INHIBITION COMPLÈTE DE LA TRANSMISSION CYCLIQUE PAR IMMUNISATION CONTRE LES OOKINÈTES DE *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA

A. SAID, M. WERY

RÉSUMÉ. Un antisérum dirigé contre les ookinètes de *P. berghei* Anka reconnaît spécifiquement les ookinètes et les zygotes. Cette réaction sérologique a été révélée par la technique d'immunofluorescence indirecte.

L'action des anticorps anti-ookinètes sur la sporogonie a été étudiée sur des moustiques nourris sur des souris immunisées. Un immun-sérum anti-ookinètes titré à 1/320 en immunofluorescence indirecte obtenu après 6 immunisations a été capable de bloquer complètement la transmission cyclique.

Ce type d'immun-sérum pourrait être utilisé pour passer au crible les bibliothèques génomiques ou de cDNA de *P. berghei* afin d'identifier et de cloner les séquences qui interviennent dans le processus de l'infectivité des gamétocytes.

Mots-clés : *Plasmodium berghei*. Ookinètes. Sérum anti-ookinète. Immunisation. Arrêt de la transmission.

Cyclical transmission blocked by immunization against *P. berghei* Anka ookinetes

SUMMARY. An antiserum raised against *P. berghei* Anka ookinetes binds specifically to ookinetes and zygotes surface as assessed by indirect immunofluorescence.

The transmission blocking activity of this serum was assessed by feeding mosquitoes on immunized mice. A serum showing an antibody titer of 1/320 reached after 6 immunizations completely blocks ookinetes development. This immune serum might be used to screen *P. berghei* genomic or cDNA library in order to identify or clone sequences involved in the process of gametocyte infectivity.

Key-words : *P. berghei*. Ookinete. Anti-ookinete serum. Immunization. Transmission blocking.

Introduction

On sait depuis longtemps que l'immunité antipaludéenne est spécifique de chaque stade. La réussite des essais d'immunisations expérimentales à base des formes asexuées (Brown *et al.*, 1970 ; Mitchell *et al.*, 1975 et Simpson *et al.*, 1974)

Laboratoire de Protozoologie, Institut de Médecine Tropicale, Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen, Belgique.

Accepté le 29 mai 1989.

et des sporozoïtes (Clyde *et al.*, 1975 et Nussenzweig, 1977) permettront dans l'avenir de proposer une nouvelle stratégie de lutte contre le paludisme basée sur l'immunothérapie. De plus les résultats obtenus avec les immunisations à base de gamètes chez *P. gallinaceum* (Carter *et al.*, 1976 et Gwadz, 1976) et chez *P. yoelii* (Mendis *et al.*, 1979) ont montré que l'immunité induite était capable de réduire la production du nombre d'oocystes dans l'estomac du moustique. Des résultats similaires ont été rapportés chez *P. knowlesi* (Gwadz *et al.*, 1978).

Grâce aux progrès des techniques de culture *in vitro*, certains stades de développement peuvent être produits en masse et purifiés.

Nous décrivons dans ce travail les résultats d'un essai d'immunisation à base d'ookinètes de *P. berghei* Anka. L'immunité acquise est capable de bloquer complètement la transmission cyclique.

Matériel et méthode

Animaux.

Des souris OF1 âgées de 4 semaines ont été utilisées comme hôtes vertébrés et *Anopheles stephensi* comme hôte invertébré.

Parasites.

La souche de *P. berghei* Anka utilisée dans cette étude a été entretenue depuis son isolement en 1965, par passages cycliques sur souris OF1 et *Anopheles stephensi*.

Préparation d'ookinètes

Au 4^e jour de l'infection, le sang (0,9 ml) d'une souris, est prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie à l'éther, dans une seringue contenant 5 ml de RPMI stock et 2 unités d'héparine/ml. La suspension de globules rouges est centrifugée à 200 *g* pendant 5 minutes et le culot (0,5 ml) est transféré dans une boîte de Petri contenant 5 ml de RPMI complet ajusté à pH 8,4 par quelques gouttes de NaOH 1N. Ce mélange est incubé pendant 24 heures dans une chambre maintenue à 21° C avec une humidité relative de 90 %.

La préparation contenant les ookinètes est centrifugée à 200 *g* pendant 5 minutes et le culot (0,5 ml) est resuspendu dans 4,5 ml de PBS. Cette suspension est ajoutée minutieusement à 5 ml d'une solution de Nycodenz à 53 %. Après une centrifugation à 1 500 *g* pendant 30 minutes, l'interface qui contient approximativement 80 % d'ookinètes est lavé 2 fois dans du PBS à 200 *g* pendant 5 minutes avant de déterminer le nombre d'ookinètes/ml par numération dans une cellule hématimètre (Neubauer).

Immunisation anti-ookinètes

Un inoculum de 10⁴ ookinètes a été injecté par voie intraveineuse à deux groupes de 3 OF1 selon un rythme hebdomadaire. Ces deux groupes ont reçu

respectivement, 4 et 6 doses de cet inoculum. Après chaque immunisation, les souris ont reçu par voie gastrique, 25 mg de chloroquine/kg pendant 4 jours afin d'éliminer les parasites asexués présents dans l'inoculum.

Infection d'épreuve

Les groupes de souris immunisées et un groupe de souris témoins non immunisé ont reçu un challenge de 10^6 parasites de *P. berghei* Anka par voie intrapéritonéale.

Immunisation anti-formes asexuées

Un autre groupe de souris a été immunisé contre les formes asexuées du sang par 4 infections successives induites par inoculation intrapéritonéale de 10^6 parasites de *P. berghei* Anka. Ces infections étaient interrompues à partir du 4^e jour de l'infection par traitement à la chloroquine (25 mg/kg) pendant deux jours successifs. Elles avaient pour seul but de fabriquer des immuns sérums antiparasites sanguicoles.

Milieux

RPMI stock	:	RPMI 1640 (Flow)	10,41 g/l
		Hepes	5,95 g/l
RPMI complet	:	RPMI stock	100 ml
		sérum de veau fœtal	20 ml
		bicarbonate à 5 %	5 ml
		pH 7,3	
Nycodenz à 53 % :		Nycodenz à 100 %	5,3 ml
		PBS	4,7 ml

Immunofluorescence

La titration des anticorps anti-ookinètes a été effectuée par la technique d'immunofluorescence indirecte. L'antigène d'ookinètes a été obtenu par culture *in vitro*. Les immuns-sérums ont été prélevés après la 4^e et la 6^e immunisation à base d'ookinètes et après la 4^e immunisation à base de formes asexuées.

Gamétocytémie

Au 4^e jour de l'infection un frottis mince de sang prélevé à la queue de la souris infectée, a été coloré au giemsa et examiné pour déterminer le nombre de gamétocytes sur 10 000 globules rouges.

Exflagellation

Au 4^e jour de l'infection, avant de gorger les anophèles, une goutte de sang placée entre lame et lamelle a été examinée à frais pour contrôler la maturité des microgamétocytes.

Ookinètes

La recherche des ookinètes a été effectuée sur un étalement du contenu stomacal de l'anophèle, coloré au giemsa, 24 heures après le repas sanguin infectant. Leur nombre est exprimé par rapport à 10 000 globules rouges.

Oocystes

Au 9^e jour après le repas sanguin, l'infectivité des gamétocytes pour des moustiques a été mesurée par la moyenne du nombre d'oocystes obtenu par estomac.

Résultats

Les paramètres suivants ont été mesurés sur les 3 groupes de souris inoculés par 10⁶ parasites sanguicoles.

Anticorps anti-ookinètes (tableau I)

Le titre d'anticorps après 4 et 6 injections immunisantes a été mesuré. Une semaine après la 4^e immunisation, le titre d'anticorps était de 1/80. A ce moment, l'immunité n'avait pas d'effet ni sur la production des gamétocytes ni sur l'exflagellation des microgamétocytes, ni sur la formation des ookinètes.

Une semaine après la 6^e immunisation les souris avaient un titre d'anticorps de 1/320. A ce moment, l'immunité obtenue s'est révélée très efficace contre le développement des ookinètes. La dissection des estomacs n'a révélé aucun oocyste chez les moustiques gorgés. Cet immunosérum est spécifiquement dirigé contre les ookinètes comme le montre l'image de fluorescence (*fig. 1*). En effet ce sérum n'a pas reconnu ni les gamétocytes ni les formes asexuées pourtant présents en même temps que les ookinètes sur la lame d'antigène.

La figure 2 illustre bien que les ookinètes ne sont pas reconnus par le sérum anti-formes sanguicoles. Ce dernier reconnaît cependant les gamétocytes et les formes asexuées.

Immunité fonctionnelle et stades cibles (tableau I)

Allure de l'infection d'épreuve.

L'immunisation des souris contre les ookinètes n'avait aucun effet sur l'allure d'une infection induite par les formes asexuées. Toutes les souris immunisées et témoins ont succombé entre le 17^e et le 20^e jour de l'infection consécutive à l'inoculation.

Gamétocytémie

La production et la morphologie des gamétocytes étaient pratiquement identiques dans les groupes immunisés et témoins.

FIG. 1. — Immunofluorescence des ookinètes.
1) sérum anti-ookinètes 2) sérum anti-formes asexuées.

TABLEAU I. — Production et infectivité des gamétocytes au cours d'une immunisation à base d'ookinètes.

	Gamé- tocytes	Exfla- gellation	Ookinètes	Oocystes	Titre d'Ac
Témoin	15 ± 5,2	+	148 ± 39,2	257 ± 62,3	0
1 ^{er} groupe	18 ± 6,8	+	167 ± 57,2	206 ± 78,4	80
Témoin	12 ± 6,5	+	132 ± 40,8	195 ± 87,5	0
2 ^e groupe	13 ± 4,7	+	0		320

Gamétocytes : moyenne de 3 souris exprimée sur 10⁴ GR.

Ookinètes : moyenne du contenu stomacal de 15 Anophèles exprimée sur 10⁴ GR.

Oocystes : moyenne du nombre d'oocystes/estomac (N = 30).

Titre d'Ac : inverse de la dernière dilution qui montre une fluorescence positive sur un antigène d'ookinètes.

1^{er} groupe : challenge après la 4^e immunisation.

2^{er} groupe : challenge après la 6^e immunisation.

Témoin : infection sanguine sans immunisation préalable.

Exflagellation

Aucune différence visible n'a été observée entre le nombre d'exflagellations obtenus chez les souris témoins et les souris immunisées.

Production d'ookinètes

La moyenne du nombre d'ookinètes obtenus chez les moustiques nourris sur le groupe témoin (148 ± 39,2) ne diffère pas statistiquement de celle obtenue chez les moustiques nourris sur les souris qui ont reçu 4 immunisations (167 ± 57,4).

Par contre les moustiques nourris sur le groupe ayant reçu 6 immunisations n'ont développé aucun ookinète alors que ceux nourris sur le groupe témoin ont donné lieu à des nombreux ookinètes (132 ± 40,8).

Production d'oocystes

Les moustiques nourris sur les souris ayant reçu 4 injections immunisantes ont donné moins d'oocystes (206 ± 78,4) que ceux nourris sur les souris du groupe témoin (257 ± 62,3), cependant la différence n'est pas statistiquement significative.

Aucun oocyste n'a été observé chez les moustiques nourris sur les souris ayant reçu 6 injections immunisantes tandis que ceux nourris sur les souris du groupe témoin ont donné en moyenne (195 ± 87,5) oocystes/estomac.

Discussion

Les résultats des immunisations contre les gamètes de *P. yoelii* (Mendis *et al.*, 1979) et *P. gallinaceum* (Gwadz, 1976) ont montré la possibilité d'induire une immunité capable de réduire la transmission cyclique. La présente étude montre que l'immunité induite chez les souris OF1 après 4 injections intraveineuses de 10^4 ookinètes de *P. berghei* Anka n'a aucun effet sur le développement du cycle sexué. L'immunité sérique à ce moment correspond à un titre d'anticorps de 1/80.

Par contre après 6 immunisations, le niveau d'immunité sérique obtenu, correspondant à un titre de 1/320 en immunofluorescence indirecte, est capable de bloquer complètement la sporogonie au stade de la fertilisation. Cette immunité est inactive contre les formes asexuées et contre les gamétocytes, aussi bien que sur l'exflagellation des microgamétocytes comme l'ont déjà observé certains auteurs avec des immunisations à base de gamètes (Gwadz, 1976 ; Carter *et al.*, 1976 et Kashik *et al.*, 1982).

L'action des anticorps anti-ookinètes sur la suppression de l'inféctivité des gamétocytes est fonction du titre d'anticorps. Dans notre étude le retard de l'obtention de ce niveau d'immunité peut s'expliquer par les faibles doses utilisées dans chaque immunisation.

Les formes sexuées (gamètes mâles et femelles, zygotes et ookinètes), possèdent à leur surface des protéines communes et des protéines spécifiques à chaque stade (Kaushal *et al.*, 1984). Des anticorps monoclonaux capables d'inhiber la transmission cyclique ont été utilisés pour identifier les antigènes de surface, cibles de l'immunité inhibitrice de la transmission cyclique. Certains anticorps monoclonaux bloquent la fécondation tandis que d'autres empêchent le développement du zygote (Rener *et al.*, 1983 ; Vermeulen *et al.*, 1985 ; Kaushal *et al.*, 1983 et Winger *et al.*, 1988).

L'immunsérum obtenu dans cette étude, capable d'inhiber complètement l'inféctivité des gamétocytes pourrait être utilisé pour passer au crible les bibliothèques génomiques ou de cDNA de *P. berghei* afin d'identifier et de cloner les séquences qui interviennent dans le processus de la transmission cyclique.

RÉFÉRENCES

- BROWN K. N., BROWN I. M., HILLS L. A. : Protection against *Plasmodium knowlesi* shown by monkeys sensitized with drug-suppressed infection or by dead parasites in Freund's adjuvant. *Exp. Parasitol.*, 1970, 28, 304-317.
- CARTER R., CHEN D. H. : Malaria transmission blocked by immunization with gametes of the malaria parasite. *Nature*, 1976, 263, 57-60.
- CLYDE D. F., MCCARTHY V. C., MILLER R. H., WOODWARD W. E. : Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 24, 397-401.
- GWADZ R. W. : Malaria: successful immunization against the sexual stages of *Plasmodium gallinaceum*. *Science*, 1976, 193, 1150-1151.

- GWADZ R. W., GREEN I. : Malaria immunization in rhesus monkey: a vaccine effective against both the sexual and asexual stages of *Plasmodium knowlesi*. *J. Exp. Med.*, 1978, *148*, 1311-1323.
- KAUSHIK N. K., SUBRAHMANYAM D., SEGHAL S. : Blocking of malarial transmission by a gamete vaccine against *Plasmodium berghei* NK-65. *Indian J. Malaria*, 1982, *19*, 13-19.
- KAUSHAL D. C., CARTER R., RENER J., GROTEENDORST C. A., MILLER L. H., HOWARD R. J. : Monoclonal antibodies against surface determinants on gametes of *P. gallinaceum* block transmission of malaria parasites to mosquitoes. *J. Immunol.*, 1983, *131*, 2557-2562.
- KAUSHAL D. C., CARTER R. : Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. II. Comparison of surface antigens of male and female gametes and zygotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1984, *11*, 145-146.
- MENDIS K. N., TARGETT G. A. T. : Immunization against gametes and asexual erythrocytic stages of a rodent malaria parasite. *Nature*, 1979, *277*, 389-391.
- MITCHELL G. M., BUTCHER G. A., COHEN S. : Merozoite vaccination against *Plasmodium knowlesi* malaria. *Immunology*, 1975, *29*, 397-407.
- NUSSENZWEIG R. S. : Immunoprophylaxis of malaria: sporozoite induced immunity. In: Immunity to blood parasites of animals and man. *Plenum Publishing corp.*, New York, 1977, 75-87.
- RENER J., GRAVES M., CARTER R., WILLIAM J. L., BURKOT T. R. : Target antigens on transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *J. Exp. Med.*, 1983, *158*, 976-981.
- SIMPSON G. L., SCHENKEL R. H., SILVERMAN P. H. : Vaccination of rhesus monkeys against malaria by use of sucrose density gradient fractions of *Plasmodium knowlesi* antigens. *Nature*, 1974, *247*, 304-305.
- VERMEULEN A. N., PONNUDURAI T., BECKERS P. J. A., VERHAVE J. P., SMITS M. A., MEUWISSEN J. H. E. T. H. : Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *J. Exp. Med.*, 1985, *162*, 1460-1476.
- WINGER L. A., TIRAWANCHAI N., NICHOLAS J., CARTER H. E., SMITH J. E., SINDEN R. E. : Ookinete antigens of *Plasmodium berghei* Appearance on the zygote surface of an Mr 21 KD determinant identified by transmission-blocking monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.*, 1988, *10*, 193-207.