

MAINTENANCE D'UN CLONE MALE ET D'UN CLONE FEMELLE de *Schistosoma mansoni* par transplantation microchirurgicale de sporocystes-fils. Fiabilité de la méthode

J. JOURDANE*

RÉSUMÉ. La maintenance sur une longue période (2 années) d'un clone mâle et d'un clone femelle de *Schistosoma mansoni* par transplantation microchirurgicale de sporocystes a permis de montrer que cette technique est d'une très grande fiabilité :

- la survie postopératoire à 60 jours des Mollusques receveurs est supérieure à 75% ;
- le taux moyen d'infestation des Planorbes est de 75% avec les sporocystes mâles et 45% avec les sporocystes femelles ;
- la production cercarienne des Mollusques receveurs est en moyenne de 441 cercaires par jour et par Mollusque pour le clone mâle et de 530 cercaires pour le clone femelle ;
- le taux moyen de maturation des cercaires en schistosomes adultes est de 24,5%.

Long term maintenance of a male clone and a female clone of *Schistosoma mansoni* by microsurgical transplantation of sporocysts. Reliability of the technique

SUMMARY. The long term maintenance (2 years) of a male clone and a female clone of *Schistosoma mansoni* by microsurgical transplantation of sporocysts allowed us to show that this technique is of great reliability :

- the postoperative survival of recipient snails at 60 days is greater than 75% ;
- the mean of infection rate of the snails is 75% by the male clone sporocysts and 45% by the female clone sporocysts ;
- the cercarial production of recipient snails is on average 441 cercariae per snail per day for the male clone and 530 cercariae for the female clone ;
- the average worm recovery rate is 24,5%.

Les premières recherches sur le clonage de *S. mansoni* (Jourdane, 1978) ont permis la réalisation de deux transplantations en succession avec émission intermédiaire de cercaires infestantes. En 1980, nous avons réussi (Jourdane et Théron) à maintenir le parasite par clonage pendant une année grâce à six transplantations successives avec conservation de l'inféctivité des cercaires. La même année, Nojima *et al.* annoncent des résultats expérimentaux comparables en utilisant une technique

* Département de Biologie Animale (Directeur : C. Combes) Université, avenue de Villeneuve, F 66025 Perpignan Cedex.

Accepté le 4 novembre 1983.

opérateur différent. L'entretien du parasite par transplantation de sporocystes a aussi été réussi par Cohen et Evelan (1982) qui ont conservé pendant une année un clone mâle et un clone femelle du schistosome. A partir de mars 1981, nous avons commencé à cloner séparément des sporocystes mâles et femelles que nous avons réussi à maintenir par cette technique dans des conditions de routine jusqu'à ce jour. Au cours des dix premières transplantations (échelonnées sur 2 années), nous avons mené une étude comparée sur les deux clones portant sur les facteurs qui assurent une optimisation du succès des transplantations, la productivité cercarienne et enfin l'infectivité des cercaires émises après chaque transplantation. Nous présentons ici le résultat de nos recherches.

I — Matériel et méthodes

1 - Technique de transplantation

La technique de transplantation utilisée est la même que celle que nous avons décrite en détail dans un précédent travail (Jourdane et Theron, 1980). Notre matériel d'étude est constitué par une souche brésilienne de *Schistosoma mansoni* et une souche albinos de *Biomphalaria glabrata* de même origine géographique. Dans le cas précis de nos recherches, les deux Mollusques donneurs qui ont servi de point de départ ont été échantillonnés dans un lot de Mollusques exposés à 1 miracidium dont le sexe de l'infestation avait été déterminé *a posteriori* après l'infestation de Souris. Les transplantations ont été réalisées par la même personne de façon à éviter tout facteur d'erreur résultant des spécificités opératoires individuelles. Chaque série de transplantations a été réalisée sur 20 Planorbes receveurs dont la taille est comprise entre 10 et 13 mm de diamètre.

2 - Production cercarienne

La production cercarienne pour chacun des deux clones a été étudiée à partir d'un lot de 5 Mollusques. Chaque lot est placé dans un panier à larges mailles immergé dans un aquarium contenant 2,5 litres d'eau. L'étude est menée dans une enceinte climatique régulée à + 26° centigrades et avec une photopériode équilibrée LD : 12-12. Les cercaires sont récoltées toutes les 24 heures après filtration de l'eau de l'aquarium sur un filtre en tissu polyamide Nytrell T I de 25 µm. Après coloration au lugol, un comptage exhaustif des cercaires est réalisé à la loupe binoculaire.

3 - Technique d'infestation des Souris

L'infestation des Souris est faite selon la technique d'Erickson (1974). Les Souris sont infestées sous anesthésie par voie transabdominale. Celles-ci, dont l'abdomen a été préalablement rasé, sont couchées sur de petits cristallisoirs en verre de 40 mm de diamètre contenant 75 cercaires mâles et 75 cercaires femelles dans 20 ml d'eau. La température de l'eau du cristallisoir est maintenue à + 28° centigrades grâce à un bain-marie.

II — Résultats

I - Optimisation du succès des transplantations

a) — *Survie postopératoire de Mollusques receveurs*

Si les règles aseptique préconisées dans notre précédent travail (Jourdan et Théron, 1980) sont rigoureusement respectées pendant et après la transplantation, la mortalité postopératoire demeure toujours très faible. Néanmoins, durant ce travail, nous avons noté que la survie à 60 jours est légèrement différente selon le clone concerné : sur l'ensemble de l'expérimentation (10 transplantations en série pour chaque sexe), 75% en moyenne des Mollusques receveurs avec le clone mâle sont survivants, alors que le pourcentage de survie des Mollusques receveurs avec le clone femelle est de 83%. Au cours de la période patente, la mortalité est également différente selon le sexe : la survie moyenne des Mollusques receveurs avec des sporocystes mâles et des sporocystes femelles est respectivement de 13 et de 20 semaines.

b) — *Prévalence d'infestation des Mollusques*

Nous avons étudié la prévalence d'infestation en fonction de 3 facteurs (*fig. 1*) :

- le sexe du schistosome ;
- le rang de la transplantation ;
- l'âge de l'infestation chez le Mollusque donneur.

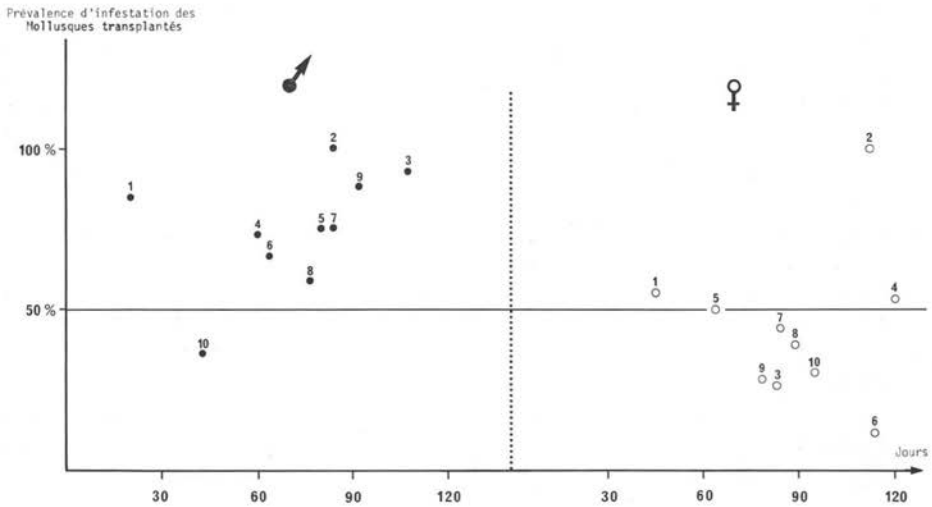


FIG. 1. — Taux d'infestations comparés des Mollusques à chacun des repiquages successifs du clone mâle et du clone femelle. Les nombres notés près de chaque point précisent le rang de la transplantation. En ordonnées les jours correspondent à l'âge de l'infestation chez le Mollusque donneur au moment de la transplantation.

Les résultats, exprimés en pourcentages de Mollusques parasités par rapport aux Mollusques survivants 60 jours après la transplantation, sont nettement différents pour les 2 sexes. Le pourcentage d'infestation des Mollusques est en moyenne de $75,1\% \pm 11,2$ avec le clone mâle, de $43,6\% \pm 14,3$ avec le clone femelle.

Il n'existe pas de relation entre le succès des transplantations et le rang de celles-ci : les valeurs faibles et élevées des taux d'infestation des Mollusques se distribuent au hasard dans chacune des séries de repiquages.

On n'observe pas davantage de relation entre l'âge des sporocystes transplantés et leur capacité de répliation. Pour chacun des clones, les pourcentages d'infestation les plus élevés sont obtenus aussi bien à partir de jeunes greffons que de greffons âgés.

c — Productivité cercarienne

Des différences ont été mises en évidence entre les deux clones concernant la durée de la période prépatente et la productivité cercarienne.

Les premières émissions de cercaires s'échelonnent pour le clone mâle entre le 40^e et le 50^e jour post-transplantation, pour le clone femelle entre le 50^e et le 60^e jour.

Il ne nous a pas été possible pour des raisons matérielles de tester la production cercarienne après chaque transplantation. Nous avons choisi d'évaluer celle-ci au milieu de la série de repiquages, après la 6^e transplantation. La production a été suivie pour le clone mâle à partir du 48^e jour post-transplantation pendant 7 semaines et pour le clone femelle à partir du 61^e jour pendant 10 semaines. Ces deux durées correspondent à la durée moyenne de survie après le début de l'émission des Mollusques respectivement transplantés avec le clone mâle et le clone femelle.

Nous avons rassemblé sur le *tableau I* les données relatives à la production cercarienne des deux clones. Pour le clone mâle, la productivité moyenne correspondant à 49 jours d'émission a été de 21 662 cercaires. Pour le clone femelle, la productivité par Mollusque correspondant à 75 jours d'émission a été de 37 144 cercaires soit une production journalière de 530 cercaires.

TABLEAU I. — Production comparée des cercaires émises par les sporocystes mâles et femelles issus de la 6^e transplantation. Les valeurs représentent la moyenne des productions de 5 Mollusques (P. J. : production journalière ; P. H. : production hebdomadaire).

Nature du clone	Produc- tion	Semaines post-émergence										Cercaires par jour par Mol- lusque	Produc- tion totale	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11
♀	P J	776	700	930	931	818	355	184	141	205	264		530	
	P H	5 432	4 905	6 510	6 517	5 726	2 486	1 288	992	1 440	1 848			37 144
♂	P J	375	220	207	321	637	652	680					441	
	P H	2 629	1 945	1 454	2 247	4 459	4 564	4 764						21 662

Le clône mâle se révèle donc moins productif que le clône femelle. En ce qui concerne la cinétique de production, les données font apparaître aussi une différence entre les deux clônes : dans le cas du clône femelle, on note une période de forte productivité entre la 1^{re} et la 5^e semaine suivie d'une période de faible productivité jusqu'à la mort des Mollusques ; dans le cas du clône mâle par contre, les résultats révèlent une augmentation moyenne de la production cercarienne après la 1^{re} semaine avec l'âge de la parasitose.

d — Infectivité des cercaires

Des lots de 10 Souris ont été exposés aux cercaires émises après chaque transplantation. 30 jours après l'infestation, les vers adultes qui se sont développés chez la Souris sont recueillis par perfusion hépatique. Pour l'ensemble des 100 Souris perfusées, le taux moyen de maturation des cercaires en schistosomes adultes est de $24,5 \pm 2,4$ (fig. 2). Au cours de la série de 10 repiquages, nous n'avons pas mis en évidence de variations importantes de la probabilité de développement des cercaires en schistosomes adultes. Hormis les deux valeurs extrêmes de 33,2% et de 18,3% notées respectivement à la 3^e et à la 7^e transplantation, les fluctuations des autres pourcentages compris entre 22 et 28% sont minimales par rapport à la moyenne.

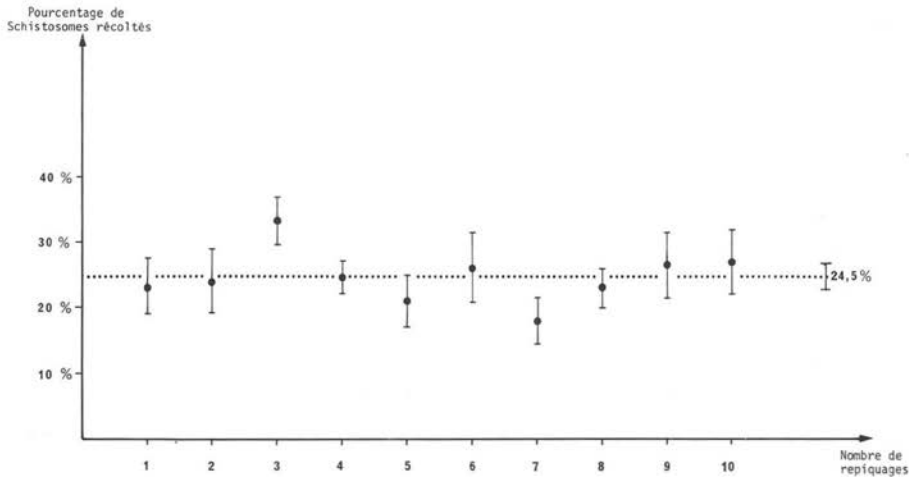


FIG. 2. — Taux de maturation des cercaires en schistosomes adultes après chacun des repiquages.

III — Discussion

Si l'on compare l'entretien de *S. mansoni* par clonage à son entretien classique, le clonage peut être considéré comme une technique de routine qui pourrait dans de nombreux cas se substituer à la technique classique. En dehors de ses avantages

purement pratiques déjà soulignés par ailleurs (Combes, 1981), notamment en ce qui concerne la réduction des coûts et du temps de travail, nos données portant sur une maintenance à long terme montrent que cette technique se révèle d'une très grande fiabilité.

— La survie postopératoire des Mollusques à 60 jours est toujours supérieure à 75% pour le clone mâle et à 83% pour le clone femelle. Ces résultats sont meilleurs que ceux observés lors de l'entretien classique du cycle au cours duquel on note souvent une mortalité importante des Mollusques infestés en période prépatente, ceux-ci étant échantillonnés dans des classes d'âge très jeunes pour augmenter la prévalence d'infestation ;

— le taux moyen d'infestation des Planorbes par transplantation de sporocystes mâles est très voisin (75%) de celui que l'on note après infestation plurimira-cidiale. Si la réussite de l'infestation avec les sporocystes femelles est dans la majorité des cas presque 2 fois moindre (45%) qu'avec les sporocystes mâles, sans qu'aucune explication à cette différence puisse être actuellement donnée, ce pourcentage moyen de réussite permet néanmoins de maintenir le clone femelle sans problèmes ;

— la production cercarienne des Mollusques receveurs est très proche de celle des Mollusques infestés expérimentalement par 10 miracidiums pour le même couple hôte-parasite (490 cercaires par jour et par Mollusque (Théron, 1982) ;

— enfin, l'infektivité moyenne des cercaires produites au cours de la série des 10 transplantations ($24,5 \pm 2,4$) est du même ordre de grandeur que celle des cercaires issues d'infestations miracidiales pour la même souche de Mollusque et de schistosome ($28,9\% \pm 3,9$) (Théron, 1982).

Au-delà de ces observations, il nous paraît important de préciser que nous n'avons pas noté de corrélation entre la variation des caractères spécifiques de la souche de schistosome et le rang des transplantations, ce qui laisse espérer une possibilité de conservation indéfinie de la souche par clonage.

Nous avons déjà souligné par ailleurs (Jourdan et Théron, 1980) que l'intérêt du clonage ne se limite pas seulement à ses avantages techniques. De nombreux auteurs ont pu notamment mettre en évidence que les passages obligatoires du parasite chez le Vertébré au cours de l'entretien classique entraînaient à la longue une dérive génétique des souches pouvant aller jusqu'à la stérilité. Les recherches modernes tant sur le plan immunologique que sur le plan génétique s'accommodent mal de cette variabilité génétique incontrôlable. L'entretien du parasite par clonage permet d'éliminer cette dérive génétique qui ne peut se produire en l'absence de reproduction sexuée.

Il nous paraît important de noter aussi que la technique de clonage, qui permet de garder côte à côte de façon indéfinie autant de clones mâles et femelles de souches d'origines différentes, ouvre des perspectives de recherches certainement très larges dans le domaine de la génétique des schistosomes.

En effet, les expériences de génétique chez les schistosomes se sont toujours avérées très difficiles, le sexe des cercaires ne pouvant être précisé qu'au terme du

développement des schistosomes adultes chez la Souris. Cet impératif a constitué jusqu'ici un frein certain au développement de cette discipline, dont les apports dans le domaine de la spécificité et de la phylogénie du genre *Schistosoma* devraient se révéler du plus haut intérêt.

REMERCIEMENTS . Cette recherche a bénéficié de l'aide financière de la Edna Mac Connell Clark Foundation et du C.N.R.S. (E.R.A. 915).

BIBLIOGRAPHIE

- COHEN L. M., EVELAND L. K. : *Schistosoma mansoni* : Long term maintenance of clones by microsurgical transplantation of sporocysts. Abstracts fifth Internation. Congr. Parasitol., Toronto, Canada, 7-14 August 1982, 604.
- COMBES C. : Pour vaincre la bilharziose : le Clonage. *La Recherche*, 1981, 12, 1138-1140.
- ERICKSON D. L. : An efficient technique for exposure of rodents to *Schistosoma mansoni* or *Schistosoma haematobium*. *J. Parasitol.*, 1974, 60, 553-554.
- JOURDANE J. : Perspectives de maintenance de *Schistosoma mansoni* exclusivement chez le Mollusque vecteur par l'utilisation des techniques de transplantation. Proc. fourth Internation. Congr. Parasitol., Warszawa C, 1978, 100.
- JOURDANE J., THERON A. : *Schistosoma mansoni* : Cloning by microsurgical transplantation of sporocysts. *Exp. Parasitol.*, 1980, 50, 349-357.
- NOJIMA H., NODA S., SATO A. : Serial implantations of larval *Schistosoma mansoni* from infected to uninfected snails. *J. Parasitol.*, 1980, 66, 478-482.
- THERON A. : Le compartiment cercaire dans le cycle de *Schistosoma mansoni*. Écologie de la transmission bilharzienne en Guadeloupe. *Thèse Doct. Etat*, Université de Perpignan, 1982, 506 p.
-