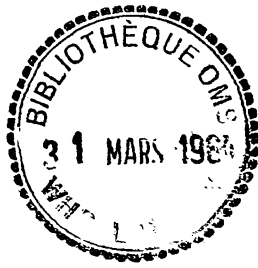


a 63684



WHO/Mal/426
3 janvier 1964

ORIGINAL : ANGLAIS

SELECTION D'UNE SOUCHE DE SOURIS BLANCHES
REFRACTAIRE A L'INFECTION A P. BERGHEI

par

S. P. Ramakrishnan,¹ L. J. Bruce-Chwatt,² Satya Prakash,¹
D. S. Chowdhury,¹ S. Pattanayak,¹ Dalip Singh¹ et S. K. Dhar¹

1. Introduction

Les études entreprises depuis 60 ans sur l'épidémiologie du paludisme dans les régions holoendémiques ont fourni nombre d'arguments valables en faveur de l'hypothèse selon laquelle, en Afrique tropicale, la mère transmet à l'enfant qu'elle porte une certaine immunité humorale acquise à l'égard du paludisme. Ce phénomène est mentionné pour la première fois de façon explicite dans le rapport sur le paludisme en Afrique occidentale présenté par Stephens & Christophers (1900) à la Commission du paludisme de la Royal Society. Bruce-Chwatt a fait le point de la question (1961).

L'existence de cette immunité congénitale vient d'être confirmée au cours d'une série de recherches qui ont montré la relation existant entre les anticorps présumés et la teneur élevée en 7S gamma-globuline dans le sérum de certains habitants de l'Afrique occidentale (McGregor, 1960; Cohen, McGregor & Carrington, 1961; Gilles, 1961). Les travaux récemment entrepris par Voller & Bray (1962) et Bray (1962) pour détecter et mesurer quantitativement ces anticorps plus ou moins spécifiques dans le sang des populations en question ont donné des résultats très encourageants.

¹ National Institute of Communicable Diseases, Delhi, Inde.

² Division de l'Eradication du Paludisme, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse.

Tandis que certains aspects de l'histoire naturelle du paludisme dans les zones holoendémiques peuvent s'expliquer par la présence d'anticorps humoraux transmis à l'enfant par une mère en état d'immunité ou acquis à la suite d'une infection, d'autres éléments de l'immunité antipaludique semblent indiquer la présence d'un facteur génétique. On a souvent signalé que les Noirs présentent un plus haut degré de tolérance innée à l'égard de certaines espèces de parasites du paludisme (Boyd & Stratman-Thomas, 1933). La question de la relation entre la constitution génétique de l'hôte et sa sensibilité à l'infection paludéenne a été discutée par James & Ciuca (1938), Taliaferro (1949), Culbertson (1951), Sargent (1959), Swellengrebel (1950) et Simon (1960).

On admet que, à l'intérieur d'une même espèce, les individus d'une race ou d'une lignée sont parfois plus résistants à tel ou tel parasite que les individus d'autres races ou d'autres lignées, et l'on a souvent attribué ces variations à une différence dans la constitution génétique de l'hôte. Cependant toute immunité, acquise ou non, est une expression de la structure génétique de l'animal, conditionnée par un certain milieu dans lequel survient la maladie infectieuse. Il est virtuellement impossible de classer certaines réactions d'immunité comme innées et d'autres comme acquises, et l'on doit admettre l'absence de toute ligne de démarcation très nette.

Il existe dans la nature un processus constant de sélection qui tend à éliminer l'hôte hypersensible et à empêcher la formation progressive de lignées d'animaux présentant une tolérance accrue aux agents infectants. Cette constatation a été l'élément décisif qui a amené Theobald Smith à considérer la maladie infectieuse comme un phénomène biologique tendant à créer un certain équilibre entre le parasite et l'hôte.

De nombreux auteurs ont procédé à des études expérimentales concernant l'influence des facteurs génétiques sur l'immunité bactérienne; elle a été analysée de façon approfondie par Bradford Hill (1934) et évaluée avec précision par Wilson (1955). Il n'est pas surprenant, étant donné les difficultés inhérentes à l'étude de l'immunité à l'égard de protozoaires en général et des parasites du paludisme en particulier, que les travaux entrepris dans ce domaine soient beaucoup moins nombreux que ceux qui traitent de l'immunité à l'égard des bactéries et des virus.

L'impaludation expérimentale de l'homme a mis en lumière certains phénomènes immunologiques, alors que les études génétiques sur le paludisme simien se heurtent à des difficultés manifestes. L'étude expérimentale approfondie des aspects génétiques de l'immunité à l'égard du paludisme chez les mammifères a été rendue possible à la suite de la découverte des plasmodia des rongeurs, c'est-à-dire P. berghei et P. vinckei. Depuis une quinzaine d'années, on a consacré de nombreux travaux aux divers aspects de l'immunité à l'égard du paludisme des rongeurs, mais on a rarement essayé de produire par sélection une souche de rongeurs présentant un haut degré de tolérance vis-à-vis d'un parasite virulent (Kretschmar, 1962). Dans la suite du présent rapport, nous comparons les résultats de notre étude avec ceux qu'a obtenus Kretschmar (1961, 1962).

Nous rendons compte ci-après des deux expériences tentées dans ce sens; l'une, au Nigéria, il y a déjà un certain temps, n'a pas donné de résultats très définitifs; l'autre aux Indes, plus récemment, a été beaucoup plus fructueuse.

Le premier essai a été effectué en 1957 au Federal Malaria Service de Yaba-Lagos (Nigéria). On a étudié quatre générations de souris blanches suisses, issues de deux couples auxquels on avait inoculé, par voie intrapéritonéale, 50 000 parasites d'une souche virulente de P. berghei et que l'on avait guéris en leur administrant de la chloroquine à la dose moyenne totale de 0,5 g de chloroquine base par animal. La génération F1 a été infectée puis traitée de la même façon, à l'âge de deux mois environ, et les survivants de chaque génération ont été accouplés. Au cours de cette expérience, 20 % environ des adultes de chaque génération sont morts et l'on a constaté une fréquence élevée d'avortements ou de morts prématurées dans les portées. Le nombre total des animaux qui ont survécu et ont été accouplés pendant quatre générations était de 86. La cinquième et dernière génération se composait de huit sujets - 5 femelles et 3 mâles - auxquels on a inoculé la "dose standard" de 50 000 parasites sans traitement consécutif, et tous sont morts. Néanmoins, la durée moyenne de survie de ce dernier groupe a été de $10,9 \pm 1,3$ jours contre $6,3 \pm 0,3$ jours pour les 1200 souris environ sur lesquelles la souche de P. berghei avait été précédemment maintenue pendant trois ans, au cours de 182 inoculations administrées à des groupes de six sujets.

Les résultats obtenus au cours de l'étude sur la transmission héréditaire de l'immunité chez les mammifères, qui se poursuit depuis quatre ans au Malaria Institute of India,¹ sont beaucoup plus intéressants. On a repris, à une plus grande échelle, les recherches sur la possibilité de sélectionner une souche de souris blanches réfractaire à l'infection à P. berghei. Les souris blanches ont été expressément choisies comme hôtes pour cette expérience parce que des milliers de souris ont été infectées, ces dernières années, à l'Institut ainsi que dans de nombreux autres laboratoires du monde entier, et que l'infection à P. berghei s'est révélée mortelle dans 100 % des cas, prouvant ainsi l'extrême sensibilité de l'espèce en général à ce parasite. On a également pris grand soin, lors de la planification des travaux, d'infecter les souris après le sevrage, afin d'éliminer toute possibilité d'immunité acquise qui aurait été transmise passivement par le lait de la mère infectée.

2. Matériel et méthodes

On a utilisé les souris blanches comme hôtes et P. berghei,² Vincke & Lips (1948), comme parasite.

Les premières souris avaient été fournies, en 1950, par les instituts suivants : Central Research Institute, Kasauli; Indian Veterinary Research Institute, Mukteshwar; Haffkine Institute, Bombay et Pasteur Institute of South India, Coonoor. Depuis lors, elles ont toutes été accouplées par croisement et en lignée pure, et l'on a obtenu une souche "inbred" de l'Institut.

Pour la première série d'expériences, on a pris 50 souris (25 mâles et 25 femelles) âgées de 43 jours; chaque animal a été placé dans une cage individuelle et on lui a inoculé, par voie intrapéritonéale, une dose unique d'un million de parasites. Des étalements de sang ont été prélevés et examinés quotidiennement, et l'on a calculé le nombre des parasites pour 10 000 érythrocytes.

¹ Maintenant, National Institute of Communicable Diseases.

² La souche de P. berghei a été obtenue en 1952 grâce à l'amabilité du Général J. S. K. Boyd et elle est conservée par passage sur sang de rats blancs. Le parasite avait subi 310 passages lorsqu'il a été utilisé pour la présente expérience.

Chaque fois que l'on trouvait plus de 2 % de globules rouges infectés, la parasitémie était enrayée par administration intrapéritonéale de 0,25 mg de phosphate de chloroquine à chaque animal. On a renouvelé le traitement aux doses et aux intervalles nécessaires pour empêcher la parasitémie de dépasser 2 % des cellules hôtes. On laissait donc l'infection évoluer d'une manière bénigne jusqu'à ce qu'elle devienne subpatente. A ce moment-là, chaque animal était mis au repos pendant 10 jours; puis on lui inoculait une nouvelle dose d'un million de parasites. Ce processus a été répété autant de fois qu'il le fallait pour que les animaux deviennent totalement réfractaires à l'inoculation d'un million de parasites.

Les mâles et les femelles devenus ainsi réfractaires ont été accouplés et les femelles gravides ont été séparées des mâles. La génération F 1 a été sevrée au bout de quatre semaines et chaque animal a reçu, le 29ème jour après sa naissance, une dose de 100 000 parasites par voie intrapéritonéale. Tous les animaux ont été examinés et traités de la même façon que les couples parents, jusqu'à ce que certains d'entre eux deviennent réfractaires à la réinoculation d'un million de parasites. Les animaux réfractaires à la dose d'épreuve ont été gardés pour la reproduction et le processus décrit pour les parents a été répété pour toutes les générations suivantes.

On avait l'intention de répéter l'expérience jusqu'au moment où il serait possible de sélectionner des mâles et des femelles absolument réfractaires à la première inoculation de 100 000 parasites. Mais il a fallu l'interrompre à la génération F 6, un grand nombre d'animaux réfractaires de cette génération s'étant avérés stériles. Les sujets de la génération F 7 étaient trop peu nombreux pour que l'on puisse continuer l'expérimentation.

3. Résultats

Le tableau 1 montre l'évolution de l'infection chez différentes générations de souris.

TABLEAU 1. EVOLUTION DE L'INFECTION A P. BERGHEI CHEZ SEPT GENERATIONS DE SOURIS

Génération et nombre de sujets dans chacune	Temps (en jours) nécessaire pour que les animaux deviennent réfractaires à l'infection d'épreuve		Nombre des doses de 0,25 mg de phosphate de chloroquine base administrées		Durée (en jours) de la période prépatente de la première infection	Durée (en jours) de la parasitémie primitive
	Variation	Moyenne	Variation	Moyenne		
O=Parents 50	69-138	105,6	2-21	8,8	1,2	92,5
F 1 27	62-130	90,8	2-12	7,4	4,7	62,4
F 2 38	30-130	88,0	3-12	5,8	3,8	53,3
F 3 35	33-138	97,1	3-14	7,3	4,97	67,8
F 4 29	30-127	73,2	2-9	5,6	4,7	38,3
F 5 37	36-117	85,2	5-14	7,5	4,9	52,2
F 6 65	37-112	61,0	4-11	5,8	6,2	31,8
F 7 4	82-107	83,5	1-5	2,7	5,7	26,5

Le tableau précédent montre les variations de la durée de la période prépatente qui est de 1,2 jour chez les parents (ayant reçu un million de parasites à la première inoculation) et qui se prolonge de 3,8 à 6,2 jours pour les générations suivantes n'ayant reçu que 100 000 parasites.

La durée de la parasitémie primitive était de 92,5 jours, en moyenne, chez les parents, puis suivait une courbe décroissante allant de 67,8 à 31,8 jours pour les générations suivantes, si bien que, pour F 6, elle se trouvait sensiblement plus courte que pour les cinq générations précédentes.

Le tableau 2 montre la proportion des souris de chaque génération que l'on a trouvées réfractaires à l'infection initiale.

TABLEAU 2. POURCENTAGE DES SOURIS REFRACTAIRES A L'INFECTION INITIALE, DANS SIX GENERATIONS SUCCESSIVES

Génération	Nombre d'animaux	Nombre des animaux réfractaires à l'inoculation initiale de 100 000 parasites	Pourcentage des animaux réfractaires à l'inoculation initiale de 100 000 parasites
O= Parents	50	1*	2
F 1	23	1	4,3
F 2	38	néant	-
F 3	34	néant	-
F 4	29	néant	-
F 5	37	néant	-
F 6	63	12	19
F 7	4	1	25

* Ce sujet était réfractaire à 1 million de parasites.

On peut constater, d'après ce tableau, que la proportion des animaux réfractaires n'a augmenté de façon manifeste que dans la génération F 6. Les résultats obtenus pour la génération F 7 ne sont pas significatifs, étant donné le petit nombre des souris infectées.

4. Discussion

Les résultats de la présente étude semblent indiquer que, chez six générations de souris, comportant un total de 274 animaux, la sensibilité des sujets a diminué progressivement de génération en génération, ainsi que cela ressort notamment du raccourcissement de la durée de la parasitémie primitive et de la prolongation (à un moindre degré) de la période prépatente. L'accroissement soudain de la proportion des animaux réfractaires à la dose infectante de parasites dans la génération F 6, est significatif.

Il est regrettable qu'il ne nous soit pas resté un nombre suffisant de souris pour nous permettre de poursuivre l'expérience au-delà de la génération F 6. Nous ne savons pas exactement pourquoi la plupart des sujets sont devenus stériles. Les résultats obtenus (dont il faut bien souligner le caractère préliminaire) montrent qu'il n'est pas impossible d'obtenir, par sélection progressive, une souche de souris moins sensibles à une infection à P. berghei par ailleurs virulente. Mais il faudra vérifier cette hypothèse sur un plus grand nombre d'animaux et des travaux viennent d'être entrepris à cet effet.

D'autre part, il convient de souligner que nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Kretschmar (1961), qui a travaillé sur des souris de la souche NMRI provenant de Tübingen; cette souche présente une certaine résistance innée à des infections à P. berghei fatales pour toutes les autres souches de souris. Chez nombre de ces animaux, l'infection à P. berghei durait pendant des semaines ou des mois sans paraître avoir d'effets marqués sur eux (Kretschmar, 1962). D'après cet auteur, la faible sensibilité des souris de la souche NMRI est due à la "constitution génétique" de cette souche et il n'est pas possible de continuer à la réduire en accouplant les survivants de l'infection expérimentale et en soumettant leur progéniture à une nouvelle inoculation. Il y a lieu toutefois, de souligner que rien n'a été publié sur l'accouplement en lignée pure d'une souche sensible, suivi de passages répétés d'infections à P. berghei. Néanmoins, Kretschmar (1962) reconnaît que l'immunité relative de la souche NMRI à l'égard de P. berghei est de nature génétique et ne se limite pas à certains sujets choisis, mais caractérise la souche elle-même.

Bien que les résultats de notre enquête ne soient pas concluants, ils diffèrent assez peu de ceux dont Hill (1934) a rendu compte après une série de recherches sur la transmission héréditaire de la résistance aux infections bactériennes. Hill concluait son analyse en soulignant que, même lorsque les échantillons expérimentaux comportent un grand nombre d'animaux, on constate des différences considérables entre les souches, de sorte qu'il est difficile d'évaluer le caractère dominant du facteur génétique. A l'intérieur des souches, la reproduction sélective à partir des survivants entraîne généralement un abaissement du taux de mortalité chez les générations suivantes, mais ce phénomène peut être dû à l'effet combiné de facteurs génétiques et d'une immunité acquise, se transmettant des parents à leur progéniture.

Wilson & Miles (1955) ont fait remarquer que les épreuves de résistance auxquelles on soumet chaque génération modifient toujours la réaction innée de l'animal et que cette modification agit encore plus sur la progéniture. Mais c'est là un phénomène inévitable qui n'infirmes en rien les conclusions d'une expérience dont l'objet est de reproduire les conditions existant dans des zones impaludées à endémicité élevée. La présente étude indique qu'il doit être possible de sélectionner une souche de souris blanches relativement réfractaire à une infection à P. berghei à laquelle la souche originale était très sensible, mais il reste encore beaucoup à faire pour évaluer la rapidité du processus et pour apprécier la spécificité des facteurs génétiques qui entrent en jeu.

5. Résumé

1. Six générations de souris blanches issues de 50 parents totalement sensibles à l'infection à P. berghei ont été croisées de telle façon que chaque génération a été exposée à une infection atténuée par la chloroquine. On a accouplé les survivants dans l'intention de sélectionner une souche présentant une sensibilité atténuée.
2. Douze animaux de la génération F 6 sur un total de 63 (soit 19 %) et un animal de la génération F 7 sur un total de quatre, ont pu résister à l'inoculation initiale de 100 000 parasites.
3. On a constaté un raccourcissement de la période de parasitémie primitive et une prolongation de la période prépatente, ce qui semble indiquer qu'il s'est opéré une certaine sélection d'animaux présentant une tolérance accrue.
4. Un abaissement de la fertilité, particulièrement marqué pour la génération F 7, a réduit le nombre des animaux survivants dans une mesure telle qu'il a fallu interrompre les investigations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boyd, M. & Stratman-Thomas, W. K. (1939) Amer. J. Hyg., 18, 485
- Bray, R. S. (1962) Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 56, 436
- Bruce-Chwatt, L. J. (1963) Congenital immunity in malaria. Dans : Garrham, P. C. C., Roitt, A. & Pierce, B. ed. Immunity to protozoa, Oxford
- Cohen, S., McGregor, I. A. & Carrington, S. (1961) Nature (Lond.), 192, 733
- Culbertson, J. T. (1951) Immunological mechanisms in parasitic infections. Dans : Most, H. Parasitic infections in man, New York
- Gilles, H. M. & McGregor, I. A. (1959) Ann. trop. Med. Parasit., 53, 492
- Gilles, H. M. & McGregor, I. A. (1960) Ann. trop. Med. Parasit., 54, 275
- Gilles, H. M. (1961) W. Afr. med. J., 10, 293
- Hill, A. B. (1934) The inheritance of resistance to bacterial infections in animal species, Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. (Lond.) No 196
- James, S. P. & Ciuca, M. (1938) Species and races of human malaria parasites and a note on immunity. Dans : Acta conventus tertii de tropicis atque malariae morbis, (Amsterdam) 2, 269
- Kretschmar, W. (1961) Z. Tropenmed. Parasit., 12, 346
- Kretschmar, W. (1962) Z. Tropenmed. Parasit., 13, 159
- McGregor, I. A. (1960) W. Afr. med. J., 6, 260
- Sergent, E. (1959) Arch. Inst. Pasteur Algér., 34, 52
- Simon, H. J. (1960) Attenuated infection, Philadelphie
- Stephens, J. W. W. & Christophers, S. R. (1900) Reports to the Malaria Committee of the Royal Society, third series, 4
- Swellengrebel, N. H. (1950) Ann. trop. Med. Parasit., 44, 84
- Taliaferro, W. M. (1949) Immunity to the malaria infections. Dans : Boyd, M. ed. Malariology, 2, 935
- Voller, A. & Bray, R. S. (1962) Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 110, 907
- Wilson, G. S. & Miles, A. A. (1955). Dans : Topley & Wilson, Principles of bacteriology and immunity, Londres

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.

La parution d'un article dans cette série ne constitue donc pas une publication officielle et un tel article peut donc, avec l'accord de l'auteur et de l'OMS, être publié dans un périodique de l'OMS ou ailleurs.

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.