

INFLUENCE DE LA MAINTENANCE D'UNE SOUCHE DE *PLASMODIUM BERGHEI* ANKA SUR LA GAMETOGENESE

par

A. SAID, G. TIMPERMAN & M. WERY

*Laboratoire de Protozoologie, Institut de Médecine Tropicale,
Nationaalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique*

Résumé — Les clones isolés après 281 passages cycliques, 28 et 35 passages mécaniques consécutifs ont fait l'objet d'une étude pour les caractériser au point de vue production de gamétocytes et infectivité pour les moustiques. Tous les clones issus du passage cyclique 281 étaient capables de se reproduire sexuellement. Par contre après 28 passages mécaniques, la population parasitaire est composée d'un mélange de clones qui exhibent différents caractères d'infectivité: 5 clones générateurs d'une sporogonie complète, 7 clones sans fertilisation des macrogamétocytes et 1 clone dont le cycle sexué s'arrête au stade d'ookinète. Quant aux clones isolés du 35^e passage mécanique, à part 1 clone qui était capable de produire des ookinètes et pas plus, les autres clones (10) n'ont jamais donné lieu à une fécondation des macrogamétocytes, alors que la souche parentale était encore infectante pour les moustiques (3 oocystes/10 estomac). Il existe une corrélation négative hautement significative d'une part entre le taux de production des gamétocytes et le nombre des passages mécaniques ($R = -0,95$; $P < 0,001$) et d'autre part entre le taux d'infectivité des gamétocytes et le nombre des passages mécaniques ($R = -0,86$; $P < 0,01$).

KEYWORDS; *Plasmodium berghei*; Clones; Gametocytogenesis; Infectivity to Mosquitoes

Introduction

Le cycle sexué du plasmodium commence par la différenciation en gamétocytes de certains mérozoïtes issus d'une schizogonie érythrocytaire ou hépatique. Cette différenciation en cellule sexuée mâle ou femelle, de même que le processus de maturation de cette cellule, prennent place dans le globule rouge hôte. Elles préparent la fécondation qui ne pourra toutefois avoir lieu que dans l'estomac du moustique, dans un environnement chimico-physique bien différent de celui de la circulation sanguine de l'hôte vertébré,

La maturité sexuelle doit cependant être atteinte dans le globule rouge, avant que la fécondation donne naissance à l'ookinète dans le tube digestif du moustique. L'ookinète sain doit être capable de sortir du tube digestif pour que les oocystes grandissent normalement. Les sporozoïtes, dont le point de ralliement sera les glandes salivaires du moustique, constituent l'aboutissement de ce processus de reproduction sexuée.

L'entretien d'une souche de plasmodium par passages mécaniques sanguins répétés occasionne la perte de l'infectivité des gamétocytes tandis qu'une maintenance par passages cycliques conserve ce caractère (3).

Les populations clonées issues d'un isolat de plasmodium, sont-elles toutes capables de produire des gamétocytes viables ? Ou bien ce pouvoir appartient-il seulement à certains clones ?

L'inféctivité des gamétocytes, obéit-elle à la loi du tout ou rien ? Le but principal des clonages successifs de la population parasitaire a été d'obtenir la production de matériel caractérisé pouvant servir à des études génétiques du phénomène de la gamétogénèse.

Nous décrivons ici des clones de *P. berghei* Anka obtenus respectivement après 281 passages cycliques, 28 et 35 passages mécaniques. Ces clones sont caractérisés par leur capacité de produire des gamétocytes et d'infecter les moustiques.

Matériel et méthodes

Animaux :

Des souris OF1 et C57 Black femelles, âgées de 4 semaines ont servi comme porteurs des gamétocytes.

Parasites :

La souche de *P. berghei* Anka utilisée dans cette étude, a été isolée en 1965. Depuis lors elle a été entretenue au laboratoire de protozoologie par passages cycliques sur souris blanche et *A. stephensi*.

Clonage :

Cette souche a été clonée à son 281^e passage cyclique (Clones série C281). A partir de celui-ci une série de passages mécaniques sanguins a été entreprise. Des clonages ont été effectués au 28^e (Clones série M28) et au 35^e (Clone série M35) passage de cette série. Pour chaque expérience le clonage a été pratiqué par la méthode des dilutions sur un groupe de 60 souris OF1. Chaque souris a reçu en théorie 0,3 parasites contenus dans un inoculum de 0,1 ml. A partir du 7^e jour après l'inoculation, les souris ont été contrôlées chaque jour pendant 30 jours.

Numération des parasites :

Un groupe de 5 souris OF1 a reçu par voie intrapéritonéale 10⁶ parasites de chaque clone.

Au 4^e jour de l'infection un frottis mince de sang prélevé à la queue de l'animal infecté, a été coloré au giemsa et examiné pour déterminer la parasitémie asexuée et la gamétocytémie sur 10.000 globules rouges.

Contrôle de la maturité fonctionnelle :

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

— Ookinètes : la recherche des ookinètes a été effectuée sur un étalement du contenu stomacal de l'anophèle, coloré au giemsa, 24 heures après le repas sanguin infectant.

— Oocystes : au 9e jour après le repas sanguin, l'inféctivité des gamétocytes pour les moustiques a été mesurée par la moyenne du nombre d'oocystes obtenu par estomac.

— Analyses statistiques : le T test et l'analyse de variance ont servi à comparer la production des gamétocytes et d'oocystes des différents clones. L'analyse de régression a été utilisée pour les corrélations entre les différents paramètres étudiés.

Résultats

Pour chaque expérience, un groupe de 60 souris a reçu par voie intraveineuse, un inoculum de 0,1 ml contenant 0,3 globules rouges parasités par souris. Les résultats des clonages sont résumés dans la (fig 1).

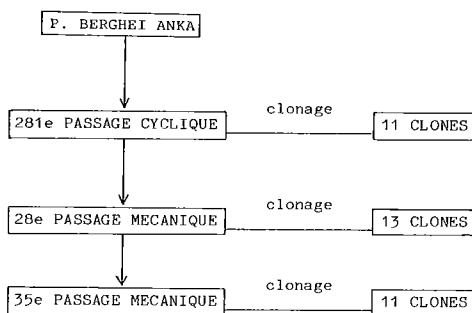


Figure 1. Résultats des clonages

Production des gamétocytes et évaluation de leur état de maturité :

Clones C 281 (Tab. 1) : la détermination de la gamétocyttémie a été effectuée sur 5 souris au 4e jour après l'inoculation par voie intrapéritonéale de 10^6 parasites de chaque clone.

TABLEAU 1
Production et infectivité des gamétocytes des clones obtenus à partir du cyclique 281

Clone	Micro-Gamétoctes	Macro-Gamétoctes	Gamétoctes (Nbre total)	Exfl.	Ookinètes	Oocystes	M.I.
C281	28*	32*	60*	+	+	5,75 ± 0,80	10
cl01	27 ± 2,52	33 ± 2,80	60 ± 5,93	+	+	4,93 ± 0,96	10
cl02	22 ± 2,52	24 ± 2,64	46 ± 3,84	+	+	5,03 ± 0,84	10
cl03	14 ± 3,03	26 ± 2,97	40 ± 2,60	+	+	4,14 ± 1,16	10
cl04	20 ± 3,84	16 ± 2,40	36 ± 4,14	+	+	5,76 ± 0,56	10
cl05	32 ± 6,13	32 ± 6,03	64 ± 4,04	+	+	5,07 ± 0,76	10
cl06	40 ± 2,82	26 ± 2,02	66 ± 5,40	+	+	4,38 ± 1	10
cl07	10 ± 3,03	22 ± 2,90	32 ± 3,74	+	+	5,01 ± 0,34	10
cl08	28 ± 6,06	16 ± 4,08	44 ± 7,12	+	+	4,05 ± 1,27	10
cl09	6 ± 2	6 ± 1,94	12 ± 1,41	+	+	4,94 ± 0,40	10
cl10	4 ± 1,09	20 ± 1,86	24 ± 5,40	+	+	3,76 ± 1,57	10
cl11	8 ± 2,28	13 ± 2,40	21 ± 2,28	+	+	4,72 ± 1,83	9

Microgamétocytes = moyenne de 5 souris, exprimée sur 10^4 GR ± SD.

Macrogamétocytes = moyenne de 5 souris, exprimée sur 10^4 GR ± SD.

Gamétocytes = moyenne de 5 souris, exprimée sur 10^4 GR ± SD.

Oocystes = moyenne de LN du nombre d'oocystes + 1 sur 10 estomac.

M.I. = nombre de moustiques infectés sur 10.

* Résultats provenant d'une seule souris.

Les 11 clones produisent des gamétocytes mais à des taux différents. L'analyse de variance du nombre de gamétocytes produit par clone révèle une différence très hautement significative $F_{10,44} = 61,13$, $P < 0,01$. Les clones 01, 05 et 06 donnent plus de gamétocytes ($60/10^4$ globules rouges). Ces 3 clones ont le même taux de production que le cyclique 281 dont ils sont issus. Le clone 09 donne moins de gamétocytes ($12/10^4$ globules rouges). Les microgamétocytes étaient capables d'exflageller et la recherche des ookinètes était positive pour tous les clones.

Clones M 28 (Tab. 2) : l'analyse de variance du nombre des gamétocytes produit par clone indique une différence hautement significative $F_{12,51} = 57,22$; $P < 0,01$. Comparativement aux clones précédents on note une nette diminution du taux de production de gamétocytes $T_{22} = 5,48$; $P < 0,001$. Les clones 02, 05 et 10 produisent plus de gamétocytes que les autres clones et que la souche parentale. Sur 13 clones, 8 étaient capables de produire des microgamétocytes fonctionnellement matures et parmi ceux-ci seulement 6 ont permis d'observer des ookinètes.

Clones M 35 (Tab. 3) : les 11 clones obtenus sont capables de produire des gamétocytes. L'analyse de variance du nombre des gamétocytes produit par clone montre que leur taux ne diffère pas statistiquement au seuil de probabilité de 5 %, $F_{10,44} = 1,91$. Par rapport aux clones du mécanisme 28, ils produisent moins de gamétocytes avec une différence hautement significative $T_{118} = 2,7$, $P < 0,01$. Deux clones sur 11 sont capables de produire des microgamétocytes matures mais la recherche des ookinètes n'a été positive que chez un d'entre eux.

Infectivité des gamétocytes

Au 4^e jour de l'infection, après avoir déterminé la parasitémie asexuée et sexuée, et contrôlé la maturité des microgamétocytes, 20 à 30 anophèles

stephensi, femelles, étaient gorgés sur une souris positive. Le repas sanguin a eu lieu dans une chambre à 20°C avec une humidité relative de 85 %. Au 9e jour après le repas sanguin, 10 estomacs ont été examinés pour la numération d'oocystes. Ce nombre est exprimé en Log n du nombre d'oocystes plus un.

Clones C 281 (Tab. 1): le nombre d'oocystes obtenu par estomac varie d'un clone à l'autre. L'analyse de variance du nombre d'oocystes obtenu par clone montre une différence hautement significative au seuil de probabilité de 1 %. $F_{10,9} = 2,87$. Le clone 04 donne autant d'oocystes que la souche parentale (5,76/estomac). Il n'existe par de corrélation entre le nombre de macrogamétocytes observé au moment du repas sanguin et le nombre d'oocystes obtenu au 9e jour. Tous les clones ont produit des gamétocytes capables d'engendrer une infection chez les moustiques.

Clones M 28 (Tab. 2): parmi les 13 clones isolés à ce stade, nous pouvons distinguer 3 types de comportement :

- 5 clones avec production de gamétocytes infectants;
- 7 clones avec production de gamétocytes stériles;
- 1 clone dont le cycle sexué s'arrête au stade d'ookinète.

TABLEAU 2
Production et infectivité des gamétocytes des clones obtenus à partir du passage 28

Clone	Micro-Gaméto- cytes	Macro-Gamé- to- cytes	Gamé- to- cytes (Nbre total)	Exfl.	Ooki- nètes	Oocystes	M.I.
M28	1*	6*	7*	+	+	2,8 ± 0,84	8
cl01	0,4 ± 0,5	4,2 ± 2,04	4,6 ± 2,30	+	-	0	0
cl02	4,2 ± 0,83	12,4 ± 2,79	16,6 ± 3,4	+	+	4,97 ± 0,54	10
cl03	0	1,2 ± 0,44	1,2 ± 0,44	-	-	0	0
cl04	0	1,4 ± 0,54	1,4 ± 0,54	+	-	0	0
cl05	13,6 ± 2,19	20,8 ± 2,28	34,4 ± 3,57	+	+	5,31 ± 0,82	10
cl06	0	0,8 ± 0,44	0,8 ± 0,44	-	-	0	0
cl07	2,2 ± 1,30	4,8 ± 1,30	6,8 ± 2,23	+	+	2,97 ± 1,55	10
cl08	0	2 ± 0,70	2 ± 0,70	-	-	0	0
cl09	0,2 ± 0,44	1,2 ± 0,44	1,4 ± 0,54	-	-	0	0
cl10	9,5 ± 5,77	16 ± 8,86	25,5 ± 10,80	+	+	4,14 ± 1,20	10
cl11	0	1,2 ± 0,44	1,2 ± 0,44	-	-	0	0
cl12	1,4 ± 0,54	4,8 ± 1,64	6,2 ± 1,64	+	+	3,93 ± 0,80	10
cl13	0,4 ± 0,54	2 ± 1,22	2,4 ± 1,67	+	+	0	0

Microgamétocytes = moyenne de 5 souris, exprimée sur 10^4 GR ± SD.

Macrogamétocytes = moyenne de 5 souris, exprimée sur 10^4 GR ± SD.

Gamétocytes = moyenne de 5 souris, exprimée sur 10^4 GR ± SD.

Oocystes = moyenne de LN du nombre d'oocystes + 1 sur 10 estomac.

M.I. = nombre de moustiques infectés sur 10.

* Résultats provenant d'une seule souris.

Au moment du clonage, le taux d'infectivité des gamétocytes de la population parentale était de (2,8/estomac). Les clones producteurs de gamétocytes infectants donnent plus d'oocystes que la population dont ils sont issus. On note une différence hautement significative entre le nombre d'oocystes produits par les différents clones. $F_{12,117} = 117$; $P < 0,01$.

Pour l'ensemble des clones il existe une corrélation hautement significative entre le nombre de macrogamétocytes et le nombre d'oocystes $R = 0,90$; $P < 0,001$, $ddl = 13$. Cette corrélation reste significative $R = 0,80$; $P < 0,05$, $ddl = 5$ si on n'envisage que les clones producteurs de gamétocytes viables (Fig. 2). Les clones, avec un taux de production de gamétocytes inférieur à $5/10^4$ globules rouges n'ont pas donné d'oocystes.

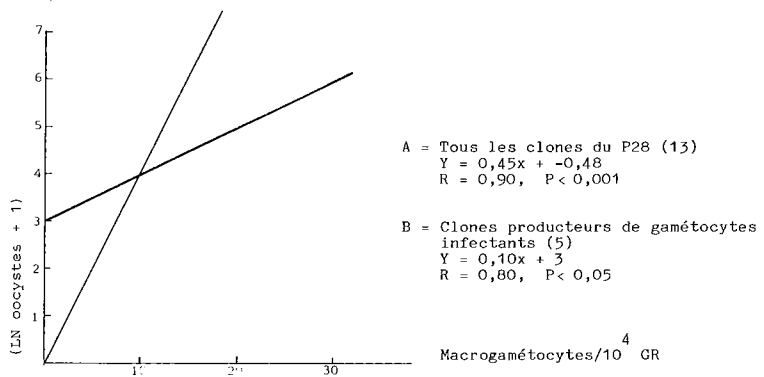


Figure 2. Relation entre macrogamétocytes et oocystes

TABLEAU 3
Production et infectivité des gamétocytes des clones obtenus à partir du 35^e passage

Clone	Micro-Gamétocytes	Macro-Gamétocytes	Gamétocytes (Nbre total)	Exfl.	Ookinètes	Oocystes	M.I.
M35	-	4*	4*	-	+	0,13	1
cl01	-	1,2 ± 0,44	1,2 ± 0,44	-	-	0	0
cl02	-	1 ± 0	1 ± 0	-	-	0	0
cl03	-	2,6 ± 0,89	2,6 ± 0,89	+	-	0	0
cl04	-	3 ± 2,80	3 ± 2,80	-	-	0	0
cl05	-	1,4 ± 1,67	1,4 ± 1,67	-	-	0	0
cl06	-	2,6 ± 1,94	2,6 ± 1,94	-	-	0	0
cl07	-	3 ± 2,52	3 ± 2,52	+	+	0	0
cl08	-	4 ± 2,44	4 ± 2,44	-	-	0	0
cl09	-	9,6 ± 11,97	9,6 ± 11,97	-	-	0	0
cl10	-	8 ± 8,48	8 ± 8,48	-	-	0	0
cl11	-	0,8 ± 0,83	0,8 ± 0,83	-	-	0	0

Gamétocytes = moyenne de 5 souris, exprimée sur 10^4 GR ± SD.
 Oocystes = moyenne de LN du nombre d'oocystes + 1/10 estomac.
 M.I. = nombre de moustiques infectés 1/10.

* Résultats provenant d'une seule souris.

Clones M 35 (Tab. 3): sur les 11 clones obtenus, aucune n'a été capable de produire d'oocystes. Cependant des oocystes (0,13/estomac) avaient été observés chez les moustiques nourris sur la population parentale (M35) au moment du clonage. Seul 1 clone était responsable d'une genèse avortée au stade d'ookinète et une souris C57 Black (remarquable pour sa réceptivité aux sporozoïtes) piquée par les moustiques au 21^e jour après le repas sanguin sur cette population clonée, est demeurée négative.

Discussion

Cette étude montre que la composition des populations parasitaires en particulier la production des gamétocytes d'une part et la capacité des gamétocytes d'infecter les anophèles d'autre part varient considérablement en fonction des conditions d'entretien de la souche.

Les clones isolés du cyclique 281 diffèrent aussi bien par leur taux de production de gamétocytes que par leur taux d'infectivité pour le moustique. Cependant tous les clones étaient capables de produire des sporozites infectants.

Par contre les clones, issus du mécanique 28, étaient génétiquement différents les uns des autres, quant à leur capacité d'infecter les moustiques. La variation va de la perte totale de l'infectivité (7 clones/13) à une génèse avortée au stade d'ookinète (1 clone/13) puis à une infectivité normale (5 clones/13). Ces clones diffèrent aussi par leur taux de production de gamétocytes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Graves *et al.* (2) pour la production des gamétocytes.

Quant aux clones obtenus à partir du mécanique 35, à part un clone qui était capable de produire des ookinètes, et pas plus, les autres (10/11) n'ont jamais donné lieu à une fécondation des macrogamétocytes.

Il ressort de ces observations que la production et l'infectivité des gamétocytes sont deux caractères propres à chaque clone qui ne sont pas nécessairement liés. Cependant ils peuvent être modifiés par les conditions de maintenance du parasite.

En effet, quand une souche est entretenue cycliquement, les deux cycles, sexués et asexués, se développent alternativement. Il y aurait vraisemblablement, au cours de la méiose qui suit la fécondation une redistribution de l'information nécessaire à la production des parasites capables de se reproduire à la fois sexuellement et asexuellement. La population parasitaire du cyclique 281 est composée exclusivement de ce type de parasites. Au cours des passages mécaniques où seul le cycle asexué se développe, on assiste rapidement à une perte du potentiel génétique responsable de la gamétogénèse. Ce caractère est apparu chez une grande partie de la population parasitaire du mécanique 28 et chez la totalité de la population parasitaire du mécanique 35.

Parmi les clones producteurs de gamétocytes viables du mécanique 28, le taux d'infectivité pour les moustiques accuse une diminution par rapport à ceux du cycle 281 ($T_{158} = 2,18$, $P < 0,05$).

Les coefficients de corrélation hautement significatifs observés d'une part entre le taux de production de gamétocytes et le nombre de passages mécaniques $R = -0,95$, $P < 0,001$, $ddl = 8$ (Fig. 3) et d'autre part entre le taux d'infectivité des gamétocytes et le nombre de passages mécaniques $R = -0,86$, $P < 0,01$, $ddl = 8$ (Fig. 4) reflètent bien l'évolution et le degré d'association de ces deux paramètres par rapport au nombre des passages mécaniques.

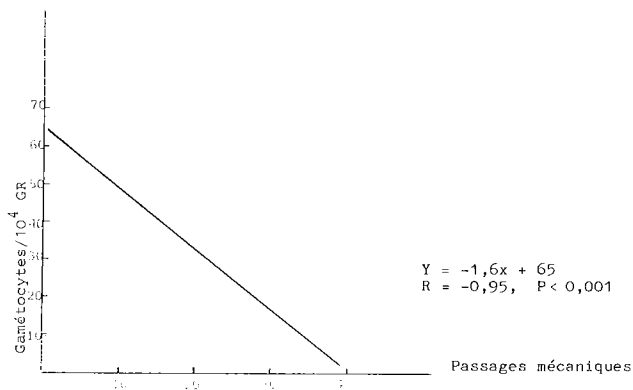


Figure 3. Relation entre taux de production de gamétocytes et nombre de passages mécaniques

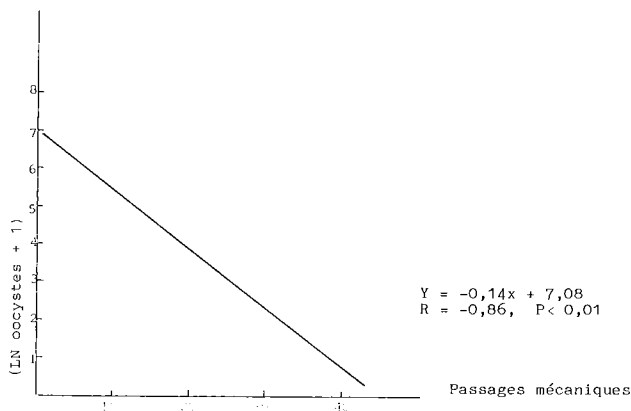


Figure 4. Relation entre taux d'inféctivité des gamétocytes et nombre de passages mécaniques.

L'obtention de 2 clones avec arrêt de la sporogonie au stade d'ookinète prouve que l'exflagellation comme la fécondation ne sont pas toujours des garanties pour la réussite d'une transmission cyclique. Il y aurait par conséquent à chaque stade du cycle sexué des conditions à remplir par le parasite, pour la réussite de la transmission cyclique. L'analyse qualitative du DNA des différents clones obtenus dans cette étude pourra servir d'outil pour élucider la cause de la variation de l'inféctivité des gamétocytes.

Influence of maintenance of a strain of *Plasmodium berghei* Anka on gametogenesis.

Summary — Clones of *P. berghei*, isolated after 281 cyclical passages, and after 28 and 35 subsequent mechanical passages were compared with respect to gametocyte production and infectivity for mosquitoes.

All the clones obtained after the 281th cyclical passage were capable of sexual reproduction. However, the clones isolated after the 28th mechanical passage exhibit three types of sexual development: 5 clones completed sporogony, 1 clone only produced ookinetes, and 7 clones showed no gametocyte fertilization. From the 11 clones isolated after 35 mechanical passages, only one could produce ookinetes, the others did not show any gametocyte fertilisation.

The number of mechanical passages is inversely correlated with the production rate of gametocytes ($R = -0.95$, $P < 0.001$) and with the infectivity rate of the gametocytes ($R = -0.86$, $P < 0.01$).

Inloed van het onderhoud van een stam van *Plasmodium berghei* Anka op de gametogenese.

Samenvatting — Van een aantal clonen *P.berghei*, geïsoleerd na 281 cyclische, en vervolgens 28 en 35 mechanische passages, werd de productie van gametocyten en de infectiviteit voor muggen onderzocht.

Alle clonen bekomen na de 281e cyclische overzetting waren in staat tot sexuele vermenigvuldiging.

Na 28 mechanische passages daarentegen bestond de parasieten populatie uit een mengeling van clonen met een verschillende infectiviteit: 5 clonen vertoonden een volledige sporogonie, voor 1 cloon ging de sexuele cyclus niet verder dan het öökinetestadium, en bij 7 clonen had er helemaal geen bevruchting van de macrogametocyten plaats.

Na de 35 mechanische passage was de totale populatie nog cyclisch overzetbaar (3 ööcysten/10 muggen), maar slechts 1 van de 11 geïsoleerde clonen was in staat öökineten, zonder verdere ontwikkeling, voort te brengen.

Bij de overige 10 clonen was er geen bevruchting van de macrogametocyten.

Er is een tweevoudige significante negatieve correlatie tussen het aantal mechanische passages enerzijds en de productie ($R = -0,95$, $P < 0,001$) en de infectiviteit ($R = -0,86$, $P < 0,01$) van de gametocyten anderzijds.

Reçu pour publication le 7 janvier 1986.

REFERENCES

1. Burkot TR, Williams JL, Schneider I: Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* clone grown *in vitro* from the same isolate. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 1984, **78**, 339-341.
2. Graves PM, Carter R, McNeill KM: Gametocyte production in cloned lines of *Plasmodium falciparum*. *Amer.J.trop.Med.Hyg.*, 1984, **33**, 1045-1050.
3. Vanderberg JP, Gwadz RW: The transmission by mosquitoes of *Plasmodium* in the laboratory. *in* *Malaria* (Ed.J.P.Kreier), New York, Academic Press, 1980, II, 153-234.