



INDEXED
WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ



WHO/MAL/69.683

FRANCAIS SEULEMENT
(with summary in
English)

a 65246

EFFET DE LA VACCINATION PAR PLASMODIUM BERGHEI IRRADIE SUR L'ACTIVITE PHAGOCYTAIRE
DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL AU COURS DE L'INFECTION DU RAT PAR CE PLASMODIUM¹

par

G. Biozzi, C. Stiffel, D. Mouton et C. Decreusefond
Institut d'immuno-biologie, Centre national de la Recherche scientifique, Paris, France

et

A. Corradetti, F. Verolini, A. Bucci et A. Ventura
Laboratori di Parassitologia dell'Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italie

1. INTRODUCTION

Le rôle prépondérant des macrophages du système réticulo-endothélial (SRE) dans les mécanismes de défense contre les maladies infectieuses est connu depuis longtemps et a été récemment confirmé par l'emploi des méthodes quantitatives d'exploration de l'activité du SRE (Biozzi et al., 1953, 1957, 1963).

Deux constatations essentielles se dégagent de ces études :

- 1) L'activité fonctionnelle du SRE subit des modifications importantes au cours de l'infection.
- 2) La stimulation préalable du SRE augmente la résistance des animaux envers des infections produites par des micro-organismes capables de survivre dans le cytoplasme des macrophages (Howard, 1961, Howard et al., 1959).

Comme dans le cas des infections bactériennes, la défense de l'organisme envers les infections provoquées par des plasmodiums s'effectue selon deux mécanismes fondamentaux :

- 1) un mécanisme spécifique constitué par la réponse immunologique;
- 2) un mécanisme non spécifique dont la manifestation principale est la phagocytose (Zuckerman, 1968).

Ces deux mécanismes peuvent être associés, comme lors de l'intervention des anticorps opsonisants qui facilitent la phagocytose. Dans le cas de l'infection paludéenne, la présence d'opsonines a été démontrée par Zuckerman (1945) et l'importance de l'immunité spécifique ressort clairement des expériences de Corradetti et al. (1966) qui obtiennent une protection contre la maladie par la vaccination avec le parasite irradié.

En outre, le rôle prépondérant joué par l'activité phagocytaire des cellules du SRE au cours de l'infection paludéenne a été établi depuis longtemps par les premières expériences de Cannon et Taliaferro (1931) et confirmé par la suite (Taliaferro, 1949, 1963, Goble & Singer, 1960).

¹ Cette recherche a bénéficié d'une aide financière de l'Organisation mondiale de la Santé.

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.

Par l'emploi de méthodes quantitatives, il a été démontré que la fonction phagocytaire du SRE est stimulée chez le poussin infecté par Plasmodium (H.) gallinaceum (Cox et al., 1963) et chez le rat et la souris par P. berghei (Fabiani & Orfila, 1959). Enfin, le rôle important joué par le SRE dans les mécanismes de défense contre le paludisme est particulièrement mis en évidence par les expériences de Nussenzeig (1967) qui a montré que la stimulation préalable du SRE produite par l'injection de Corynebacterium parvum (Halpern et al., 1963) s'accompagne d'une augmentation de la résistance des souris à l'infection provoquée par les sporozoïtes de P. berghei.

Dans le présent travail, nous avons étudié les modifications de l'activité phagocytaire du SRE au cours de l'infection produite par P. berghei chez le rat infecté par inoculation de sang. De plus, nous avons étudié la réponse du SRE chez des rats infectés après vaccination avec P. berghei irradié afin de tenter d'élucider le mécanisme de la protection obtenue dans ces conditions.

2. MATERIEL ET METHODES

La souche de P. berghei utilisée est celle appelée "Istisan". Elle a été isolée par Vincke au Congo belge et envoyée au laboratoire de parasitologie de l'Istituto Superiore di Sanità de Rome à la fin de l'année 1949. Depuis lors, cette souche a été maintenue au laboratoire par passages successifs de rat à rat par inoculation de sang. Depuis plusieurs années, la souche a perdu la propriété de produire des gamétocytes. C'est cette même souche de plâsmodium qui a été utilisée par Corradetti et al. (1966) pour vacciner les rats avec les parasites irradiés.

Les expériences sont réalisées chez des rats de 2-3 mois (poids de 120 à 180 g). L'infection des rats par P. berghei est réalisée par l'injection intrapéritonéale de 450 000 globules rouges parasités provenant de rats à l'acmé de l'infection. L'évolution de la parasitémie au cours de l'infection est établie d'après le pourcentage de globules rouges parasités.

La vaccination est effectuée par l'injection intrapéritonéale de 30.10^6 d'hématies parasitées irradiées à 30 000 r suivant la technique utilisée par Corradetti et al. (1966).

L'activité phagocytaire du SRE est mesurée d'après la cinétique de l'épuration sanguine d'une dose de carbone colloïdal de 16 mg par 100 g. Cette cinétique suit une fonction exponentielle de la concentration sanguine du carbone par rapport au temps. L'activité phagocytaire est exprimée par l'index phagocytaire K qui mesure la fonction de l'ensemble des cellules réticulo-endothéliales au contact du sang circulant et par l'index phagocytaire corrigé α qui exprime cette activité par unité de poids des organes actifs : foie et rate (Biozzi et al., 1953).

Ces deux index sont calculés d'après les formules :

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{t_2 - t_1}$$

$$\alpha = \sqrt[3]{K} \times \frac{\text{Poids du corps}}{\text{Poids : foie + rate}}$$

où C_1 et C_2 sont les concentrations sanguines du carbone respectivement aux temps t_1 et t_2 exprimés en minute.

3. RESULTATS

Nous avons mesuré l'activité phagocytaire du SRE chez 4 groupes de rats chez lesquels l'évolution de la maladie a été parallèlement suivie par l'étude de la parasitémie.

- 1) Rats témoins.
- 2) Rats infectés avec 450 000 globules rouges parasités.
- 3) Rats vaccinés avec $30 \cdot 10^6$ globules rouges parasités et irradiés avec 30 000 r.
- 4) Rats vaccinés comme au paragraphe 3 puis infectés 20 jours après avec 450 000 hématies parasitées.

Les résultats de ces expériences sont rapportés dans le tableau I et la figure 1.

1) Rats témoins. Les valeurs moyennes des index K et α et leur déviation standard obtenues chez 14 rats témoins sont indiquées au temps 0 sur la figure 1.

2) Rats infectés. La parasitémie apparaît après une phase de latence de 3 à 5 jours, elle atteint son maximum entre 8 et 12 jours puis disparaît en 2-3 jours. Cette parasitémie peut être importante, puisqu'on peut trouver jusqu'à 60 à 80 % d'hématies parasitées. La mortalité débute au 6ème-8ème jour et s'échelonne jusqu'au 12ème-14ème jour. Le pourcentage de survie varie de 10 à 30 % (Corradetti et al., 1966).

Chez les animaux infectés, l'activité phagocytaire du SRE n'est pas modifiée durant le début de la phase de latence de la parasitémie. Puis, cette activité augmente brusquement pour atteindre un maximum à l'apparition des hématies parasitées, c'est-à-dire au 6ème jour. Par la suite, l'activité phagocytaire diminue mais reste supérieure à la normale, même quand la parasitémie a disparu chez les animaux survivant à l'infection.

Parallèlement, on observe une augmentation pondérale du foie et surtout de la rate dont le poids peut atteindre 6 fois sa valeur normale. Malgré la disparition de la parasitémie, cette hypertrophie hépato-splénique persiste et à 20 jours, l'augmentation de poids est encore de 50 % pour le foie et 400 % pour la rate.

L'index phagocytaire α ne varie pas au début de l'infection, car l'élévation de l'index phagocytaire K est compensée par une augmentation importante du poids du foie et de la rate. Cela indique que dans cette période, il n'y a pas encore de lésions fonctionnelles du foie et de la rate car l'activité de ces deux organes par unité de poids est normale. Quand l'index phagocytaire K diminue, l'index α est à la limite inférieure de la variation standard en raison de la persistance de l'hépatosplénomégalie.

3) Rats vaccinés. Chez les rats de ce groupe, on observe une augmentation progressive de l'activité phagocytaire du SRE. Vingt jours après la vaccination, la valeur de l'index phagocytaire K est 3 fois supérieure à la valeur normale. Les poids respectifs du foie et de la rate augmentent, mais dans de faibles proportions (au maximum 30 % pour le foie et 80 % pour la rate). Dans ces conditions, on observe une augmentation très nette de l'index phagocytaire corrigé α .

4) Rats infectés après vaccination. La vaccination des rats par l'injection de $30 \cdot 10^6$ hématies parasitées irradiées les protège contre le développement de l'infection produite par des hématies parasitées non irradiées. On observe une très légère parasitémie qui se développe entre le 6ème et le 14ème jour et dont le taux ne dépasse pas 10 %.

L'évolution de l'index phagocytaire K est parallèle à celle observée chez les rats non vaccinés jusqu'au 14ème jour. Par la suite, l'activité du SRE retourne aux valeurs normales. Au moment de l'injection des hématies parasitées, la rate est déjà légèrement hypertrophiée

en raison de la vaccination, mais on observe cependant une augmentation de poids de cet organe plus précoce que chez les rats non vaccinés mais également plus réduite et plus transitoire. De même, l'augmentation du poids du foie qui atteint au 6ème jour le même pourcentage que chez les rats infectés diminue rapidement pour disparaître au bout de 20 jours.

Dans ces conditions, les variations de l'index phagocytaire α sont faibles.

4. DISCUSSION

L'étude simultanée de la parasitémie et de l'activité phagocytaire du SRE chez des rats infectés par P. berghei nous a permis de constater que la stimulation assez importante du SRE que l'on observe au cours de cette infection n'évolue pas parallèlement à la parasitémie. En effet, nos résultats montrent que l'augmentation de l'activité phagocytaire précède l'apparition de la parasitémie, ceci est en accord avec les expériences de Cox et al. (1963) réalisées chez le poussin infecté avec P. (H.) gallinaceum. De plus, la stimulation de la phagocytose persiste plus longtemps que la parasitémie, puisqu'au 20ème jour, alors que les hématies parasitées sont totalement disparues, l'index phagocytaire est encore égal au double de sa valeur normale.

Nous avons en outre remarqué que l'intensité de la stimulation obtenue chez les différents animaux n'est pas en rapport avec le taux de la parasitémie.

L'augmentation de la fonction phagocytaire que nous avons observée est due presque uniquement à l'accroissement de la masse hépato-splénique (en effet, l'index phagocytaire corrigé α ne subit que de légères modifications). Cette forte augmentation pondérale du foie et de la rate au cours des infections paludiques est connue depuis longtemps et a toujours été considérée comme un important facteur de défense (revu par Goble & Singer, 1960, Fabiani, 1966).

La vaccination avec des parasites irradiés abolit presque complètement la parasitémie et permet la survie de tous les animaux. Par contre, elle n'empêche pas l'augmentation de l'activité phagocytaire du SRE. Cette augmentation est alors de même intensité que celle observée chez les animaux infectés, mais de plus courte durée, puisque l'index phagocytaire est de nouveau normal 14 jours après l'infection.

Il faut cependant remarquer que la vaccination par elle-même produit une stimulation de l'activité phagocytaire du SRE. La protection contre l'infection paludéenne obtenue par cette vaccination pourrait donc relever des deux mécanismes de défense, spécifique et non spécifique. Le mécanisme spécifique serait lié à la formation d'anticorps contre les antigènes des parasites (Corradetti et al., 1966). Le mécanisme non spécifique serait en rapport avec l'augmentation de la fonction phagocytaire du SRE. Cette dernière hypothèse est confirmée par les travaux de Yoeli (1966) et ceux de Nussenzweig (1967), qui obtiennent une protection contre l'infection paludéenne par stimulation préalable du SRE.

5. RESUME ET CONCLUSIONS

Nous avons étudié les modifications de l'activité phagocytaire du SRE chez des rats infectés par les formes schizogoniques de P. berghei, ainsi que chez des rats préalablement vaccinés par le même parasite irradié.

1) Rats infectés par P. berghei. L'activité phagocytaire du SRE présente une forte augmentation au 6ème jour de l'infection qui correspond au début de la parasitémie. Puis, cette stimulation décroît progressivement, mais persiste même après la disparition de la parasitémie chez les rats survivants. Cette réponse concerne l'activité globale des cellules réticulo-endothéliales du foie et de la rate dont la masse est augmentée au cours de l'infection. Par conséquent, l'activité phagocytaire spécifique exprimée par unité de poids de ces deux organes n'est que faiblement modifiée.

2) Rats vaccinés par P. berghei irradié. A la suite de la vaccination, l'activité phagocytaire du SRE augmente progressivement jusqu'au 20ème jour, date à laquelle les rats vaccinés sont infectés par P. berghei. Il y a concordance chronologique entre l'apparition de la résistance produite par la vaccination et la stimulation du SRE.

3) Rats infectés après vaccination. La vaccination induit une protection considérable qui se traduit par la survie de tous les animaux vaccinés tandis que 70 à 80 % des rats non vaccinés succombent à l'infection. L'activité phagocytaire du SRE déjà augmentée par la vaccination atteint les mêmes valeurs maximales que chez les animaux non vaccinés. La durée de cette stimulation est transitoire et la fonction du SRE revient rapidement à des valeurs normales.

SUMMARY

As in bacterial infections, the defence of the organism against Plasmodia involves the specific immunological reaction and a non-specific mechanism of which phagocytosis is the most important. The two mechanisms can be associated as is the case with opsonizing antibodies, which facilitate the phagocytosis. In malaria, the existence of opsonins has been demonstrated by ZUCHERMAN in 1945 and the importance of specific immunity has been confirmed by CORRADETTI et al., in 1966, when they were able to achieve protection against malaria infection by vaccination with irradiated parasites. The present authors have studied the modifications of the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system (RES) in rats during infection by inoculation of blood infected with the "Istisan" strain of Plasmodium berghei and after vaccination with irradiated parasites of the same strain. This strain was isolated in 1949 by VINCKE in the Congo and maintained since by successive blood passages from rat to rat. Several years ago, the strain lost its property to produce gametocytes.

A first group of rats, 2-3 months old, weighing 120-180 g, received intraperitoneal injection of 450 000 parasitized red blood cells from rats at the height of their infection. A second group of rats was vaccinated by inoculation of 30×10^6 parasitized red blood cells irradiated at 30 000 r. The third group was vaccinated as in the second group and then infected 20 days later by inoculation of 450 000 parasitized red blood cells.

The phagocytic activity was assessed by two indices related to the speed of elimination from the blood of a 16 mg/100 g dose of colloidal carbon. The results were as follows:

(a) Rats infected with P. berghei. The phagocytic activity of the RES was markedly increased on the sixth day of the infection which corresponded to the beginning of parasitaemia. Then, the stimulation decreased gradually, but persisted even after parasitaemia had receded. The spleen weight was increased up to six times its normal weight and, 20 days after parasitaemia had receded, the liver and the spleen were still 50% and 400% respectively above normal. The specific phagocytic activity, expressed as a weight ratio of the two organs, was only slightly modified.

(b) Rats vaccinated with irradiated P. berghei. The phagocytic activity of RES increased gradually up to day 20. The phagocytic index was three times the normal value. The weights of the liver and spleen increased respectively by 30% and 80%. There was a chronological coincidence of the appearance of resistance to infection and of the stimulation of the RES.

(c) Rats infected after vaccination. All vaccinated animals survived, while 70-80% of the controls died. Parasitaemia developed between the sixth and fourteenth day and did not exceed 10% infection of the red blood cells. The phagocytic activity of the RES, increased by vaccination, reached the same maximum values as with unvaccinated animals. This stimulation was of short duration and the activity of the RES quickly returned to normal levels.

It is suggested that protection against malaria infection by vaccination appears to be dependent upon the two defence mechanisms, specific and non-specific; the first related to antibody production and the second to the increase of the phagocytic function of the reticulo-endothelial system. This hypothesis is confirmed by YOELI (1966) and NUSSENZWEIG (1967) who achieved protection against malaria infection following previous stimulation of the reticulo-endothelial system.

REMERCIEMENTS

Nous remercions pour leur aide MM. A. Sebastini et L. Amati, techniciens du Laboratoire de Parasitologie de l'Istituto Superiore di Sanità. Nous remercions aussi M. L. Pugliani, technicien du Laboratoire de Physique du même Institut qui a effectué l'irradiation des parasites.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Biozzi, G., Benacerraf, B. & Halpern, B. (1953) Brit. J. exp. Pathol., 34, 441
- Biozzi, G., Halpern, B., Benacerraf, B. & Stiffel, C. (1957) In: Halpern, B., Benacerraf, B. & Delafresnaye, J. F., ed. "Physiopathology of the reticulo-endothelial system", Blackwell Scientific Publications Oxford, p. 204
- Biozzi, G., Halpern, B. & Stiffel, C. (1963) In: "Rôle du système réticulo-endothélial dans l'immunité antibactérienne et antitumorale" C.N.R.S. ed., p. 205
- Cannon, P. R. & Taliaferro, W. H. (1931) J. Prev. Med., 5, 37
- Corradetti, A., Verolini, F. & Bucci, A. (1966) Parasitologia, 8, 133
- Cox, F. E. G., Nicol, T. & Bilbey, D. L. J. (1963) J. Protozool., 10, 107
- Fabiani, G. (1966) Bull. Soc. Pathol. exot., 59, 605
- Fabiani, G. & Orfila, J. (1959) C.R. Acad. Sci.(Paris), 249, 803
- Goble, F. C. & Singer, I. (1960) In: "The reticulo-endothelial system in experimental malaria and trypanosomiasis", Ann. N.Y. Acad. Sci., 88, 149
- Halpern, B., Prévot, A. R., Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Morard, J.-C., Bouthillier, Y. & Decreusefond, C. (1963) J. Reticulo-endothelial Soc., 1, 77
- Howard, J. G. (1961) Scot. Med. J., 6, 60
- Howard, J. G., Biozzi, G., Halpern, B., Stiffel, C. & Mouton, D. (1959) Brit. J. exp. Pathol., 40, 281
- Nussenzweig, R. S. (1967) Exp. Parasitol., 21, 224
- Taliaferro, W. H. (1949) Ann. Rev. Microbiol., 3, 159
- Taliaferro, W. H. (1963) In: Garnham, P. C. C., Pierce, A. E. & Roitt, I., ed. "Immunity to Protozoa" Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 22
- Yoeli, M. (1966) Bull. Soc. Path. exot., 59, 593
- Zuckerman, A. (1945) J. infect. Dis., 77, 28
- Zuckerman, A. (1968) In: Weinman, D. & Ristic, M., ed. "Infectious blood diseases of man and animals", Academic Press Inc., New York, vol. 1, p. 23

TABLEAU. MODIFICATIONS DE L'ACTIVITE PHAGOCYTAIRE DU SYSTEME
RETICULO-ENDOTHELIAL AU COURS DE L'INFECTION PAR P. BERGHEI

Infection = injection i.p. de 450 000 hématies parasitées

Vaccination = injection i.p. de 30.10^6 hématies parasitées irradiées avec 30 000 r

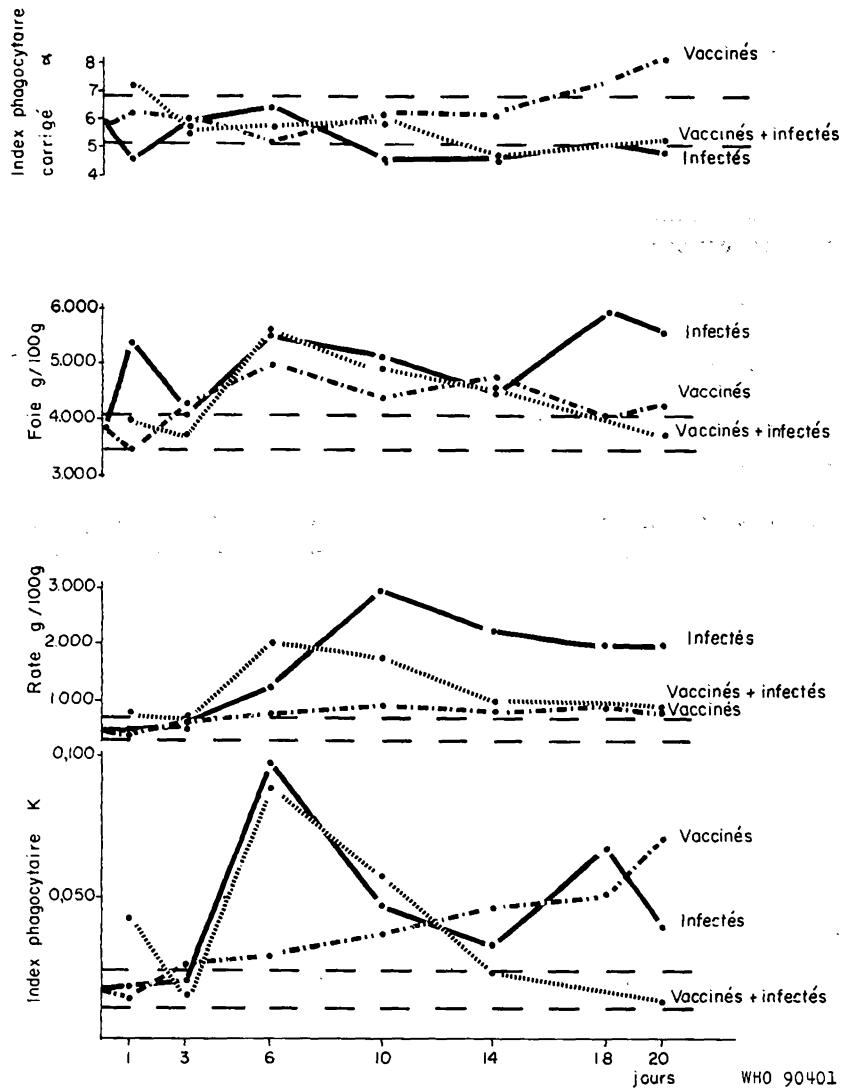
Vaccination et infection = l'infection est pratiquée 20 jours après la vaccination

	Poids g	Index pha- gocytaire K^a	Poids corps	Index pha- gocytaire corrige α	Foie g/100 g	Rate g/100 g	Parasi- témie
			poids foie + rate				
<u>Témoins</u> (14 rats)	156	0,017 +0,0075	23 + 2,3	5,9 +0,8	3,850 +0,350	0,500 +0,145	
<u>Infectés^b</u> jours après infection							
1	119	0,018	17,1	4,3	5,430	0,449	-
3	123	0,020	21,3	5,9	4,140	0,520	+
6	114,5	0,098	14,8	6,4	5,525	1,260	12 %
10	161	0,047	12,8	4,6	5,160	2,970	135 %
14	129	0,033	14,8	4,7	4,590	2,270	1-2 %
18	137	0,068	12,8	5,1	5,970	2,040	-
20	143	0,040	13,8	4,7	5,620	2,070	-
<u>Vaccinés^b</u> jours après vaccination							
1	134	0,014	25,7	6,2	3,458	0,457	
3	124	0,026	20,6	5,9	4,322	0,558	
6	146	0,029	17,6	5,3	5,000	0,730	
10	124	0,037	18,9	6,3	4,400	0,900	
14	163	0,047	18,1	6,2	4,800	0,800	
18	145	0,051	20,0	7,4	4,130	0,890	
20	155	0,071	19,7	8,3	4,310	0,792	
<u>Vaccinés et infectés^b</u> jours après infection							
1	148	0,043	20,6	7,2	4,090	0,815	-
3	152	0,015	22,5	5,6	3,770	0,702	-
6	172	0,089	12,9	5,7	5,570	2,150	20 %
10	185	0,058	15,2	5,9	4,940	1,830	+
14	189	0,023	17,6	4,8	4,660	1,053	-
20	162	0,013	22,5	5,3	3,730	0,930	-

^a Dose de carbone injecté : 16 mg par 100 g.

^b Chaque chiffre correspond à la moyenne des valeurs obtenues chez 5 rats.

Fig. 1: Variations de l'index phagocytaire K, de l'index phagocytaire corrigé α ainsi que du poids du foie et de la rate au cours de l'infection du rat par *P. berghei*



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.

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.