

Observations sur la transmission cyclique du *Plasmodium berghei*

PAR

Guy MICHIELS (*).

Boursier de l'I. B. E. R. S. O. M.

(Reçu pour publication le 11 février 1963.)

Introduction.

De nombreuses expériences de transmission cyclique du *Plasmodium berghei* ont été tentées depuis la découverte de ce plasmodium en 1948. Nous rappellerons tout d'abord les principales communications faisant état de succès dans ce domaine :

a) Yoeli et Wall en décembre 1951 rapportent un succès complet obtenu à partir de jeunes hamsters infectés, chez *A. stephensi*, *maculipennis* et *quadrifasciatus* : des oocystes mûrs furent régulièrement présents mais les sporozoïtes n'arrivèrent au niveau des glandes salivaires que d'une manière irrégulière. Une transmission fut réussie, tant par inoculation de glandes salivaires positives que par piqûres de moustiques infectants. Les animaux employés furent de jeunes rats blancs âgés d'un mois environ.

b) Ramakrishnan et Satya Prakash signalent avoir obtenu l'évolution sporogonique chez un seul spécimen d'*A. stephensi* aux Indes (1953).

c) Perez Reyes, expérimentant *A. aztecus*, a également réalisé cette évolution ainsi que la transmission du plasmodium aux hamsters par inoculation expérimentale de sporozoïtes (1953).

(*) Ce travail a été accompli, sous la direction du Professeur Dr. I. Vincke, au laboratoire de paludologie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers. Il a pu être mené à bien grâce à l'aide du Fonds National de la Recherche Scientifique.

d) Bray, utilisant différents anophèles, obtint de nombreux oocystes mûrs, une seule glande salivaire fortement positive, mais échoua dans tous ses essais de transmission à un hôte vertébré (1954).

e) Rhodain, Wanson et Vincke consacrèrent de nombreux travaux à cette question; citons ceux de 1955, année où ces auteurs obtinrent également, à partir de jeunes hamsters infectés, la sporogonie complète chez *A. maculipennis atroparvus*. Ici aussi, il fut impossible d'obtenir une transmission complète, ce que les auteurs attribuèrent au petit nombre de sporozoïtes présents et à leur rapide dégénérescence chez un mauvais hôte vecteur.

f) Durant plusieurs années, plus aucun résultat ne fut publié. En 1960, enfin, Yoeli et Most rapportèrent trois passages cycliques successifs sur jeunes rats. Un tel succès fut obtenu en partant de sporozoïtes provenant d'oocystes mûrs de l'estomac d'*A. quadrimaculatus* et *aztecus*.

Ayant reçu le 7 février 1961, grâce à l'obligeance du gouvernement du Katanga et à celle du docteur de Waersegger, la souche SP 11 de *Plasmodium berghei*, nous avons à nouveau repris ces expériences.

Cette souche nous a été fournie sur un thamnomyse infecté au Katanga par deux glandes salivaires positives d'*A. dureni* trouvé à Kasapa.

Technique.

1. Nous avons employé au cours de nos essais, comme porteurs de plasmodium, de jeunes rats et souris blancs et des thamnomyse et comme moustiques des *A. quadrimaculatus*, *atroparvus*, *stephensi*, *albimanus* et *gambiae*.

Les hamsters et les thamnomyse étaient de jeunes animaux sevrés. Les rats et les souris également. Par la suite, nous avons pris ces derniers animaux de plus en plus jeunes pour finalement n'employer que du matériel dont l'âge variait entre 10 et 21 jours. Ils étaient anesthésiés au nembutal de sorte que les anophèles se nourrissaient facilement. Nous n'avons employé que des animaux du premier au quatrième passage mécanique (P1 à P4).

2. Les animaux infectés étaient exposés le plus souvent trois jours de suite, parfois un ou deux jours seulement, aux anophèles, puis ces derniers étaient nourris sur des mèches de glucose déposées 48 heures après le dernier repas sanguin. L'insectarium était à une température de 27° et à une humidité de 85 p. cent.

3. Les dissections d'estomac se faisaient à partir du 7^e jour après le premier repas sanguin tandis que celles des glandes salivaires débutaient le 10^e jour.

Ces dissections ont été effectuées dans du sérum de rat dilué au quart ou dans de l'extrait globulaire préparé suivant la méthode de Whitmann.

4. Quant aux essais de transmission, différentes méthodes ont été employées.

a) par piqûre de moustique;

b) par injection d'estomacs ou de glandes salivaires positives. Ce matériel était repris dans du sérum physiologique ou du sérum de rat dilué au quart et injecté

par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale à des souris et des rats de trois semaines;

c) par broyat de thorax ou d'anophèles totaux pris parmi les lots dont les estomacs avaient été trouvés positifs un ou deux jours auparavant. Ce broyat était centrifugé à 500 tours pendant 10 minutes, le liquide surnageant à 1.000 tours pendant 10, 15 ou 20 minutes. Le culot obtenu était ensuite inoculé. Des *Aedes* positifs (Sporozoïtes de *Pl. Gallinaceum* dans les glandes salivaires) traités de la même manière donnaient des résultats positifs à raison de 1/5 de moustique par animal.

5. Le pouvoir d'extra-flagellation de la souche a toujours été testé d'abord de manière qualitative, ensuite de manière quantitative sans qu'il ait été possible d'établir une relation entre le nombre d'extra-flagellations et le degré d'infection du moustique.

Résultats.

Voici, consigné dans le tableau I, les résultats obtenus de février à octobre 1961.

TABLEAU I.

Espèce d' <i>Anophèles</i>	Lots de moustiques	Souris jeunes sevrées	Rats jeunes sevrés	Lots infectés	Estomacs disséqués	Estomacs positifs	Glandes sal. disséquées	Glandes positives	Commentaires
<i>quadrimaculatus</i> ...	6	3	3	2	48	2	5	0	rare oocystes
<i>atroparvus</i>	1	—	1	—	12	0	—	—	—
<i>gambiae</i>	4	1	3	1	72	1	12	—	—
<i>stephensi</i>	144	128	16	59	2.840	269	347	4	(*)

(*) Les 4 glandes salivaires ne furent que très faiblement positives. Les oocystes montrèrent tous les stades de l'évolution jusqu'aux sporozoïtes. Leur nombre ne fut jamais supérieur à 50 par estomac.

Comme d'autres auteurs l'ont déjà constaté, il existe de grandes différences entre les résultats obtenus chez des animaux présentant apparemment des conditions identiques.

C'est ainsi qu'un de nos animaux, la souris 101, expérimentée successivement sur trois lots de moustiques *stephensi*, a donné des résultats positifs dans les trois lots avec un total de 26 estomacs positifs sur 98 disséqués et de 3 glandes salivaires sur 57.

Plus remarquable encore est une série de 4 souris provenant toutes de la même origine et qui toutes infectèrent leur lot respectif d'anophèles *stephensi*, avec comme total 103 estomacs positifs sur 234 disséqués, alors que d'autres séries absolument identiques quant au

pouvoir d'extra-flagellation, de degré d'infection, de passage etc., se révélèrent soit négatives soit très faiblement positives.

Bien qu'ayant obtenu des oocystes mûrs remplis de sporozoïtes nous n'avons pas réussi (voir tableau II) contrairement à Yoeli et à Most, la transmission cyclique. Il faut cependant noter que nous n'avons jamais réussi à obtenir un nombre aussi élevé d'oocystes que celui signalé par ces auteurs.

TABLEAU II.
Essais de transmission cyclique.

Type d'expérience	Nombre d'animaux. Rats, jeunes sevrés en général	Résultat	Commentaires
Piqûres de moustiques ...	43	—	Les anophèles proviennent dans la plupart des cas du reliquat des lots dont la dissection montrait des estomacs positifs
Inoculation des estomacs +	46	—	Injection de 1 à 26 estomacs par animal
Inoculation des glandes salivaires +	4	—	—
Inoculation des broyats ...	15	—	Injection de 36 à 80 thorax ou anophèles totaux par animal

N. B. 1. Les animaux injectés ont été examinés jusqu'au 21^e jour et dans certains cas jusqu'au 30^e jour.

2. En moyenne nous injectons entre 4 et 12 estomacs positifs montrant un maximum d'oocystes mûrs (10 à 50) par animal.

A partir d'octobre 1961, un accident technique étant survenu dans notre insectarium, nous avons été privés d'anophèles durant une certaine période (3 mois).

Dès que possible nous avons repris nos essais, mais nous n'avons plus jamais été capables d'obtenir le moindre résultat (voir tableau III). Dans certains cas des schizonticides à doses sub-curatives furent administrés (1/20 mg de Nivaquine chez la souris 1/10 mg chez le rat) dans l'espoir d'augmenter le nombre de gamètes par rapport au nombre de formes asexuées.

Tous nos essais échouèrent, pas un oocyste n'ayant été obtenu.

TABEAU III.

Résultats obtenus de février à août 1962.

Espèce d' <i>Anophèles</i>	Lots de moustiques	Souris	Rats	Thamnomys jeunes sevrés	Hamsters sevrés	Estomacs disséqués	Estomacs positifs	Glandes sal. disséquées	Glandes sal. positives
<i>atroparvus</i>	3	1	1	—	1	29	—	—	—
<i>albimanus</i>	20	11	4	1	4	230	—	—	—
<i>gambiae</i>	29	14	11	2	2	198	—	—	—
<i>stephensi</i>	69	34	28	1	6	1.186	—	47	—

N. B. : Les rats et les souris étaient de jeunes animaux de 10 à 21 jours, puis devant l'insuccès de nos essais, nous sommes revenus à de jeunes animaux sevrés (21 à 30 jours), de tels animaux ayant été employés avec succès lors des expériences précédentes. Les thamnomys et les hamsters avaient environ 45 jours.

Il avait déjà été observé précédemment que le pouvoir d'extraflagellation diminuait rapidement lors de l'entretien par passage mécanique d'une souche de *Plasmodium berghei* en laboratoire. Ce phénomène ne peut être la raison de nos échecs à partir de février 1961. En effet, nous avons testé ce pouvoir de manière régulière pour tous les animaux employés et grâce à l'espacement au maximum des passages mécaniques successifs, nous sommes parvenus à le garder intact durant toute la période de nos essais. En conclusion nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats aussi favorables que ceux signalés par Yoeli et Most en 1960. Ces résultats ne furent guère différents de ceux obtenus par Bray R. S. et Rodhain, Wanson et Vincke. Si de nombreux oocystes mûrs purent être constatés au niveau de l'estomac des Anophèles, par contre les glandes salivaires ne furent que très rarement infectées et tous les essais de transmission échouèrent.

Nous remercions le docteur P. Janssen, directeur du laboratoire de recherche « Dr. C. Janssen » à Beerse pour les rats et les souris qu'il a eu l'amabilité de nous fournir.

Résumé. — Des essais de transmission cyclique ont été tentés au moyen d'une souche récente produisant d'abondantes extraflagellations. Les animaux employés étaient des rats et des souris blancs de 15 à 30 jours, des thamnomys et des hamsters d'environ 45 jours. Des oocystes mûrs ont été obtenus principalement avec *Anopheles stephensi* mais aucun essai de transmission n'a été, à partir de ces oocystes, couronné de succès.

Samenvatting. — Proefnemingen werden gedaan voor het lukken van de cyclische transmissie met behulp van een recent ontvangen stam waaruit menigvuldige extraflagellatie's werden verkregen. De gebruikte dieren waren witte ratten en muizen van 15 tot 30 dagen oud, de hamsters en *thamnomys* waren ongeveer 45 dagen oud. Rijpe oocysten werden hoofdzakelijk bekomen met *A. stephensi* maar men slaagde er niet in, met deze oocysten, de transmissie te gelukken.

Summary. — Attempts at cyclic transmission have been tried by means of a recent strain producing numerous exflagellations. The animals used were white rats and mice aged 15-30 days, *Thamnomys* and hamsters about 45 days old. Ripe oocysts have been obtained chiefly with *A. stephensi* but attempts at transmission from these oocysts have not been successful.

Zusammenfassung. — Vermittels eines frischen, reichlich Geißelbildung produzierenden Stammes wurden Untersuchungen zur Klärung des Übertragungszyklus durchgeführt. Als Versuchstiere verwendete man weisse Ratten und Mäuse von 15-30 Tagen sowie *Tamnomys* und Hamster von etwa 45 Tagen. Reife Oocysten wurden insbesondere mit *A. stephensi* gewonnen, jedoch verlief, von diesen Oocysten ausgehend, kein Übertragungsversuch erfolgreich.

Resumen. — Ensayos de transmisión ciclica han sido intentados, por medio de una cepa reciente, produciendo abundantes extraflagelaciones. Los animales empleados fueron ratas y ratones blancos de 15-30 días, *Thamnomys* y hámster aproximadamente de 45 días. Oocistes maduros se obtuvieron, principalmente, con el *A. stephensi*, pero ninguno de los ensayos de transmisión, a partir de los mismos, se vieron coronados por el éxito.

BIBLIOGRAPHIE.

- Bray, R. S., 1954, The mosquito transmission of *Plasmodium berghei*. Ind. II. Malarialogy, 8, 263.
- Perez-Reyes, R., 1963, *Anopheles aztecus* (Hoffman, 1935), A new definitive host for the cyclical transmission of *Plasmodium berghei* Vincke et Lips, 1948, JI. Parasitology, 39, 603.
- Ramakrishnan, S. P., Satya Prakash, Krishnaswami, A. K. and Mohan, B. N., 1953, Studies of *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. A critical analysis of experimental mosquito transmission. Ind. JI., Malarialogy, 7, 67.
- Rodhain, J. et Vincke, I., 1951, Essai d'évolution de *Plasmodium berghei* Vincke et Lips chez *Anopheles maculipennis* (var. *atroparvus*). Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 31 : 2, 297-302.

- , —, 1952, Note au sujet de l'évolution du *Plasmodium berghei* chez *A. maculipennis* var. *atroparvus*. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., **32**: 165.
- Rodhain, J., Wanson, M. et Vincke, I., 1955, Nouveaux essais d'évolution de *Plasmodium berghei* Vincke et Lips chez diverses espèces d'Anophèles. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., **35**, 203.
- , —, —, 1955, Essai de transmission cyclique de *Plasmodium berghei*. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., **35**, 603.
- Vincke, I. H., 1954, Experimental transmission of *Plasmodium berghei*, Ind. J. Malariology, **8**, 257.
- Whitman, L., 1948, The prolonged viability of sporozoites of *Plasmodium gallinaceum* in extracts of washed chicken erythrocytes. Journ. of Immun., Vol. 59, n° 3.
- Yoeli, M. and Wall, 1951, Complete sporogonie development of *Plasmodium berghei* in experimental by infected Anopheles spp. Nature 168, p. 1078.
- , —, 1952a, Ibid. 169, p. 881.
- , —, 1952b, Cyclic transmission of *Plasmodium berghei* and stages of development. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **46**, p. 374.
- Yoeli, M. and Most, H., 1960, The biology of a newly isolated strain of *Plasmodium berghei* in a rodent host and in experimental mosquito vectors. Royal Soc. Trop. Med. and Hygiene, **54**, 549-555.
-