ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome XLV

1970

N° 5

Annales de Parasitologie (Paris), t. 45, 1970, n° 5, pp. 529 à 536

MÉMOIRES ORIGINAUX

Sur les paramètres cultureux de *Giardia duodenalis*

par R. ECALLE, P. GAYREL et G. ROUX

*Laboratoire de Physiologie, Zoologie et Parasitologie pharmaceutique (Pr G. ROUX),
U.E.R. de Pharmacie, 31, Allées Jules-Guesde, F 31 - Toulouse*

Résumé

Dans les conditions expérimentales adoptées, la courbe de croissance de *Giardia duodenalis* cultivé *in vitro* peut, en coordonnées semi-logarithmiques, être décomposée en trois droites successives, de pente respectivement négative (latence), positive (croissance) et négative (décroissance). Ceci nous permet de définir avec plus de précision les paramètres cultureux de ce parasite.

La concentration initiale en *Giardia*, du moins dans les limites essayées (qui ont varié du simple au décuple), ne paraît pas avoir d'influence systématique déterminante sur les paramètres cultureux étudiés. Leurs valeurs moyennes, telles que nous sommes appelés à les retrouver habituellement dans des essais sur des souches de notre région, sont déduites des résultats obtenus sur 17 prélèvements d'origines différentes.

Summary

In experimental conditions, the cultural parameters of *Giardia duodenalis* are defined with more accuracy.

The initial concentration in *Giardia*, varying from simple to decuple, does not appear to have any systematic influence on the studied cultural parameters. The average values of these parameters — as they usually can be found in experiments fulfilled with regional strains — have been stated from the results obtained with 17 samples of different origins.

C'est en 1959 seulement que Karapetjan réussit la culture *in vitro* d'une espèce de *Giardia* : *Giardia intestinalis*, parasite de l'intestin de l'homme. Peu après, *Giardia duodenalis*, parasite duodéal du Lapin, a pu également être cultivé par Karapetjan (3, 4) puis par Solov'ev (8) et en 1965, par Meyer et Pope (6).

S'inspirant de ces travaux antérieurs, l'un de nous a élaboré une méthode de culture de *Giardia duodenalis* avec un pourcentage de réussite de 90 % (1). Le présent travail a pour but de préciser les paramètres cultureux que présente, dans les conditions expérimentales adoptées, l'espèce étudiée.

Généralement, le développement d'un microorganisme *in vitro* comporte trois phases : latence, croissance exponentielle, palier. Au cours de la latence, la durée de génération, temps nécessaire au doublement de la population, diminue progressivement pour atteindre la valeur caractéristique qu'elle présentera tout au long de la phase exponentielle. Puis, après un certain nombre de cycles de reproduction, la durée moyenne de génération augmente à nouveau et tend vers l'infini ; on assiste alors à une stabilisation de l'effectif de la population, stabilisation qui se maintient quelque temps (palier).

Dans le cas des cultures de *Giardia duodenalis*, on constate dès l'abord une diminution nette et progressive du nombre d'individus, avant que ne s'instaure la phase de croissance exponentielle ; par la suite, celle-ci s'interrompt brusquement, faisant place à une période de décroissance, au cours de laquelle on assiste à nouveau à une baisse rapide et régulière des effectifs. La phase de croissance exponentielle se trouve ainsi intercalée entre deux périodes pendant lesquelles le nombre d'individus décroît ; la courbe représentative de l'évolution de la population passe donc successivement par un minimum, puis par un maximum très accusé.

La connaissance des coordonnées de ces deux points permet de calculer le temps de génération pendant la phase exponentielle. Ce paramètre peut, en effet, être déduit du taux de croissance X (nombre de divisions par heure) calculé selon la formule de Freytag et Freytag (2), utilisée aussi par Karapetjan (5) et nous-mêmes (1) :

$$X = \frac{\log b - \log a}{t \log 2}$$

- a , nombre de *Giardia* par cm^2 au début de la phase exponentielle,
 b , » » à la fin de la phase exponentielle,
 t , temps (en heures) écoulé entre le début et la fin de la phase exponentielle.

En réalité, la détermination expérimentale précise de ces valeurs soulève des problèmes : en effet, les numérations effectuées sur les cultures ne peuvent être trop fréquemment répétées, non seulement par suite des difficultés matérielles, mais surtout en raison des perturbations qu'elles apportent aux conditions culturales (renversement de la culture, risque de variation de la température, éclairage intense, etc.).

Or, si l'on adopte une certaine rythmicité (par exemple, une numération à heure fixe, chaque 24 heures), la probabilité est très faible d'une coïncidence exacte entre, d'une part, l'instant réel où la population présente sa densité minimale ou sa densité maximale et, d'autre part, le moment de l'une de ces déterminations. Il s'ensuit que :

— les valeurs expérimentales minimales et maximales de la densité de population, ainsi obtenues, sont entachées d'une marge d'incertitude qui vient se surajouter à l'erreur instrumentale normale affectant chacune des numérations ;

— le délai qui sépare les deux observations ayant fourni ces valeurs expérimentales minimales et maximales ne constitue qu'une évaluation relativement imprécise de la durée réelle de la phase exponentielle.

Par ailleurs, ce mode de calcul, basé sur seulement deux points expérimentaux, s'il a pour lui la simplicité, présente le désavantage de négliger une grande partie de l'information apportée par les nombreuses numérations des stades intermédiaires.

Ces considérations nous ont donc incités à entreprendre une analyse plus détaillée des courbes expérimentales obtenues.

Technique

Matériel expérimental :

Les 17 souches qui ont fait l'objet des essais rapportés ici ont été obtenues par prélèvement duodénal sur un nombre correspondant de Lapins adultes, mâles ou femelles, de races variées (que nous nous sommes procurés au hasard des marchés).

Conditions des cultures :

La composition et la préparation des milieux, le protocole d'obtention des cultures (prélèvement, mise en culture, entretien...) ont déjà été exposés de façon détaillée (1). Nous nous bornerons à rappeler que les récipients utilisés sont des flacons stériles en polystyrène à fond plat et d'une capacité de 30 ml.

Méthode de contrôle du développement en culture :

Préalablement aux essais, cinq rectangles de 20 mm² (soit au total 1 cm²) régulièrement répartis sont gravés sur le fond de chaque flacon. En cours d'expérience, chaque 24 heures, pendant quinze jours consécutifs, il est procédé, sur le flacon retourné avec précaution, à la numération au microscope des *Giardia* fixés dans les surfaces ainsi délimitées.

Traitement des résultats :

Au cours de la phase de croissance exponentielle, le nombre de *Giardia* prenant naissance à chaque instant est proportionnel au nombre d'individus déjà présents à ce moment dans le milieu. Il semble rationnel d'admettre une proportionnalité analogue au cours des phases où la population décroît, le nombre de *Giardia* disparaissant à chaque instant étant alors proportionnel au nombre d'individus présents à ce moment dans le milieu.

Dans cette hypothèse, si on trace le graphique de l'évolution de la densité de population, en portant en abscisses le temps et en ordonnées le logarithme du nombre de *Giardia* par cm², la courbe représentative obtenue pourra être décomposée en trois droites successives. Elles présenteront respectivement une pente négative (latence), positive (croissance exponentielle) et négative (phase de décroissance).

Nous avons calculé pour chacune des souches étudiées, l'équation de ces trois droites :

LATENCE :

La variation du nombre de *Giardia* par cm² paraît changer de sens entre la deuxième et la troisième numération (48 h et 72 h après la mise en culture) : ce sont, en effet, ces déterminations qui nous ont fourni les valeurs expérimentales minimales.

Pour définir la droite représentative de cette phase, nous ne disposons donc, de façon générale, que des deux observations effectuées 24 heures et 48 heures après la mise en culture. Aussi l'équation retenue sera celle de la droite passant par ces 2 points expérimentaux.

PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE :

Il a déjà été indiqué plus haut que les valeurs minimales et maximales, correspondant à des déterminations effectuées en périodes transitoires, risquaient de pré-

senter une marge d'incertitude nettement plus élevée que les autres points expérimentaux. D'autre part, le délai séparant ces deux numérations a été, dans l'immense majorité des cas, de $6 (\pm 1)$ jours.

Nous avons convenu de retenir pour le calcul de la ligne de régression représentative de cette phase, la période de quatre jours consécutifs au cours de laquelle nous avons observé le plus fort accroissement relatif de population. Cette droite est donc ajustée sur cinq déterminations successives.

Nous avons en outre calculé la somme des carrés des écarts de ces cinq données expérimentales sur la ligne de régression ainsi définie.

PHASE DE DÉCROISSANCE :

Les conventions retenues sont analogues à celles adoptées pour la phase précédente : la droite représentative est ajustée sur cinq numérations successives correspondant à la période continue de quatre jours au cours de laquelle nous avons constaté la plus forte diminution relative de la densité de population. Le calcul de la somme des carrés des écarts à cette ligne de régression a été également effectué dans les mêmes conditions que précédemment.

Une fois les équations de ces droites établies, il est facile de calculer, pour chaque essai, les coordonnées de leurs points d'intersection : l'abscisse du point d'intersection des deux premières droites fournit une estimation théorique du moment où intervient le passage de la phase de latence à celle de croissance exponentielle, passage qui, dans la réalité, est progressif et s'étend donc sur une certaine période.

Dans les mêmes conditions, l'intersection des lignes représentatives de la croissance exponentielle et de la décroissance qui lui succède indique l'instant théorique où l'un de ces phénomènes fait place à l'autre.

Il est dès lors possible d'évaluer d'une part la durée de la période de latence et d'autre part, celle de la phase de croissance exponentielle.

Tableau

Souche	Nombre de Giardia par cm ² après 24 h	LATENCE	CROISSANCE EXPONENTIELLE			DÉCROISSANCE
		Durée (en h)	Durée (en h)	Coefficient de régression +	Temps de génération (en h)	Coefficient de régression +
1 ...	110	48,2	112,6	0,255.8	28,2	— 0,088.4
2 ...	110	79,2	114,7	0,228.0	31,7	— 0,106.1
3 ...	130	66,7	119,8	0,209.0	34,6	— 0,077.1
4 ...	170	48,0	79,2	0,426.0	17,0	— 0,148.0
5 ...	180	75,6	131,0	0,268.4	26,9	— 0,139.7
6 ...	180	81,1	136,8	0,195.6	36,9	— 0,075.7
7 ...	200	86,2	144,7	0,215.9	33,5	— 0,069.5
8 ...	210	66,2	149,8	0,182.0	39,7	— 0,088.6
9 ...	220	63,4	134,6	0,263.3	27,4	— 0,169.6
10 ...	240	76,3	122,4	0,263.8	27,4	— 0,111.7
11 ...	260	47,3	173,0	0,155.3	46,5	— 0,191.7
12 ...	280	66,7	128,6	0,243.2	29,7	— 0,145.1
13 ...	290	67,1	116,0	0,269.0	26,9	— 0,120.0
14 ...	340	59,2	112,3	0,264.8	27,3	— 0,129.5
15 ...	370	66,5	148,3	0,198.9	36,3	— 0,133.7
16 ...	820	68,6	139,4	0,218.8	33,0	— 0,119.0
17 ...	1.040	81,8	128,9	0,228.2	31,7	— 0,083.9
Moyenne		67,54	128,95	0,240.3	31,45	— 0,117.83
Ecart-type ...		11,92	20,50	0,058.5	6,52	0,034.86
Coefficient de variation		17,7 %	15,9 %	24,3 %	20,7 %	29,6 %

+ : Coefficient de la régression du logarithme décimal du nombre de Giardia par cm² par rapport à la durée de la culture exprimée en jours.

Résultats

Pour l'ensemble des 17 souches essayées, la moyenne des coefficients de régression du logarithme décimal du nombre de *Giardia* par cm², par rapport à la durée de la culture exprimée en jours est, pour la phase de latence, égale à (— 0,099.23) avec un écart-type de $\pm 0,066.00$.

Le tableau groupe, par ailleurs, les valeurs numériques calculées concernant les caractéristiques de nos cultures.

Sur le graphique ci-joint, nous avons reporté les valeurs moyennes ainsi déterminées : il traduit donc l'évolution moyenne d'une culture dans les conditions expérimentales adoptées.

Discussion et Conclusions

1° L'une de nos hypothèses de travail était relative au caractère exponentiel de la phase de décroissance.

La somme des carrés des écarts à la ligne de régression (du logarithme décimal du nombre de *Giardia* par cm² sur la durée de la culture) a pour valeur moyenne :

0,014.901 pour la phase de croissance exponentielle,

0,009.808 pour la phase de décroissance.

L'ajustement à une évolution exponentielle du phénomène, des points expérimentaux retenus, est donc au moins aussi bonne (sinon meilleure) pour la période de décroissance que pour la phase de croissance ; cette constatation confirme donc la validité de notre hypothèse.

2° Dans le tableau, nos essais ont été classés suivant l'ordre croissant de la densité de population, après 24 heures de culture (première numération de contrôle). Ceci nous permet de constater que, dans les limites des conditions de notre expérimentation — où ce facteur a pourtant varié du simple au décuple — la concentration initiale en *Giardia* ne paraît pas avoir d'influence systématique déterminante sur les divers paramètres culturels étudiés.

3° Les valeurs de l'écart-type et du coefficient de variation nous renseignent sur l'homogénéité des résultats trouvés pour chacun des paramètres.

C'est pour la pente de la droite représentative de la phase de latence que nous relevons la dispersion la plus élevée. Il est vrai que pour définir cette ligne nous disposons seulement, dans chaque cas, de deux points expérimentaux dont les coordonnées ne sont déterminées qu'avec une certaine approximation instrumentale. En outre, cette période de nos essais correspond à une phase d'adaptation des *Giardia* aux nouvelles conditions d'environnement. Si ces dernières sont toujours fort différentes de celles existant dans l'habitat naturel, ces différences peuvent néanmoins être plus ou moins accusées suivant les caractéristiques individuelles de l'hôte. Il n'est donc pas surprenant que, suivant les souches, la capacité d'adaptation au nouveau milieu soit plus ou moins développée.

La dispersion des valeurs des autres paramètres est nettement plus faible : les coefficients de variation vont de 15,9 à 29,3 % (*). Bien entendu, il a été tenu

(*) A titre de comparaison, signalons par exemple que, déterminés par électrophorèse sur papier sur un lot de 48 Lapins normaux de même race (Fauve de Bourgogne), de même poids et de même âge, les taux d'albumines d' α -globulines, de β -globulines et de γ -globulines ont présenté des coefficients de variations respectivement égaux à : 12,2 %, 30,7 %, 30,0 % et 32,1 % (7).

compte, dans les calculs, de l'ensemble des 17 essais rapportés, bien que la souche 4 paraisse présenter des caractéristiques culturales quelque peu différentes des autres : durée de la phase de latence, durée de la phase de croissance exponentielle et temps de génération nettement plus courts, coefficient de régression de la phase de croissance exponentielle beaucoup plus élevé (valeur moyenne + 3,2 fois l'écart-type).

Compte tenu de la très grande difficulté de la culture de *Giardia in vitro*, conséquence de l'extrême fragilité de ces organismes dès qu'ils sont placés hors de leur habitat normal, compte tenu également de l'absence de sélection dans l'échantillonnage des Lapins porteurs des souches soumises aux essais, l'homogénéité de nos résultats s'avère donc satisfaisante.

Elle témoigne du degré de fidélité et de reproductibilité de la méthode de culture utilisée.

Ceci nous permet, en outre, de considérer les valeurs moyennes ainsi déterminées comme étant la traduction des caractéristiques biologiques des souches de *Giardia duodenalis* que nous sommes appelés à rencontrer dans notre région.

La connaissance des paramètres ainsi définis pourra être mise à profit pour une analyse plus détaillée des effets de facteurs fort variés sur le développement *in vitro* de *Giardia duodenalis*.

Bibliographie

1. ECALLE (R.), 1969. — Recherches de biologie parasitaire sur *Giardia duodenalis*, par culture *in vitro*. Thèse Pharmacie (Etat), Toulouse.
 2. FREYTAG (K.) et FREYTAG (K.), 1956. — Experimentelle Bestimmung des durchschnittlichen zeitlichen Abstandes zwischen den Teilungen in einer Bakterienkultur. *Mathem. Naturwiss. Unterr.*, 9, 222-223.
 3. KARAPETJAN (A. E.), 1961. — Metodika polucheniya kul'tury *Lambliia duodenalis*. *Med. Parazitol. i Parazit. Bolezni*, 30, 691-694.
 4. KARAPETJAN (A. E.), 1962. — *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.*, 48, 337-340.
 5. KARAPETJAN (A. E.), 1963. — Determination of growth rate of *Lambliia intestinalis* cultivated *in vitro*. *Acta protozool. Pologne*, 1, 25-30, 321-326.
 6. MEYER (E. A.) et POPE (B. L.), 1965. — Culture *in vitro* of *Giardia* trophozoites from the rabbit and Chinchilla. *Nature G.B.*, 207, n° 5004, 1417-1418.
 7. MOSINGER (M.), VERSINO (A.), JOUGLARD-DUPLAY (J.) et FONDARAI (J.), 1963. — Etude statistique de protidogrammes et de glycoprotidogrammes de Lapins normaux. *C.R. Soc. Biol.*, 157 (4), 861-865.
 8. SOLOV'EV (M. M.), 1962. — K metodika kul'tivirovaniya lyamblii. *Med. Parazitol. i Parazit. Bolezni*, 31, 744-745.
-