

10452

ORSTOM

Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération



MÉLANGES EXPÉRIMENTAUX
DE CLONES NATURELS
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* :
CINÉTIQUES ET DÉTECTION
PAR DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

Céline FRANÇOIS

de génétique moléculaire des parasites et des vecteurs
UMR CNRS-ORSTOM n°9926

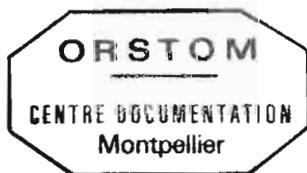
ORSTOM Documentation



010004523

Céline FRANÇOIS

MÉLANGES EXPÉRIMENTAUX
DE CLONES NATURELS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* :
CINÉTIQUES ET DÉTECTION
PAR DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES



20 JUN 1996

Montpellier
1996

Ø52
GLOTRY
FRA



F

Les opinions exprimées dans ce document
n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs

Ce travail de recherche a été effectué au centre de recherche Orstom de Montpellier, au sein de l'unité mixte de recherche CNRS-ORSTOM n° 9926 «Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs» (U.R. 41 des Maladies infectieuses et parasitaires; département Eau et Santé), sous la direction de Michel TIBAYRENC, directeur de l'unité, et avec l'encadrement de Christian BARNABÉ, pour l'obtention par Céline FRANÇOIS du Diplôme d'Études Approfondies de Parasitologie de l'Université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 11 juillet 1995.

Université des Sciences et Techniques du Languedoc - Montpellier II

Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie

Mémoire de stage

Mélanges expérimentaux
de clones naturels de *Trypanosoma cruzi* :
cinétiques et détection par des
marqueurs moléculaires

Présenté par Céline FRANCOIS, le 11 juillet 1995

Laboratoire d'accueil : UMR CNRS - ORSTOM 9926 «Génétique Moléculaire
des Parasites et des Vecteurs» Directeur : Dr Michel TIBAYRENC
Centre de Recherche ORSTOM
Responsable de stage : Dr Michel TIBAYRENC

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCTION	3
II. GENERALITES	3
2.1. La maladie de Chagas	3
2.2. Le parasite	3
2.3. Le cycle évolutif	4
2.4. Position du problème	4
2.4.1. Génétique évolutive de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.4.2. Résultats déjà acquis dans le cadre d'études d'aval menées au laboratoire	4
2.4.3. Hypothèse de travail	5
III. MATERIEL ET METHODES	5
3.1. Matériel biologique	5
3.2. Mise en culture et entretien des épimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
3.2.1. Mise en culture des épimastigotes	7
3.2.2. Entretien des stocks de parasites	7
3.3. Etablissement des gammes étalons des mélanges de clones	7
3.3.1. Réalisation des gammes étalons	7
3.4. Cinétiques de croissance des épimastigotes	8
3.4.1. Suivi des cinétiques de croissance	8
3.4.2. Suivi de la composition des mélanges à différents temps de la cinétique de croissance	8
3.4.3. Suivi de la composition des mélanges après repiquages successifs	8
3.5. L'électrophorèse isoenzymatique	9
3.5.1. Généralités	9
3.5.2. Technique électrophorétique	9
3.5.3. Interprétation des résultats	9
3.6. Amplification de l'ADN par amorce aléatoire ou RAPD	10
3.6.1. Généralités	10
3.6.2. Extraction de l'ADN	10
3.6.3. La technique RAPD	10
3.6.4. Amplification et visualisation des bandes	11
3.6.5. Lecture des profils RAPD	11
3.7. Méthodes statistiques	11
3.7.1. Le test t de Student	11
3.7.2. La modélisation des cinétiques de croissance	11

IV. RESULTATS	12
4.1. Cinétiques de croissance	12
4.1.1. Interprétation des courbes de cinétiques de croissance	12
4.1.1.1. Cinétiques des stocks isolés	13
4.1.1.2. Cinétiques des mélanges	13
4.1.2. Analyses statistiques des résultats	13
4.1.2.1. Tests de reproductibilité	13
4.1.2.2. Temps de doublement et concentrations parasitaires maximales	15
4.1.2.3. Modélisation des cinétiques de croissance	15
4.2. Les gammes étalons	16
4.2.1. Résultats des électrophorèses isoenzymatiques sur acétate de cellulose	16
4.2.2. Résultats de RAPD	16
4.3. Suivi à court terme de l'évolution de la composition des mélanges	18
4.3.1. Résultats des électrophorèses isoenzymatiques	18
4.3.2. Résultats de RAPD	19
4.4. Suivi de la composition des mélanges après repiquages successifs	20
4.4.1. Résultats des électrophorèses isoenzymatiques	20
4.4.2. Résultats de RAPD	22
V. DISCUSSION	25
5.1. Efficacité de la détection des mélanges par les marqueurs génétiques	25
5.2. Stabilité des mélanges	25
5.3. Les cinétiques de croissance	25
VI. CONCLUSION / PERSPECTIVES	26
VII. PROJET DE RECHERCHE	28
7.1. Projet	28
7.2. Méthodologies employées	30
7.3. Financement	31
BIBLIOGRAPHIE	32
ANNEXES	34

RESUME

Les populations de *Trypanosoma cruzi* sont subdivisées en clones naturels, stables dans l'espace et dans le temps, dont certains sont séparés par de grandes distances évolutives. Certains de ces clones, sur-représentés et ubiquistes, ont été appelés : "clones majeurs". En zone d'endémie chagastique, de nombreux patients sont infectés par des mélanges de clones, qui pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité de la maladie.

Le présent travail vise à déterminer le comportement in vitro de mélanges de clones majeurs génétiquement très dissemblables. L'hypothèse nulle est que les mélanges de 2 clones correspondent à la simple juxtaposition des caractéristiques biologiques de chacun des clones.

Trois mélanges ont été étudiés en culture avec des proportions initiales de 50%-50% : clone 20 + clone 39, clone 19 + clone 39 et clone 19 + clone 32. Les cinétiques de culture de chacun de ces mélanges ainsi que celles des clones pris séparément ont été suivies dans le temps grâce à des numérations pratiquées tous les 2 jours. Des suivis de la composition des mélanges : (i) sur 21 jours sans repiquage; (ii) sur 40 jours avec repiquage périodique, ont été pratiqués grâce à deux marqueurs génétiques: l'électrophorèse isoenzymatique sur acétate de cellulose et les RAPD. L'évolution au cours du temps des proportions de chaque clone dans les mélanges a été évaluée par comparaison avec une échelle de mélanges extemporanés allant de 10%-90% à 90%-10%, les clones purs étant pris comme témoins. Cette échelle a permis d'évaluer la résolution des différents marqueurs (9 systèmes enzymatiques et 2 amorces RAPD) pour le dépistage des mélanges.

L'analyse qualitative des cinétiques montre que les mélanges se comportent comme les cinétiques des clones rapides (19 et 20). Cette observation suggère fortement que les clones lents (32 et 39) ont disparu. L'analyse génétique montre qu'en fait, les clones lents, s'ils deviennent minoritaires, ne disparaissent pas complètement. Il existerait même une stimulation relative du clone 39 en présence des clones rapides par rapport à la cinétique de ce même clone 39 cultivé isolément.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi populations are subdivided into natural clones, that are stable in space and time, of which some are separated by large evolutionary distances. Some of the clones, that are overrepresented and widespread, were called "major clones". In Chagasic endemic areas, many patients are infected by mixtures of clones, that could play a role in pathogenicity of the disease.

The goal of the present work is to estimate the in vitro behaviour of mixtures of genetically highly dissimilar major clones. The null hypothesis is that the behaviour of mixtures composed of 2 different clones is the same than a simple juxtaposition of the behaviour of each of these clones taken separately.

Three mixtures have been studied in culture with starting proportions of 50%-50%, namely: clone 20 + clone 39, clone 19 + clone 39, and clone 19 + clone 32. Culture kinetics of each of these mixtures, as well as those of the clones taken separately, were followed by countings performed every two days. Follow-ups of mixture composition: (i) until 21 days without subculture; (ii) until 40 days with periodical subculture, were performed by use of two kinds of genetic markers, namely cellulose acetate isoenzyme electrophoresis and RAPD. Evolution in time of the proportion of each clone in the mixtures has been estimated by comparison with a scale of extemporaneous mixtures ranging from 10%-90% to 90%-10%, with the pure clones taken as controls. This scale made it possible to estimate the resolution of the markers used (9 enzyme systems and 2 RAPD primers) for screening of the mixtures.

Qualitative analysis of the kinetics shows that the mixtures behave like the fastest clones (19 and 20). This strongly suggests that the slow clones (32 and 39) were eliminated. Actually, genetic analysis shows that the slow clones, although they become underrepresented, do not disappear totally. One could even infer a relative simulation of the clone 39 when mixed with fast clones, by comparison with the kinetics of the same clone taken separately.

I. INTRODUCTION

Les études évolutives en microbiologie ont 3 retombées principales en termes de recherche appliquée (1) : (i) le typage de souches dans le cadre d'études épidémiologiques; (ii) la taxonomie moléculaire; (iii) les "études d'aval", c'est-à-dire l'évaluation de l'impact de la diversité génétique des microorganismes sur leurs propriétés biologiques médicalement importantes (virulence, résistance aux drogues, etc).

Notre équipe d'accueil a lancé depuis quelques années des programmes portant sur ces études d'aval, qui s'appuient sur la compétence spécifique du laboratoire, c'est-à-dire la génétique évolutive. Il a été décidé dans un premier temps de focaliser ces études d'aval sur un seul microorganisme, *Trypanosoma cruzi*, l'agent de la maladie de Chagas. Il y a deux raisons à ce choix : premièrement, *T. cruzi* est le parasite pour lequel nous disposons de l'information la plus riche en ce qui concerne la génétique évolutive; deuxièmement, ce parasite constitue un modèle expérimental relativement aisé à manipuler.

Le présent travail s'inscrit donc dans le cadre de ces études d'aval menées à l'UMR CNRS/ORSTOM: "Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs", et aborde pour la première fois l'étude d'un phénomène biologique majeur chez *T. cruzi*, à savoir le comportement de mélanges de génotypes clonaux du parasite.

II. GENERALITES

2.1. La maladie de Chagas.

Découvert par Carlos Chagas en 1909, *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* est l'agent de la maladie de Chagas ou trypanosomiase humaine latino-américaine. Cette anthrozoonose grave répandue dans 17 pays d'Amérique latine touche actuellement, selon l'OMS, 16 à 18 millions de personnes. 100 millions de personnes sont exposées à la maladie et 500000 sont nouvellement infectées par an (2). Considérée traditionnellement comme une endémie rurale, la maladie de Chagas s'étend également aux régions sub-urbaines. Certaines espèces de vecteurs sont presque exclusivement domestiques, comme *Triatoma infestans*, qui est extrêmement répandu en Amérique du sud. D'autres, considérés comme essentiellement sylvestres, peuvent envahir les zones péri-domestiques. Cette maladie est très liée au développement socio-économique car les triatomés ont une forte tendance à coloniser préférentiellement les habitats défavorisés. La raison en est que le vecteur aime à s'abriter pendant la journée dans des endroits obscurs : les fissures et trous des murs non plâtrés constituent donc pour lui un habitat préférentiel.

2.2. Le parasite.

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, Chagas 1909 est un kinétoplastidé de la famille des Trypanosomatidés (Döflein, 1901), il appartient à la section Stercoraria du genre *Trypanosoma*.

Le parasite passe par différents stades tout au long de son cycle biologique :

- la forme épimastigote, qui est la forme de multiplication dans le tube digestif du vecteur,
- la forme trypomastigote, qui est une cellule différenciée, libre et très mobile, présente dans l'ampoule rectale du vecteur (trypomastigote métacyclique) et dans le sang de l'hôte mammifère (trypomastigote sanguicole),
- la forme amastigote, qui est une forme intracellulaire et immobile. Il s'agit de la seule forme de multiplication cellulaire chez l'hôte mammifère. Elle infecte les cellules réticulo-histiocytaires et musculaires.

2.3. Le cycle évolutif.

Le parasite est transmis naturellement à l'homme et à d'autres mammifères par des insectes vecteurs. Ces derniers sont des hémiptères hétéroptères de la famille des Reduviidés et de la sous-famille des triatomines, appartenant à trois genres: *Triatoma*, *Rhodnius* et *Panstrongylus*. Les formes trypomastigotes infectantes du parasite sont déposées sur la peau avec les déjections de l'insecte hématophage, et pénètrent dans l'organisme par une lésion de la peau ou au niveau de la muqueuse de l'oeil. Les trypanomastigotes circulant dans le sang envahissent les macrophages du derme et du tissu cutané. Dans ces cellules, ils perdent leur flagelle et se multiplient par division binaire sous forme amastigote. En fin de division, les amastigotes se transforment en trypomastigotes, puis sont libérés dans le sang. Ces formes trypomastigotes sanguicoles vont elles-mêmes infecter d'autres cellules-cibles, comme les cellules musculaires et réticulo-histiocytaires.

2.4. Position du problème.

2.4.1. Génétique évolutive de *Trypanosoma cruzi*.

L'analyse isoenzymatique a montré que l'espèce *Trypanosoma cruzi* était hétérogène (3). L'approche de génétique des populations permet d'explorer la diversité génétique d'une espèce donnée. Cette approche examine les paramètres qui conditionnent la structuration des populations et leur isolement génétique les unes par rapport aux autres. L'espèce *Trypanosoma cruzi* apparaît peu ou pas sexuée et montre tous les indices d'une forte structuration clonale: grands écarts par rapport aux prévisions panmictiques, avec en particulier un considérable déséquilibre de liaison (association non aléatoire de génotypes observés à des locus différents) (4, 5, 6). Le modèle clonal n'implique pas que la recombinaison sexuée soit totalement absente chez *Trypanosoma cruzi*, mais plutôt qu'elle n'est pas suffisamment fréquente pour empêcher la génération et la propagation de clones stables dans l'espace et dans le temps, qui se comportent comme des lignées phylogénétiquement isolées les unes des autres. Cette existence de lignées phylogénétiques indépendantes est une des composantes les plus importantes du modèle clonal. En effet, on peut inférer que l'évolution séparée aboutira à une accumulation de mutations divergentes d'une lignée clonale à l'autre, ces mutations pouvant en particulier intéresser les propriétés biologiques médicalement importantes du parasite.

Certains génotypes clonaux sont sur-représentés et ubiquistes. On peut donc supposer que leur importance dans l'épidémiologie et la clinique de la maladie de Chagas est considérable. Ils ont été nommés pour cela "clones majeurs" par Tibayrenc et Brénière (6). Au sein du laboratoire d'accueil, les études d'aval (1) sont actuellement focalisées sur l'étude de ces clones majeurs.

2.4.2. Résultats déjà acquis dans le cadre d'études d'aval menées au laboratoire.

Récemment Laurent (7) et Revollo (8) ont étudié l'importance de la variabilité génétique de différents stocks de *Trypanosoma cruzi* sur des propriétés médicalement importantes. Ils ont rapporté que les divergences observées sur certains paramètres biologiques tels que la cinétique de croissance, la métacyclogenèse ou l'infectivité sont corrélées aux distances génétiques. Ceci est en faveur de l'hypothèse de travail que les divergences phylogéniques entre clones ont un impact majeur sur ces propriétés biologiques. En d'autres termes, en ce qui concerne leurs propriétés biologiques, les phylums majeurs qui subdivisent l'espèce *T. cruzi* tendent à se comporter comme des espèces différentes.

2.4.3. Hypothèse de travail.

Aujourd'hui, il est indispensable de dépasser le modèle reposant sur l'étude séparée des différents clones naturels. En effet, ce modèle ne reflète pas la situation épidémiologique observée sur le terrain. Chez *Trypanosoma cruzi*, les mélanges de clones naturels chez un hôte (triatome ou patient chagasiq) semblent très fréquents (9,10). Des données récentes basées sur la technique PCR (Brénière, en préparation) suggèrent qu'en Bolivie, au moins 50% des patients chagasiques portent des mélanges de clones.

Il est permis de supposer que ces mélanges jouent un rôle dans la pathogénicité de la maladie de Chagas, et ont un effet différent d'une simple juxtaposition des effets séparés de chaque clone entrant dans le mélange: on pourrait supposer des phénomènes d'inhibition réciproque, ou au contraire de potentialisation.

Le présent travail vise à commencer d'explorer ce problème par le paramètre expérimental de la cinétique de culture des épimastigotes. En effet, ce paramètre a été spécialement étudié. Engel et al. (11) et Dvorak (12) ont observé que les cinétiques de croissance des épimastigotes sont très différentes en fonction des stocks considérés. Laurent (7) a montré que les différences de cinétique de croissance sont corrélées aux distances génétiques : il y a une tendance statistique lourde pour les stocks apparentés génétiquement à avoir des cinétiques de croissance similaires, et inversement.

III. MATERIEL ET METHODES

3.1. Matériel biologique.

Les stocks de *Trypanosoma cruzi* utilisés pour cette étude proviennent de diverses origines géographiques et biologiques. Ces stocks, tous sud-américains, ont été isolés à partir de l'homme ou d'hôtes sylvestres comme l'agouti (rongeur d'Amérique du Sud).

Le tableau 1 donne l'origine des stocks utilisés.

Tableau 1 : Origines des 4 stocks de *Trypanosoma cruzi* étudiés dans le présent travail.

CLONET	CODE	PAYS	PROVINCE	LOCALITE	HOTE
19	Cutia cl1	Brésil	?	Espiritu Santo	<i>Dasyprocta aguti</i>
20	P209 cl1	Bolivie	?	Sucre	homme: phase chronique
39	Mn cl2	Chili	région IV	?	homme: phase chronique
32	CBB cl3	Chili	Coquimbo	Talahuén	homme

Tous ces stocks ont été clonés au laboratoire. Pour les raisons évoquées plus haut, ils ont été sélectionnés pour être représentatifs de 4 clones majeurs, les clones 19, 20, 39 et 32 (4). Ces génotypes clonaux, comme le montre la figure 1, sont plus ou moins distants génétiquement les uns des autres : les divers génotypes clonaux que montre la figure peuvent être subdivisés en 2 phylums majeurs, dont le premier va des génotypes 1 à 25 (gauche de l'arbre), tandis que le premier comprend les génotypes 26 à 43 (droite de l'arbre). Les clones 19 et 20, comme on peut le voir, sont très proches l'un de l'autre, au sein du phylum 1, tandis que les génotypes 32 et 39 sont dans le phylum 2, mais séparés l'un de l'autre par des distances génétiques non négligeables.

Des études ultérieures (Barnabé, en préparation) ont amplement confirmé cette subdivision en 2 phylums principaux, tout en raffinant cette image de la diversité génétique de la maladie de Chagas: les "clones" individualisés par telle série de marqueurs génétiques ne doivent pas être regardés comme de véritables clones, mais comme des familles de clones étroitement apparentés ("clonets") (13).

Comme on pouvait s'y attendre (5), l'emploi de méthodes de caractérisation plus résolutive a montré une hétérogénéité résiduelle limitée au sein des clones majeurs. Il n'en demeure pas moins que les degrés de parenté génétique inférés à l'origine entre les clones 19, 20, 32 et 39 ont été confirmés, ce qui nous permet de garder cette classification dans le présent travail.

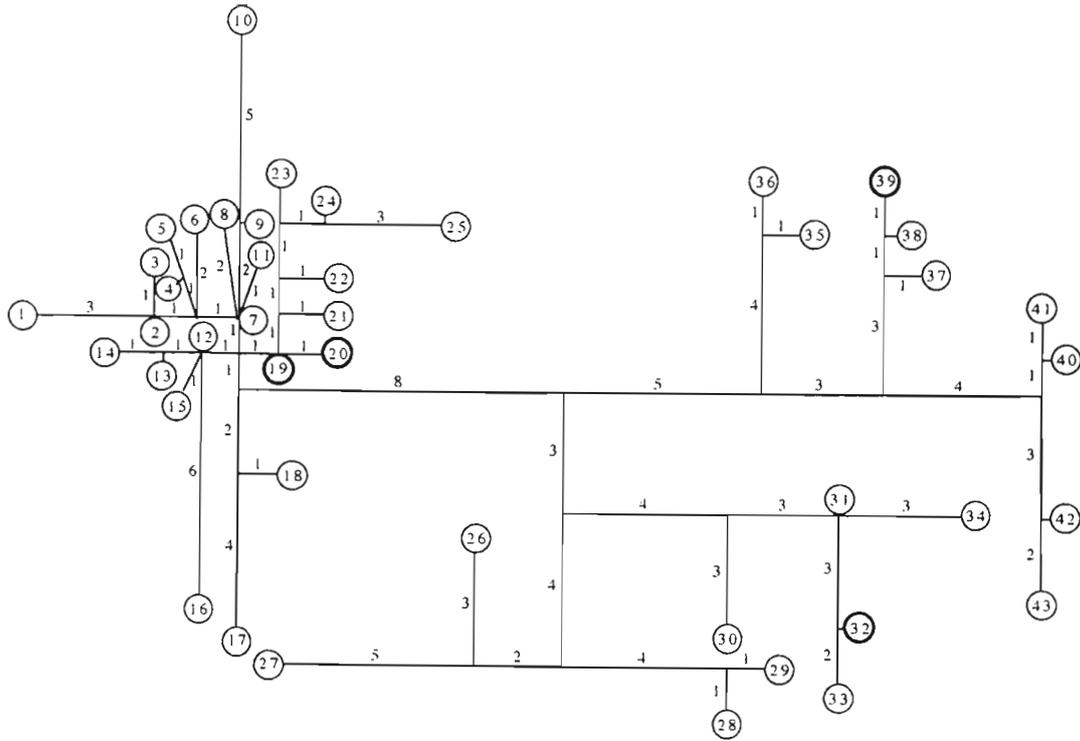


Figure 1 : "Réseau de Wagner" décrivant les relations phylogéniques des 43 clones naturels de *Trypanosoma cruzi* identifiés sur la base de 15 loci isoenzymatiques. Le long des branches de l'arbre, entre chaque intersection, est indiquée la distance patristique, ou nombre de pas évolutifs permettant de quantifier les relations phylogéniques entre les clones naturels, dont les numéros sont entourés par un cercle à l'extrémité des branches.

Pour le choix des stocks, nous nous sommes aidés des travaux réalisés antérieurement par Laurent (7) et Revollo (8). Nous avons choisi, au sein de chaque clone majeur, les stocks les plus représentatifs de leur groupe pour la cinétique de culture, en nous basant essentiellement sur leur temps de doublement. Sur ces bases, trois mélanges ont été retenus :

- * 20 et 39 avec P209 cl1 et Mn cl2
- * 19 et 39 avec Cutia cl1 et Mn cl2
- * 20 et 32 avec P209 cl1 et CBB cl 3

Tous les génotypes des stocks choisis ont été vérifiés par électrophorèse d'isoenzymes sur acétate de cellulose.

3.2. Mise en culture et entretien des épimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Les épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* sont les formes les plus faciles à entretenir en culture. Elles se multiplient facilement, même en milieu axénique, et la production de formes en grande quantité ne pose pas de problème.

3.2.1. Mise en culture des épimastigotes.

Les stabilats préalablement conservés en tubes Nunc dans l'azote liquide sont décongelés dans un bain-marie à 37°C pendant 5 minutes.

Le contenu des tubes est transféré dans un milieu de culture biphasique (milieu N.N.N. Nicolle, Novy, Mac Neal), la phase solide de ce milieu est constituée d'un mélange d'agar (Bacto-agar 1,3%; NaCl 0,56%) et de sang (sang de lapin à 7%), la phase liquide est le milieu de culture LIT (Liver Infusion Tryptose: NaCl 0,5%; Na₂HPO₄ 7,5%; Tryptose 0,5%; KCl 0,04%; Yeast extract 0,3% ; Hémine 2%. Liver infusion 0,3%; Gentamycine 4%; pH 7,2) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté.

Le milieu LIT sera utilisé par la suite seul pour l'entretien des stocks et les cinétiques de culture. L'ensemble est incubé à 27°C, température optimale de croissance des formes épimastigotes de *T.cruzi*.

3.2.2. Entretien des stocks de parasites.

Quand la densité des formes le permet, le contenu des tubes NNN est transféré dans des tubes contenant 3 ml de LIT 10% SVF. Ces tubes sont repiqués toutes les semaines ou tous les quinze jours en fonction de leur vitesse de croissance.

3.3 Etablissement des gammes étalons des mélanges de clones.

Nous nous sommes placés dans des conditions standards de cinétique. Afin de suivre dans le temps l'évolution des mélanges de clones par les marqueurs (isoenzymes et RAPD) il était nécessaire d'étalonner au préalable les niveaux de détection des mélanges, pour estimer de manière quantitative les proportions respectives des deux génotypes en présence.

3.3.1. Réalisation des gammes étalons.

Les 4 stocks de parasites sont cultivés séparément et massivement dans des boîtes de culture de 150 cm² afin d'obtenir des quantités parasitaires suffisantes pour les analyses isoenzymatiques et RAPD.

Les mélanges de stocks ont tous été effectués avec des formes épimastigotes en phase exponentielle de croissance dans les proportions suivantes: 90%-10%; 75%-25%; 50%-50%; 25%-75% et 10%-90%. Par ailleurs, chaque stock pur a été utilisé comme contrôle.

Ces mélanges sont centrifugés à 3500 rpm à 4°C pendant 30 minutes, les culots de parasites sont lavés (3000 rpm, 10 minutes à 4°C) dans 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline: 0,01 M; NaCl 0,15 M; pH 7,2), puis repris dans 1 ml de PBS et centrifugés (10 000 rpm, 10 minutes à 4°C) en tubes Eppendorf préalablement pesés. Après cette dernière centrifugation, les surnageants sont éliminés, et les tubes, pesés. La différence de poids (tube plein moins tube vide) nous donne le poids du culot parasitaire.

3.4. Cinétiques de croissance des épimastigotes

Toutes les cinétiques de croissance ont été effectuées en boîtes de culture de 75 cm². La concentration initiale en parasites a été fixée à 5x10⁵ parasites/ml. En effet, il s'agit de la plus faible concentration pour laquelle les stocks ne présentent aucune phase de latence. Le volume final de LIT 10% SVF (sans antibiotique) est de 50 ml. Le milieu de culture utilisé est préalablement filtré successivement sur 3 membranes de nitrocellulose dont le diamètre des pores est de 1 µm; 0,45 µm et 0,22 µm. Tous les inoculums ont été fait à partir de cultures en phase exponentielle de croissance.

Afin d'évaluer la reproductibilité des résultats, toutes les cinétiques ont été répétées 3 fois. Nous avons donc cultivé :

- * 3 boîtes pour les clones purs: 19, 20, 39, 32
- * 3 boîtes pour les mélanges de clones : 19-39, 20-39, 20-32

Les inoculums pour l'étude de la cinétique des mélanges de clones ont été :

- * $2,5 \times 10^5$ parasites/ml de P209 cl1 et $2,5 \times 10^5$ parasites/ml de Mn cl2
- * $2,5 \times 10^5$ parasites/ml de Cutia cl1 et $2,5 \times 10^5$ parasites/ml de Mn cl2
- * $2,5 \times 10^5$ parasites/ml de P209 cl1 et $2,5 \times 10^5$ parasites/ml de CBB cl3.

Toutes ces boîtes de culture ont été incubées à 27°C en position couchée.

3.4.1. Suivi des cinétiques de croissance.

Tous les 2 jours, 3 prélèvements de chaque boîte sont effectués après homogénéisation pour le comptage des parasites sur cellule de Thoma, ce qui permet d'évaluer la concentration en parasites. Les prélèvements sont dilués en fonction de leur densité avec une solution de fixation contenant du bleu trypan (PBS 0,01 M; NaCl 190 mM; formaldéhyde 0,75%; bleu trypan 0,2%; pH 7,2). Le bleu trypan est un colorant vital qui ne colore que les cellules mourantes ou mortes. Le nombre de parasites dans toute la chambre de numération est multiplié par un facteur de dilution $\times 10^4$ pour obtenir la concentration en parasites/ml de chaque boîte. Les cinétiques de croissance sont suivies jusqu'à la dégénérescence quasi totale des parasites.

3.4.2. Suivi de la composition des mélanges à différents temps des cinétiques de croissance.

Parmi les 9 boîtesensemencées :

- 3 sont récoltées à J+7 (milieu estimé de la phase exponentielle de croissance)
- 3 sont récoltées à J+14 (fin estimée de la phase exponentielle de croissance, début de la phase de ralentissement)
- 3 sont récoltées à J+21 (milieu estimé de la phase de plateau).

3.4.3. Suivi de la composition des mélanges après repiquages tous les 7 jours.

Trois boîtes des différents mélanges sontensemencées, toujours avec la même concentration initiale en parasites de 5×10^5 /ml. Le premier repiquage a lieu à J+12, en phase de croissance exponentielle. Le volume de culture restant après le repiquage doit contenir assez de parasites pour appliquer les techniques de caractérisation (isoenzyme et RAPD). Dans ce but, les concentrations initiales en parasites ont été augmentées de 5×10^5 à 5×10^6 /ml. Par la suite, les repiquages des mélanges ont lieu tous les 7 jours ainsi que les analyses isoenzymatiques et RAPD.

3.5. L'électrophorèse isoenzymatique.

3.5.1. Généralités.

Le terme «isoenzymes» désigne des enzymes présentant la même fonction enzymatique, mais de mobilité différente en électrophorèse. Les protéines migrent dans un champ électrique, et les différences de migrations observées traduisent une différence de charge électrique globale de la molécule, reflet de la variation de la structure primaire de la protéine, qui est elle-même le reflet d'une variation du gène correspondant.

3.5.2. Technique électrophorétique.

- Préparation des extraits isoenzymatiques.

Les culots parasitaires préalablement congelés et conservés à -80°C ont été lysés par une solution hypotonique (dithiothreitol 2 mM; acide aminocaproïque 2 mM; EDTA 2 mM). Après une période de 20 minutes de lyse dans la glace, le lysat est centrifugé à 10000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, puis le surnageant, contenant les enzymes hydrosolubles, est prélevé et aliquoté. Les culots, constitués par des débris cellulaires, ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN total.

- Les systèmes enzymatiques étudiés.

Neuf systèmes enzymatiques ont été choisis, qui permettent de caractériser de façon discriminante les divers stocks en mélanges (Annexe 1).

- Le support.

Les extraits enzymatiques sont déposés sur des plaques d'acétate de cellulose (HELENA, Beaumont, Texas, USA). Les plaques sont imbibées 20 minutes dans le tampon d'électrophorèse, dont la dilution dépend du système enzymatique à étudier (Annexe 1). Les enzymes sont déposées à l'aide d'un applicateur sur les plaques et migrent dans le film de tampon à la surface du gel.

- Migration des gels.

Les plaques sont déposées dans les cuves d'électrophorèse contenant le tampon de migration adéquat.

Toutes les migrations sont anodiques (sauf pour la SOD, pour laquelle le dépôt est central). La migration est rapide, 30 minutes au maximum. La plupart des migrations sont réfrigérées par des éponges refroidies à -20°C déposées au milieu de la cuve. Le voltage appliqué et le temps de migration dépendent du système enzymatique étudié (Annexe 1).

- Révélation des gels.

Après migration, les bandes protéiques sont révélées par des procédés biochimiques spécifiques. Cette révélation s'effectue sur un milieu solide (agarose à 1,2%) contenant tous les ingrédients nécessaires à la révélation (Annexe 2).

En fin de migration, la plaque d'acétate est déposée sur le gel d'agarose, puis placée dans une étuve à 37°C. La révélation est arrêtée par un bain d'acide acétique à 5%. Après lavage dans l'eau, la plaque est séchée à l'air libre.

3.5.3. Interprétation des résultats.

Les électromorphes sont répertoriés d'après leur vitesse de migration. La bande la plus rapide est notée 1, la deuxième plus rapide est notée 2 et ainsi de suite. En ce qui concerne les résultats des gammes étalons et des suivis des 3 mélanges, l'interprétation se fait en déterminant s'il existe une superposition des profils isoenzymatiques des génotypes pris séparément.

3.6. Amplification de l'ADN par amorce aléatoire ou RAPD.

3.6.1. Généralités.

Les marqueurs génétiques moléculaires se sont révélés être d'excellents outils d'analyse de la variabilité génétique et des liens de parenté génétique. Le développement depuis 4 ans de la technique RAPD (14,15) montre le potentiel important de cette méthode pour la caractérisation génétique des souches de protozoaires parasites (16,17).

Le principe de cette technique repose sur l'amplification d'ADN génomique avec une amorce de 10 nucléotides dont la séquence est arbitrairement sélectionnée. Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,6%. La présence ou l'absence de fragments amplifiés dépend de l'existence, dans le génome étudié, de séquences complémentaires à l'amorce. Le profil d'amplification dépend de l'amorce utilisée, mais aussi des conditions de réaction (18).

3.6.2. Extraction de l'ADN.

L'ADN a été purifié à partir des culots parasitaires. L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée en 3 étapes:

- **lyse cellulaire**: le culot parasitaire est lysé à 55°C pendant une nuit dans 600 µl de tampon de lyse (Tris-HCl pH 8 10 mM; EDTA 1 mM; SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) à 1%) en présence de 100 µg/ml de protéinase K

- **déprotéinisation**: les protéines sont éliminées par 2 extractions au phénol, suivies de 2 extractions au chloroforme. Après chaque extraction, la solution est homogénéisée et centrifugée à 12000 g pendant 10 minutes à 20°C. La phase aqueuse contient l'ADN.

- **précipitation de l'ADN**: suite à l'ajout d'acétate de sodium 3 M à 10% du volume final, l'ADN est précipité dans l'éthanol absolu froid pendant une heure à -70°C. Après centrifugation à 12000 g pendant 30 minutes à 4°C, le culot d'ADN est lavé 2 fois à l'éthanol 70%, puis séché et re-suspendu dans un volume minimum d'eau stérile.

La concentration d'ADN est déterminée par spectrophotométrie. Un spectre d'absorption est ainsi établi à des longueurs d'ondes variant de 210 nm à 300 nm (UV). Une contamination par de l'ARN ou des protéines se traduit par une distorsion de la courbe. Le pic d'absorption maximum pour un ADN purifié se situe aux environs de 257 nm.

La concentration est calculée à partir de la densité optique (DO) au maximum d'absorption. L'ADN en solution est conservé dans de l'eau stérile à -20°C.

3.6.3. La technique RAPD.

Les conditions techniques que nous avons utilisées, sont analogues à celles de Williams et al. (19).

- Réactifs et matériel.

Les amorces oligonucléotidiques, constituées de 10 nucléotides, ne contiennent aucun palindrome. Les amorces choisies ont été préalablement testées par Tibayrenc et al. (16). Dans notre étude, nous utilisons 2 amorces différentes : A 7 et A 10 (Appligene). (Annexe 2)

- Le programme d'amplification comprend:

* 45 cycles comprenant trois segments:

+ dénaturation (1 minute à 94°C)

+ appariement (1 minute à 36°C)

+ synthèse (2 minutes à 72°C)

* 1 cycle d'élongation finale de 7 minutes à 72°C.

3.6.4. Amplification et visualisation des bandes.

- **Amplification**: 20 ng d'ADN sont amplifiés dans 60 µl de milieu réactionnel (6 µl de PCR reaction buffer (Boehringer Mannheim); 0,01 µM d'un mélange des dNTP) en présence de l'amorce à 0,1 mM et de 1,5 UI de Taq polymérase (Boehringer Mannheim). Le volume final est ajusté à 60 µl avec de l'eau stérile.

- **Gels d'électrophorèse**: les fragments d'ADN amplifiés sont séparés selon leur taille sur gel d'agarose à 1,6% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. La migration est réalisée à 85 volts pour les grands gels. Le gel est ensuite observé sous UV et photographié.

3.6.5. Lecture des profils RAPD.

Les bandes sont codées en commençant par le chiffre 1 pour la bande présentant la mobilité électrophorétique la plus faible (donc le fragment d'ADN le plus grand). Pour les 2 amorces, chaque stock et chaque mélange est donc représenté par un ensemble de nombres.

L'interprétation des gammes étalons et des 3 mélanges se fera par l'observation de la superposition des 2 profils RAPD des clones constituant le mélange. Tout comme l'interprétation des profils isoenzymatiques, l'intensité des bandes pourra être prise en compte pour estimer de manière semi-quantitative les proportions des 2 clones constituant un mélange.

3.7. Méthodes statistiques

3.7.1. Le test t de Student.

Le test t de Student qui est utilisé pour de petits effectifs (< à 30), permettra de savoir par la comparaison de moyennes si les mélanges diffèrent significativement des clones purs (20).

3.7.2. La modélisation des cinétiques de croissance.

L'avantage de cette méthode par rapport à l'analyse précédente réside dans le fait que l'ensemble de la courbe est pris en compte : phase exponentielle de croissance + phase plateau + phase de dégénérescence. Les mélanges représentent les variables à expliquer. En d'autres termes, on recherche quel comportement adoptent les différents mélanges : celui des clones rapides, celui des clones lents ou un autre différent des deux premiers.

Les stocks sont considérées comme les variables explicatives. Les coefficients de corrélation multiple (**21**) sont déterminés pour les différents modèles, qui sont au nombre de 4:

- 1- Mélange = constante + stock rapide (19 ou 20)
- 2- Mélange = constante + stock lent (32 ou 39)
- 3- Mélange = constante + stock rapide + stock lent
- 4- Mélange = constante + stock rapide + stock lent + stock rapide * stock lent

Les 2 premiers modèles correspondent aux comparaisons de temps de doublement, mais en prenant en compte le niveau d'information maximum. Les 2 derniers modèles permettent de savoir si les 2 stocks des mélanges et non un seul expliquent le comportement de ce mélange. De plus, ces modèles mettent en évidence une interaction éventuelle entre les 2 stocks entrant dans le mélange.

Enfin, les modèles sont comparés entre eux pour chaque cinétique. Afin de vérifier s'il existe une différence significative entre les différents modèles, un test de Fisher (**20**) est alors effectué sur les coefficients de corrélation multiple.

IV. RESULTATS

4.1. Cinétiques de croissance.

4.1.1. Interprétation des courbes de cinétique de croissance.

Les résultats des cinétiques de croissance sont représentés sous forme de courbes exprimant le logarithme du nombre de parasite/ml en fonction du temps exprimé en jours. Toutes les cinétiques sont répétées trois fois, ainsi que toutes les numérations. Chaque point correspond donc à la moyenne de 9 comptages.

La solution de coloration ayant servi pour les numérations contient, en plus du bleu trypan, du formaldéhyde utilisé comme fixateur. Nous avons testé cette solution sans ajouter de fixateur afin de nous assurer que ce produit ne provoque pas un effet létal envers les parasites qui fausserait les numérations. La comparaison a été réalisée sur 8 jours à l'aide du test t de Student. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre la solution de coloration contenant le fixateur et celle n'en contenant pas.

Les cinétiques présentent toujours 3 phases :

- * une phase de croissance exponentielle
- * une phase de plateau, dont la longueur est variable en fonction des stocks considérés
- * une phase de dégénérescence ou de lyse cellulaire également variable en fonction des stocks.

La première phase est caractérisée par 2 paramètres: le temps de doublement (ou Doubling Time : DT), et la concentration parasitaire de fin de phase logarithmique. Le temps de doublement est déterminé par la pente de la droite de la phase exponentielle. La valeur correspondante est une constante pour un stock donné (Tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes cinétiques.

STOCKS	CLONES et MELANGES	DT en heures	Conc. max. parasites x 10 ⁶ /ml	Durée Phase log. en jours	Durée Phase plateau en jours	Durée Phase lyse en jours
P209 cl1	20	69,9 ± 3,42	46,4 ± 9,27	14	8	8
Mn cl2	39	129 ± 42,2	9,74 ± 3,97	26	14	12
P209+Mn	20+39	83,0 ± 22,2	30,9 ± 11,4	14	8	8
Cutia cl1	19	67,8 ± 14,7	82,5 ± 14,8	16	<4	16
Mn cl2	39	116 ± 18,8	10,6 ± 4,36	20	12	8
Cutia+ Mn	19+39	79,7 ± 3,87	57,9 ± 11,2	16	<4	>16
P209 cl1	20	80,0 ± 11,7	34,8 ± 2,37	12	8	6
CBB cl3	32	109 ± 14,8	13,6 ± 1,75	12	8	6
P209+CBB	20+32	95,5 ± 7,55	36,1 ± 8,07	12	10	>4

4.1.1.1. Cinétiques des stocks isolés

En confirmation des données de Laurent (1994) et de Revollo (1995), l'analyse des temps de doublement montre que :

- * les stocks appartenant aux clones 19 (Cutia cl1) et 20 (P209 cl1) sont les plus rapides
- * le stock appartenant au clone 39 (Mn cl2) est le plus lent
- * le stock appartenant au clone 32 (CBB cl3) présente une vitesse de

croissance intermédiaire.

L'analyse des phases de plateau et des phases de lyse cellulaire montrent que :

* pour P209 cl1, la concentration parasitaire en fin de phase exponentielle est haute, la phase de plateau est longue (entre 6 et 8 jours), et la lyse cellulaire est rapide.

* Cutia cl1 atteint une concentration parasitaire en fin de phase exponentielle plus élevée, et la phase plateau est quasi inexistante. Lorsque la concentration maximale est obtenue, la lyse parasitaire apparaît très vite.

* CBB cl3 est caractérisé par une concentration parasitaire maximale beaucoup plus faible et une phase de plateau longue (environ 8 jours), ainsi qu'une phase de dégénérescence rapide.

* Mn cl2 est le stock dont la concentration maximale est la plus faible. En revanche, il présente une phase plateau beaucoup plus longue (entre 12 et 14 jours) et une dégénérescence assez lente.

Les phases exponentielles et les phases plateaux sont reproductibles pour un même lot de 3 cinétiques. Les phases de dégénérescence, au contraire, ne sont pas du tout reproductibles.

Ces différences de comportement sont mis en évidence par des courbes moyennes où figurent les erreurs standards. (Figure 2)

4.1.1.2. Cinétiques des mélanges.

Les courbes correspondant aux 3 différents mélanges sont presque confondues avec celles des stocks les plus rapides (P209 cl1 et Cutia cl1).

4.1.2. Analyses statistiques des résultats.

4.1.2.1. Tests de reproductibilité.

Nous avons testé la reproductibilité de 2 paramètres des cinétiques : le temps de doublement et la concentration parasitaire maximale pour tous les stocks en fin de phase exponentielle de croissance. La reproductibilité est considérée comme bonne lorsque le coefficient de variation est inférieur à 20%; elle est considérée comme nulle lorsqu'il dépasse 40% (22).

Les coefficients de variation des différents temps de doublement montrent une bonne reproductibilité au sein d'un même lot de boîtes de culture. Les mêmes tests ont été réalisés pour les 2 séries de valeurs concernant P209 cl1. Le temps de doublement est également reproductible (8,18%) pour le même stock cultivé à des moments différents.

Pour les 2 séries de valeurs obtenues avec Mn cl2, le coefficient de variation est légèrement supérieure à 20% (24,8%). La reproductibilité dans le temps est discutable dans ce cas. Les coefficients de variation des concentrations maximales en fin de phase logarithmique montrent également une bonne reproductibilité pour un même lot de boîtes de culture. Ce paramètre est également reproductible pour le même stock cultivé à des moments différents. Les coefficients de variation sont pour P209 cl1 et Mn cl2 respectivement de 15,9% et 17,0%.

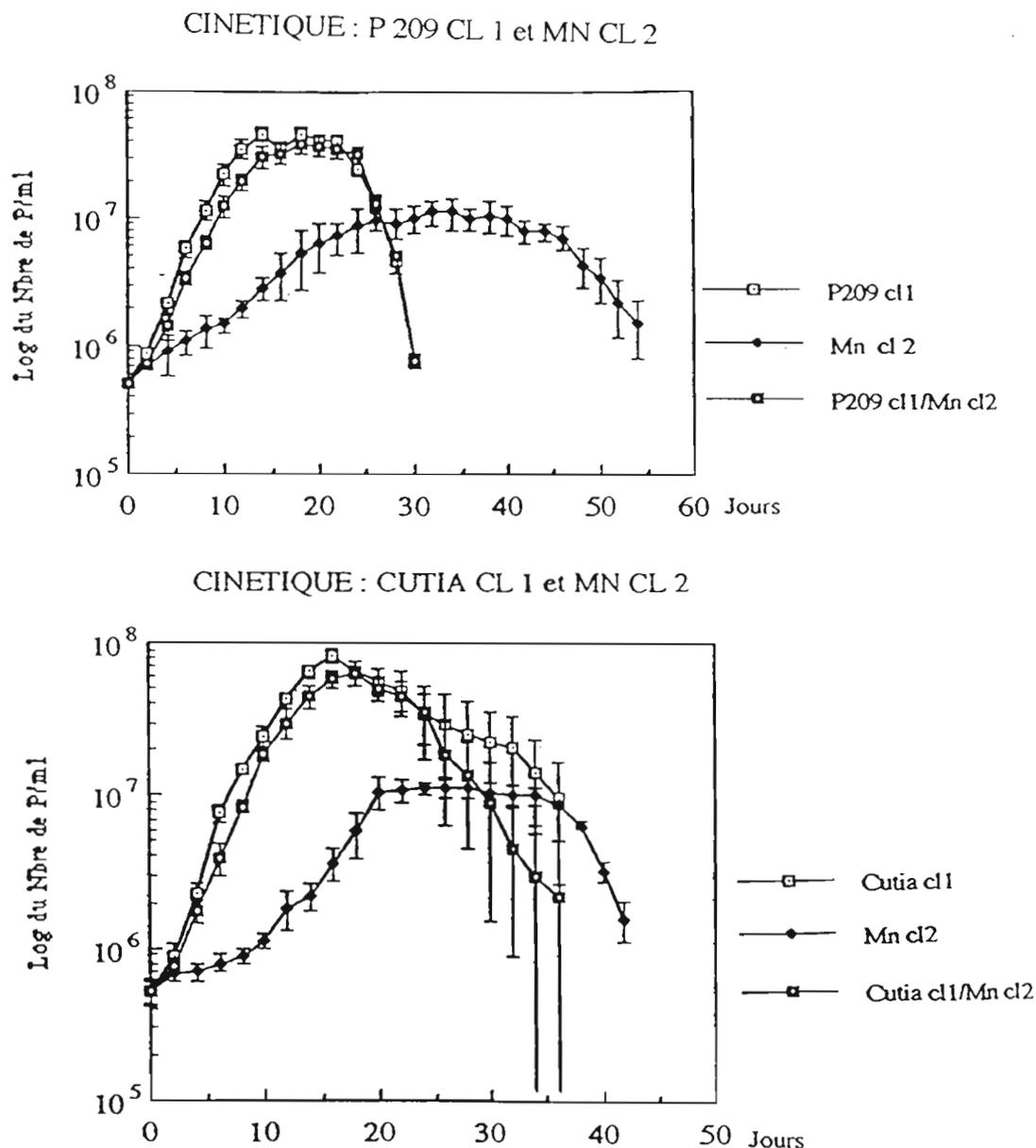


Figure 2 : Représentation graphique des différentes cinétiques de croissance.

CINETIQUE : P209 cl1 et CBB cl3

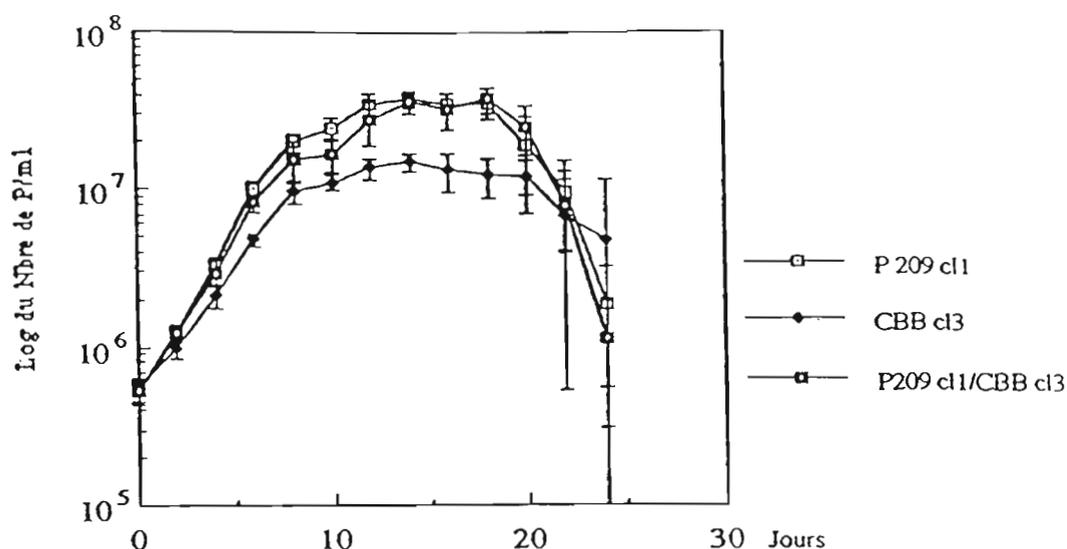


Figure 2 (suite): Représentation graphique des différentes cinétiques de croissance.

4.1.2.2. Temps de doublement et concentrations parasitaires maximales.

Les temps de doublement et les concentrations maximales étant reproductibles, nous pouvons donc comparer les différents mélanges avec les clones pris séparément pour ces deux paramètres (Tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison statistique des temps de doublement et des concentrations maximales en fin de phase exponentielle de croissance avec les mêmes paramètres que ceux utilisés pour les clones purs.

	H0 : DT A = DT B	H0 : Conc. max. A = Conc. max. B
P209 cl1 / Mn cl2		
Mélange / P209 cl1	H0 pas rejetée	H0 rejetée
Mélange/ Mn cl2	H0 rejetée	H0 rejetée
Cutia cl1 / Mn cl2		
Mélange / Cutia cl1	H0 pas rejetée	H0 rejetée
Mélange / Mn cl2	H0 rejetée	H0 rejetée
P209 cl1 / Mn cl2		
Mélange / P209 cl1	H0 rejetée	H0 pas rejetée
Mélange / CBB cl3	H0 pas rejetée	H0 rejetée

4.1.2.3. Modélisation des cinétiques de croissance.

Le tableau 4 regroupe les résultats de la modélisation permettant d'évaluer dans quelles mesures les mélanges sont expliqués par les clones purs.

Puis, les modèles sont comparés entre eux pour chaque cinétique. Afin de vérifier s'il existe une différence significative entre les différents modèles, un test de Fischer est alors effectué sur les coefficients de corrélation multiple. Pour les 2 premières cinétiques de croissance, il n'existe pas de différence significative entre les modèles 2, 3 et 4. Le modèle 1 est significativement différent des modèles 2, 3 et 4. Pour la cinétique P209 cl1/ CBB cl3, il n'y a aucune différence significative entre les 4 modèles.

Tableau 4 : Résultats de la modélisation des cinétiques de croissance.

MODELES	COEFFICIENT DE CORRELATION	INTERPRETATION : CORRELATION
P209 cl1 / Mn cl2 Mélange= cste+P209 cl1 Mélange= cste+ Mn cl2 Mélange= cste+ P209 cl1+ Mn cl2 Mélange= cste+ P209 cl1+ Mn cl2+ P209*Mn cl2	$R^2 = 0,944$ $R^2 = 0,290$ $R^2 = 0,961$ $R^2 = 0,981$	Significative Non significative Significative Significative
Cutia cl1 / Mn cl2 Mélange= cste+ Cutia cl1 Mélange= cste+ Mn cl2 Mélange= cste+ Cutia cl1+ Mn cl2 Mélange= cste+ Cutia cl1+ Mn cl2+ Cutia cl1*Mn cl2	$R^2 = 0,959$ $R^2 = 0,159$ $R^2 = 0,960$ $R^2 = 0,983$	Significative Non significative Significative Significative
P209 cl1 / CBB cl3 Mélange= cste+ P209 cl1 Mélange= cste+ CBB cl3 Mélange= cste+ P209 cl1+ CBB cl3 Mélange= cste+ P209 cl1+ CBB cl3+ P209 cl1*CBB cl3	$R^2 = 0,931$ $R^2 = 0,969$ $R^2 = 0,969$ $R^2 = 0,970$	Significative Significative Significative Significative

4.2. Les gammes étalons.

4.2.1. Electrophorèses isoenzymatiques sur acétate de cellulose.

Les 9 systèmes isoenzymatiques choisis pour faire les gammes étalons des 3 mélanges étudiés ont tous permis de mettre en évidence la présence de 2 génotypes pour la plupart des proportions employées. En postulant que tous les systèmes enzymatiques testés sont présents en quantité égale pour les différents clones naturels, une interprétation semi-quantitative de la composition des mélanges est possible. Cependant, tous ces systèmes isoenzymatiques n'ont pas la même sensibilité pour détecter deux génotypes différents. Il est donc intéressant de déterminer quels sont ces systèmes plus sensibles et pour quels mélanges.

L'observation des différentes plaques isoenzymatiques obtenues avec les gammes étalons de chaque mélange a montré que:

- * les profils isoenzymatiques des mélanges correspondent exactement à la superposition des profils des stocks purs constituant les gammes
- * l'intensité des bandes est proportionnelle aux proportions des deux clones respectifs.

A la lecture des plaques d'isoenzymes, il apparaît que certains systèmes isoenzymatiques sont réellement plus sensibles que d'autres surtout pour des proportions 90%-10%. Cette sensibilité est également dépendante des stocks constituant les mélanges. Par exemple, les systèmes MPI et GDH ne distinguent pas P209 cl1 de CBB cl3 en proportion 10%-90%. Parmi les 9 systèmes isoenzymatiques sélectionnés, 6 fournissent une sensibilité supérieure à 90% dans les mélanges (GOT, GPI, IDH, PEP1, 6PGDH (photo 1), SOD). Seuls les systèmes MPI, PGM et GDH ne présentent qu'une sensibilité d'environ 75%.

4.2.2. Résultats des RAPD.

La caractérisation par les RAPD confirme dans son ensemble les résultats isoenzymatiques des différentes gammes étalons.

- **L'amorce A7.** Dans les cas des mélanges P209 cl1/Mn cl2 et Cutia cl1/Mn cl2, cette amorce est capable de distinguer les différents génotypes dans toutes les proportions testées, sauf dans le cas du mélange 90% Mn cl2-10% P209 cl1 ou 10% Cutia cl1. De même, pour le mélange P209 cl1/CBB cl3, la détection des 2 génotypes est valable pour toutes les proportions utilisées sauf dans le cas du mélange 90% CBB cl3-10% P209 cl1. Tout comme avec les isoenzymes, les profils RAPD correspondent exactement à la superposition des profils des stocks simples constituant les mélanges (photo 2).

L'intensité des bandes est directement proportionnelle aux quantités de chacun des deux clones. La sensibilité de cette amorce pour la détection des mélanges est supérieure à 75% quand les clones 39 et 32 sont majoritaires, alors qu'elle est supérieure à 90% lorsque les clones 19 et 20 sont majoritaires.

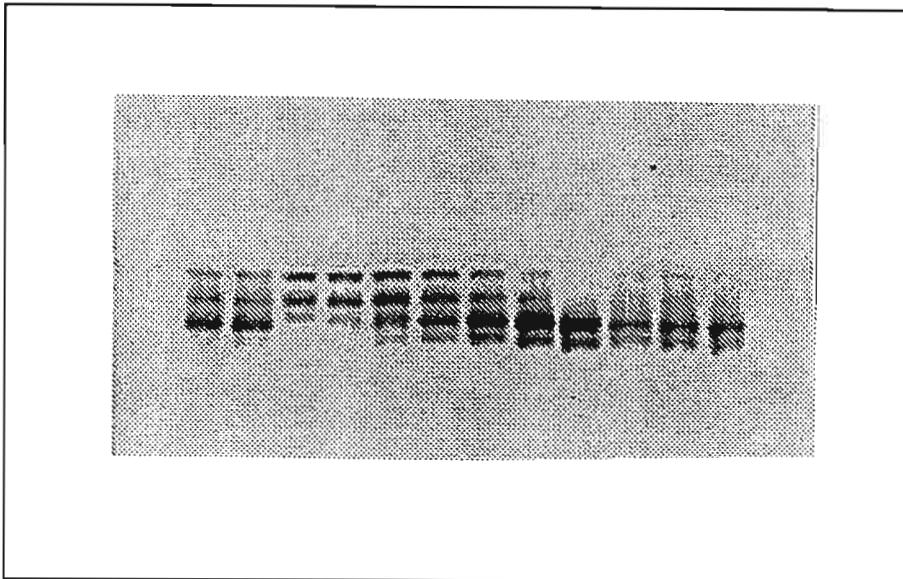
- **L'amorce A10.** Pour le mélange P209 cl1/CBB cl3, les observations qui ont été faite quant à l'allure générale des profils RAPD se révèle, une fois de plus, valable.

Il n'en est pas de même pour le mélange P209 cl1/ Mn cl2. En effet, l'amorce A10 n'est pas capable de mettre en évidence les mélanges de ces 2 stocks. Le seul génotype révélé est celui de Mn cl2 sauf quand celui-ci est dans une proportion inférieure à 25%.

Pour le mélange Cutia cl1/Mn cl2, ce même phénomène est observé. La distinction des 2 génotypes est impossible, même lorsque le mélange est de 90%-10% en faveur de Cutia cl1.

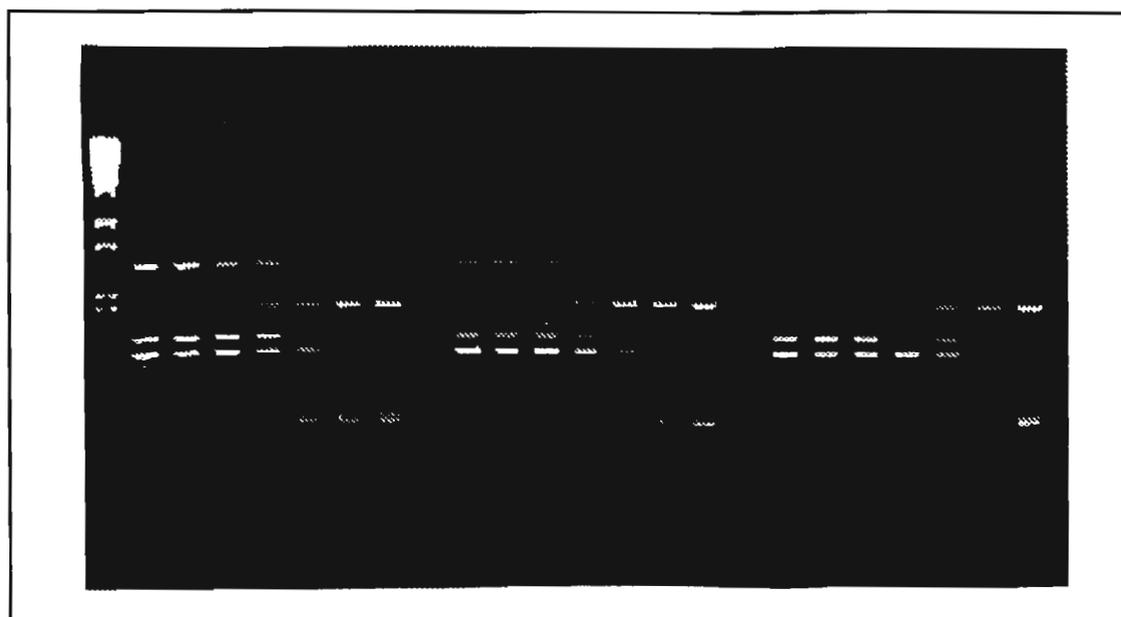
Dans ces 2 derniers mélanges, la sensibilité de l'amorce A10 pour la détection des 2 génotypes est respectivement de 25% et 10%. Cette amorce semble donc avoir une "préférence" pour l'ADN du stock appartenant au clone 39. Ce phénomène serait dû à un ADN de haute complexité possédant des sites complémentaires de l'amorce beaucoup plus spécifiques (19). Ce phénomène fait que l'amorce A10 ne permet pas une détection quantitative des mélanges de stocks.

Photo 1 : Zymogramme de la 6 PGDH de la gamme étalon du mélange Cutia cl1/Mn cl2



1 et 2 : Cutia cl1/Mn cl2 à J+7; **3 :** 100% Mn cl2; **4 :** 90% Mn cl2-10% Cutia cl1; **5 :** 75% Mn cl2-25% Cutia cl1; **6 :** 50% Mn cl2- 50% Cutia cl1; **7 :** 25% Mn cl2-75% P209 cl1; **8 :** 10% Mn cl2-90% Cutia cl1; **9 :** 100% Cutia cl1;**10; 11 et 12 :** Cutia cl1/Mn cl2 à J+14.

Photo 2 : Profil RAPD (amorce A7) des gammes étalons des mélanges P209 c11/Mn c12; Cutia c11/Mncl2 et P209 c11/CBB c13.



- 1 : marqueurs de poids moléculaires
- 2 à 8 : Gamme étalon du mélange P209 c11/Mn c12 (100% Mn c12; 90%-10%; 75%-25%; 50%-50%; 25%-75%; 10%-90%; 100% P209 c11)
- 10 à 16 : Gamme étalon du mélange Cutia c11/Mn c12 (100% Mn c12; 90%-10%; 75%-25%; 50%-50%; 25%-75%; 10%-90%; 100% Cutial c11)
- 18 à 25 : Gamme étalon du mélange P209 c11/CBB c13 (100% CBB c13; 90%-10%; 75%-25%; 50%-50%; 25%-75%; 10%-90%; 100% P209 c11)

4.3. Suivi à court terme de l'évolution de la composition des mélanges.

4.3.1. Résultats des électrophorèses isoenzymatiques.

Les gammes étalons permettant un dosage semi-quantitatif de la composition des mélanges, nous pouvons mettre en évidence les changements de composition de ces mélanges aux différents temps: J+7, J+14, J+21 (Tableau 5).

Tableau 5 : Suivi par les isoenzymes de la composition des mélanges à J+7, J+14 et J+21.

P209 c11 / Mn c12			
	J+7	J+14	J+21
100%-0%			X (MPI, PGM)
> à 90%			X
90%-10%		X	
75%-25%	X		
Cutia c11 / Mn c12			
	J+7	J+14	J+21
100%-0%			X (MPI, PGM)
> à 90%			X
90%-10%		X	
75%-25%	X		
P209 c11 / CBB c13			
	J+7	J+14	J+21
100%-0%			X (MPI)
90%-10%			X
75%-25%		X	
50%>>75%	X		

L'analyse isoenzymatique est réalisée sur les 3 boîtes de cinétique pour les 3 temps donnés. Tous les résultats sont concordants: reproductibles entre les 3 boîtes mais différents suivant la sensibilité des systèmes isoenzymatiques testés.

L'évolution des mélanges initiaux 50%-50% est la suivante : à J+7 les mélanges 19-39 et 20-39 montrent des proportions de 75%-25% en faveur des stocks les plus rapides (clones 19 et 20). A J+14, ces proportions ne sont plus que de 90%-10% toujours en faveur des stocks rapides. Enfin, à J+21, Les 2 stocks rapides sont présents à plus de 90%. A J+21, dans le cas du mélange P209 cl1/Mn cl2, les systèmes isoenzymatiques PGM, MPI, 6PGDH n'ont pas permis de détecter les deux génotypes. De même pour le mélange Cutia cl1/Mn cl2 à J+21, les systèmes PGM et MPI ne distinguent pas les 2 génotypes: dans ces deux cas, seul le stock le plus rapide est détecté.

En ce qui concerne le mélange P209 cl1/CBB cl3 à J+7, le mélange est compris entre les proportions 50%-50% et 75%-25% en faveur, une fois de plus, du stock le plus rapide (P209 cl1). A J+14, tous les systèmes isoenzymatiques, sauf MPI, qui ne montre plus de mélange à ce stade, permettent d'estimer le mélange à 75%-25%. A J+21, tous les systèmes permettent l'estimation du mélange à 90%-10% en faveur de P209 cl1 (sauf MPI).

4.3.2. Résultats des RAPD.

Comme avec l'analyse isoenzymatique, les gammes étalons permettent la mise en évidence d'une évolution de la composition des différents mélanges au temps J+7, J+14, J+21. De la même manière, une évaluation semi-quantitative est possible lorsque l'amorce le permet (Tableau 6).

Tableau 6 : Suivi par les RAPD de la composition des mélanges à J+7, J+14 et J+21.

P209 cl1 / Mn cl2			
	J+7	J+14	J+21
90%-10%			X A7 et A10
75%-25%		X A7 et A10	
50%-50%	X A7		
0%-100%	X A10		
Cutia cl1 / Mn cl2			
	J+7	J+14	J+21
90%>>100%		X A10	X A10
90%-10%			X A7
75%-25%		X A7	
50%-50%	X A7		
0%-100%	X A10		
P209 cl1 / CBB cl3			
	J+7	J+14	J+21
75%-25%		X A10	X A7 et A10
50%-50%	X A7 et A10	X A7	

- **L'amorce A7.** Quelque soit le mélange, cette amorce est capable de détecter les différents génotypes jusqu'à J+21. A J+21, les stocks rapides sont présents dans de plus fortes proportions: 90% de P209 cl1 dans le mélange P209 cl1/Mn cl2, entre 90% et 100% de Cutia cl1 dans le mélange Cutia cl1/Mn cl2 et 75% de P209 cl1 dans le mélange P209 cl1/CBB cl3.

- **L'amorce A10.** Le niveau de détection des deux génotypes (P209 cl1 et Mn cl2) est très faible et n'est possible qu'à partir de J+14. En effet, Mn cl2 (clone 39) est le seul stock à être détecté jusqu'à J+7. A J+21, la présence des deux génotypes, par contre, est nettement mise en évidence.

Pour le mélange Cutia cl1/Mn cl2, les observations précédentes s'avèrent également valables. Dans ces 2 cas, La détection tardive des 2 génotypes est sans doute liée à la disparition progressive de Mn cl2.

Dans le cas du mélange P209 cl1/CBB cl3, les 2 génotypes sont identifiables de J+7 à J+21. La disparition du stock le plus lent (CBB cl3, clone 32) au profit du stock le plus rapide (P209 cl1, clone 20) est moins accentuée que dans les 2 autres mélanges.

A partir des estimations apportées par les gammes étalons, il est possible d'évaluer les concentrations des 2 stocks constituant les mélanges (données non fournies). Ces concentrations estimées à partir des profils isoenzymatiques et RAPD sont comparées de manière qualitative à celles des cinétiques des stocks purs. En effet, sachant qu'une seule numération a été effectuée pour J+7, J+14 et J+21, il n'est donc pas possible de comparer statistiquement ces concentrations avec celles des cinétiques des clones purs.

Dans les 3 mélanges, les stocks lents (Mn cl2 et CBB cl3) semblent augmenter jusqu'à J+14, puis diminuer à J+21. P209 cl1 dans les mélanges P209 cl1/Mn cl2 et P209 cl1/CBB cl3 semble encore en phase ascendante jusqu'à J+21 alors qu'à la même date, les stocks purs commencent déjà à subir la lyse cellulaire. La concentration de Cutia cl1 dans le mélange Cutia cl1/Mn cl2 est, quant à elle, moins élevée. Dans le mélange P209 cl1/CBB cl3, P209 cl1 à J+21 a une concentration plus faible que ne le laissait prévoir la courbe du stock pur. Ce phénomène n'est pas significatif car la phase de dégénérescence des parasites n'est pas reproductible.

4.4. Suivi de la composition des mélanges après repiquage tous les 7 jours.

4.4.1. Résultats des électrophorèses isoenzymatiques.

L'analyse isoenzymatique de ces mélanges est également réalisée sur 3 boîtes de culture pour chaque repiquage (4 au total). Les résultats obtenus sont homogènes pour chaque lot. Cependant quelques différences de sensibilité apparaissent entre les systèmes isoenzymatiques testés (Tableau 7).

Tableau 7 : Suivi par les isoenzymes de la composition des mélanges après repiquages successifs.

	P209 cl1 / Mn cl2				
	12 JOURS	1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
GDH	90%	100%	100%	100%	100%
GOT	90%	> à 90%	100%	100%	100%
GPI	75%>>90%	90%	> à 90%	100%	100%
IDH	90%	> à 90%	100%	100%	100%
MPI	90%	100%	100%	Moins intense	Profil disparu
PEP 1	90%	100%	100%	100%	100%
6 PGDH	90%	> à 90%	100%	100%	Profil disparu
PGM	90%	100%	100%	100%	100%
SOD	90%	> à 90%	100%	100%	100%
Cutia cl1 / Mn cl2					
	12 JOURS	1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
GDH	75%>>90%	90%	> à 90%	>> à 90%	100%
GOT	90%	> à 90%	>> à 90%	>>> à 90%	100%
GPI	90%	> à 90%	>> à 90%	100%	100%
IDH	100%	100%	100%	100%	100%
MPI	90%	100%	100%	100%	Profil disparu
PEP 1	90%	> à 90%	100%	100%	100%
6 PGDH	90%	> à 90%	100%	100%	Presque disparu
PGM	100%	100%	100%	100%	100%
SOD	90%	> à 90%	100%	100%	100%
P209 cl1 / CBB cl3					
	12 JOURS	1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
GDH	Détectable	Détectable	Détectable	Détectable	100%
GOT	75%	90%	> à 90%	>> à 90%	100%
GPI	75%	75%	90%	> à 90%	>> à 90%
IDH	50%>>75%	75%	90%	> à 90%	100%
MPI	90%	100%	100%	100%	100%
PEP 1	75%	90%	> à 90%	100%	100%
6 PGDH	50%>>75%	75%	75%>>90%	90%	90%
PGM	75%	90%	> à 90%	>> à 90%	100%
SOD	90%	> à 90%	100%	100%	100%

L'analyse des mélanges à J+12 montre la présence constante des 2 stocks constituant chaque mélange, ce qui corrobore les résultats précédents.

- Pour le suivi du mélange P209 cl1/Mn cl2, la disparition du stock le plus lent (Mn cl2) est assez rapide. En effet, GPI est le seul système isoenzymatique capable de détecter les 2 génotypes jusqu'au second repiquage. Pour les systèmes IDH, GOT, SOD et 6PGDH, la détection des deux génotypes ne va pas au delà du premier repiquage. Les systèmes PEP 1, GDH, MPI et PGM, quant à eux, ne détectent plus le mélange après le premier repiquage. A partir du troisième repiquage, le seul stock identifié par les isoenzymes est P209 cl1. Au quatrième repiquage, les systèmes MPI et 6PGDH ne révèlent plus aucune activité. Il est difficile d'expliquer ce phénomène, dont il faudrait vérifier la reproductibilité en renouvelant la manipulation.

- Pour le mélange Cutia cl1/Mn cl2, la détection du mélange est encore possible jusqu'au troisième repiquage avec 2 systèmes isoenzymatiques : GOT et GDH. GPI distingue les 2 stocks jusqu'au deuxième repiquage. PEP 1, 6PGDH et SOD caractérisent les 2 stocks en mélange jusqu'au premier repiquage seulement. MPI est incapable de détecter les 2 stocks au-delà du douzième jour. PGM et IDH ne permettent pas la détection des 2 génotypes même à J+12. Comme dans le mélange précédent, on observe une atténuation de l'activité du système MPI, qui n'est plus révélé au quatrième repiquage. L'activité de 6PGDH tend à disparaître également, mais n'est pas totalement éliminé.

- Dans le mélange P209 cl1/CBB cl3, les 2 génotypes sont détectés jusqu'au quatrième repiquage avec les systèmes GPI et 6PGDH. PGM, IDH, GDH et GOT identifient les 2 stocks jusqu'au troisième repiquage. PEP 1 met en évidence les 2 stocks jusqu'au deuxième repiquage seulement, et SOD jusqu'au premier repiquage, seulement. MPI n'est pas capable de détecter le mélange au delà du douzième jour. Les proportions détectées avec le système GDH ne sont pas quantifiables, à cause du manque de sensibilité de la gamme étalon GDH.

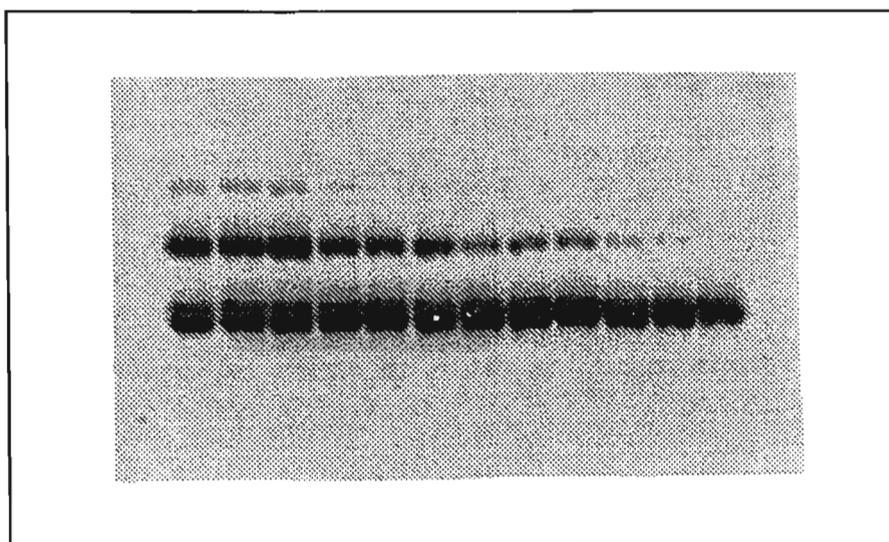
Compte tenu de la rapidité à laquelle les stocks lents disparaissent dans les mélanges 50%-50%, un autre mélange a été réalisé dans d'autres proportions: 90% de stock lent (Mn cl2) et de 10% de stock rapide (P209 cl1) (Tableau 8).

Tableau 8 : Suivi par les isoenzymes de la composition du mélange 10% P209 cl1 / 90% Mn cl2.

	12 JOURS	10% P209 cl1 / 90% Mn cl2			
		1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
GDH	50%	75%	50%>>75%	90%	100%
GOT	25%>>50%	75%>>90%	> à 90%	>> à 90%	100%
GPI	50%	75%	90%	> à 90%	100%
IDH	25%>>50%	75%>>90%	90%	> à 90%	100%
MPI	50%	75%	90%	100%	Profil disparu
PEP 1	50%	50%>>75%	75%	90%	100%
6 PGDH	50%	75%	90%	> à 90%	Profil disparu
PGM	75%	90%	> à 90%	100%	100%
SOD	50%	75%	90%	> à 90%	100%

A J+12, le mélange n'est déjà plus constitué que de 50% de P209 cl1 et de 50% de Mn cl2. Sept des 9 systèmes isoenzymatiques utilisés permettent de caractériser les 2 stocks jusqu'au troisième repiquage (photo 3). MPI et PGM permettent de distinguer les 2 génotypes jusqu'au deuxième repiquage seulement. Comme précédemment, les profils MPI et 6PGDH ne sont pas révélés au quatrième repiquage.

Photo 3 : Zymogramme de la GPI du mélange
10% P209 cl1/90% Mn cl2 après repiquages successifs.



- 1; 2 et 3 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 à J+12.
4; 5 et 6 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 au 1° repiquage (J+19).
7; 8 et 9 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 au 2° repiquage (J+26).
10; 11 et 12 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 au 3° repiquage (J+33).

4.4.2. Résultats des RAPD.

Les résultats du suivi de l'évolution des mélanges par les amorces A7 et A10 sont répertoriés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Suivi par les RAPD de la composition des mélanges après repiquages successifs.

		P209 cl1 / Mn cl2			
	J+12	1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
100%-0%		X A7	X A7	X A7	X A7 et A10
90%>>100%		X A10	X A10	X A10	
90%-10%	X A7 et A10				
		Cutia cl1 / Mn cl2			
	J+12	1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
100%-0%		X A7	X A7	X A7	X A7
90%>>100%	X A10	X A10	X A10	X A10	X A10
90%-10%	X A7				
		P209 cl1 / CBB cl3			
	J+12	1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
90%>>100%			X A7	X A7	X A7 et A10
90%-10%		X A7		X A10	
75%< >90%			X A10		
75%-25%	X A7	X A10			
50%-50%	X A10				

- **L'amorce A7.** Dans le mélange P209 cl1/Mn cl2, le niveau de détection des 2 stocks est faible à J+12 et aucune quantification n'est possible. Par la suite, le seul stock mis en évidence est P209 cl1. Pour le mélange Cutia cl1/Mn cl2, les observations sont identiques : dès le premier repiquage, Cutia cl1 est le seul stock représenté. En ce qui concerne le mélange P209 cl1/CBB cl3, les 2 stocks persistent jusqu'au quatrième repiquage dans des proportions supérieures à 90% pour P209 cl1.

- **L'amorce A10.** Dans le mélange P209 cl1/Mn cl2, les 2 stocks sont encore identifiés au troisième repiquage. A partir du quatrième repiquage, il n'y a plus que P209 cl1 qui soit représenté. Pour le mélange Cutia cl1/Mn cl2, les 2 stocks sont caractérisés jusqu'au quatrième repiquage, dans des proportions supérieures à 90% pour Cutia cl1. Dans le mélange P209 cl1/CBB cl3, les 2 génotypes persistent au moins jusqu'au quatrième repiquage dans des proportions supérieures à 90% pour P209 cl1.

Le tableau 10 regroupe les concentrations des différents clones dans les mélanges à J+12. Ces concentrations sont calculées à partir des estimations apportées par les gammes étalons pour les isoenzymes et les RAPD. Ces concentrations sont comparées par le test t de Student avec celles de cinétiques des clones purs relevées également à J+12.

Tableau 10 : Comparaison à J+12 des concentrations des clones dans les mélanges avec les concentrations tirées directement des cinétiques des clones purs.

	J+12		
	ISOENZYMES	CLONES PURS	DIFFERENCE
Mn cl2 dans P209 cl1/Mn cl2	4,5E+06 >> 11E+06	1,94E+06	Significative
Mn cl2 dans Cutia cl1/Mn cl2	4,1E+06 >> 10E+06	1,82E+06	Significative
CBB cl3 dans P209 cl1/CBB cl3	6,7E+06	13,6E+06	Non significative
P209 cl1 dans P209 cl1/Mn cl2	34E+06 >> 40E+06	36,0E+06	Non significative
Cutia cl1 dans Cutia cl1/Mn cl2	31E+06 >> 37E+06	42,4E+06	Non significative
P209 cl1 dans P209 cl1/CBB cl3	20E+06	34,4E+06	Significative
	J+12		
	RAPD	CLONES PURS	DIFFERENCE
Mn cl2 dans P209 cl1/Mn cl2	4,5E+06	1,94E+06	Significative
Mn cl2 dans Cutia cl1/Mn cl2	4,1E+06	1,82E+06	Significative
CBB cl3 dans P209 cl1/CBB cl3	13E+06	13,6E+06	Non significative
P209 cl1 dans P209 cl1/Mn cl2	40E+06	36,0E+06	Non significative
Cutia cl1 dans Cutia cl1/Mn cl2	37E+06	42,4E+06	Non significative
P209 cl1 dans P209 cl1/CBB cl3	13E+06	34,4E+06	Significative

Pour les mélanges P209 cl1/Mn cl2 et Cutia cl1/Mn cl2, à J+12 la concentration de Mn cl2 est supérieure significativement à celle de la cinétique du clone pur à la même date. Cette augmentation n'est pas retrouvée pour CBB cl3. Les concentrations en mélange des stocks rapides (P209 cl1 et Cutia cl1) ne présentent pas de différence significative avec celle des stocks purs, sauf pour P209 cl1 dans le mélange P209 cl1/CBB cl3.

La technique RAPD a également été utilisée pour le suivi du mélange 10% P209 cl1- 90% Mn cl2 (Tableau 11).

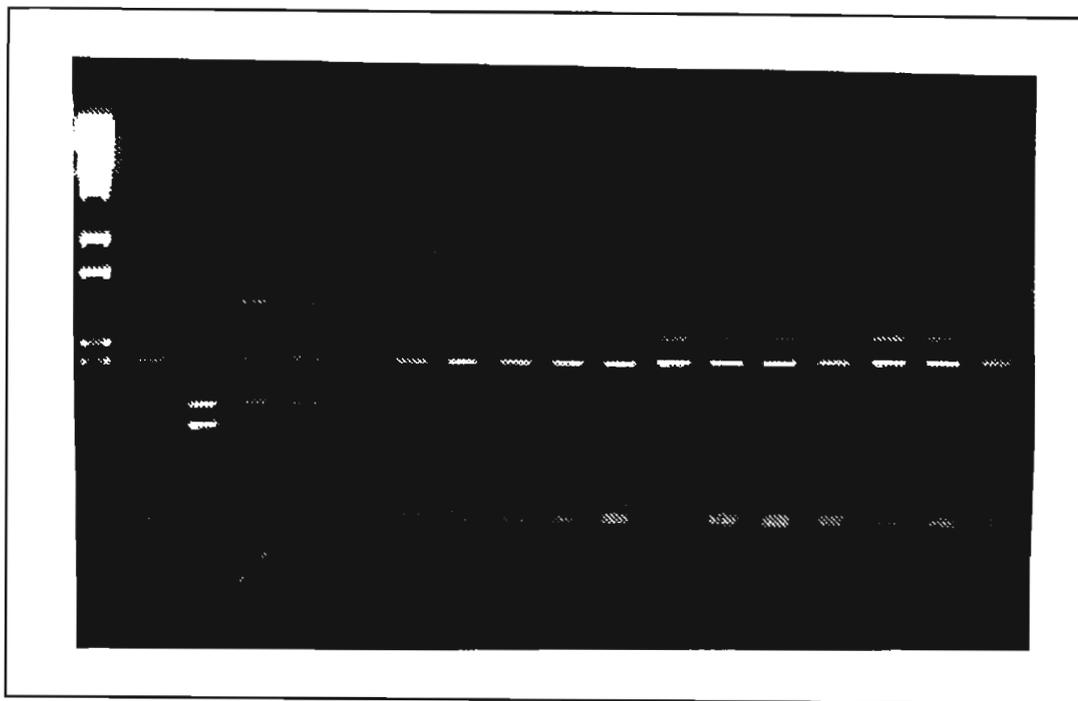
Tableau 11 : Suivi par les RAPD de la composition du mélange 10% P209 cl1 / 90% Mn cl2.

	10% P209 cl1 / 90% Mn cl2				
	12 JOURS	1° REPIQUAGE	2° REPIQUAGE	3° REPIQUAGE	4° REPIQUAGE
100%-0%			X A7	X A7	X A7
90%>>100%				X A10	X A10
90%-10%			X A10		
75%-25%		X A7 et A10			
50%-50%	X A7				
25%-75%					
10%-90%					
0%-100%	X A10				

- **L'amorce A7**. Les proportions initiales (90%-10%) deviennent 50%-50% à J+12. Après le premier repiquage il n'y a plus que 25% de Mn cl2 pour 75% de P209 cl1. Dès le deuxième repiquage, P209 cl1 est le seul génotype à être identifié (photo 4).

- **L'amorce A10**. A J+12 Mn cl2 est le seul stock identifiable. Au premier repiquage, la mise en évidence des 2 stocks est possible. Le mélange est alors constitué de 75% de P209 cl1 et de 25% de Mn cl2. Au deuxième repiquage, les 2 stocks sont distingués dans des proportions de 90% pour P209 cl1. Au niveau du troisième et quatrième repiquage, du fait de l'affinité spéciale d'A10 pour l'ADN de Mn cl2, le mélange est toujours apparent, P209 cl1 étant dans une proportion très supérieure à 90%.

Photo 4 : Profil RAPD (amorce A7) du mélange 10% P209 cl1/90% Mn cl2 après repiquages successifs.



- 1 : marqueurs de poids moléculaires; 2 : P209 cl1 pur; 3 : Mn cl2 pur.
 4; 5 et 6 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 à J+12.
 7; 8 et 9 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 au 1° repiquage (J+19).
 10; 11 et 12 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 au 2° repiquage (J+26).
 13; 14 et 15 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 au 3° repiquage (J+33).
 16; 17 et 18 : 10% P209 cl1/90% Mn cl2 au 4° repiquage (J+40).

V. DISCUSSION

5.1. Efficacité de la détection des mélanges par les marqueurs génétiques.

Les mélanges étalons en proportion variable montrent que : les isoenzymes permettent en général un dosage semi-proportionnel des mélanges, avec un meilleur seuil de détection pour certains systèmes que pour d'autres. Les résultats obtenus avec l'amorce RAPD A7 sont similaires à ceux des isoenzymes. Par contre, l'amorce A10 a montré un phénomène insolite d'"appétence" spécifique pour l'ADN du stock Mn cl2 (clone 39), qui peut ainsi être détecté à des seuils très bas.

Ces essais en gamme étalon nous permettent d'interpréter avec rigueur le suivi des mélanges dans le temps.

5.2 Stabilité des mélanges.

En l'absence de repiquage, comme le montrent les isoenzymes et les RAPD (voir tableaux 6 et 7), les stocks lents sont déjà très minoritaires à J+14, cette tendance s'accroissant à J+21. Cependant, à cette dernière date, le stock lent n'est éliminé d'aucun des mélanges.

Avec repiquage des cultures (à J+12, puis tous les 7 jours), les mélanges ont été suivis plus longtemps (voir tableaux 8 et 10). La persistance du stock lent est confirmée jusqu'au 33^e jour (3^e repiquage) pour les 3 mélanges, jusqu'au 40^e jour (4^e repiquage) pour les mélanges Cutia cl1/Mn cl2 et P209 cl1/CBB cl3.

Le fait de déséquilibrer le mélange au profit du stock le plus lent (voir tableaux 9 et 11) module ces résultats, mais ne change pas la tendance générale, c'est-à-dire tendance du stock rapide à dominer l'autre, mais sans l'éliminer.

5.3 Les cinétiques de croissance.

L'examen visuel des courbes de croissance des mélanges les montrent très semblables à la courbe des stocks les plus rapides entrant dans ces mélanges. Cette assertion est quelque peu tempérée par les comparaisons statistiques. (Tableau 12)

Cependant, dans l'ensemble, on note une tendance des courbes des mélanges à "coller" à celles des stocks rapides, ce qui est logique, puisque ces derniers deviennent rapidement dominants.

Il serait cependant trop hâtif d'expliquer l'ensemble de nos données par un modèle simple de dominance des stocks rapides. En effet, nous avons tenté de mesurer à J+12, dans les mélanges, les concentrations des stocks respectifs, en nous basant sur l'aspect des caractérisations isoenzymes et RAPD de ces mélanges par comparaison avec les gammes étalons. Les concentrations ont été ainsi comparées à celles que nous avons pu mesurer directement de la courbe de croissance des stocks purs correspondants à J+12. En cas de fourchette de lecture (concentration située entre deux niveaux de la gamme étalon), les deux estimations de concentration ont été comparées avec la valeur correspondante du stock pur en question. Nous observons que dans les mélanges, la concentration du stock Mn cl2 (clone 39) est constamment plus forte que celle du même stock pris isolément, alors que la concentration de départ est deux fois moins forte dans le cas du mélange.

Tableau 12 : Synthèse des différents résultats qualitatifs et statistiques concernant les cinétiques.

	P209 cl1 / Mn cl2	Cutia cl1 / Mn cl2	P209 cl1 / CBB cl3
Aspect qualitatif des mélanges	Pas différent de P209 cl1 Différent de Mn cl2	Pas différent de Cutia cl1 Différent de Mn cl2	Pas différent de P209 cl1 Différent de CBB cl3
Comparaison des temps de doublement des mélanges aux clones purs	Pas différent de P209 cl1 Différent de Mn cl2	Pas différent de Cutia cl1 Différent de Mn cl2	Différent de P209 cl1 Pas différent de CBB cl3
Comparaison des concentrations maximales des mélanges aux clones purs	Différent de P209 cl1 Différent de Mn cl2	Différent de Cutia cl1 Différent de Mn cl2	Pas différent de P209 cl1 Différent de CBB cl3
Modélisation des cinétiques	Pas différent de P209 cl1 Différent de Mn cl2	Pas différent de Cutia cl1 Différent de Mn cl2	Pas différent de P209 cl1 Pas différent de CBB cl3

VI. CONCLUSION / PERSPECTIVES

Ce travail très préliminaire n'avait d'autre ambition que de commencer à jeter les bases d'une méthodologie, et à cerner certains problèmes.

Des résultats fiables ont été obtenus avec les gammes étalons et le suivi des mélanges de stocks dans le temps. L'emploi des marqueurs isoenzymatiques et de l'amorce RAPD A7 permet un dosage semi-quantitatif des mélanges, tandis que l'amorce A10 montre un intéressant effet de "préférence" pour l'un des stocks étudiés. Ces données seront bien sûr très utiles pour l'étude des mélanges naturels tels qu'on les observe fréquemment, particulièrement en Bolivie. Il serait cependant indispensable de compléter cette panoplie de marqueurs par les identifications PCR spécifiques de clones naturels de *T. cruzi* (23). En effet, l'emploi des isoenzymes et des RAPD implique que les stocks isolés soient cultivés, ce qui introduit un biais, tandis que l'identification PCR directe ne présente pas cet inconvénient. Dans les mélanges, le stock rapide tend rapidement à dominer le stock lent, cependant, ce dernier semble persister longtemps, et rien ne permet de certifier qu'il soit complètement éliminé.

L'interprétation des courbes de culture est plus délicate. La courbe du mélange tend à mimer celle du stock le plus rapide, bien que certains résultats laissent supposer que le stock le plus lent voit sa croissance "stimulée" par la présence de l'autre stock.

Même si l'on s'en tient à l'analyse du paramètre très simple de la croissance des épimastigotes en culture in vitro, beaucoup reste à faire pour compléter ce premier travail sur les mélanges de stocks. Il faudrait :

(a) faire varier les proportions initiales des stocks, pour évaluer l'effet concentration (plan en carré latin).

(b) voir si les résultats obtenus dans le présent travail (dominance rapide du stock le plus rapide sans élimination immédiate du stock lent; stimulation apparente de la croissance de ce dernier dans les mélanges) sont recouverts par des échantillonnages faisant appel à d'autres stocks appartenant aux mêmes clones majeurs.

Au delà de l'analyse de la cinétique de culture in vitro, cette étude au long cours des mélanges de clones naturels de *T. cruzi* devra reposer sur l'analyse d'autres paramètres reflétant mieux les conditions de vie naturelle du parasite, en particulier le comportement des mélanges in vivo, chez l'insecte vecteur (stabilité des mélanges après passage chez le vecteur, transmissibilité comparée des mélanges et des stocks purs), et chez l'hôte vertébré (virulence comparée des mélanges et des stocks purs).

L'étude expérimentale des mélanges chez l'hôte vertébré constituera un complément indispensable à l'enquête épidémiologique, qui vise à caractériser les formes cliniques de la maladie de Chagas liées à la présence de mélanges de clones naturels (étude actuellement en cours à l'IBBA de La Paz). En effet, dans de telles enquêtes épidémiologiques, les données sont d'interprétation délicate, du fait qu'il est difficile d'établir une relation de cause à effet entre l'isolement d'un stock présentant des caractéristiques données (tel mélange patent, ou tel génotype apparemment pur, cette dernière observation étant du reste ardue à prouver) et la forme clinique observée chez le patient.

VII. PROJET DE RECHERCHE

Titre du projet : Comportement biologique et pathogénique des mélanges de clones naturels chez *Trypanosoma cruzi*.

Directeur de thèse : Michel Tibayrenc.

Cadre logistique : UMR CNRS-ORSTOM 9926 "Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs". Centre de recherche ORSTOM.

7.1. Projet.

Selon l'analyse de génétique des populations, *Trypanosoma cruzi*, l'agent de la maladie de Chagas, est subdivisé en clones naturels, stables dans l'espace et dans le temps. La recombinaison génétique est rare ou absente entre ces clones, qui se comportent comme des phylums évolutifs, et peuvent être séparés les uns des autres par des distances génétiques considérables (5).

La caractérisation génétique par isoenzymes montre l'existence de certains génotypes clonaux ubiquistes et surreprésentés dans certaines zones ("clones majeurs") (6). On peut suspecter que l'importance épidémiologique et médicale de ces génotypes dominants est considérable. En fait, ces "clones", caractérisés par une série forcément limitée de marqueurs génétiques, doivent être plutôt regardés comme des familles de clones étroitement apparentés. L'utilisation de méthodes plus résolutive montre une variabilité génétique additionnelle au sein de chacun de ces "clones". Le terme "clonnet" (24) a été proposé pour désigner les génotypes apparaissant comme identiques avec une série de marqueurs génétique donnés dans une espèce clonale. Les "clones majeurs" de *T. cruzi* ne sont pas de véritables clones, mais des clonets.

Des études expérimentales ont été entreprises dans le laboratoire d'accueil pour tenter de cerner le comportement biologique des clones majeurs. Un protocole expérimental standard a été élaboré, qui repose sur l'analyse d'une vingtaine de stocks clonés au laboratoire, et représentant 4 "clones majeurs". Deux thèses (7,8) ont été déjà consacrées à ce modèle, avec étude de paramètres tels que la cinétique de culture, la virulence chez la souris, l'infectiosité des trypanomastigotes pour les cultures cellulaires, la sensibilité au rochagan et au nifurtimox des épimastigotes, amastigotes, trypanomastigotes. L'hypothèse de travail testée à travers ces protocoles est que les distances génétiques séparant les clones majeurs ont un fort impact sur les propriétés biologiques et pathogéniques de ces clones. En d'autres termes : si deux génotypes clonaux de *T. cruzi* se ressemblent génétiquement, ils auront tendance à avoir des propriétés biologiques et pathogéniques similaires, et inversement. Les résultats obtenus à travers les deux thèses corroborent totalement cette hypothèse de travail : sauf rares exceptions, il y a une corrélation statistique très forte entre distances génétiques et différences biologiques au sein de l'échantillonnage à l'étude (Figure 3).

Les études expérimentales entreprises jusqu'à présent visent à cerner le comportement biologique des clones pris isolément. Or, il semble qu'un tel modèle soit éloigné des réalités de terrain. En effet, un fait remarquable est l'observation fréquente, en zone d'endémie, de mélanges de clones chez un même triatome vecteur ou chez un même patient chagasiq. Ces mélanges ont été d'abord dépistés par analyse isoenzymatique. Certains profils sont très évocateurs de mélanges, et peuvent du reste être reconstitués par mélanges expérimentaux de culture, ce qui a été fait dans notre travail de DEA.

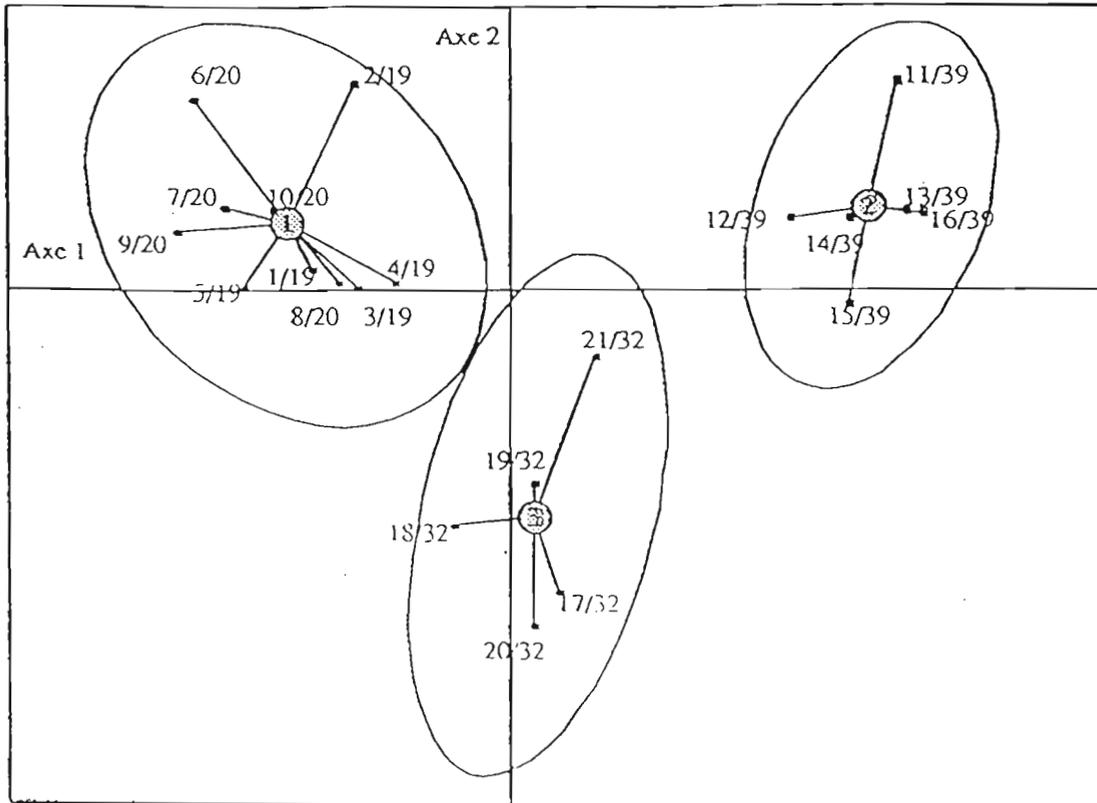
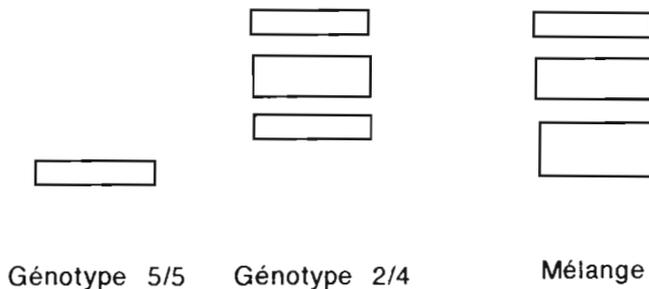
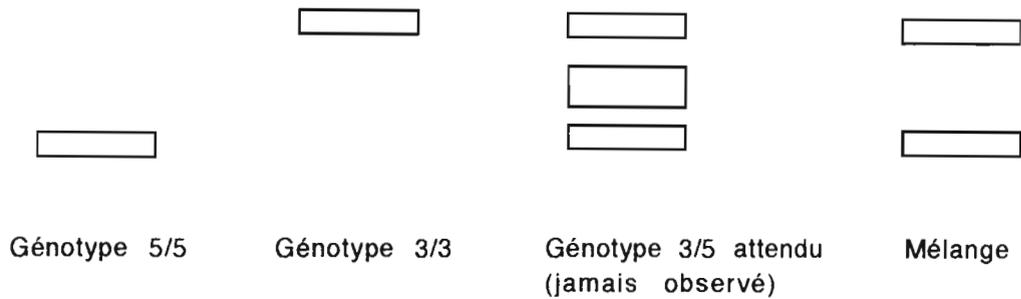


Figure 3 : Impact de la divergence phylogénique entre clones naturels de *Trypanosoma cruzi* sur la variabilité biologique de ces clones. Analyse factorielle discriminante de diverses variables biologiques (dont la sensibilité à 2 drogues antichagasiqes majeures) pour 21 stocks de *T. cruzi* appartenant aux génotypes clonaux 19, 20, 32, et 39 du réseau de Wagner. Les stocks se répartissent en 3 groupes biologiques 19/20, 32 et 39. La probabilité d'identifier le génotypes isoenzymatique d'un stock donné par ses propriétés biologiques est de 98% (d'après Revollo (8)).

Système isoenzymatique phosphoglucose isomérase





De tels profils sont retrouvés en Bolivie dans environ 10% des stocks isolés de triatomes vecteurs (9) et de patients chagasiques (10).

Il semble en fait, d'après des études faisant appel à la PCR, que ces mélanges soient encore plus fréquents : ils seraient retrouvés dans environ 50% des cas (25).

Les mélanges de génotypes clonaux sont donc une situation fréquente en zone d'endémie. Il s'agit là d'un cas de figure très spécifique d'un point de vue écologique. En effet, comme il a été dit plus haut, certains de ces clones naturels sont séparés par des distances génétiques considérables, comparables à celles qu'on relève entre certaines espèces différentes de *Leishmania*, par exemple. Il est donc insolite d'observer la coexistence de génotypes si différents d'une même espèce parasitaire au sein d'un même hôte.

L'hypothèse de travail proposée dans le cadre du présent projet de thèse est que ces mélanges ont un comportement biologique différent de celui qu'on attendrait d'une simple juxtaposition des comportements biologiques des deux génotypes clonaux impliqués : il pourrait y avoir potentialisation ou inhibition réciproque selon les cas. On peut soupçonner que ces mélanges fréquents pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de certaines formes cliniques de la maladie de Chagas.

7.2. Méthodologies employées.

L'approche retenue sera expérimentale. Différents paramètres biologiques déjà explorés par Laurent (7) et Revollo (8) dans le cas des clones pris isolément seront explorés en situation de mélanges de clones. L'avantage d'une telle stratégie est que les paramètres sont déjà chiffrés pour les clones considérés séparément. Etant donné que la présente étude reprendra le même échantillonnage, il sera possible de voir immédiatement si les mélanges se comportent comme une simple juxtaposition des génotypes clonaux, ou bien, s'ils ont un comportement différent, qui est plus que la somme des deux parties.

Les principaux paramètres envisagés comprendront: (i) la cinétique de croissance des épimastigotes en culture; (ii) l'aptitude des épimastigotes (formes isolées chez le vecteur) à se transformer en trypomastigotes (formes infectantes pour l'hôte vertébré); (iii) la capacité de division des amastigotes (formes colonisant la cellule-hôte de l'hôte vertébré); (iv) la sensibilité in vitro au Ragonil et au Nifurtimox; (v) la virulence chez la souris; (vi) la transmissibilité par un vecteur majeur de la maladie de Chagas, *Triatoma infestans*.

Notre travail de DEA nous a permis de maîtriser les techniques d'analyse isoenzymatique et RAPD, qui seront utilisées pour suivre les mélanges. Le diagnostic PCR spécifique de clone majeur, qui permettra d'identifier les mélanges sans passer par la phase de culture (par exemple dans le sang des souris infectées ou dans les déjections de triatomes infectés) est disponible au laboratoire d'accueil (25).

Par ailleurs, nous avons déjà obtenu certains résultats préliminaires sur le paramètre (i) (cinétique de croissance des épimastigotes en culture), ce qui nous a permis de nous familiariser avec le maniement du parasite. Par ailleurs, les techniques impliquées dans l'étude des paramètres (ii) à (v) ont été mises au point dans le laboratoire d'accueil, dans le cadre de la thèse de J.P. Laurent et S. Revollo. Enfin, les techniques impliquant les vecteurs (en particulier alimentation artificielle sur membrane) ont été également mises au point au laboratoire.

Les mélanges se feront selon des protocoles les plus simples possibles au départ. Les clones majeurs à l'étude seront le 19/20 (regroupés en un même ensemble par des analyses génétiques ultérieures), le 32 et le 39 (numérotation des clones majeurs d'après Tibayrenc & Ayala (5); Figure 1). Les premières analyses porteront sur deux cas de figure de mélanges de stocks appartenant aux clones majeurs 19/20 et 39, respectivement. D'autres cas de figure plus complexe (impliquant le clone majeur 32, reposant sur des mélanges de trois génotypes au lieu de deux, etc) seront introduits progressivement par la suite.

7.3. Financement.

Un financement CEE (programme STD3) avait été obtenu et avait permis de mener à bien la première phase de cette étude (analyse des clones naturels considérés séparément). Une demande de financement sera introduite dans le cadre du 4^o programme-cadre, pour financer le présent projet.

Le sujet proposé rentre dans le cadre d'une série d'études au long cours menées par le laboratoire d'accueil, visant à explorer une même question de base : quel est l'impact de la variabilité génétique de *Trypanosoma cruzi* sur les propriétés biologiques et médicales du parasite? La démarche élaborée dans le cas de l'agent de la maladie de Chagas pourra être appliquée ultérieurement au cas d'autres agents pathogènes (protozoaires, levures, bactéries), posant des problèmes similaires de variabilité génétique.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Tibayrenc, M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology*. Sous presse.
- 2- Anonyme. 1991. Lutte contre la maladie de Chagas. *Rapport d'un comité O.M.S d'experts*, **811**.
- 3- Miles, M.A. & Cibulskis, R.E. 1986. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*. **2** (4): 94-97.
- 4- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. & Ayala, F.J. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complexe multiclonal structure. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*. **83**: 115-119.
- 5- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological signifiacnce. *Evolution*. **42** (2): 277-292.
- 6- Tibayrenc, M. & Brénière, S.F. 1988. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Suppl. I. **83**: 249-255.
- 7- Laurent, J.P. 1994. Comparaison des propriétés biologiques de différents clones naturels de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, Chagas, 1909, agent de la maladie de Chagas. Thèse de Doctorat d'Université, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. pp 91.
- 8- Revollo, M.S. 1995. Impact de l'évolution clonale de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, sur certaines propriétés biologiques médicalement importantes du parasite. Thèse de Doctorat d'Université. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. pp 210.
- 9- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M., Dédet, J.P., Poch, O. & Desjeux, P. 1985. New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Genetica*. **67** (3): 223-230.
- 10- Brénière Campana, S.F., Tibayrenc, M., Antezana, G., Pabon, J., Carrasco, R., Selaès, H. et Desjeux, P. 1985. Résultats préliminaires en faveur d'une relation faible ou inexistante entre les formes cliniques de la maladie de Chagas et les souches isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Acad. Sci. Paris*. **300** (15): 555-558.
- 11- Engel, J.C., Dvorak, J.A., Segura, E.L. & Crane M. St. J. 1982. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I) Growth kinetics in liquid medium. *J. Protozool.* **29** (4): 555-560.
- 12- Dvorak J.A. 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.* **24**: 357-371.
- 13- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J., 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*. **7** (9): 228-232.
- 14- Welsh, J. McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. **18**: 7213-7218.

- 15-** Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, U. S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. **18** (22): 6531-6535.
- 16-** Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guérrini, F., Skarecky, D. & Ayala, F.J. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 1335-1339.
- 17-** Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*. **1**: 55-63.
- 18-** Mac Pherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles, G.J. & Gajadhar, A.A. 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Molecular and Cellular Probes*. 293-299.
- 19-** Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. and Tingey, U. S. 1991. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology*.
- 20-** Schwartz, D. 1984. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. *Flammarion et Cie, éditeur*. pp 318.
- 21-** Tomassone, R. 1989. Comment interpréter les résultats d'une régression linéaire? *STAT. ITCF*. pp 56.
- 22-** Tomassone, R., Dervin, C. & Masson, J.P. 1993. Biométrie Modélisation de phénomènes biologiques. *Masson Editeur*. p 119.
- 23-** Brénière, S.F., Bosseno, M.F., Revollo, S., Rivera, M.T. & Tibayrenc, M. 1993. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and host blood by PCR technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46** (3): 335-341.
- 24-** Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, F.J. 1991. The clonal theory of parasitic protozoa: a taxonomic proposal applicable to other clonal organisms. *Biosciences*. **41** : 767-774.
- 25-** Brénière, S.F., Bosseno, M.F., Telleria, J., Carrasco, R., Vargas, F., Yaksic, N. & Noireau, F. Field application of PCR diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivians triatomines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Sous presse.

ANNEXE 1

Noms et codes d'identification des systèmes enzymatiques :

Nom	Abréviation	Code
Glutamate déshydrogénase	GDH	E.C.1.(2/4).1.
Glutamate oxaloacétate transaminase	GOT	E.C. 2.6.1.1.
Glucose-phosphate déshydrogénase	GPI	E.C.5.3.1.9.
Isocitrate déshydrogénase	IDH	E.C.1.1.1.42.
Mannose-phosphate déshydrogénase	MPI	E.C.5.3.1.8.
Peptidase 1	PEP 1	E.C.3.4.11.
6 Phosphogluconate déshydrogénase	6PGDH	E.C.1.1.1.44.
Phosphoglucomutase	PGM	E.C.2.7.5.1.
Superoxyde dismutase	SOD	E.C.1.15.1.1.

Conditions électrophorétiques :

Enzymes	Tampons	Imbibition	Migration	Voltage	Temps	Lecture
GDH	A	50/50	pur	160 V	30 mn	visible
GOT	A	50/50	pur	160 V	30 mn	visible
GPI	A	20/80	pur	200 V	30 mn	visible
IDH	A	30/70	pur	200 V	20 mn	visible
MPI	B	50/50	pur	200 V	20 mn	visible
PEP 1	B	pur	pur	200 V	25 mn	visible
6PGDH	A	25/75	pur	160 V	30 mn	visible
PGM	C	50/50	50/50	200 V	20 mn	visible
SOD	D	pur	pur	300 V	30 mn	trans-illuminateur 5 mn

Tampons de migration et d'imbibition :

Tampons	Nom	Composition
A	III de Shaw	Tris 1M; Acide borique 0,65M; EDTA 0,016M; pH 8
B	HR	Tris Barbitol Sodium Barbitol (HR HELENA) pH 9
C	II de Kreutzer	Na H ₂ PO ₄ 0,2M; Na ₂ HPO ₄ 0,2M; pH 7
D	Tampon SOD	Tris 0,1M; ac. borique 0,3M; sucrose 10g/l; pH 7,6

ANNEXE 2

Solutions de révélation :

Enzymes	Tampon de réaction (eau qsp 10 ml)	Solution de coloration
GDH	10ml Tris HCl 1M pH 7	170mg ac. glutamique; 5mg NADP; 4,8mg NAD; 5mg NBT; 3mg PMS
GOT	10ml Tris HCl 0,1M pH 8	30mg ac. L aspartique; 25mg ac. céto glutarique; 5mg pyridoxal 5 phosphate; 20mg fast blue BB (Sigma)
GPI	2,5ml Tris HCl 1M pH 7	10mg fructose 6 phosphate; 50mg MgCl ₂ ; 5UI glucose 6 phosphate déshydrogénase; 5mg NADP; 5mg NBT; 3mg PMS
IDH	10ml Tris HCl 0,1M pH 8	10mg ac. DL isocitrique; 50mg MgCl ₂ ; 5mg NADP; 5mg NBT; 3mg PMS
MPI	2,5ml Tris HCl 1M pH 7	20mg mannose 6 phosphate; 50mg MgCl ₂ ; 8UI glucose 6phosphate déshydrogénase; 8UI glucose phosphate isomérase; 5mg NADP; 5mg NBT; 3mg PMS
PEP 1	10ml Tris HCl 0,1 M pH 8	5mg leu-leu-leu; 30,5mg MgCl ₂ ; 3mg MnCl ₂ ; L amino ac. oxydase 1mg; peroxydase 1mg; 3 amino 9 éthyl carbazole 10mg dilué dans 0,4ml d'éthanol absolu
6PGDH	2,5ml Tris HCl 1M pH 8	10mg ac. 6 phospho-gluconique; 50mg MgCl ₂ ; 5mg NADP; 5mg NBT; 3mg PMS
PGM	2,5ml Tris HCl 1M pH 8	20mg glucose 1 phosphate; 50mg MgCl ₂ ; 8UI glucose 6 phosphate déshydrogénase; 5mg NADP; 5mg NBT; 3mg PMS
SOD	10ml tampon phosphate 0,1M pH 7,5	riboflavine à 0,0032%; 7,4mg EDTA; 5mg iodo nitro tétrazolium

Séquences des amorces utilisées pour la technique des RAPD :

AMORCES	SEQUENCES
A7	GAAACGGGTG
A10	GTGATCGCAG