

Communications — Mededelingen

ETUDE DE L'INFECTIVITE DES SPOROZOITES DE *PLASMODIUM BERGHEI* AU COURS DES MANIPULATIONS DE LABORATOIRE

par

NGIMBI, N. P., WERY, M., TIMPERMAN, G., HENDRIX, L. & PEETERS-DE RUYSSER, F.
*Laboratoire de Protozoologie, Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold,
Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique*

Résumé — Les sporozoïtes conservés en dehors des glandes salivaires de l'anophèle perdent rapidement leur viabilité.

Les milieux nutritifs qui leur sont le plus favorables doivent être isotoniques et contenir du glucose, du NaCl, de l'hémoglobine et surtout du sérum soit de souris, soit de veau foetal.

L'albumine ne peut remplacer le sérum total, ni d'ailleurs des solutions de substituts du plasma.

L'abaissement de la température à 0°C prolonge de manière importante la survie des sporozoïtes, indiquant l'influence bénéfique d'un ralentissement du métabolisme.

Par contre, dans les glandes salivaires de l'anophèle, à 21°C, la viabilité se maintient à un niveau constant pendant plus de dix jours sans perte appréciable.

L'inoculation intraveineuse des sporozoïtes est la plus efficace, suivie par la voie intrapéritonéale et la voie sous-cutanée; la voie orale n'occasionne aucune infection chez la souris.

L'intensité de l'infection, aussi bien dans le foie que dans le sang, n'est pas proportionnelle au nombre de sporozoïtes dans l'inoculum.

KEYWORDS : *Plasmodium berghei*; Sporozoites; In vitro; Viability.

1. Introduction

Dans les conditions naturelles, l'anophèle se charge lui-même de transférer les sporozoïtes de ses glandes salivaires dans la circulation de l'hôte vertébré. La standardisation d'un inoculum de sporozoïtes (Vincke et Bafort, 1968) pour étude expérimentale nécessite des manipulations et le séjour des parasites dans un milieu artificiel avant leur utilisation.

Tout travail quantitatif réalisé sur la sporogonie des plasmodiums doit tenir compte de ce séjour des sporozoïtes en dehors des glandes salivaires, au cours duquel on sait qu'ils perdent rapidement leur capacité d'infecter l'hôte vertébré (Fink et Schicha, 1969).

Les nombreux essais d'immunisation par sporozoïtes ont montré que viabilité et antigénicité sont liées (Vanderberg, 1975). Les meilleurs antigènes vaccinnants sont constitués par des sporozoïtes viables (Verhave et Meeuwissen, 1974; Verhave, 1975; Beaudoin *et al.*, 1977) ou des sporozoïtes irradiés (Nussenzweig *et al.*, 1967; Spitalni et Nussenzweig, 1972; Beaudoin *et al.*, 1976; Bafort *et al.*, 1977; Bawden *et al.*, 1977; etc.).

Les autres essais de préparations antigéniques sont de loin inférieurs ou complètement inefficaces : sporozoïtes tués par le formol (Alger et

Harant, 1976), homogénéisés ou détruits par ultrasons (Spitalni et Nussenzweig, 1972).

Or, seuls les sporozoïtes intacts et les sporozoïtes atténués par irradiation sont capables de pénétrer à l'intérieur d'une cellule hépatique pour y poursuivre soit un développement complet ou au moins un développement avorté en cours de maturation (Vanderberg *et al.*, 1968b).

La viabilité est donc une caractéristique importante d'un bon antigène.

Un sporozoïte viable est celui qui réussit à pénétrer dans une cellule parenchymateuse du foie de l'hôte vertébré et à se développer en schizonte. La manière la plus précise de mesurer actuellement l'infektivité d'une suspension de sporozoïtes consiste donc en l'inoculation à un hôte vertébré réceptif d'un nombre connu de sporozoïtes et le calcul subséquent dans le foie de celui-ci du nombre de schizontes pré-érythrocytaires qui s'y sont développés (Wéry, 1968; Vanderberg *et al.*, 1968a).

Il faut toutefois standardiser, pour chaque espèce de *Plasmodium* de rongeurs (a) l'hôte vertébré (souris, rat) dont la réceptivité varie considérablement d'une souche à l'autre et selon l'âge (Wéry, 1968; Nussenzweig *et al.*, 1966; Vanderberg *et al.*, 1968a); (b) le temps qui sépare l'inoculation de l'autopsie (Landau et Killick-Kendrick, 1966); (c) la voie d'inoculation (Wéry, 1968); (d) les conditions d'hébergement des animaux pendant la durée de la schizogonie pré-érythrocytaire (Yoeli *et al.*, 1975).

Nous avons suivi dans ce travail la viabilité des sporozoïtes de *P. berghei berghei* dans les glandes salivaires du moustique et dans divers milieux en tenant compte (a) de la composition du milieu de conservation; (b) de la température; (c) de la voie d'inoculation.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel parasite

La souche Anka de *P. berghei berghei* est entretenue au laboratoire par passages cycliques en série sur souris blanche (souche OF1) et *Anopheles stephensi* (Vincke *et al.*, 1966).

La sporogonie évolue entre 19 et 21° C et les sporozoïtes apparaissent dans les glandes salivaires à partir du 13^e jour après le repas infectant.

2.2. Récolte des sporozoïtes

Sauf mention contraire, les récoltes de sporozoïtes ont été effectuées le 21^e jour après le repas sanguin de l'anophèle, par dissection des glandes salivaires et homogénéisation dans un broyeur avec piston en teflon (Wéry, 1968).

L'extraction des glandes salivaires était faite dans le milieu choisi pour la conservation et la suspension étant maintenue à la température choisie pour l'expérimentation pendant le temps que durait la dissection, soit entre 1 et 2 heures, selon le nombre de moustiques. Les numérations de sporozoïtes dans les suspensions finales ont été faites après homogénéisation, en cellule de Neubauer. Les récoltes ainsi pratiquées donnent régulièrement près de 20.000 sporozoïtes par anophèle.

Le temps de conservation dans un milieu donné et à la température choisie était calculé à partir du moment où l'homogénéisation de la suspension était réalisée.

2.3. Contrôles de viabilité des sporozoïtes, animaux d'expérience

La viabilité des sporozoïtes a pu être vérifiée de deux manières différentes après inoculation aux animaux :

A. Contrôle de l'apparition de la parasitémie après injection de nombres décroissants de sporozoïtes à des souris OF1 ou C57 Black. Le nombre minimal de sporozoïtes de *P. berghei* produisant une infection chez 100 p. cent des animaux inoculés avait été déterminé au préalable, il est de 2.500 pour les souris OF1 et de 200 pour les souris C57 Black (tableau 1).

B. Numération des schizontes dans les coupes histologiques de foies prélevés 48 heures après l'inoculation. La surface des coupes est standardisée et comprise entre 12 et 14 mm². Cinquante coupes sériées sont examinées, et le résultat est exprimé en nombre de schizontes par coupe (moyenne et extrêmes). Le diamètre des schizontes varie de 24 à 29 microns et l'épaisseur des coupes est de 4 microns.

TABLEAU 1
Nombre de sporozoïtes nécessaire pour produire une infection

	Souris C57	Souris OF1
Dose minimale infectante	2	100
Dose minimale infectant 100 % des animaux	200	2.500

2.4. Inoculum et voies d'inoculation

Le rendement respectif des voies d'inoculation intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée et orale a été évalué, mais la voie intraveineuse a été systématiquement utilisée pour les comparaisons de suspensions de sporozoïtes.

Le volume des inoculums a été dans tous les cas de 0,3 ml. Les différents liquides de conservation qui ont été testés sont les suivants :

- milieu TC 199 (Difco);
- milieu GLSH pour culture des Trypanosomatidae (Le Ray, 1975);
- milieu CGVS pour culture des Naegleria (Willaert, 1976).

Trois solutions isotoniques :

- NaCl 0,85 g p. cent;
- glucose 5,25 g p. cent;
- NaCl 0,316 g et glucose 3,5 g p. cent.

Des quantités variables de sérum de veau fœtal, de sérum de souris, d'albumine bovine ou d'ovalbumine ont été ajoutées à ces milieux de base.

3. Résultats et discussion

3.1. Survie des sporozoïtes à température ambiante dans des solutions isotoniques dépourvues de sérum

Quatre solutions physiologiques ont été essayées : NaCl, glucose, NaCl-glucose, TC 199.

Les suspensions de sporozoïtes ont été laissées à la température de 21° C pendant 30 minutes à 4 heures après la fin de la dissection, puis

injectées par voie intraveineuse à des souris OF1. Le nombre de sporozoïtes injecté à chaque animal approche ou dépasse dix fois la dose minimale infectante de 2.500 sporozoïtes.

Après 1 heure, aucune des suspensions ne contient plus suffisamment de parasites viables pour infecter les souris receveuses, tandis qu'après 30 minutes, seuls les sporozoïtes se trouvant dans la solution mixte de glucose et de chlorure de sodium sont encore infectants pour une souris sur deux.

La solution saline tamponnée qui sert de base au milieu TC 199 n'est pas meilleure qu'une solution isotonique simple de NaCl ou de glucose.

En conclusion, l'isotonicité d'une solution ne suffit pas à maintenir en vie les sporozoïtes, de même que la présence de glucose, aliment préférentiel de nombreux protozoaires. Les acides aminés et les vitamines contenus dans le TC medium n'ajoutent rien à la qualité de la conservation, bien que ce milieu soit recommandé pour la conservation des tissus animaux en chirurgie.

3.2. Survie des sporozoïtes à température ambiante dans des solutions isotoniques additionnées de sérum ou d'albumines animales

L'addition de 10 p. cent de sérum de souris à des solutions isotoniques prolonge considérablement la survie des sporozoïtes.

Le tableau 2 donne les résultats de la comparaison entre les quatre solutions étudiées sous 3.1 additionnées de sérum de souris. Les suspensions sont maintenues pendant 4 à 8 heures à 21° C, après quoi 30.000 sporozoïtes sont injectés par voie intraveineuse à chaque souris OF1 ou C57 Black.

TABLEAU 2
Durée de la conservation des sporozoïtes à 21° C dans quatre solutions isotoniques additionnées de 10 p. cent de sérum de souris. Infectivité pour les souris *

Milieu de conservation	Souche de souris	Temps de conservation à 21° C				
		4 heures	5 heures	6 heures	7 heures	8 heures
NaCl 0,95 %	OF1	4/5 *	4/5	4/5	1/5	0/3
	C57 Black	—	—	—	—	2/2
TC medium 199	OF1	5/5	5/5	5/5	4/5	1/3
	C57 Black	—	—	—	—	0/2
Glucose-NaCl	OF1	5/5	5/5	5/5	5/5	1/3
	C57 Black	—	—	—	—	1/2
Glucose 5,25 %	OF1	5/5	5/5	5/5	5/5	3/3
	C57 Black	—	—	—	—	2/2

Inoculum : 30.000 sporozoïtes par souris.

* Proportion animaux positifs.

Le nombre de sporozoïtes viables tombe à moins de 2.500 dans chaque inoculum après la 4^e heure dans la solution saline physiologique additionnée de sérum de souris et après la 7^e heure dans les autres solutions. Les différences d'une solution à l'autre sont minimes et les meilleurs résultats sont obtenus dans la solution glucosée additionnée de sérum de souris.

Le sérum constitue donc l'élément essentiel de la conservation et les autres constituants jouent par comparaison un rôle négligeable.

Le remplacement du sérum par d'autres protéines animales (ovalbumine, albumine bovine) n'a pas le même effet : à 21° C, l'infectivité des sporozoïtes a disparu dès la 3^e heure dans les solutions glucosées additionnées de 10 p. cent d'albumine d'œuf, tandis qu'on ne retrouvait plus de sporozoïtes viables dans la solution glucosée additionnée de différentes concentrations d'albumine bovine (0,5 à 10 p. cent) après un contact d'une heure seulement.

Vanderberg (1974) de son côté a pu maintenir la viabilité dans le milieu TC 199 additionné d'albumine bovine pendant 3 heures à cette même température. Cet auteur conclut que l'albumine seule est supérieure au sérum complet.

Le rôle d'agent conservateur ne semble donc pas être le fait des macromolécules. D'ailleurs, Vincke et Bafort (1968) qui ont utilisé le polyvinyl pyrrolidone pour purifier une suspension de sporozoïtes par centrifugation différentielle maintiennent leur suspension à 0° C et procèdent à l'injection sans délai ou bien ils y ajoutent du sérum de souris.

Le sérum de souris ou le sérum de veau fœtal donnent les meilleurs résultats. Quant au sang total, il n'ajoute rien aux qualités du sérum seul. Après incubation d'une heure à 21° C dans du sang de souris C57 Black, la dose minimale infectante pour les souris C57 Black est multipliée par 100 tandis qu'elle est multipliée par 500 après incubation dans du sang de souris OF1 dans les mêmes conditions.

3.3. Comparaison de milieux utilisés pour la culture des protozoaires

Après avoir observé que le glucose et le sérum constituaient deux éléments importants pour la survie des sporozoïtes, nous avons continué nos essais en utilisant le milieu GLSH (glucose, lactalbumine, sérum, hémoglobine) utilisé en routine dans notre laboratoire pour les cultures de Trypanosomatidae. Ce milieu contient 1 g de glucose par litre ainsi que 5 p. cent de sérum de veau fœtal et des antibiotiques.

Nous l'avons tout d'abord comparé aux autres milieux nutritifs utilisés dans notre laboratoire avec la même adjonction de sérum : le TC 199 et le CGVS (casein, glucose, vitamines, sérum). Le tableau 3 mentionne le nombre de schizontes par coupe hépatique obtenus chez le rat par injection I.V. de suspensions de sporozoïtes conservés pendant la dissection à 24° C dans ces trois milieux.

Les avantages du milieu GLSH ressortent ici de manière assez claire, puisqu'à cette température et à concentration égale de sérum, les sporozoïtes conservés dans ce milieu pendant les 90 minutes qu'a duré la dissection produisent onze fois plus de schizontes que ceux qui ont été conservés dans le TC 199. Il est remarquable que le séjour dans le milieu CGVS comportant de la caséine et dépourvu de NaCl détruit rapidement les sporozoïtes : aucun schizonte hépatique n'a pu en effet être trouvé dans les foies de deux rats ayant reçu chacun 388.000 sporozoïtes par voie intraveineuse.

Un séjour supplémentaire d'une heure à 24° C est fatal pour la majorité des sporozoïtes dans n'importe quel milieu, mais dans tous les cas, le

TABLEAU 3
Viabilité des sporozoïtes en suspension dans trois milieux nutritifs à 24° C.
Numération des schizontes hépatiques chez le rat OFA

Milieu à 24° C	Durée de conservation *	Nombre de sporozoïtes	Nombre de rats (OFA)	Nombre schizontes par coupe moyenne	Nombre schizontes par coupe extrêmes	Moyenne par groupe de deux rats
	0 heure	388.000	2	10,00 5,63	(0-15) (2-11)	7,82
	1/2 heure	388.000	2	3,64 4,36	(1-6) (1-8)	4,00
GLSH 5 % SVF	1 heure	388.000	2	1,26 0,70	(0-2) (0-2)	0,98
	0 heure	388.000	2	0,67 0,74	(0-2) (0-2)	0,71
TC 199 5 % SVF	1/2 heure	388.000	2	0,60 0,20	(0-2) (0-1)	0,40
	1 heure	388.000	2	0,14 0,34	(0-1) (0-1)	0,24
CGVS 5 % SVF	0 heure	388.000	2	0	0	0

* A partir de la fin de la dissection (90 minutes à 24° C dans le milieu considéré).

milieu GLSH préserve mieux la viabilité, ce qui se marque par une teneur régulièrement plus élevée des foies des rats en schizontes pré-érythrocytaires (tableau 3).

La conservation dans le milieu GLSH est encore améliorée si on porte la concentration en sérum de veau de 5 à 10 p. cent, comme le montre le tableau 4. On retrouve des sporozoïtes viables dans ce milieu après plus de 5 heures à 21° C.

TABLEAU 4
Influence de la concentration en sérum de veau fœtal sur la durée de conservation.
Infectivité pour la souris OF1 *

Milieu	Nombre de sporozoïtes par animal	Temps de conservation à 21° C				
		1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	5 heures
GLSH 5 %	30.000	5/5 *	4/5	2/5	2/5	1/5
GLSH 10 %	18.000	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4

* Proportion animaux positifs.

Ce milieu se distingue des autres par la présence d'hémoglobine de bœuf et de lactalbumine qui semblent donc bénéfiques. La lactalbumine ne peut cependant pas remplacer le sérum dont l'élévation de la concentration favorise la survie des parasites.

3.4. Influence de la température sur la durée de la conservation en GLSH

La température de conservation est le facteur qui affecte le plus la survie des sporozoïtes. L'infectivité d'une suspension de parasites dans le milieu GLSH (5 p. cent de sérum de veau) est maintenue pendant plus de 16 heures à 0° C, tandis qu'elle disparaît après 13 heures à 4° C et après 2 heures à 21° C (tableau 5).

TABLEAU 5
Influence de la température sur la durée de conservation des sporozoïtes dans GLSH 5 %. Infectivité pour la souris OF1 *

Température du milieu	Durée maximale ** de survie des sporozoïtes	Nombre de sporozoïtes
21° C	190.000	2 heures
4° C	30.000	13 heures
0° C	30.000	16 heures

* Testée heure par heure par inoculation à cinq souris OF1.

** Dernière inoculation ayant infecté au moins un des animaux.

Le ralentissement du métabolisme du sporozoïte est donc primordial pour sa survie une fois qu'on l'a extrait des glandes salivaires de l'anophèle, ce qui permet de penser qu'une substance essentielle manque dans tous les milieux utilisés ou bien qu'un métabolite toxique s'y développe rapidement.

3.5. *Conservation des sporozoïtes in situ, dans les glandes salivaires d'anophèles vivants maintenus à 21° C*

La température de 21° C, choisie d'ailleurs pour la plupart des expériences réalisées *in vitro* dans ce travail, correspond au maximum toléré pour la sporogonie de *P. berghei berghei*.

On sait qu'à cette température, les premiers sporozoïtes arrivent dans les glandes salivaires dès le 13^e jour et qu'à partir du 15^e jour, on les y retrouve en très grand nombre.

C'est cependant vers le 21^e jour que le nombre de sporozoïtes récoltés par dissection de glandes salivaires est le plus important. A condition que les anophèles n'aient reçu qu'un seul repas sanguin infectant, on peut admettre qu'après le 21^e jour, l'arrivée de nouveaux sporozoïtes dans les glandes salivaires est négligeable malgré l'existence d'oocystes à développement retardé que l'on observe fréquemment à l'examen des estomacs d'anophèles infectés par *P. berghei berghei*.

L'infectivité de ces sporozoïtes se maintient dès lors pendant plusieurs jours, et ce n'est qu'à partir du 30^e jour après le repas infectant que la baisse est mesurable.

Cependant, jusqu'au 40^e jour, on peut sans difficulté infecter la totalité des souris OF1 avec 10.000 sporozoïtes, dose quatre fois plus importante seulement que la dose minimale infectante de 2.500 nécessaire pour infecter tous les animaux le 21^e jour (tableau 6).

TABLEAU 6
Durée de conservation des sporozoïtes conservés *in vivo* (chez l'anophèle).
Infectivité pour la souris OF1 *

Nombre de sporozoïtes	Moment de la récolte des sporozoïtes **						
	15	21	30	40	45	50	55
50.000	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	0/2
25.000	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2
10.000	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	0/4
5.000	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	0/4
2.500	2/2	2/2	0/2	1/2	2/2	1/2	0/4

* Proportion d'animaux positifs (souris OF1).

** Nombre de jours après le repas infectant.

Il ressort de cette observation que dans les acini des glandes salivaires, un grand nombre de sporozoïtes maintiennent leur viabilité pendant au moins 25 jours à 21° C, alors que dans les milieux nutritifs, après cinq heures aucun sporozoïte viable ne peut plus être démontré.

3.6. *Influence de la voie d'inoculation sur l'infectivité d'une suspension de sporozoïtes*

L'injection intraveineuse est la voie la plus directe pour faire parvenir les sporozoïtes au foie.

Des sporozoïtes déposés en dehors du système circulatoire peuvent cependant y parvenir également : il est connu (Nussenzweig *et al.*, 1966; Wéry, 1968) que l'on réussit régulièrement à infecter des souris en leur inoculant des parasites par la voie intrapéritonéale (tableau 7).

TABLEAU 7
Infectivité et voies d'inoculation. Infection de souris C57 Black

Voie d'inoculation *	Voie intraveineuse	Voie intrapéritonéale	Voie sous-cutanée	Voie orale
Souris C57 Black **	2/2	4/4	2/4	0/4

* Inoculum : 12.000 sporozoïtes par souris inoculés sans délai, à la fin de la dissection effectuée à 0° C dans le milieu GLSH.

** Proportion d'animaux positifs.

La voie sous-cutanée est moins efficace et ne permet d'infecter qu'une partie des animaux, tandis que la voie digestive oppose dans notre expérience une barrière infranchissable aux sporozoïtes. On trouve pourtant dans la littérature des tentatives réussies d'infection per os (Yoeli et Most, 1971).

TABLEAU 8
Infectivité et voies d'inoculation. Numération de schizontes hépatiques

Voie d'inoculation (240.000 sp par souris) *	Nombre de souris (C57 Black)	Nombre de schizontes par coupe moyenne par coupe extrêmes		Moyenne par groupe d'animaux
Voie intraveineuse	5	2,74 4,78 1,92 6,02 2,49	(1-5) (2-9) (0-4) (2-12) (1-4)	3,59
Voie intrapéritonéale	5	1,70 2,78 1,57 1,44 2,39	(0-3) (1-6) (0-4) (0-4) (0-6)	1,96
Voie sous-cutanée	4	0 0,1 0,48 0,44	0 (0-1) (0-1) (0-2)	0,26
Voie orale	4	0 0 0 0		0

* Inoculation sans délai, à la fin de la dissection réalisée à 0° C dans le milieu GLSH.

La numération des schizontes dans le foie permet de préciser les données (tableau 8) : considérant le nombre moyen de schizontes par coupe obtenus après injection de 240.000 sporozoïtes à chaque animal, si on attribue le coefficient 100 à l'efficacité de la voie intraveineuse, la voie intrapéritonéale obtient le coefficient 55,2, la voie sous-cutanée le coefficient 7,2 et la voie orale le coefficient 0.

TABLEAU 9
Influence sur la parasitémie du nombre des sporozoïtes inoculés (dans GLSH 10 % à 0° C)

Nombre de sporozoïtes	Souche de souris	100.000	10.000	2.500	625	160	40	10	2-3
Proportion animaux positifs	OF1	2/2	11/15	10/15	5/15	3/15	2/15	—	—
	C57 Black	—	—	—	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2
Période prépatente	OF1	6 jours	6 jours	6-7 jours	6-8 jours	6-8 jours	10 jours	—	—
	C57 Black	—	—	—	6 jours	6 jours	6 jours	6 jours	6 jours

3.7. Influence du nombre de sporozoïtes supposés viables injectés par voie intraveineuse

L'intensité de l'infection subséquente à une inoculation de sporozoïtes est étonnamment indépendante du nombre de sporozoïtes inoculés. Nous avons observé des périodes prépatentes comparables chez la souris OF1 après des injections de 2.500 à 100.000 sporozoïtes. Chez la souris C57 Black, l'infection par 2 ou par 625 sporozoïtes est décelable le sixième jour (tableau 9).

D'autre part, le nombre de schizontes dans le foie n'est pas proportionnel au nombre de sporozoïtes inoculés (tableau 10) : l'injection de 10.000 sporozoïtes ne donne même pas un schizonte sur 50 coupes tandis que 100.000 sporozoïtes permettent de compter près de un schizonte par coupe en moyenne et 1.000.000 de sporozoïtes de la même suspension ne donnent que 1,23 tranches de schizontes par coupe.

TABLEAU 10
Influence sur la schizogonie hépatique du nombre des sporozoïtes inoculés (I. V.)
(dans GLSH 10 % à 0° C)

Nombre de sporozoïtes	Nombre de souris C57 Black	Nombre de schizontes par coupe * moyenne extrêmes		Moyenne par groupe de deux souris
10.000	2	0 0	— —	0
100.000	2	0,30 1,62	(0-1) (0-4)	0,96
1.000.000	2	2,06 0,40	(0-5) (0-2)	1,23

* 50 coupes examinées.

L'augmentation serait donc de 10 à 50 fois entre 10.000 et 100.000 sporozoïtes, tandis qu'elle n'atteindrait même pas 1,5 entre 100.000 et 1.000.000 de parasites.

Les mécanismes immunitaires de l'hôte joueraient ici un rôle prépondérant en détruisant ou en phagocytant l'excès de parasites inoculés. On pourrait en effet s'attendre pour ce modèle à une relation mathématique entre le nombre de sporozoïtes inoculés et le nombre des schizontes hépatiques.

Commentaire

Les différents stades du cycle des Plasmodium ont une existence fugace : dès qu'ils ont atteint leur maturité, les schizontes se résolvent en mérozoïtes, les gamétocytes vieillissent et dégèrent. Le sporozoïte est le seul stade parasitaire qui puisse attendre plusieurs jours sans modifications apparentes une occasion favorable à la poursuite de son développement. Le séjour intracellulaire dans les acini des glandes salivaires de l'anophèle (Sterling *et al.*, 1973) est la condition nécessaire et suffisante pour que cet arrêt dans le cycle puisse se prolonger. En effet, dans l'hémocèle du moustique, avant leur arrivée dans les glandes salivaires, l'inféctivité des sporozoïtes est peu élevée (Vanderberg, 1975).

D'autre part, la sortie des glandes salivaires correspondant à l'arrivée dans la circulation sanguine d'un vertébré s'accompagne sans doute de changements métaboliques importants, comme pour la plupart des parasites sanguicoles (Trypanosomatidae). Toutefois, le sang n'est pas un endroit où le sporozoïte puisse s'attarder et il s'efforcera de pénétrer dans une cellule parenchymateuse du foie dans les minutes qui suivent son injection au vertébré.

Le sporozoïte ne pouvant poursuivre son développement que dans le milieu intracellulaire, son séjour extracellulaire est fugace. La sortie des glandes salivaires du moustique déclencherait un mécanisme métabolique qui va mettre en route la division nucléaire et qui a besoin, pour se poursuivre avec succès, du milieu intracellulaire. Les minutes d'errément lui sont comptées et en général aucun sporozoïte viable ne peut plus être retrouvé dans la circulation de l'hôte vertébré, dès la fin de l'heure qui suit leur inoculation (Fairley, 1947).

On observe le même phénomène dans les milieux de conservation les plus élaborés, mis au point pour permettre une multiplication rapide d'autres protozoaires sanguicoles ou de cellules de métazoaires. A la température ambiante, la survie est limitée à quelque 5 heures même dans le Graces Insect Tissue Culture medium additionné d'hémolymphe (Fink et Schicha, 1969).

L'abaissement de la température allonge le temps de survie *in vitro*, pour atteindre 18 à 24 heures à 0° C. Au contraire, toute augmentation de température raccourcira la survie et il est probable qu'à 37° C, le temps de survie dans n'importe quel milieu devient comparable à ce séjour limité à 60 minutes observable dans la circulation de l'hôte.

Il faut donc admettre que les glandes salivaires de l'anophèle, par un mécanisme inconnu, hormonal et métabolique, ont un double rôle à jouer : elles permettent au sporozoïte d'acquérir son infectivité, synonyme pour nous de viabilité, puis elles le maintiennent dans cet état privilégié pendant plusieurs jours et même plusieurs semaines, par une sorte de léthargie d'où les parasites ne sortent que pour recommencer immédiatement une série de divisions nucléaires pour lesquelles le milieu intracellulaire est nécessaire.

Note : Ce travail a été présenté comme mémoire de fin de spécialisation en Biologie Clinique, option parasitologie, à la Faculté de Médecine de l'Université Nationale du Zaïre, Kinshasa.

Studies on the infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites during laboratory manipulation.

Summary — Outside the salivary glands of the *Anopheline* mosquito, sporozoites quickly lose their viability. The most favourable nutrient mediums need to be isotonic and to contain glucose, sodium chloride, hemoglobin and chiefly serum (either mouse or fetal calf serum). Neither albumins nor plasma substitutes are able to replace total serum.

Lower temperatures (0°C) increase the survival time of the sporozoites by slowing down the parasite metabolism.

On the other hand, the viability of these parasites remains unchanged for more than ten days in the salivary glands of the mosquito kept at a temperature of 21°C.

Intravenous inoculation is the most efficient, followed by intraperitoneal and subcutaneous routes. No infections were obtained by oral administration of sporozoites.

The intensity of sporozoite-induced infection, both in the liver and in the blood, is not proportional to the number of sporozoites in the inoculum.

Studies van de infectiviteit van *Plasmodium berghei* sporozoïeten tijdens manipulatie in het laboratorium.

Samenvatting — Buiten de speekselklieren van de *Anopheles* verliezen de sporozoïeten snel hun leefbaarheid.

De meest gunstige voedingsmilieus moeten isotonisch zijn, glucose, natrium chloride, hemoglobine en vooral muis- of foetaal kalfsserum bevatten.

Noch albumine noch surrogaat van het plasma kunnen totaal serum vervangen. Lagere temperaturen (0°C) verlengen aanzienlijk de overleving van de sporozoïeten dank zij de veraging van het metabolisme. Daarentegen blijft de leefbaarheid onveranderd op 21°C gedurende meer dan tien dagen in de speekselklieren van de mug.

De intraveneuse inoculatie van de sporozoïeten is het meest doeltreffend, gevolgd door intraperitoneale en subcutane inoculatie. De orale weg heeft geen enkele besmetting bij de muis veroorzaakt.

De intensiteit van infectie, zowel in de lever als in het bloed is niet evenredig met het aantal sporozoïeten in het inoculum.

Reçu pour publication le 18 juin 1979.

REFERENCES

- Alger, N. E. & Harant, J. (1976) : *Plasmodium berghei* : Heat treated sporozoite vaccination of A/J mice : comparison of routes of injection. *Science of Biology Journal* **2**, 3, 89-103.
- Bafort, J. M., Beaudoin, R. L. & Pryor, W. H. (1977) : Malaria protective sporozoite induced immunity in inbred rats. Abstr. 5^e Congr. Protozool. New York, p. 182.
- Bawden, M. P., Palmer, T. T. & Beaudoin, R. L. (1977) : Antibody response of mice vaccinated with sporozoites of *P. berghei*. Abstr. 5^e Congr. Protozool. New York, p. 183.
- Beaudoin, R. L., Strome, C. P. A., Mitchell, F. & Tubergen, T. A. (1977) : *Plasmodium berghei* : immunization of mice against the Anka strain using the unaltered sporozoite as an antigen. *Exptl. Parasitol.* **42**, 1, 1-5.
- Beaudoin, R. L., Strome, C. P. A., Tubergen, T. A. & Mitchell, F. (1976) : *Plasmodium berghei* : Irradiated sporozoites of the ANKA strain as immunizing antigens in mice. *Exptl. Parasitol.* **39**, 3, 438-43.
- Fairley, N. H. (1947) : Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **40**, 621-76.
- Fink, E. & Schicha, E. (1969) : Influence of synthetic insect TC medium on the survival of malaria sporozoites in vitro. (*Plasmodium berghei yoelii* and *P. cathemerium*). *Z. Parasitenk.* **32**, 93-94.
- Landau, I. & Killick-Kendrick, R. (1966) : Rodent Plasmodia of the Republique Centrafricaine : The sporogony and tissue stages of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei yoelii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **60**, 5, 633-649.
- Le Ray, D. (1975) : Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei* (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.* **55**, 3, 129-311.
- Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Most, H. & Orton, C. (1967) : Protective immunity produced by the injection of X irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* **216**, 160-162.
- Nussenzweig, R. S., Vanderberg, J., Yoeli, M. & Most, H. (1966) : Studies on sporozoite-induced infections of rodent malaria. III. The course of sporozoite-induced *Plasmodium berghei* in different hosts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **15**, 684-689.
- Spitalni, G. L. & Nussenzweig, R. S. (1972) : Effect of various routes of immunization and methods of parasite attenuation on the development of protection against sporozoite-induced rodent malaria. *Proc. Helminth. Soc. Washington* **39**, special issue nov. 1972.
- Sterling, C. R., Aikawa, M. & Vanderberg, J. P. (1973) : The passage of *P. berghei* sporozoites through the salivary glands of *A. stephensi* : an electron microscope study. *J. Parasit.* **59**, 593-605.
- Vanderberg, J. P. (1974) : Studies on the Motility of *Plasmodium* sporozoites. *J. Protozool.* **21**, 527-537.
- Vanderberg, J. P. (1975) : Development of infectivity by the *Plasmodium berghei* sporozoite. *J. Parasitology*, **61**, 43-50.
- Vanderberg, J. P., Nussenzweig, R. S. & Most, H. (1968a) : Further studies on the *Plasmodium berghei* — *Anopheles stephensi* — rodent system of mammalian malaria. *J. Parasitol.* **54**, 1009-1016.
- Vanderberg, J. P., Nussenzweig, R. S., Most, H. & Orton, C. G. (1968b) : Protective immunity produced by the injection of X irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. II. Effect of irradiation of sporozoites. *J. Parasitol.* **54**, 1175-80.

- Verhave, J. P. (1975) : Immunization with sporozoites. An experimental study of *Plasmodium berghei* malaria. Ph. D. thesis, Catholic University, Nijmegen, Holland.
- Verhave, J. P. & Meuwissen, J. H. E. Th. (1974) : Inhibition of exo-erythrocytic form development following reinoculation with sporozoites of *P. berghei*. Proc. Third Int. Congr. Parasit. **3**, 1243-1244.
- Vincke, I. & Bafort, J. (1968) : Methodes de standardisation de l'inoculum de sporozoïtes de *Plasmodium berghei*. Ann. Soc. belge Méd. Trop. **48**, 181-194.
- Vincke, I., Bafort, J. & Scheepers Biva, M. (1966) : Observations récentes sur la transmission cyclique du *Plasmodium berghei*. Ann. Soc. belge Méd. Trop. **46**, 3, 327-336.
- Wéry, M. (1968) : Studies on the sporogony of rodent malaria parasites. Ann. Soc. belge Méd. Trop. **48**, 1, 1-137.
- Willaert, E. (1976) : Etude immunotaxonomique des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Acta Zool. Pathol. Antw. **65**, 1-239.
- Yoeli, M. & Most, H. (1971) : Sporozoite-induced infection of *Plasmodium berghei* administered by the oral route. Science **173** : 1031-1032.
- Yoeli, M., Young, C. & Jadin, J. B. (1975) : Effects of lowered environmental temperature on the growth of exo erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **24**, 5, 769-775.