

50 376  
1984  
324  
excl. de  
prot.



THÈSE

PRÉSENTÉE À

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR EN BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION

(3ÈME CYCLE)

PAR

SAKHINA HAQUE-BEGUM

OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES ET EXPERIMENTALES SUR LES

GAMETOCYTES DES PLASMODIUM DE MAMMIFERES

Soutenu le 25 Septemmbre 1984 devant la Commission d'Examen

Président : Monsieur le Professeur E. VIVIER  
Rapporteur : Monsieur le Professeur A. VERNES  
Membres : Monsieur le Professeur A. DHAINAUT  
Madame le Professeur I. LANDAU  
Monsieur le Docteur E. DEI-CAS

Ce travail a été réalisé à l'Unité de Biologie et de Biochimie Parasitaires et Fongiques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M. U 42) sous la direction du Professeur Alain VERNES et de Monsieur le Docteur Edouardo DEI-CAS.

A MES FILS

A MON MARI

A MES PARENTS

A IMRUL

A MES AMIS

Expression de mon affection

Je remercie Monsieur le Professeur VIVIER, de la faculté des Sciences de Lille, d'avoir accepté la présidence du Jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur VERNES, Directeur de l'Unité 42 de l'INSERM, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et pour l'honneur qu'il me fait en participant au Jury de cette thèse. Je le prie de croire en ma respectueuse gratitude.

Je remercie Madame le Professeur LANDAU du Laboratoire de Zoologie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris qui m'a aimablement fourni la souche avec laquelle une grande partie de ce travail a été effectué. Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame LANDAU pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur DHAINAUT, de la faculté des Sciences de Lille, d'avoir accepté de faire partie de ce Jury.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur DEBLOCK pour l'aide personnelle et l'amitié particulière qu'il m'a toujours témoignées.

Je suis heureuse de pouvoir exprimer ici mes très sincères remerciements à Monsieur le Docteur DEI-CAS pour les enseignements et les conseils qu'il m'a dispensés, et pour la disponibilité qu'il a su me réserver dans l'évolution de ce travail.

J'adresse mes remerciements à Mademoiselle COLSON et Madame MASURELLE qui ont assuré avec beaucoup d'efficacité la dactylographie de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à tout le personnel de l'Unité 42, pour l'amitié qu'il m'a toujours témoignée et pour son aide et en particulier à Madame MICHALSKI et à Messieurs les Docteurs J.F. DUBREMETZ, C. SLOMIANNY, G. TRONCHIN, G. PRENSIER et Mr et Mme R. DAMIANI.

Je ne veux pas terminer cette page sans vouloir exprimer mon affection et ma profonde reconnaissance envers mon mari et mes deux fils Shujan et Nicolas, qui m'ont soutenue pendant ces trois ans.

# S O M M A I R E

## RESUME

1. INTRODUCTION .....	1
1.1.- Généralités .....	1
1.2.- Rappel sur le cycle de <u>Plasmodium</u> .....	1
1.3.- Aspects historiques des recherches sur les gamétocytes .....	2
1.4.- Recherches sur les variations de l'infectivité des gamétocytes .....	4
1.5.- Définition du sujet .....	7
2. MATERIEL ET METHODES .....	9
2.1.- ESPECES ET SOUCHES DE <u>PLASMODIUM UTILISEES</u> .....	9
2.2 - Hôtes expérimentaux .....	10
2.2.1. Hôtes vertébrés .....	10
2.2.2. Hôtes invertébrés .....	10
a - Entretien des moustiques adultes non infestés .....	
b - Entretien des moustiques infestés .....	
2.3 - ENTRETIEN DES SOUCHES AU LABORATOIRE .....	13
2.3.1. <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u> .....	13
2.3.2. <u>Plasmodium chabaudi</u> A.J. ....	14
2.3.3. <u>Plasmodium knowlesi</u> .....	14
2.4. - TECHNIQUE MICROSCOPIQUE .....	15
2.4.1. Microscopie photonique.....	15
a - Observations à frais.....	
b - Observation de frottis colorés .....	
c - Fixation, coloration et montage de l'intestin moyen des <u>Anopheles</u> .....	
2.4.2. Microscopie électronique à transmission .....	16
2.4.2.1. <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u> .....	16
2.4.2.2. <u>Plasmodium knowlesi</u> .....	18

2.5.- DETERMINATIONS BIOCHIMIQUES .....	19
2.5.1. Mesure du pH et des gaz du sang .....	19
2.5.2. Acide lactique plasmatique .....	20
2.6.- MANIPULATIONS .....	22
2.6.1. Evaluation de l'infectivité gamétocytaire .....	22
2.6.2. Détermination du taux d'exflagellation .....	23
2.6.3. Détermination du taux de formation d'ookinetes.....	23
2.6.4. Détermination du taux de formation d'oocystes .....	24
2.6.5. Etudes chronobiologiques .....	25
2.6.5.1. <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u> .....	25
2.6.5.1.1. Photopériode .....	25
2.6.5.1.2. Infection et suivi des animaux .....	25
2.6.5.1.3. Evaluation de l'importance de l'inoculum dans les variations de l'infectivité gamétocytaire .....	26
2.6.5.1.4. Mise en évidence de gamétocytes infestants d'origine exoérythrocytaire ...	27
2.6.5.2. <u>Plasmodium knowlesi</u> .....	28
2.6.5.2.1. Photopériode .....	28
2.6.5.2.2. Infection et suivi des animaux .....	28
2.6.6. Influence de facteurs sériques et plasmatiques sur l'infectivité gamétocytaire .....	29
2.6.6.1. Modèle expérimental .....	29
2.6.6.1.1. Etude de l'influence du sérum de souris impaludées après des temps variés .....	30
2.6.6.1.2. Effet inhibiteur du sérum et du plasma en fonction du temps écoulé entre l'inocu- lation du sérum inhibiteur et l'infection des moustiques .....	30

2.6.6.2. Influence du sérum immun sur l'infectivité gamétocytaire .....	31
2.6.6.2.1. Sérum de souris immunisée contre <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u> .....	31
2.6.6.2.2. Souris immunisée contre <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u> .....	32
2.6.6.2.3. Souris immunisées contre <u>Plasmodium chabaudi</u> .....	32
3. RESULTATS .....	33
3.1.- GAMETOCYTES D'ORIGINE EXO-ERYTHROCYTAIRE CHEZ <u>PLASMODIUM YOELII NIGERIENSIS</u> .....	33
3.2.- VARIATIONS DE L'INFECTIVITE GAMETOCYTAIRE .....	34
3.2.1. Chez <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u> .....	34
3.2.1.1. Variation de l'infectivité gamétocytaire en fonction du temps .....	34
3.2.1.2. Variation de l'infectivité gamétocytaire en fonction de la parasitémie .....	36
3.2.1.3. Infectivité gamétocytaire en fonction de la gamétocytémie dans le sang circulant et dans le sang contenu dans l'intestin moyen du moustique. Observations sur la morphologie gamétocytaire .....	37
3.2.1.3.1. Types morphologiques gaméocytaires et leur évolution au cours de l'infection .....	37
3.2.1.3.2. Ultrastructure des gamétocytes de <u>Plasmodium yoelii nigeriensis</u> .....	40
3.2.1.4. Variations du taux d'exflagellation .....	45
3.2.1.5. Variations de l'infectivité gamétocytaire et de l'exflagellation en fonction de l'importance de l'inoculum .....	46
3.2.1.6. Les ookinètes et les variatons de l'infectivité gamétocytaire : observations préliminaires.....	47
3.2.2. Chez <u>P. knowlesi</u> .....	49
3.2.2.1. Développement de l'infection chez le singe splénectomisé .....	49

3.2.2.1.1.	Rythme de la gamétocytogénèse .....	50
3.2.2.1.2.	Combien de temps faut-il pour la formation des gamétocytes ? .....	51
3.2.2.1.3.	Combien de temps faut-il pour que les gamétocytes deviennent infestants ?.....	51
3.2.2.1.4.	Pendant combien de temps les gamétocytes demeurent-ils infestants ?.....	51
3.2.2.1.5.	Variations de l'infectivité des gamétocytes .....	52
3.2.2.1.6.	Observations sur la morphologie des gamétocytes de <u>P. knowlesi</u> .....	53
3.2.2.1.6.1.	Microscopie photonique .....	53
3.2.2.1.6.2.	Microscopie électronique .....	55
3.2.2.2.	Développement de l'infection chez le singe intact (non splénectomisé) .....	58
3.2.2.2.1.	Variation de la gamétocytémie globale dans les PO et les PM .....	58
3.2.2.2.2.	Infectivité gamétocytaire .....	59
3.3.-	PO <sub>2</sub> , PCO <sub>2</sub> , pH SANGUINS ET LACTATE PLASMATIQUE CHEZ LA SOURIS SAINE ET CHEZ LA SOURIS INFECTÉE PAR <u>P. YOELII NIGERIENSIS</u> .....	60
3.3.1.	Souris saine .....	60
3.3.2.	Souris infestée par <u>P. yoelii nigeriensis</u> .....	60
3.3.2.1.	PO <sub>2</sub> .....	60
3.3.2.2.	PCO <sub>2</sub> .....	61
3.3.2.3.	pH .....	61
3.3.2.4.	Lactate plasmatique .....	61
3.4.-	POUVOIR INHIBITEUR DE L'INFECTIVITE GAMETOCYTAIRE DU SERUM ET DU PLASMA DES SOURIS IMPALUDES PAR <u>P. YOELII NIGERIENSIS</u> .....	62

3.4.1. Influence du temps après impaludation de la souris donneuse .....	62
3.4.2. Influence du temps écoulé entre la double inoculation de la souris receveuse et l'infection des moustiques .....	63
3.5.- RECHERCHES SUR LA NATURE DES FACTEURS SÉRIQUES OU PLASMATIQUES INHIBITEURS DE L'INFECTIVITÉ GAMETOCYTAIRE .....	65
3.5.1. Effet du sérum de souris immunisée contre <u>P. yoelii nigeriensis</u> .....	65
3.5.2. Evolution de l'infectivité des gamétocytes de <u>P. yoelii nigeriensis</u> chez des souris immunisées contre <u>P. chabaudi</u> .....	67
4. DISCUSSION .....	68
4.1. Origine exo-erythrocytaire des gamétocytes .....	69
4.2. Variations de l'infectivité des gamétocytes de <u>P.yoelii nigeriensis</u> au cours de la maladie expérimentale .....	72
4.3. Variations de la morphologie des gamétocytes .....	73
4.4. Variations de l'exflagellation et de la formation des ookinètes chez <u>P.yoelii nigeriensis</u> .....	77
4.5. Les gamétocytes de <u>P.knowlesi</u> .....	80
4.6. Les aspects physiopathologique .....	81
4.7. Influence de facteurs sériques et plasmatiques ...	82
5. CONCLUSIONS .....	86

## 6. BIBLIOGRAPHIE

## ANNEXE PLANCHES

## SUMMARY

Transmission of Plasmodium spp. to haematophagous vectors is necessary for the continuation of the life cycle of these haemosporidia. It has long been known that the infectivity of Plasmodium gametocytes undergoes variation during the course of malarial infection. Studies concerning the mechanism underlying such variation would be of considerable value since an inhibition of gametocyte infectivity can affect the transmission of malarial parasites.

In the present study we have investigated the variation in the infectivity of gametocytes of the rodent parasite P. yoelii nigeriensis and of the primate parasite P. knowlesi in relation to various parasite and host factors.

Gametogenesis in P. yoelii nigeriensis, with the production of infectious gametocytes can occur immediately following hepatic schizogony. The gametocytes reach their peak of infectivity for the mosquito, Anopheles stephensi on the third day following intravenous inoculation. Later, despite the increase in the number of gametocytes, their infectivity declines. This pattern is not influenced by the dose of inoculum and is parallel to the rate of exflagellation. The morphology of the gametocyte has been studied in relation to this development. Ultrastructural observations appeared to demonstrate that the loss in infectivity could be associated with mitochondrial degradation and an increase in folding of the membrane.

The results of our study suggest that serum and plasma factors are involved in the changes in gametocyte infectivity. When serum or plasma from infected animals was passively transferred to naive animals and subsequently injected with <sup>gametocytes,</sup> there was a marked inhibition in the gametocytes infectivity.

We have also observed modifications in the level of pH,  $PCO_2$ ,  $PO_2$ , lactic acid in the body fluids of infected animals. Such changes induced by malarial infection can have an influence on the physiology of gametocytes.

Finally, a morphological and chronobiological study of the gametocytes of P. knowlesi has allowed us to recognize a marked "nycthemeral" rhythm in infectivity for the mosquito.

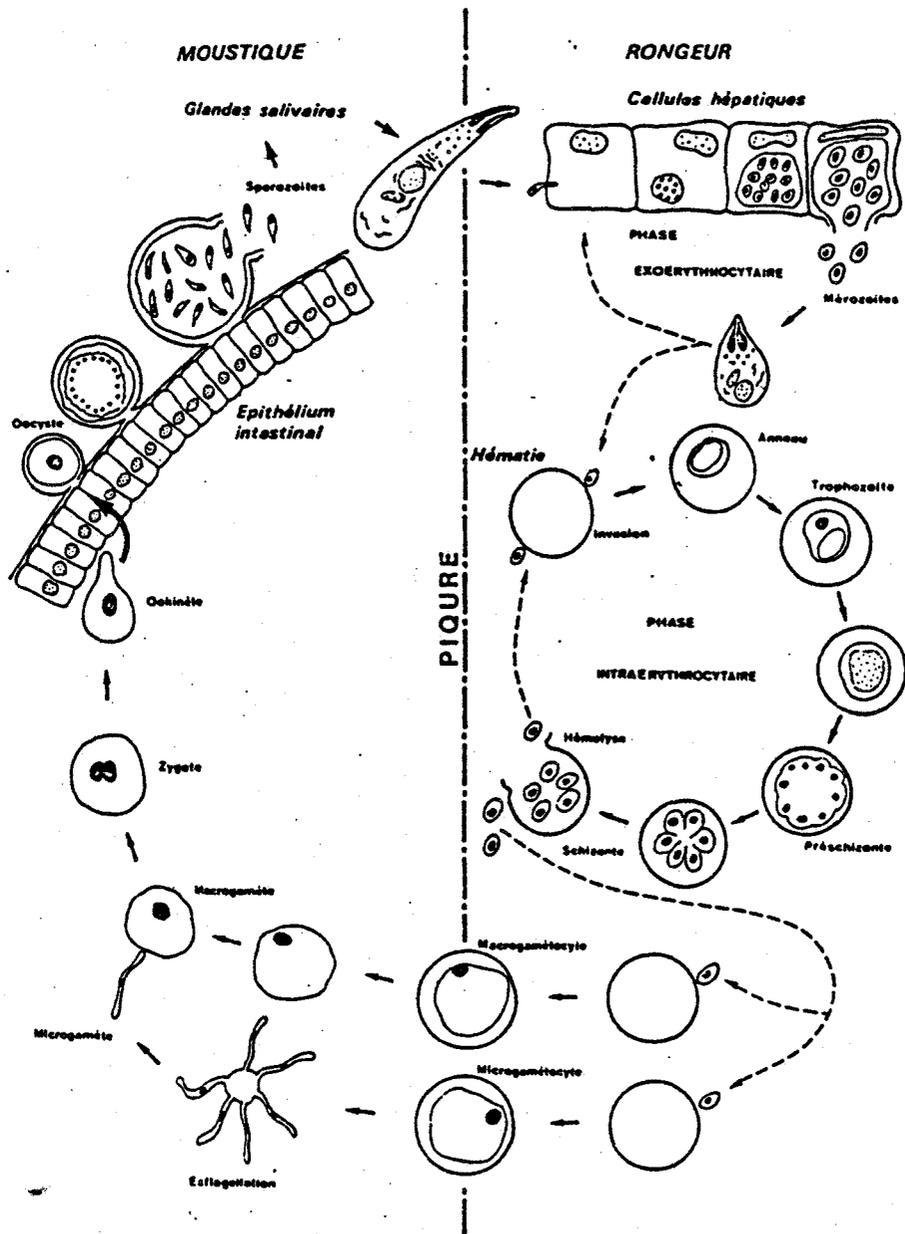


Figure a : D'après SLOMIANNY (Thèse de troisième cycle).

## 1. INTRODUCTION

### 1.1. Généralités

Le paludisme est la plus importante des maladies transmissibles : 210 millions de personnes au moins en sont affectées de manière chronique en Asie, Afrique et Amérique Latine, et le nombre de décès dus à cette infection ne peut être évalué précisément. De plus, le paludisme est en train de devenir une menace très préoccupante de par l'apparition à la fois de la résistance des Anophèles vecteurs aux insecticides et du parasite lui-même aux médicaments utilisés jusque là pour le combattre.

### 1.2. Rappel sur le cycle de Plasmodium (Fig. a)

L'infection palustre débute par l'injection des sporozoïtes par un moustique dans un capillaire de l'hôte et leur transfert vers le foie où ils envahissent les cellules du parenchyme hépatique pour se développer en schizontes préérythrocytaires (Fig. 40). Ceux-ci produisent 2000 à 20000 mérozoïtes qui sont libérés dans la circulation 42 à 72 heures après la piqûre infestante (pour les plasmodies de rongeur) et qui envahissent les érythrocytes.

La multiplication asexuée se poursuit alors par une schizogonie intraérythrocytaire répétée produisant à chaque cycle 8 à 16 (ou plus) mérozoïtes, ce qui correspond à la période d'invasion et de destruction des hématies caractéristiques du paludisme. Ces mérozoïtes donnent naissance aux macro et microgamétocytes. Les gamétocytes peuvent aussi se développer directement à partir des mérozoïtes issus des schizontes hépatiques, aussi bien dans le paludisme aviaire (ADLER et TCHERNOMORETZ, 1943) que mammalien (JAMES et al., 1936 ; KILLICK-KENDRICK et WARREN, 1968). La gamétogenèse, à partir des gamétocytes ingérés par le moustique,

conditionne la poursuite du cycle biologique et la production de sporozoïtes infestants.

### 1.3. Aspects historiques des recherches sur les gamétocytes

Les gamétocytes de Plasmodium ne quittent pas les hématies de l'hôte tant qu'ils sont dans la circulation. Par contre, lorsque le sang infesté est ingéré par un moustique réceptif, les gamétocytes s'échappent de l'érythrocyte et les gamètes se forment dans l'estomac de l'insecte. La formation de gamètes mâles filiformes et mobiles à partir du microgamétocyte est un phénomène spectaculaire connu sous l'appellation d'exflagellation.

La première exflagellation à partir du sang d'un paludéen fut observée en 1880 par LAVÉLAN (1881) qui en conclut que la maladie était liée à la présence d'un parasite dans le sang. Une observation similaire fut réalisée par DANILEWSKY (1885) sur Haemoproteus, un hématozoaire des oiseaux. MANSON (1894) pensait que les corps flagellés étaient une partie intégrale du développement du parasite essentielle à la survie de l'espèce hors de l'hôte vertébré : il suggéra que le parasite était aspiré par un moustique ou autre insecte suceur et que l'organisme flagellé devait traverser certains organes de ce vecteur. Cette hypothèse était également avancée par ROSS (1895).

En 1897, l'exflagellation fut observée pour la première fois sur du sang issu d'un malade atteint par Plasmodium falciparum, par MAC CALLUM.

Chez un Haemoproteus, OPIE (1898) parmi les parasites intraérythrocytaires observa des formes intensément colorées avec de petites zones nucléiformes et des formes pâles avec de grandes zones vésiculeuses. MAC CALLUM (1898) démontrait ensuite expérimentalement que seules les formes pâles devenaient flagellées.

Avant que MAC CALLUM ait ainsi résolu le problème de la signification de l'exflagellation, ROSS (1897) avait découvert les corps sphériques contenant du pigment sur la paroi stomacale de moustiques tués 4 à 5 jours après avoir piqué des oiseaux infectés par Protéosoma ; il avait ensuite pu suivre le développement de ces kystes jusqu'à la production des sporozoïtes qu'il avait suivie jusque dans les glandes salivaires (ROSS, 1898 ). De plus, ROSS (1898 ) avait été capable de transmettre ces sporozoïtes par la piqûre de moustiques ayant été au préalable nourris sur un moineau dont le sang contenait le parasite.

C'est enfin GRASSI (1900) qui, en travaillant sur le développement chez le moustique des parasites des fièvres tierces, bénignes et malignes, découvrit les ookinètes dans les coupes de paroi stomacale. L'essentiel du développement de la phase sexuée des Plasmodium chez les moustiques était alors élucidé.

TALIAFERRO (1925) établit que le pourcentage de gamétocytes dans les infections par P. praecox était d'environ 3 % pendant la phase aiguë, avec un accroissement important (de 2 à 50 %) pendant les rechutes et parfois pendant la phase chronique.

HUFF (1927) montra que les premiers gamétocytes dans les infections par P. cathemerium apparaissaient 4 jours après les premières formes asexuées et que le pic de formes asexuées intervenait un jour après le pic de formes asexuées. En comptant seulement les formes mûres pendant une période de 24 heures, il conclut que le nombre de gamétocytes ne montrait pas de périodicité de distribution. Dans la même espèce, SHAH (1934) trouvait une apparition simultanée des gamétocytes et des formes asexuées et une coïncidence des pics et de la décroissance des parasitémies respectives par les deux formes.

GAMBREL (1937) analysa les variations dans la production de gamétocytes, dans les paludismes aviaires (P. cathemerium et P. relictum var. matutinum) et observa que quand les gamétocytes étaient mûrs, les deux sexes se trouvaient en nombres comparables.

Elle observa aussi que les gamétocytes apparaissaient souvent en même temps que les formes asexuées et que les abondances respectives des 2 formes croissaient parallèlement après l'injection de sang parasité.

DUNCAN et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois, en 1957, en utilisant le microscope électronique, la morphologie du gamétocyte de P. cathemerium. AIKAWA et ses collègues, en 1969, ont décrit l'ultrastructure du gamétocyte de plusieurs espèces de Plasmodium d'oiseaux, de reptiles et de mammifères. En 1976, SINDEN et Coll. ont étudié la gamétogénèse et la fécondation chez P. yoelii nigeriensis à l'aide du microscope électronique et en 1982 SINDEN a décrit la structure fine de la gamétocytogénèse in vitro chez P. falciparum.

#### 1.4. Recherches sur les variations de l'infectivité des gamétocytes

LUMSDEN et BERTRAM (1940) ont noté que le maximum d'infectivité des gamétocytes de P. gallinaceum chez le moustique (Aedes aegypti) ne coïncide pas toujours avec le maximum de production des gamétocytes. Cette observation a été confirmée par CANTRELL et JORDAN (1946) qui ont montré que l'infectivité gamétocytaire de P. gallinaceum est maximale un jour avant le pic de la parasitémie et diminue ensuite rapidement. La diminution de l'infectivité gamétocytaire de P. yoelii coïncide avec l'apparition en nombre de plus en plus élevé de gamétocytes de morphologie altérée (LANDAU et al., 1979).

Chez Plasmodium yoelii, les gamétocytes sont infectants pour les moustiques du deuxième ou cinquième jour après l'infection transfusionnelle (WERY, 1968 ; MENDIS & TARGETT, 1979). Les résultats de LANDAU et al. (1979) suggèrent fortement que la période de haute parasitémie asexuée est associée avec une période d'infectivité réduite des gamétocytes pour les moustiques. Il est intéressant de noter que dans une espèce de Plasmodium parasite de rongeur telle que P. chabaudi, chez laquelle les parasites ne présentent pas de préférence pour les jeunes globules rouges et où les parasitémies dépassent rapidement 10 %, les gamétocytes sont peu infectants pour les moustiques pendant les dix premiers jours d'infection (CARTER et GWADZ, 1980) ; ensuite, lorsque l'hôte commence à surmonter l'infection, l'infectivité pour les moustiques augmente (WERY, 1968).

Les gamétocytes de P. yoelii sont présents dès le début de l'infection sanguine et peuvent donc aussi dériver directement des schizontes préérythrocytaires dans les infections par sporozoïtes (KILLICK-KENDRICK et WARREN, 1968).

Les gamétocytes mûrent en 24 heures et survivent probablement pendant moins d'un jour (HAWKING et al., 1972). Ils ont également observé que la variation du nombre d'exflagellations des microgamétocytes de P. gallinaceum chez le poulet à différentes périodes était principalement due à la variation du nombre total de gamétocytes mâles matures.

Le cycle asexué érythrocytaire de P. cynomolgi chez le singe rhésus est hautement synchronique et dure 48 heures. L'infection sanguine du même hôte par P. knowlesi est également très synchronique mais le cycle asexué dure seulement 24 heures. Les infections par sang parasité sont généralement fatales chez le singe Macaca rhésus. Lors des infections induites par sporozoïtes, les parasites arrivent dans le sang après une période

exoérythrocytaire d'environ 6 jours (GARNHAM, 1966) ; de telles infections sont moins virulentes que les précédentes mais sont habituellement fatales en l'absence de traitement.

Les gamétocytes matures de P. cynomolgi chez le singe rhésus apparaissent dans le sang environ 9 jours après l'infection par des sporozoïtes (GARNHAM, 1966). Selon ce dernier auteur, les gamétocytes atteignent la maturité morphologique en 4 jours. HAWKING et al. (1966) concluent que les gamétocytes de cette même espèce atteignent la maturité fonctionnelle en deux jours et demi et restent infectants moins de 24 heures. Dans les infections par sang parasité avec P. knowlesi, les gamétocytes mûrent en environ 36 heures et restent infectieux pendant environ 8 heures (HAWKING et al., 1968). Ces auteurs ont trouvé que les singes rhésus parasités par P. cynomolgi atteignaient un pic d'infectivité pour les moustiques à environ minuit toutes les 48 heures. Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs (COATNEY et al., 1971). Un profil régulier d'infectivité n'est cependant pas une règle absolue pour P. cynomolgi : GARNHAM et POWERS (1974) ont noté des pics d'infectivité nocturne (alternée) chez un seul des 5 singes rhésus étudiés. Les infections par P. cynomolgi peuvent perdre leur synchronicité et peuvent aussi contenir des groupes de parasites jeunes atteignant la maturité à différents jours ; dans ce cas, les gamétocytes matures apparaissent dans le sang d'une manière aléatoire ou presque en permanence, ce qui conduit à une infectivité continue pour les moustiques.

Chez les singes rhésus et M. fascicularis parasités par P. knowlesi, l'infectivité pour les moustiques atteint un pic à environ minuit, chaque jour pendant l'infection sanguine (HAWKING et al., 1968 ; HAQUE et al., 1982).

### 1.5. Définition du sujet

Dans cette étude, nous avons utilisé comme modèle P. yoelii nigeriensis chez la souris où il produit des gamétocytemies élevées et s'avère très virulent. Ceci facilite l'étude des facteurs dépendant de l'hôte sur l'infectivité des gamétocytes, ainsi que le montrent les résultats rapportés dans la suite de cet exposé. Bien qu'à ce stade nous ne puissions extrapoler ces résultats aux Plasmodium humains, il semble intéressant de les étudier chez l'homme car l'inhibition de l'infectivité gamétocytaire peut être un moyen efficace de bloquer la transmission palustre.

Nous avons également utilisé P. knowlesi chez Macacca fascicularis pour étudier l'infectivité des gamétocytes pour les moustiques. Ce parasite a développé un cycle très synchrone de 24 heures. Les gamétocytes commencent leur développement lors de la schizogonie vers midi et mûrent en 36 heures. L'infection est fatale pour le singe splénectomisé s'il n'est pas traité par des antimalariques.

Dans le présent travail, nous avons étudié les variations de l'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis et P. knowlesi pour les moustiques en fonction du temps, de la parasitémie, de l'exflagellation, de l'importance de l'inoculum et d'autres facteurs.

Nous avons également essayé de voir dans quelles mesures les variations de l'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis avaient une traduction morphologique. Quelques facteurs endogènes de l'hôte vertébré pouvant intervenir dans ces variations ont également été étudiés (gaz et pH sanguins, par exemple), de même que nous avons analysé l'effet de facteurs sériques ou plasmatiques, de souris infestées, sur

le taux d'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis. La réponse immune de l'hôte peut aussi modifier l'infectivité gamétocytaire et ceci a été étudié par transfert passif du sérum d'animaux guéris chez des souris parasitées et de sang parasité chez des souris immunisées.

Les résultats de ces différentes investigations sont rapportés dans le présent travail.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. ESPECES ET SOUCHES DE PLASMODIUM UTILISEES

Les souches de Plasmodium que nous avons utilisées pour nos expériences sont les suivantes :

- Plasmodium yoelii nigeriensis
- Plasmodium chabaudi A.J.
- Plasmodium knowlesi.

La plupart de nos expériences ont été réalisées avec la souche non clonée NIG/2 de Plasmodium yoelii nigeriensis (Liverpool) qui nous a été aimablement communiquée par Mme le Dr LANDAU (souris n° 296 - J5 infestée le 25.2.82 avec des sporozoïtes par voie intraveineuse).

La souche Plasmodium chabaudi A.J. fournie par le Dr WALLIKER (Institute of Animal Genetic, Edinburgh) est utilisée de façon continue dans notre laboratoire depuis plusieurs années.

La souche H de Plasmodium knowlesi isolée lors d'une infestation naturelle chez l'homme (laboratoire NIH, U.S.A.) nous a été transmise par R. GWADZ (Laboratoire de L. Miller, Bethesda, Maryland 20014).

Plasmodium knowlesi est la seule espèce plasmodiale de primate à schizogonie quotidienne.

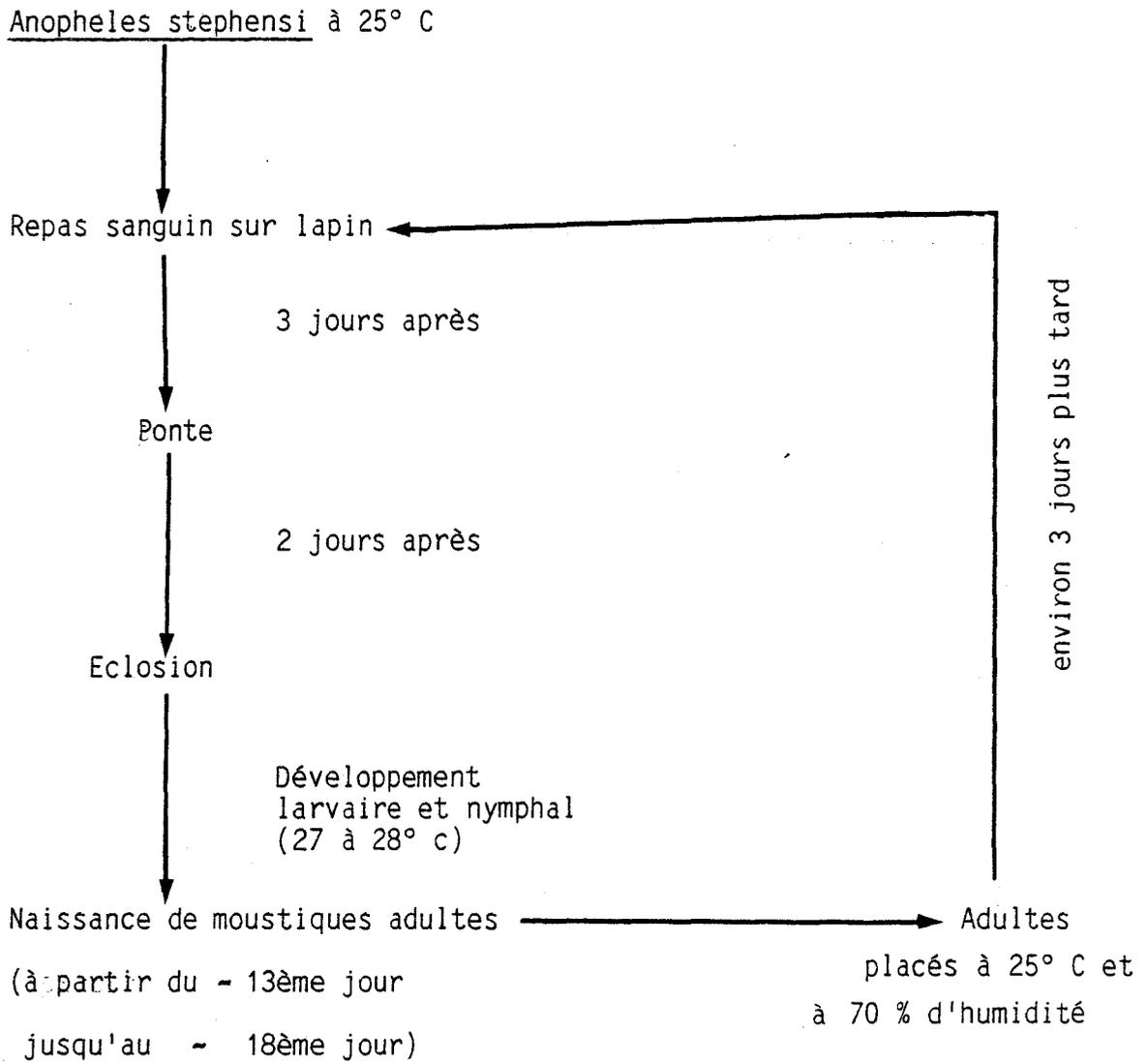


Figure b :- Elevage d'Anopheles stephensi dans notre laboratoire.

## 2.2. HOTES EXPERIMENTAUX

### 2.2.1. Hôtes vertébrés

- a) Pour Plasmodium yoelii nigeriensis et Plasmodium chabaudi A.J. : des souris Swiss femelles (Iffa Credo, France) exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), conventionnelles, âgées de 5 à 8 semaines au moment des expériences et pesant entre 15 et 18 g. Ces souris ont reçu une nourriture conditionnée supplémentée en acide para-aminobenzoïque (0,3 mg/ml d'eau).

- b) Pour Plasmodium knowlesi : deux singes mâles de l'espèce Macaca fascicularis de Malaisie. L'un d'eux est splénectomisé.

### 2.2.2. Hôtes invertébrés

Nous avons utilisé des moustiques Anopheles stephensi.

L'élevage d'Anopheles stephensi (Fig b) dans notre insectarium existe depuis 1974. Les oeufs provenant de femelles nourries sur lapin sont récoltés, déposés sur la surface de l'eau dans des bacs en plastique (30 cm x 30 cm de côté, 12 cm de hauteur), couverts de tulle. L'eau employée est l'eau du robinet (pH 7,4) qui reste pendant une semaine dans des grands réservoirs en plastique avant l'emploi. La température de la pièce est maintenue entre 27°C et 28°C.

Les larves sont alimentées avec des croquettes pour chien ("Purina"), auxquelles on a ajouté des vitamines. Cette nourriture est distribuée une fois par jour en évitant l'accumulation excessive (risque d'hyper

prolifération bactérienne). La surpopulation larvaire doit aussi être rigoureusement évitée.

Entre le 10ème et le 13ème jour, les larves IV se transforment en nymphes à partir desquelles en deux jours, les moustiques adultes éclosent. Ceux-ci sont récoltés par aspiration douce et transférés dans leurs cages définitives.

a) Entretien des moustiques adultes non infestés

Les cages contenant les adultes sont placées dans une pièce où la température ambiante est de 25°C. En vue de la production d'oeufs, la plus grande partie des Anopheles prennent deux fois par semaine leur repas sanguin sur un lapin préalablement anesthésié par le Pentobarbital (35 mg/kg). Entre les repas sanguins, les moustiques infestés ou non sont nourris avec une solution glucosée à 5 % inbibant un papier Whatman. De plus, dans chaque cage est mis un petit bac avec de l'eau pour permettre aux moustiques de pondre. La solution de glucose est changée tous les deux jours afin d'éviter la prolifération microbienne.

b) Entretien des moustiques infestés

Pour la transmission cyclique des Plasmodium et pour nos expériences, les Anopheles femelles sont réparties dans des cages plus petites (25 cm x 25 cm de côté, 26 cm de hauteur) que celles utilisées pour la copulation et la ponte.

Dans nos expériences, nous avons, en général, utilisé des Anopheles femelles âgées de 5 à 8 jours qui prenaient leur premier repas sanguin sur des souris expérimentales. Afin de faciliter celui-ci, la solution de glucose avait été enlevée des cages 24 heures auparavant. Des soins particuliers ont été pris pour assurer une humidité appropriée pendant leur jeûne.

Les souris infestées non anesthésiées, immobilisées sur une plaque de bois, sont placées dans la cage des moustiques en général pendant 15 à 30 minutes.

Les Anopheles femelles qui se sont gorgées de sang sont triées et placées dans une autre cage jusqu'à la dissection ou l'infestation par piqûre de nouvelles souris.

Pour nos expériences avec Plasmodium knowlesi, nous avons utilisé Anopheles stephensi comme hôte invertébré. Pour infester les moustiques à partir des singes impaludés, ceux-ci étaient anesthésiés à la Kétamine ( 20 mg/kg). Les moustiques gorgés de sang impaludé étaient séparés des autres comme auparavant.

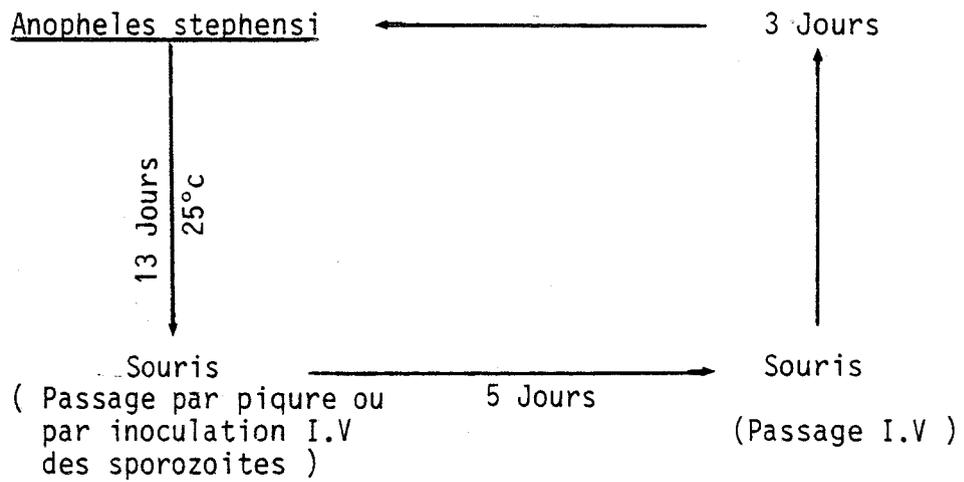


Figure c : Entretien de Plasmodium yoelii nigeriensis.

## 2.3. ENTRETIEN DES SOUCHES AU LABORATOIRE

### 2.3.1. Plasmodium yoelii nigeriensis

Nous avons effectué l'entretien de Plasmodium yoelii nigeriensis en alternant les passages sur moustiques avec des passages mécaniques (Fig. c). Les passages mécaniques ont été effectués par inoculation intra-veineuse (I.V.) ou intra-péritonéale (I.P.) d'une suspension d'hématies parasitées. En général, nous avons inoculé  $10^6$  hématies parasitées en suspension dans 0,5 ml de milieu: 199<sup>(1)</sup>.

Le nombre et la nature des passages subis par Plasmodium yoelii nigeriensis, lors de son entretien ont été enregistrés dans un cahier et les souris hôtes numérotées de la façon suivante :

N° de la souris receveuse <sup>1</sup>	N° de la souris donneuse <sup>2</sup>	N° de la souris recevant les sporozoites par piqûre de moustiques (pass <sup>(2)</sup> -cyclique)
2	1	3
4	3	5

<sup>1</sup> Souris qui reçoivent des GRP<sup>(3)</sup> par voie I.V. (ou I.P.) de la souris donneuse ;

<sup>2</sup> Animaux infestés par voie cyclique dont les GRP seront inoculés à la souris receveuse.

(1) Ref. 199020 (Eurobio)

(2) Passage cyclique

(3) GRP = Globule rouge parasité

Dorénavant, les souris impaludées, source de globules rouges parasités pour la mise en route des différentes expériences seront identifiées dans le texte avec leur numéro.

### 2.3.2. Plasmodium chabaudi A.J.

Le cycle est entretenu artificiellement sur des souris Swiss par passage mécanique tous les 5 à 6 jours de la manière suivante. Du sang (3 gouttes) est prélevé à la queue d'une souris infestée depuis 5 jours (taux de parasitémie : environ 60 %). Ce sang est mélangé à 1,5 ml de milieu 199. Le mélange est ensuite réinjecté par voie I.P. à raison de 0,5 ml par souris. Le nombre de parasites injectés à une souris est donc d'environ  $5 \times 10^5$ . La parasitémie est suivie quotidiennement en effectuant des frottis sanguins colorés au méthanol-Giemsa. Lorsque le taux d'hématies parasitées atteint 60 %, la souche est inoculée à d'autres souris.

### 2.3.3. Plasmodium knowlesi

Les inoculums congelés dans l'azote liquide ont été ressortis uniquement pour les expériences.

Lors de celles-ci, le cycle s'accomplit entre Macaca fascicularis et Anopheles stephensi (cf Chapitre "Résultats" pour les données concernant la chronobiologie de la souche).

## 2.4. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

### 2.4.1. Microscopie photonique

#### a) Observation à frais

Le sang a été observé à frais :

lors de la numération des hématies des souris parasitées à l'aide de la cellule de Thoma (après dilution dans le milieu 199) afin d'évaluer l'influence de l'anémie sur le calcul de la parasitémie (chapitre 2.6.5.1.3.) ;

pour déterminer le taux d'exflagellation (chapitre 2.6.2)

Le comptage d'oocystes dans l'intestin moyen d'Anopheles stephensi et de sporozoïtes dans les glandes salivaires a aussi été effectué à frais.

#### b) Observation de frottis colorés

Des frottis sanguins sont réalisés à partir d'une goutte de sang recueillie à la queue de la souris (PO) et de sang prélevé de l'intestin moyen des femelles d'Anopheles stephensi (PM).

Puis les frottis sont fixés au méthanol pendant 1 à 2 minutes et colorés au Giemsa R dilué à 10 % dans un tampon pH 7.2 dont la formule est la suivante :

- $\text{Na}_2 \text{H PO}_4$  1 g
- $\text{KH}_2 \text{ PO}_4$  0,7 g
- eau distillé QSP 1000ml

Le temps de coloration est de 20 minutes. Les lames sont ensuite rincées à l'eau du robinet et séchées.

Nous avons suivi la même technique pour colorer les glandes salivaires et parfois l'intestin des moustiques infestés.

Les frottis colorés au Giemsa sont lus au microscope optique en immersion (X 100). Le comptage de la parasitémie et de la gamétocytémie a été fait respectivement sur  $10^3$  et  $10^4$  hématies. Les frottis sont parcourus systématiquement mais lors des comptages les comparaisons sont établies entre les résultats obtenus dans la même zone des différents frottis.

c) Fixation, coloration et montage de l'intestin moyen des Anopheles

L'intestin moyen, séparé des tubes de Malpighi et des ovaires (chapitre 2.6.4.) a été fixé à l'alcool à  $70^\circ$  pendant plusieurs heures. Après la fixation, il est réhydraté dans l'eau distillée pendant 2 à 3 minutes. Nous l'avons coloré dans le picroindigo-carmin à 1 % dans l'eau pendant 12 à 15 minutes et ensuite rincé rapidement dans de l'eau distillée. L'intestin a été déshydraté à l'alcool, éclairci pendant 10 minutes dans du toluène, puis inclus dans du Xam-Gurr pour l'observation.

2.4.2. Microscopie électronique à transmission

2.4.2.1. Plasmodium yoelii nigeriensis

Après avoir essayé différentes modalités de fixation et d'inclusion du sang parasité, nous avons retenu la technique suivante qui nous a donné de bons résultats.

Le sang des souris parasitées est prélevé directement dans le sinus rétro-orbital et fixé rapidement dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M à pH 7,4 pendant 1 h 30 à température ambiante avec agitation manuelle intermittente.

Le sang ainsi fixé est centrifugé à 280 g pendant 5 minutes. Après élimination des 3/4 du surnageant, le culot est remis en suspension et réparti dans des tubes capillaires (tubes à microhématocrite). Ces derniers sont alors centrifugés à 500 g, 5 minutes puis sans interruption à 1100 g pendant 5 minutes.

Le surnageant est rejeté et la fraction supérieure du culot erythrocytaire, la plus riche en hématies porteuses de gamétocytes, est remise en suspension dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4 puis centrifugée. Le surnageant est alors remplacé par une solution d'acide osmique 1 % dans le même tampon. Cette post-fixation est réalisée à 4°C pendant 1 h 30. Les échantillons sont déshydratés à l'alcool et inclus dans l'EPON.

Après localisation des zones riches en parasites sur des coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine, des coupes ultrafines ont été réalisées au couteau de diamant sur un ultramicrotome Porter Blum MT1, recueillies sur des grilles en cuivre nues, et contrastées à l'acétate d'uranyle à 2 % en solution dans l'alcool à 50°, puis au citrate de plomb (Reynolds, 1963). Les coupes ont été observées aux microscopes Hitachi-HU11E et JEOL 100 Cx.

#### 2.4.2.2. Plasmodium knowlesi

Le sang de singes infestés, prélevé par ponction veineuse ou contenu dans l'intestin moyen d'Anopheles stephensi, a été préparé pour la microscopie électronique en suivant la même technique rapportée ci-dessus, mais aussi selon la technique d'AIKAWA (1966).

## 2.5. DETERMINATIONS BIOCHIMIQUES

Nous avons abordé l'étude de quelques paramètres du milieu intérieur de la souris impaludée pouvant affecter l'infectivité et la morphologie gamétocytaires.

### 2.5.1. Mesure du pH et des gaz du sang

Pour étudier les variations des  $PO_2$ ,  $PCO_2$  et pH du sang, nous avons inoculé des souris Swiss et C57 Black avec Plasmodium yoelii nigeriensis et suivi l'infestation sur des frottis journaliers.

Le sang des souris non anesthésiées a été récupéré avec une seringue héparinée et une aiguille 20 G - 1.25, par ponction cardiaque en évitant soigneusement le contact du sang avec l'air. Les déterminations du pH et des  $PO_2$  et  $PCO_2$  sont effectuées à l'aide d'un appareil IL-213 étalonné à 38°C (coefficient de Rosenthal 15/1000 du pH par degré C). La  $PCO_2$  a été mesurée sur électrode à  $H^+$  et la  $PO_2$  sur électrode à  $OH^-$  étalonnée à 38°C.

Avant de nous décider à travailler sur le sang prélevé sans anesthésie par ponction cardiaque transthoracique, nous avons essayé d'autres modalités de prélèvement :

- a) ponction cardiaque à coeur ouvert, 5 à 10 minutes après l'injection de pentobarbital<sup>(1)</sup> (50 mg/kg) ;
- b) ponction cardiaque transthoracique 15 à 30 minutes après l'injection intra-musculaire (I.M.) de kétamine (5 mg/kg) ;

---

(1) Nembutal : 0,025 ml/souris

Ketamine : 0,1 ml de solution diluée avec l' $H_2O$  et injecté  
0,25 ml/souris

Valium : 0,25 ml/souris (dilution : 1:9)

- c) ponction cardiaque transthoracique sans anesthésie 15 à 30 minutes après l'injection de valium (0.5 mg/kg) ;
- d) le sang veineux a été prélevé sans anesthésie par ponction rétro-orbitaire.

### 2.5.2. Acide lactique plasmatique

Pour compléter l'étude des variations induites par infection palustre sur le milieu intérieur des souris impaludées, nous avons dosé la lactacidémie.

Pour cela 30 souris femelles ont été infestées par voie I.P. avec  $75 \times 10^6$  GRP (provenant de la souris N°60) par Plasmodium yoelii nigeriensis. Ces animaux ont été répartis en 5 lots.

A chaque fois et pour chaque souris où le dosage de l'acide lactique était pratiqué, un frottis méthanol-Giemsa était effectué pour rapporter la lactacidémie à la parasitémie. Les dosages effectués 2, 4, 6, 7 et 8 jours après l'infestation des lots de souris impaludées (un lot à chaque fois) étaient accompagnés de dosages chez des souris saines. Chaque souris saine ou impaludée a été saignée une seule fois afin d'éviter l'éventuelle anémie, induite par des prélèvements répétés sur la lactacidémie.

Les dosages sont effectués sur du plasma. 0,5 ml de sang prélevé par ponction rétro-orbitaire sont mélangés avec 40 µl de fluorure/EDTA et centrifugés pendant 5 minutes à 1100 g. Le plasma est décanté et les dosages effectués à l'aide du Kit Boehringer (ref. 243710 Boehringer, France).

Après avoir essayé cette technique sur des souris saines à jeûn et après alimentation normale, nous avons décidé de travailler sur des souris privées d'aliment pendant la nuit précédant le prélèvement.

## 2.6. MANIPULATIONS

Les manipulations réalisées avec Plasmodium yoelii nigeriensis et P. knowlesi visaient d'une part à préciser la chronobiologie de la gamétocyto-genèse, les variations de l'infectivité gamétocytaire, le taux d'exflagellation et les changements corrélés de la morphologie gamétocytaire ; et d'autre part, à étudier l'influence éventuelle de facteurs plasmatiques et sériques sur ces variations.

### 2.6.1. Evaluation de l'infectivité gamétocytaire

A chaque expérience, environ 20 moustiques ont été mis en contact avec une souris infestée par Plasmodium yoelii nigeriensis. Après leur repas, les femelles ont été conservées entre 6 et 7 jours à 25°C, puis disséquées pour compter le nombre d'oocystes. L'infectivité gamétocytaire est alors exprimée selon la formule de COLLINS (1962) :

$$\frac{\text{Nombre total d'oocystes}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} = \text{Index oocystique ("gut index")}$$

Les frottis P0 et PM (cf chapitre 2.4) ont été étudiés quantitativement et qualitativement en comptant la gamétocytemie globale pour  $10^4$  hématies et en déterminant le pourcentage de distribution de types morphologiques gamétocytaires ("formule gamétocytaire", selon LANDAU et al., 1979). La morphologie des gamétocytes a aussi été étudiée en microscopie électronique à transmission (=MET).

Pour évaluer l'infectivité des gamétocytes de Plasmodium knowlesi, nous avons infesté des moustiques 2 à 6 fois par jour, pendant 10 jours, à partir du 3ème jour. Après l'inoculation I.V. de globules rouges parasités par Plasmodium knowlesi à un singe splénectomisé, à chaque fois, nous avons infesté un lot de 20 moustiques environ. Ceux-ci ont été disséqués 8 jours plus tard environ afin de déterminer l'index oocystique. L'infectivité a parfois été exprimée selon la formule :

$$\text{Infectivité} = \frac{\text{Nombre de moustiques positifs}}{\text{Nombre de moustiques disséqués}} \times \text{Nombre d'oocystes}$$

#### 2.6.2. Détermination du taux d'exflagellation

Pour déterminer le taux d'exflagellation, nous avons agi de la façon suivante : 10 µl de sang sont récoltés directement à la queue des souris impaludées à l'aide d'un tube capillaire hépariné (VC - H075 - Terumo), et déposés sur une lamé microscopique, sur laquelle nous avons déposé auparavant 25 µl de 199. Après homogénéisation et en travaillant rapidement à température ambiante, la suspension est couverte avec une lamelle de 22 mm x 22 mm et observée au microscope optique à 400 X. Nous comptons le nombre total d'exflagellations observées dans 25 champs à partir de la 4ème minute. Ce chiffre est rapporté à la parasitémie, à la gamétocytémie, à l'infectivité et au nombre total de globules rouges/mm<sup>3</sup>.

#### 2.6.3. Détermination du taux de formation d'Ookinètes

Les moustiques infestés ont été disséqués pour l'observation des ookinètes. Nous avons évalué la présence d'ookinètes 6 heures et 24 heures après le repas sanguin, dans l'intestin moyen. Pour cela, le

contenu initial a été étalé sur une lame microscopique avec de l'eau physiologique. Cet étalement est réalisé sur une petite surface (1,5 cm<sup>2</sup>) et ensuite séché et coloré au méthanol-Giemsa. Les ookinètes sont recherchés au X 400 et étudiés en immersion.

#### 2.6.4. Détermination du taux de formation d'oocystes

Les moustiques femelles capturés avec un tube à essai sont assommés contre la paroi de celui-ci. Ensuite, les pattes et les ailes sont détachées et le corps est placé sur une lame microscopique. Pour extraire l'intestin moyen, le thorax est maintenu fermement avec une aiguille histologique tandis que l'on détache soigneusement les deux derniers segments postérieurs de l'abdomen à l'aide d'une autre aiguille histologique entraînant avec eux l'intestin, les tubes de Malpighi et les ovaires. Les parties antérieures et postérieures de l'intestin sont coupées et rejetées et l'intestin moyen est observé entre lame et lamelle dans l'eau physiologique au microscope photonique (100 X et 400 X) avec le diaphragme du condenseur partiellement fermé.

Cette façon d'opérer permet d'effectuer une numération assez précise des oocystes si l'infestation n'est pas massive. Les comptages ont été effectués 6 à 7 jours après l'infestation des moustiques avec Plasmodium yoelii nigeriensis, 8 jours après environ, après l'infestation avec P. knowlesi.

Les oocystes ne doivent pas être confondus avec les cellules de l'épithélium de l'intestin moyen lesquelles une fois détachées adoptent souvent une forme arrondie. Les jeunes oocystes sont facilement repérables, rattachés à la surface du tube digestif et portant les granules de pigment caractéristiques. Les cellules de l'épithélium se trouvent libres dans la lumière intestinale et ne sont pas pigmentées.

Le taux d'infection des moustiques a été généralement exprimé comme le nombre d'oocystes rapporté au nombre total des moustiques disséqués (voir chapitre 2.6.1). Dans les différentes expériences, l'index oocystique a parfois été rapporté à la gamétocythémie et à la parasitémie.

## 2.6.5. Etudes chronobiologiques

### 2.6.5.1. Plasmodium yoelii nigeriensis

#### 2.6.5.1.1. Photopériode

Lors des études chronologiques les souris infestées ont été soumises alternativement à 12 heures d'obscurité (6 à 18 heures) et 12 heures de lumière (18 à 6 heures) en tenant compte des observations de HAWKING et al. (1968) concernant les variations nycthémérales de l'infectivité gamétocytaire. Dorénavant, les heures, sauf indication contraire, correspondent à ce nycthémère artificiel. Les souris avant d'être inoculées étaient habituées pendant deux semaines au même nycthémère.

#### 2.6.5.1.2. Infection et suivi des animaux

Trois expériences ont été conduites pour étudier :

- a) la chronobiologie de la gamétocytogenèse ;
- b) la distribution de types morphologiques gamétocytaires dans le sang prélevé sur le vertébré et dans l'intestin moyen du moustique après l'hémophagie ;
- c) les variations de l'infectivité gamétocytaire en fonction du temps.

TABLEAU A : Détail des expériences sur la chronobiologie de la gamétocytogenèse  
et sur les variations spontanées de l'infectivité gamétocytaire.

Plasmodium yoelii nigeriensis chez la souris Swiss. Hôte invertébré :

Anopheles stepensi ; J = Jour ; N = Nuit

Numéro d'expérience	Inoculum (nombre de GRP)	Nombre de souris/lot (1)	temps (heures) après l'infestation des lots de souris		Nombre de cages de moustiques	Nombre d' <u>Anopheles</u> femelles/cage
1	$1.5 \times 10^6$	2 (A)	8	J	1 cage	15
		2 (B)	22	N	"	"
		2 (C)	27	N	"	"
		2 (D)	31 - 32	J	"	"
		2 (E)	36 - 37	J	"	"
		2 (F)	46 - 47	N	"	"
		2 (A)	51 - 52	N	"	"
		2 (B)	55 - 56	J	"	"
		2 (c)	59 - 60	J	"	"
		2 (D)	70 - 71	N	"	"
		2 (F)	83 - 84	J	"	"
		2 (A)	99 - 100	N	"	"
		2 (B)	123 - 124	N	"	"
		2	$10^7$ (sang congelé à $-196^\circ\text{C}$ )	1 (A)	30	J
2 (B)	48			N	2 cages	"
2 (C)	66			N	"	"
2 (D)	90			N	"	"
2 (B)	115			N	"	"
3	$10^7$	1 (A)				
		1 (B)	24	N	2 cages	20
		1 (A)				
		1 (B)	48	N	"	"
		1 (A)				
		1 (B)	66	N	"	"
		1 (A)				
		1 (B)	74	N	"	"
		1 (A)				
		1 (B)	90	N	"	"
		1 (A)				
		1 (B)	114	N	"	"
1 (A)						
1 (B)	121	N	"	"		

(1) Les lots ont été nommés d'A à F. En général, chaque lot a été exposé  
2 fois ou plus aux moustiques.

Les infestations sont effectuées par voie-intraveineuse. Le nombre de GRP à inoculer, suspendus dans le milieu 199 a varié dans les différentes expériences entre  $1,5 \times 10^6$  à  $1 \times 10^7$ . Dans tous les cas, la suspension de GRP a été conservée à 4°C pendant la durée de la manipulation. Les infestations étaient réalisées avec du sang parasité, congelé ou non de souris inoculées par voie cyclique (tableau A).

La parasitémie et la gamétocytémie ont été déterminées sur des frottis méthanol-Giemsa. Deux sortes de frottis ont été effectués, 1 à 4 fois toutes les 24 heures : les uns classiques (PO) avec du sang prélevé à la queue des souris ; les autres (PM) réalisés avec le sang ingéré par les moustiques et obtenu par dissection de ceux-ci immédiatement après leur repas infestant comme il a été indiqué dans le chapitre 4.

Différents lots de souris étaient exposés aux moustiques plusieurs fois par jour à des heures différentes pendant 5 jours. Mise à part la première expérience, une seule souris de chaque lot était exposée aux moustiques. Le détail des différentes expériences est exposé dans le tableau A.

Nous avons effectué une expérience sur un lot de 4 souris pour déterminer les variations du taux d'exflagellation (cf.chapitre 3.2.1.4) en fonction du temps, de la parasitémie et de la gamétocytémie.

#### 2.6.5.1.3. Evaluation de l'importance de l'inoculum dans les variations de l'infectivité gamétocytaire

A partir de la souris donneuse N°119-J6, quatre lots de deux souris ont été inoculés respectivement avec  $41 \times 10^6$  GRP,  $19 \times 10^6$  GRP,

$2 \times 10^6$  GRP et  $27 \times 10^3$  GRP. Pendant 5 jours, une souris de chaque lot a été exposée quotidiennement aux piqûres d'une dizaine d'Anopheles afin d'évaluer l'infectivité gamétocytaire. De plus, sur les souris de tous les lots, nous avons déterminé à la même heure tous les jours :

- a) le taux d'exflagellation ;
- b) la parasitémie et la gamétocytémie ;
- c) le nombre d'hématies par  $\text{mm}^3$  à l'aide de la cellule de Thoma.

Ces déterminations ont été réalisées comme il a été indiqué précédemment dans le chapitre 2.4.1.

#### 2.6.5.1.4. Mise en évidence de gamétocytes infestants d'origine exo-érythrocytaire

De façon à mettre en évidence ces gamétocytes, trois séries expérimentales ont été réalisées avec Plasmodium yoelii nigeriensis.

La première d'entre elles a été effectuée au cours des recherches sur la chronobiologie de la gamécytogenèse. Cinq souris infestées par P.yoelii nigeriensis sont exposées pendant 7 heures aux piqûres d'Anopheles stephensi. Après des délais de 40 à 47 h, 50 à 60 h et 70 à 77 h, l'infectivité du sang de ces souris est testée sur Anopheles stephensi.

Pour les deux autres séries analogues, le temps d'exposition aux Anophèles infestées par P.yoelii nigeriensis a été de trois heures, avec 2 souris par lot. Dans ces cas, la recherche de gamétocytes infestants a été effectuée à 44 h - 48 h - 55 h - 67 h - 72 h et 92 h.

Des frottis de contrôle PO et PM de chaque souris ont été effectués.

## 2.6.5.2. Plasmodium knowlesi

### 2.6.5.2.1. Photopériode

Les singes inoculés avec Plasmodium knowlesi ont aussi été soumis à 12 heures d'obscurité (9 à 21 heures) et à 12 heures de lumière (21 à 9 heures) pour les mêmes raisons que celles expliquées dans le chapitre 2.6.5.1.1.

### 2.6.5.2.2. Infection et suivi des animaux

Les expériences avec Plasmodium knowlesi ont été réalisées afin d'étudier :

- a) le nombre et la fréquence des vagues de gamétocytogénèse au cours de l'infection ;
- b) la corrélation entre les variations de la morphologie gamétocytaire et celle de l'infectivité au cours de la maladie et dans le nycthémère
- c) les types morphologiques gamétocytaires.

Pour réaliser cette expérience, nous avons inoculé deux singes : un singe est splénectomisé, l'autre est intact, avec des GRP par P. knowlesi par voie I.V.

A partir du moment où la parasitémie devient patente, les singes ont été exposés aux moustiques. Des frottis PO et PM ont été effectués.

De cette façon, la parasitémie, la gamétocytémie dans les frottis PO et PM et l'infectivité gamétocytaire ont été évaluées toutes les 4 à 6 heures environ, pendant dix jours. Lorsque la parasitémie atteint 5 % environ, le singe est traité à la chloroquine (Nivaquine, Specia 10 mg/kg/jour, par voie I.M. et ce, pendant 5 jours).

Pour l'étude de la morphologie gamétocytaire, nous avons prélevé 8 jours après l'inoculation, du sang de l'animal splénectomisé et des intestins moyens d'Anopheles stephensi, 30 à 50 sec, 30 minutes et 20 heures après le repas infestant, pris aussi pour l'étude ultrastructurale. Ces prélèvements ont été fixés et préparés pour la MET en suivant la technique d'AIKAWA (1966).

#### 2.6.6. L'influence de facteurs sériques et plasmatiques sur l'infectivité gamétocytaire

##### 2.6.6.1. Modèle expérimental

Pour étudier l'influence du sérum ou du plasma de souris saines et impaludées, sur l'infectivité des gamétocytes, nous avons travaillé sur le modèle expérimental mis au point par PETIT et al. (1982). Brièvement, cela consiste à inoculer par voie intraveineuse une souris saine (receveuse) avec le sérum ou le plasma à tester et, dans les minutes qui suivent, le sang contenant les gamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis.

Ces expériences ont été réalisées sur des souris Swiss femelles âgées d'environ 6 semaines.

Le sang contenant les gamétocytes infestants, prélevé dans le sinus rétro-orbitaire d'une souris impaludée par voie transfusionnelle 3 jours auparavant (parasitémie : 10 à 15 %) est immédiatement dilué (1:4) dans du TC-199 et conservé à 4°C jusqu'au moment de l'inoculation de la souris receveuse. Le délai entre le prélèvement et l'inoculation n'a jamais dépassé 15 minutes et en général était de 5 minutes environ. Le nombre de parasites inoculés est de  $60 \times 10^6$  environ.

2.6.6.1.1. Etude de l'influence du sérum de souris impaludées après des temps variés

Dans tous les cas, les souris receveuses ont d'abord reçu le sérum ou le plasma à tester puis 0,1 ml du sang contenant les gamétocytes infestants. Des souris-témoins receveuses ont été inoculées avec 0,5 ml d'un pool de sérum de souris sain.

Les souris receveuses expérimentales ont reçu 0,5 ml de sérum ou de plasma de souris impaludée selon le détail suivant :

Tableau B : Détails sur l'origine des échantillons sériques et plasmatiques utilisés pour l'étude de leur influence sur l'infectivité des gamétocytes (voir texte)

Nombre de jours après impaludation des souris donneuses : souris saine	0	3	4	5	6
Nombre de souris receveuses	1(plasma) 6(sérum)	1(plasma)	1(plasma)	2(plasma) 6(sérum)	1(plasma)

2.6.6.1.2. Effet inhibiteur du sérum et du plasma en fonction du temps écoulé entre l'inoculation du sérum inhibiteur et l'infection des moustiques

Les souris ayant reçu le sérum ou le plasma à tester, puis 0,1 ml de sang contenant les gamétocytes infestants, ont été présentées aux Anopheles (pendant 10 à 15 minutes) 45 minutes, 3 heures, 7 heures et 20 heures après cette double injection I.V.

Dans un temps compris entre 45 minutes et 24 heures après l'inoculation des gamétocytes infestants et du sérum ou du plasma à tester, la souris receveuse a été exposée aux piqûres de femelles d'Anopheles stephensi. Celles-ci ont été disséquées 6 à 7 jours plus tard pour déterminer leur index oocystique.

Les plasma et les sérums à tester ont été obtenus chez des souris saines ou impaludées, selon l'expérience, par ponction du sinus rétro-orbitaire avec une pipette Pasteur héparinée ou non. Avant d'être inoculés les prélèvements étaient conservés à température ambiante ou à 4°C.

#### 2.6.6.2. Influence du sérum de souris immunisées sur l'infectivité gamétocytaire

##### 2.6.6.2.1. Sérum de souris immunisées contre Plasmodium yoelii nigeriensis

Des souris qui ont exceptionnellement survécu à l'infestation par Plasmodium yoelii nigeriensis ont été immunisées activement par l'inoculation, mensuelle pendant 1 an, de sang parasité. Ces animaux n'ont jamais développé la maladie.

Le sérum des souris ainsi immunisées a été inoculé sur des souris saines lesquelles ont immédiatement reçu du sang parasité contenant des gamétocytes infestants par voie intra-veineuse selon les modalités décrites dans le chapitre 2.6.6.1.1.

Enfin, des moustiques ont été infestés sur les souris receveuses, 45 minutes, 6 heures et 20 heures après l'inoculation de gamétocytes infestants.

#### 2.6.6.2.2. Souris immunisées contre Plasmodium yoelii nigeriensis

De plus, des souris qui ont survécu ont été inoculées avec des GRP contenant des gamétocytes infestants de Plasmodium yoelii nigeriensis. Puis des moustiques sont gorgés sur les souris, 45 minutes, 6 heures et 20 heures après l'inoculation du sang parasité avec des gamétocytes. Les moustiques qui se sont gorgés, sont disséqués au 7ème jour pour déterminer l'index oocystique.

#### 2.6.6.2.3. Souris immunisées contre Plasmodium chabaudi

Des souris après guérison de l'infestation à P. chabaudi ont été inoculées avec des GRP contenant des gamétocytes infestants de Plasmodium yoelii nigeriensis. Ces animaux ont été exposés aux moustiques 48 h, 72 h et 120 heures après l'inoculation. Treize jours plus tard une souris saine a été mise en contact avec ces moustiques. Pour évaluer l'index oocystique, quelques moustiques ont été disséqués 7 jours après l'infestation.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. GAMETOCYTES D'ORIGINE EXO-ERYTHROCYTAIRE CHEZ PLASMODIUM YOELII NIGERIENSIS

Dans un frottis PM de l'une des 5 souris expérimentales un macrogamétocyte faiblement pigmenté, accompagné de très rares trophozoites jeunes, a été observé dans l'intervalle 40 à 47 heures après la piqûre infestante. Entre 50 et 60 heures, nous n'avons observé que des formes asexuées.

Sur les frottis (PO) réalisés sur le même animal 70 à 77 heures après, des images micro et macrogamétocytaires ont été observées. Ces gamétocytes peu pigmentés et de grande taille évoquent l'aspect jeune décrit par LANDAU et al. (1979) et DEI-CAS et al. (1980).

Dix jours après, les moustiques conservés à 25°C et gorgés 40 à 60 heures après les piqûres infestantes se sont avérés négatifs. Par contre, ceux infestés 70 à 77 heures après l'infection de la souris avec des sporozoites étaient positifs dans une proportion de 3 sur 10 moustiques, le nombre d'oocystes variant entre 26 et 300. La morphologie des oocystes et des sporozoites était normale, ceux-ci s'avérant infestants pour une autre souris.

Dans deux autres expériences, les frottis PO et PM montraient uniquement des formes asexuées 44 heures après les piqûres infestantes. Une des expériences a été interrompue 79 heures après l'infection des souris : aucun lot de moustiques n'était infesté.

Dans la troisième expérience, le seul lot de moustiques infesté était celui exposé 92 heures après l'infestation de la souris : sur 11 moustiques, 2 ont été faiblement positifs avec 2 à 4 oocystes par moustique.

TABLEAU C : Variations de la parasitémie, de la gamétoctémie et de l'infectivité gamétoctaire chez *Plasmodium yoelii nigeriensis* chez la souris swiss.

Numero d'expérience	Nombre de GRP inoculés	Heures après l'inoculation	Parasitémie(%)		Gamétoctémie sur 10 <sup>6</sup> GR		Oocystes/mcistique	Nombre de souris
			PO	PM	PO	PM		
1	1,5 x 10 <sup>6</sup>	8	0,01	0,01	-	-	-	1
		22	0,05	0,05	-	-	-	
		27	0,01	0,1	-	-	-	
		31- 32	0,4	0,5	1	1	5±15	
		36- 37	0,1	0,1	3	2	0,5±2	
		46- 47	0,9	1	4	5	24,7±30	
		51- 52	1,2	1,4	11	9	41,5±69	
		55- 56	1,5	1,7	14	16	43,7±58,8	
		59- 60	1,9	2,3	6	6	58,7±125	
		70- 71	4	4	5	4	63±80,6	
		83- 84	6	5,8	14	18	140±134,8	
99-100	16	15,9	25	32	27,5±54			
123-124	29	28,7	15	8	0			
2	10 <sup>7</sup> Sang congelé	30	0,3	0,2	6	6	13,6±24,2	1
		48	2,3	1,3	16	20	32,8±50	
		66- 67	5,9	6,5	22	16	140 ±127	
		90- 91	15,5	17	13	17	1,3±2	
		115-116	17,7	22	20	13	0	
3	10 <sup>7</sup>	24	2±0	2,5±1,4	8±2,8	7±1,4	20±20	2
		48	10,3±0,3	10 ±0	16 ±2	15,5±	107±48,6	
		66	12,5±2	12,5±1,8	19,8±3,1	14,8±0,7	300±74	
		74	16,3±1,4	18,4±2	11,4±4,2	14,5±0,9	310±90	
		90	22 ±0,6	21,5±3	15,5±2	21,1±4,3	250±60	
		114	28 ±3,7	26,2±2,6	18 ±0,5	20,6±1,9	23±12	
		121	24 ±1,4	(1)	16,9±4,3		16±24	

GRP = Globule rouge parasité

GR = Globule rouge

(1) Absence de prélèvement

### 3. 2. VARIATIONS DE L'INFECTIVITE GAMETOCYTAIRE

#### 3. 2. 1. Chez Plasmodium yoelii nigeriensis

Ici, nous rapportons les variations de l'infectivité gamétocytaire en fonction de divers facteurs.

Le tableau C indique pour les différentes expériences le type d'inoculum (sang congelé à  $-196^{\circ}\text{C}$  ou sang frais, inoculum de  $1,5 \times 10^6$  ou de  $1 \times 10^7$ ), les formules gamétocytaires déterminées sur les frottis PO et PM, ainsi que l'infectivité des gamétocytes.

Les figures 1 à 3 montrent les résultats chiffrés correspondants à l'ensemble des expériences analysées ci-dessous.

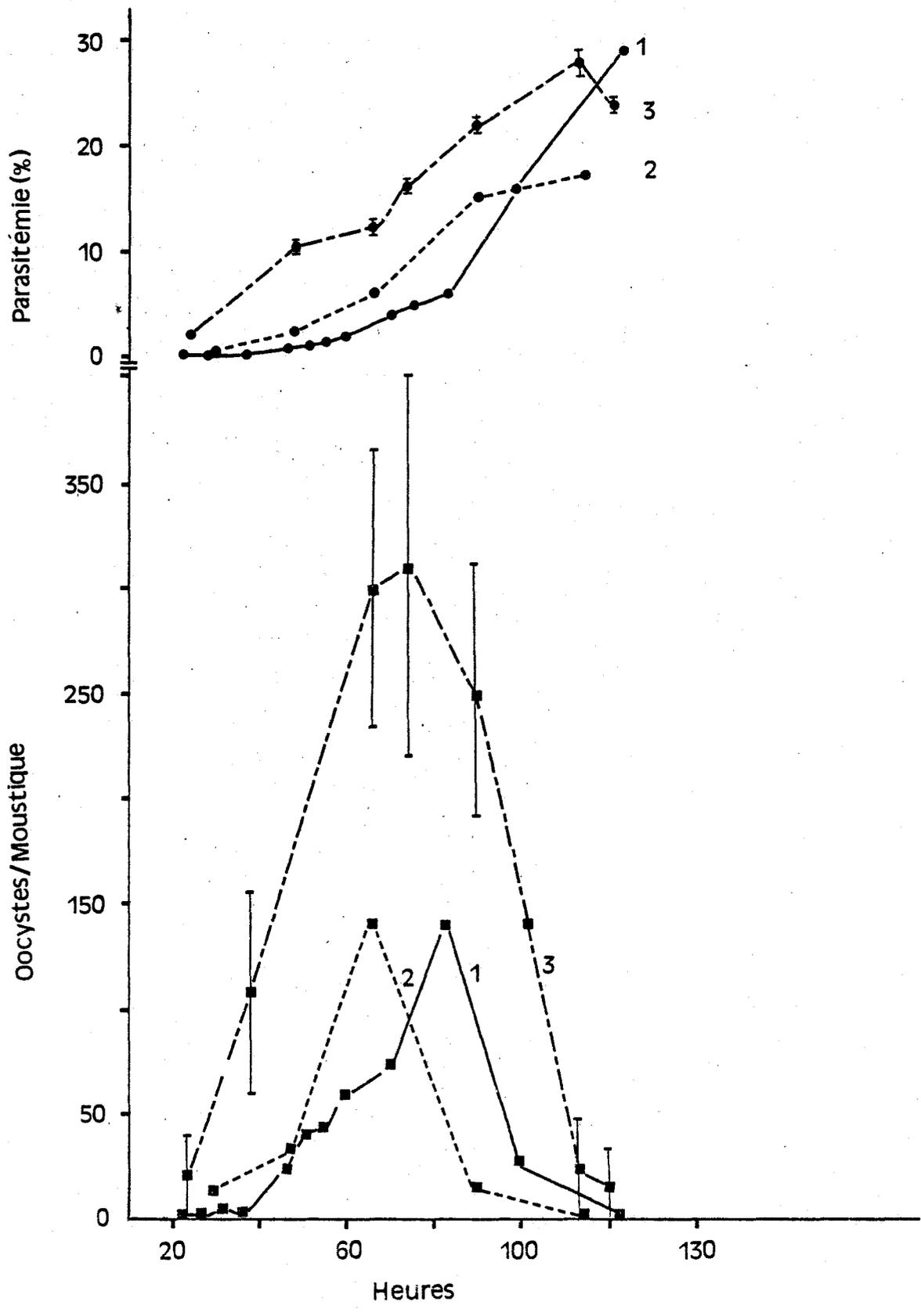
Toutes les souris sont mortes 7 à 10 jours environ après l'inoculation, sauf celles inoculées avec du sang congelé à  $-196^{\circ}\text{C}$ , qui ont survécu à l'infection.

##### 3.2.1.1. Variation de l'infectivité gamétocytaire en fonction du temps (Fig.d).

Comme nous l'avons signalé, des gamétocytes d'origine exo-érythrocytaire sont décelables accompagnés de formes asexuées sur les frottis sanguins, environ 40 à 48 heures après l'infection avec des sporozoïtes. Ces gamétocytes deviennent infestants pour l'Anopheles une trentaine d'heures plus tard, et évoluent vers une sporogonie normale. Cependant, nous avons observé ce résultat une seule fois.

Habituellement, des gamétocytes sont décelables dans le sang périphérique de la souris 4 à 5 jours après une infection par des sporozoïtes (par piqûre de moustique). La parasitémie est de 1 à 4 % environ au 6ème jour pour atteindre un maximum de 35 à 40 % au 10ème jour. Les gamétocytes deviennent infestants pour le moustique vers le 4ème jour après l'infection.

Fig. d : Variations de l'infectivité ( ■ ) des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis et de la parasitémie ( ● ) en fonction du temps. Inoculum (voie i.v.) :  $1,5 \times 10^6$  GRP (1, ■—■ , ●—● ) ;  $10^7$  GRP congelé (2, ■---■ , ●---● ) ;  $10^7$  GRP frais (3, ■--■ , ●--● ).



Après l'inoculation IV de  $1,5 \times 10^6$  GR parasités, la parasitémie (0,01 %) est décelable sur frottis 8 heures plus tard environ. Des gamétocytes jeunes, dans des proportions de 1 sur  $10^4$  hématies, sont observables sur les frottis (PO et PM) 31 à 32 heures après l'infection et ils sont infestants pour les moustiques. Le maximum d'infectivité gamétocytaire est enregistré 66 à 90 heures après l'inoculation des souris. A ce moment, la parasitémie varie entre 6 et 16 % environ. L'infectivité tombe de manière significative vers la 114<sup>ème</sup> heure et devient presque nulle 123 à 124 heures après l'infection (tableau C; expériences 1 et 3). Un inoculum issu de sang parasité congelé à  $-196^\circ\text{C}$  évolue de façon semblable : cependant, la chute de l'infectivité gamétocytaire est presque totale 115 à 116 heures après l'infection, malgré la présence de nombreux gamétocytes sur les frottis (expérience 2).

Puis, le nombre de gamétocytes continue à augmenter. Vers la 116<sup>ème</sup> heure après l'infection, la parasitémie varie entre 17 et 29 %. Dans des infections ultérieures avec la même souche transmise de manière répétée par voie mécanique, des inoculums semblables produisaient des parasitémies qui dépassaient 50 % au 5<sup>ème</sup> jour (Fig. j). La parasitémie et la gamétocytémie globales ne sont pas significativement différentes sur les frottis PO et PM.

Les souris meurent habituellement 8 à 10 jours après l'infection par voie mécanique.

L'évolution du taux de microgamétocytes et macrogamétocytes en fonction du temps est analysée dans les chapitres 3.2.1.3.1

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de variation significative de la gamétocytémie et de l'infectivité au cours de la journée.

La courbe d'infectivité cependant a montré quelques variations au cours des différentes expériences (Fig. d,e). Par exemple, le pic d'infectivité a été plus précoce (66 heures) au cours des expériences 2 et 3 (Tableau C) qu'au cours de l'expérience 1.

Fig.e : Variations de l'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis en fonction de la parasitémie. Expériences 1 (○—○) ; 2 (●--●) et 3 (■····■) qui correspondent aux expériences homonymes de la Fig. d.

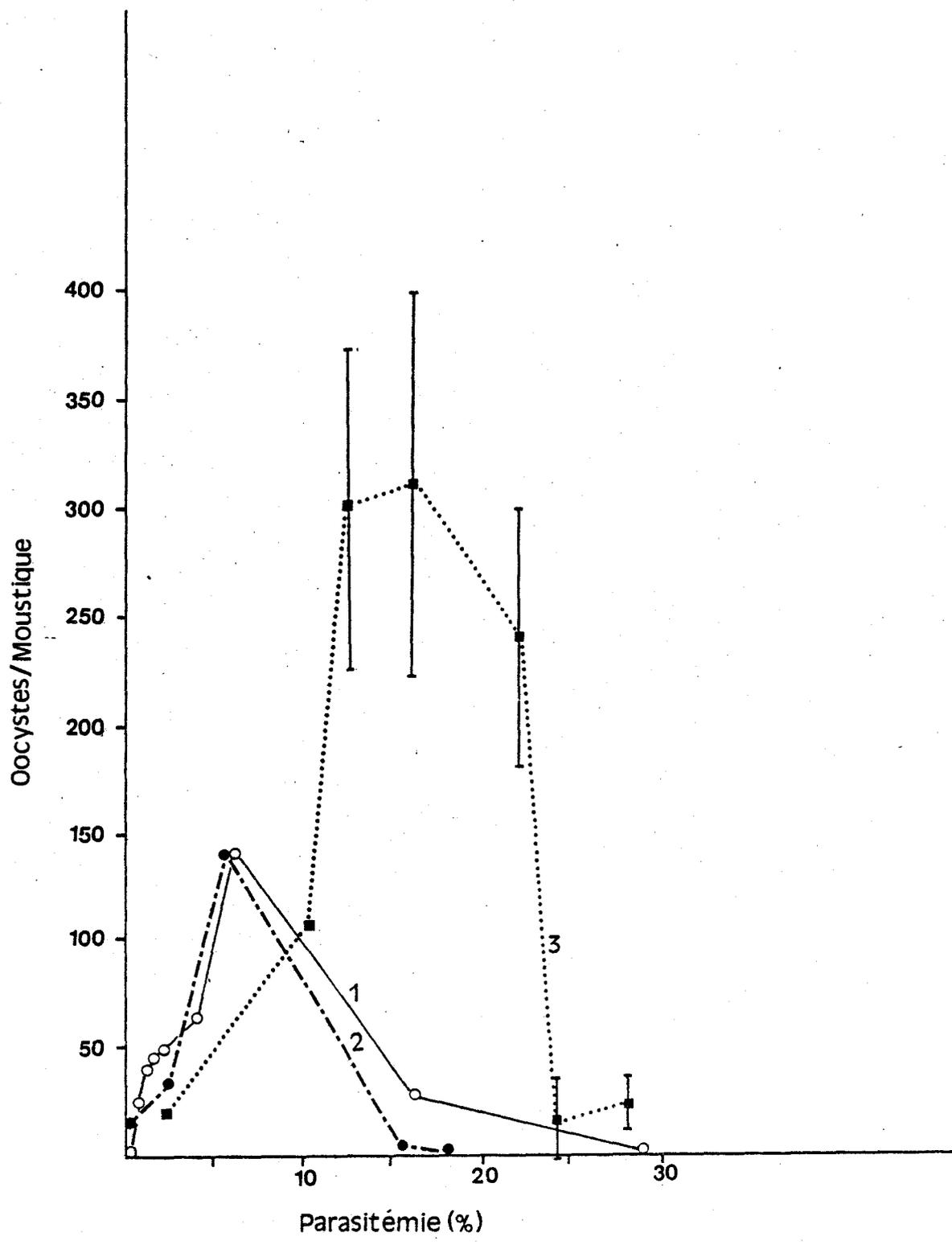


Fig. f : Variation du rapport (%) gamétocytes/formes asexuées en fonction de la parasitémie. P. yoelii nigeriensis, frottis PO. Inoculum :  $1,5 \times 10^6$  GRP ( ● ),  $10^7$  GRP congelé ( \* ) ;  $10^7$  frais ( ▲ ).

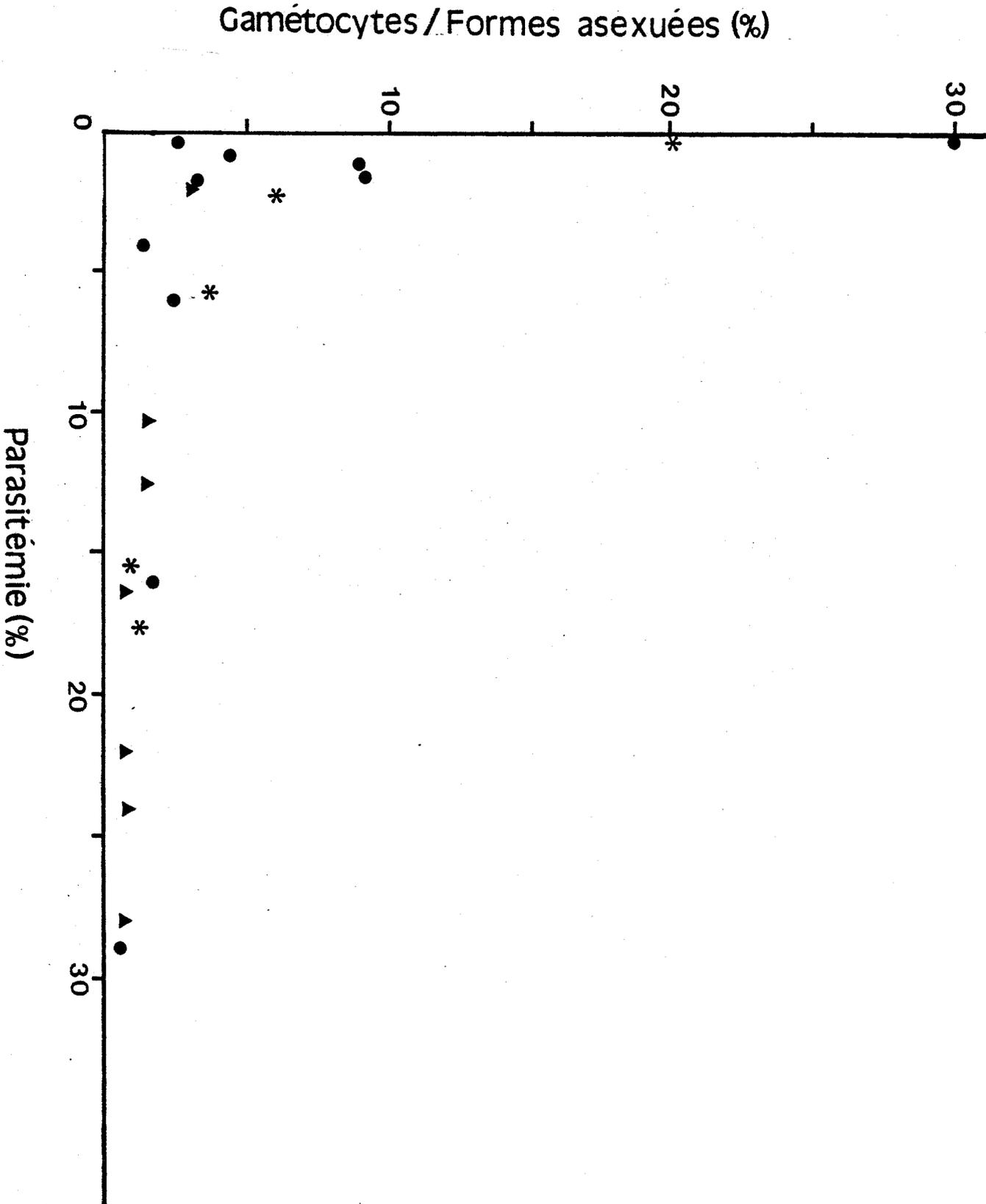
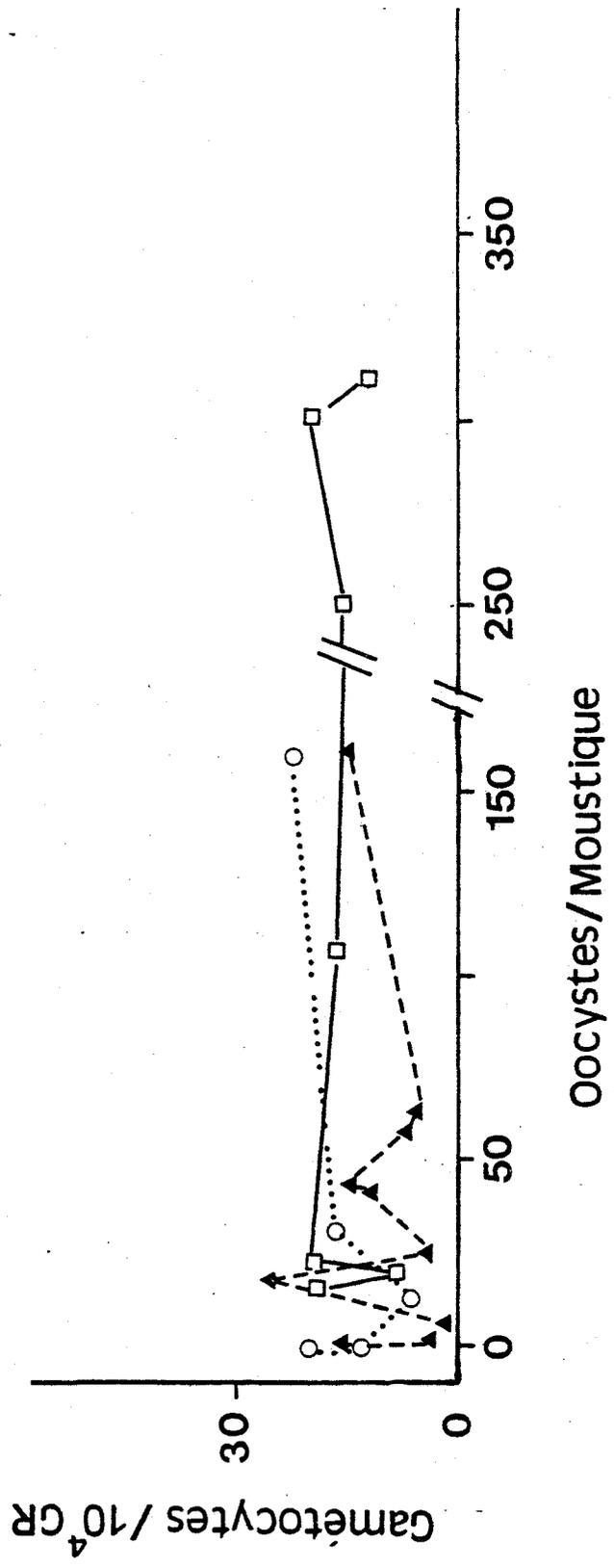


Fig. g : Gamétocytes (par  $10^4$  GRP) de *P. yoelii nigeriensis*  
en fonction de l'infectivité gamétocytaire.

Inoculum :  $1,5 \times 10^6$  GRP ( $\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$ ) ;  $10^7$  GRP congelé  
( $\circ$ .... $\circ$ ) ;  $10^7$  GRP frais ( $\square$ — $\square$ ).



### 3.2.1.2. Variation de l'infectivité gamétocytaire en fonction de la parasitémie

Ayant constaté des variations de l'infectivité gamétocytaire au cours de la maladie expérimentale, nous avons étudié ces variations en rapport avec la montée de la parasitémie.

Sur la figure e-, nous avons reporté les variations de l'infectivité en fonction de la parasitémie, observées au cours de 3 expériences.

En général, nous avons observé qu'à partir de 0,2 à 0,4 GRP par 100 hématies, l'infectivité augmente avec la parasitémie ; lorsque celle-ci atteint 6 à 20 % environ, l'infectivité culmine, puis elle diminue plus ou moins rapidement tandis que la parasitémie continue d'augmenter.

Si nous étudions l'évolution du rapport formes sexuées/asexuées en fonction de la parasitémie (Fig. f) nous pouvons observer que la proportion de formes sexuées décroît avec l'augmentation de la parasitémie (Fig. f).

Il apparaît donc qu'à faible parasitémie, la gamétocytogénèse est plus efficace car le rapport formes sexuées/asexuées est plus haut et les gamétocytes produits sont alors très infestants.

Plus tard, l'augmentation de la parasitémie globale s'accompagne d'une augmentation du nombre de gamétocytes (Fig. j), celle-ci ne correspondant pas à une plus grande infectivité pour le moustique (Fig. g).

### 3.2.1.3. Infectivité gamétocytaire en fonction de la gamétocytémie dans le sang circulant et dans le sang contenu dans l'intestin moyen du moustique. Observations sur la morphologie gamétocytaire

D'après LANDAU et al. (1979), les microgamétocytes sont répartis en quatre types morphologiques : 0, I, II et III. Ces types se succèdent, et tous les intermédiaires peuvent donc être observés. Le microgamétocyte

Tableau D : Variations (%) de la proportion relative de microgamétocytes de P. yoelii nigeriensis de type morphologique différent.

[ Les chiffres à droite et à gauche de la barre oblique correspondent respectivement à la moyenne des pourcentages de microgamétocytes de chaque type sur les frottis PO et PM ].

Heures après l'inoculation de GRP (i.v.)	Proportion relative (%) de microgamétocytes (♂)					Gamétocytes/10 <sup>4</sup> GR		
	Jeune	0	I	II	III	♂	♀	♀ ± ♂
24	37,5/25	25/37	37,5/37	0/0	0/0	4 ± 1,4/4 ± 1,4	2 ± 1,4/3 ± 1,4	6/7
48	19/5	33/35	14/50	19/10	14/0	10,5 ± 3,5/10 ± 1,4	7 ± 1,4/5,5 ± 0,7	17,5/15,5
66	13/0	35/28	30/50	9/22	0/0	11 ± 3,5/9 ± 4,2	10,5 ± 0,7/14 ± 1,4	21,5/23
74	3,2/3,8	29/38	48/34	13/19	6,5/4	15,5 ± 2,1/13 ± 2,8	6 ± 2,8/7 ± 1,4	21,5/20
90	5,5/0	16/7,6	27/23	36/42	14/27	18 ± 1,4/13 ± 0,7	9 ± 4,2/8,5 ± 3,5	27/21,5
114	0/0	12/3,6	15/17,8	36/39	36/39	16,5 ± 0,7/14 ± 1,4	8,5 ± 6,3/12 ± 5,6	25/26
121	0	0	15/-(1)	34/-	50/-	13 ± 1,4/-	9,5 ± 3,6/-	22,5/-

(1) Absence de prélèvement

qui est d'abord de grande taille (types 0 et I) se condense et diminue de volume (type II et type III). La taille des microgamétocytes de types 0 et I est située entre 9  $\mu\text{m}$  et 10,5  $\mu\text{m}$  (LANDAU et al., 1979). Le noyau du gamétocyte de type 0 est relativement petit puis il augmente de volume dans le type I.

Les gamétocytes jeunes ne remplissent pas l'hématie hôte. Leur cytoplasme est bleu pâle ; le noyau relativement petit est rose clair ; le pigment est fin. Ils se retrouvent dans des hématies matures.

Le type 0, qui succède au gamétocyte jeune, remplit le globe rouge. Le noyau, plus grand que chez le type jeune, est rose plus clair. Le cytoplasme est net, le pigment est fin.

Le noyau est très volumineux pour le type I ; il est granuleux ; sa teinte rose est à peu près la même que celle du cytoplasme.

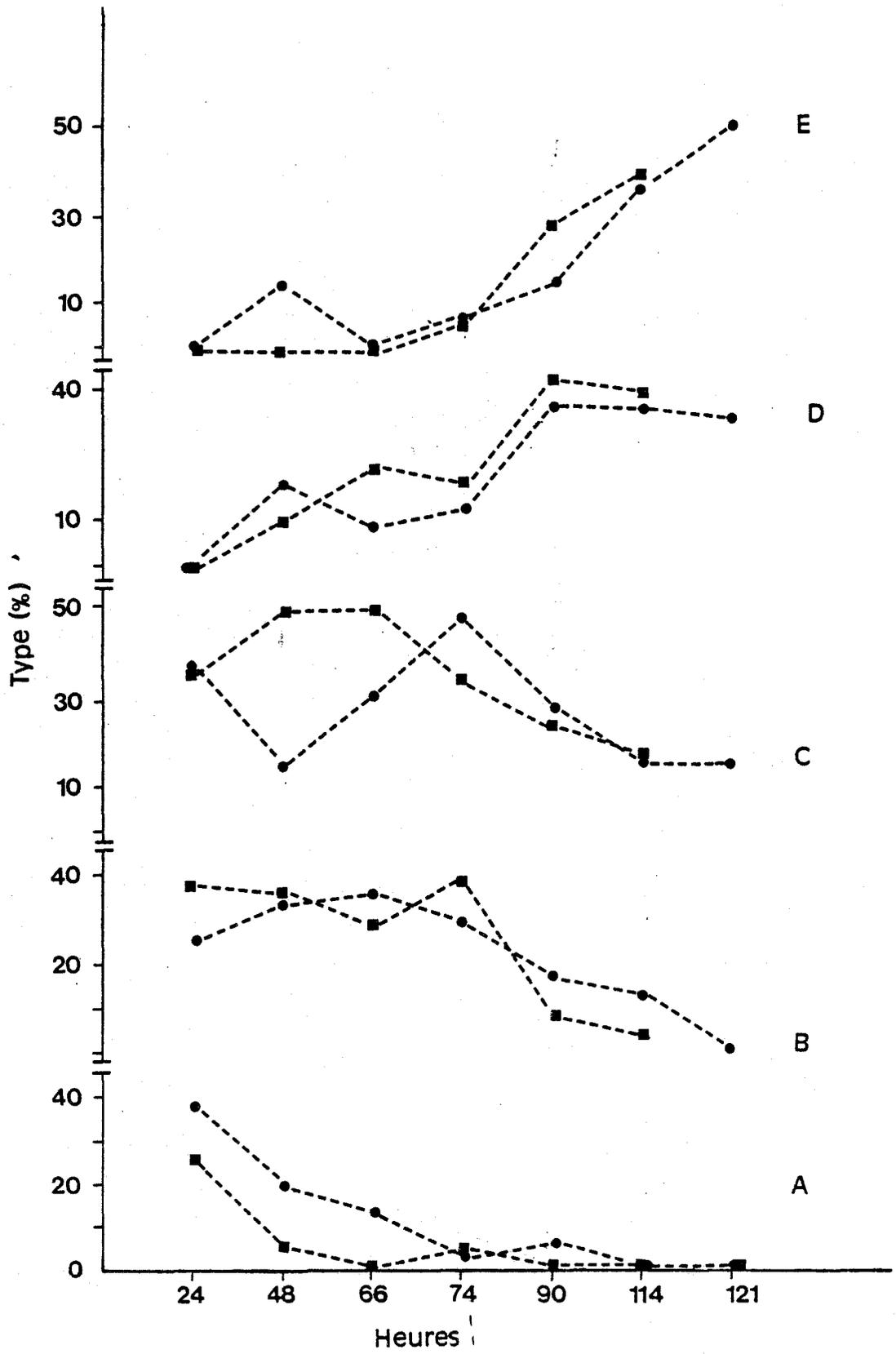
Le noyau remplit la moitié du volume du gamétocyte de type II ; il est très bien limité, homogène d'aspect colloïdal. Le noyau est plus colorable que le cytoplasme, qui est gris clair, bleuté ou rose. Le pigment abondant est limité au cytoplasme.

Le type III est plus petit, plus dense et plus chromophile. Le noyau, plus condensé, est de teinte plus foncée ; il n'occupe plus que le tiers du parasite et peut être morcelé en deux ou trois masses irrégulières.

#### 3.2.1.3.1. Types morphologiques gamétocytaires et leur évolution au cours de l'infection

Les variations subies par la proportion relative de types morphologiques gamétocytaires sont exposées dans le tableau D . . Les gamétocytes se distinguent en microscopie photonique, des formes asexuées, par leur tendance à remplir l'hématie hôte par leur forme sphérique et par la présence d'un grand noyau. De plus, l'observation de centaines de frottis nous a permis de remarquer que les gamétocytes,

Fig. h : Pourcentage relatif de types morphologiques des microgamétocytes de P. yoelii nigeriensis dans des frottis PO (●---●) et PM (■---■) en fonction du temps après l'inoculation i.v. de GRP. Type jeune (A) ; type 0 (B) ; type I (C) ; type II (D) et type III (E) (voir texte).



38

même très jeunes, présentent un cytoplasme plus homogène que celui des formes asexuées. Le macro et le microgamétocyte peuvent être distingués par la taille relative du noyau, grand chez le microgamétocyte, plus petit, arrondi ou en croissant chez le macrogamétocyte et surtout par la couleur du cytoplasme sur les frottis colorés aux techniques panoptiques type Romanowsky : rose chez le microgamétocyte mature, bleu pâle chez le microgamétocyte jeune ou très âgé, bleu plus foncé chez le macrogamétocyte.

Nous avons suivi l'évolution des types 0 à III (selon LANDAU et al., 1979) de microgamétocytes au cours de l'infestation sur frottis P0 et PM.

De 24 à 74 heures après l'infestation, la proportion de microgamétocytes de type jeune, 0 et I, est la plus élevée dans les frottis P0 et PM. De 90 à 121 heures après l'infestation, la représentation des types 0 et I se fait moins forte. Les types II et III augmentent considérablement vers la fin de l'infestation (tableau D ; Fig. h ). Le pourcentage relatif de types 0 et I se situe entre 28 et 50 % de 66 à 74 heures après l'infestation. Les types II et III varient de 36 à 50 % vers la fin de l'infestation.

Nous avons observé en général de faibles variations dans la proportion de microgamétocytes présents dans les frottis P0 par rapport aux frottis PM faits simultanément. 24 heures après l'inoculation, il apparaît que la proportion de microgamétocytes jeunes par rapport au total des microgamétocytes atteint son maximum tant dans les frottis P0 que PM. De 24 à 74 heures après l'infestation, la proportion de microgamétocytes de type 0 est légèrement plus élevée dans les frottis PM que dans les frottis P0. Nous avons observé également qu'à 48 heures ainsi qu'à 66 heures, le pourcentage relatif de microgamétocytes de type I est plus élevé dans les frottis PM que dans les P0 (Fig. h ).

90 heures après l'infestation, la proportion de microgamétocytes de type II apparemment altérés (forme amiboïde, souvent avec une forte constriction moyenne ou en sablier) dans les frottis P0 et PM est supérieure à celle des types II d'aspect habituel.

Le microgamétocyte de type III est peu observable à 48 heures d'infestation. A la 66ème heure, nous n'avons pas observé de microgamétocytes de ce type dans les frottis P0 et PM. A 74 heures, le pourcentage relatif de microgamétocytes de type III est respectivement de 6,5 % et de 4 % dans les frottis P0 et PM. A la 114ème heure, ce type atteint 36 % sur les P0 et 39 % sur les PM.

Les différents types morphologiques de microgamétocytes sont représentés sur les figures 32 à 35.

Le nombre de macrogamétocytes par  $10^4$  GR est peu différent dans les frottis P0 et PM. C'est 66 heures après l'infestation que l'on compte le maximum de macrogamétocytes :  $10,5 \pm 0,7/10^4$  GR sur les frottis P0 et  $14 \pm 1,4/10^4$  GR sur les frottis PM.

Nous n'avons pas compté les différents types de macromégatocytes sur les frottis bien qu'il existe des variations morphologiques nettes des macrogamétocytes (LANDAU et al., 1979 ; DEI-CAS et al., 1980). Nous avons simplement essayé de classer les morphologies de macrogamétocytes.

Le noyau de macrogamétocytes de type jeune, présente une chromatine condensée formée par des particules, fines accumulées en périphérie. Le pigment est dispersé dans le cytoplasme du parasite et ne remplit pas l'hématie entière.

Dans le type 0, le noyau est granuleux, et plus volumineux que dans le type précédent. Il a une teinte rouge violacé soutenue le présente quelques petites masses chromatiniennes plus foncées. Le cytoplasme du parasite bleu pâle a un aspect plus homogène. Le pigment est dispersé dans le cytoplasm (Fig.36).

Fig. 1 : Distribution des diamètres maximums des hématies parasitées par des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis 3 jours (A) et 5 jours (B) après l'inoculation des GRP. Mesures effectuées sur des frottis P0 (trait continu) et PM (trait discontinu).

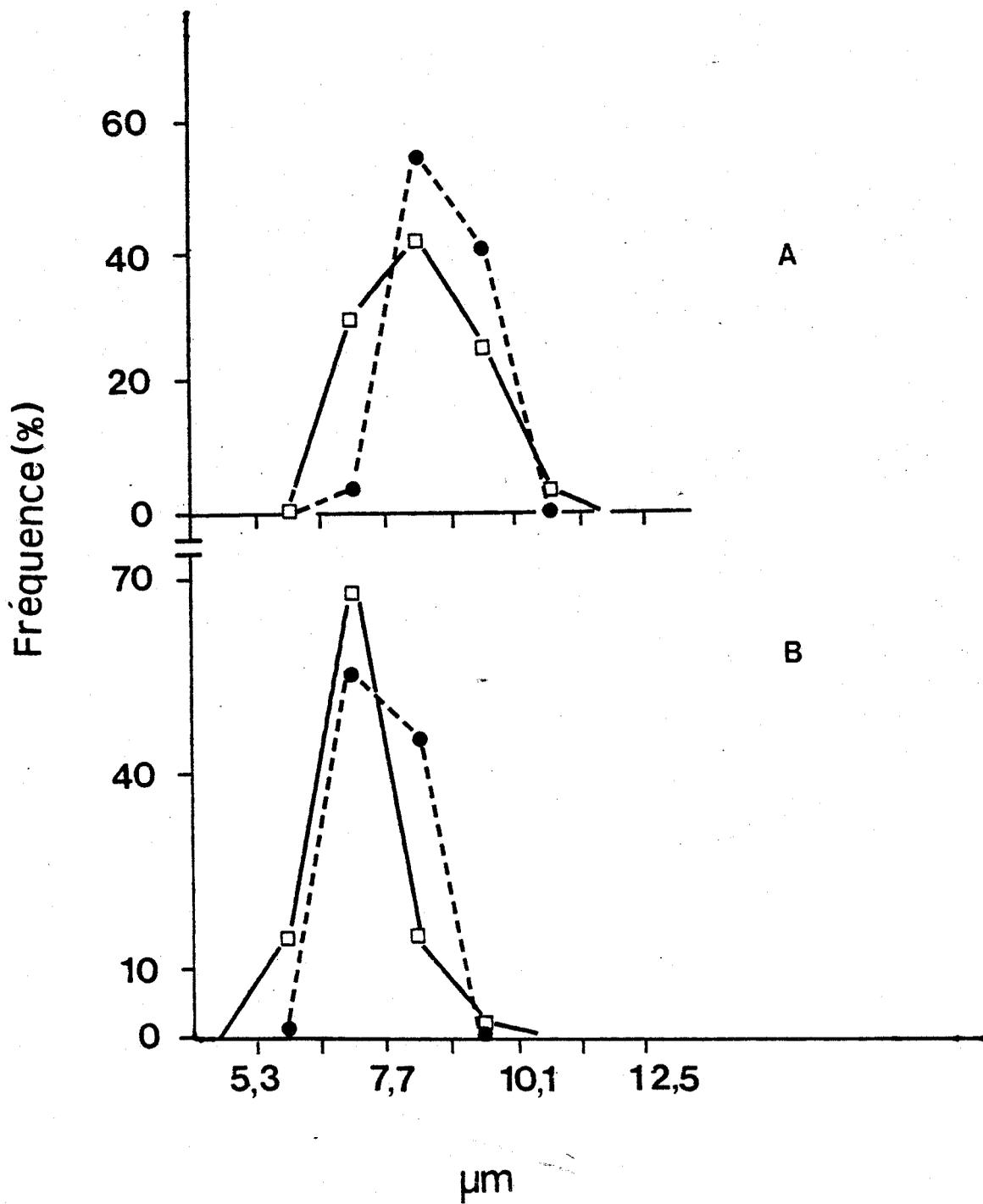
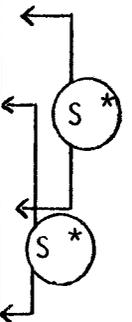


Tableau E: Diamètre ( $\mu\text{m}$ ) des hématies parasitées (GRP) par les gamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis (infection transfusionnelle) en fonction du type de prélèvement et de l'évolution de l'infection.

Nombre de jours après l'infection	Modalité du prélèvement	GRP par des microgamétocytes	GRP par des macrogamétocytes	GRP par des gamétocytes ( $\sigma^7 + \text{q}$ )
3	PO	$8,1 \pm 1$	$8,1 \pm 1$	$8,1 \pm 1$
	PM	$8,6 \pm 0,7$	$8,8 \pm 0,7$	$8,7 \pm 0,7$
5	PO	$6,8 \pm 0,9$	$6,9 \pm 0,7$	$6,9 \pm 0,8$
	PM	$7,5 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,6$



\* S = différence statistiquement significative ( $P < 0,01 \%$ )

Dans le type I, le noyau est homogène. Il a une teinte rose violacé. Le cytoplasme du parasite est plus foncé et plus pigmenté que celui du type précédent. Il occupe entièrement l'hématie (Fig. 37).

Le noyau est rose dans le type II, il se dispose en général sur la périphérie et présente un aspect homogène. Les particules de pigment sont plus grosses et abondantes (Fig. 38).

Le type III est morphologiquement plus proche du précédent avec un noyau petit, plus condensé et de teinte plus foncée. Le cytoplasme devient d'un bleu violet plus foncé. Il est plus homogène et présente de grosses masses de pigment. (Fig. 39).

Nous avons mesuré le diamètre des hématies parasitées par gamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis dans les frottis P0 et

PM aux 3ème et 5ème jours après l'infestation (tableau E; Fig. i).

La taille moyenne d'un gamétocyte: ( $8,1 \pm 1 \mu\text{m}$ ) au 3ème jour diffère de celle au 5ème jour ( $6,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ). Nous avons observé également une faible variation de taille des gamétocytes entre les frottis P0 et PM du 3ème jour et les frottis P0 et PM du 5ème jour après l'infestation.

### 3.2.1.3.2. Ultrastructure des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis

Les gamétocytes sont présents dans les normocytes, aussi bien que dans les réticulocytes. Parfois, des enroulements membranaires sont observés dans le cytoplasme de la cellule hôte (Fig. 20).

Les gamétocytes sont toujours situés dans une vacuole parasitophore limitée par une membrane (unitaire) qui constitue la membrane la plus externe dérivant de celle de l'hématie (Fig. 1 et 26). Elle correspond à ce que certains auteurs (AIKAWA et al., 1970; AIKAWA, 1972; BRADBURY et ROBERTS, 1970) appellent "outer membran".

Le plasmalemme (membrane cytoplasmique) du gamétocyte est continu dans tous les cas. La seule différenciation est constituée par le cytostome (Fig. 10) observé dans le micro et le macrogamétocyte. Cette formation résulte de l'invagination de la membrane du gamétocyte et présente un anneau dense de 112 nm de diamètre environ dans la zone de début de l'invagination.

Chez le microgamétocyte, le plasmalemme est doublé intérieurement par un complexe sous-membranaire discontinu formé de vésicules aplaties dont la longueur varie de 90 nm à 400 nm (Fig. 2).

Nous avons fréquemment observé des accumulations de membranes sous forme de vésicules, d'empilements membranaires, semblant se situer dans ce qui subsiste de la vacuole parasitophore. Ces images de stockage membranaire sont souvent rattachées à la membrane cytoplasmique donnant lieu chez les microgamétocytes à des vacuoles paranucléaires (Fig. 4) mais s'observent également dans les macrogamétocytes (Fig. 5). Nous avons observé ce type de vacuole paranucléaire seulement chez le microgamétocyte.

Les microgamétocytes fixés lorsque les changements précédant la gamétogénèse (activation) étaient déclenchés 7 à 8 minutes après le prélèvement (Fig. 25) montrent des microtubules sous-pelliculaires. Ceux-ci sont absents chez les formes non encore activées.

Pour distinguer en ultrastructure les macro et les microgamétocytes, nous avons employé les critères proposés par plusieurs auteurs (AIKAWA et al., 1969 et 1970 ; STERLING et AIKAWA, 1973 ; SINDEN et al., 1976). Ces critères sont les suivants :

Macrogamétocyte ( ♀ )Microgamétocyte ( ♂ )

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Monoribosomes très abondants, peu de polyribosomes</li> <li>- Le réticulum endoplasmique (RE) : très développé</li> <li>- Mitochondries : abondantes et très ramifiées</li> <li>- Noyau : relativement petit et arrondi</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Monoribosomes peu abondants ou absents, beaucoup de polyribosomes.</li> <li>- RE : moins développé</li> <li>- Mitochondries : moins abondantes</li> <li>- Noyau : grand et fréquemment lobé</li> </ul> |
|---|---|

La photo (Fig. 3) montre un microgamétocyte avec très peu de pigment malarique qui correspond vraisemblablement à une forme jeune. Cette cellule (Fig. 3) est plutôt riche en polyribosomes par rapport aux microgamétocytes plus évolués (Fig. 4).

Chez les macrogamétocytes, les ribosomes libres sont plus nombreux que les polyribosomes.

Le réticulum endoplasmique est nettement plus abondant chez le macro que chez le microgamétocyte (Fig. 1). Chez le premier, les vésicules sont bien développées, dilatées, à contenu finement granuleux. Elles forment un réseau anastomosé dans le centre du cytoplasme.

Des ribosomes sont attachés sur la face externe de certaines vésicules (Fig. 7).

En outre, de longues lames d'ergastoplasme empilées (REG) sont parfois juxtaposées au noyau du macrogamétocyte (Fig. 8). Chez les microgamétocytes, le réticulum endoplasmique est rare. Les vésicules moins dilatées à contenu clair sont plutôt disposées au centre de la cellule.

Dans le cytoplasme, nous avons observé quelques vésicules dont l'aspect évoque celui des vésicules golgiennes, mesurant  $4,9 \pm 0,04$  nm de diamètre et qui sont rattachées au réticulum endoplasmique agranulaire (Fig. 9).

Les corps osmiophiles sont nombreux, de formes diverses : allongés, ovoïdes ou sphériques selon l'incidence de la coupe et répartis de façon variable. Ils paraissent plus abondants dans certains gamétocytes peut-être plus évolués (Fig. 4 et 5). Cependant, dans tous les cas, ces structures sont plus nombreuses chez le macro que chez le microgamétocyte. Les corps osmiophiles mesurent entre 30 nm et 64 nm de largeur et de 100 à 192 nm en longueur. Leur contenu est dense et ils sont entourés par une membrane plus ou moins nette. Les corps osmiophiles tant dans le macro que dans le microgamétocyte sont soit régulièrement répartis dans le cytoplasme, soit distribués surtout en périphérie. Ils sont parfois groupés en amas (Fig. 18, 19). Bien que ces dispositions aient été observées dans des échantillons assez nombreux, ces constatations peuvent cependant être influencées par l'incidence de la coupe.

Les mitochondries sont de formes diverses, allongées, ovoïdes, ramifiées ou en haltères (Fig. 1 et 3). Leur localisation est variable, occupant souvent le cytoplasme sous-pelliculaire et périnucléaire (Fig. 5). Elles sont parfois rassemblées en groupes et constituées de 2 membranes entourant une matrice plus ou moins dense. Nous n'avons jamais observé de crêtes. Certaines mitochondries sous-pelliculaires peuvent atteindre 3  $\mu$ m de long (Fig. 12) mais, en général, elles atteignent  $0,8 \pm 0,2$   $\mu$ m environ de longueur. Nous avons parfois observé des mitochondries très dilatées, vacuolisées dans une extrémité (Fig. 11 et 22).

Le pigment malarique est constitué de cristaux de taille très variable (de 100 à 400 nm de longueur), de forme grossièrement rectangulaire, répartis dans le cytoplasme. Sur quelques coupes, les

grains de pigment sont distribués en périphérie. Ils peuvent être plus ou moins denses aux électrons. Quelquefois, ils sont entourés d'une membrane unitaire dont ils sont séparés par un espace clair (Fig. 19). Nous n'avons pas observé de pigment dans le cytoplasme érythrocytaire. La quantité de pigment est variable (Fig. 5 et 22).

Des vacuoles transparentes aux électrons, disposées dans la périphérie du cytoplasme, sont observables chez les macrogamétocytes (Fig. 18). Ces vacuoles sont parfois entourées par des corps osmiophiles et des mitochondries.

Des vacuoles pouvant correspondre à la vacuole nutritive ou à la portion proximale du tube cytostomal (SLOMIANNY, 1982) ont été observées autant chez les macro que chez les microgamétocytes (Fig. 11, 16 et 22). Par contre, nous n'avons pas observé de vésicules de micropinocytose, ni de vésicules lysosomiales.

Le noyau, limité par une double membrane, est plus grand chez le microgamétocyte que chez le macrogamétocyte, et fréquemment lobé chez le premier. Des pores nucléaires à deux variétés sont présents aussi bien chez les macro que chez les microgamétocytes (Fig. 14 et 16). Les pores simples mesurent 60 nm, les pores complexes mesurent 80 nm.

Le nucléoplasme est finement granulaire et présente des granules denses, irrégulièrement dispersés (Fig. 4, 8 et 17).

Le diamètre nucléaire mesuré sur les plus grandes superficies de coupe ont  $2,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$  chez le macro et  $3,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$  chez le microgamétocyte.

Nous n'avons pas observé d'images nucléolaires. Il n'apparaît pas non plus de structure mitotique sur les noyaux étudiés.

Fig. j : Variations du taux d'exflagellation ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ) de la parasitémie ( $\circ$ ..... $\circ$ ), de la gamétocytémie ( $\ast$ — $\ast$ ), du rapport ( $\bullet$ — $\bullet$ ) micro ( $\delta$ )/macro ( $\rho$ ) gamétocytes, et du nombre de macrogamétocytes ( $\triangle$ — $\triangle$ ) et de microgamétocytes ( $\blacktriangle$ ..... $\blacktriangle$ ) en fonction du temps.

P. yoelii nigeriensis : inoculum  $2 \times 10^6$  GRP.

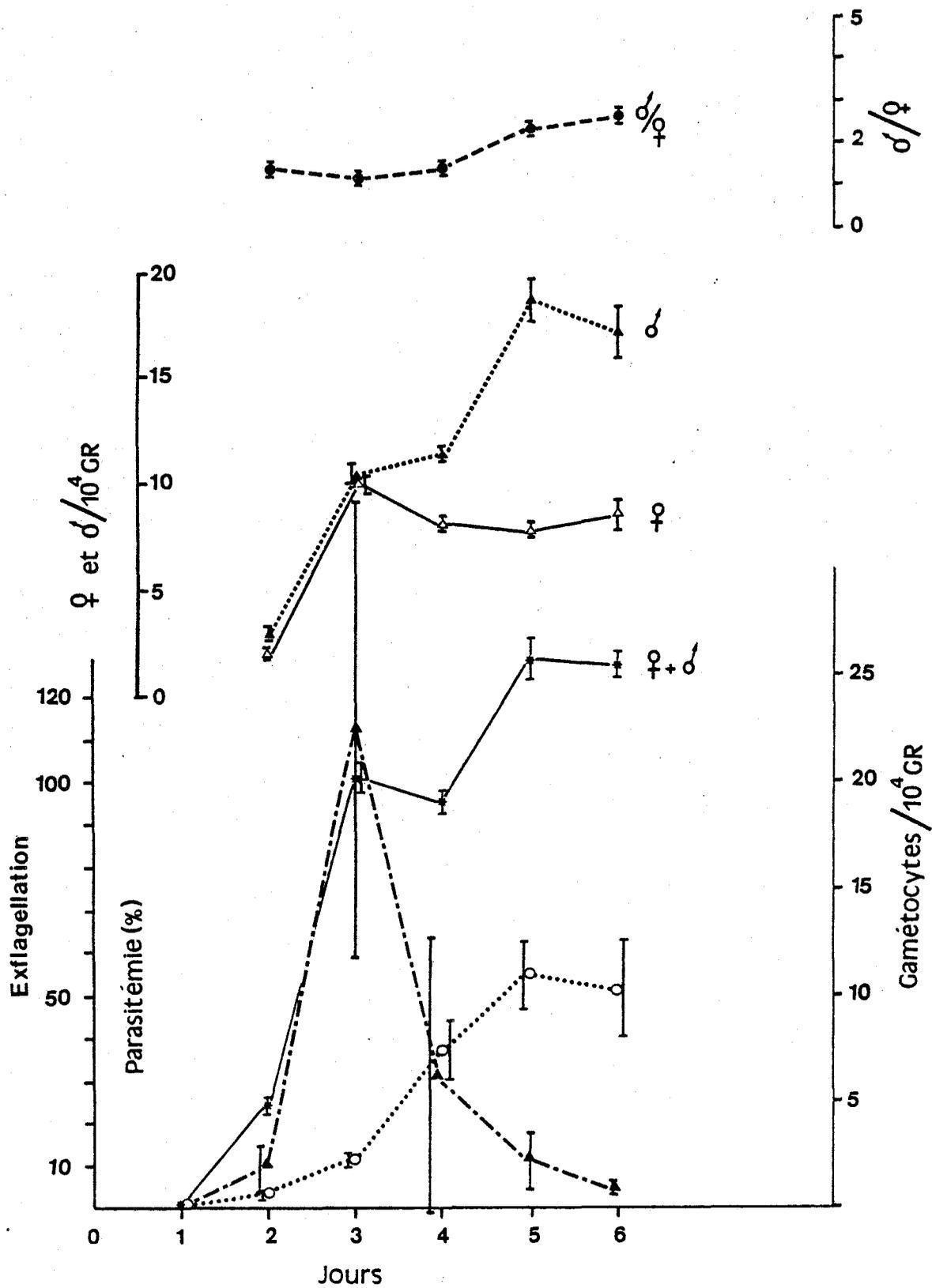


Tableau F : Evolution du taux d'exflagellation, de la gamétocytemie et la parasitémie de P.yoelii nigeriensis chez la souris Swiss (Inoculum :  $2 \times 10^6$  GRP (Voie i.v.).

Nombre de jours après inoculation	Taux d'exflagellation	Nombre de micro et macrogamétocytes sur $10^6$ GR			Rapport $\frac{\sigma}{\varphi}$	Parasitémie %
		Microgamétocytes ( $\sigma$ )	Macrogamétocytes ( $\varphi$ )	$\varphi + \sigma$		
J1			-	-	-	0,2±1
J2	9,6±5	2,8±1,6	2±1	4,8±2,4	1,4±0,6	3,7±0,4
J3	112,2±53,6	10,2±2,6	10±2,6	20,2±4,2	1,2±0,5	11±1
J4	31±32,8	11,3±1,3	8±1,4	19,3±2,5	1,4±0,2	36,9±7,5
J5	11±6,9	18±5,4	7,8±1	25,8±5,6	2,3±0,8	55,6±8,5
J6	4,3±1	17±6	8,5±3,1	25, ±3,7	2,6±2,3	51,5±11,9

#### 3.2.1.4. Variations du taux d'exflagellation.

Nous avons montré dans la fig. j l'évolution du taux d'exflagellation chez Plasmodium yoelii nigeriensis en fonction du temps.

Nous avons voulu savoir dans quelle mesure les variations de l'infectivité gamétocytaire constatées étaient associées à des changements du taux d'exflagellation.

Pour faire cette expérience, nous avons inoculé quatre souris avec  $2 \times 10^6$  GRP (par souris). Puis, quotidiennement et à la même heure, nous avons déterminé le taux d'exflagellation, la gamétocytémie et la parasitémie. Les résultats apparaissent sur le tableau F et sur les figures j et k

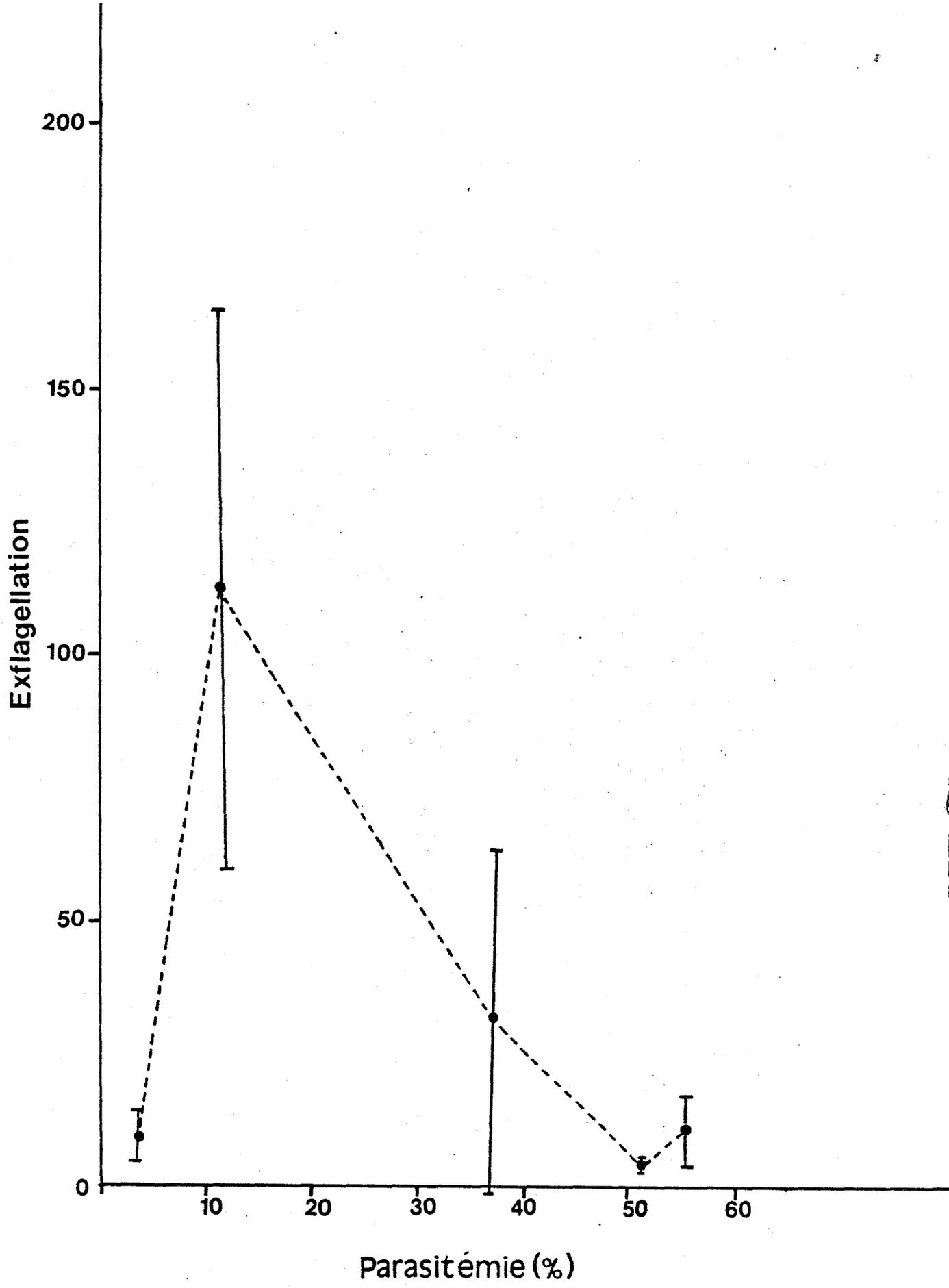
Les souris sont mortes 8 à 9 jours après l'inoculation.

Les premiers parasites sont observés le lendemain de l'inoculation. Les premiers gamétocytes et des exflagellations sont décelables pour la première fois, le 2ème jour. Sur le frottis P0, la gamétocytémie maximale ( $25,8 \pm 5,6/10^4$  GR) a été enregistrée le 5ème jour alors que le taux d'exflagellation ( $11 \pm 6,9$ ) était très bas par rapport à celui observé au 3ème jour, quand le taux d'exflagellation atteint son maximum ( $11,2 \pm 53,6$ ). Au-delà, malgré l'augmentation continue de la parasitémie et de la gamétocytémie, nous assistons à une décroissance importante du taux d'exflagellation.

De plus, nous avons remarqué que les premiers microgamétocytes exflagellants sont observables 6 à 8 mn après le prélèvement au début (jour 1) et à la fin (jours 5 et 6) de l'infection. Par contre, les exflagellations observées le jour 3 de l'infection se produisent déjà 3 à 4 minutes après le prélèvement. A cela, il faut ajouter qu'après avoir exflagellé, les microgamètes demeurent mobiles entre lame et lamelle pendant un temps plus court (8 à 12 mn) le jour 3, qu'en début et en fin d'infection (15 à 18 mn).

Fig.k : Variation du taux d'exflagellation en fonction de la parasitémie. P. yoelii nigeriensis.

Inoculum :  $2 \times 10^6$  GRP.



Sur la fig. k ), nous présentons les taux d'exflagellation en fonction de la parasitémie. Les premières exflagellations ont été décelées lorsque la parasitémie était de  $3,7 \pm 0,4$  %. Le taux maximum d'exflagellation ( $112 \pm 53,6$ ) est observé pour une parasitémie relativement faible ( $11 \pm 1$  %). Puis, la parasitémie continue à augmenter en atteignant  $55,6 \pm 8,5$  % le 5ème jour, tandis que le taux d'exflagellation diminue remarquablement : ce taux est alors de  $11 \pm 6,9$ . Macro et microgamétocytes ont été observés en quantités égales les 2ème et 3ème jours. Puis, à partir du 4ème jour, les microgamétocytes deviennent plus nombreux ( $17 \pm 6$  à  $18 \pm 5,4/10^6$  GR) que les macrogamétocytes ( $7,8 \pm 1$  à  $8,5 \pm 3,1$ ) dans les frottis PO (tableau F).

#### 3.2.1.5. Variations de l'infectivité gamétocytaire et de l'exflagellation en fonction de l'importance de l'inoculum

Lors d'infections induites par des inoculums compris entre  $27 \times 10^3$  GRP et  $41 \times 10^6$  GRP, le nombre maximum de gamétocytes infestants pour les moustiques enregistré (dans les frottis PO) au jour 3 varie de  $10,5 \pm 0,7$  à  $27 \pm 1,4$  pour  $10^4$  GR. Cependant le nombre maximum de gamétocytes a été compté sur les frottis PO au 5ème jour :  $20,5 \pm 2$  à  $52,5 \pm 3,5/10^4$  GR (tableau G).

Au jour 2, l'infectivité est plus importante pour les inoculums forts ( $19 \times 10^6$  GRP et  $41 \times 10^6$  GRP) que pour les autres. Quelle que soit l'importance de l'inoculum, nous n'avons pas observé d'exflagellation le lendemain de l'inoculation (jour 1) ; cependant, quelques Anopheles se sont alors infectés faiblement (10 à 20 oocystes/moustique). L'exflagellation apparaît, sauf chez les souris inoculées avec  $27 \times 10^3$  GRP, au jour 2 et elle atteint son maximum (66 à 100 pour 25 champs) chez les quatre lots infectés avec un inoculum différent au jour 3, où l'infectivité gamétocytaire est également maximale.

Fig.1 : Evolutions de l'infectivité gamétocytaire (●--●),  
de la parasitémie (○—○) et du taux d'exflagellation  
(●—●) en fonction de l'importance de l'inoculum de  
P. yoelii nigeriensis chez la souris Swiss.

Inoculum :  $27 \times 10^3$  GRP (A) ;  $2 \times 10^6$  GRP (B) ;  
 $19 \times 10^6$  GRP (C) ;  $41 \times 10^6$  GRP (D). GRP = globules  
rouges parasités.

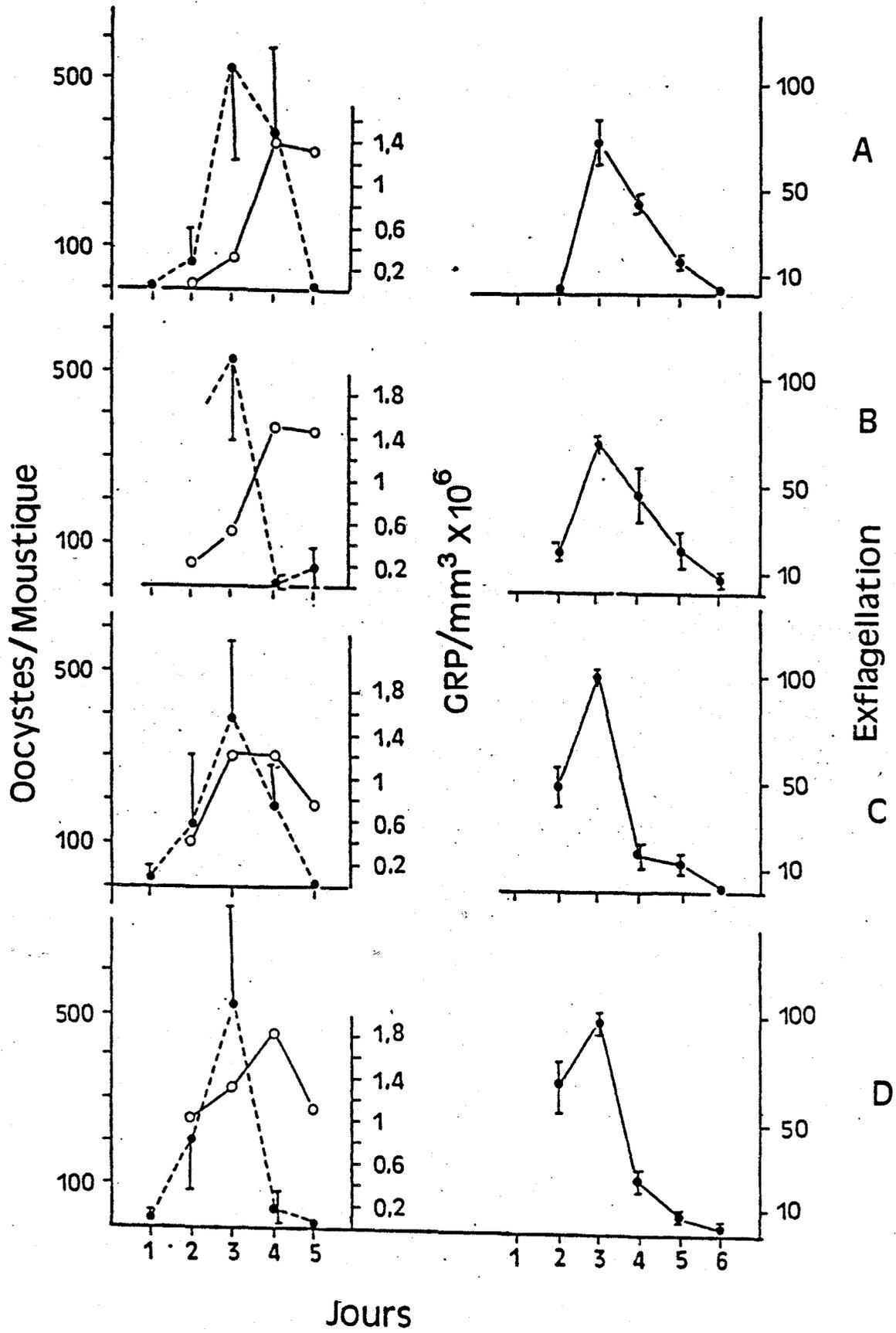


Fig. n : Evolution, en fonction de l'inoculum, de l'anémie  
induite lors d'une infestation par P. yoelii nigeriensis.

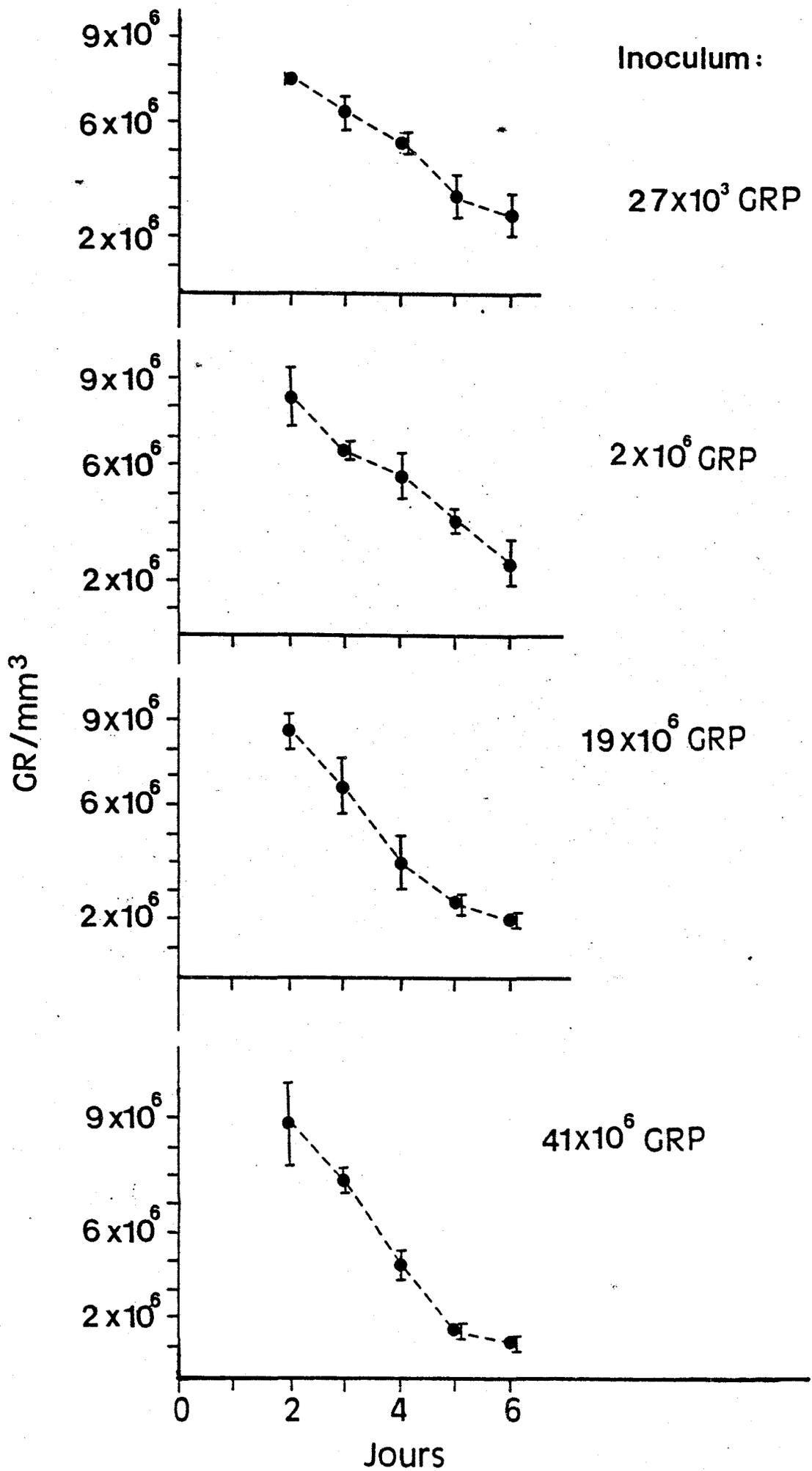
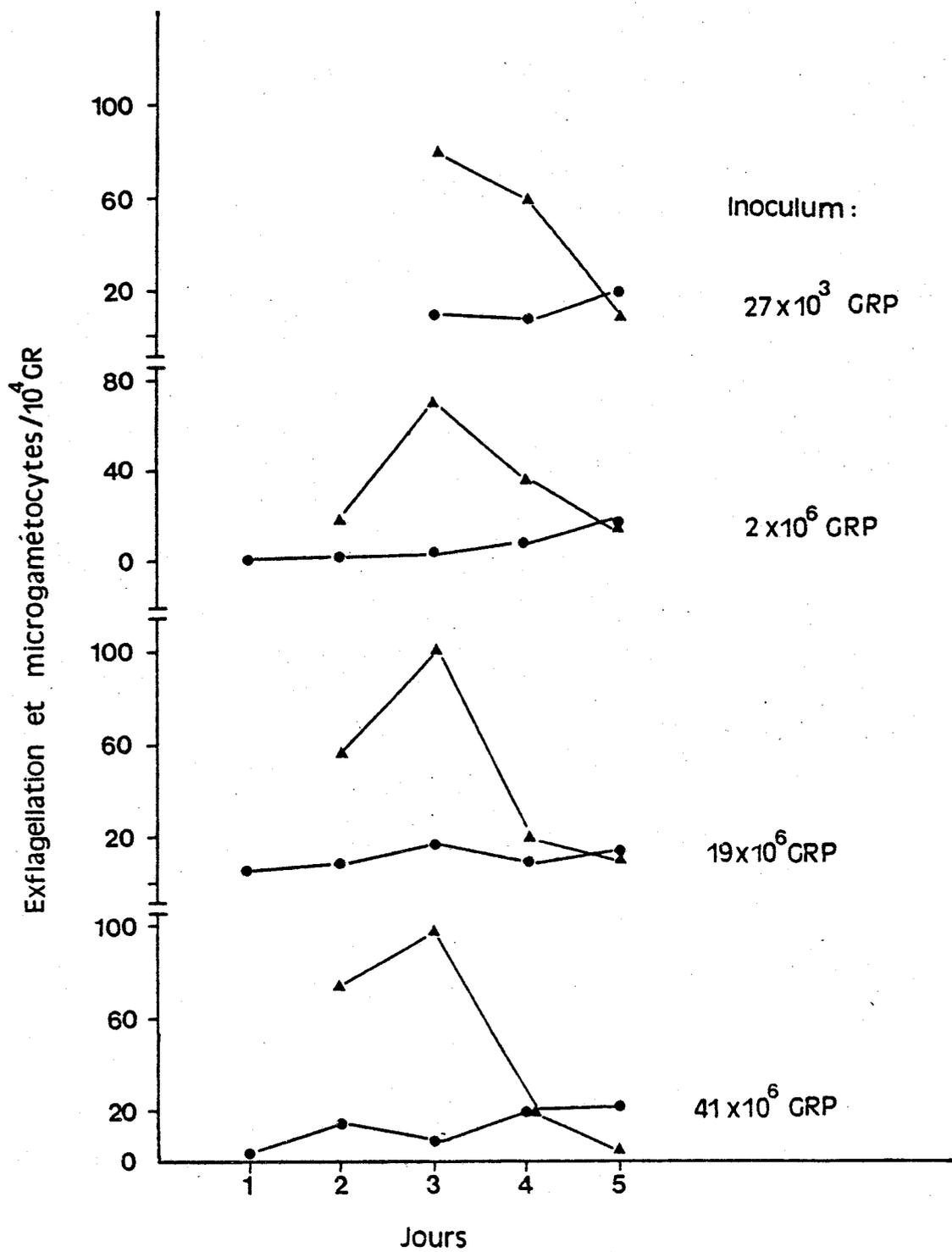


Fig. m : Evolution du taux d'exflagellation (▲—▲) et du nombre de microgamétocytes (●—●) (par  $10^4$  GRP) en fonction de l'importance de l'inoculum. Chaque courbe correspond aux chiffres d'une seule souris inoculée par voie i.v.



**Tableau 6 : Gamétoctémie, parasitémie et taux d'exflagellation chez *P. yoelii nigeriensis* en fonction de l'importance de l'inoculum (GRP par voie i.v.)**

Inoculum :		27 x 10 <sup>3</sup> GRP			2 x 10 <sup>6</sup> GRP			19 x 10 <sup>6</sup> GRP			41 x 10 <sup>6</sup> GRP		
Jours après l'infection	G	P	E	G	P	E	G	P	E	G	P	E	
1	0 ± 0	-	-	2,5 ± 0,7	-	-	3 ± 1,4	-	-	4 ± 0	-	-	
2	0,5 ± 0,7	0,05 ± 0,02	-	1 ± 1,4	0,1 ± 0,03	19 ± 1,4	16,5 ± 7,8	0,4 ± 0,07	48 ± 10	24,5 ± 7,8	0,9 ± 0,1	67 ± 10,6	
3	25 ± 0	0,4 ± 0,03	72,5 ± 10,6	10,5 ± 0,7	0,4 ± 0,1	68 ± 3	26,5 ± 6,4	1 ± 0,03	99 ± 1,4	27 ± 1,4	1,5 ± 0,2	99,5 ± 0,7	
4	25,5 ± 2	1 ± 0,4	43,5 ± 3	16 ± 0	1 ± 0,6	45 ± 13	18 ± 1,4	1 ± 0,1	16 ± 5,5	32 ± 4,2	1,5 ± 0,3	23 ± 4,2	
5	30 ± 7	0,9 ± 0,5	16,5 ± 2	26,5 ± 2,8	0,9 ± 0,6	21 ± 8,5	20,5 ± 2	0,5 ± 0,3	12 ± 3	52,5 ± 3,5	0,9 ± 0,2	6 ± 2	

G = gamétoctytes/10<sup>4</sup> GR

P = parasites/mm<sup>3</sup>

E = taux d'exflagellations (voir chapitre 6.2)

Un très faible taux d'exflagellation a été enregistré pour tous les inoculums, au 5ème jour. L'infectivité gamétocytaire, chez Anopheles, était très faible ou nulle ce jour-là (Fig. 1).

La parasitémie a (pour les quatre inoculums) progressivement augmenté jusqu'au 5ème jour. Pour évaluer dans quelle mesure la parasitémie exprimée pour 100 GR, rapportée donc en valeur relative, représente les variations réelles de la masse parasitaire ou est affectée par la réduction progressive du nombre de globules rouges (Fig.n) au cours de la maladie, nous avons effectué des numérations érythrocytaires journalières, ce qui nous a permis d'exprimer le nombre de parasites par  $\text{mm}^3$  (Fig. 1 ; Tableau G).

En fin d'évolution, alors que la parasitémie relative ne cesse généralement pas de croître, le nombre réel de parasites a tendance à se stabiliser face à l'effondrement de la masse globulaire (Fig. 1 ). Le nombre de microgamétocytes par  $10^4$  GR au cours des quatre infections à inoculums variés est exposé sur le Fig. m.

#### 3.2.1.6. Les ookinètes et les variations de l'infectivité gamétocytaire : observations préliminaires

Pour connaître dans quelle mesure les variations de l'infectivité gamétocytaire ont un retentissement décelable sur l'ookinétiformation, nous avons disséqué des moustiques, 16 à 19 heures après l'ingestion de sang des souris infectées avec P. yoelii nigeriensis depuis 3 jours (pic d'infectivité gamétocytaire) et 5 jours (infectivité gamétocytaire très faible).

Les ookinètes étaient présents chez tous les moustiques examinés, infestés 3 et 5 jours après l'inoculation des souris. Ces ookinètes se présentent sous trois morphologies différentes :

- forme "typique", allongée, très basophile, avec une extrémité pointue et l'autre arrondie, un noyau central ;
- forme "arrondie", aussi basophile que la forme précédente, avec un noyau rond, très visible et une ou deux petites formations arrondies Giemsa, positives, très brillantes aux environs de celui-ci ;
- forme "acidophile", allongée, avec un ou deux pôles très aigus, en continuité avec un prolongement fin et droit du cytoplasme, un noyau ovulaire entouré par un halo clair et un cytoplasme bleu rougeâtre ou franchement rose, avec pigment malarique fin, bien visible.

Le nombre total d'ookinètes que nous avons compté, sûrement très inférieur au chiffre réel puisque des gros débris du contenu intestinal cachent sûrement le plus grand nombre, sur les préparations, apparaît sur le tableau H, ainsi que la représentation pourcentuelle des trois types morphologiques observés.

Tableau H - Ookinètes de Plasmodium yoelii nigeriensis (1)

Nombre de jours après infection	Nombre d'ookinètes dénombrés/moustique	Proportion (%) d'ookinètes :		
		"typiques"	"arrondis"	"acidophile"
3	52 ± 18 n = 3	41 ± 24	51 ± 22	8 ± 8
5	14 ± 15 n=4	29 ± 47	28 ± 35	43 ± 49

(1) Souris inoculées par voie i.v. avec  $2,5 \times 10^5$  GRP

### 3. 2.2. Chez P. knowlesi

#### 3. 2.2.1. Développement de l'infection chez le singe splénectomisé

Les premiers parasites sont décelés 44 heures après l'inoculation. La parasitémie est montée à 1,8 % environ le 7ème jour, en atteignant le maximum avant traitement, 4,5 % 10 jours après inoculation.

Dans le nycthémère, le maximum de la parasitémie globale a été observé à des heures variables : quatre fois aux environs de minuit, trois fois aux environs de 19 h et une fois à 8 h du matin.

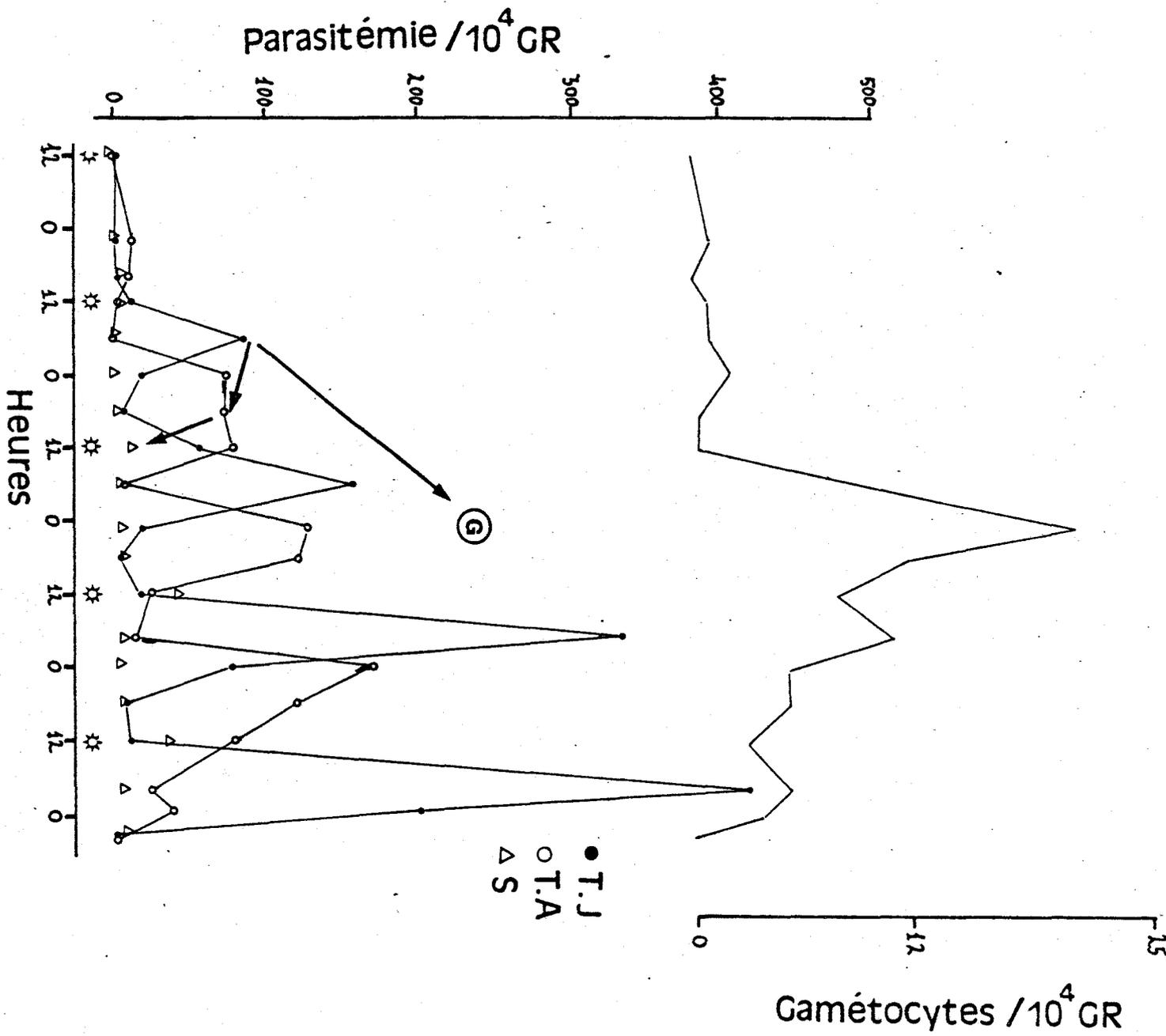
Les pics maximums de trophozoïtes annulaires se sont produits constamment entre 18 et 21 heures et ceux des schizontes matures toujours à midi (12 h).

Les résultats de l'étude de l'évolution des trophozoïtes jeunes ou annulaires jusqu'au stade de schizontes est représenté sur le tableau I :

Jour après l'inoculation	Trophozoïtes jeunes	Trophozoïtes âgés	Schizontes matures
6	0,88	0,76	0,21
7	1,62	1,30	0,42
8	3,36	1,73	0,77

TABLEAU I : Evolution de trophozoïtes jeunes à schizontes pendant trois jours de la maladie expérimentale (parasites %).

Fig. 0 : Evolution de la gamétocytémie et de différents stades sanguins asexués |(trophozoites jeunes( ● ) ; trophozoites âgés ( ○ ) ; et schizontes ( △ )| par  $10^4$  GR en fonction du temps chez Macaca fascicularis splénectomisé infesté par P. knowlesi. La séparation de mérozoites résultant d'une schizogonie a lieu aux environs de midi ( ✱ ). Les gamétocytes atteignent leur pic ( G ) dans le sang périphérique 25 à 28 heures environ après la division du schizonte.



	(1) 6/0	6/12	7/2	7/8	7/12	7/18	8/0	8/6	8/12	8/18	9/1	9/6	9/12	9/19	10/0	10/6	10/12	10/20
TROPHOZOITES JEUNES	0,5	2	1,5	2	6	88	20	4,5	54,3	162	37,3	5,8	42,5	336	77,5	15	17	420
TROPHOZOITES AGES	1,5	0	12,5	11	3,7	0	75,5 (86%)	72,5	80	6	130	122	26	17,5	173	122	81	22 3
SCHIZONTES	0	1,5	1,5	11,5	8	1	0	2	21,6	2,6	2	9,4	54	8	0,5	9,5	77	4,3
GAMETOCYTES	0	0	1	0	0,7	1	2 ~12% <sup>(2)</sup>	0,5	0,3	11	21 ~21%	12	8,5	11	5,5 ~6%	5,5	3	5,3
PARASITEMIE / 10 <sup>4</sup>	2	3,5	16,5	24,5	18,3	90	98	79,5	103,3	188,3	190,5	151	130,5	372,5	257	159,5	178	453
INFECTIVITE	0	0	0	0	0	0	0,4	0,2	0	0	11,6	0,4	0	0	2,45	0,4	0	0

Tableau J : GAMETOCYTOGENESE CHEZ Plasmodium knowlesi - PARASITES/10<sup>4</sup> GR

(1) Date/Heure

(2) % de gamétocytes par rapport au nombre de trophozoites âgés.

Dans cette espèce quotidienne, seulement 25 % environ de trophozoites annulaires arrivent au stade schizonte mature.

Cette perte apparente de parasites d'après l'analyse des frottis, se produit lors du passage trophozoite âgé à schizonte, la chute observée lors du passage trophozoite annulaire à âgé ne dépassant pas, en général, 20 %.

Si l'on étudie la discordance existant entre l'augmentation attendue du nombre de trophozoites annulaires (consécutive à chaque schizogonie) en fonction du taux de croissance de la souche, et celle qui a eu lieu dans nos expériences, nous constatons que pendant les 2 à 3 jours qui ont précédé le traitement, le nombre de trophozoites annulaires est respectivement 6, 26 et 210 fois environ plus faible que la valeur théorique attendue.

#### 3.2.2.1.1. Rythme de la gamétocyto-génèse ( Fig. 0; Tableau J)

La gamétocyto-génèse est sensiblement la même dans les PO et les PM, un peu plus faible dans les derniers. Elle a atteint son maximum au 8ème jour après l'inoculation à 1 h du matin : 21,7 gamétocytes/10<sup>4</sup> GR.

Au cours du nyctémère, la gamétocyto-génèse atteint son maximum entre 19 h et 2 h (trois fois sur cinq entre 0 h et 2 h).

La succession temporelle des vagues de trophozoites annulaires, âgés et de gamétocytes (fig. 0 ) indique que :

- a) à chaque schizogonie correspond une vague de gamétocyto-génèse ;
- b) cette dernière atteint son maximum 25 à 38 h après le pic de trophozoites annulaires dans le sang périphérique ;
- c) les vagues nyctémérales de gamétocyto-génèse donnent une gamétocyto-génèse croissante au fil des jours qui atteint son maximum 164 h après l'inoculation du singe. Puis la gamétocyto-génèse décroît.

Nous avons donc constaté l'existence de deux périodicités dans la gamétocytogénèse qui se superposent :

(a) un rythme "à long terme" : la production de gamétocytes est croissante au cours de la maladie expérimentale jusqu'à la 41ème heure après l'apparition des premiers parasites dans le sang périphérique, pour diminuer par la suite indépendamment de l'augmentation de la parasitémie, augmentation qui ne cesse qu'avec le traitement.

(b) un rythme nyctéméral ou "à court terme" : le taux de gamétocytes dans le sang périphérique augmente entre 19 h et 2 h et redescend pendant le jour.

#### 3.2.2.1.2. Combien de temps faut-il pour la formation des gamétocytes ?

Entre le pic journalier de trophozoites âgés et l'apparition de gamétocytes (qui ne sont pas encore infestants), il s'écoule entre 6 et 13 heures.

#### 3.2.2.1.3. Combien de temps faut-il pour que les gamétocytes deviennent infestants ?

Une fois reconnaissables sur les frottis de sang périphérique, les gamétocytes deviendront infestants 5 à 10 h après.

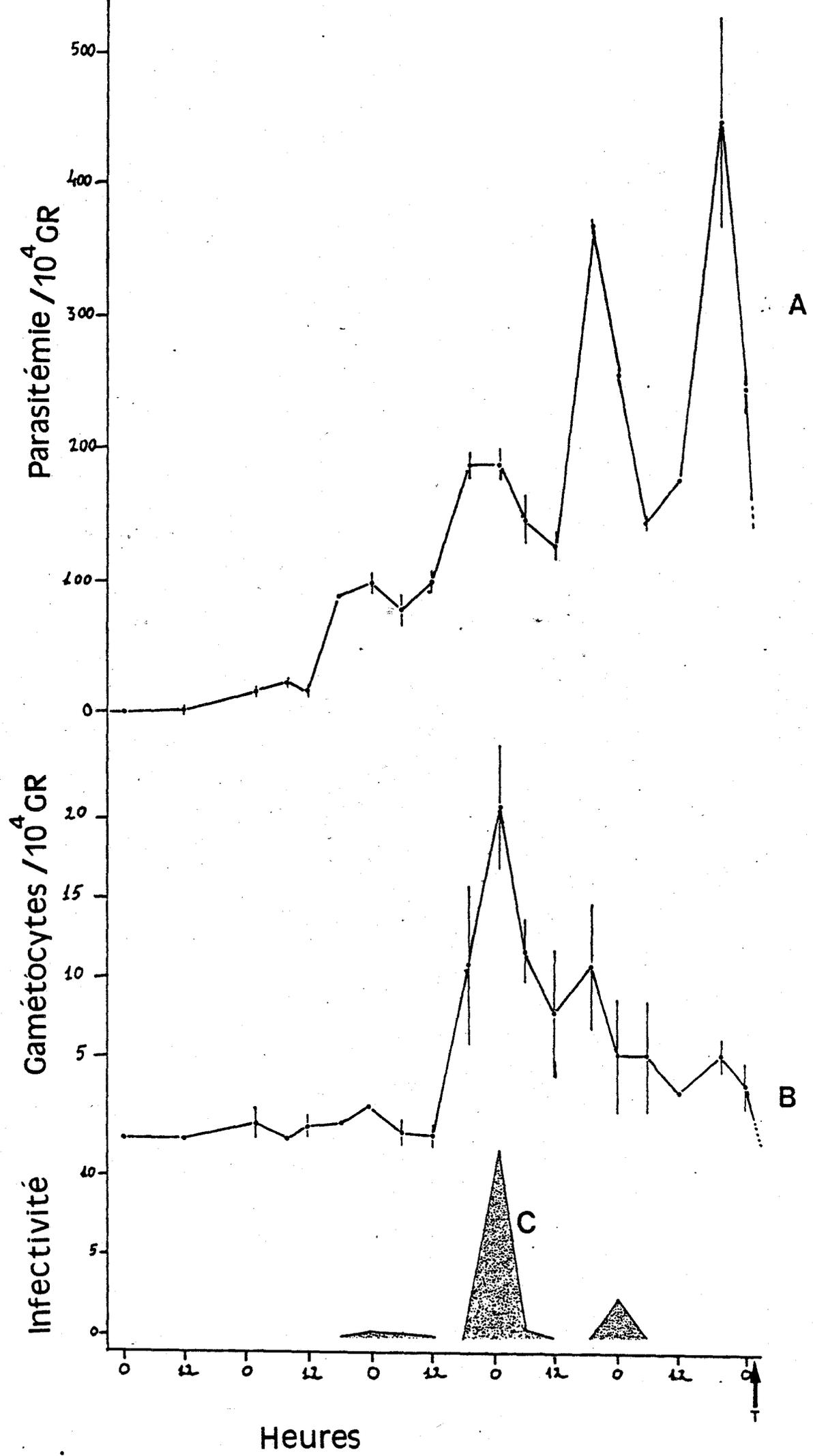
Entre chaque pic de trophozoites âgés et le moment où les gamétocytes correspondant à ce pic deviennent infestants, il s'écoule en tout de 11 à 23 h.

#### 3.2.2.1.4. Pendant combien de temps les gamétocytes demeurent-ils infestants ?

Dans nos expériences, ils demeurent infestants pendant 5 à 6 h minimum, 12 h après le maximum de leur infectivité, celle-ci devient nulle.

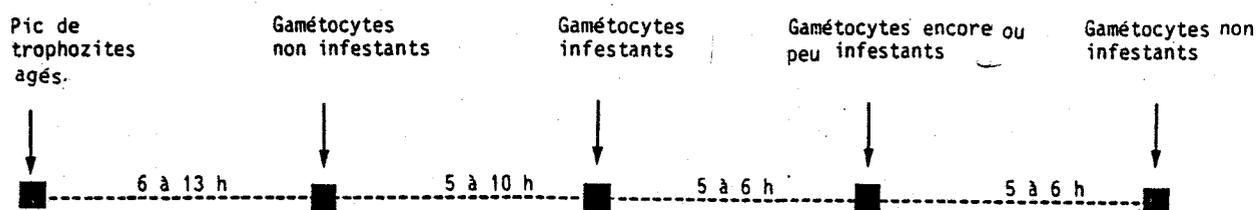
Fig. D : Variations de la parasitémie (A) ; gamétocytémie (B)  
infectivité gamétocytaire (C) chez Macaca fascicularis  
splénectomisé, infesté par P. knowlesi en fonction du  
temps :

$$\text{l'infectivité} = \frac{\text{nombre de moustiques positifs}}{\text{nombre de moustiques disséqués}} \times \text{nombre oocystes}$$



Malgré leur perte d'infectivité, les gamétocytes ne disparaissent pas immédiatement de la circulation. Vers la fin de l'expérience, nous avons remarqué une "accumulation" de gamétocytes qui montraient des signes apparents de dégénérescence : réduction de volume, condensation massive du pigment, bords frangés, vacuolisation nucléaire et cytoplasmique.

#### SCHEMA RECAPITULATIF



Entre le commencement d'une vague de gamétocytogénèse et l'épuisement de l'infectivité des gamétocytes formés, il s'écoule entre 16 et 29 h. La gamétocytogénèse dans cette souche de P. knowlesi est donc quotidienne, comme la schizogonie.

#### 3.2.2.1.5. Variations de l'infectivité des gamétocytes ( Fig. P)

Les gamétocytes ont été infestants pour Anopheles stephensi au J2 (3 h), au J3 (0 h), au J6 (0 h et 6 h), au J7 (1 h et 6 h) et au J8 (0 h). Le maximum d'infectivité a été enregistré le jour 8 à 1 h du matin les autres jours, l'infectivité étant toujours plus forte vers 0 h.

Il ne semble pas exister de particularités dans les "formules gamétocytaires" des moments d'infectivité importante, par rapport à celles des moments d'infectivité nulle.

Cependant, l'existence d'un rythme nyctéméral très marqué (aux environs de minuit) de l'infectivité gamétocytaire est un fait net et indiscutable.

### 3.2.2.1.6. Observations sur la morphologie des gamétocytes de Plasmodium knowlesi

#### 3.2.2.1.6.1. Microscopie photonique

Les gamétocytes chez cette espèce présentent une morphologie très variée. (Fig. 45 à 48)

Les macrogamétocytes, qui sont plus nombreux sur les frottis que les microgamétocytes, ne remplissent pas, en général, la cellule hôte. Leur forme est sphérique, parfois ovulaire. Le bord peut présenter des déformations localisées. Le cytoplasme coloré par le Giemsa acquiert des tons bleus, plus ou moins foncés, parfois mauves, moins fréquemment, un peu rougeâtres. Le pigment plus ou moins abondant se présente comme des granulations de petite taille, plus ou moins condensées, formant des taches réparties irrégulièrement, parfois superposées à l'image nucléaire, parfois disposées en périphérie.

De rares macrogamétocytes présentent des zones assez larges du cytoplasme, bien limités, de couleur bleu clair puisque dépourvues de pigment, lesquelles pourraient correspondre à des vacuoles. Le noyau, en général excentré, est souvent ovulaire, parfois triangulaire ; il a des bords nets bien que dans certains cas le bord interne soit légèrement frangé. Les limites nucléocytoplasmiques sont nettes. La présence d'un espace optiquement vide, petit et bien limité, arrondi près du bord, ou en déformant le contour nucléaire, est fréquemment observée. Le contenu nucléaire est, en général, homogène, parfois légèrement granuleux.

L'hématie qui héberge des macrogamétocytes est remarquablement modifiée. Elle est plus ou moins déformée, réduite parfois à une sorte de sac membranaire "vidé", entourant le macrogamétocyte. Cependant, cette sorte de "couronne érythrocytaire" est souvent mince, rouge foncée,

violet mauve, rose vif ou rose orangé, parsemée de granulations fines et régulières de Sinton et Mulligan.

Les microgamétocytes de P. knowlesi présentent une variabilité morphologique encore plus large que les macrogamétocytes. Leur forme est arrondie en général, mais elle peut être grossièrement triangulaire. La couleur du cytoplasme varie entre le rose vif et le rose bleuâtre. Le pigment peut montrer des aspects semblables à ceux décrits pour le macrogamétocyte. Le noyau, disposé en périphérie, est très grand mais ne dépasse pas la moitié de la cellule. En général, son contour est semi-circulaire, cependant le bord droit (ou cytoplasmique) peut être irrégulier, déchiqueté ou très diffus, rendant invisible la limite entre le nucléoplasme et le cytoplasme. Le noyau est parfois apparemment "fragmenté" soit en deux grosses masses, soit en plusieurs agglomérats reliés entre eux, de taille et de forme très variées. La présence d'une ou plusieurs "vacuoles" nucléaires est encore plus fréquente que chez le macrogamétocyte. Le contenu nucléaire peut se présenter homogène, mais le plus souvent est granuleux, de couleur variant du rouge vif au rose pâle. Enfin, les modifications subies par l'hématie hôte correspondent à celles signalées à propos du macrogamétocyte.

Malgré la synchronicité de l'évolution de cette espèce, aux moments de pics d'infectivité, coexistent les différentes morphologies gamétocytaires décrites. Pour cela, il semble très difficile de rattacher l'infectivité à une morphologie gamétocytaire donnée.

### 3.2.2.1.6.2. Microscopie électronique

Lors du prélèvement de sang de Macaca fascicularis, la parasitémie était de 2,6 % ; l'infectivité était maximale ( $13 \pm 9$  oocystes/moustique) mais la gamétocytemie ne représentait que 6 % environ du nombre total de parasites dans le sang périphérique. L'examen d'un grand nombre de coupes ultrafines nous a cependant permis d'aborder l'étude de l'ultrastructure assez mal connue des gamétocytes de cette espèce qui est pourtant très utilisée en malariologie chez un autre hôte vertébré (M. mulatta).

Les gamétocytes de P. knowlesi que nous avons pu étudier siégeaient dans des hématies matures dont la taille n'était pas modifiée. La cellule hôte présentait dans tous les cas des "clefts" parfois très nombreuses, en général alignées parallèlement à la surface de la vacuole parasitophore.

Les gamétocytes, à l'intérieur de la vacuole parasitophore, sont donc entourés par deux membranes : l'une correspondant à celle de cette vacuole, l'autre à la membrane cytoplasmique de la cellule parasitaire. Entre les deux membranes, il y a, en général, un espace bien visible qui mesure 20 nm, mais souvent les deux membranes sont accolées. En-dessous du plasmalemme parasitaire une troisième membrane est bien visible. Cette structure, constituée d'un seul feuillet très dense aux électrons, pourrait résulter de la fusion des deux membranes des vésicules aplaties du complexe sous-membranaire (Fig. 30).

Les deux seuls cytostomes (Fig. 29) que nous avons pu observer étaient dans des macrogamétocytes et dans les deux cas, des "unités" de cette troisième membrane étaient associées aux anneaux denses cytostomales caractéristiques (Fig. 29).

Les enroulements membranaires, fréquents chez les gamétocytes de P. yoelii nigeriensis (fig. 5 . ), bien qu'existant chez P. knowlesi, (fig. 28 ) semblent beaucoup plus rares.

Nous avons pu étudier un seul microgamétocyte<sup>(1)</sup> (fig. 28 ) dont la photographie mesure 6  $\mu\text{m}$ . Cette cellule a un noyau semi-lunaire, de grande taille (4,8  $\mu\text{m}$  x 3,3  $\mu\text{m}$ ), un système réticuloendoplasmique agranulaire très peu développé et des ribosomes libres peu nombreux, souvent groupés en polysomes. Les corps osmophiles sont très rares et des vésicules de pinocytose sont bien visibles en périphérie. Nous n'avons pas reconnu de mitochondries. Quelques cristaux de pigment, de taille très variée, sont entourés d'une seule membrane fine.

Dans l'enveloppe nucléaire, où l'espace entre les deux feuillets membranaires mesure 41 nm, il est possible d'observer un pore nucléaire complexe.

Le nucléoplasme se présente peu dense, inhomogène, parsemé de granules denses, ronds et nombreux, disposés irrégulièrement et mesurant 40 nm environ.

Les macrogamétocytes, plus nombreux sur les coupes, présentent un système réticuloendoplasmique granulaire et agranulaire très développé, distribué largement dans le cytoplasme mais respectant en général la périphérie de la cellule. Entre les systèmes membranaires, les ribosomes libres sont nombreux.

Les corps osmiophiles, nombreux, présentent des tailles et des densités très variées. Plusieurs fois, ces structures semblent occuper

---

(1) Nous n'avons pas trouvé d'images ultrastructurales de microgamétocytes de P. knowlesi dans la bibliographie malariologique.

préférentiellement la périphérie ; cependant, l'étude de coupes permet de les retrouver aussi dans le centre de la cellule et autour du noyau. Les mitochondries, très nombreuses et de taille très variée, ( $0,2 \pm 0,05$  à  $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) occupent préférentiellement la périphérie du cytoplasme. Allongées, présentant parfois des constriction, elles sont typiquement entourées d'une double membrane dont la feuille interne (Fig. 31) semble rarement donner lieu à des ébauches de crêtes. La matrice mitochondriale assez claire est occupée par un fin matériel particulé, moyennement dense, disposé irrégulièrement. Des microvésicules (Fig. 31) entourées d'une seule membrane sont aussi occasionnellement visibles dans les mitochondries.

Des vacuoles entourées d'une seule membrane, de taille plus ou moins variable sont couramment présentes dans le cytoplasme. Plus souvent retrouvées en périphérie, elles contiennent du cytoplasme érythrocytaire qui coexiste parfois avec des cristaux de pigment (Fig. 29). Leur taille est très variable, ainsi que leur typographie.

Le noyau étudié sur les coupes sériées d'un macrogamétoocyte est haltérimforme et mesure  $2,7 \pm 0,5 \times 0,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ . Des pores complexes sont visibles (Fig. 30). Une continuité semble s'établir entre le feuillet externe de l'enveloppe nucléaire et le système réticulaire endoplasmique (Fig. 30). Le nucléoplasme inhomogène présente des granules denses de taille très variée, irrégulièrement disposés. Nous n'avons pas observé de nucléole ni d'images microtubulaires nettes.

### 3.2.2.2. Développement de l'infection chez le singe intact (non splénectomisé)

L'inoculation a eu lieu le même jour que celle du singe splénectomisé. Le premier parasite a été observé le 4ème jour après l'inoculation à 0 h 30 : il s'agissait d'un trophozoite annulaire avec une grande vacuole et un noyau très allongé avec une tache chromatienne accessoire.

A partir de ce moment, la parasitémie a progressé faiblement pour atteindre 0,87% le jour 8 à 19 h : il s'agit là du maximum de parasitémie observé dans les PO et dans les PM.

Dans la journée, le maximum de la parasitémie globale a été observé trois fois aux environs de 0 h 30 et deux fois de 19 h 30.

Les schizontes matures ont toujours été très rares (0,01 à 0,03 %) et ils sont observables à 12 h, 19 h, 20 h et 4 h du matin.

Les pics de trophozoites annulaires se sont produits à 1 h, le jour 7 et à 19 et 20 h, les jours 8 et 10 respectivement.

Il est difficile de savoir quand la schizogonie a lieu. En tout cas, les pics de trophozoites annulaires se produisent entre 19 h et 1 h du matin, presque comme chez l'animal splénectomisé (entre 18 et 21 h).

#### 3.2.2.2.1. Variation de la gamétocytémie globale dans les PO et les PM

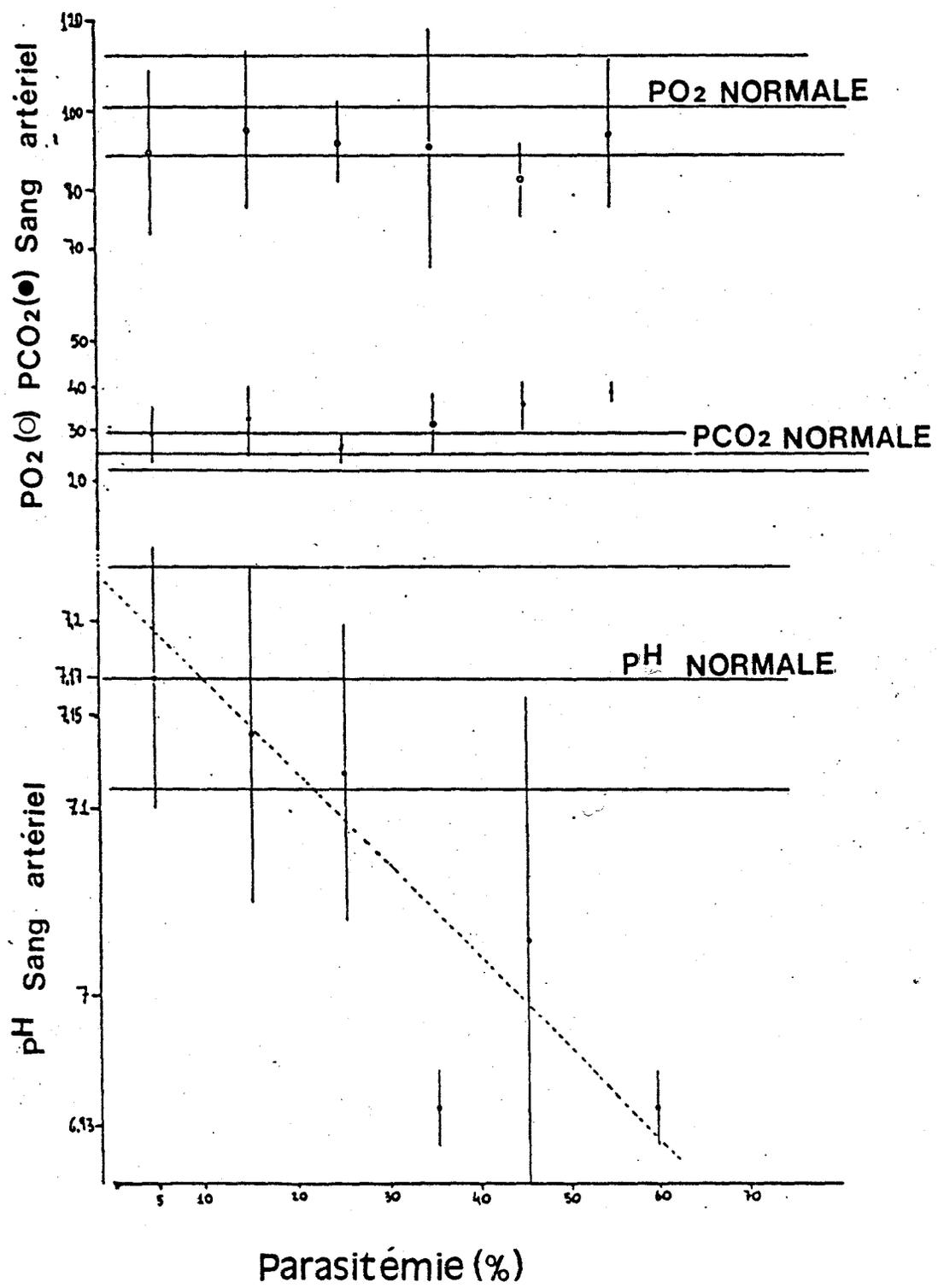
La gamétocytémie est aussi faible dans les PM que dans les PO. Dans les PO, la gamétocytémie globale atteint son maximum le jour 8 à 12 h : seulement 4 gamétocytes/ $10^4$  GR. Dans les PM, la gamétocytémie maximum est 1 gamétocyte/ $10^4$  GR le jour 7 à 6 h.

Ces résultats sont apparemment en contradiction avec ceux du singe splénectomisé. Le faible chiffre de gamétocytes nous empêche, bien-sûr, de tirer des conclusions.

#### 3.2.2.2.2. Infectivité gamétocytaire

Les gamétocytes de P. knowlesi chez le singe intact ont été infestants pour Anopheles stephensi à deux moments : le jour 8 à 6 h du matin et le jour 11 à 0 h 30. Dans les deux circonstances, nous n'avons pas réussi à observer de gamétocytes dans les frottis (PO et PM).

Fig. 9 : Evolution de la  $PO_2$ , de la  $PCO_2$  et du pH du sang artériel au cours du paludisme à *P. yoelii nigeriensis* chez la souris C 57 Black. Les lignes horizontales supérieure et inférieure à chacun des paramètres normaux correspondent aux écarts-type. Pour chaque point expérimental, nous avons dessiné l'écart-type.



3.3. PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, pH SANGUINS ET ACIDE LACTIQUE PLASMATIQUE CHEZ LA SOURIS SAINE ET INFECTEE PAR P. YOELLII NIGERIENSIS ( Tableau K)

3.3.1. Souris saine :

N'ayant pas trouvé dans la bibliographie les limites normales de PCO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub> <sup>(1)</sup>, pH et acide lactique plasmatique chez la souris saine, nous les avons déterminées chez les deux souches de Mus musculi (CB-57 et Swiss) avec lesquelles nous avons travaillé.

Après avoir essayé plusieurs modalités de prélèvements pour déterminer le PCO<sub>2</sub>, le PO<sub>2</sub> et le pH, nous avons retenu la ponction cardiaque transthoracique, cette technique nous ayant permis d'atteindre le maximum de reproductibilité et de fiabilité dans les résultats. Ceux-ci sont exposés dans le tableau K.

3.3.2. Souris infectées par Plasmodium yoelii nigeriensis (Tableau L, M; Fig.q)

3.3.2.1. PO<sub>2</sub>

La PO<sub>2</sub> subit des variations faibles, non significatives en général, au cours du paludisme à Plasmodium yoelii nigeriensis même aux moments de plus forte parasitémie.

---

(1) Un travail récent ( KRISHNA et al, 1983 ) rapporte des chiffres concernant la PO<sub>2</sub> chez la souris saine et infectée par P. yoelii yoelii (17 X)

Tableau K - PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, pH sanguins et lactate plasmatique chez les souris CB-57 et Swiss saines

		CB57		SWISS	
SANG ARTERIEL *	PO <sub>2</sub> (mmHg)	101 ± 3	n = 11	95,4 ± 14	n = 9
	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	25,6 ± 4	n = 11	26,3 ± 3,5	n = 9
	pH	7,17 ± 0,05	n = 11	7,3 ± 0,03	n = 9
PLASMA **	Acide lactique (mg/100 mol)	—		66,3 ± 20	n = 32
SANG VEINEUX *	PO <sub>2</sub> (mmHg)	51 ± 2	n = 15	45,8 ± 12,5	n = 21
	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	38,7 ± 8	n = 15	38,6 ± 6	n = 21
	pH	7,10 ± 0,07	n = 15	7,24 ± 0,08	n = 21

\* Prélèvements par ponction cardiaque transthoracique

\*\* Prévèlements à l'oeil, souris à jeun

Tableau L - PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, et pH sanguins chez la souris CB-57 infectée par Plasmodium yoelii nigeriensis

Parasitémie (%)	Sang artériel *			Sang veineux *		
	PO <sub>2</sub> (mmHg)	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	pH	PO <sub>2</sub> (mmHg)	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	pH
0,5 à 10	91,4 ± 16 (NS)	28,8 ± 5,5 (NS)	7,17 ± 0,07 (NS)	47,5 ± 10 (NS)	42,1 ± 7 (NS)	7,11 ± 0,09 (NS)
11 à 20	96,1 ± 17 (NS)	32,9 ± 7,4 (NS)	7,13 ± 0,09 (NS)	53,7 ± 12 (NS)	37,3 ± 6 (NS)	6,99 ± 0,10 (NS)
21 à 40	92 ± 14 (NS)	29,2 ± 4,8 (NS)	7,04 ± 0,11 (NS)	43,2 ± 10 (S)	43 ± 6,7 (NS)	6,97 ± 0,13 (NS)
> 41	93 ± 16 (NS)	36 ± 4,5 (S)	6,98 ± 0,10 (S)	47,3 ± 15 (NS)	39 ± 5 (NS)	6,92 ± 0,09 (S)

\* Différences statistiquement significatives (S) et non significatives (NS) (P < 0,01) par rapport aux valeurs observées chez la souris saine CB-57 (tableau K).  
(Test de Student corrigé pour des petits échantillons).

Tableau M - Lactate plasmatique chez la souris Swiss infectée avec Plasmodium yoelii nigeriensis

Parasitémie (%)	N	Lactate (mg/100 ml)	% de variation par rapport aux souris saines	Différence *
4 à 14	17	77,7 ± 33	+ 17	NS
15 à 36	10	85,5 ± 39	+ 29	NS
> 37	7	87,6 ± 42	+ 32	NS

\* S : significative ; NS : non significative (P > 0,01)

#### 3.3.2.2. PCO<sub>2</sub>

La PCO<sub>2</sub> augmente légèrement dès le départ. Lorsque la parasitémie dépasse 40 %, cette augmentation devient statistiquement significative dans le sang artériel et demeure pratiquement inchangée jusqu'à la mort des animaux. Ces variations sont moins nettes dans le sang veineux.

#### 3.3.2.3. pH

Le pH sanguin diminue significativement dans le sang artériel lorsque la parasitémie dépasse 40% .

#### 3.3.2.4. Lactate plasmatique

La concentration de lactate plasmatique, déjà très variable chez les rongeurs sains (46.3 à 86.3 mg/100 ml) montre des variations importantes chez les animaux infectés. Une nette tendance à l'augmentation est observée à partir d'une parasitémie de 20 % environ. Cependant, cette augmentation ne s'est pas avérée statistiquement significative (Tableau M ) certainement parce que l'échantillon était peu important.

Fig. r : Influence du plasma de souris impaludée  
sur l'infectivité des gamétocytes de  
Plasmodium yoelii nigeriensis.

Sur l'ordonnée, nous avons représenté le  
nombre d'oocystes (par moustique) dénombrés  
dans l'intestin moyen des Anopheles infestés  
sur la souris receveuse (voir texte) ; sur  
l'abscisse, figure le nombre de jours après  
l'impaludation de la souris donneuse de  
plasma dont le pouvoir inhibiteur de l'in-  
fectivité gamétocytaire est testé. Le plasma  
du jour "0" correspond au plasma témoin de  
souris saine.

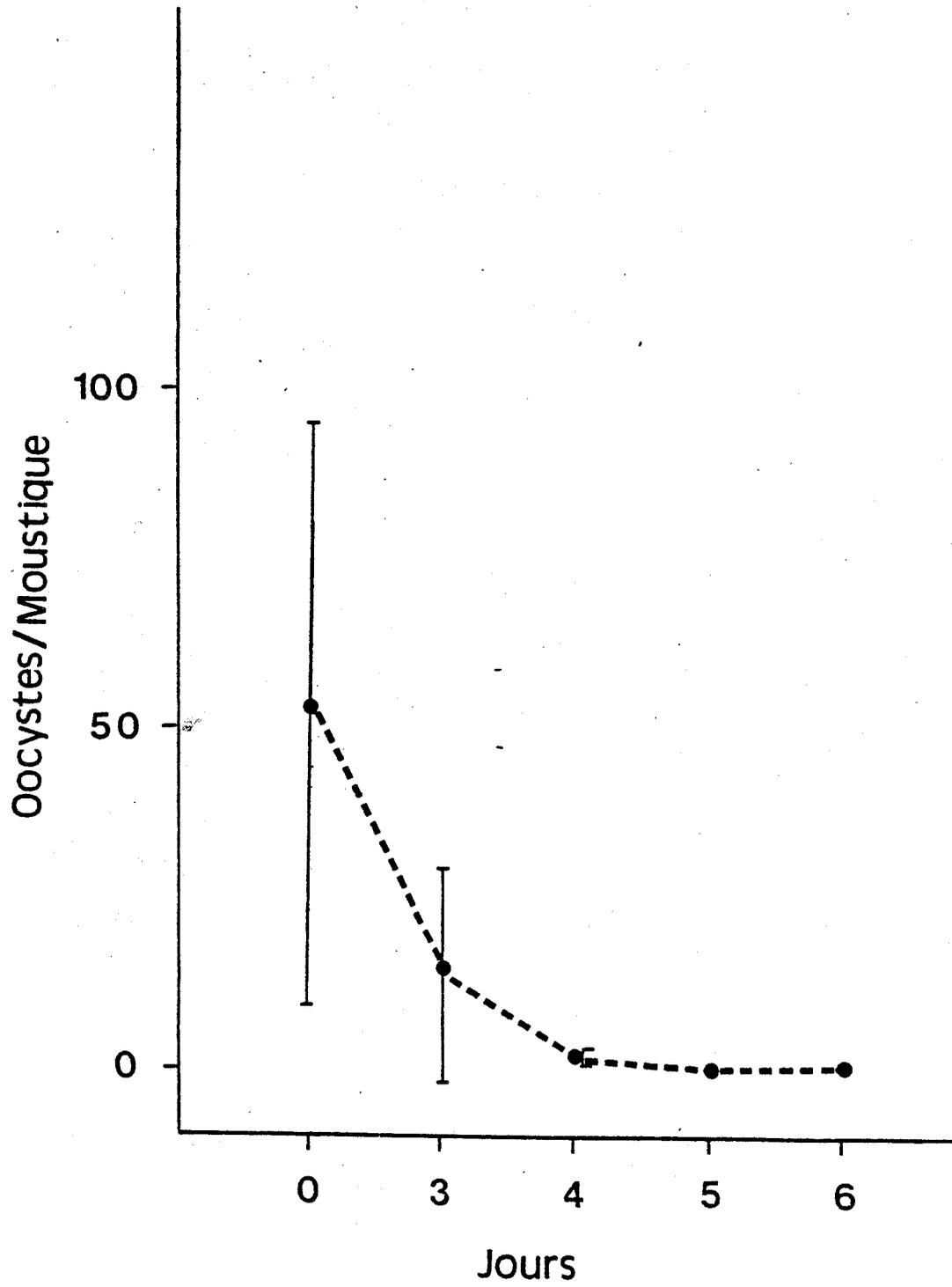


Tableau N : Influence du plasma de souris impaludées sur l'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis en fonction du temps écoulé après l'impaludation des souris donneuses.

Parasitémie (%) de la souris donneuse	Nombre de jours après l'impaludation de la souris donneuse	Infestation des moustiques : temps (mn) après la double inoculation de la de la souris receveuse	Nombre oocystes/ moustique	Nombre de moustiques positif/ nombre de moustiques disséqués	% inhibition de l'infectivité	Différence :
0	-	45	$53 \pm 43$	26/26	0	-
16	3	45	$14,5 \pm 15$	12/15	72,6	S (P < 0,01)
58	4	45	$0,9 \pm 1$	6/17	98	S (P < 0,001)
46	6	45	0	0/12	100	S (P < 0,01)

### 3.4. POUVOIR INHIBITEUR DE L'INFECTIVITE GAMETOCYTAIRE DU SERUM ET DU PLASMA DES SOURIS IMPALUDEES PAR PLASMODIUM YOELII NIGERIENSIS

Ayant constaté que l'infectivité gamétocytaire diminue dans les phases tardives de la maladie expérimentale, nous avons essayé de mettre en évidence l'effet inhibiteur de l'infectivité gamétocytaire exercé par le sérum (Petit et al., 1982) ou le plasma des souris impaludées depuis 5 ou 6 jours. Pour cela, nous avons inoculé simultanément par voie intraveineuse dans des souris saines (receveuses) du sang contenant des gamétocytes infestants provenant d'un animal impaludé depuis 3 jours, et du sérum ou du plasma de souris impaludée (souris donneuse) en variant les conditions expérimentales et en testant l'infectivité pour le moustique des gamétocytes inoculés.

#### 3.4.1. Influence du temps après impaludation de la souris donneuse

Dans ce système, le sérum de souris impaludée depuis trois jours n'inhibe pas l'infectivité gamétocytaire : 12 moustiques sur 15 infectés 45 mn après la double inoculation sont positifs avec 2 à 45 oocystes dans l'intestin moyen. La parasitémie dans la souris receveuse est de 0,6 % 45 mn après la double inoculation et la gamétocytémie sur le frottis P0 était de  $5/10^4$  GR.

Le sérum de souris impaludée depuis quatre jours inhibe partiellement l'infectivité gamétocytaire : six Anopheles sur 17 sont positifs avec seulement 2 à 4 oocystes par moustique. La parasitémie chez la souris receveuse était également de 0,6 % et la gamétocytémie globale sur le frottis P0 était de  $5/10^4$  GR.

**Tableau 0** : Influence du sérum ou du plasma des souris impaludées (5ème jour après l'infestation)  
sur l'infectivité gamétocytaire en fonction du temps écoulé entre l'inoculation du sérum  
inhibiteur et l'infestation des moustiques : résultats cumulés de 3 expériences.

Intervalle entre l'inoculation du sérum inhibiteur et l'infestation des moustiques	Oocystes/moustique souris témoin	Nombre de moustiques positifs/nombre de moustiques disséqués	Oocystes/moustique souris expérimentale	Nombre de moustiques positifs/nombre de moustiques disséqués	% inhibition de l'infectivité	Différence
45 mn	4,8 ± 5,5	35/44	0,06 ± 0,4	2/80	98,8 ± 2,5	S (P < 0,001)
3 h	27,4 ± 35	16/20	5,5 ± 8,7	13/28	79,7 ± 12	S (P < 0,001)
7 h	7 ± 4,3	12/12	1,9 ± 2	33/52	72,4 ± 12	S (P < 0,01)
20 h	18,5 ± 9,7	29/30	5,9 ± 3,5	61/74	68 ± 22	S (P < 0,02)

L'inoculation de sérum de souris impaludée depuis 5 et 6 jours a inhibé complètement l'infectivité gamétocytaire sauf au cours d'une expérience dans laquelle il n'y a pas eu d'inhibition chez une des souris ( $17 \pm 15$  oocystes). Les deux souris témoins de cette dernière expérience, inoculées avec du sérum de souris saine, ont donné lieu à des infestations de  $32 \pm 32$  et  $6 \pm 5,4$  oocystes par moustique. La parasitémie chez les souris témoins ( $0,7 \pm 1 \%$ ) et expérimentales, 45 mn après l'inoculation est sensiblement la même.

Les Anopheles, qui ingèrent le sang de souris receveuse ayant reçu du sérum de souris impaludée (depuis 3 ou 4 jours) développent moins d'oocystes par rapport aux témoins (Fig.n°; Tableau N). L'infectivité des gamétocytes chez une souris qui reçoit du Plasma de souris impaludée depuis 3 jours est abaissée de 72,6% par rapport au témoins. Le sérum provenant de souris infectées depuis 4 jours réduit l'infectivité des gamétocytes de 98 %. L'inhibition est totale lorsqu'on inocule du sérum ou du plasma de souris impaludée depuis 5 ou 6 jours. L'emploi de plasma ou de sérum ne modifie pas les résultats.

#### 3.4.2. Influence du temps écoulé entre la double inoculation de la souris receveuse et l'infection des moustiques (Tableau O)

Les souris qui ont reçu le sérum ou plasma à tester provenant dans tous les cas de souris donneuses infestées depuis cinq jours, et 0,1 ml de sang contenant les gamétocytes infestants sont exposées aux Anopheles 45 mn, 3h, 7 h et 20 h après cette double injection. A chaque expérience, nous avons inoculé des souris témoins avec des gamétocytes infestants et du sérum ou du plasma de souris saine.

Dans une expérience, deux souris témoins et deux souris expérimentales sont présentées aux Anopheles 45 mn et 20 h après l'inoculation de sérum inhibiteur et de sang parasité. Aucun oocyste ne se développe chez les moustiques gavés 45 mn après la double injection des souris expérimentales ; par contre, les moustiques qui ont ingéré du sang des souris témoins sont tous positifs. Les moustiques gavés 20 h après la double injection sur les souris témoins montraient  $19 \pm 19,4$  et  $8,5 \pm 8$  oocystes/moustique et sur les souris expérimentales montraient  $8,9 \pm 4,5$  et  $5 \pm 4,7$  oocystes/moustique.

Pendant les délais intermédiaires, plus de 45 minutes et moins de 20 heures après la double inoculation, nous avons observé que l'infectivité gamétocytaire demeure inhibée jusqu'à la 7ème heure.

Tableau p : Effet du sérum de souris immunisée contre P. yoelii nigeriensis sur l'infectivité des gamétocytes de la même espèce.

Intervalle entre l'inoculation du sérum "immunisé" et l'infestation des moustiques	Oocystes/moustique souris témoin	Nombre de moustiques positifs/nombre de moustiques disséqués	Oocystes/moustique souris expérimentale	Nombre de moustiques positifs/nombre de moustiques disséqués	% Inhibition de l'infectivité
40 mn	1,3 ± 1	8/12	0	0/9	100
1 h	29 ± 22	6/6	0	0/12	100
15 h	40,5 ± 37	10/10	4 ± 3	9/11	90
20 h	25,3 ± 17	11/11	0	0/15	100
23 h	40 ± 35	4/4	2,3 ± 2,3	9/12	94
24 h	16 ± 26,8	6/10	0,2 ± 0,4	2/11	98

### 3.5. NATURE DES FACTEURS SÉRIQUES OU PLASMATIQUE

Ayant mis en évidence l'effet inhibiteur du sérum et du plasma de souris impaludées sur l'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis, nous avons voulu connaître la nature du facteur ou des facteurs pouvant l'expliquer.

Une des premières questions qui se pose est la suivante :  
le(s) facteur(s) inhibiteur(s) est (sont)-il(s) de nature immunologique ?

Pour y répondre, en travaillant sur le même modèle, nous avons testé le pouvoir inhibiteur du sérum de souris immunisée contre la même espèce. Puis nous avons étudié l'évolution de l'infectivité gamétocytaire lorsque les gamétocytes infestants de P. yoelii nigeriensis étaient transférés chez des souris guéries d'une infection à P. chabaudi.

#### 3.5.1. Effet du sérum et du plasma de souris immunisée contre Plasmodium yoelii nigeriensis

Cette expérience (Tableau p) a été réalisée avec du sérum et du plasma de souris immunisée.

L'effet du sérum et du plasma des souris immunisées a été testé 40 mn, 20 h et 24 h après la double injection.

Le sérum de souris immunisée contre P. yoelii nigeriensis s'est avéré totalement inhibiteur de l'infectivité gamétocytaire pour les moustiques infestés 40 mn et 20 h après la double inoculation

Tableau Q : L'infectivité gamétocytaire de *P. yoelii nigeriensis* transférés chez des souris  
 "immunisées" contre cette souche (inoculum :  $60 \times 10^6$  GRP).

Intervalle entre l'inoculation du sang parasité et l'infestation des moustiques	Oocystes/moustique (contrôle-inoculum)	Nombre de moustiques positifs/nombre de moustiques disséqués (contrôle-inoculum)	Oocystes/moustique souris immunisée	Nombre de moustiques positifs/nombre de moustiques disséqués	Parasitémie (%) de souris :	
					non immunisée	immunisée
40 mn	$1,3 \pm 0,1$	8/12	0	0/10	1,6	1,4
1 h	$29 \pm 22$	6/6	0	0/10	2,3	1
15 h	$40,5 \pm 37$	10/10	0	0/10	3,8	0,06
20 h	$25,3 \pm 17$	11/11	0	0/10	8,4	0,01
23 h	$40 \pm 35$	4/4	0	0/10	9	0,05
24 h	$16 \pm 26,8$	6/10	0	0/10	16	0

(Tableau p) . Le lot de moustiques infestés 24 h après la double inoculation s'est avéré faiblement positif.

Nous pouvons ajouter ici que le sérum de souris immunisée qui a donc inhibé l'infectivité gamétocytaire n'a pas complètement empêché l'évolution de l'infection chez les souris receveuses qui montraient une parasitémie de 30 à 35 % vers le 5ème ou 6ème jour et qui pourtant guérissent plus tard. Par contre, les souris témoins sont mortes.

Au cours d'une autre expérience, le plasma de souris immunisées a été inoculé à la place du sérum. Le plasma de souris immunisée a inhibé l'infectivité gamétocytaire à partir de la 1ère heure après la double inoculation, et cette inhibition demeure importante jusqu'à 23 h plus tard (Tableau P).

L'injection de plasma de souris immunisée a également exercé un effet net sur l'évolution de la maladie expérimentale : les souris ayant reçu ce plasma ont survécu à l'infection et les souris inoculées avec du plasma sain sont mortes au 5ème jour.

Nous avons également inoculé deux souris immunisées contre P. yoelii nigeriensis, c'est-à-dire qui avaient survécu à l'infection, avec des gamétocytes de cette espèce. Les Anopheles, nourris sur ces animaux à intervalles variés (40 mn, 1 h, 15 h, 20 h, 23 h et 24 h après l'inoculation du sang avec des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis) ne se sont pas infestés. Aucune infectivité gamétocytaire n'a été observée chez les moustiques jusqu'à la fin de notre expérience. Les parasitémies et les gamétocytémies ont été analysées simultanément lors de l'infestation des moustiques et elles étaient très faibles (tableau Q) chez ces animaux qui ont survécu à cette réinfection.

Tableau R : Evolution de l'infectivité des gamétocytes infestants de Plasmodium yoelii nigeriensis transférés chez deux souris guéries d'un paludisme à P. chabaudi.

Temps écoulé après le transfert des gamétocytes	Oocystes/moustique
48 h	62 ± 31
72 h	186 ± 17
120 h	0

3.5.2. Evolution de l'infectivité des gamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis chez des souris immunisées contre P. chabaudi

Deux souris immunisées contre Plasmodium chabaudi ont été inoculées avec du sang parasité par P. yoelii nigeriensis. Les moustiques nourris sur ces animaux le 3ème jour, le 4ème jour et le 5ème jour après l'infection (tableau R) se sont infectés normalement, l'infectivité étant maximale le 3ème jour, devenant presque nulle le 5ème jour. Treize jours plus tard, une souris saine mise au contact avec les moustiques infestés le 3ème jour s'est infestée normalement.

#### 4. DISCUSSION

Le paludisme est sans doute l'une des infections parasitaires les plus étudiées. Dans le passé, on a vu que cette maladie pourrait être éradiquée par l'épandage d'insecticides actifs contre les moustiques et par traitement des impaludés avec de nouvelles drogues synthétiques. Mais les moustiques qui transmettent l'infection ont vite acquis une résistance aux pesticides et des souches de *Plasmodium* sont devenues résistantes aux antipaludiques.

La présence de gamétocytes dans le sang périphérique, leur infectivité vis-à-vis des moustiques et la prévalence de l'infection chez les Anopheles constituent les principaux facteurs pour l'infestation palustre de l'hôte vertébré.

La production de gamétocytes, leur maturation et leur longévité dans la circulation sanguine périphérique varient selon l'espèce de Plasmodium et la nature de l'infection.

Dans ce travail, nous avons tenté d'élucider les points suivants :

a) Comment expliquer, malgré la présence de nombreux gamétocytes dans le sang périphérique au cours de certaines périodes, la non-infection de moustiques susceptibles ?

b) Quelle est l'évolution de la gamétocytogénèse et de l'infectivité gamétocytaire chez les deux espèces étudiées ?

c) Quels sont les rapports entre la variation de l'infectivité gamétocytaire et l'évolution de l'exflagellation et de la parasitémie au cours de l'infection ?

d) Les variations morphologiques des gamétocytes entraînent-elles des changements dans leur physiologie ?

e) Quels sont les facteurs dépendants du parasite et de l'hôte qui peuvent expliquer les variations de l'infectivité gamétocytaire ?

#### 4.1. Origine exo-érythrocytaire des gamétocytes

Nous avons abordé au départ le problème de l'origine de gamétocytes. Nous avons voulu savoir si les gamétocytes de P. yoelii nigeriensis peuvent se développer directement à partir de mérozoïtes d'origine exo-érythrocytaire. L'examen de ponctions cardiaques pratiquées chez la souris à différents intervalles a montré que des parasites sont décelés dans le sang à partir de la 43e heure suivant l'inoculation intraveineuse de sporozoïtes de P. berghei yoelii (souche 17 x) (LANDAU et KILLICK-KENDRICK, 1966). A partir de ce moment, des schizontes tissulaires éclatent et relarguent des mérozoïtes dans le sang.

Lors de l'inoculation intraveineuse de sporozoïtes de P. B. yoelii (souche 17 x), KILLICK-KENDRICK et WARREN (1968) observent des microgamétocytes matures 74 h après l'infestation. Alors, les moustiques infestés ont développé un grand nombre d'oocystes.

Dans notre expérience, les souris ont été infestées par piqûre. Nos souris ont été exposées aux moustiques durant 7 h. Nous ne pouvons donc pas préciser le moment exact de leur infestation. Cependant les premiers gamétocytes ont été observés 40 à 47 heures plus tard sur les

frottis sanguins (PM) devenant infestants 70 à 77 h après l'infestation de souris c'est-à-dire 30 heures environ après les premières ruptures de schizontes hépatiques. Trois seulement des 10 moustiques ont été trouvés infestés, le nombre d'ocystes allant de 26 à 300. Deux autres expériences ont fourni des résultats négatifs vraisemblablement parce que le nombre de sporozoïtes transmis aux souris était inférieur à celui de l'expérience précédente. Dans la 3ème expérience, des gamétocytes infestants ont été démontrés, 92 h après l'infection par des sporozoïtes. Dans ce cas, 2 moustiques sur 11 se sont avérés infestés avec 2 à 4 ocystes.

KILLICK-KENDRICK et WARREN (1968) ont calculé que si les gamétocytes proviennent uniquement de schizontes sanguins, la période minimale nécessaire à leur maturation dans le sang doit être  $43 + 24 + 24 = 91$  h (43 h de schizogonie hépatique ; 24 h pour la première schizogonie érythrocytaire ; 24 h supplémentaires minimum pour la maturation des gamétocytes).

Le temps de maturation minimum de P. yoelii nigeriensis dans le foie de souris blanches est de 43 h. Trente six heures après l'infestation, le parasite occupe entièrement les cellules hépatiques de rats blancs (LANDAU et BOULARD, 1978). Dans notre expérience, 40 à 60 h après l'infestation des souris, les moustiques ne se sont pas infestés. Lorsque nous infestons des animaux avec du sang parasité congelé, nous constatons l'apparition des premiers gamétocytes infestants 30 h après l'inoculation. Le délai minimum donc, pour pouvoir affirmer que les gamétocytes sont d'origine érythrocytaire, est de  $43 + 24 + 30 = 97$  h ; plus tôt il faut admettre qu'ils sont d'origine exo-érythrocytaire.

D'après notre première expérience, nous pouvons affirmer que des mérozoïtes produits par la schizogonie exo-érythrocytaire chez P. yoelii nigeriensis ont évolué directement en formes sexuées. LANDAU et al. (1979) ont montré que les gamétocytes de P. yoelii nigeriensis (souche 17 x) sont susceptibles d'infester le moustique 70-72 h après l'inoculation des sporozoïtes. Ils soulignent également la présence d'un gamétocyte de type III, 78 heures après l'inoculation des sporozoïtes, c'est-à-dire 35 heures environ après la rupture des premiers schizontes hépatiques. Selon ces auteurs, les gamétocytes de type III ne seraient pas (ou peu) infectieux pour les moustiques.

Nous n'avons pas injecté les sporozoïtes par voie intraveineuse ce qui constitue un moyen efficace de provoquer des infestations importantes. Toutefois, il faut rappeler que la simple piqûre d'un Aedes aegypti peut infester plus de 85 % d'une population de poulets et des piqûres répétées permettent d'obtenir une infestation à 100 % (RUSSEL et MOHAN, 1942 ; COATNEY et al., 1945). Cependant, les piqûres de moustiques peuvent ne pas être toujours infectieuses, même lorsque des sporozoïtes matures sont présents dans les glandes salivaires (LAIRD, 1941). Il n'est pas facile de quantifier le taux de sporozoïtes reçus par l'hôte (FINK, 1968). Cet auteur utilisant le modèle P. cathemerium a démontré que l'infection intraveineuse de 250 sporozoïtes par oiseau permet une infestation à 100 %. En ce qui concerne la malaria aviaire (P. cathemerium et P. gallinaceum), plusieurs auteurs (SHAH, 1934 ; GAMBREL, 1937 ; BISHOP, 1955) ont remarqué l'apparition simultanée de gamétocytes et de formes asexuées dans le sang des oiseaux expérimentalement infestés, mais le délai d'apparition des formes sexuées n'a pas été précisé.

L'infectivité des sporozoïtes est généralement évaluée par leur faculté pour se développer dans un hôte sensible (VANDERBERG et GWADZ, 1980). Ces auteurs ont aussi indiqué que dans une même population, il existe des sporozoïtes présentant vraisemblablement différents degrés d'infectivité. Un fort inoculum de sporozoïtes peut donc augmenter le degré de l'infection (BOYD, 1940) et sera suivi d'une parasitémie importante plus facilement et plus rapidement observable (VANDERBERG et GWADZ, 1980). Il semblerait que la mort de souris à J7, que nous avons enregistrée fréquemment, au lieu d'1 à J10 ou à J12, cours de l'entretien de P. y. nigeriensis par piqûre, soit due au passage d'une quantité trop massive de sporozoïtes.

#### 4.2. Variations de l'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis au cours de la maladie expérimentale

La chronobiologie de la gamétocytogénèse et les variations de l'infectivité des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis observées au cours de trois expériences semblables ont été analogues (Tableau C ; Fig. d, e). Bien que la dose d'inoculation ait varié, l'infectivité maximale a toujours été enregistrée 66 à 90 h après l'infestation.

VANDERBERG et al. (1968) et VANDERBERG (1977) avaient infesté par voie i.p. des hamsters avec du sang parasité par la souche NIX-GS de P. berghei et les infections de moustiques les plus satisfaisantes avaient été obtenues lors des repas sanguins réalisés 3 et 4 jours après l'inoculation. Nos expériences ont permis d'apprécier encore plus précisément l'infectivité des gamétocytes en fonction du temps. Celle-ci a débuté simultanément avec l'apparition des formes sexuées dans le

sang périphérique (à 27 heures, l'infectivité était nulle et les frottis PO et PM ne montraient pas de gamétocytes) ; si l'infectivité a démarré un peu plus précocément dans les expériences 2 et 3, elle a décliné habituellement dans les 3 cas après 90 heures. Ces résultats sont comparables à ceux reportés par LANDAU et al. (1979) selon lesquels, lorsqu'un fort inoculum de sang parasité par P. yoelii nigeriensis est injecté, l'infectivité est maximale pendant 3 jours, puis décline rapidement. De son côté, VANDERBERG et GWADZ (1980) ont rapporté qu'il est préférable d'infecter les rongeurs avec un inoculum relativement fort de parasites de manière à obtenir une gamétocytemie élevée le plus tôt possible, avant le déclin de l'infectivité.

Nos résultats confirment donc ceux de ces auteurs mais précisent en plus qu'ils sont valables dans une très large gamme de doses d'inoculation.

L'infectivité gamétocytaire était presque nulle lorsque la parasitémie était de 16 % et de 22 % respectivement dans les expériences 1 et 2 ; pour une parasitémie équivalente une infectivité élevée a été obtenue dans la troisième expérience (Fig. d, e). Ces résultats suggèrent que la variation d'infectivité ne dépend pas seulement du niveau de parasitémie.

Comme LANDAU et al. (1979) et CAMPBELL et al. (1982), nous trouvons aussi que l'infectivité ne coïncide pas avec la quantité de gamétocytes présents dans le sang, mais plutôt avec la qualité de ces gamétocytes.

#### 4.3. Variations de la morphologie des gamétocytes

LANDAU et al. (1979) ont étudié la morphologie des microgamétocytes et observé que la chute d'infectivité gamétocytaire coïncidait avec l'augmentation du nombre de gamétocytes altérés. Ces auteurs ont

décrit 5 types de microgamétocytes (jeune, 0, I, II et III). Quand un grand nombre de gamétocytes types 0 et I étaient présents, ils observaient une haute infectivité, résultat que nous avons confirmé. Le taux de gamétocytes dans le sang dépendait, lors de ces expériences, du type d'inoculation, de l'intensité de l'infection, de la souche palustre et du rongeur. Ces différents types de gamétocytes ont été observés par DEI-CAS et al. (1980) chez le singe infecté avec Plasmodium inui. Avant cela, HAWKING et al. (1971) en étudiant la gamétocytogenèse chez le singe Aotus avaient classé les gamétocytes de P. falciparum en 5 stades selon la forme des parasites et des érythrocytes hôtes. Ils avaient conclu que ces gamétocytes évoluaient vers la maturité en 48 heures et qu'ils dégénéraient ensuite rapidement.

Une séquence de différenciation morphologique comparable a ensuite été retrouvée lors du développement des gamétocytes de P. falciparum in vitro (SMALLEY, 1976 ; JENSEN, 1979 ; CARTER et MILLER, 1979). SINDEN (1982) en a étudié l'ultrastructure.

Il a été suggéré que les souris infectées par P. berghei, P. chabaudi et P. yoelii yoelii (souche 17 x) pouvaient traverser des périodes de défense réduite, induites par la maladie, qui correspondent avec un engorgement maximal des moustiques et avec les périodes d'infectivité maximale des gamétocytes (DAY et EDMAN, 1983). Dans nos expériences, nous n'avons pas obtenu d'engorgement important des moustiques quand ils ont piqué des souris hautement infectées par P. yoelii nigeriensis et montrant une haute gamétocytémie et une baisse de réactivité face aux Anopheles. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle, dans certaines expériences, nous n'avons pas pu préparer de frottis à partir des estomacs de moustiques (Tableau C, expérience 3). Par ailleurs à l'inverse des résultats rapportés par DAY et EDMAN, la période de

réactivité réduite des souris (après 5 jours) ne correspond pas à la période d'infectivité maximale des gamétocytes de P. yoelii nigeriensis. L'infectivité, par contre, a été étroitement corrélée avec la présence, mais pas nécessairement avec l'abondance de microgamétocytes (CAMPBELL et al., 1982). Dans nos expériences, nous avons observé une décroissance de la proportion de formes sexuées lors de l'évolution de la parasitémie (Fig. f).

La densité globale en gamétocytes différait peu entre les frottis de sang périphérique (PO) et de sang d'estomac d'Anopheles (PM). Lors de l'étude morphologique des microgamétocytes, nous avons observé que les formes jeunes (0,I) étaient proportionnellement plus nombreuses dans les périodes précoces (Fig. h, Tableau D). D'autre part, nous avons rarement observé des macrogamétocytes dans les frottis (PO et PM) réalisés 74 h après infection (Tableau D). Au contraire, au même moment, le nombre de microgamétocytes avait augmenté. De ceci pourrait résulter une plus faible probabilité de fécondation, ce qui pourrait être une des causes de la perte d'infectivité observée.

Nous avons également essayé de suivre l'évolution morphologique des gamétocytes à l'échelon ultrastructural, mais il ne nous a pas été possible de rapporter les images observées aux types morphologiques décrits en microscopie photonique et ceci essentiellement parce que d'une part, les divers types coexistent dans les prélèvements et, d'autre part, les critères de différenciation sur frottis (essentiellement taille et colorabilité) ne peuvent pas être appréciés en ultra-structure.

En ce qui concerne les différences ultrastructurales entre macro et microgamétocytes de P. yoelii nigeriensis, les ribosomes, le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau ont fourni à SINDEN et al. (1976) des critères distinctifs qui ont d'ailleurs été

utilisés pour d'autres Hemosporidies (AIKAWA et al., 1969 ; DESSER, 1972 ; STERLING, 1972 ; STERLING et AIKAWA, 1973 ; AIKAWA et SEED, 1980). Nous n'avons observé le complexe membranaire interne que chez le microgamétocyte de P. yoelii nigeriensis et il était toujours discontinu ; ce résultat avait également été rapporté par SINDEN et al. (1982).

Le macrogamétocyte possède un abondant réticulum endoplasmique situé près du noyau ou dans la périphérie cytoplasmique avec de nombreux ribosomes, ceci suggérant une capacité considérable pour la synthèse protéique (SINDEN, 1982). Nous avons observé des groupes de corps osmiophiles et de mitochondries. Ces mitochondries groupées pourraient correspondre à ce que SLOMIANNY (1982) décrit comme une mitochondrie unique multilobée. D'autre part, nous nous interrogeons sur la signification des mitochondries en cours de transformation vacuolaire, observées dans des stades gamétocytaires vraisemblablement tardifs : il pourrait s'agir de gamétocytes de type III.

Les microgamétocytes contiennent peu de ribosomes par rapport aux macrogamétocytes, ce qui pourrait correspondre à une capacité réduite de synthèse protéique. Nous avons en outre observé des variations dans la richesse en polyribosomes chez les microgamétocytes. Les formes les plus riches pourraient être les plus jeunes ; les formes les plus pauvres en polyribosomes, plus nombreuses vers le 5ème jour (Fig. 22), pourraient correspondre aux microgamétocytes de type III de LANDAU et al. (1979) moins infectieux pour le moustique.

Nous avons également observé que les enroulements membranaires sont plus fréquents dans les gamétocytes vers le 5ème jour après l'infestation. De telles images ont été observées par TADASUKE ONO et al. (1983) dans le cytoplasme d'érythrocytes infectés par des gamétocytes

immatures de P. falciparum après traitement par l'AMP cyclique in vitro. Ces auteurs suggèrent que l'apparition de ces structures était liée à la présence du parasite et qu'elles dérivait de la membrane plasmique de l'hématie. SINDEN et al. (1978) ont décrit ces enroulements membranaires et suggèrent qu'ils dérivent de la membrane de la vacuole parasitophore.

Le rôle des corps osmiophiles observés dans le cytoplasme des deux types de gamétocyte est inconnu.

L'enveloppe nucléaire des micro et macrogamétocytes est munie de pores complexes contenant des structures tubulaires rangées autour d'un élément central (Fig. 6, 10) bien décrit par VIVIER (1967) chez les grégarines et les coccidies et par SINDEN et al. (1976) chez P. yoelii nigeriensis.

Le cytostome est présent chez les macro et microgamétocytes (AIKAWA, 1969b ; AIKAWA et GORDON, 1968 ; RUDZINSKA et TRAGER, 1968) quel que soit leur stade évolutif.

#### 4.4. Variations de l'exflagellation et de l'ookinete-formation chez P. yoelii nigeriensis

L'observation morphologique des gamétocytes ne permet pas de préjuger de leur capacité à exflageller ou à former des ookinètes. Une autre méthode a donc été utilisée visant à apprécier le pouvoir infectant du sang parasité ingéré par les moustiques. En effet, l'apparition de gamétocytes dans le sang n'est pas un critère absolu d'infectivité (VANDERBERG et GWADZ, 1980) ; selon ces auteurs, les gamétocytes doivent traverser une période complémentaire de développement avant d'atteindre la maturité fonctionnelle qui peut être mesurée, soit par l'infectivité des gamétocytes pour les moustiques, comme nous l'avons rapporté, soit par la capacité des microgamétocytes pour "exflageller".

Nous avons donc également évalué ce paramètre au cours de nos expériences et constaté qu'en général le taux maximum d'exflagellation coïncidait avec le maximum d'oocytes comptés ultérieurement sur les parois intestinales des Anopheles.

Sur la base de l'étude du taux d'exflagellation, HAWKING et al. (1972) déduisent que la variation du nombre d'exflagellations est directement liée au nombre total de gamétocytes mâles présents dans le sang. Cependant, avec différents inoculum, nous avons observé le même pic d'exflagellation 66 heures après l'infection ; à l'exception d'un cas (inoculum :  $27 \times 10^3$  GRP ; Fig. 1 ; Tableau G) où le taux d'exflagellation était maximum à 66 heures, alors que l'infectivité l'était à 48 heures après l'infection. La présence de microgamétocytes capables d'exflageller est donc un indicateur utile de l'infectivité mais ce n'est pas un critère absolu. De plus, l'incapacité à exflageller expérimentalement ne signifie pas nécessairement une non-infectivité (VANDERBERG et GWADZ, 1980). Ainsi, nous n'avons jamais observé d'exflagellation 1 heure après l'inoculation de  $60 \times 10^6$  GRP (Tableaux 0, P) alors qu'il existait une faible infectivité. Il semble peu probable que la forte densité en globules rouges ait caché les exflagellations intervenant dans ces préparations.

La proportion de microgamétocytes qui exflagellent le plus précocément est plus importante lorsque l'infectivité est plus élevée. Ces microgamétocytes qui sont donc capables de féconder sont remplacés vers le 5ème jour par d'autres qui commencent à exflageller plus tardivement et qui seraient moins efficaces. Mais ces observations préliminaires méritent d'être précisées et approfondies.

Nos observations préliminaires sur la formation des ookinètes en parallèle avec l'infectivité gamétocytaire suggèrent l'existence de différences dans la proportion de types morphologiques des ookinètes produits lors des repas sanguins pris 3 ou 5 jours après l'infection. Il est ainsi possible que les ookinètes formés à 5 jours soient moins capables de devenir en oocystes. Les facteurs intervenant dans la transformation des ookinètes sont encore mal connus. ROSALES-RONQUIZZO et SILVERMAN (1974) ont étudié in vitro les facteurs externes (température, pH) influençant la formation des ookinètes. ROSENBERG et KOONTZ (1984) ont indiqué qu'un facteur érythrocytaire était essentiel pour l'infectivité des zygotes pour Aedes aegypti : ils ont montré que les zygotes de P. gallinaceum produits in vitro et implantés dans les moustiques par gavage de ceux-ci, à travers une membrane, ne formaient des oocystes que si une substance issue des cytoplasmes des hématies saines était présente. Il se peut que ce produit soit nécessaire pour la pénétration de l'épithélium (GARNHAM et al., 1962) par les ookinètes.

Ces résultats sont très intéressants. En effet, pour savoir dans quelle mesure les différences d'infectivité constatées par nos tests au long de ce travail et par d'autres auteurs sont liées à des changements subis par les gamétocytes, du taux de fécondation ou dans l'évolution des zygotes, il faudrait poursuivre nos travaux en évaluant en cinétique au cours de la maladie expérimentale le taux de syngamies et d'ookinéto-formation. L'incidence du taux d'hématies saines n'est pas en contradiction avec nos résultats : l'infectivité plus forte au début d'infection correspond à une plus grande proportion d'hématies saines et l'infectivité gamétocytaire plus faible en fin d'infection à une proportion très réduite d'hématies saines résultant de l'anémie

palustre, que nous avons quantifiée (Fig. N). En somme, et selon nos propres résultats, le pic d'infectivité correspond à un taux de  $6 \times 10^6$  érythrocytes/mm<sup>3</sup> dont  $1 \times 10^6$  GR/mm<sup>3</sup> sont parasités et la chute de l'infectivité correspond à un taux de  $2,5 \times 10^6$  érythrocytes/mm<sup>3</sup>, donc  $5 \times 10^5$  GR/mm<sup>3</sup> sont parasités.

#### 4.5. Les gamétocytes de P. knowlesi

Chez le singe Macaca fascicularis (splénectomisé et non splénectomisé), infesté avec P. knowlesi, l'infectivité maximale est accompagnée du maximum de rendement de la gamétocytogenèse; celle-ci était évaluée par le rapport formes sexuées/asexuées.

Un rythme nycthéméral très marqué existe chez P. knowlesi chez le singe splénectomisé. Les schizontes se divisent constamment à midi. Nos résultats concernant P. knowlesi chez M. fascicularis correspondent à ceux obtenus par HAWKING et al. (1968) chez M. rhesus. HAWKING et al. (1966) ont démontré que les gamétocytes sont plus infestants pendant la nuit. HAWKING et al. (1968, 71 et 72) ont montré que la vie des gamétocytes de trois espèces (P. knowlesi, P. cynomolgi, P. falciparum, P. vinkei, P. chabaudi) est courte. GARNHAM et POWERS (1974) ont confirmé les résultats de HAWKING et al. Chez P. inui, l'infectivité accompagne un premier pic de gamétocytes puis elle tombe malgré l'augmentation de la gamétocytémie associée à l'augmentation globale de la parasitémie (DEI-CAS et al., 1980). Contrairement à ces résultats, chez P. knowlesi, la principale vague gamétocytaire accompagne le pic maximum d'infectivité. Ensuite, la production de gamétocytes diminue avec l'infectivité. Les gamétocytes de P. knowlesi sont morphologiquement

très différents de ceux de P. yoelii nigeriensis et la concentration de formes jeunes dans l'intestin moyen du moustique (signalé pour P. yoelii nigeriensis et pour P. inui) ne semble pas avoir lieu. La morphologie des gamétocytes de P. knowlesi correspond à celle du groupe "malariae" proposé par LANDAU et al. (1976). Au niveau ultrastructural, les gamétocytes sont rares. Les mitochondries des gamétocytes de P. knowlesi avec leurs vésicules et leurs ébauches de crêtes sont assez différentes de ceux de P. yoelii nigeriensis.

#### 4.6 Les aspects physiopathologiques

La défaillance rénale, de cause circulatoire, toxique ou immunologique, qui accompagne très certainement l'évolution des formes graves de paludisme pourrait expliquer l'incapacité de cet organe à compenser l'acidose que nous avons retrouvée. Une acidose métabolique a aussi récemment été décrite lors du paludisme P. yoelii yoelii (17 X) chez la souris au cours de la phase terminale (KRISHNA et al., 1983).

Le paludisme entraîne chez la souris, lorsque la parasitémie dépasse 20 % environ, une acidose importante. Celle-ci semble être mixte : elle a une composante respiratoire puisque le PCO<sub>2</sub> augmente considérablement, mais aussi métabolique car la lactacidémie et la concentration plasmatique d'autres acides organiques (MAUROIS et al., résultats non publiés) augmentent aussi. Ces changements sont sans doute en rapport avec l'anoxie tissulaire, conséquence elle-même de l'anémie importante (chapitre 3.2.1.5) mais très probablement aussi des troubles au niveau de l'unité circulatoire périphérique rapportés chez plusieurs Plasmodium.

La physiologie du paludisme nous apparaît d'une extrême complexité. Des études conduites dans notre laboratoire depuis plusieurs

années ont permis de mettre en évidence des perturbations remarquables du métabolisme lipidique chez la souris (MAUROIS et al., 1980), le singe et l'homme (MAUROIS et al., 1979 ; VERNES et al., 1980) impaludés. Quelques unes de ces modifications entraînent en conséquences hématologiques avec expression morphologique (MAUROIS et al., 1983) et il serait surprenant que les gamétocytes et peut-être d'autres stades du cycle de Plasmodium chez l'hôte vertébré ne soient pas influencés par des changements aussi remarquables.

Il est certain que le milieu intérieur de la souris impaludée est profondément perturbé lorsque la parasitémie est élevée vers le 5ème ou 6ème jour après infection transfusionnelle chez P. yoelii nigeriensis. Alors, sans qu'on puisse établir un rapport de cause à effet, l'infectivité gamétocytaire devient très faible.

Des substances d'origine parasitaire ou xénique induites par la maladie et libérées dans la circulation pourraient affecter l'infectivité des gamétocytes. L'acidose que nous venons de décrire et caractériser pourrait être en rapport avec la perte d'infectivité gamétocytaire ; d'autres facteurs comme le pigment paludique (l'hématine), les perturbations lipidiques et l'action des mécanismes de défense non spécifiques et spécifiques (Chapitre 3.5) pourraient aussi jouer un rôle non négligeable.

#### 4.7. Influence de facteurs sériques et plasmatiques

Le manque d'un facteur ou des facteurs plasmatiques associé avec les fortes parasitemies suite à l'infection mécanique avec P. gallinaceum, P. berghei ou P. knowlesi, pourrait être responsable d'une infectivité gamé-

toctaire réduite, soit parce que les gamétocytes subissent un dommage irréversible dans le sang circulant (CARTER et GWADZ, 1980), soit parce qu'ils ne peuvent pas évoluer normalement après l'ingestion par les moustiques. Le sang dont plus de la moitié d'hématies sont parasitées pourrait subir la carence relative de substances essentielles pour permettre un maximum d'infectivité gamétocytaire (CANTRELL et JORDAN, 1946 ; EYLES, 1952). Les auteurs ont aussi rapporté que ce sang constitue probablement la source principale de protéines et d'autres substances nécessaires aux gamètes, aux ookinetes et aux oocystes.

D'après les résultats rapportés par LANDAU et al (1979) le transfert passif de gamétocytes non infestants de P. yoelii nigeriensis chez la souris saine entraîne la récupération de leur infectivité: il n'est donc pas possible de parler d' "irréversible damage" (CARTER et GWADZ, 1980) à la lumière de ces faits.

PETIT et al.(1982) ont rapporté que la perte d'infectivité gamétocytaire pourrait dépendre d'un facteur sérique. Le sérum de souris infectées depuis 5 jours avec P. yoelii nigeriensis a déterminé une inhibition immédiate de l'infectivité gamétocytaire. Nos résultats confirment ces observations préliminaires et précisent que l'effet inhibiteur du sérum demeure actif jusqu' a 20 heures après l'inoculation.

CARTER et GWADZ (1980) signalent que le délai de 55 jours, après l'infection transfusionnelle des souris, est trop court pour qu'il y ait la formation d'anticorps pouvant expliquer la perte d'infectivité gamétocytaire mais

d'autres facteurs non anticorps comme des protéines inflammatoires, ou la fibronectine pourraient influencer la physiologie des gamétocytes. Des résultats préliminaires d'expériences récents que nous avons réalisées sont en faveur de l'existence d'une protéine inflammatoire "CRP-Like" de souris capable, dans notre modèle, d'inhiber l'infectivité des gamétocytes.

Nous avons observé que l'infectivité gamétocytaire de P. yoelii nigeriensis est significativement inhibée par le sérum d'animaux qui ont survécu à l'infestation (Tableau P). Les moustiques qui ont ingéré le sang de ces souris guéries ne se sont pas non plus infestés. Une absence totale d'oocystes a été remarquée dans l'intestin au moyen de moustiques infestés 45 minutes, 1 h, 15 h et 20 h après l'inoculation du sérum inhibiteur et ceci malgré la présence de gamétocytes sur les frottis. HUFF, MARCH-BANK et SHIROISHI (1958) ont proposé que probablement l'immunité active développée par l'hôte vertébré entraîne une réduction de l'infectivité des gamétocytes. BISHOP et MCCONNACHIE (1956; 1960) démontrent que le plasma provenant de poulets immunisés contre P. gallinaceum n'a aucun effet sur l'exflagellation. L'inhibition de l'infectivité gamétocytaire par le sérum d'animaux guéris qui immunisent activement (une injection mensuelle pendant 1 année) est sans doute due à la réponse humorale. Bien que dans la présente contribution nous n'avons pas caractérisé les anticorps responsables ni leur capacité à reconnaître des antigènes paludiques, il semble très probable que l'effet inhibiteur du sérum soit la conséquence de facteurs immunologiques.

La frappante spécificité d'espèce du sérum inhibiteur provenant d'animaux immunisés est un argument de poids en faveur de la nature immunologique de ce facteur.

D'autres études sur P. gallinaceum, P. yoelii nigeriensis et P. knowlesi ( GWADZ, 1976; CARTER et CHEN, 1976; MENDIS et TARGETT, 1979; GWADZ et GREEN, 1978; CARTER et GWADZ, 1980) ont démontré une inhibition du taux d'infection des moustiques gorgés sur des animaux immunisés activement auparavant contre les gamètes des espèces correspondantes.

## 5. CONCLUSIONS

Les réponses que nous pouvons apporter à partir de nos résultats aux problèmes que pose la variation de l'infectivité des gamétocytes de mammifères sont les suivantes :

1. Chez P.yoelii nigeriensis une première vague de gamétocytes infestants se développe directement à partir des cryptozoïtes ;
2. Après l'inoculation de sang parasité par P.yoelii nigeriensis l'efficacité du processus de gamétocytogénèse et l'infectivité gamétocytaire augmentent graduellement en atteignant un pic vers la 70ème heure, puis diminuent considérablement malgré l'augmentation de la parasitémie et de la gamétocytémie ;
3. L'exflagellation, dans la même espèce, suit une évolution parallèle ;
4. Les évolutions toujours chez P.yoelii nigeriensis , en fonction du temps, de la gamétocytogénèse, de l'infectivité gamétocytaire et de l'exflagellation, que nous venons d'évoquer, sont indépendantes de l'importance de l'inoculum entre  $27 \times 10^3$  GRP et  $41 \times 10^6$  GRP, mais leur chute apparaît liée à l'évolution de l'anémie palustre.
5. L'infectivité gamétocytaire chez P.knowlesi montre aussi un pic en début d'infection mais apparaît plus étroitement liée à la remarquable périodicité des schizogonies que chez P.yoelii nigeriensis.
6. Les changements morphologiques et de la taille subis par les gamétocytes de

P.yoelii nigeriensis sont liés aux variations de l'infectivité gamétocytaire.

En ce qui concerne la taille, nos résultats sont compatibles avec l'explication suggérée par LANDAU et coll. (1979) selon laquelle les gamétocytes infestants, plus volumineux, plus nombreux dans les capillaires, sont absorbés préférentiellement par le moustique lors de l'hémophagie.

Ces phénomènes n'ont pas pu être retrouvés chez P.knowlesi.

7. Les études ultrastructurales, surtout chez P.yoelii nigeriensis nous permettent de suggérer que des empilements membranaires plus abondants, coexistant avec de nombreuses mitochondries en cours de vacuolisation caractérisent les gamétocytes incapables d'évoluer, de fin d'infection.

8. Le sérum et le plasma de souris impaludées par voie transfusionnelle depuis plus de 4 jours avec P.yoelii nigeriensis a un effet inhibiteur gamétocytaire.

9. Cet effet inhibiteur pourrait être en rapport avec les changements physiopathologiques du milieu intérieur de la souris ( $PO_2$ ,  $PCO_2$ , pH et acide lactique) que nous avons décrit et caractérisé ici chez P.yoelii nigeriensis.

10. Cependant, le sérum des animaux immunisés activement contre la souche homologue a aussi inhibé l'infectivité gamétocytaire : la réponse humorale pourrait donc, au moins en partie, expliquer cette inhibition.

11. La poursuite de ces recherches devrait permettre : - d'une part, d'éclairer à quel niveau de la sporogonie s'exerce le pouvoir inhibiteur du sérum ou du plasma et quelle est la nature et par quel mécanisme a lieu cette inhibition ; - d'autre part dans quelle mesure d'autres facteurs comme les cellules sanguines,

qui jouent un rôle important dans l'infectivité des zygotes de P. gallinaceum (ROSENBERG et al., 1984) ne sont pas concernées dans l'évolution des gamétocytes chez le moustique.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADLER, S and TCHERNOMORETZ, I. 1943. The extraerythrocytic origin of gametocytes of Plasmodium gallinaceum, Brumpt, 1935. Ann. Trop. Med. Parasit. 37, 148-152.
- AIKAWA, M. 1966. The fine structure of the erythrocyte stages of three avian parasites, Plasmodium fallax, P. lophurae and P. calhemerium. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 449-471.
- AIKAWA, M. and JORDAN, H. 1968. Fine structure of reptilian malarial parasite. J. Parasitol. 54, 1023-1033.
- AIKAWA, M., HUFF, C.G. and SPRINZ, H. 1969. Comparative fine structure study of the gametocytes of avian, reptilian and mammalian malarial parasites. J. Ultrastruc. Res. 26, 316-331.
- AIKAWA, M., HUFF, C.G. and STROME, P.C. 1970. Morphological study of microgametocytogenesis of Leucocytozoon simondi. J. Ultrastruct. Res. 32, 43-68.
- AIKAWA, M. 1972. Parasitological review. Plasmodium: The fine structure of malarial parasites. Exp. Parasitol. 30, 284-320.
- AIKAWA, M., SEED, T.M. 1980. Morphology of Plasmodia. Malaria, vol. I p. 285
- BISHOP, A. 1955. Problems concerned with gametogenesis in Haemosporidiidea, with particular reference to the genus Plasmodium. Parasitology, 45, 163-185.
- BISHOP, A. and McCONNACHIE, E.W. 1956. A study of the factors affecting the emergence of gametocytes of Plasmodium gallinaceum from the erythro-

- cytes and the exflagellation of the male gametocytes. Parasitology, 46, 192-215.
- BISHOP, A. and McCONNACHIE, E.W. 1960. Further observation on the in vitro development of the gametocytes of Plasmodium gallinaceum. Parasitology, 45, 163-185.
- BOYD, M.F. 1940. The influence of sporozoites dosage in vivax malaria. Am. J. Trop. Med. 20, 279-286.
- BRADBURY, P.C. and ROBERTS, J.F. 1970. Early stages in the differentiation of gametocytes of Haemoproteus columbae Kruse. J. Protozool. 17, 405-414.
- CAMPBELL, C.C., COLLINS, W.E., DINH, N.P., BARBER, A. and BRODERSON, J.R. 1982. Plasmodium falciparum gametocytes from culture in vitro develop to sporozoites that are infectious to primates. Science, 1048-1050.
- CANTRELL, W. and JORDAN, H.B. 1946. Changes in the infectiousness of gametocytes during the course of Plasmodium gallinaceum infections. J. Infect. Dis. 78, 153-159.
- CARTER, R. and CHEN, D.H. 1976. Malaria transmission blocked by immunization with gametes of the malaria parasite. Nature (London). 263, 57-58.
- CARTER, R. and MILLER, L.H. 1979. Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum in continuous culture. Bull. W.H.O., 57, (Suppl. 1). 37-52.
- CARTER, R. and GWADZ, R.W. 1980. Infectiousness and gamete immunization in Malaria. Malaria, vol. 3 (Ed. KREIER) Academic Press, New York.

- COATNEY, G.R., COOPER, W.C. and MILES, V.I. 1945. Studies on Plasmodium gallinaceum. I. The incidence and course of the infection in young chicks resulting from single mosquito bites. Am. J. Hyg. 41, 109-118.
- COATNEY, G.R., COLLINS, W.E., WARREN, N.W. and CONTACCOS, P.G. 1971. "The primate malarias". U.S. Govt. Printing Office, Washington
- COLLINS, W. E. 1962. Comparative infectivity of Plasmodium falciparum (Columbia strain) to Anopheles quadrimaculatus and Anopheles albimanus. Mosq. News, 22, 257-259.
- DANILEWSKY, B. 1885. Zur parasitologie des blutes. Biol. Zbl. 5, 529
- DAY, J.F. and EDMAN, D. 1983. Malaria renders mice susceptible to mosquito feeding when gametocytes are most infective. J. Parasitol. 69, 163-170.
- DEI-CAS, E., MAUROIS, P., LANDAU, I, DUTOIT, E., MILTGEN, F., VERNES, A. et BIGUET, J. 1980. Morphologie et infectivité des gamétocytes de Plasmodium inui. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 55, 621-633
- DESSER, R.S. 1972. Gametocytes maturation, exflagellation and fertilization in Parahaemoproteus (= Haemoproteus) velans: an ultrastructural study. J. Protozool. 19, 287-296.
- DUNCAN, D., STREET, J., S. R., MICKS, D.O. 1959. Electron microscopie observations of the gametocytes of malaria parasite (P. cathemerium). Tex. Rep. Biol. Med. 17, 314-322.
- EYLES, D.E. 1952. Studies on P. gallinaceum: Factors associated with the malaria infection in the vertebrate host which influence the degree of infection in the mosquito. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55, 386-391.

- FINK, E. 1968. Experimental infektion von kanariern mit P. cathemerium durch den stich infizierter Mücken (Culex pipens) und durch inokulation isolierter sporozoiten . Z. Parasit. 31, 232-253.
- GAMBRELL, W.E. 1937. Variation in gametocytes production in avian malaria. Am. J; Trop. Med. 17, 689-726.
- GARNHAM, P.C.C., and POWERS, K.G. 1974. Periodicity of infectivity of Plasmodial gametocytes: The "Hawking phenomenon" Ins. J. Parasitol. 4, 103-106.
- GARNHAM, P.C., BIRD, R.C. and BAKER, J.R. 1962. Electron microscopic studies of motile stages of malaria parasites. III. The ookinete of Haemamoeba and Plasmodia . Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 56, 116-120.
- GARNHAM, P.C. 1966. "Malaria parasites and other Haemosporidea". Blackwell, Oxford
- GRASSI, B. 1900. Studi di uno zoologo sulla malaria. Mem. Accad. Lincei, 3, 299-505.
- GWADZ, R.W. 1976. Malaria succesful immunization against the sexual stages of Plasmodium gallinaceum. Science, 193, 1150-1151.
- GWADZ, R.W. and GREEN, I. 1978. Malaria immunization of rhesus monkey: a vaccine effective against both the sexual and asexual stages of Plasmodium knowlesi. J. Exp. Med. 148, 1311-1323.
- HAQUE, S., DEI-CAS, E., DEBLOCK, S., MAUROIS, P., POIRRIEZ, J., ABDELLATIFI, M., CAMUS, D., TRIBOULET, J.P., VERNIS, A., PETIT, G., BOULARD, Y.

et LANDAU, I. 1982. Les gamétocytes de plasmodium de rongeur et de primate: observations sur les variations de la morphologie et de l'infectivité pour Anopheles stephensi. Reunion de la Société Française de Parasitologie, Paris.

HAWKING, F. and WORMS, M.J., GAMMAGE, K. and GODDARD, P.A. 1966. The biological purpose of the blood cycle of the malaria parasite Plasmodium cynomolgi. Lancet, 2, 422-424.

HAWKING, F., WORMS, M.J. and GAMMAGE, K. 1968. 24 and 48 hour cycles of malaria parasites in the blood. Their purpose, production and control. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 731-760.

HAWKING, F., WILSON, M.E. and GAMMAGE, K. 1971. Evidence for cycle development and short-lived maturity in the gamétocytes of Plasmodium falciparum. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 549-559.

HAWKING, F. 1972. The asexual and sexual circadian rythms of Plasmodium vinckei chabaudi, of P. berghei and of P. gallinaceum. Parasitology, 65, 189-210.

HUFF, C.G. 1927. Studies on the infectivity of plasmodia of birds for mosquitoes, with special reference to the problem of immunity in the mosquito. Am. J. Hyg. 7, 706-734.

HUFF, C.G., MARCHBANK, D.F. and SHIROISHI, T. 1958. Changes in infectiousness of malarial gamétocytes. II. analysis of the possible causative factors. Exp. Parasitol. 7, 399-417.

JAMES, S.P., NICOL, W.R. and SHUTE, P.G. 1936. Clinical and parasitological observations on induced malaria. Proc. R. Soc. Med. 29, 879-894.

- JENSEN, J.B. 1979. Observations on gamétocytogenesis in Plasmodium falciparum from continuous cultures. J. Protozool. 26, 129-132
- KILLICK-KENDRICK, R. and WARREN, M. 1968. Primary exoerythrocytic schizonts of a mammalian plasmodium as a source of gametocytes. Nature, (London), 220, 191-192.
- KRISHNA, S., SHOUBRIDGE, E.A., WHITE, N.J., WEATHERALL, D.J. and RADDA, G.K. 1983. Plasmodium yoelii: Blood oxygen and brain function in the infected mouse. Exp. Parasitol. 56, 931-936
- LANDAU, I. and KILLICK-KENDRICK, R. 1966. Rodent plasmodium of the République Central Africaine: the sporogony and tissue stages of Plasmodium chabaudi and P. berghei yoelii. Trans. R. Soc. Med. Hyg. 60, 633-649.
- LANDAU, I., MILTGEN, F. et CHABAUD, A.G. 1976. Les différents types de gamétocytes chez les hémosporidies de mammifères. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 51 (2), 175-187.
- LANDAU, I. and BOUZARD, Y. 1978. Life cycle and morphology in "Rodent malaria". (Eds. Killick-Kendrick and Peters) Academic Press, New York, 53-84.
- LANDAU, I., MILTGEN, F., BOULARD, Y., CHABAUD, A.G. et BACCAM, D. 1979. Etudes sur les gamétocytes des Plasmodium du groupe VIVAX. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 54 (2), 145-161.
- LAIRD, R. 1941. Observations on mosquito transmission of P. lophurae. Am. J. Hyg., 34C, 163-167.

- LUMSDEN, W.H.R. and BERTRAM, D.S. 1940. Observations on the biology of Plasmodium gallinaceum Brumpt 1935, in the domestic fowl, with special reference to the production of gametocytes and their development in Aedes aegypti (L). Ann. Trop. Med. Parasitol., 34, 135-160.
- LAVARENAN, A. 1981. Description d'un nouveau parasite découvert dans le sang des malades atteints d'impaludisme. C.R. Soc. Biol., Paris, 93, 627-630.
- MAC CALLUM, W.G. 1897. On the flagellated form of the malarial parasite Lancet, 2, 1240-1241.
- MACCALLUM, W.G. 1898. On haematozoan infections of birds. J. Exp. Med. 3, 117-136
- MANSON, P. 1894. On the nature and significance of the crescentic and flagellated bodies in malarial blood. Brit. Med., 11, 1306-1308.
- MAUROIS, P., VERNES, A., CHARET, P., NOUVELOT, A., BECQUET, R. and GLARD, R. 1979. Changes in serum lipoproteins during malaria therapy with P. vivax. Ann. Trop. Med. Parasitol., 73 (5), 491-493.
- MAUROIS, P. and CHARET, P. 1980. Kinetic study of serum lipoproteins, total cholesterol and triacylglycerides in various models of experimental rodent malaria. Ann. Trop. Med. Parasitol., 74(1) 17-28.
- MAUROIS, P., DEI-CAS, E., FEO, C., PESSH, M. and ALCINDOR, J.L. 1983. Anaemia during rodent malaria : relationship with impairment of lipoprotein metabolism. 2ème Conférence Internationale sur le Paludisme et les Babeosioses. Annecy, France.

MENDIS, K.N. and TARGETT, G.A.T. 1979. Immunization against gametes and asexual erythrocytic stages of rodent malaria parasite. Nature (London) 277, 389-391.

OPIE, E.L. 1898. On the haemocytozoa of birds. J. Exp. Med., 3, 79.

PETIT, G., CUMUS, D., DEI-CAS, E. et LANDAU, I. 1982. Inhibition immédiate de l'infectivité des gamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis par le sérum de rongeurs infectés depuis 5 jours. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 57 (5), 507.

ROSS, R. 1895. The crescent-sphere-flagella metamorphosis of the malaria parasite in the mosquito. Trans. S. Indian Branch Br. Med. Assoc. 6, 334-350.

ROSS, R. 1897. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitoes fed on malarial blood. Brit. Med. J. ii, 1786-1788.

ROSS, R. 1898. Report on the cultivation of Proteosoma, Labbe, in Grey Mosquitoes Calcutta India : Office of the Superintendent of Government Printing, 21 May 1898.

ROSS, R. 1898. Preliminary report on the infection of birds with Proteosoma by the bites of Mosquitoes. G.C. Press, Simla, 27 October 1898.

ROSALES-RONQUILLO, M.C. and SILVERMAN, P.H. 1974. In vitro ookinete development of the rodent malarial parasite. Plasmodium berghei. J. Parasitol. 60, 819-824.

ROSENBERG, L.C., KOONTZ, K.A. and FRED, K.F. 1984. Plasmodium gallinaceum : erythrocyte factor essential for zygote infection of Aedes aegypti. Exp. Parasitol., 57, 158-164.

- RUDZINSKA, M.A. and TRAGER, W. 1957. Intracellular phagotrophy by malarial parasites : an electron microscope study of P. lophurae. J. Protozool., 4, 190-199.
- RUDZINSKA, M.A. and TRAGER, W. 1968. The fine structure of trophozoites and gametocytes in P. coatneyi. J. Protozool. 15, 73-88.
- RUSSELL, P.F. and MOHAN, B.N. 1942. The immunization of fowls against mosquito-borne P. gallinaceum by injections of serum and inactivated homologous sporozoites. J. Exp. Med., 76, 477-495.
- SHAH, K. 1934. The periodic development of sexual forms of P. cathemerium in the peripheral circulation of canaries. Am. J. Hyg. 19, 392-403.
- SINDEN, R.E., CANNING, E.U. and SPAIN, P. 1976. Gametogenesis and fertilization in Plasmodium yoelii nigeriensis : a transmission electron microscope study. Proc. R. Soc. London B., 193, 55-76.
- SINDEN, R.E. 1978. Cell biology "rodent malaria" (Eds. Killick-Kendrick and Peters) Academic Press, New York, 85-168.
- SINDEN, R.E. 1982. Gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in vitro : an electron microscopic study. Parasitology 84, 1-11.
- SLOMIANNY, C. 1982. Contribution à l'étude ultrastructurale du processus de dégradation de l'hémoglobine chez P. chabaudi (LANDAU, 1965).  
Thèse de 3ème cycle, Université de Sciences et Techniques de Lille I.
- SMALLEY, M.E. 1976. Plasmodium falciparum gametocytogenesis in vitro. Nature (London) 264, 271-272.

- STERLING, C.R. 1972. Ultrastructural study of gametocytes and gametogenesis of Haemoproteus metchnikovi. J. Protozool. 19, 69-76.
- STERLING, C.R. and AIKAWA, M. 1973. A comparative study of gametocytes ultrastructure in avian haemosporidia. J. Protozool., 20, 81-92.
- TADASUKE, O., NAKABAYASHI, T., KRAMER, K.J., HUI, G. and SIDDIQUI, W.A. 1983. Electron microscope observation in cultured Plasmodium falciparum and infected erythrocytes after treatment with cyclic AMP in vitro. Biken. J. 26, 75-85.
- TALIAFERRO, L.G. 1925. Infection and resistance in bird malaria with special reference to periodicity and rate of reproduction of the parasites. Am. J. Hyg., 5, 742-789.
- VANDERBERG, J.P., NUSSENZWEIG, R.S. and MOST, H. 1968. Further studies on P. berghei, Anopheles stephensi-rodent system of experimental malaria. J. Parasitol., 54, 1009-1016.
- VANDERBERG, J.P. 1977. Plasmodium berghei : quantitation of sporozoites infected by mosquitoes feeding on a rodent host. Exp. Parasitol., 42, 169-181.
- VANDERBERG, J.P. and GWADZ, R.W. 1980. Mosquitoes transmission of Plasmodia. In "Malaria", vol. 2 (ed. R. Kreier), p. 172-187. Academic Press, New York.

- VERNES, A., DEI-CAS, E., DUTOIT, E., MAUROIS, P., GENTILINI, J.L. et  
BIGUET, J. 1980. Modification du Lipoproteinogramme au cours  
du paludisme humain. Pathol. Biol., 28, 457-460.
- VIVIER, E. 1967. Observations ultrastructurales sur l'enveloppe nucléaire  
et ses "proes" chez les sporozoaires. J. Microscopie, 6, 371-390.
- WERY, M. 1968. Studies on the sporogony of the rodent malaria parasite.  
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 46, 755-788.

## LISTE D'ABREVIATIONS

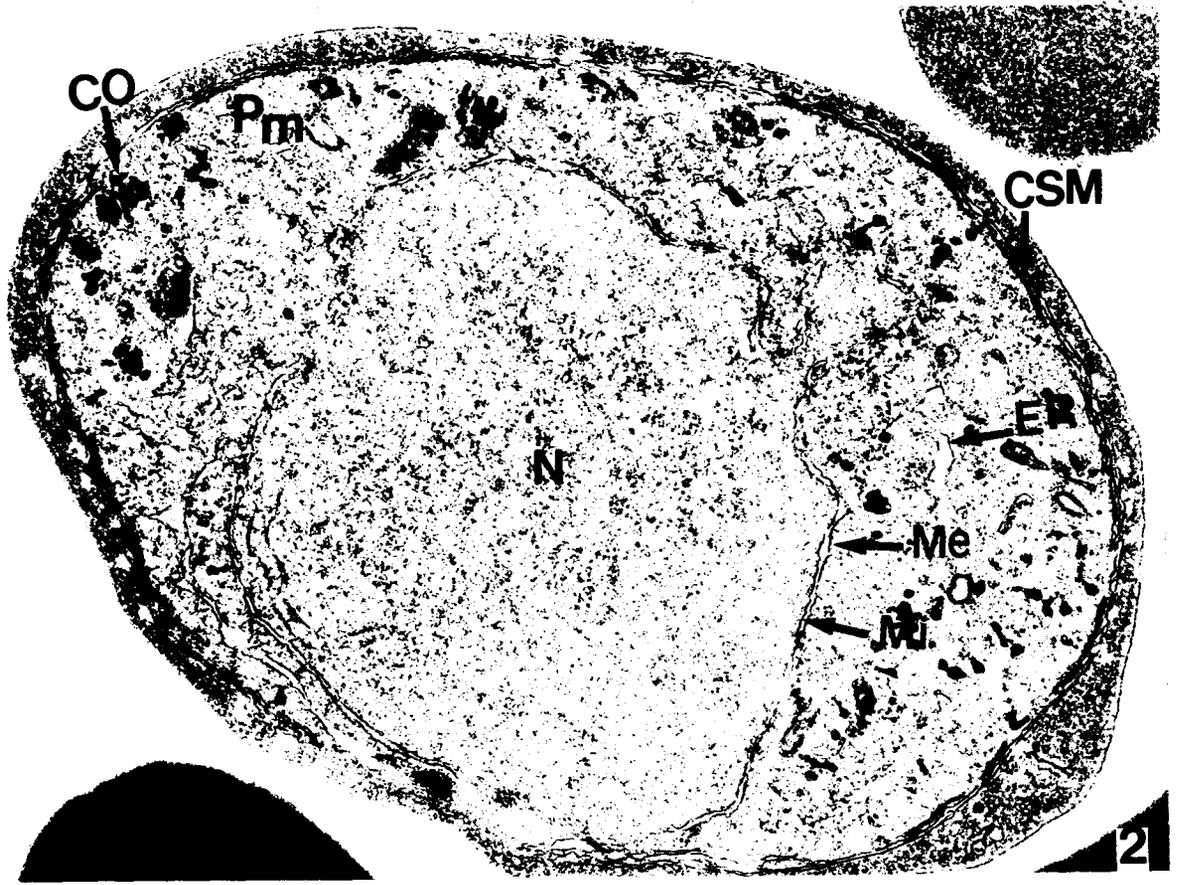
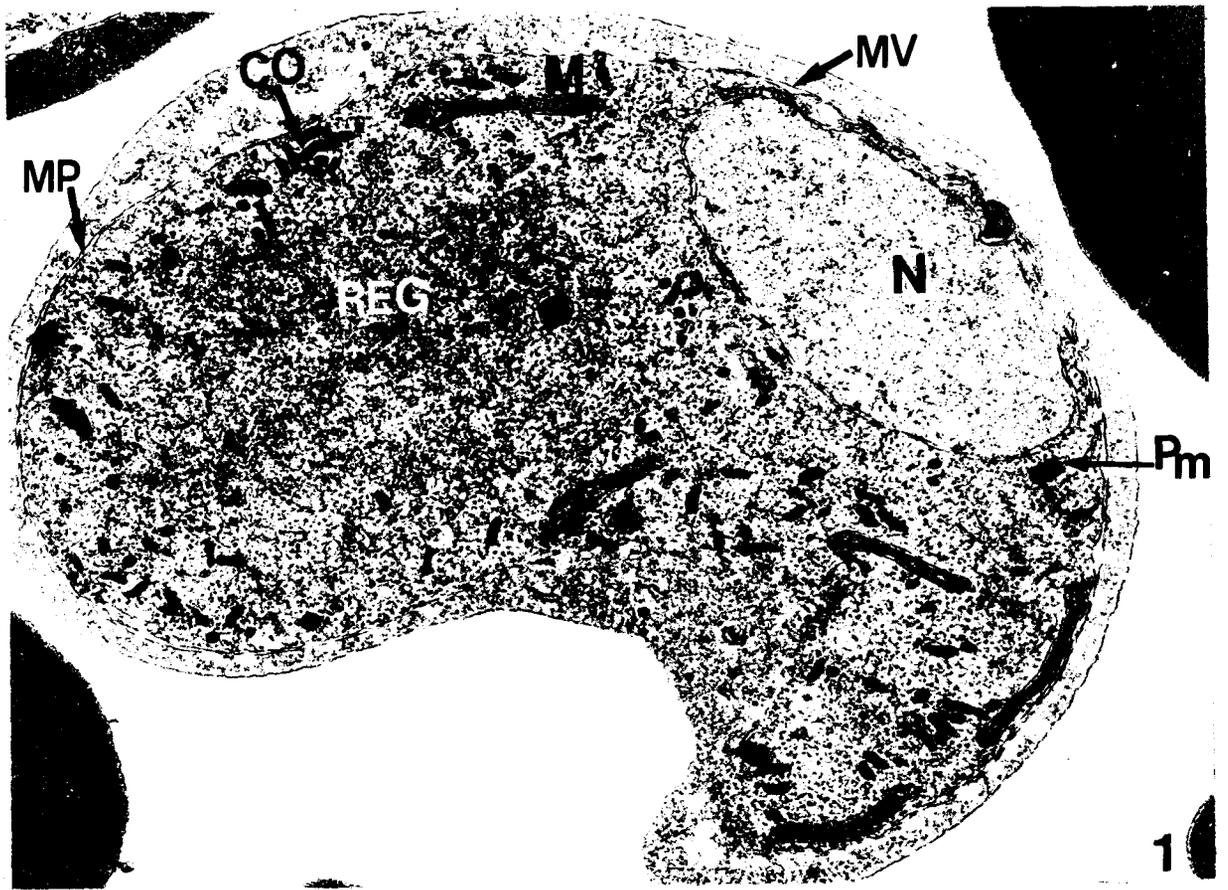
- A : axonème
- CO : corps osmiophile
- Csm : complexe sous-membranaire
- Ct : cytostome
- D : granules denses
- E : érythrocytes
- Em : empilement membranaire
- M : mitochondrie
- Me : membrane nucléaire externe
- Mi : membrane nucléaire interne
- MP : membrane du parasite
- MV : membrane de la vacuole parasitophore
- mSP : microtubule sous-pelliculaire
- N : noyau
- Pc : pore nucléaire complexe
- Pm : pigment malarique
- PR : polyribosomes
- PS : pore nucléaire simple
- R : ribosomes
- RE : réticulum endoplasmique agranulaire
- REG : réticulum endoplasmique granulaire
- V : vésicules golgiennes
- VC : vacuole cystostomale
- VN : vacuole nutritive

Gamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis au 3ème jour de l'infestation

Figure 1 : Vue d'un macrogamétocyte : monoribosomes, corps osmiophiles, mitochondries et pigment malarique sont abondants dans le cytoplasme. Le réticulum endoplasmique granulaire est bien développé. x 34 000

Figure 2 : Vue d'ensemble d'un microgamétocyte : contrairement à la figure précédente, le cytoplasme est pauvre en ribosomes, en réticulum endoplasmique et en mitochondries. En revanche, le noyau est nettement plus grand que chez le macrogamétocyte. Notez la présence d'un complexe sous-membranaire discontinu immédiatement en-dessous du plasmalemme.

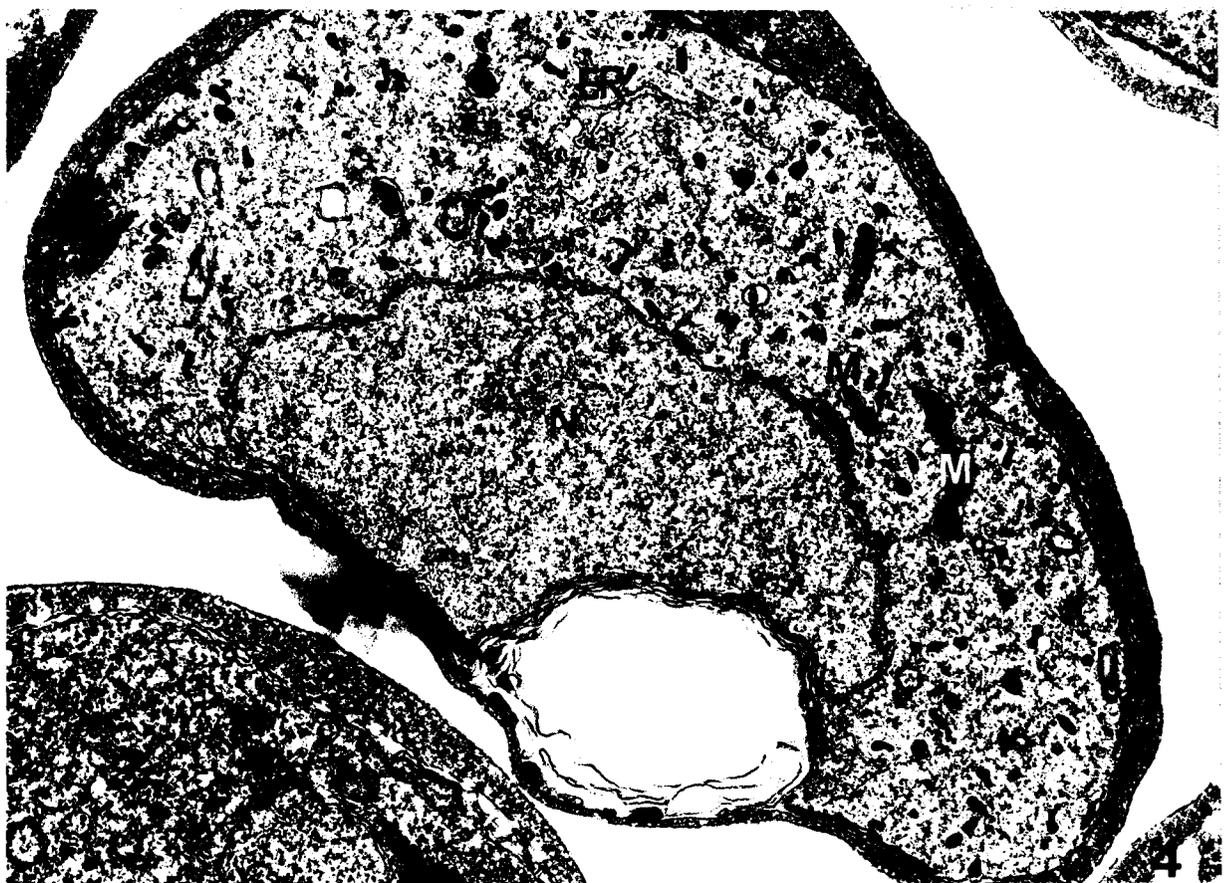
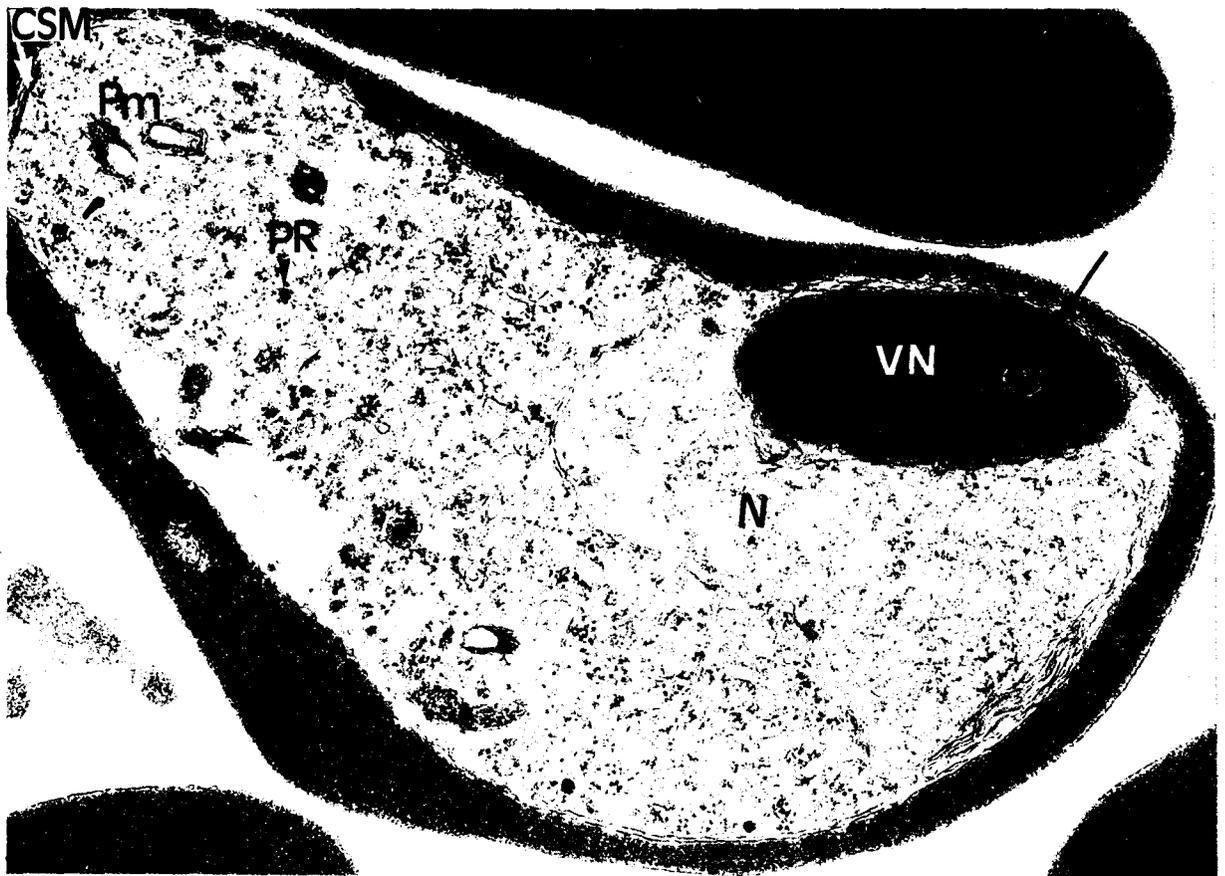
x 31 000



### Microgamétocytes de P. yoelii nigeriensis

Figure 3 : Trois jours après l'infestation : notez la rareté des corps osmiophiles et du pigment malarique. Les polyribosomes sont nettement visibles au sein d'un cytoplasme peu dense. La grande vacuole paranucléaire (flèche) présente un aspect assez typique avec un contenu qui s'apparente à celui du cytoplasme érythrocytaire. x 30 000

Figure 4 : Cinq jours après l'infestation, les corps osmiophiles sont nombreux et régulièrement répartis dans le cytoplasme. Notez la présence d'empilements membranaires au sein d'un espace optiquement vide qui pourrait correspondre à un élargissement localisé de la vacuole parasitophore. x 28 000



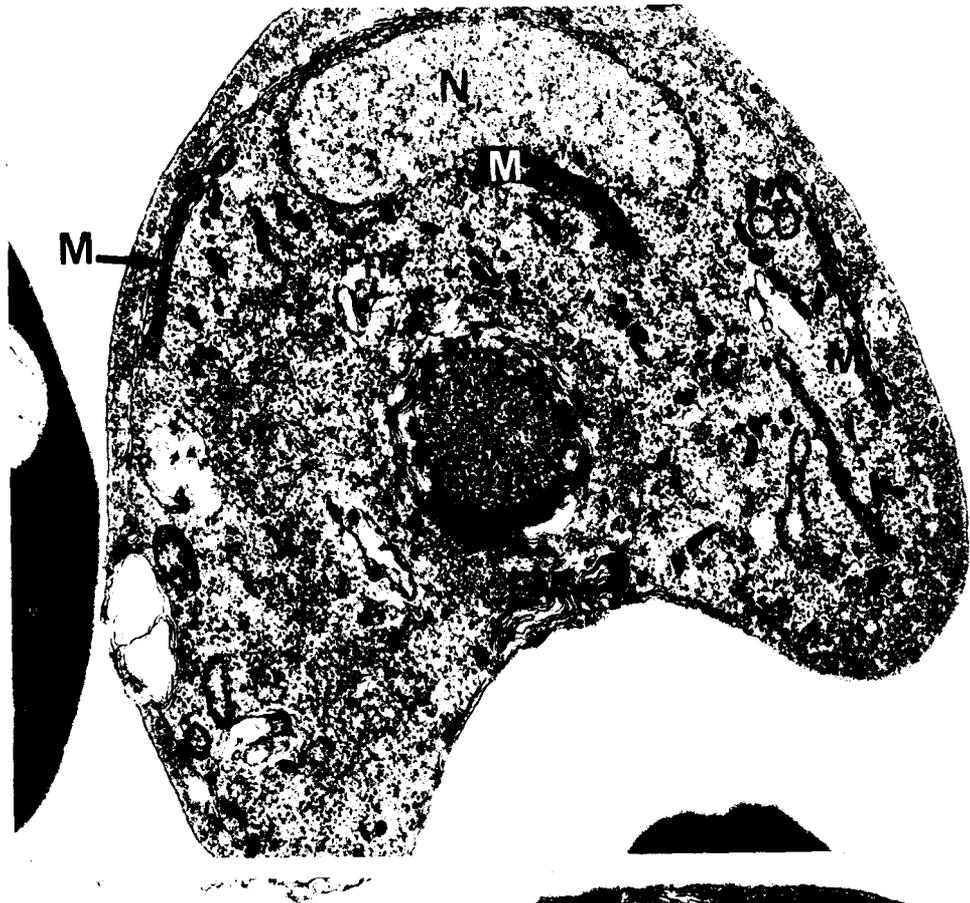
Gamétocytes de *P. yoelii nigeriensis* 5 jours après l'infestation

Figure 5 : Macrogamétocyte montrant des mitochondries à localisation périnucléaire et sous-pelliculaire. Les empilements membranaires sont abondants. Les cristaux de pigment malarique apparaissent intravésiculaires.

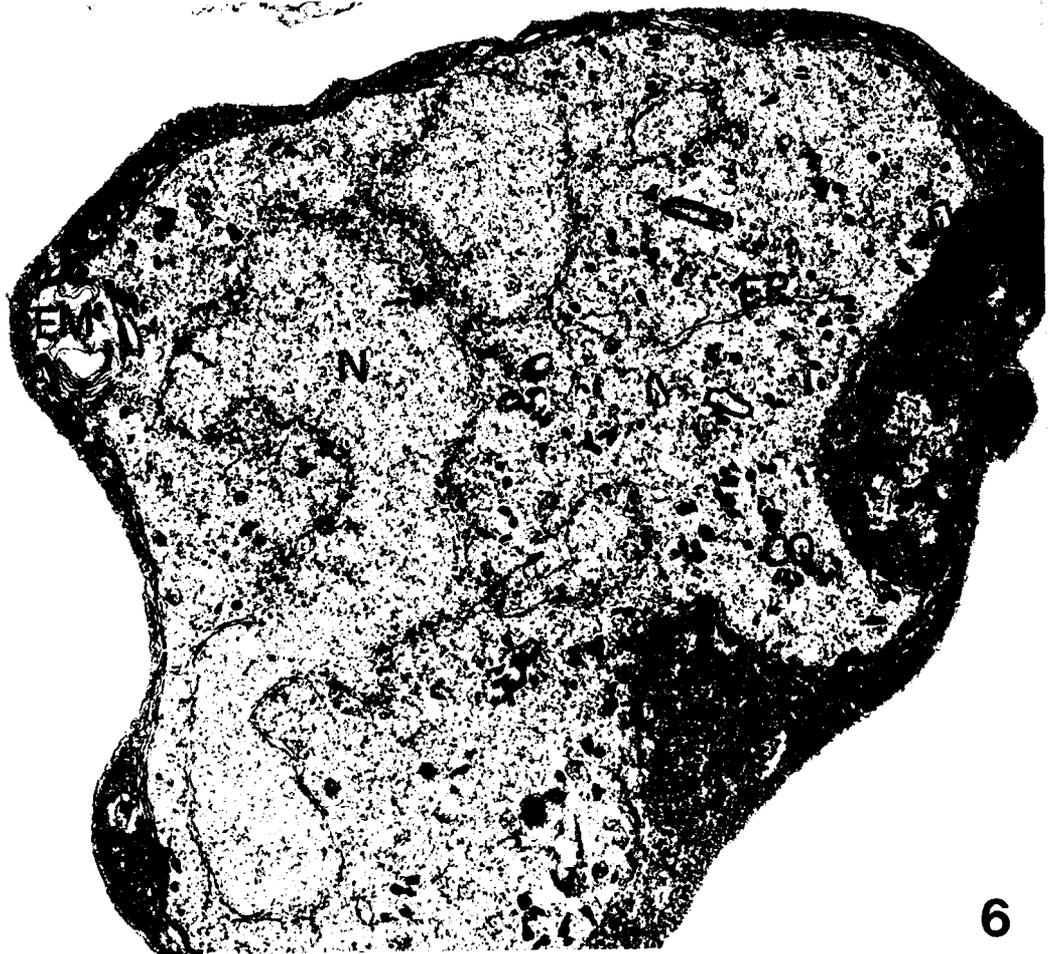
x 22 000

Figure 6 : Microgamétocyte. Le noyau est ici polylobé et présente des pores complexes (flèche).

x 25 000



5



6

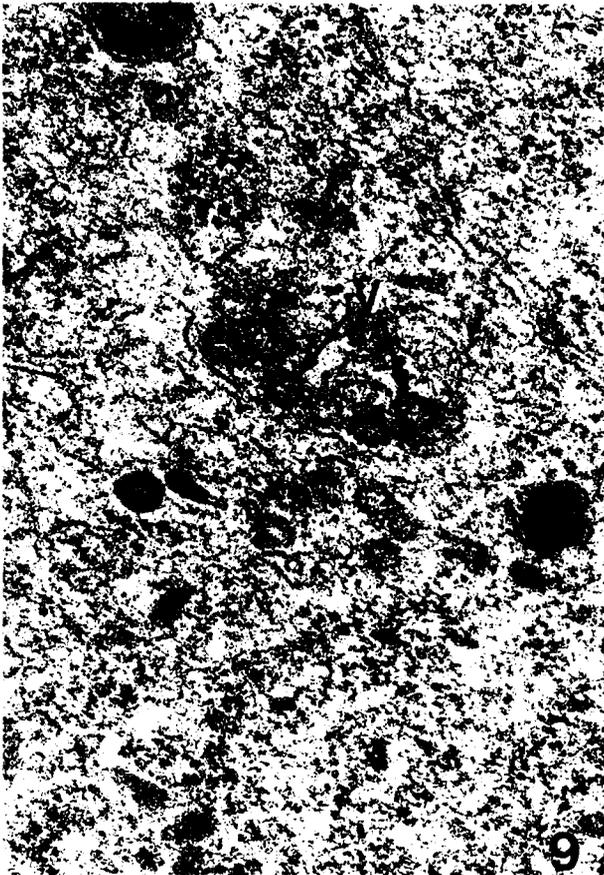
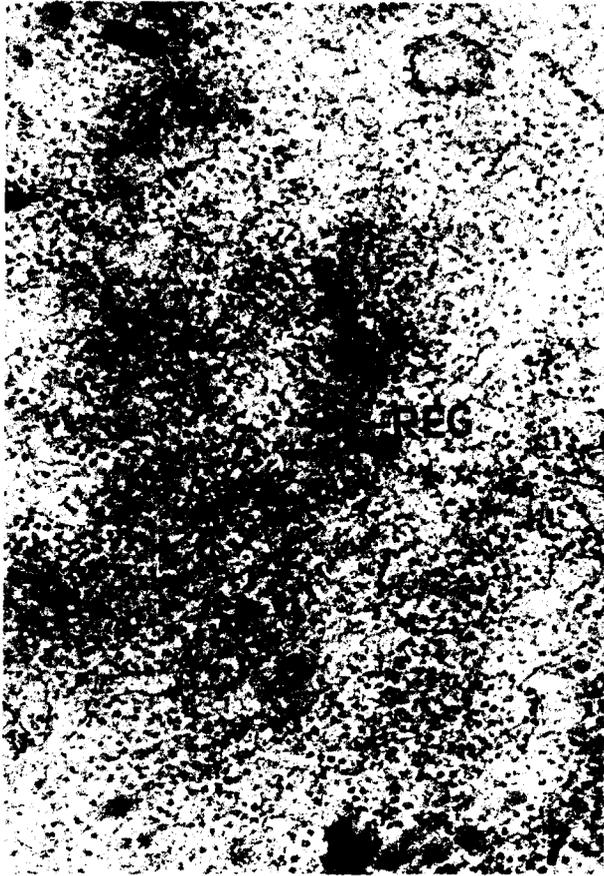
### Gamétocytes de *P. yoelii nigeriensis*

Figure 7 : Portion de cytoplasme d'un macrogamétocyte montrant le réticulum endoplasmique granulaire développé (3 jours après l'infestation). x 59 000

Figure 8 : Macrogamétocyte. Les granules denses sont répartis ici dans l'ensemble du noyau. Notez l'empilement de lames du réticulum endoplasmique granulaire accolées d'un côté à l'enveloppe nucléaire et de l'autre à une mitochondrie (3 jours après l'infestation). x 47 000

Figure 9 : Portion de cytoplasme d'un microgamétocyte montrant un amas de petites vésicules à contenu dense en relation avec le réticulum endoplasmique. Ces vésicules pourraient constituer l'appareil de Golgi (5 jours après l'infestation). x 72 000

Figure 10 : Microgamétocyte. Vue d'un cytotome en relation avec une vacuole cytotomale (5 jours après l'infestation). x 58 000



Macrogamétocytes de *P. yoelii nigeriensis* : vues de détail

Figure 11 : Mitochondries en voie de vacuolisation (4 jours après l'infestation). x 28 000

Figure 12 : Mitochondrie sous-pelliculaire en relation avec du réticulum endoplasmique granulaire (5 jours après l'infestation). x 26 000

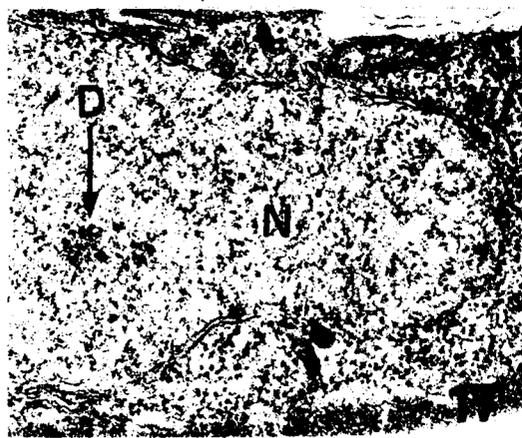
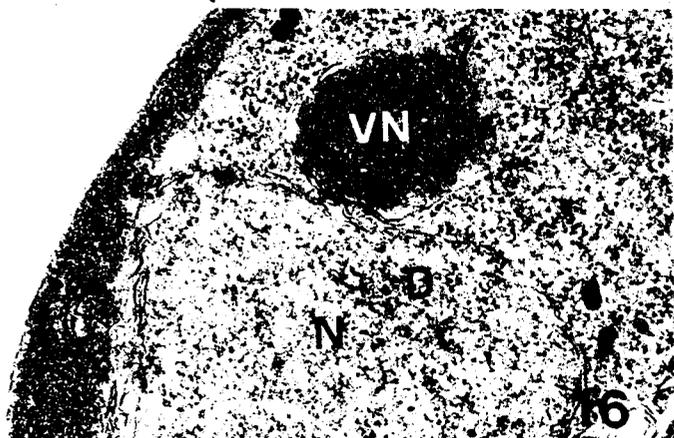
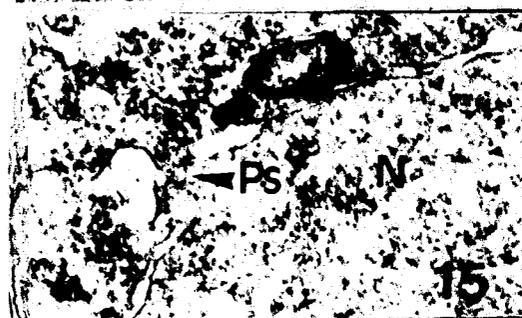
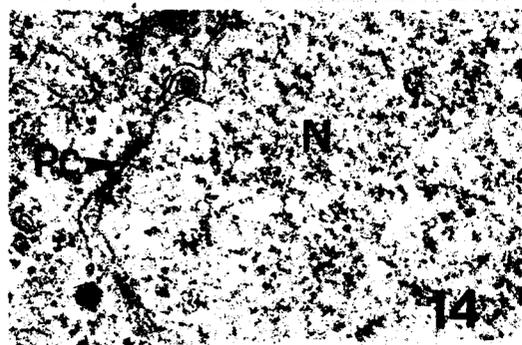
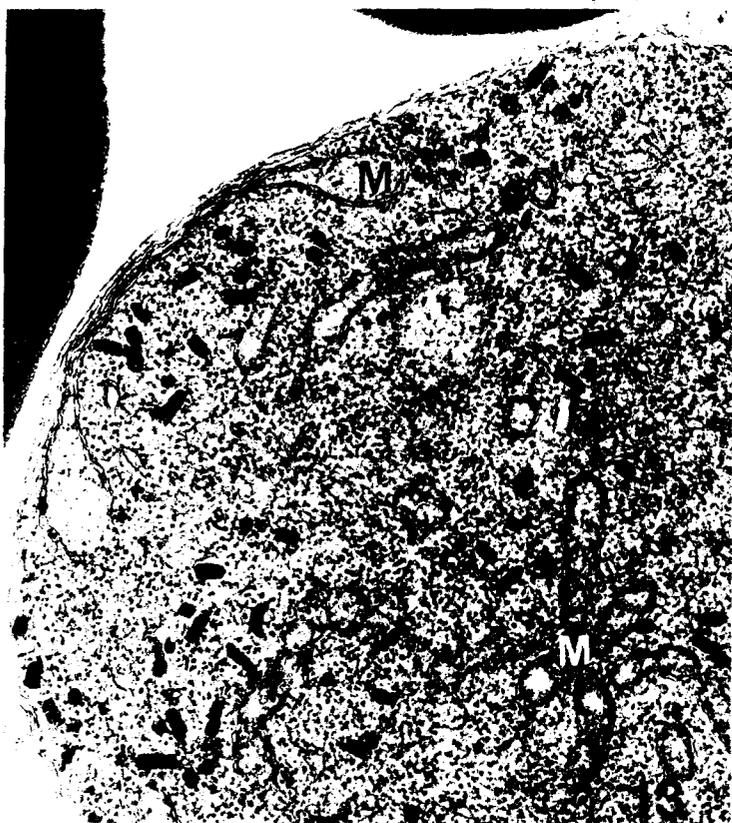
Figure 13 : Amas de mitochondries dans le cytoplasme (5 jours après l'infestation). x 28 000

Figure 14 : Pore nucléaire complexe (5 jours après l'infestation). x 60 000

Figure 15 : Pore nucléaire simple (4 jours après l'infestation). x 63 000

Figure 16 : Vacuole nutritive périnucléaire (5 jours après l'infestation). x 40 000

Figure 17 : Granules denses dans le noyau (5 jours après l'infestation). x 40 000



Gamétocytes de P. yoelii nigeriensis au 5ème jour de l'infestation : vues de détail.

Figure 18 : Macrogamétocyte. De multiples vacuoles vides entourées par une seule membrane. Notez la répartition périvacuolaire des corps osmiophiles et des mitochondries.

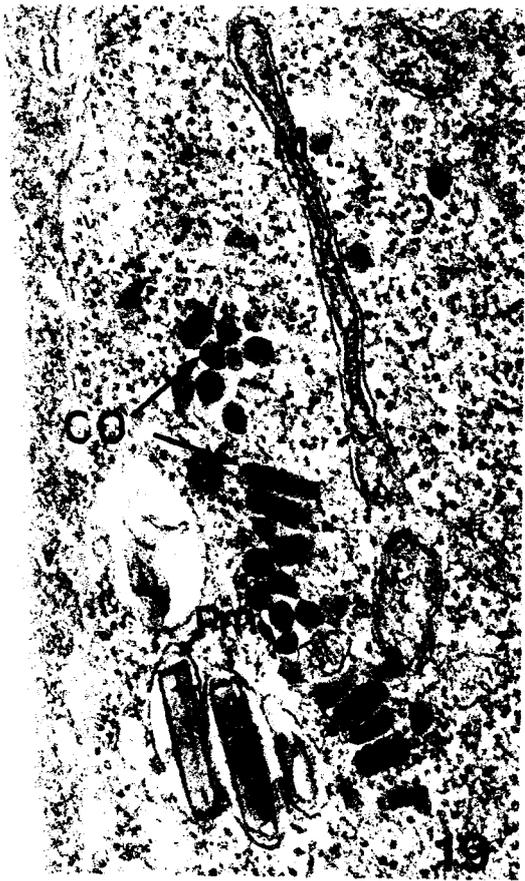
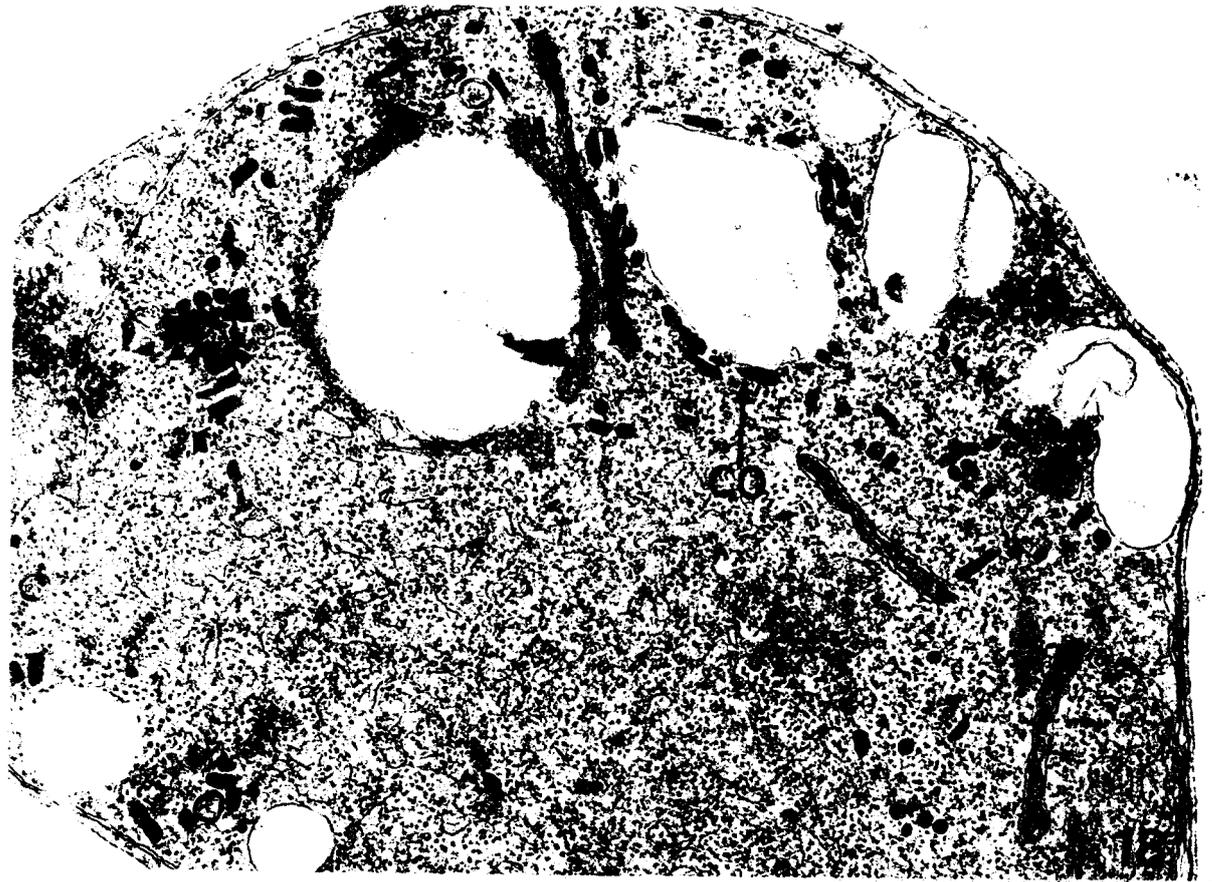
x 27 000

Figure 19 : Macrogamétocyte. Vue de détail du pigment malarique, des corps osmiophiles et des mitochondries.

x 52 000

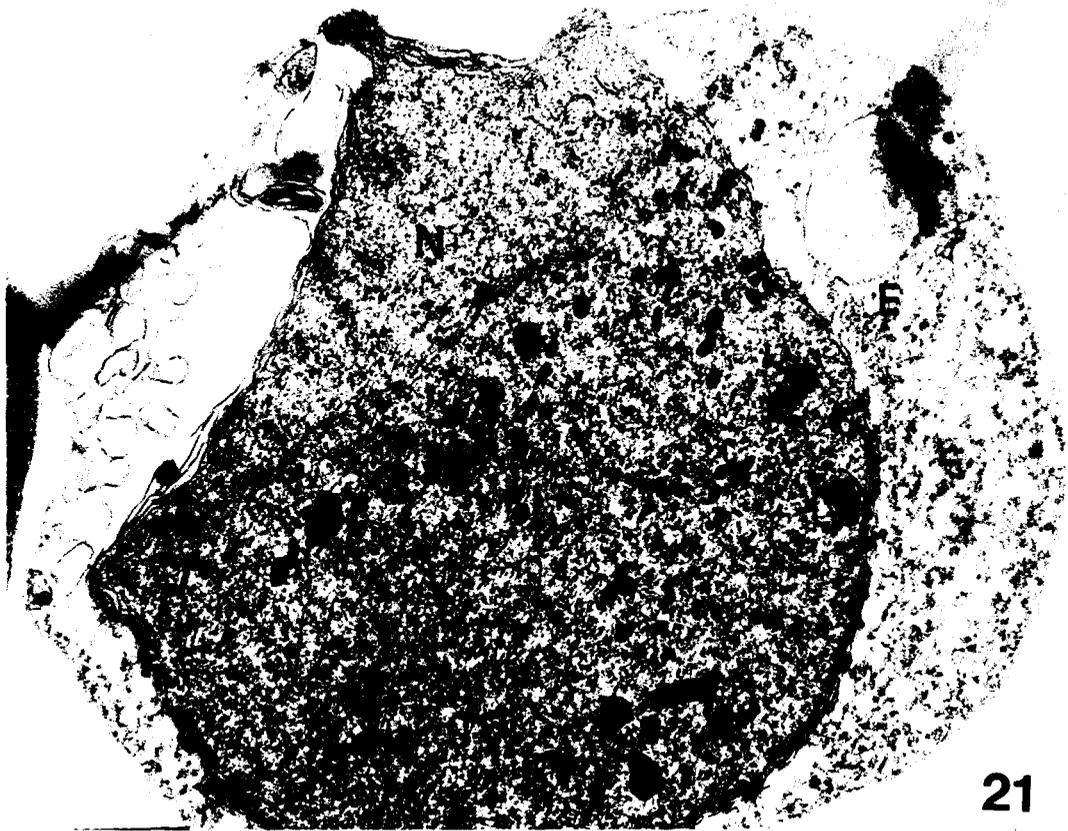
Figure 20 : Microgamétocyte. Présence d'enroulements membranaires dans le stroma érythrocytaire.

x 35 000

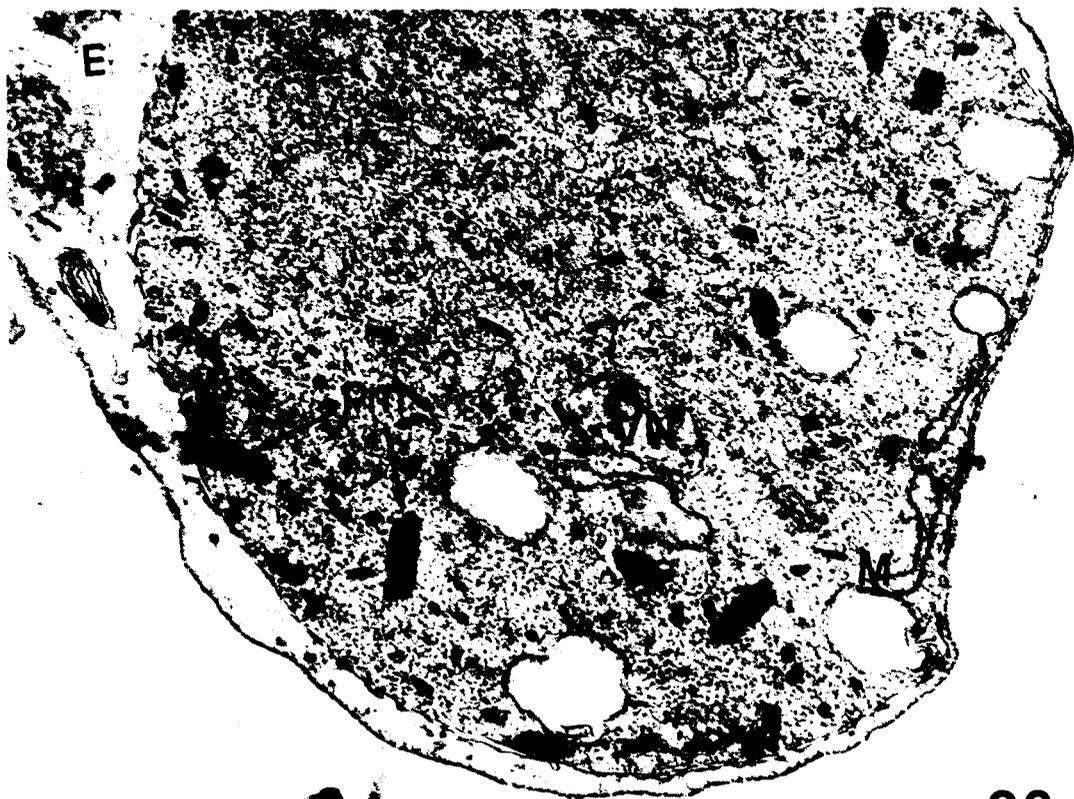


Gamétocytes de P. yoelii nigeriensis : modifications  
remarquables du stroma érythrocytaire

Figures 21 et 22 : Microgamétocyte (Fig. 21) et macrogamétocyte (Fig. 22). Cinq jours après l'infestation. Remarquez l'aspect du stroma érythrocytaire en voie de lyse. Dans la Figure 22, noter le processus de vacuolisation des mitochondries déjà montré dans un état plus avancé dans la Figure 11. x 35 000



21



22

P. yoelii nigeriensis : microgamétocytes en début d'activation

Figures 23 et 24 : Axonèmes coupés transversalement et logés dans une dépression nucléaire. Fig. 23 x 27 000

Fig. 24 x 61 000

Figure 25 : Autre vue d'axonèmes en position sous-pelliculaire et périnucléaire. x 45 000

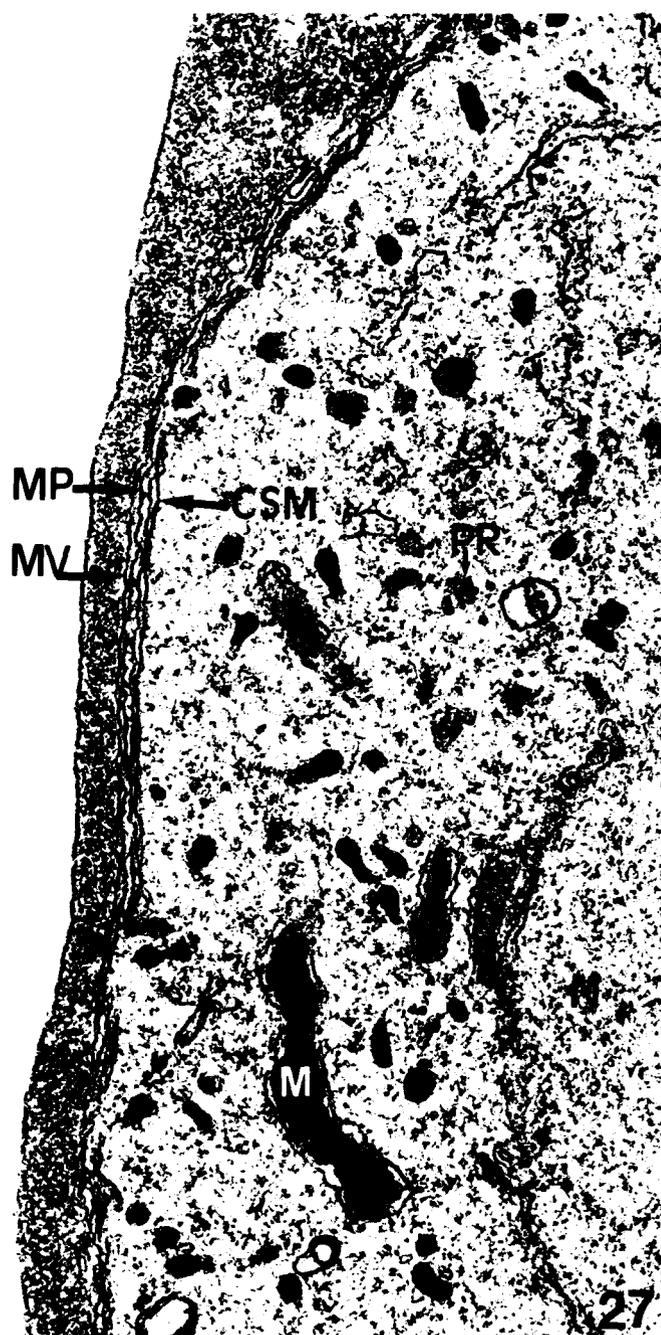
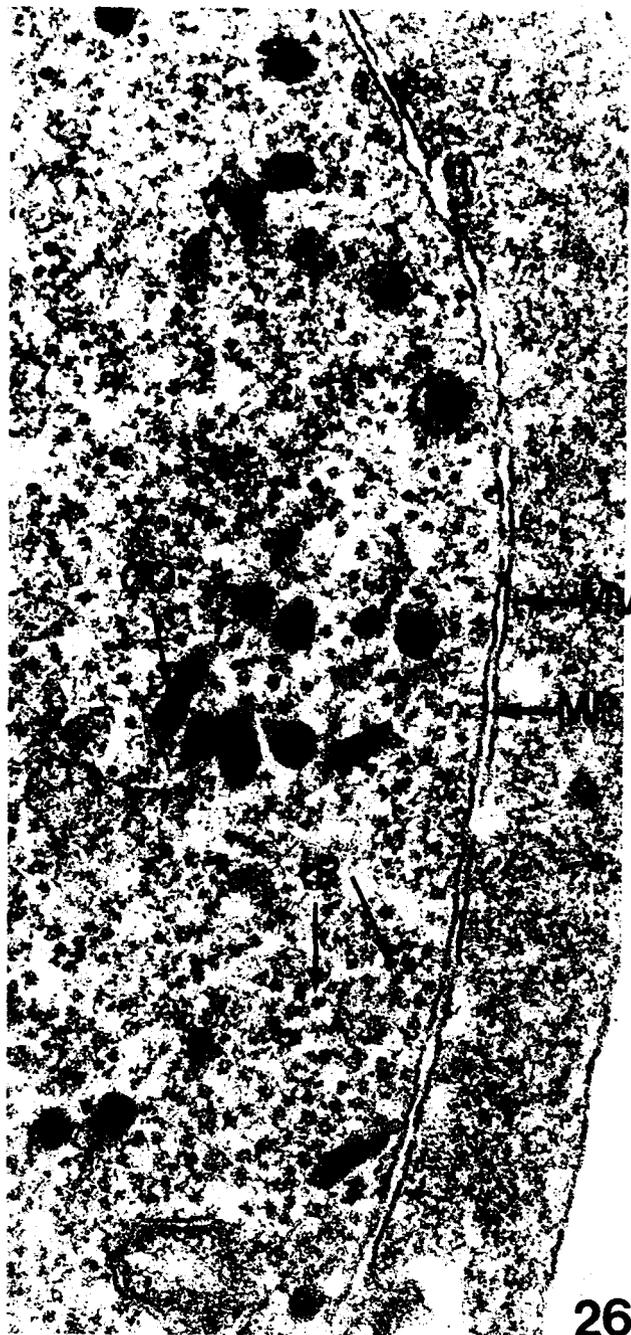


Membrane des gamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis :

vue de détail

Figure 26 : Macrogamétocyte : membrane de la vacuole parasitophore  
et membrane du parasite. x 80 000

Figure 27 : Microgamétocyte : membrane sous-pelliculaire. x 56 000

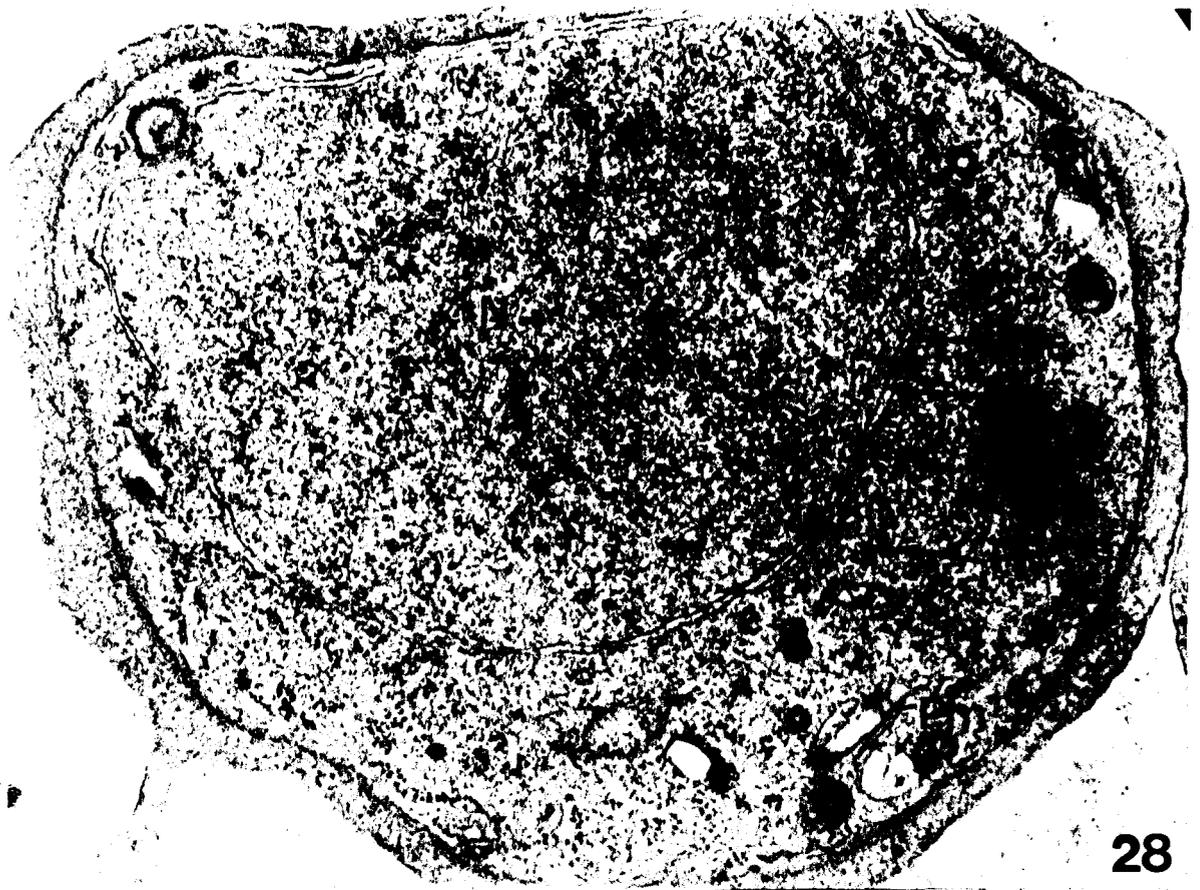


Gamétocytes de P. knowlesi

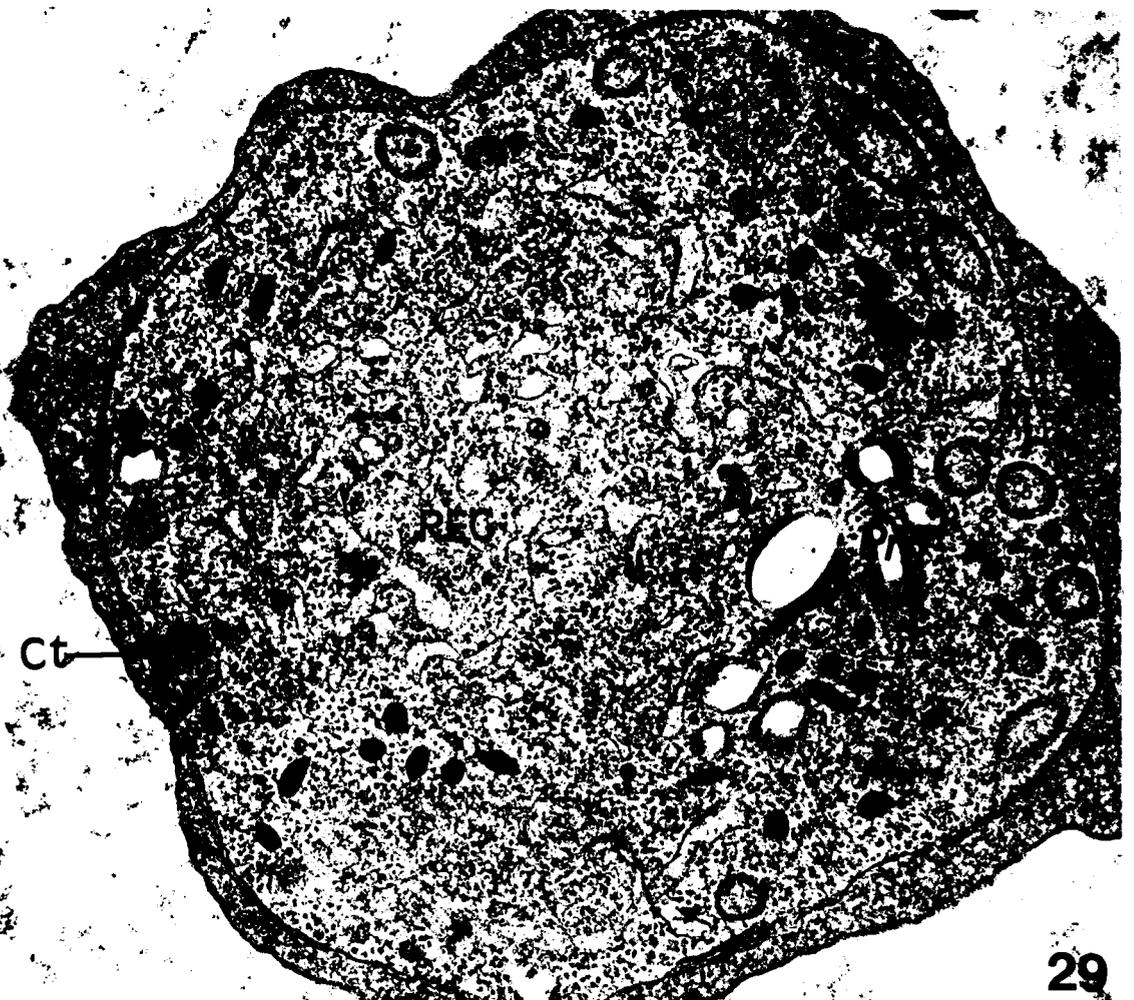
Figure 28 : Vue d'un microgamétocyte. Pigment malarique et polyribosomes sont abondants dans le cytoplasme du parasite. Notez la présence de granules denses dispersés dans le nucléoplasme. x 36 000

Figure 29 : Macrogamétocyte : monoribosomes, corps osmiophiles, mitochondries et pigment malarique sont abondants dans le cytoplasme. Le réticulum endoplasmique granulaire est bien développé. Notez la présence d'un cytosome.

x 30 000



28



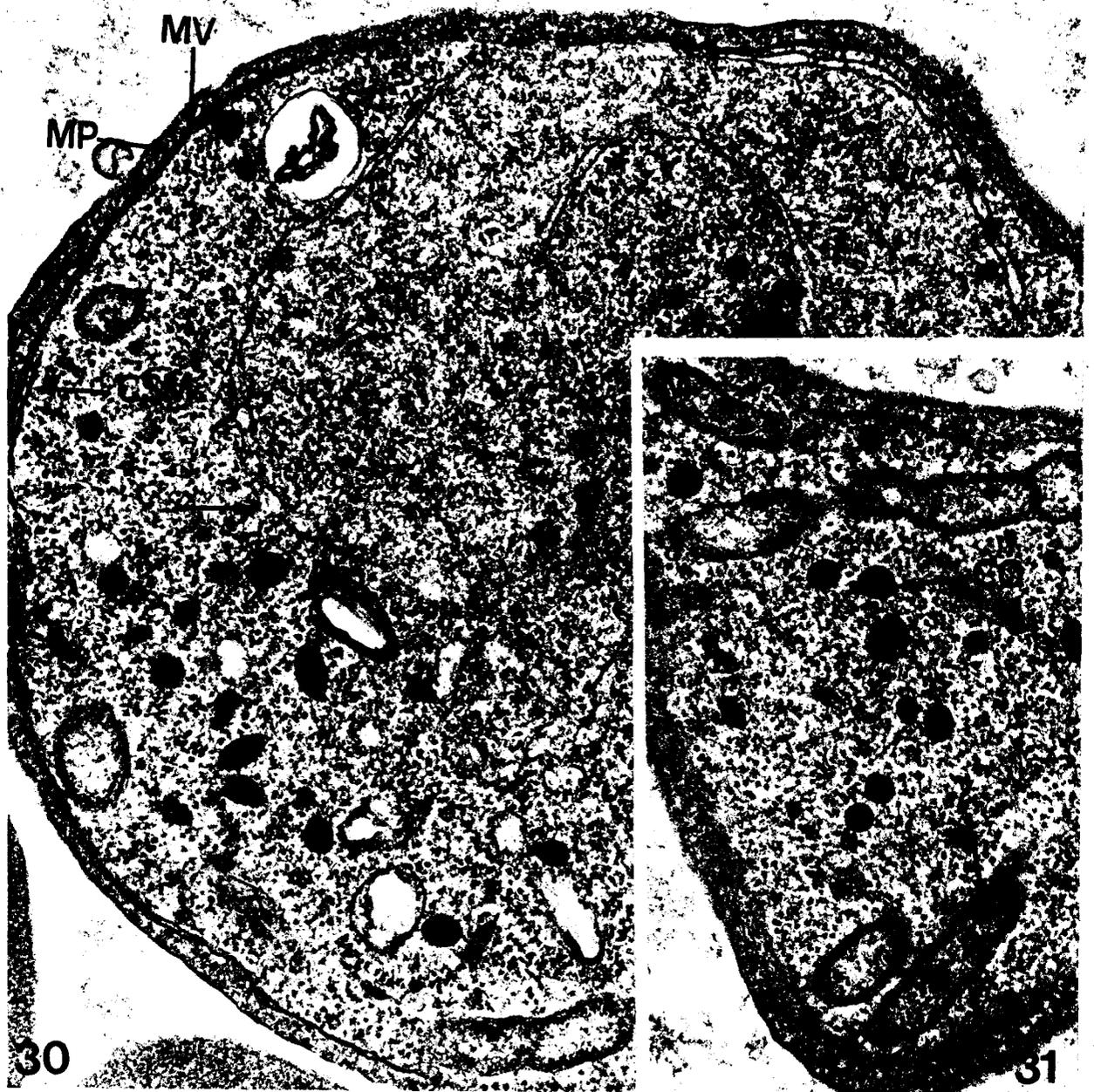
Ct

29

### Gamétocytes de P. knowlesi

Figure 30 : Macrogamétocyte : le noyau est haltérimorphe. Notez la continuité qui semble s'établir entre le feuillet externe de l'enveloppe nucléaire et le REG. x 40 000

Figure 31 : Amas de mitochondries : le feuillet interne (flèche) semble donner lieu à des ébauches de crêtes. x 40 000



30

31

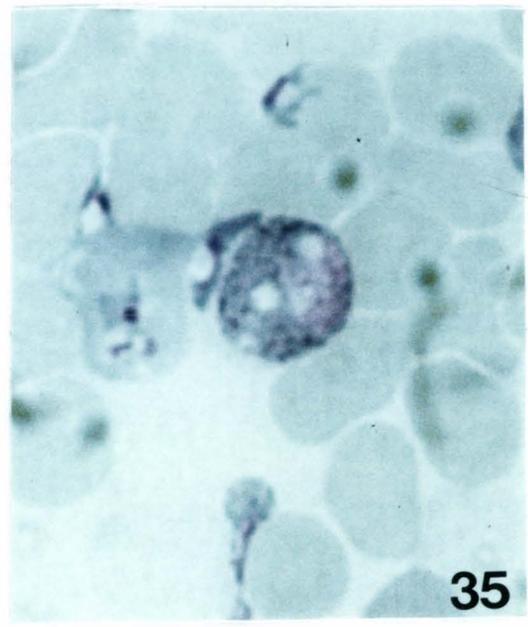
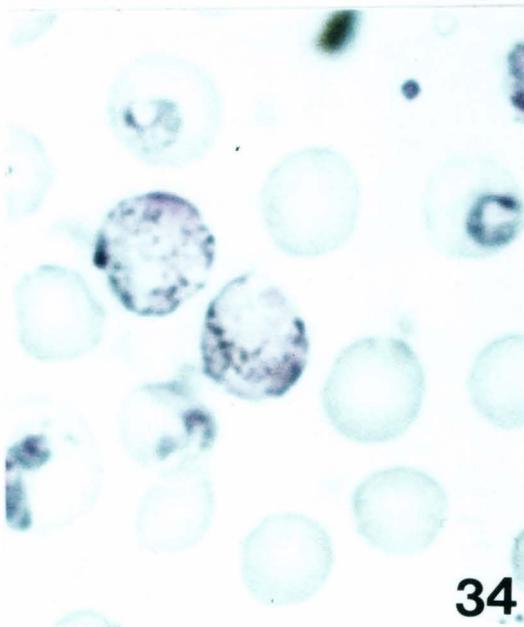
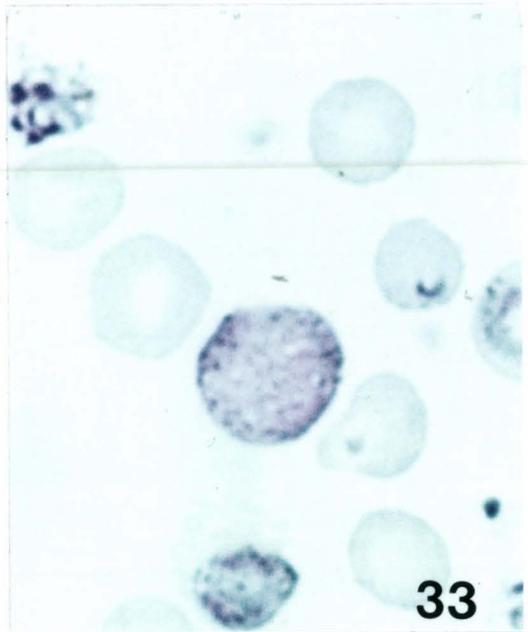
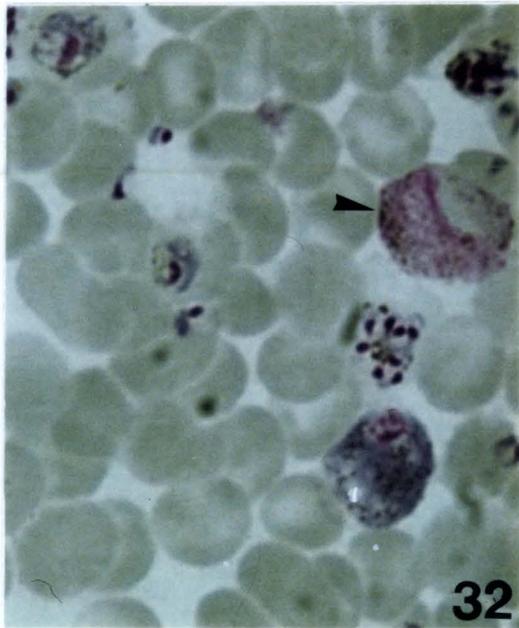
Types de microgamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis

Figure 32 : Microgamétocyte de type 0,3 jours après l'infestation  
(flèche). Macrogamétocyte jeune. x 5 600

Figure 33 : Microgamétocyte de type I au 5ème jour d'infestation. x 8 000

Figure 34 : Microgamétocytes de type III, au 5ème jour d'infestation. x 8 200

Figure 35 : Microgamétocyte de type III, au 3ème jour d'infestation. x 7 400



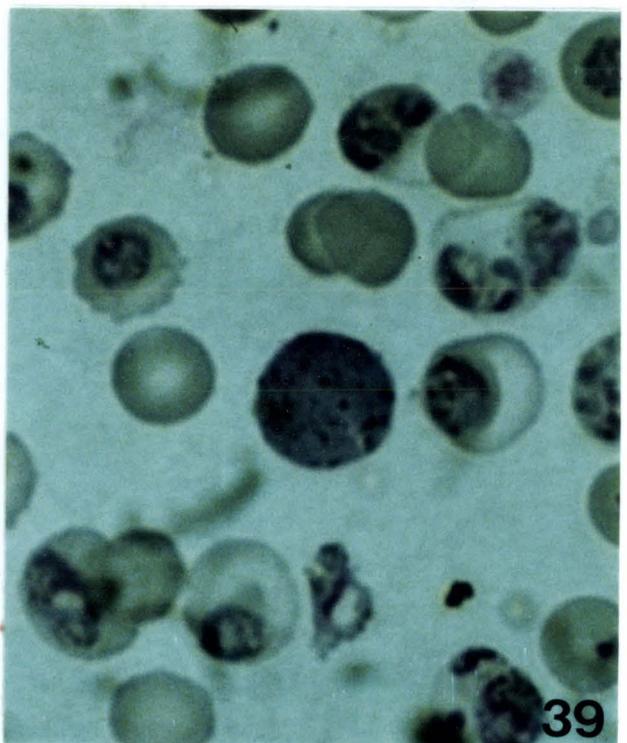
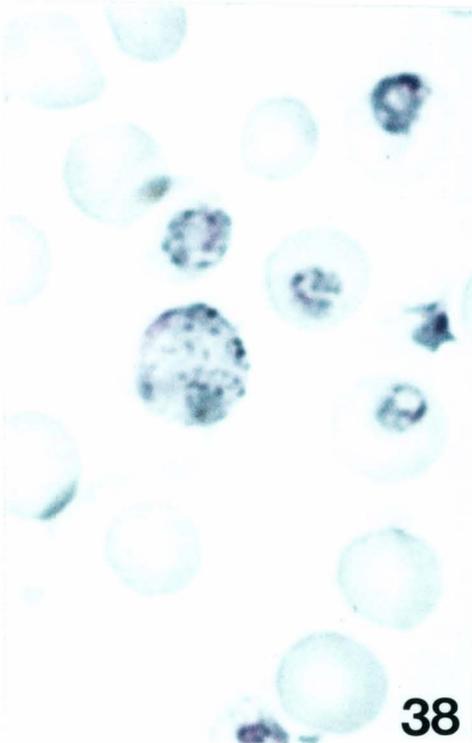
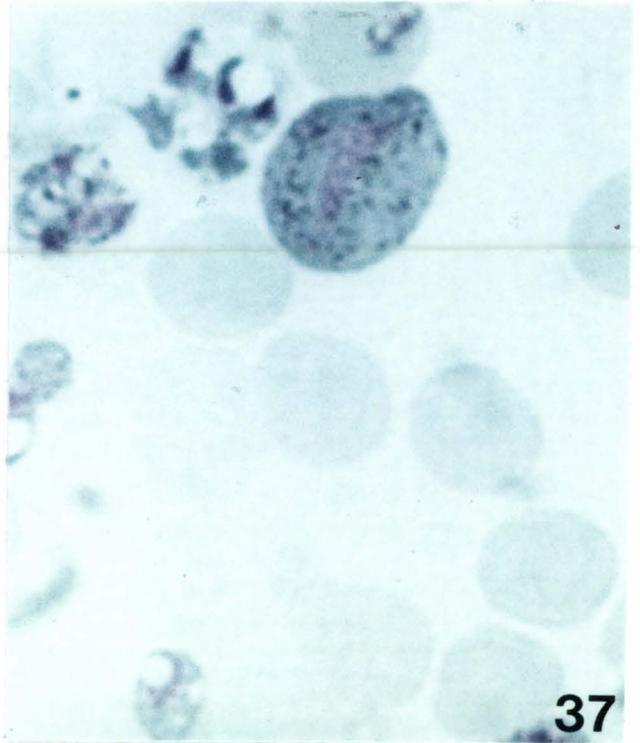
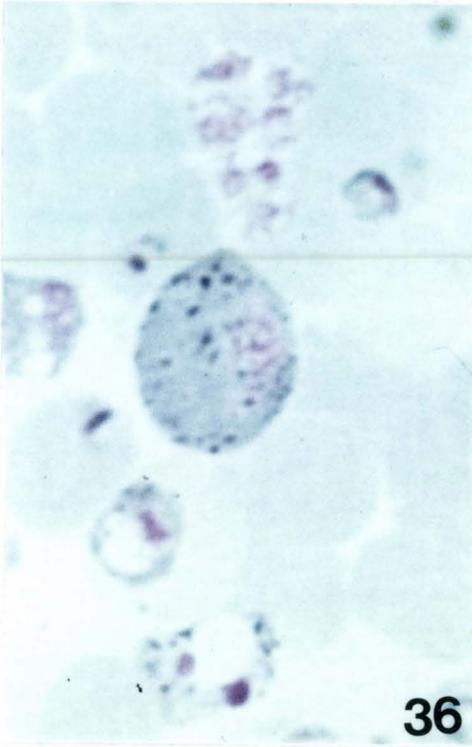
Types de macrogamétocytes de Plasmodium yoelii nigeriensis

Figure 36 : Macrogamétocyte de type 0, au 3ème jour  
d'infestation. x 8 700

Figure 37 : Macrogamétocyte de type I, au 5ème jour  
d'infestation. x 8 200

Figure 38 : Macrogamétocyte de type II, au 5ème jour  
d'infestation. x 7 500

Figure 39 : Macrogamétocyte de type III, au 5ème jour  
d'infestation. x 8 000



Schizontes, sporozoïtes, ookinetes et oocystes de

Plasmodium spp.

Figure 40 : Schizontes hépatiques de P. berghei x 3 500

Figure 41 : Sporozoïtes de P. yoelii nigeriensis dans  
la glande salivaire d'Anopheles femelle x 7 400

Figure 42 : Ookinete de P. yoelii nigerriensis 24 heures  
après le repas sanguin. x 7 200

Figure 43 : Oocystes de P. yoelii nigeriensis dans l'intestin  
moyen d'un moustique gorgé (6 jours auparavant)  
sur une souris, 70 à 77 heures après l'inocula-  
tion de sporozoïtes par piqûre de moustique  
x 800

Figure 44 : L'intestin moyen de moustique gorgé (6 jours  
auparavant) sur une souris infestée par voie  
transfusionnelle depuis 3 jours.  
x 720



41



42



43

44



Gamétocytes de P. knowlesi

Figures 45 à 47 : Différentes morphologies de macrogamétocytes chez  
P. knowlesi.      x 8 500,      x 9 800,      x 10 000

Figure 48 : Microgamétocyte de P. knowlesi.      x 7 000

