



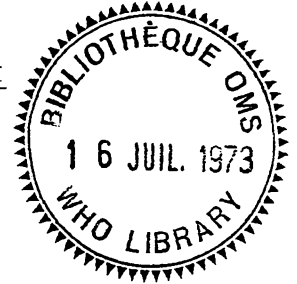
WORLD HEALTH ORGANIZATION

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

a 66168

NOTE SUR LA PREPARATION D'UN SERUM ANTI-PLASMODIUM BERGHEI BERGHEI  
AVEC LA SOURIS ET LE LAPIN<sup>1</sup>

par

J. Gillet<sup>2</sup> et F. Herman<sup>2</sup>

Au cours de nos recherches sur le paludisme congénital de la souris et afin de détecter le parasite par immunofluorescence, nous avons été amenés à préparer un antiserum contre Plasmodium berghei berghei (Vincke & Lips, 1948) en utilisant soit la souris, soit le lapin. Nous exposons brièvement ci-après la technique adoptée pour la préparation de l'anti-gène avec ces animaux ainsi que les résultats obtenus.

Plusieurs auteurs travaillant sur rongeurs (rat ou souris) ont utilisé les radiations ionisantes en vue soit d'atténuer la virulence du plasmodium (Bennison & Coatney, 1945; Ceithaml & Evans, 1946; Corradetti et coll., 1966, 1969; Wellde & Sadun, 1967, 1968), soit de tuer le parasite (Ceithaml & Evans, 1946; Corradetti et coll., 1966). Ayant d'abord en vue la première alternative, nous avons soumis des formes érythrocytaires de P. b. berghei (souche Anka) à des doses hebdomadaires successives de 5000 r. La source d'irradiation était constituée par une bombe au Cesium (<sup>137</sup>Cs) délivrant 100 000 r à l'heure. Le parasite contenu dans du sang total hépariné infecté à raison de 10 % des globules rouges subissait chaque semaine une irradiation de 5000 r à l'issue de laquelle 50 000 plasmodiums étaient inoculés par voie péritonéale à des souris adultes neuves de race génétiquement pure GIF/TB particulièrement sensible. Le parasite reste virulent après une irradiation totale de 35 000 r et invariablement mortel après une survie de 13 à 15 jours, la période de prépatence étant quelque peu allongée (cinq jours en moyenne au lieu de trois jours). Il faut atteindre une dose cumulative totale, égale ou supérieure à 36 164 r, pour observer que l'inoculation cesse d'être infectante chez les souris. Avec cette technique d'irradiations successives, il n'a pas été possible d'obtenir une atténuation de P. b. berghei qui reste pleinement actif jusqu'à une dose cumulée déterminée pour être ensuite tué.

Etant donné les échecs de nos tentatives d'atténuation progressive du parasite, nous avons administré à des parasites érythrocytaires une charge totale unique d'irradiation de 30 000 r, la dose de 20 000 r s'avérant insuffisante pour inactiver notre souche de plasmodium. Après irradiation, le sang total hépariné était injecté par voie intrapéritonéale, la concentration étant calculée de façon à obtenir 200 millions de parasites dans environ 0,5 ml. Au total, les souris en expérience reçurent 11 inoculations par voie péritonéale à raison de deux par semaine. Nous donnons ci-après les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte avec le mélange de sérum prélevé chez ces souris respectivement après 7 et 11 inoculations.

<sup>1</sup> Recherche effectuée avec un subside de l'Organisation mondiale de la Santé.

<sup>2</sup> Laboratoire de parasitologie, Ecole de Santé publique de l'Université catholique de Louvain, 4, Clos Chapelle aux Champs, 1200 Bruxelles (Dir. J. Gillet).

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

TABLEAU I

Titre de dilution	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400
Après 7 inoculations	+	+	0	-	-
Après 11 inoculations	++	++	++	+	0

Les résultats obtenus après sept inoculations sont insuffisants; ils sont un peu meilleurs après 11 inoculations. Toutefois, dès la huitième injection, la résorption de l'inoculum est mauvaise et un certain nombre de souris périssent par infection abdominale. Outre que le titre actif n'est pas très élevé, la quantité d'antisérum obtenu par cette technique est réduite et sans proportion avec le travail effectué.

Compte tenu de l'insuffisance des résultats obtenus avec des souris, nous nous sommes rabattus sur l'inoculation répétée à des lapins d'antigène frais à très forte dose et si possible vivant. Il nous fut fourni par des souris héparinées (30 Un. dans 0,1 ml) présentant au moins 30 % des globules rouges parasités, concentration généralement obtenue six jours après l'inoculation de 5 millions de plasmodiums par voie péritonéale. Le sang prélevé par ponction cardiaque est récolté dans un flacon contenant 600 Un. d'héparine (2 ml) afin d'écartier tout risque de coagulation.

Dans un premier temps, nous avons essayé d'obtenir une suspension aussi pure que possible d'érythrocytes parasités en éliminant au maximum les autres éléments figurés du sang. A cette fin, 7 ml du mélange polysaccharose-métrizoate de sodium (24 volumes de polysaccharose à 9 % et 10 volumes de métrizoate de sodium à 33,9 %) ont été déposés dans le fond d'un tube à centrifugation puis 12 ml de sang complet hépariné y ont été versés lentement par dessus en évitant tout mélange. Après une centrifugation à 2200 tours/minute, pendant 30 minutes, on obtient dans le tube différentes couches bien séparées qui se présentent de bas en haut dans l'ordre suivant : culot de globules rouges parasités ou non, une couche de polynucléaires sans séparation bien nette avec la surface supérieure du culot d'érythrocytes, le mélange polysaccharose-métrizoate de sodium, une couche renfermant les mononucléaires et les plaquettes, enfin le plasma surnageant. Une aspiration lente élimine toutes les couches surmontant le culot de globules rouges qui est ensuite repris à la seringue en prenant bien soin de ne pas toucher aux globules blancs et aux plaquettes collés sur la paroi du tube. La technique avec le mélange polysaccharose-métrizoate de sodium assure une meilleure purification que les centrifugations fractionnées utilisées seules.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à l'éclatement des globules rouges. Différentes techniques ont été utilisées pour libérer les parasites des érythrocytes : éclatement en eau distillée (Stein & Desowitz, 1964; Chavin, 1966) French press (d'Antonio et coll., 1966); hémolysines (Bowman et coll., 1960); saponine (Sherman & Hull, 1960; Spira & Zuckerman, 1962). Avec ces deux dernières techniques, les plasmodiums restent viables. Nous inspirant d'une méthode de comptage de plaquettes sanguines après hémolyse en présence d'un sel d'ammonium (Dacie & Lewis, 1968), nous avons ajouté au culot de globules rouges obtenus après centrifugation sur polysaccharose-métrizoate de sodium neuf volumes d'une solution à 1 % d'oxalate d'ammonium. Le mélange est agité pendant 15 minutes à la température du laboratoire puis centrifugé à 3000 tours pendant 10 minutes. Le culot obtenu subit ensuite deux lavages en eau physiologique glucosée et une centrifugation à 3000 tours pendant 10 minutes. Sur la base de la numération de départ et compte tenu d'une perte évaluée à 10 % au cours des manipulations, le dernier culot est dilué en eau physiologique glucosée de façon à obtenir 5 milliards ( $5 \times 10^9$ ) de parasites pour 3 ml.

Il faut préciser que la technique d'isolement assurée uniquement par centrifugations fractionnées avec éclatement par sel d'ammonium laisse vivants une grande proportion de parasites. Martin et collaborateurs (1971), utilisant le chlorure d'ammonium afin de libérer les plasmodiums en vue de les utiliser comme antigène pour la réaction d'immunofluorescence, firent la même constatation. Bien que la centrifugation sur polysaccharose-métrizoate de sodium précédant le contact avec l'oxalate d'ammonium tue les parasites, nous avons préféré cette dernière technique qui assure une meilleure purification du culot. Par ailleurs, l'antigène ainsi obtenu est inoculé immédiatement à l'animal; la fraîcheur laisse intactes les qualités antigéniques de l'inoculum comme on le constatera plus loin à la lecture des résultats de nos examens par immunofluorescence.

Dans un troisième temps, nous avons inoculé des lapins par voie intraveineuse en huit injections successives espacées de trois à quatre jours à raison de cinq à six milliards (5 à 6 x 10<sup>9</sup>) de plasmodiums par dose. Après essai, l'adjuvant de Freund fut écarté. Les animaux furent saignés par ponction cardiaque quatre jours après la dernière dose; le sérum obtenu fut conservé à -30°C.

Cependant à côté d'anticorps spécifiques anti-berghei, le sérum obtenu en contient d'autres. En effet, si l'antigène inoculé aux lapins renfermait principalement des plasmodiums libres, il y avait également en grande quantité des stroma d'érythrocytes de souris, ainsi qu'en moins grand nombre, des globules blancs et des plaquettes sanguines.

Dans un quatrième temps, il a donc fallu écarter du sérum ces anticorps indésirables par contact avec du sang de souris héparinées et indemnes de parasites. Le sang prélevé au coeur est dilué dans neuf volumes d'une solution à 1 % d'oxalate d'ammonium. Après agitation à la température du laboratoire pendant 15 minutes, ce mélange est centrifugé à 3000 tours pendant 10 minutes; le sédiment remis en suspension dans une solution tampon phosphatée subit une seconde centrifugation identique. La solution tampon phosphatée ajoutée au dernier culot fournira la suspension d'épuisement dont 1/2 volume est ajouté à un volume du sérum à traiter. Ce mélange est agité pendant six heures à +4°C. Repris ensuite par centrifugation à 3000 tours pendant 5 minutes, le sérum subit un second contact identique pour être finalement, après centrifugation, conservé à -30°C. A noter qu'en fin de manipulation cet antisérum qui ne contient plus que des anticorps anti-berghei se retrouve dilué de moitié dans la solution tampon phosphatée. Il faudra en tenir compte pour le calcul des dilutions successives à utiliser lors de l'immunofluorescence.

Enfin, dans un cinquième temps, nous avons recherché le titre des anticorps anti-berghei spécifiques en appliquant la méthode indirecte d'immunofluorescence. Nous ne détaillerons pas cette technique qui depuis Voller (1962, 1964) a été largement pratiquée en paludologie. Précisons cependant que nous avons utilisé le sérum fluorescent antiglobulines souris marqué par l'Institut Pasteur et dilué au 1/100 au moment du contact. Les frottis antigènes effectués avec du sang parasité mais non lavé sont essuyés de part et d'autre d'une bande centrale de 1/2 centimètre environ par un tampon imprégné de silicone; ils sont ensuite emballés dans du papier absorbant et placés au dessiccateur à -20°C. Repris le lendemain, ils sont fixés au HCl 0,1 N pendant 10 minutes et utilisés immédiatement. L'examen de ces frottis sous microscope Wild équipé en fluorescence avec un brûleur à vapeur de mercure nous a donné les résultats suivants :

1/200 ++; 1/3200 ++; 1/6400 +; 1/12 800 nég.

En résumé, l'inoculation de la souris de race GIF/TB génétiquement pure avec de très fortes doses de P. b. berghei tué par radiations ionisantes donne un antisérum trop peu actif pour l'immunofluorescence. Par contre, l'antigène P. b. berghei, tel que nous l'avons préparé, permet d'obtenir chez le lapin un antisérum spécifique et hautement actif pouvant être utilisé en immunofluorescence. Cet antisérum doit cependant subir au préalable deux contacts d'épuisement afin d'écarter les anticorps non spécifiques.

SUMMARY

During research on congenital malaria of mice and for the detection of malaria parasites by immunofluorescence, an antiserum against Plasmodium berghei berghei was produced which could be used for mice or rabbits.

With pure GIF/TB mice, the antiserum produced by repeated intraperitoneal inoculation of high doses of parasites ( $2 \times 10^8$ ) killed by irradiation from a Caesium bomb at 30 000 r was insufficiently active for immunofluorescence.

On the other hand, in the rabbit receiving eight doses intravenously of  $5-6 \times 10^9$  parasites at three to four day intervals, a highly active specific antiserum was obtained which could be used for the immunofluorescence test. However, this antiserum has to be treated twice to clear it of non-specific antibodies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bennison, B. E. & Coatney, G. R. (1945) Publ. Hlth Rep., 60, 127
- Bowman, I. B. R., Grant, P. T. & Kermack, W. O. (1960) Exp. Parasit., 9, 131
- Ceithaml, J. & Evans, E. A., jr (1946) J. infect. Dis., 78, 190
- Chavin, S. I. (1966) Milit. Med., 131, suppl., 1124
- Corradetti, A., Verolini, F. & Bucci, A. (1966) Parassitologia, 8, 133
- Corradetti, A., Verolini, F., Bucci, A. & Pennacchio, A. E. (1969) Parassitologia, 11, 129
- Dacie, J. V. & Lewis, S. M. (1968) Practical haematology, London, Churchill, 4th ed., p. 72
- D'Antonio, L. E., Von Doenhoff, A. E., jr & Fife, E. H., jr (1966) Milit. Med., 131, suppl. 1152
- Martin, W. J., Finerty, J. & Rosenthal, A. (1971) Nature new Biology, 233, 260
- Sherman, I. W. & Hull, R. W. (1960) J. Protozool., 7, 409
- Spira, D. & Zuckerman, A. (1962) Science, 137, 536
- Stein, B. & Desowitz, R. S. (1964) Bull. Org. mond. Santé, 30, 45
- Voller, A. (1962) Bull. Org. mond. Santé, 27, 283
- Voller, A. (1964) Bull. Org. mond. Santé, 30, 343
- Wellde, B. T. & Sadun, E. H. (1967) Exp. Parasit., 21, 310
- Wellde, B. T. & Sadun, E. H. (1968) Isotopes and Radiation in Parasitology, I. International Atomic Energy Agency, Vienne

Le but des documents de la série WHO/Mal est le suivant :

- a) mettre le personnel de l'OMS, les instituts nationaux, les chercheurs et les travailleurs de la santé publique au courant de l'évolution des recherches sur le paludisme et des progrès de l'éradication du paludisme au moyen d'exposés succincts relatifs à quelques problèmes en cause;
- b) distribuer, aux catégories de lecteurs indiquées ci-dessus, les rapports d'opérations et autres communications qui présentent un intérêt particulier, mais qui ne sont pas normalement imprimés dans les publications de l'OMS;
- c) communiquer aux intéressés différents articles qui sont destinés à la publication mais qui, en raison de leur actualité, méritent d'être rapidement connus.

On notera que les résumés de travaux non publiés représentent souvent des rapports préliminaires d'investigations; les conclusions de ces travaux peuvent donc être sujettes à des révisions ultérieures.

Les articles signés n'engagent que leurs auteurs. La mention des manufactures et des produits commerciaux n'implique pas que ces maisons ou leurs produits soient recommandés ou approuvés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres.