diminution hautement significative de l'inféctivité des gamétoctes mis en présence de sérum inhibiteur. Cette inhibition est immédiate et ne paraît pas « dose-dépendante ». Inversement, le sérum de Souris encore infectantes n'inhibe pas l'inféctivité.

Le modèle expérimental mis au point comprend donc : a) un mélange de sang contenant des gamétoctes infectants de *P. y. nigeriensis* et de sérum dont on veut tester l'effet inhibiteur ; b) des *Anopheles stephensi* gorgés par nutrition artificielle qui permettent de quantifier l'inféctivité des gamétoctes mis en présence de sérum sain (témoin) ou de sérum inhibiteur.

Ce modèle s'est révélé fiable et devrait permettre l'étude de tout facteur susceptible de modifier l'inféctivité des gamétoctes de *Plasmodium* pour l'Anophèle.

Mots-clés : *Plasmodium yoelii nigeriensis*, Gamétoctes. Inféctivité. Sérum inhibiteur.

* Laboratoire d'Helminthologie et de Parasitologie Comparée, École Pratique des Hautes Études, 61, rue Buffon, F 75231 Paris Cedex 05.

** Laboratoire de Zoologie (Vers), Associé au C. N. R. S., Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue Buffon, F 75231 Paris Cedex 05.

1. Travail effectué grâce à une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé (M2/181/70/B).

Accepté le 8 décembre 1986.

Inhibition of the infectivity of *Plasmodium* gametocytes by serum of the infected host: setting-up of an experimental model.

SUMMARY. In the course of experimental malarial infections the infectivity of the gametocytes falls abruptly and at an early stage of the infection. This phenomenon is independent of the production of circulating antibodies.

With *Plasmodium yoelii nigeriensis* infecting the white mouse, the maximum infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* occurs on day 2, and on day 5 no more oocysts develop in the mosquito.

The behaviour of the plasmodial strain in the mouse and particularly the « crisis » phenomenon were studied in detail in standardized experimental conditions.

The decrease of the infectivity for the *Anopheles* begins just before the peak of parasitaemia, and a concomitant increase in the number of circulating gametocytes is observed. These events are very shortly followed by the crisis. The more severe is the crisis and virulent the infection, the earlier and more abrupt is the loss of infectivity.

Previous studies having shown that this inhibition of the gametocytes infectivity was linked to a serum factor, our research aimed at setting up an experimental model allowing the identification of this factor.

The intravenous injection of 5th day serum to mice harbouring infective gametocytes did not determine any loss of the gametocytes infectivity in the receiving mice.

In order to study *in vitro* the effect of the 5th day serum, this one was added to blood from mice with highly infective gametocytes, and mosquitoes were fed on this through a membrane. As a result, a significant decrease of the infectivity of gametocytes was observed. This inhibition is immediate and does not appear to be « dose-dependent ». Inversely, serum from mice still infective to the mosquito did not reduce the infectivity of the gametocytes.

The experimental model set up thus comprises: a) mouse blood containing *P. y. nigeriensis* infective gametocytes to which is added the serum to be tested; b) *Anopheles stephensi* fed through a membrane; this allows quantifying the infectivity of the gametocytes in the presence of normal serum (control) or inhibitory serum.

This model proved to be reliable; it should promote the study of any factor likely to modify the infectivity of *Plasmodium* gametocytes to the mosquito.

Key-words: *Plasmodium yoelii nigeriensis*. Gametocytes. Infectivity. Inhibiting serum.

Introduction

Au cours de nombreuses infections paludéennes expérimentales, l'infectivité des gamétocytes pour l'Anophèle diminue brutalement au moment du pic de parasitémie et lorsque la gamétocythémie est particulièrement forte (Vandenberg et Gwadz, 1980).

Dans ce cadre, *Plasmodium yoelii nigeriensis* Killick-Kendrick, 1973, occupe une place privilégiée, puisque l'annulation de l'infectivité pour l'Anophèle à partir de la Souris Swiss y est extrêmement précoce (Landau et coll., 1979), ce qui exclut *a priori* l'action d'un facteur immunologique spécifique (O. M. S., 1984).

Une première tentative d'explication de ce phénomène a été fournie par Petit et coll. (1982) qui ont mis en évidence *in vivo* l'action inhibitrice du sérum de Souris

très parasitées sur l'infektivité des gamétocytes. Cependant, le protocole utilisé basé sur le transfert de gamétocytes à des Souris neuves, s'est avéré relativement complexe et difficile à reproduire (Petit, comm. pers.).

Nous avons donc cherché à mettre au point un nouveau modèle expérimental permettant l'étude de ce phénomène.

Il nous est apparu indispensable, dans un premier temps, d'étudier le comportement de la souche plasmodiale chez la Souris dans différentes conditions expérimentales, afin d'établir le protocole le plus adapté. Puis, nous avons tenté de reproduire les résultats de Petit et coll. *in vivo* en étudiant l'action du sérum inhibiteur sur l'infektivité des gamétocytes directement chez la Souris infectante.

Enfin, nous avons mis au point un modèle fiable *in vitro* basé sur une technique de nutrition artificielle des Anophèles. Dans la discussion, nous interpréterons les résultats en fonction du déroulement de l'infection chez l'hôte et tenterons d'analyser le phénomène d'inhibition de l'infektivité.

Matériel et méthodes

A — MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1 — *Souche plasmodiale* : *Plasmodium yoelii nigeriensis* Killick-Kendrick, 1973 a été choisi pour cette étude en raison de sa grande virulence chez la Souris blanche et de la précocité de la chute d'infektivité des gamétocytes pour l'Anophèle. La souche que nous avons utilisée au départ (641 DR) est issue d'une souche donnée au Laboratoire en 1978 par Killick-Kendrick (746 LA), entretenue par deux passages de sang et un passage de sporozoïtes chez la Souris blanche, puis congelée dans l'azote liquide.

2 — *Vecteur* : *Anopheles stephensi*, élevé au Laboratoire, et issu d'un élevage établi par Shute et Maryon (1966) en Angleterre.

3 — *Hôte vertébré* : Souris blanches Swiss (Iffa Credo, IOPS-OF1), non consanguines, de sexe mâle, âgées de 4 à 8 semaines, élevées au Laboratoire.

B — INFECTION EXPÉRIMENTALE CHEZ LA SOURIS

1 — *Préparation d'un stock de sang congelé* : il a été constitué à partir d'un stock antérieur, après inoculation à la Souris, transmission au vecteur et passage de sporozoïtes, puis second passage de sang à un lot de 15 Souris. Au troisième jour d'infection, le « pool » de sang de ces Souris était réparti en aliquotes et congelé à -196°C (= stock 164 XT).

2 — *Inoculations à la Souris* :

A partir du stock de sang congelé (164 XT) : immédiatement après décongélation, 16×10^6 parasites (vivants ou tués) par Souris étaient inoculés par voie intra-veineuse (IV) à un lot de 4 à 8 Souris.

A partir du sang de *Souris infectée* : 4×10^6 parasites par *Souris* étaient inoculés par voie IV à un lot de 6 à 12 *Souris*. La *Souris* donneuse était prélevée au 3^e jour d'infection après inoculation de sang décongelé.

3 — *Étude de la parasitémie* : L'évolution des parasitémies a été suivie quotidiennement, à l'aide de frottis sanguins prélevés à la queue, jusqu'au 11^e jour pour un lot de *Souris* infectées à partir de sang décongelé, et jusqu'au 6^e jour pour la plupart des autres lots. Les parasitémies sont évaluées en pourcentages.

C — ÉTUDE DE L'INFECTIVITÉ POUR L'ANOPHÈLE

1 — *Par gorgement direct des Anophèles* : L'évolution de l'infektivité des gamétocytes a été suivie jusqu'à J6 après inoculation de sang décongelé et J5 après passage de sang frais. Pour ce faire, une cage d'*Anophèles* a été gorgée pendant 45 à 60 minutes, sur une *Souris*, chaque jour différent, d'un même lot. Les femelles gorgées étaient triées dans un délai de 24 heures. Sept jours après le gorgement, l'estomac de 20 à 30 de ces *Anophèles* était disséqué et observé à fort grossissement et tous les oocystes comptés. Les résultats sont exprimés en moyenne d'oocystes par *Anophèle*.

2 — *Par nutrition artificielle* : Nous avons utilisé cette technique pour gorger des *Anophèles* à travers une membrane sur le sang d'une *Souris* infectante mélangé, d'une part à du sérum de *Souris* saines (témoin), d'autre part à du sérum de *Souris* parasitées, et maintenu à 37°8 C.

Une membrane (Parafilm R) est tendue à l'extrémité inférieure des chambres de nutrition, et celles-ci sont disposées sur chaque cage d'*Anophèles*. Une quantité de sang de 0,6 ml ou plus est prélevée au sinus rétro-oculaire de la *Souris* choisie à l'aide de pipettes Pasteur héparinées, déposée dans une salière et mélangée au sérum à tester, puis déposées dans la chambre de nutrition. Les *Anophèles* sont alors gorgés à travers la membrane pendant 15 à 20 minutes. Le délai maximum entre le prélèvement sanguin et le début du gorgement est de 3 minutes.

D — PRÉPARATIONS DES SÉRUMS

Ils ont été préparés à partir d'un lot de *Souris* saines (sérum témoin) et d'un lot de *Souris* très parasitées. Le sang était prélevé au sinus rétro-oculaire, à l'aide de pipettes Pasteur non héparinées. Le sang de toutes les *Souris* d'un même lot était mélangé. Les sérums ont toujours été utilisés (inoculation aux *Souris*, nutrition artificielle, ou congélation) dans un délai de trois heures après le prélèvement.

Résultats

A — ÉTUDE DE L'INFECTION PAR « *PLASMODIUM YOELII NIGERIENSIS* » CHEZ LA SOURIS SWISS

1 — *Évolution de la parasitémie*. Chez les *Souris* infectées à partir de sang frais (fig. 1 a) : la parasitémie devient patente le lendemain de l'inoculation (J1),

FIG. 1. — *P. yoeli nigeriensis* : courbes de parasitémie et d'infectivité pour l'Anophèle après inoculation de sang frais ou de sang décongelé à la Souris Swiss.

L'inoculation a lieu au jour 0.

Les parasitemies sont exprimées en pourcentages, l'infectivité en nombre moyen d'oocystes par Anophèle.

(a) Parasitemies après inoculation de sang frais ; (b) Infectivité après inoculation de sang frais ; (c) Parasitemies après inoculation de sang décongelé ; (d) Infectivité après inoculation de sang décongelé.

s'élève très rapidement pour atteindre un pic au 3^e jour, puis chute brutalement vers un minimum atteint le 6^e jour. Elle remonte alors progressivement vers des taux élevés.

Chez les Souris infectées directement à partir de sang décongelé (*fig. 1 c*) : la parasitémie n'apparaît qu'au 2^e jour d'infection, puis monte rapidement vers un pic plus étalé (deux jours au lieu d'un) aux 4^e et 5^e jours. Elle baisse ensuite jusqu'au 7^e-8^e jour, puis remonte également vers des taux élevés.

2 — *Évolution de l'infectivité pour l'Anophèle*. Chez les Souris infectées à partir de sang frais (*fig. 1 b*), elle présente un pic très élevé et précoce, au 2^e jour d'infection, puis s'annule très vite, dès le 5^e jour après l'inoculation. Chez les Souris infectées à partir de sang décongelé (*fig. 1 d*), le pic est moins précoce et plus étalé, aux 3^e et 4^e jours ; l'annulation de l'infectivité pour l'Anophèle a lieu au 6^e-7^e jour.

Le pic d'infectivité précède toujours le pic de parasitémie et la chute de l'infectivité commence au moment où la parasitémie est la plus élevée.

3 — *Aspects morphologiques : notion de « crise »*. Pour l'interprétation des courbes de parasitémie et d'infectivité, il nous a paru important d'étudier parallèlement l'allure de l'infestation sanguine et les transformations au niveau du sang de l'hôte.

La notion de « crise » dans les infections expérimentales est essentielle, puisqu'elle sépare grossièrement l'infection en deux temps, l'un où les gamétocytes sont infectants, le second où ils ne le sont plus. Selon Garnham (1966), la « crise » est « une baisse brutale de la parasitémie associée à l'installation d'une anémie ». Nos observations des frottis sanguins ont permis de détailler ce phénomène.

. *Avant la « crise » :*

— Au tout début de l'infection, les parasites n'envahissent que des réticulocytes ; puis de plus en plus d'hématies mûres sont infestées. Les gamétocytes sont rares dans le sang prélevé à la queue de l'animal, et sont tous jeunes, ou mûrs (0 et 1 selon la classification de Landau et coll., 1979).

— Peu avant la « crise » (*fig. 2 a*), seules les hématies mûres sont parasitées ; les réticulocytes sont rares. Les gamétocytes commencent à envahir le sang prélevé à la queue et on voit apparaître quelques stades plus âgés (II et III selon la classification de Landau et coll., 1979) et des altérations telles que vacuolisation et condensation du noyau.

FIG. 2. — Frottis sanguins chez la Souris infectée par *P. yoelii nigeriensis* ($\times 1\,000$) : a) *Peu avant la crise* : tous les parasites sont intra-cellulaires ; les réticulocytes sont rares ; les gamétocytes sont de morphologie normale ; noter 2 microgamétocytes (flèches) ; b) *Pendant la crise* : apparition d'hématies lysées (étoiles) et de parasites extra-cellulaires ; les réticulocytes sont encore rares ; les gamétocytes sont normaux ou altérés : microgamétocyte normal (flèche), microgamétocyte altéré (flèche grasse) ; c) *Deux jours après la crise* : nombreux débris et parasites extra-cellulaires ; nombreux réticulocytes, polyparasités ; les gamétocytes sont tous altérés : microgamétocyte (flèche grasse) et microgamétocyte (étoile).

Fig. 2.

— Ces caractéristiques s'accroissent au moment de la « crise », en même temps que survient une hémolyse (*fig. 2 b*).

. *Après la « crise » (fig. 2 c) :*

— On observe des signes d'hémolyse : raréfaction des hématies sur le frottis, apparition d'hématies altérées ou lysées, de parasites extracellulaires et de débris cellulaires, de plus en plus nombreux pendant quelques jours.

— Il y a davantage de réticulocytes parasités dès le premier jour suivant la « crise » ; la réticulocytose devient rapidement évidente et les réticulocytes constituent la majorité des cellules parasitées le 3^e jour après la crise. Pendant toute la remontée de la parasitémie, les formes asexuées n'occupent à nouveau que des réticulocytes.

— Les gamétocytes sont très abondants dans le sang prélevé à la queue, mais tous sont altérés, quel que soit leur stade ; en outre, les stades âgés (II et III) sont les plus nombreux.

Notons que la « crise » est intimement liée à la virulence de l'infection, et survient plus tardivement (dans notre protocole) après l'inoculation de sang décongelé qu'après celle de sang frais.

Quelques Souris (10 sur 149), dites « non malades », échappent à ce modèle, et ne présentent pas de crise nette ; elles sont caractérisées, pendant la première semaine d'infection, par des parasitémies très basses, l'absence d'anémie, et une réticulocytose plus abondante et plus précoce.

4 — *Relations parasitémie-infectivité.* Très généralement, une parasitémie relativement faible chez la Souris favorise une plus grande infectivité pour l'Anophèle : les moyennes de 300 à 400 oocystes par Anophèle sont observées pour des parasitémies de 4 à 20 % et inversement, au-dessus de 45 % d'hématies parasitées, l'infectivité est très faible ou nulle. En fait, la notion de « crise » semble ici très importante.

Avant le pic d'infectivité, donc avec des parasitémies inférieures à 20 %, l'infectivité augmente avec la parasitémie, de façon considérable : une parasitémie 2 à 5 fois plus élevée, pour le même jour d'infection, correspond à une infectivité 10 à 70 fois plus grande, avec de larges variations individuelles.

Cette relation, très marquée au tout début de l'infection, s'amenuise à mesure qu'on se rapproche de la crise et que la parasitémie devient élevée, c'est-à-dire qu'une parasitémie plus forte (dans un même lot de Souris) correspond de moins en moins à une infectivité plus grande.

Juste avant, puis après la crise, les rapports entre parasitémie et infectivité changent : une parasitémie identique (20 % par exemple) au début de l'infection et après la crise donnera 400 oocystes par Anophèle avant et seulement 100 oocystes après. L'infectivité apparaît ici d'autant plus faible que la parasitémie est élevée. Mais c'est plutôt l'évolution préalable de l'infection chez la Souris et l'importance de la crise qui sont déterminantes : en d'autres termes, un pic de parasitémie élevé suivi d'une crise sévère entraîne une annulation brutale de l'infectivité ; inverse-

ment, les Souris « non malades » qui n'ont pas eu de crise nette, ont une infectivité prolongée qui, au 5^e-6^e jour est 3 à 40 fois plus élevée que les autres (même pour des parasitémiées équivalentes).

5 — *Relations infectivité-gamétocytes circulants.* Nous avons retrouvé les phénomènes déjà décrits par Landau et coll. en 1979 : l'infectivité pour l'Anophèle est maximum alors que les gamétocytes sont très peu abondants dans le sang « circulant » (prélevé à la queue), un jour avant le pic de parasitémie. La baisse brutale d'infectivité s'accompagne d'une part d'une irruption des gamétocytes dans le sang « circulant », d'autre part d'altérations et de modifications morphologiques, attribuées au « vieillissement » de ces gamétocytes.

En conclusion. L'utilisation d'un même stock de sang congelé et du même protocole d'inoculation permet d'obtenir des infections « standardisées » chez la Souris Swiss dans plus de 90 % des cas. L'infection suivant l'inoculation de sang décongelé est ici plus tardive et s'étale davantage dans le temps que celle après inoculation de sang frais.

— L'infection est caractérisée par un pic très précoce et une annulation rapide de l'infectivité pour l'Anophèle. La chute de l'infectivité commence avant le moment où la parasitémie est la plus élevée.

— Son annulation est d'autant plus brutale et précoce que le pic de parasitémie est lui-même précoce et élevé, et que la « crise » qui en découle est sévère.

— L'infectivité pour l'Anophèle n'est pas en rapport avec la gamétocythémie « apparente » chez la Souris mais étroitement liée à la morphologie et à la qualité des gamétocytes visibles sur les frottis.

B — INHIBITION DE L'INFECTIVITÉ DES GAMÉTOCYTES PAR LE SÉRUM DE SOURIS PARASITÉES : MISE AU POINT DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL

1 — ÉTUDE « IN VIVO » : INJECTION DU SÉRUM A DES SOURIS INFECTÉES

a — *Description du protocole*

Principe : des Anophèles sont d'abord gorgés pendant 30 minutes sur deux lots de Souris receveuses à l'infectivité élevée. Immédiatement après, celles-ci reçoivent en IV : pour le premier lot, du sérum de Souris parasitées ayant perdu leur infectivité (dit « inhibiteur ») et, pour le lot témoin, du sérum de Souris saines. Après un certain délai (1 heure à 3 heures), les deux lots sont donnés à gorgier à de nouveaux Anophèles pendant 45 à 60 minutes. L'infectivité pour chaque Souris, avant et après injection de sérum, est évaluée par comptage des oocystes pour 20 Anophèles, 6 à 8 jours plus tard.

Le sérum inhibiteur testé a été prélevé au 5^e ou au 6^e jour d'infection après inoculation de sang frais, chez des Souris qui avaient eu un pic de parasitémie supérieur à 30 % au troisième jour (*fig. 1 a et b*). Les Souris « non malades » étaient exclues de l'expérience.

Les gorgements après infection de sérum du 5^e jour ont eu lieu 1 heure après l'injection dans une première expérience, 3 heures après dans une deuxième expérience, et 2 heures puis 20 heures dans la troisième. Le sérum du 6^e jour a été testé 1 heure, puis 18 heures après l'injection.

Les Souris receveuses étaient en début d'infectivité (avant le pic), au 2^e jour d'infection après inoculation de sang décongelé (*fig. 1 d*).

La quantité de sérum injectée était de 0,5 ml par Souris. Une quantité plus importante risquerait d'entraîner la mort de la Souris.

b — Résultats

Aucune action nette du sérum inhibiteur n'a pu être mise en évidence par ces expériences.

Dans presque tous les cas, l'injection IV, qu'il s'agisse de sérum sain ou inhibiteur, a provoqué une baisse d'infectivité immédiate (à 1 heure) de 50 % en moyenne (effet de chasse ? dilution ?) ; puis l'infectivité a repris sa courbe ascendante.

2 — MODÈLE « IN VITRO » : ÉTUDE EN NUTRITION ARTIFICIELLE

Les Souris infestantes donneuses de gamétocytes sont sélectionnées avec une parasitémie de 4 à 12 % trois jours après inoculation de sang décongelé.

Le sérum inhibiteur a été prélevé au 5^e jour après inoculation de sang frais, lorsque l'infectivité pour l'Anophèle est quasi nulle (*fig. 1 b*), chez des Souris ayant eu un pic de parasitémie supérieur à 30 %. Inversement, le sérum *a priori* inactif a été prélevé à 2 jours 1/2, lorsque l'infectivité est encore élevée.

Quatre types d'expériences ont été réalisés, différant par le sérum testé (*tableau I*) :

a — *Effet du sérum du 5^e jour* (0,3 ml sérum + 0,3 ml sang) : dilué à moitié avec le sang infectant, le sérum du 5^e jour provoque une diminution de l'infectivité des gamétocytes pour l'Anophèle de 75 % en moyenne par rapport au sérum de Souris saines) $p < 0,001$).

b — *Effet du sérum du 5^e jour après congélation* (0,3 ml sérum + 0,3 ml sang) : la congélation n'altère en rien l'effet inhibiteur de ce sérum, puisqu'il diminue l'infectivité pour l'Anophèle de 79 % par rapport à du sérum de Souris saines également congelé.

c — *Effet du sérum du 5^e jour en plus faible proportion* (0,1 ml sérum + 0,4 ml de sang) : cette proportion de 20 % a été testée afin de mettre en évidence une éventuelle relation « effet dose » dans l'action du sérum. En fait, l'inhibition persiste ici identique à celle des expériences précédentes (71 %).

d — *Effet du sérum de 2 jours 1/2* (0,3 ml sérum + 0,3 ml sang) : dans cette expérience, aucune modification significative de l'infectivité pour l'Anophèle n'a été observée.

TABLEAU I. — Effet du sérum de souris parasitées depuis 5 jours et 2 jours 1/2 sur l'infectivité des gamétocytes de *P. yoelii nigeriensis* pour l'Anophèle en nutrition artificielle.

L'infectivité est exprimée en nombre moyen d'oocystes par Anophèle.

Sg : sang de souris au 3^e jour d'infection ; SSS : sérum de souris saines ; SSP : sérum de souris parasitées. NS : non significatif.

Expérience	Souris	Nombre moyen d'oocystes par Anophèle		Rapport infectivité SSS/SSP	Degré de signification * (test U de Mann-Whitney)
		Sg + SSS (témoin)	Sg + SSP (test)		
Sérum du 5 ^e jour (immédiatement après prélèvement) 50 % sang + 50 % sérum	A	79	12	6,6/1	$p < 0,001$
	B	76,5	16,2	4,7/1	$p < 0,001$
	C	104,4	14	7,5/1	$p < 0,001$
	D	84	57,2	1,5/1	NS
	E	102,2	27	3,8/1	$p < 0,01$
	F	55	29,4	1,9/1	$p < 0,05$
	G	55	18,2	3,0/1	$p < 0,001$
	H	102	17,6	5,8/1	$p < 0,001$
Sérum du 5 ^e jour après congélation 50 % sang + 50 % sérum	I	129	5	25,7/1	$p < 0,001$
	J	16	4	4,0/0	$p < 0,001$
	K	18,7	4	4,7/1	$p < 0,001$
	L	82,3	11,5	7,2/1	$p < 0,001$
	M	33,4	11,7	2,8/1	$p < 0,01$
Sérum du 5 ^e jour en plus faible % 80 % sang + 20 % sérum	N	22,6	7,8	2,9/1	$p < 0,01$
	O	73,7	20,3	3,6/1	$p < 0,01$
Sérum de 2 jours 1/2 (immédiatement après prélèvement) 50 % sang + 50 % sérum	T	35,7	20,8	1,7/1	NS
	U	80,2	140	0,6/1	NS
	V	91,3	124	0,7/1	NS
	W	61,1	93,6	0,6/1	NS

* Test U de Man-Whitney (non paramétrique) : les différences entre le gorgement test et le témoin sont hautement significatives pour chaque souris des expériences avec sérum du 5^e jour (excepté la souris D), non significatives pour les autres.

Discussion

Nous avons mis au point un modèle *in vitro* permettant l'étude de l'infectivité des gamétocytes de *P. yoelii nigeriensis* pour l'Anophèle, et en particulier, son inhibition, spontanée ou expérimentale.

. L'étude du comportement de la souche plasmodiale chez la Souris Swiss a permis :

— d'obtenir dans 90 % des cas des infections « standardisées » pour des conditions expérimentales définies,

— de confirmer l'importance fondamentale de la notion de « crise » au cours de l'infection, correspondant à la chute de la parasitémie après le pic,

— de mettre en évidence un pic d'infectivité pour l'Anophèle extrêmement précoce, précédant le pic de parasitémie et suivi d'une baisse brutale avec annulation dès le 5^e jour.

. L'étude *in vivo* de l'action du sérum prélevé au 5^e jour sur l'infectivité des gamétocytes n'a pas permis de retrouver les résultats de Petit et coll. (1982). Ceux-ci avaient démontré l'action inhibitrice de ce sérum sur l'infectivité des gamétocytes par un transfert de gamétocytes infectants à des Souris neuves, immédiatement suivi par l'injection IV de sérum de Souris au 5^e jour d'infection, ou de Souris saines pour le lot témoin. L'infectivité des gamétocytes chez les Souris ayant reçu, une demi-heure avant, le sérum du 5^e jour, était quasi nulle par rapport aux témoins. Cependant, ces résultats n'ont pu être reproduits que dans 4 expériences sur 8. Avec notre protocole, l'injection IV de sérum directement aux Souris infectantes a entraîné une baisse d'infectivité immédiate d'environ 50 %, mais ce aussi bien avec le sérum sain qu'avec le sérum du 5^e jour. L'action inhibitrice de ce sérum sur l'infectivité n'est donc pas facile à objectiver *in vivo*, probablement en raison de facteurs liés à l'hôte qui restent à découvrir.

. Par contre, l'étude *in vitro*, par nutrition artificielle des Anophèles sur un mélange de sang infectant + sérum « inhibiteur », a mis en évidence une réduction hautement significative de l'infectivité des gamétocytes sous l'effet du sérum du 5^e jour. Cette inhibition par le sérum est immédiate. Elle n'apparaît pas « dose-dépendante », puisqu'elle se produit de façon identique lorsque la proportion de sérum par rapport au sang n'est plus que de 20 %. En outre, cette proportion étant celle obtenue lors de nos expériences *in vivo* (0,5 ml de sérum injecté à une Souris possédant 2 ml de sang), l'absence d'inhibition par ce même sérum *in vivo* ne peut pas s'expliquer simplement par une plus grande dilution chez l'hôte.

Inversement, le sérum prélevé 12 heures environ avant la « crise », à un moment où l'infectivité est encore forte et les parasitémies déjà élevées (23 à 40 %), ne modifie pas l'infectivité de façon significative.

. Ce modèle *in vitro* offre des avantages considérables par rapport à l'expérimentation *in vivo* :

— simplicité et rapidité d'exécution, grâce à la suppression, des injections IV de sérum, et à la réduction de moitié du nombre de Souris utilisées et de lots d'Anophèles à disséquer,

— facilité d'interprétation, le gorgement témoin et le gorgement « test » ayant lieu simultanément et à partir du même sang (au lieu de deux Souris différentes et plusieurs heures d'intervalle),

— enfin, meilleur contrôle des conditions de l'expérience.

. L'inhibition précoce, chez la Souris, de l'infectivité des gamétocytes de *P. yoelii nigeriensis* pour l'Anophèle, est donc en relation avec un facteur sérique

qui apparaît au cours de l'infection. Son apparition semble dépendre de l'évolution préalable de l'infection chez l'hôte : l'inhibition se produit en effet d'autant plus précocement que la parasitémie a atteint un pic élevé et que la « crise » est sévère. Douze heures environ avant la « crise », il semble que ce facteur soit absent, ou présent en quantité insuffisante pour inhiber efficacement l'infectivité des gamétocytes *in vitro*. Par ailleurs, l'action de ce facteur sérique *in vitro* est immédiate. Enfin, cette inhibition est réversible *in vivo* lorsque des gamétocytes sont transférés à une Souris neuve (Landau et coll., 1979).

La nature du facteur inhibiteur reste à déterminer. L'inhibition de l'infectivité chez l'hôte peut être due à l'absence d'un substrat essentiel pour le gamétocyte, substrat qui pourrait être d'origine érythrocytaire (Rosenberg et coll., 1984) et s'épuiser en cas de parasitémie élevée ou *a fortiori* d'hémolyse. Néanmoins, le fait que le sérum soit actif lorsqu'il ne constitue que 20 % du milieu où baignent les gamétocytes, va un peu à l'encontre de cette hypothèse.

En ce qui concerne d'éventuels facteurs immunologiques, leur activité contre les gamétocytes est loin d'être clairement démontrée en dehors d'une immunisation active spécifique. Carter et coll. (1979a) ont mis en évidence la production chez le Poulet d'anticorps anti-gamètes bloquant la transmission de *P. gallinaceum* non seulement après immunisation active par des gamètes, mais aussi au cours de la primo-infection chez le Poulet non immunisé. Dans ce dernier cas, cependant, la production d'anticorps anti-gamètes est faible, inconstante, et surtout retardée de plus d'une semaine par rapport à la chute de l'infectivité pour l'Anophèle (qui débute au 6^e jour d'infection). De plus, dans le cas de *P. berghei* et de *P. knowlesi*, cette perte d'infectivité ne s'accompagne qu'inconstamment d'anticorps antigamétocytes dans le sérum (Vandenberg et Gwadz, 1980). Enfin, la présence d'anticorps antigamétocytes dans le sérum de patients infectés par *P. falciparum* ne semble pas modifier l'activité de ces gamétocytes (Carter et coll., 1979b).

Néanmoins, l'importance de l'immunité à médiation cellulaire dans le contrôle précoce de l'infection est maintenant largement établie (Brown et coll., 1984 ; Ockenhouse et Shear, 1983 ; Weidanz et Grun, 1983). Son rôle éventuel dans la chute de l'infectivité au moment de la « crise » reste à préciser.

Enfin, une dernière hypothèse fait appel à la production d'un facteur toxique ou inhibiteur, par les hématies parasitées ou le parasite lui-même ou ses débris, lors de l'hémolyse. Maurois et coll. (1985) ont ainsi démontré une diminution de 50 % de l'activité lécithine-cholestérol-acyltransférase (LCAT) au moment du pic de parasitémie dans le sérum de Souris parasitées par *P. chabaudi* ; ce phénomène serait dû à l'action d'inhibiteurs circulants provenant des hématies parasitées. Ainsi des facteurs qui sont en partie à l'origine de la « crise » pourraient aussi participer à l'inhibition de l'infectivité des gamétocytes.

L'étude de l'action des sérums de Souris parasitées sur les gamétocytes devrait permettre d'étayer l'une de ces hypothèses. Le modèle *in vitro* ici mis au point paraît parfaitement adapté à la poursuite d'une telle étude, et peut être élargi à l'étude de tout facteur susceptible de modifier l'infectivité des gamétocytes de *Plasmodium* pour l'Anophèle.

BIBLIOGRAPHIE

- BROWN I. N., DOCKRELL H. M., DE SOUZA J. B., PLAYFAIR J. H. L. : Blood-stage malaria in Biozzi high and low antibody responder mice: the importance of antibody and macrophages in immunity. *Ann. Immunol.*, 1984, *135 C*, 231-240.
- CARTER R., GWADZ R. W., GREEN I. : *Plasmodium gallinaceum* : transmission-blocking immunity in chickens. II. The effect of anti-gamete antibodies *in vitro* and *in vivo* and their elaboration during infection. *Exp. Parasitol.*, 1979a, *47*, 194-208.
- CARTER R., GWADZ R., GREEN I., AJDUKEINICZ A. B. : Antibodies to sexual stages of *Plasmodium falciparum* in the Gambia, their distribution, stage specificity and significance in malaria transmission. Trans. 3rd Meeting Scient. Work. Group on the Immunology of Malaria, Panama, 1979. *UNDP-WHO Techn. Reports Series*, 1979b, 105-121.
- GARNHAM P. C. C. : Malaria parasites and other haemosporidia. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, 1966 (1 114 p.), 211.
- KILLICK-KENDRICK R. : Parasitic protozoa of the blood of rodents. 1. The life cycle and zoogeography of *Plasmodium berghei nigeriensis* subsp. nov. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1973, *67*, 261-277.
- LANDAU I., MILTGEN F., BOULARD Y., CHABAUD A. G., BACCAM D. : Études sur les gamétocytes des *Plasmodium* du groupe « vivax » : morphologie, évolution, prise par les Anophèles et infectivité des microgamétocytes de *Plasmodium yoelii*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1979, *54*, 145-161.
- MAUROIS P., PESSAH M., BRICHE I., ALCINDOR L. G. : Alterations of lecithin-cholesterol-acyl-transferase activity during *Plasmodium chabaudi* rodent malaria. *Biochimie*, 1985, *67*, 227-239.
- OCKENHOUSE C. F., SHEAR H. L. : Malaria-induced lymphokines: stimulation of macrophages for enhanced phagocytosis. *Infect. Immun.*, 1983, *42*, 733-739.
- O. M. S. : Asexual blood stage and transmission-blocking antigens of *Plasmodia*. Report of the Sixth Meeting of the Scientific Working Group on the Immunology of Malaria, Genève, 1984. Document OMS/TDR, INMAL/SWG (6)/84-3 (43 p.), 1984.
- PETIT G., CAMUS D., DEI-CAS E., LANDAU I. : Inhibition immédiate de l'infectivité des gamétocytes de *Plasmodium yoelii nigeriensis* par le sérum de rongeurs infectés depuis 5 jours. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1982, *57*, 507-508.
- ROSENBERG R., KOONTZ L. C., ALSTON K., FRIEDMAN F. K. : *Plasmodium gallinaceum* : Erythrocyte factor essential for zygote infection of *Aedes aegypti*. *Exp. Parasitol.*, 1984, *57*, 158-164.
- SHUTE P. G., MARYON M. : Laboratory techniques for the study of malaria. *J. & A. Churchill*, London, 1966.
- VANDENBERG J. P., GWADZ R. W. : The transmission by mosquitoes of *Plasmodia* in the laboratory. In : Malaria, vol. 2, Pathology, vector studies, and culture (Kreier J. P., ed.). *Academic Press*, London, 154-227.
- WEIDANZ W. P., GRUN J. L. : Antibody-independent mechanisms in the development of acquired immunity to malaria. In : « Host defenses to intracellular pathogens » (Advances in experimental medicine and biology, vol. 162) (Eisenstein T. K., Actor P., Friedman H., eds.). *Plenum Press*, New York, 409-423.