

## Étude de quelques caractères des populations parasitaires dans les infections chroniques à *P. berghei* (Anka)

M. WÉRY

*Institut de Médecine Tropicale 'Prince Léopold', Laboratoire de Protozoologie, Anvers (Belgique)*

### INTRODUCTION

Un système expérimental superposable à l'infection naturelle causée par *P. falciparum* en zone endémique a été créé chez la souris blanche en utilisant l'espèce *P. berghei*, souche Anka, qui possède une virulence semblable à celle de son homologue de la fièvre tierce maligne. Des inoculations répétées de parasites asexués, suivies d'un traitement radical administré dès que la parasitémie devenait patente ont pu provoquer chez des animaux l'apparition d'une immunité de protection capable d'enrayer une poussée de parasitémie toujours mortelle chez les témoins non immunisés.

La rémission obtenue chez les animaux immunisés a été suivie de fluctuations importantes de parasitémie. Tout comme dans le cas d'infections à *P. falciparum*, ces recrudescences successives s'estompent après 3 à 6 mois, en l'absence de réinfection, et une guérison spontanée — apparente — s'ensuit.

D'autres lignés chroniques de la même souche de *P. berghei* ont été produites en partant de rats adultes à parasitémie patente transitoire. Des anophèles nourris sur de tels animaux produisent des sporozoïtes capables d'induire des infections chroniques chez la souris, alors que l'injection de formes érythrocytaires asexuées provenant des mêmes rats produit à coup sûr chez la souris des infections aiguës mortelles.

Ces modèles expérimentaux nous ont donné l'occasion de vérifier quelques caractères des populations de recrudescence : virulence, gamétogénèse fonctionnelle, constitution antigénique.

### SÉQUENCE DES MANIPULATIONS

1. Des populations de recrudescence ont été produites chez des souris OF1 (Oncin, France) immunisées par cinq infections successives traitées, induites

par inoculation d'une population clonée issue de la souche Anka de *Plasmodium berghei* et réinfectées ensuite par la population totale de la même souche.

2. Chaque recrudescence a été isolée sur des souris neuves et la population parasitaire résultante a été conservée congelée après sacrifice des animaux le 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation.

3. Des clones de ces populations de recrudescence ont été préparés par la technique des dilutions de Beale et Walliker et inoculés à des souris en vue de la préparation le 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation de stabilats en quantité suffisante pour l'étude ultérieure du comportement de ces clones.

4. La titration de l'infectivité des populations congelées a été faite par dilution des inoculums et observation de la parasitémie au 6<sup>e</sup> jour.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

La gamétogénèse semble être conservée intacte au sein des populations de recrudescence provenant d'animaux immunisés. Les tentatives d'infection d'anophèles à partir de ces populations isolées sur animaux neufs ont toutes donné des résultats comparables quant aux numérations d'oocystes ou de sporozoïtes, à ceux obtenus chez des anophèles utilisés pour la transmission cyclique de la souche Anka originale. Les sporozoïtes ainsi obtenus possèdent une viabilité normale et les infections subséquentes sont mortelles pour la souris. Au moins 80 % des sporozoïtes récoltés par dissection des glandes salivaires d'*Anopheles stephensi*, entre le 21<sup>e</sup> et le 28<sup>e</sup> jour après le repas sanguin, sont viables. La démonstration en a été faite récemment par inoculation intraportale à des animaux réceptifs comme la souris C57 Black. Le calcul du nombre total de schizontes exoérythrocytaires a permis d'estimer à environ 80 % le nombre des sporozoïtes ayant pu se développer dans le foie.

Par contre, les gamétocytes mûris chez des animaux naturellement immuns comme le rat adulte ou chez des animaux possédant une immunité acquise semblent être porteurs d'un caractère génétique de virulence moindre : leur installation chez l'anophèle se fait normalement mais les sporozoïtes résultants, bien qu'infectants pour la souris, induisent chez plus de la moitié des animaux inoculés des parasitémies susceptibles d'être contrôlées par l'hôte.

Ce phénomène n'est pas lié à la pauvreté de l'inoculum en sporozoïtes viables, puisque l'inoculation de nombres de plus en plus petits de sporozoïtes de la lignée normale de Anka à la souris OF1 induit dans tous les cas, soit une infection aiguë mortelle, ou pas d'infection du tout. La perte de virulence observée est donc plutôt liée à une modification d'un caractère génétique de la souche. On sait en effet que la virulence peut se modifier au cours de manipulations de laboratoire. Dans ce cas-ci, le caractère modifié serait porté par les gamétocytes.

Quant aux formes asexuées, aucune différence de virulence n'a pu être mise en évidence entre les différentes recrudescences successives, quel que soit le niveau de parasitémie atteint au cours de la recrudescence. On peut en déduire que la virulence du parasite ne varie pas d'une recrudescence à l'autre et que le niveau du pic parasitémique à chaque recrudescence est déterminé par l'efficacité de la protection immune vis-à-vis des antigènes constitutifs de la recrudescence en cause. Cette observation introduit la notion de variation antigénique du parasite au cours de l'évolution de l'infection à allure chronique.

Briggs, Welde et Sadun (1968) ont tenté une démonstration de la présence de variants antigéniques de *P. berghei* en produisant une suppression transitoire de la parasitémie par une sérothérapie homologe. Cette lyse parasitaire est suivie après un court délai d'une recrudescence beaucoup plus virulente, produite d'après ces auteurs par un variant insensible à l'action des anticorps. Nous avons essayé de mettre en évidence ces variations par des épreuves de protection croisée (Wéry et Timperman, 1979).

Il est admis que, tant l'immunité stérile ou protection totale obtenue par injection d'antigènes tués que la prémunition ou protection relative résultant d'infections répétées reposent sur l'action des anticorps sériques. Encore récemment Murphy (1979) l'a démontré en étudiant le pouvoir protecteur transféré passivement par sérothérapie. Cohen et Butcher (1970) et plus récemment Quinn et ses collaborateurs (1979) ont localisé l'action de ces anticorps protecteurs : en se fixant sur les mérozoïtes ils empêcheraient leur pénétration à l'intérieur d'un nouveau globule rouge, freinant ainsi l'évolution de la parasitémie.

Enfin, Freeman et ses collaborateurs (1980) démontrent, par une épreuve de neutralisation *in vivo* à l'aide d'anticorps monoclonaux chez des animaux infectés par *P. yoelii*, que les anticorps dirigés contre les mérozoïtes sont les seuls protecteurs.

Ce sont donc les antigènes localisés à la surface des mérozoïtes qui doivent correspondre à la spécificité des anticorps sériques, et si la parasitémie s'élève, malgré une immunité établie, c'est qu'un certain nombre de mérozoïtes possèdent des antigènes différents qui ne sont pas neutralisés par les anticorps présents à ce moment-là dans le sérum. Ceci suppose la présence, au sein d'une population parasitaire, d'un éventail de variants antigéniques exposés en surface du stade mérozoïte. Plus cet éventail sera étroit, et homologue de l'immunisation, plus grand sera le nombre de mérozoïtes neutralisés et plus lente sera la progression de la parasitémie.

D'où la nécessité, pour des essais de protection croisée, de produire des populations clonées et de les stabiliser dans l'azote liquide. Ces stabilats permettent d'immuniser des animaux vis-à-vis d'un groupe restreint de variants antigéniques spécifiques d'une recrudescence. Chaque inoculum contient les mêmes antigènes et la répétition du contact avec ces antigènes amène la fabrication d'anticorps homologues bien déterminés. Cependant, dès les premières schizogonies issues de la population stabilisée, l'organisme de l'hôte est mis en contact avec des mélanges antigéniques complexes, et lors du traitement par la chloroquine la lyse des parasites intraglobulaires amènera inévitablement une réponse anticorporelle diversifiée. On peut simplement espérer, en interrompant la parasitémie le 4<sup>e</sup> jour, que des variants antigéniques nouveaux, différents de ceux qui se trouvaient dans la population stabilisée n'ont pas eu l'occasion d'apparaître.

Deux stabilats de recrudescences différentes (Rec 1 et Rec 3) sont utilisés pour immuniser deux lots de souris. La procédure d'immunisation consiste en quatre infections successives à partir du même stabilat et interrompues dès le 4<sup>e</sup> jour par traitement à la chloroquine. La protection peut être évaluée par observation du niveau de parasitémie au 3<sup>e</sup> jour après chaque inoculation. Une ou deux semaines séparent deux inoculations successives et la protection devient visible à partir de la 3<sup>e</sup> infection.

Quatorze jours après la dernière inoculation immunisante, les animaux reçoivent une inoculation d'épreuve constituée par les mêmes stabilats, la moitié des animaux de chaque lot recevant le stabilat homologue à l'immunisation, l'autre moitié recevant le stabilat hétérologue. Les parasitémies résultantes de l'inoculation d'épreuve chez les animaux protégés par la population homologue ou hétérologue sont com-

parées entre elles et à celles obtenues chez des animaux non immunisés ayant reçu le même inoculum. Le degré de protection immune entre groupes d'animaux est évalué par comparaison de la parasitémie du 3<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> jour, de préférence au moment où les témoins non immunisés atteignent 1 % de parasitémie (fig. 1 et 2). Ce n'est en effet que les premiers jours après l'inoculation d'épreuve que l'on peut espérer déceler une différence : passé ce délai, l'éventail de variants antigéniques augmente avec le nombre de parasites en circulation et les courbes de parasitémie s'uniformisent.

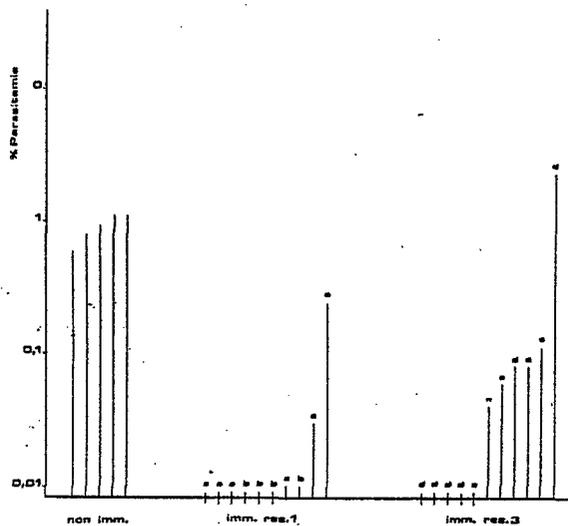


FIG. 1. — Infection par Rec. 1, parasitémie J. 4.

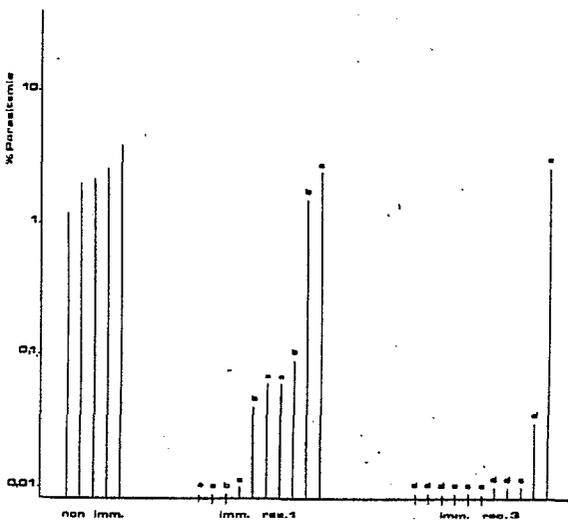


FIG. 2. — Infection par Rec. 3, parasitémie J. 6.

Murphy (1979), par une sérothérapie homologue, parvient à produire un délai dans le développement de la parasitémie qui n'est observable que dans les tout premiers jours après l'inoculation.

Dans notre expérimentation, les animaux témoins succombent entre le 7<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour, tandis que les animaux immunisés peuvent contrôler la première poussée de parasitémie provoquée par l'inoculation de populations virulentes homologues ou hétérologues. Les parasitémies sont régulièrement plus élevées entre le jour 3 et le jour 7 dans les infections d'épreuve hétérologues que dans les infections homologues. Le niveau de 0,1 % de parasitémie au 7<sup>e</sup> jour après l'inoculation est atteint chez 8 animaux sur 20 dans les systèmes homologues, et chez 17 animaux sur 20 dans les systèmes hétérologues.

L'utilisation des valeurs moyennes de parasitémie par groupe à titre de comparaison est impossible du fait de la variation individuelle dans le degré de protection immune au sein d'un même groupe. 5 % environ des animaux se comportent en effet comme les témoins non immunisés. Heumann et ses collaborateurs (1979) ont pu montrer que l'efficacité de la protection immune sérique est un facteur héréditaire qui peut être sélectionné génétiquement. Ces auteurs ont pu produire des lignées de souris à haute ou à basse réponse anticorpale.

Malgré ces différences individuelles, la protection conférée par une recrudescence est plus importante vis-à-vis de l'infection d'épreuve homologue que vis-à-vis de l'hétérologue, suggérant la conclusion que ces différences sont dues à l'existence de variants antigéniques distincts dans les deux populations Rec 1 et Rec 3.

La mise en évidence de ces variants antigéniques a été tentée par analyse immunoélectrophorétique, en utilisant des extraits antigéniques hydrosolubles totaux des deux populations parasitaires et des immunosérums de lapins immunisés par la technique de Vaitukaitis à l'aide de ces antigènes solubles. L'apparition progressive d'anticorps précipitants de la première à la cinquième semaine chez les lapins a permis de faire apparaître au maximum 5 constituants antigéniques de plasmodium dans chacune des deux préparations d'antigène soluble. Les arcs de précipitation représentent bien des constituants parasites, les sérums de lapins ne causant aucune précipitation vis-à-vis d'antigènes de globules rouges ou de sérums de rats (photo 1).

Les constituants antigéniques retrouvés dans les préparations antigéniques des deux populations de recrudescence sont identiques, ce qui permet de conclure que l'antigène variable n'ayant pas été mis en évidence n'est pas un antigène majeur, ou qu'il n'est

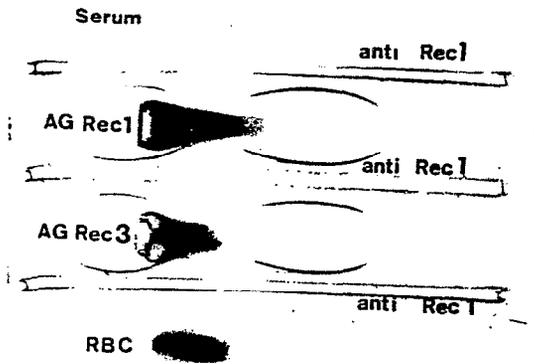


PHOTO. 1. — Antisérums de lapin anti-recrudescence 1.

Antigènes (de haut en bas) : sérum de rat ; recrudescence 1 (*P. berghei*) ; recrudescence 3 (*P. berghei*) ; globules rouges de rat.

pas hydrosoluble, ou qu'il ne s'exprime qu'au niveau du stade mérozoïte, et il serait donc présent en trop petites quantités dans la solution préparée à partir de la population parasitaire totale.

Dean et Cohen (1979) ont montré que, chez *P. knowlesi*, la mosaïque antigénique des formes asexuées érythrocytaires change au cours de la maturation de trophozoïtes en schizontes. Onze constituants importants sont mis en évidence par des anticorps précipitants de sérum de singes infectés. Certains antigènes sont plus abondants au niveau du stade mérozoïte.

D'autre part, la seule réaction *in vitro* qui jusqu'à présent a permis, dans les mains de certains auteurs, de démontrer l'existence de variants antigéniques chez les plasmodiums de singes est l'agglutination d'érythrocytes infectés par des schizontes. Or cette réaction fait intervenir des antigènes de plasmodium exprimés à la surface des globules rouges. L'isolement et la purification de quatre de ces antigènes a été réussie par Schmidt-Ullrich et ses collaborateurs (1979) : ce sont des glycoprotéines. Ces antigènes de la surface

du globule rouge doivent cependant correspondre à des constituants des plasmodiums eux-mêmes et il est probable que la séparation des différents stades parasitaires et l'extraction de leurs antigènes solubles dans l'eau ou dans des détergents amènera la mise en évidence de l'antigène variable. De même, l'hyperimmunisation de lapins avec des mélanges antigéniques mieux définis augmentera le nombre de constituants mis en évidence.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BRIGG (N. T.), WELLDE (B. T.) & SADUN (E. H.), 1968. — Variants of *P. berghei* resistant to passive transfer of immune serum. *Exptl. Parasitology*, 22 : 338-345.
- COHEN (S.) & BUTCHER (G.), 1970. — Properties of protective malarial antibody. *Nature*, 225 : 732-734.
- DEANS (J. A.) & COHEN (S.), 1979. — Localization and chemical characterization of *Plasmodium knowlesi* schizont antigens. *Bull. Org. mond. Santé*, 57 (suppl. 1) : 93-100.
- FREEMAN (R. R.), TREJDSOIEWICZ (A. J.) & CROSS (G. A. M.), 1980. — Protective monoclonal antibodies recognizing stage specific merozoite antigen of a rodent malaria parasite. *Nature*, 284 : 366-368.
- HEUMANN (A. M.), STIFFEL (C.), MONJOUR (L.), BUCCI (A.) & BIOZZI (G.), 1979. — Correlation between genetic regulation of antibody responsiveness and protective immunity induced by *Plasmodium berghei* vaccination. *Infect. Immunity*, 24, 3 : 829-836.
- MURPHY (J. R.), 1979. — Host defenses in murine malaria : analysis of the mechanisms of immunity to *Plasmodium berghei* generated in response to immunization with formaline-killed blood stage parasite. *Infect. Immunity*, 24, 3 : 707-712.
- QUINN (T. C.) & WYLER (D. J.), 1979. — Mechanisms of action of hyperimmune serum in mediating protective immunity to rodent malaria (*Plasmodium berghei*). *J. Immunol.*, 123, 5 : 2245-2249.
- SCHMIDT-ULLRICH (R.), WALLACH (D. F. H.) & LIGHTHOLDER (J.), 1979. — Fractionation of *Plasmodium knowlesi*, induced antigens of rhesus monkey erythrocyte membranes. *Bull. Org. mond. Santé*, 57 (Suppl. 1) : 115-121.
- WÉRY (M.) & TIMPERMAN (G.), 1979. — Observation on the virulence and the antigenic characters of cloned and uncloned lines of the Anka isolate of *Plasmodium berghei*. 2. Cross protection assay with successive recrudescence population. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 59 : 361-369.