

SCHIZOGONIE DE *PLASMODIUM YOELII NIGERIENSIS*. RÔLE DES MÉROZOÏTES LATENTS

A. BEAUTÉ-LAFITTE, A. CHABAUD, V. ALTEMAYER-CAILLARD, E. DEHARO,
Ph. GAUTRET, I. LANDAU

RÉSUMÉ

Plusieurs procédés ont été utilisés pour chercher à préciser le cycle schizogonique de *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

— La technique de concentration des formes très jeunes (anneaux et jeunes trophozoïtes) sur gradient de Percoll-glucose qui permet de suivre très précisément le développement de la parasitémie lors des premiers cycles schizogoniques.

— Une méthode d'étude des prépatences donnant une notion approximative du nombre de mérozoïtes inoculés.

— Une comparaison entre le nombre de mérozoïtes présents dans le sang après des dilutions simples dans de l'eau physiologique révélant le nombre total de mérozoïtes et des dilutions après passage dans l'organisme d'une souris et congélation, révélant le nombre de mérozoïtes latents.

Il est montré que l'infection au cours des deux premiers cycles varie suivant l'heure d'inoculation. Dans tous les cas, la montée de la parasitémie s'effectue essentiellement entre 0 et 6 heures. Cette montée a lieu au cours du 1^{er} cycle pour les « inoculations Percoll » de 6 et 9 heures, au cours du 2^e cycle pour les « inoculations Percoll » de 12, 15 et 18 heures. Cependant, ces différences sont rapidement compensées et les taux de parasitémie s'égalisent à peu près dès le 3^e ou 4^e cycle. A ce moment la parasitémie ne dépend plus de l'heure d'inoculation.

L'existence de cette période 0-6 heures, plus favorable à la péné-

tration des mérozoïtes, indépendante de l'heure d'inoculation, implique que certains mérozoïtes sont susceptibles de rester latents.

Pour chercher à quantifier ce phénomène nous utilisons le fait que la prépatence est d'autant plus courte que le nombre de mérozoïtes inoculé est grand. En diluant progressivement l'inoculum et en établissant le nombre d'heures nécessaires pour que la parasitémie atteigne le taux de 5 %, il est montré que l'infection à *P. y. nigeriensis* se déroule dans ses grandes lignes de la façon suivante : après l'inoculation d'un mérozoïte la parasitémie monte à 5 % en environ 160 heures au bout de 9 schizogonies successives, le taux de multiplication étant de 5 pour la 1^{ère} schizogonie et de 10 pour les suivantes. Ce barème permet de connaître approximativement le nombre de mérozoïtes inoculés lorsque l'on connaît le nombre d'heures qui ont été nécessaires pour que la parasitémie atteigne le taux de 5 %.

En évaluant de cette façon le nombre de mérozoïtes disponibles dans le sang des souris, il est montré qu'à minuit, soit 12 heures après l'inoculation, 1 mérozoïte sur 10 reste latent, alors qu'à 15 heures, 3 heures seulement après l'inoculation, il n'y a que 1 mérozoïte sur 100 qui soit latent.

L'hypothèse explicative proposée est que certains des mérozoïtes restent latents parce qu'ils ne sont pas encore infectieux ; ils pourraient alors pénétrer dans les lymphatiques du réseau péricapillaire et ne revenir que progressivement dans les vaisseaux sanguins.

SUMMARY: Schizogony of *Plasmodium yoelii nigeriensis*. Role of the latent merozoites.

Several procedures were employed to try to specify the schizogonic cycle of *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

— The Percoll-glucose gradient technique for concentrating the very young stages (rings and young trophozoites), allowing a very precise follow up of the development of the parasitaemia during the first schizogonic cycles.

— A method for studying the prepatencies, providing an approximation of the number of merozoites inoculated.

— A comparison between the numbers of merozoites present in the blood, after — 1stly simple dilutions in saline, revealing the total number of merozoites, — 2ndly dilutions in saline after

a passage of a few hours in the organism of a mouse, revealing the number of latent merozoites.

It was shown that the infection, during the first two cycles, varies according to the time of inoculation. In all cases the increase of the parasitaemia occurred mainly from 00:01 to 06:00. This increase of parasitaemia in mice inoculated with the Percoll concentrated parasites was significantly high during the first cycle in mice inoculated at 06:00 and 09:00 and during the second cycle in those inoculated at 12:00, 15:00 and 18:00. However, differences were rapidly compensated and parasitaemias became comparable at the 3rd or 4th cycle when they ceased to be dependent on the time of inoculation.

Laboratoire de Biologie parasitaire, associé au CNRS (URA 114), et Laboratoire de Protozoologie et Parasitologie Comparée (EPHE), Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France.

Accepté le : 18 août 1993.

The existence of a privileged time, 00:01 to 06:00, for the merozoites penetration, independent of the time of inoculation implies that some merozoites are capable of remaining latent.

The notion that the length of the prepatent period is proportional to the number of merozoites inoculated was used to try to quantify this phenomenon. By using progressive dilutions of the inocula and specifying the number of hours necessary for the parasitaemia to reach 5 %, it was shown that the infection by *P. y. nigeriensis* developed roughly as follows: when a single merozoite was inoculated, the parasitaemia reached 5 % in about 160 hours i.e. 9 successive schizogonies, the rate of multiplication being 5 at the first schizogony and 10 at the following ones. Using this basis and knowing the time which was necessary to the parasitaemia to reach 5 % it became possible, to evaluate roughly the number of merozoites inoculated. This scale allows an approxi-

mate estimation of the number of merozoites inoculated when the number of hours necessary for the parasitaemia to reach 5 % is known.

By using this evaluation procedure of the merozoites available in the blood of mice, it was shown that at midnight, 12 hours post inoculation, 1 merozoite out of 10, remained latent while at 15:00, 3 hours post inoculation, only 1 merozoite out of 100 was latent.

These paradoxical data was confirmed by studying the evolution of the parasitaemia during the first schizogonies, made possible by the Percoll-glucose technique.

An hypothesis is proposed by the authors: Some of the merozoites remain latent, because not yet infective; they may reach the lymphatics surrounding the blood capillaries, and only return progressively inside the blood vessels.

Les particularités des cycles schizogoniques de certains plasmodiums de rongeurs et en particulier ceux de *Plasmodium yoelii nigeriensis*, ne s'expliquent qu'en admettant une latence prolongée d'une importante proportion des mérozoïtes libérés à chaque schizogonie.

Cette notion a été indiquée par Landau et Chabaud (1980) du fait que les périodes de latence augmentent selon que les inoculations de mérozoïtes ont lieu à 0, 16 et 9 heures. Il en est déduit que « tout se passe comme si le mérozoïte infectant ne pouvait entrer dans l'hématie qu'aux environs de 0 heure. »

Plusieurs éléments nouveaux ont complété ces données.

1 — Les phénomènes de latence varient totalement selon l'espèce de plasmodium en cause (Cambie et coll. 1990).

Plasmodium y. yoelii a des mérozoïtes dans le sang pendant les 24 heures qui suivent l'inoculation; leur pénétration dans l'hématie s'échelonne donc tout au long de la journée. L'infection est peu synchrone.

P. vinckei petteri a des mérozoïtes qui pénètrent rapidement dans l'hématie, quelle que soit l'heure d'inoculation. L'infection est donc synchrone et est indépendante du rythme nyctéméral de l'hôte.

P. c. chabaudi a des mérozoïtes qui pénètrent essentiellement à minuit (pour des Rongeurs éclairés de 8 h à 20 h), ou à midi (pour des Rongeurs éclairés de 20 h à 8 h). L'infection est donc synchrone et dépend du rythme propre à son hôte.

2 — Les mérozoïtes de *P. y. yoelii* restent latents et virulents pendant 2 jours et vraisemblablement beaucoup plus (Landau et coll., 1990).

3 — Le cycle schizogonique des différentes sous-espèces de *P. y. yoelii* dure 18 heures et non 24 heures comme il était admis (Deharo et coll., sous presse). De ce fait, les données du paragraphe précédent peuvent prêter à erreur car les passages de sang congelé de souris à souris destinés à démontrer la présence de mérozoïtes latents, étant effectués toutes les 18 heures, peuvent contenir des mérozoïtes

issus de la schizogonie. Plus récemment, il a été démontré, par des passages de sang toutes les 12 heures, que la latence des mérozoïtes de *P. y. nigeriensis* est de plus de 36 heures (Beauté-Lafitte et coll., 1993).

Le cycle schizogonique de *P. y. nigeriensis* apparaît donc complexe. De nouvelles expériences ont été effectuées pour tenter d'éclaircir ces phénomènes.

I. — ÉVOLUTION DE LA PARASITÉMIE EN FONCTION DE L'HEURE D'INOCULATION AU COURS DES DEUX PREMIERS CYCLES

Les techniques utilisant des gradients de Percoll-glucose, qui concentrent les anneaux et trophozoïtes jeunes, permettent des inoculations synchrones riches. Il devient possible de suivre les deux ou trois premières schizogonies (Deharo et coll., sous presse).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les parasitémies de souris inoculées à 6, 9, 12, 15 et 18 heures ont été suivies en établissant les formules parasitaires toutes les 3 ou 6 heures.

RÉSULTATS

L'examen des formules parasitaires permet de confirmer les résultats obtenus précédemment avec le Percoll : durée de la schizogonie de 18 heures, délai entre schizogonie et pic des anneaux de 3 heures, car la couche du gradient qui est inoculée contient essentiellement des parasites très jeunes (anneaux et jeunes trophozoïtes). Les courbes de parasitémies sont représentées *figure 1*.

INTERPRÉTATION

Notre hypothèse pour expliquer ces résultats est la suivante :

a) Chaque schizogonie donne naissance à deux populations de mérozoïtes : une population L de mérozoïtes

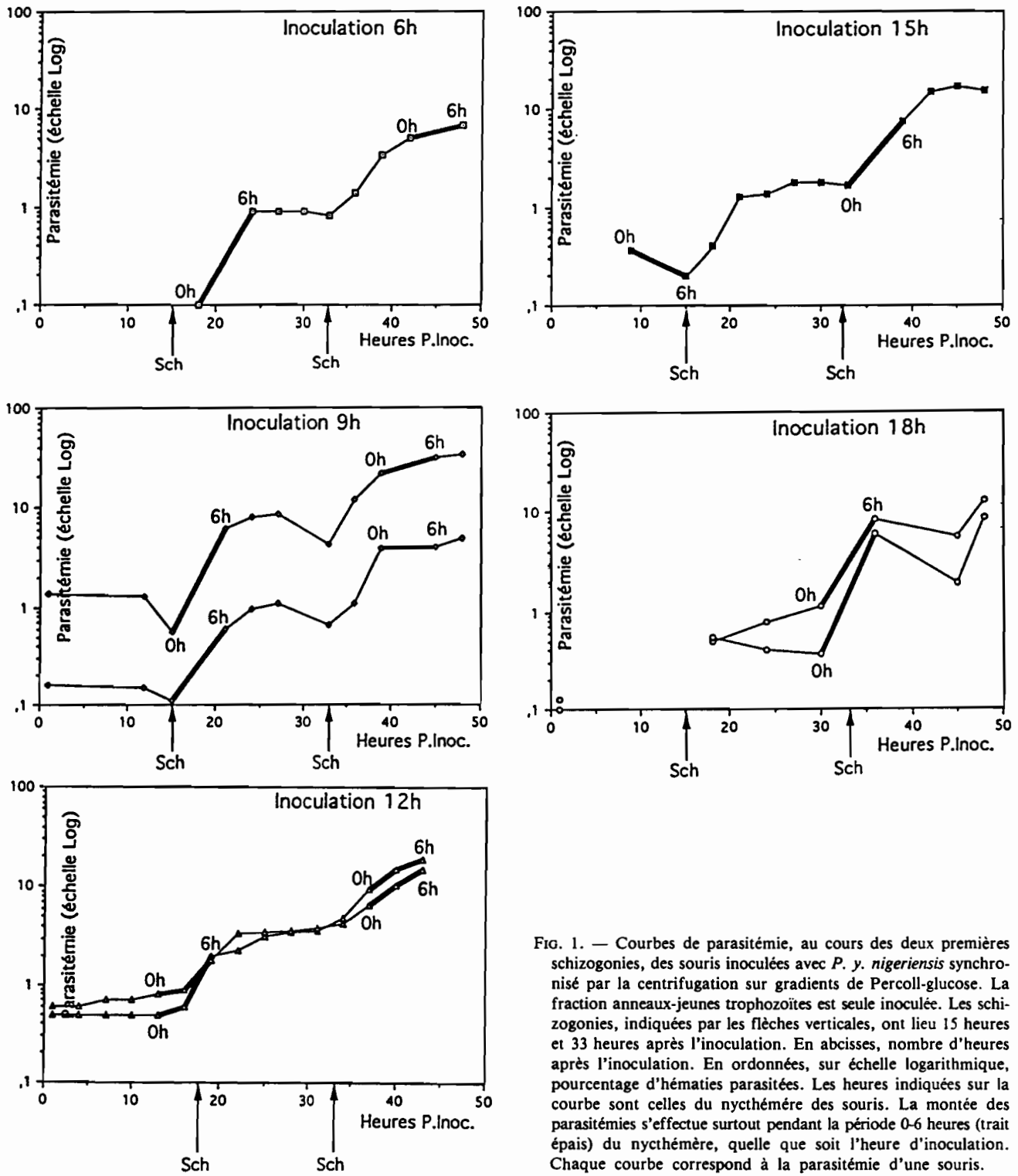


FIG. 1. — Courbes de parasitémie, au cours des deux premières schizogonies, des souris inoculées avec *P. y. nigeriensis* synchronisé par la centrifugation sur gradients de Percoll-glucose. La fraction anneaux-jeunes trophozoïtes est seule inoculée. Les schizogonies, indiquées par les flèches verticales, ont lieu 15 heures et 33 heures après l'inoculation. En abscisses, nombre d'heures après l'inoculation. En ordonnées, sur échelle logarithmique, pourcentage d'hématies parasitées. Les heures indiquées sur la courbe sont celles du nyctémère des souris. La montée des parasitémies s'effectue surtout pendant la période 0-6 heures (trait épais) du nyctémère, quelle que soit l'heure d'inoculation. Chaque courbe correspond à la parasitémie d'une souris.

latents. Une population R de mérozoïtes qui pénètrent immédiatement dans les hématies et initient une nouvelle schizogonie.

b) Les mérozoïtes de type L ne deviennent infectants

qu'après un délai variable, d'au moins 3 heures. Ils peuvent alors pénétrer dans une hématie à un moment quelconque, mais de façon préférentielle entre minuit et 6 heures.

Inoculation à J0 6 heures (fig. 1 6h)

La 1^{re} schizogonie a lieu à J0 21 heures puisque nous avons inoculé des formes âgées de 3 heures. La croissance de la parasitémie du 1^{er} cycle 0-6 heures est brutale puisqu'elle correspond à l'addition des R et L issus de la 1^{re} schizogonie (R₁ + L₁) qui ont le temps de devenir infectants. La 2^e schizogonie a lieu à J1 15 heures. La parasitémie ne croît que progressivement et la période 0-6 heures est peu marquée.

Inoculation à J0 9 heures (fig. 1 9h)

La 1^{re} schizogonie a lieu à J1 0 heure et la 2^e à J1 18 heures. La montée de la parasitémie de la 1^{re} période 0-6 heures est plus prolongée que précédemment. Il y a une montée au lieu d'un plateau au-delà de 6 heures car les deniers L₁ ne deviennent infectants qu'à ce moment. Ils ne pénètrent que progressivement et la 2^e schizogonie échelonnée entraîne une 2^e période 0-6 heures peu marquée.

Inoculation à J0 12 heures (fig. 1 12h)

La 1^{re} schizogonie a lieu à J1 3 heures et la 2^e à J1 21 heures. La 1^{re} montée de parasitémie, correspondant à la période 0-6 heures, est modérée car la population L₁ ne devient infectante que trop tardivement et ne pénètre que progressivement. La 2^e période 0-6 heures permet la pénétration des L₂ et des L₁ accumulés mais celle-ci apparaît mal sur le graphique à cause de l'échelle logarithmique.

Inoculation à J0 15 heures (fig. 1 15h)

La 1^{re} schizogonie a lieu à J1 6 heures et la 2^e à J2 0 heure. Les R₁ et L₁ n'interviennent pas au cours de première période 0-6 heures. C'est au cours de la 2^e période 0-6 heures que s'accumulent les pénétrations des mérozoïtes R₂, L₁ et L₂ et la parasitémie monte donc très fortement à ce moment.

Inoculation à J0 18 heures (fig. 1 18h)

La 1^{re} schizogonie (non figurée) a lieu à J1 9 heures et la 2^e à J2 3 heures. Ici aussi c'est pendant la 2^e période 0-6 heures que se place la montée principale de la parasitémie à cause des L₁ qui, contrairement à ce qui se passe pour l'inoculation J0 12 heures, ont eu le temps de s'accumuler, au cours de la 1^{re} schizogonie.

DISCUSSION

Il résulte de ces données que l'infection au cours des deux premiers cycles varie suivant l'heure d'inoculation. Dans tous les cas, la montée de la parasitémie s'effectue essentiellement de 0 à 6 heures. Cette montée a lieu au cours du 1^{er} cycle pour les « inoculations Percoll » de 6 et 9 heures, au cours du 2^e cycle pour les « inoculations Percoll » de 12, 15 et 18 heures. Cependant, ces différences

sont rapidement compensées et les taux de parasitémie s'égalisent à peu près dès le 3^e ou 4^e cycle.

Les résultats préliminaires de Landau et Chabaud (1980) qui avaient établi des différences de prépatence entre les infections à inoculation matinale et les infections à inoculation tardive, avaient été obtenus dans les conditions suivantes :

— La parasitémie qui avait été choisie arbitrairement comme base était de « 5 parasites par champ », à l'objectif à immersion $\times 100$. Cela correspond environ à une parasitémie de 1 % (1 parasite pour 100 hématies).

— Les temps de latence étaient de 37-40 heures pour l'inoculum à minuit (2 cycles = 36 h), de 51-81 heures pour l'inoculum à 16 heures (3 cycles = 54 heures), et de 64-90 heures pour l'inoculum à 9 heures (4 cycles = 72 h).

— L'inoculation de mérozoïtes à 9 heures correspond à l'inoculation de Percoll faite à 12 heures, puisque cet inoculum contient des anneaux et des trophozoïtes jeunes qui, dans le cycle normal, se trouvent dans le sang trois heures après les schizontes et les mérozoïtes. Dans notre expérience faite avec le Percoll à 12 heures, les parasitémies sont de 0,6 à H0, de 0,77 à H18 et de 4,5 à H36. Le taux de multiplication est de 8.

— L'inoculation de mérozoïtes à 16 heures correspond à l'inoculation de Percoll faite à 19 heures. Nous disposons des courbes de 18 heures. Les parasitémies sont de 0,1 à H0, de 0,5 à H18 et de 8 à H36. Le taux de multiplication est de 80.

— L'inoculation de mérozoïtes à minuit correspond à l'inoculation après Percoll faite à 3 heures. Nous ne disposons pas de ces courbes, mais sachant que la schizogonie s'est effectuée à 18 heures, tous les mérozoïtes L et R sont disponibles pour la période de pénétration 0-6 heures et les conditions sont optimales pour une montée très rapide de la parasitémie.

Les résultats obtenus précédemment s'expliquent donc facilement. Cependant, il est nécessaire d'amender la conclusion indiquant que le mérozoïte infectant ne pénètre qu'aux environs de 0 heure. Il faut préciser seulement qu'il pénètre de façon préférentielle aux environs de 0 heure.

II. — ÉVOLUTION DE LA PARASITÉMIE EN FONCTION DE L'HEURE D'INOCULATION APRÈS LES DEUX PREMIERS CYCLES

Les valeurs obtenues dans les expériences précédentes indiquent qu'au cours des deux premières schizogonies, les courbes de parasitémie varient suivant les heures d'inoculation, mais ces différences paraissent s'effacer au cours des cycles suivants. Les expériences suivantes ont été faites pour vérifier ce point particulier.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Du sang congelé de souris infecté par *P. yoelii nigeriensis* (Lot 472 RQ) est décongelé rapidement puis dilué dans

un mélange contenant 20 ml d'eau physiologique, 1 ml de glycérol et 40 mg de glucose.

A midi, 6 lots de 3 souris (Swiss non consanguines) sont inoculés avec, par souris, 200 µl de sang dilué respectivement à 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} . La même opération est répétée à minuit.

La parasitémie de chacune des souris est suivie jusqu'à ce qu'elle atteigne un niveau d'environ 5 parasites pour 100 hématies. La courbe de parasitémie a été construite pour permettre d'obtenir par extrapolation l'heure à laquelle sont atteints les 5 % lorsque l'heure des prélèvements ne coïncide par exactement avec ce moment.

RÉSULTATS

Les résultats sont indiqués dans le *tableau I*.

TABLEAU I. — Nombre d'heures nécessaires pour que, avec des inoculums progressivement dilués, la parasitémie des 3 souris de chaque lot atteigne 5 %. Il y a peu de différences entre les inoculations faites à midi et celles faites à minuit.

	Midi			Minuit		
10^{-2}	87	100	122	107	112	120
10^{-3}	110	114	125	122	124	128
10^{-4}	125	146	0	130	135	170
10^{-5}	140	160	0	140	0	0
10^{-6}	177	0	0	0	0	0
10^{-7}	0	0	0	0	0	0

Discussion

Lorsque les parasitémies atteignent un taux de 5 %, c'est-à-dire dans nos expériences, après de nombreuses schizogonies, il y a peu de différences entre les infections, que les inoculations aient été faites à midi ou à minuit.

III. — RECHERCHE DU RAPPORT L/R.

DIFFÉRENCES ENTRE LE NOMBRE DE L À 15 HEURES ET À MINUIT

Pour pouvoir apprécier l'importance de ces phénomènes de latence chez *P. y. nigeriensis*, deux questions sont essentielles : quel est le nombre de mérozoïtes latents (L) par rapport au nombre de mérozoïtes rapides (R) ? Dans quelle mesure ce rapport L/R varie-t-il au cours de la journée ?

Le premier point a été étudié par Landau et coll., 1990, avec *P. y. yoelii*, en effectuant des passages successifs et rapprochés de sang de souris à souris congelé et décongelé entre chaque passage. A chaque passage, les mérozoïtes rapides pénètrent dans les hématies, commencent le cycle schizogonique puis sont détruits par congélation sans avoir donné naissance à de nouveaux mérozoïtes car le délai de maturation est trop court (18 heures). Il ne reste plus que

les mérozoïtes latents (L) qui soient inoculés à la souris suivante. En calculant les dilutions successives, les auteurs avaient estimé grossièrement que le rapport L/R était de 1/100 au 1^{er} passage, de 1/10 au 2^e passage et de 1/5 au 3^e passage.

Sachant maintenant que le cycle schizogonique de toutes les sous-espèces de *P. yoelii* est de 18 heures et non de 24 heures comme nous le pensions à l'époque, les résultats précédents peuvent prêter à erreur. On peut envisager en effet qu'entre deux passages espacés de 18 heures seulement, une schizogonie ait eu lieu et ait donné naissance à des mérozoïtes autres que les latents que nous cherchons à compter.

Une nouvelle série expérimentale a donc été entreprise.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Pour chercher à établir le rapport L/R, nous comparons d'une part les résultats d'inoculations faites avec du sang soumis à des dilutions simples (dans de l'eau physiologique) avec ceux de dilutions dont la première est faite par passage dans l'organisme d'une souris donneuse. Dans le premier cas, les inoculums comprennent à la fois les mérozoïtes R et L. Dans le second cas, après congélation du sang, les mérozoïtes R entrés dans les hématies de la souris sont détruits et l'inoculum ne contient plus que les mérozoïtes L.

En outre, pour comparer le nombre de mérozoïtes L présents dans le sang de la souris donneuse à 15 heures et à minuit, les expériences de dilution avec le sang passé par la souris donneuse sont faites une première fois à 15 heures et une seconde fois à 0 heure.

Le processus expérimental est schématisé sur la *figure 2*.

A — Un tube de sang congelé à -75° est décongelé à midi pour être dilué. En raison du milieu glycérolé utilisé pour la congélation, ce sang d'origine se trouve déjà dilué à $5 \cdot 10^{-1}$. Le liquide de dilution (LD) comprend 20 ml d'eau physiologique, 1 ml de glycérol et 40 mg de glucose. Il importe de changer de pipette pour chaque dilution car des expériences préliminaires semblent indiquer que les mérozoïtes adhèrent aisément aux parois.

B — Les dilutions s'effectuent successivement dans les tubes suivants :

— 1^{er} tube : 0,4 ml de LD + 0,1 ml de sang décongelé. La dilution qui était à $5 \cdot 10^{-1}$ passe à 10^{-1} .

— 2^e tube : 0,9 ml LD + 0,1 ml tube 1 = dilution 10^{-2} .

— 3^e tube : 0,9 ml LD + 0,1 ml tube 2 = dilution 10^{-3} etc.

C — A midi, 200 µl de chaque tube sont inoculés par voie IP à des lots de 3 souris.

D — A midi, la « souris donneuse » est injectée, par voie IP, avec un important inoculum du même sang décongelé.

Le volume de sang injecté à la souris donneuse se trouve

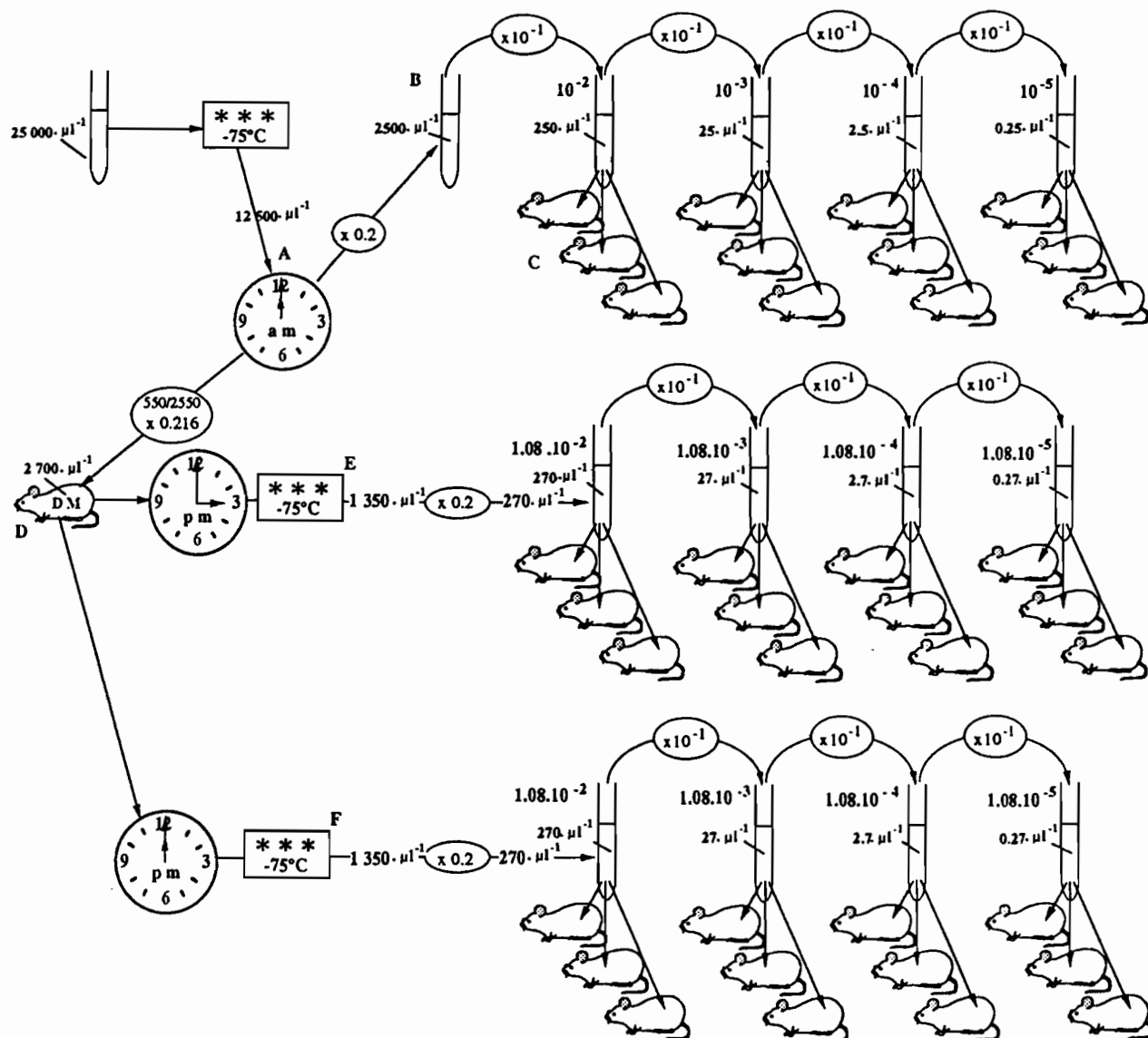


FIG. 2. — Protocole des expériences réalisées dans le troisième chapitre. Explications dans le texte.

dilué dans le sang de cette souris, de la façon suivante : $550 \mu\text{l}$ de sang décongelé ont été inoculés. Ce sang était déjà dilué à $5 \cdot 10^{-1}$ à cause de la congélation ; la dilution dans le sang de la souris donneuse est donc de $550/2550 = 0,216$ (en admettant que le volume de sang d'une souris de 20 g est de $2\,000 \mu\text{l}$).

E — A 14 h 45, $200 \mu\text{l}$ de sang sont prélevés dans un sinus rétro-orbitaire de la souris donneuse, mélangés à $200 \mu\text{l}$ de glycérol et congelés à -75° pendant 15 minutes. A 15 heures, ce sang est décongelé rapidement et est utilisé pour les dilutions suivantes :

— 1^{er} tube : $800 \mu\text{l}$ LD + $200 \mu\text{l}$ sang. La dilution est donc de $0,5 \times 0,216 \times 0,5 \times 0,2 = 1,08 \cdot 10^{-2}$.

— 2^e tube : $900 \mu\text{l}$ LD + $100 \mu\text{l}$ sang. La dilution est de $1,08 \cdot 10^{-3}$.

— 3^e tube : $900 \mu\text{l}$ LD + $100 \mu\text{l}$ sang. La dilution est de $1,08 \cdot 10^{-4}$ etc.

Des lots de 3 souris sont inoculés avec le liquide de chacun des tubes, chaque souris recevant la dose de $200 \mu\text{l}$.

F — Les mêmes opérations qu'en E sont répétées à 23 h 45.

G — Comme dans les expériences précédentes, l'heure où la parasitémie des souris receveuses atteint un niveau d'environ 5 parasites pour 100 hématies est établie soit directement soit par lecture de la courbe de parasitémie.

RÉSULTATS ATTENDUS

Pour établir les données quantitatives qui soient compatibles avec nos résultats, nous disposons des éléments suivants :

1 — Il est admis qu'une souris d'environ 20 g a un volume total de sang d'environ 2 000 μ l. Le nombre d'hématies dans l'ensemble de l'organisme est donc estimé à $5 \cdot 10^6 \times 2\,000 = 10^{10}$. L'heure qui est notée pour chaque souris correspond au moment où elle a une parasitémie de 5 %. Il y a donc à ce moment $10^{10} \times 5/100 = 5 \cdot 10^8$ parasites dans tout le sang de la souris.

2 — Le cycle schizogonique de *P. y. nigeriensis* dure 18 heures. L'expérimentation montre que le taux de parasitémie n'augmente pas brusquement au moment de la schizogonie. Il augmente nettement environ 4 heures après.

3 — Nous avons observé que, pour les inoculations les plus faibles, les souris n'atteignent une parasitémie de 5 % qu'aux environs de la 160^e heure et jamais plus tard. Il faut donc admettre environ $160/18 = 9$ cycles schizogoniques pour que les infections dont l'inoculum ne comporte que quelques mérozoïtes atteignent ce taux de 5 %.

4 — Dans les infections expérimentales très synchrones (technique du Percoll), et faciles à analyser, la première schizogonie aboutit à une multiplication plus faible, (environ 5). A partir de la deuxième schizogonie, le taux de multiplication atteint environ 10.

Le tableau II, fondé sur ces données, propose donc une échelle des taux de parasitémie au cours des 162 premières heures, en fonction du nombre de parasites inoculés.

La 2^e colonne B indique les heures des schizogonies. La colonne C indique le nombre de parasites. La colonne A indique les taux de multiplication de chaque schizogonie. La colonne D est destinée à faire connaître le nombre de mérozoïtes de l'inoculum qui détermine une parasitémie à 5 % à une heure déterminée : ainsi pour une souris positive à 126 heures, le nombre de mérozoïtes de l'inoculum se lit sur la même ligne ; il est de 50. Les résultats observés ci-dessous, pour les dilutions simples, sont indiqués dans la colonne E.

RÉSULTATS OBSERVÉS

Les résultats observés sont consignés dans le tableau III.

DISCUSSION

Dilutions simples

Pour connaître la concentration en mérozoïtes du sang d'origine, nous constatons dans le tableau III que dans le cas d'une dilution simple à 10^{-2} par exemple, les parasitémies atteignent 5 % à 70, 71 et 73 heures. Le tableau II indique que lorsque la parasitémie d'une souris atteint 5 % dans ce laps de temps, l'inoculum a été de 500 à 5 000 mérozoïtes. Les 200 μ l de l'inoculum non dilué (sang

TABLEAU II. — Correspondances attendues entre le nombre d'heures de l'infection (colonne B) et le nombre de parasites (colonne C). L'heure où la parasitémie des souris atteint 5 % (colonne D) correspond sur la colonne C au nombre de mérozoïtes inoculés. Sur la colonne A : coefficients de multiplication. Sur la colonne E : heure expérimentalement obtenues avec les dilutions simples.

A	B	C	D	E
	0	1	162	
$\times 5$	18	5	144	
$\times 10$	36	50	126	130
$\times 10$	54	$5 \cdot 10^2$	108	120
$\times 10$	72	$5 \cdot 10^3$	90	102
$\times 10$	90	$5 \cdot 10^4$	72	72
$\times 10$	108	$5 \cdot 10^5$	54	
$\times 10$	126	$5 \cdot 10^6$	36	
$\times 10$	144	$5 \cdot 10^7$	18	
$\times 10$	162	$5 \cdot 10^8$	0	

TABLEAU III. — Résultats expérimentaux indiquant le nombre d'heures précédant la montée de la parasitémie à 5 %.

Dilutions directes :				
10^{-2}	70	71	73	
10^{-3}	100	102	108	
10^{-4}	120	125	128	
10^{-5}	130	∞	∞	
Dilutions après passage par souris donneuse 15 heures :				
$1,08 \cdot 10^{-2}$	108	153	morte	
$1,08 \cdot 10^{-3}$	128	130	147	
$1,08 \cdot 10^{-4}$	130	148	160	
$1,08 \cdot 10^{-5}$	∞	∞	∞	
Dilutions après passage par souris donneuse 0 heure :				
$1,08 \cdot 10^{-2}$	87	102	105	
$1,08 \cdot 10^{-3}$	108	138	∞	
$1,08 \cdot 10^{-4}$	137	∞	∞	
$1,08 \cdot 10^{-5}$	153	158	∞	

du lot 720 FV) contenaient donc $5 \cdot 10^4 \times 10^2 = 5 \cdot 10^6$ mérozoïtes soit 25 000 mérozoïtes par μ l.

Dans l'expérience préliminaire du tableau I, le sang d'origine est différent (lot 472 RQ). Ici, dans le cas d'une dilution simple à 10^{-2} par exemple, les parasitémies atteignent 5 % à 87, 100, 107, 112, 120 et 122 heures. Le tableau II indique que lorsque la parasitémie d'une souris atteint 5 % dans ce laps de temps, l'inoculum a été de 500 à 5 000 mérozoïtes. Les 200 μ l de l'inoculum non dilué (sang du lot 472 RQ) contenaient donc $2\,500 \times 10^2 = 250\,000$ mérozoïtes soit 1 250 mérozoïtes par μ l.

Dans nos conditions expérimentales, les dilutions de chaque lot augmentent par paliers de 10 %. Si les hypothèses concernant les taux de multiplication (*tableau II*) se vérifient, ces dilutions sont compensées, chaque 18 heures, par une schizogonie qui multiplie le taux de parasitémie par 10.

Un calcul simple permet en utilisant le *tableau II* d'obtenir la correspondance entre chacune des heures observées et le nombre de mérozoïtes qui ont dû pénétrer dans les hématies pour déterminer une infection atteignant le seuil de 5 %.

Les correspondances entre les nombres calculés et les nombres observés sont les suivantes :

— dilution 10^{-2} (inoculum de 50 000 mérozoïtes)

Nous trouvons 70, 71 et 73 heures au lieu des 72-90 heures calculées (= inoculums de 100 000, 75 000 et 47 500 M).

— dilution 10^{-3} (inoculum de 5 000 mérozoïtes)

Nous trouvons 100, 102 et 108 heures au lieu des 90-108 heures calculées (= inoculums de 2 500, 2 000 et 500 M).

— dilution 10^{-4} (inoculum de 500 mérozoïtes)

Nous trouvons 120, 125 et 128 heures au lieu des 108 à 126 heures calculées (= inoculums de 200, 75 et 68 M).

— dilution 10^{-5} (inoculum de 50 mérozoïtes)

Nous trouvons 130 heures et 2 souris négatives au lieu des 126 à 144 heures calculées (= inoculums de 20, 0 et 0 M).

Le résultat obtenu à la dilution extrême de 1/100 000^e est satisfaisant car, à ce niveau, il est normal de rencontrer une distribution non poissonnienne, et de type surdispersée. Nous pouvons donc estimer que le schéma concernant la multiplication de *P. y. nigeriensis* peut être considéré comme fiable.

Dilutions après passage par souris donneuse à minuit

— dilution 10^{-2} (inoculum de 54 000 M)

Nous trouvons 87, 102 et 105 heures au lieu des 72-90 heures calculées (= inoculums de 12 500, 2 000 et 1 250 M).

— dilution 10^{-3} (inoculum de 5 400 mérozoïtes)

Nous trouvons 108 et 138 heures et une souris négative au lieu des 90-108 heures calculées (= inoculums de 500, 20 et 0 M).

— dilution 10^{-4} (inoculum de 540 mérozoïtes)

Nous trouvons 137 heures et 2 souris négatives au lieu des 108 à 126 heures calculées (= inoculums de 22, 0 et 0 M).

— dilution 10^{-5} (inoculum de 54 mérozoïtes)

Nous trouvons 153 et 158 heures et 1 souris négative au lieu des 126 à 144 heures calculées (= inoculums de 2, 2 et 0 M).

Les résultats sont beaucoup plus dispersés que dans les expériences de dilutions simples mais il apparaît qu'une proportion souvent importante des mérozoïtes reste en circulation à minuit, 12 heures après l'inoculation de la souris donneuse.

Dilutions après passage par souris donneuse à 15 heures

— dilution 10^{-2} (= 54 000 M)

Nous trouvons 108 et 153 heures au lieu des 72-90 heures calculées (= inoculums de 500 et 2 M).

— dilution 10^{-3} (inoculum de 5400 mérozoïtes)

Nous trouvons 120, 130 et 147 heures au lieu des 90-108 heures calculées (= inoculums de 200, 40 et 4 M).

— dilution 10^{-4} (inoculum de 540 mérozoïtes)

Nous trouvons 130, 148 et 160 heures au lieu des 108 à 126 heures calculées (= inoculums de 40, 4 et 1 M).

— dilution 10^{-5} (inoculum de 54 mérozoïtes)

Nous trouvons trois souris négatives.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Nous pouvons utiliser les estimations du nombre de mérozoïtes obtenus dans les différentes circonstances pour établir le *tableau IV*.

TABLEAU IV. — *Rapports des estimations du nombre de mérozoïtes obtenus dans les différentes circonstances.*

Dilution	MD/MC	M0h/MC	M0h/MD	M15h/MC	M15h/MD	M15h/M0h
10^{-2}	1,5	0,10	0,07	0,002	0,003	0,05
10^{-3}	0,33	0,03	0,10	0,015	0,05	0,47
10^{-4}	0,23	0,014	0,06	0,028	0,13	2
10^{-5}	0,13	0,02	0,18	0	0	0

Rapport MD/MC

Il correspond au nombre de mérozoïtes obtenus par dilution simple (MD) par rapport au nombre de mérozoïtes calculé (MC).

Ce rapport indique l'écart entre le nombre total de mérozoïtes (R + L) obtenu par dilutions simples et le même nombre tel qu'il a été calculé.

Les valeurs obtenues s'éloignent sensiblement de 1. Ces écarts paraissent inévitables pour plusieurs raisons :

— le nombre d'heures écoulées entre l'inoculation et le moment où la parasitémie atteint 5 % qui a été utilisé pour évaluer le nombre de mérozoïtes inoculés est approximatif

— la distribution surdispersée des mérozoïtes est privable et, dans les fortes dilutions, les résultats obtenus sont de moins en moins précis.

Il semble donc légitime d'admettre la fiabilité des chiffres proposés dans le *tableau II* pour l'évolution de la parasitémie. Cependant, les rapports établis avec MC plutôt qu'avec les dilutions fortes atténuent les causes d'erreur et paraissent donc plus fiables.

Rapports M 0h/MC et M 0h/MD

M 0h/MC correspond au nombre de mérozoïtes obtenus après passage chez la souris à minuit par rapport au nombre de mérozoïtes calculé et M 0h/MD au nombre de méro-

zoïtes obtenus après passage chez la souris à minuit par rapport au nombre de mérozoïtes obtenus par dilution simple.

Ces rapports indiquent la proportion relative de la quantité de mérozoïtes latents (L) détectés chez les souris à minuit et de la quantité totale de mérozoïtes (R + L) disponible lorsque les mérozoïtes rapides n'ont pas été éliminés.

Un rapport de 1/10 peut être admis, ce qui signifie que lorsque 10 mérozoïtes sont inoculés, 9 ont été utilisés et que 1 reste disponible dans le sang, à minuit.

Rapports M 15h/MC et M 15h/MD

M 15h/MC correspond au nombre de mérozoïtes obtenus après passage chez la souris à 15 heures par rapport au nombre de mérozoïtes calculé et M 15h/MD au nombre de mérozoïtes obtenus après passage chez la souris à 15 heures par rapport au nombre de mérozoïtes obtenus par dilution simple.

Ces rapports indiquent la proportion relative de la quantité de mérozoïtes latents (L) détectés chez les souris à 15 heures et de la quantité totale de mérozoïtes (R + L) disponible lorsque les mérozoïtes rapides n'ont pas été éliminés.

La dispersion des valeurs obtenues est très importante, mais un rapport de 1/100 semble compatible avec les résultats. Cela indique que lorsque 100 mérozoïtes sont inoculés, 99 ont été utilisés et que 1 reste disponible dans le sang, à 15 heures.

Rapport M 15h/M 0h

M 15h/M 0h correspond au nombre de mérozoïtes obtenus après passage chez la souris à 15 heures par rapport au nombre de mérozoïtes obtenus après passage chez la souris à minuit.

Ce rapport résulte des données précédentes en indiquant que le nombre de mérozoïtes latents disponibles dans le sang des souris est environ 10 fois plus important à minuit, 12 heures après l'inoculation, qu'à 15 heures, 3 heures après l'inoculation.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce résultat paradoxal apparaissait déjà dans les recherches sur *P. c. chabaudi* où le nombre de mérozoïtes latents détectés dans le sang des souris augmente régulièrement de midi à minuit (Cambie et coll., 1990).

Cette distinction entre mérozoïtes latents (L) et mérozoïtes rapides (R) apparaît également dans nos expériences où l'on peut suivre les premières schizogonies grâce à l'inoculation de formes très jeunes de *P. y. nigeriensis* sélectionnées sur gradients de Percoll. Après la première schi-

zogonie, les R sont les seuls à pénétrer dans les hématies et produisent une infection très synchronone. Dès la 2^e schizogonie, les L de la 1^{re} schizogonie interviennent et se mélangent aux R de la 2^e schizogonie. L'infection devient moins synchronone et cette synchronie s'efface presque complètement au cours de la 3^e schizogonie. (Deharo et coll., 1993). On constate que le coefficient de multiplication de la 1^{re} schizogonie est à peu près moitié du coefficient des schizogonies suivantes. Ceci laisse supposer que les R sont presque aussi nombreux que les L.

Ici encore, l'existence d'une population importante de mérozoïtes latents paraît la seule explication possible.

Une hypothèse peut être formulée pour expliquer le mécanisme du phénomène :

— Les mérozoïtes latents sont des formes inactives non infectantes. Ils n'acquièrent leur pouvoir infectant que progressivement. Ces mérozoïtes latents pourraient s'échapper hors du sang, par exemple dans le réseau lymphatique qui entoure les capillaires sanguins. Ils y séjourneraient plus ou moins longtemps avant de revenir au contact des hématies. Un mécanisme humoral, vraisemblablement lié au cycle nyctéméral de l'hôte, pourrait favoriser le mécanisme en cause.

Remerciements. — Nous sommes très reconnaissant à notre collègue et ami Jean-Charles GANTHIER d'avoir bien voulu relire et corriger le manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Beauté-Lafitte A., Altemayer-Caillard V., Gonnet-Gonzalez F., Ramiamanana L., Chabaud A., Landau I. : The chemosensitivity of the rodent malaria. Relationships with the biology of merozoites, 1993, submitted to *Int. J. Parasitol.*
- Cambie G., Landau I., Chabaud A. G. : Niches horaires des trois espèces de Plasmodies coexistant chez un rongeur de Centrafrique. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1990, 310, 183-188.
- Deharo E., Gautret Ph., Ginsburg H., Chabaud A., Landau I. : Synchronisation of *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *P. y. killicki* infection in the mouse by means of Percoll-glucose gradient stage-fractionation. Determination of the duration of the schizogonic cycle, 1993, Submitted to *Parasitol. Res.*
- Landau I., Cambie G., Chabaud A. : Biology of Plasmodium merozoites with special reference to the chemoresistance of *Plasmodium falciparum*. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1990, 65, 101-103.
- Landau I., Chabaud A. G. : Nouvelles données sur le cycle nyctéméral des *Plasmodium*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1980, 291, série D, 985-988.
- Montalvo-Alvarez A., Landau I., Baccam D., Chabaud A. G., Ginsburg H. : Experimental modifications of the circadian rhythm of *Plasmodium vinckei petteri* following cryopreservation; probable resistance of the merozoite to thawing. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1988, 307, 5-10.