

Présence en Bolivie de sept nouveaux variants isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*

Considérations taxonomiques
et épidémiologiques

Discussion

sur la valeur antigénique potentielle
de certaines isoenzymes ⁽¹⁾

Michel TIBAYRENC ⁽²⁾, Lourdes ECHALAR ⁽³⁾,
François LE PONT ⁽⁴⁾, Philippe DESJEU ⁽⁵⁾

Résumé

Les auteurs décrivent la variabilité génétique de 45 isolats boliviens de *Trypanosoma cruzi* à l'aide de 12 loci isoenzymatiques. Ils montrent la présence de deux groupes principaux, avec cependant une importante variabilité intragroupe. La répartition géographique et l'importance médicale de ces variants (zymosouches) sont discutées. La valeur antigénique de certaines isoenzymes (GD, ME) est considérée.

Mots-clés : Bolivie — *Trypanosoma cruzi* — Zymosouches — Valeur antigénique — Isoenzymes.

Summary

THE PRESENCE IN BOLIVIA OF 7 NEW ISOENZYMIC VARIANTS OF *TRYPANOSOMA CRUZI*. TAXONOMIC AND EPIDEMIOLOGICAL REFLEXIONS. DISCUSSION ABOUT THE POTENTIAL ANTIGENIC VALUE OF SOME ISOENZYMES. The authors describe the genetic variability observed on 45 Bolivian stocks of *Trypanosoma cruzi* by means of 12 enzymic loci. They show the presence of two main groups, with nevertheless a great intragroup variability. The geographical repartition and medical importance of these variants (zymostrains) are discussed. The antigenic value of some isoenzymes (GD, ME) is considered.

Key words : Bolivia — *Trypanosoma cruzi* — Zymostrains — Antigenic value — Isoenzymes.

-
- (1) Étude réalisée dans le cadre de l'accord signé entre l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude (IBBA) et l'O.R.S.T.O.M.
 - (2) Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., IBBA, Embajada de Francia, Casilla 824, La Paz, Bolivia.
 - (3) Assistante de recherches, IBBA, même adresse.
 - (4) Technicien O.R.S.T.O.M., IBBA, même adresse.
 - (5) Co-directeur de l'IBBA, même adresse.

Introduction

L'existence de souches isoenzymatiques différentes de *Trypanosoma cruzi* a été démontrée premièrement par Miles *et al.* (1977) sur la base d'une interprétation intuitive des zymogrammes. L'interprétation génétique des zymogrammes (Tibayrenc *et al.*, 1981 a et b) nous a amenés récemment à reconsidérer le problème. Un travail antérieur (Tibayrenc et Desjeux 1982) nous avait permis de distinguer en Bolivie 2 souches isoenzymatiques de *T. cruzi*, sympatriques, mais présentant des fréquences géographiques différentes. L'extension de nos zones d'étude et l'emploi d'autres loci isoenzymatiques nous montrent maintenant l'existence de 9 variants, dont la signification taxonomique et médicale est discutée ici.

Matériel et méthodes

Nous avons jusqu'à présent étudié 250 isolats de *T. cruzi* à l'aide d'une batterie limitée d'enzymes : 109 isolats (Tibayrenc et Desjeux, 1982) ont été examinés à l'aide des systèmes enzymatiques suivants : Phosphoglucumutase (E.C.2.7.5.1., PGM), Malate déshydrogénase Nadp⁺ ou enzyme malique (E.C.1.1.1.40., ME), Glucose phosphate isomérase (E.C.5.3.1.9., PGI), et 6 phosphoglucuronate déshydrogénase (E.C.1.1.1.44., 6PGD). 141 isolats (Tibayrenc *et al.*, à paraître) ont été étudiés avec les mêmes enzymes, plus l'Isocitrate déshydrogénase (E.C.1.1.1.42., ICD). Sur ces 250 isolats, nous en avons sélectionné 45 provenant de 7 localités qui présentent des conditions écologiques très variées ⁽¹⁾, et nous les avons examinés avec une

TABLEAU I

Conditions de révélation des enzymes (le matériel et les techniques utilisés sont donnés en annexe)

Enzyme	Tampon de migration	Tampon de révélation	Activateur	Coenzyme	Enzyme liante	Substrat	Eau	Système de révélation
PGM	1	A. 80/ml	MgCl ₂ 1,0/M 2,5/ml	NADP 50/mg	G6PD 200 µl	Glucose 1P 240/mg	17/ml	NBT-PMS (1)
GPI	2	B. 84/ml	"	"	"	Fructose 6P 95/mg	14/ml	"
6PG	"	" 78/ml	"	"	-	6 phosphoglucuronic acid 50/mg	20/ml	"
ICD	3	" 87/ml	"	"	-	DL isocitric acid 47/mg	11/ml	"
ME	"	C. 78/ml	"	"	-	Malate 1,0/M pH 7,0 6/ml	14/ml	"
MDH	4	A. 40/ml	-	NAD 50/mg	-	" 9/ml	51/ml	"
G6P	"	B. 82/ml	MgCl ₂ 1,0/M 2,5/ml	NADP 50/mg	-	D Glucose 6P 60/mg	14/ml	"
GD	"	F. 100/ml	-	"	-	L Glutamic acid		"
PEP	"	D. 7,6/ml	MnCl ₂ 0,1/M 780 µl	-	L Aminoacid oxidase 0,5/mg (4) Peroxidase 0,25/mg (4)	Leucyl leucyl leucine 26/mg	42/ml	3 Amino 9 Ethyl-carbazole (2)
LAP	5	E. 50/ml	-	-	-	L Leucyl β naphthyl amide 20/mg	50/ml	Fast Black K Salt (3)

(1) Chivisivi : altitude 2 600 m ; 60 km de SE La Paz ; climat tempéré sec. Sucre : altitude 2 600 m ; 250 km de SE La Paz ; climat tempéré sec. Santa Cruz : altitude 400 m ; 400 km de E La Paz ; climat subtropical. Yungas : altitude 1 600 m ; 100 km E de La Paz ; climat subtropical. Alto Beni : altitude 1 000 m ; 200 km NE de La Paz ; climat subtropical. Tupiza : altitude 2 600 m ; 1 000 km S de La Paz ; climat tempéré sec. Tarija : altitude 1 600 m ; 900 km S de La Paz ; climat subtropical sec.

batterie de 10 enzymes, les 5 déjà citées, et : Glucose 6 phosphate déshydrogénase (E.C.1.1.1.49., G6PD), Glutamate déshydrogénase Nadp^+ (E.C.1.4.2.1., GD), Malate déshydrogénase Nad^+ (E.C.1.1.1.37., MDH), Aminopeptidase (E.C.3.4.11.1., PEP) et Leucine aminopeptidase (E.C.3.4.11., LAP). Ces 10 enzymes permettent d'étudier 12 loci, ME et MDH présentant chacune 2 loci.

Les conditions d'électrophorèse et de révélation sont consignées dans le tableau I. Elles sont proches de celles données par Lanham *et al.* (1981), avec certaines modifications.

Tous les isolats, sauf ceux fournis par le laboratoire du CENETROP de Santa Cruz, ont été obtenus à partir du tube digestif de l'insecte vecteur selon une méthode déjà décrite (Tibayrenc *et al.*, 1982). Les parasites ont été cultivés en milieu GLSH, sans qu'il soit besoin de cultures massives : la quantité fournie par un seul tube est suffisante pour les études isoenzymatiques. Les cultures ont été centrifugées à 2 500 RPM pendant 10 minutes, les culots ont été stockés sans lavage à -70°C jusqu'à utilisation. Au moment de l'électrophorèse, les culots ont été lysés en leur ajoutant une quantité sensiblement égale de stabilisateur d'enzyme hypotonique (Dithiotreitol, Acide E-aminocaproïque, EDTA à 2mM), et en les laissant dans un bain de glace pendant 20 minutes. La lyse des parasites

a été parachevée par triple congélation-décongélation (eau à 37°C , alcool à -70°C). L'exploitation des données isoenzymatiques s'est faite par le calcul de la distance génétique standard de Nei (1972) dont nous avons proposé l'utilisation pour la systématique des Flagellés (Tibayrenc, 1980). Ces calculs ont été faits en se basant sur les hypothèses génétiques formulées auparavant pour *T. cruzi* : absence de sexualité actuelle et donc évolution par clones indépendants (Tibayrenc *et al.*, 1981 b), et diploidie (Tibayrenc *et al.*, 1981 a). Cette dernière hypothèse a également été formulée par Lanar *et al.* (1981) sur la base d'une étude de l'ADN du parasite. Elle semble pouvoir être étendue à toutes les souches isoenzymatiques du parasite (Lemesre et Tibayrenc).

Résultats et discussion

Ils sont consignés dans les tableaux II (provenance des différents variants isoenzymatiques), III (fréquences alléliques, interprétation génétique) et IV (matrice des distances génétiques), ainsi que dans le dendrogramme (fig. 1). Dans ce dernier, seules les valeurs les plus proches les unes des autres sont exactes (par exemple distance génétique entre 1 et 1a). Les branchements ultérieurs se font en

TABLEAU II

Provenance des zymosouches, avec effectifs respectifs des isolats tous obtenus de *Triatoma infestans*, sauf 1c de Santa Cruz (*Triatoma sordida*) ; 1b de Sucre (homme) ; 1a de l'Alto Beni (*Rhodnius pictipes*)

Zymosouche:	1	1a	1b	1c	1d	2	2a	2b	2c
Provenance:									
Chiwisivi	8	0	0	0	0	1	0	0	0
Santa Cruz	0	0	0	1	1	5	0	0	0
Sucre	1	0	1	0	0	1	0	0	0
Yungas	3	0	0	0	0	1	0	0	0
Alto Beni	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Tupiza	6	0	0	0	0	4	2	0	2
Tarija	1	0	0	0	0	3	1	1	0
TOTAL:	20	1	1	1	1	15	3	1	2

TABLEAU III

Interprétation génétique des zymogrammes ; fréquences alléliques

Zymosouches :		1	1a	1b	1c	1d	2	2a	2b	2c
Locus :	Allèle									
PGM	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0	0
	3	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1	1
PGI	1	0	0	0	0	0	0,5	0	0,5	0
	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0	1
	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0
	5	1	1	1	1	0	0	0	0	0
6PGD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0
	3	0	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0
	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
PEP	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G6PD	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	4	1	1	0	0	1	0	0	0	0
ICD	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0
	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	1	1	1	1
ME1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0
ME2	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
	2	0	0	1	0	1	1	1	1	1
MDH1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
MDH2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LAP	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	1	1	1	1
GD	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

PGM : Phosphoglucomutase ; PGI : Phosphoglucose Isomérase ; 6PGD : 6 phosphogluconate déshydrogénase ; PEP : Peptidase ; G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase ; ICD : Isocitrate déshydrogénase ; ME : malate déshydrogénase Nadp+ ; MDH : Malate déshydrogénase Nad+ ; LAP : Leucine aminopeptidase ; GD : Glutamate déshydrogénase Nadp+.

TABLEAU IV

Matrice des distances génétiques entre les zymosouches

	1	1a	1b	1c	1d	2	2a	2b	2c
1	0								
1a	0,09	0							
1b	0,57	0,57	0						
1c	0,30	0,30	0,19	0					
1d	0,30	0,30	0,43	0,19	0				
2	1,71	1,71	1,01	1,71	1,71	0			
2a	1,71	1,71	1,01	1,71	1,71	0,03	0		
2b	1,73	1,73	1,04	1,73	1,73	0,03	0,05	0	
2c	1,77	1,77	1,08	1,77	1,77	0,41	0,34	0,36	0

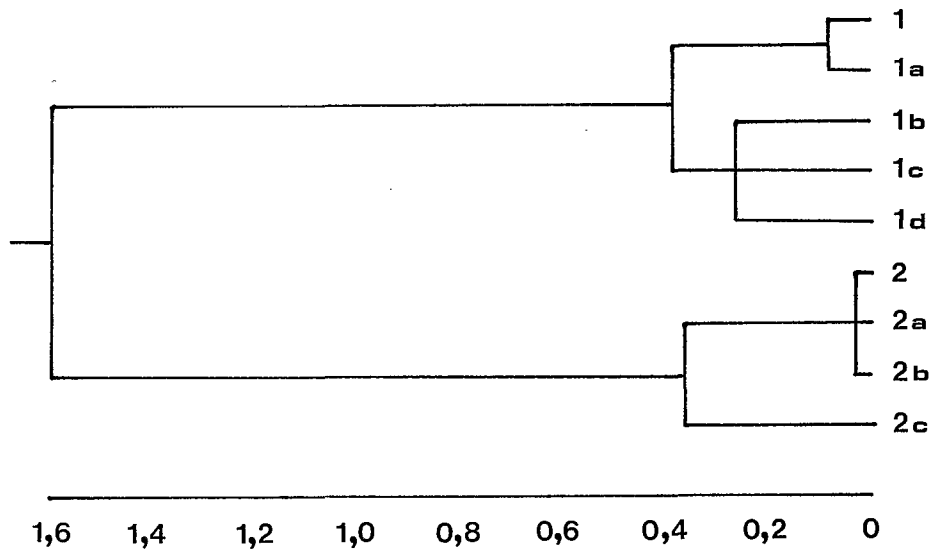


FIG. 1. — Dendrogramme des distances génétiques

calculant les distances génétiques moyennes selon la méthode indiquée par Nei (1975). Ce dendrogramme ne constitue qu'une visualisation des données de la matrice et ne peut être considéré sans réserves comme un véritable arbre évolutif.

On peut en tirer les conclusions phylogéniques suivantes :

— La variabilité n'est pas chez *T. cruzi* extrêmement forte : sur les 45 isolats, on n'observe que 9 variants isoenzymatiques. Encore, 88 % des variants peuvent-ils être rapportés aux souches isoenzymatiques 1 et 2, ou aux souches très proches (n'en différant que par un seul allèle).

— Le dendrogramme obtenu montre clairement une discontinuité majeure : existence de deux groupes phylétiques très nettement différenciés. Or, dans le cas d'une évolution purement asexuée à partir d'un même organisme ancestral, on devrait prévoir un *continuum* (Génermont, 1976). L'aspect observé peut s'expliquer de deux façons : ou l'évolution s'est bien faite uniquement par mitose, et dans ce cas la séparation en deux groupes majeurs ne peut s'expliquer que par un effet fondateur drastique (« bottle-neck effect ») ; ou bien l'absence actuelle de sexualité n'est qu'un phénomène secondaire de dégradation parasitaire, et dans ce cas les deux groupes principaux pourraient être le résultat d'une spéciation vraie. Certains arguments viennent à l'appui de cette hypothèse : la persistance d'une sexualité chez les trypanosomes africains (Tait, 1980), l'existence d'un état diploïde chez *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 1981 a ; Lanar *et al.*, 1981), insolite chez un organisme qui serait primitivement asexué. D'autre part, théoriquement, la multiplication asexuée chez un organisme diploïde devrait aboutir à une hétérozygotie généralisée (Génermont, 1980). Ce n'est pas le cas chez *T. cruzi*. La perte de sexualité pourrait donc être un phénomène relativement récent. L'inféodation des triatomes vecteurs à l'homme, qui a augmenté considérablement la niche écologique du parasite (par la pullulation des triatomes), pourrait être une explication de cette perte de sexualité. Quelle que soit l'hypothèse invoquée, demeure le fait indéniable de la présence en Bolivie de deux subdivisions majeures du taxon *T. cruzi*. On comparera utilement ce résultat à ceux obtenus par d'autres auteurs. Certains de ces travaux ont fait appel à la systématique numérique seule, sans interprétation génétique (Ready et Miles, 1980 ; Gibson *et al.*, 1980). Cependant, les caractères étudiés (bandes isoenzymatiques) étant les mêmes que dans les calculs de distances génétiques, on peut s'attendre à ce que

les dendrogrammes obtenus soient plus ou moins comparables. C'est ce qui se produit quand les deux méthodes sont utilisées conjointement (Lanotte *et al.*, 1981). Les résultats obtenus par Ready et Miles (1980) chez *T. cruzi* montrent la présence au Brésil de 3 groupes principaux (« zymodèmes »), mais avec une variabilité intragroupe qui semble inférieure à celle que nous avons retrouvée en Bolivie. Les données fournies par Lanotte *et al.* (1981) montrent que le « pattern » obtenu pour des « espèces » différentes de *Leishmania* est très comparable à celui que montrent nos souches isoenzymatiques de *T. cruzi*. Nous avons formulé l'hypothèse que les *Leishmania* sont diploïdes (Tibayrenc *et al.*, 1981 a). Cette opinion a été également émise par Maazoun *et al.* (1981). Ainsi, bien que l'épidémiologie des *Leishmania* soit différente de celle de *T. cruzi* (plus forte spécificité vectorielle pour les *Leishmania*), l'évolution biochimique pourrait révéler des similitudes : l'hypothèse que nous présentons pour *T. cruzi* dans ce travail (perte plus ou moins récente de la sexualité, certaines souches isoenzymatiques pouvant être le résultat d'une spéciation vraie) est peut-être applicable aux *Leishmania*. Cependant, ne disposant pas de données personnelles, nous n'émettons cette opinion qu'avec réserves. La situation que montrent les trypanosomes africains est différente, le dendrogramme obtenu par systématique numérique (Gibson *et al.*, 1980) étant très buissonnant. Ceci est peut-être à mettre en relation avec l'hypothèse d'une sexualité classique que Tait (1980) a proposée pour *Trypanosoma brucei*. Si l'on suit cette hypothèse, certains « zymodèmes » mineurs de *T. brucei* pourraient ne refléter qu'une variabilité « individuelle » (chaque clone étant l'équivalent génétique d'un « individu ») sans signification taxonomique.

— La comparaison avec des organismes apparentés nous amène à parler des valeurs absolues de distances génétiques que nous avons relevées. Il est hasardeux d'établir des relations strictes entre valeurs de distances génétiques et niveaux taxonomiques. Cependant, certains auteurs notent une correspondance au moins relative entre ces deux types de données (Ayala, 1982 ; Cronin *et al.*, 1981). Les comparaisons interorganismes sont a priori davantage justifiées dans le cas d'organismes apparentés (*Leishmania* et *Trypanosoma*). Les valeurs que nous relevons entre les deux « phylums » boliviens de *T. cruzi* sont très fortes (supérieures à 1, atteignant 1,77), ce qui confirme les données d'un précédent travail (Tibayrenc et Miles, 1982). Elles

Sept nouveaux variants isoenzymatiques de *T. cruzi* en Bolivie

sont considérées comme des distances génétiques minimales, une amélioration des techniques ne pouvant que les majorer (voir les résultats inférieurs que nous avons obtenus dans un précédent travail : Tibayrenc *et al.*, 1981 a). Ces valeurs sont très supérieures à celles qu'on observe entre *Trypanosoma brucei brucei* et *T. brucei gambiense* (Tait et Le Ray, communication personnelle), et comparables à celles qui existent entre « espèces » différentes de *Leishmania* (Lanotte *et al.*, 1981). Ceci est un argument pour considérer les deux groupes majeurs observés en Bolivie comme des entités taxonomiques naturelles, des « *agamospécies* ». Un autre élément est donné par la constance de certains variants sur des aires géographiques très étendues : la souche isoenzymatique 1 de Bolivie est biochimiquement très proche du « zymodème » 1 du Brésil (Tibayrenc et Miles, 1982), des isolats collectés en Guyane française, et de la souche de laboratoire Tehuentepec, qui vient du Mexique (résultats non encore publiés). La souche 2a de Bolivie, très apparentée à la souche 2 (n'en différant que par un allèle), a été retrouvée dans le sud des États-Unis, au Brésil et au Chili (résultats non encore publiés).

— L'adoption d'une terminologie définitive est cependant rendue très difficile par l'existence d'une certaine hétérogénéité au sein des groupes que nous observons. Si certains variants semblent mineurs (ne différant entre eux que par un allèle), d'autres sont beaucoup mieux différenciés : distance génétique de 0,4 entre 2 et 2c par exemple. Ce variant 2c semble être apparenté au « zymodème » 2 du Brésil, sans lui être semblable (Tibayrenc *et al.*, à paraître). Le cas le plus difficile à classer est celui du variant 1b (distance génétique de 1,01 par rapport à la souche 2, de 0,57 par rapport à la souche 1). Ceci n'apparaît pas clairement sur le dendrogramme. L'hétérogénéité intragroupe ne saurait donc être négligée, et son importance épidémiologique et taxonomique doit absolument être éclaircie. Ceci ne pourra se faire que par une étude extensive portant sur toute l'aire de répartition du parasite. En attendant, nous ne pouvons que nous en tenir à une terminologie d'attente : chaque variant reçoit le nom de « zymosouche » (ou « zymos-train » en Anglais, abréviation : « ZS »), sans préjuger de son importance médicale ou taxonomique. Le terme qui prévaut actuellement, « zymodème », doit à notre sens être rejeté, au moins en ce qui concerne *T. cruzi*. D'une part, il désigne actuellement les zymosouches « majeures » de *T. cruzi* (Miles *et al.*, 1981 a), or, comme nous venons de le

montrer, la distinction entre souches « majeures » et « mineures » est loin d'être évidente. D'autre part, ce terme est générateur de confusions, un « dème » désignant en génétique des populations une population panmictique, ce qui implique une reproduction sexuée, or, cette reproduction sexuée semble absente chez *T. cruzi*.

— La valeur taxonomique des différents loci enzymatiques n'est pas univoque. Ainsi, deux loci sont apparus constamment monomorphes pour les 45 isolats étudiés : ce sont MDH2 et GD, ceci confirmant d'autres résultats (Tibayrenc et Miles, 1982, et résultats non encore publiés). Ces loci semblent constituer de bons « loci-diagnostic » pour le taxon *T. cruzi* par rapport à d'autres parasites proches : *T. cruzi marenkellei* et *T. rangeli* (résultats non encore publiés). D'autres loci permettent de distinguer les deux grands groupes : le groupe 1 est caractérisé par PGM, ICD, LAP et MDH1, qui sont chez lui monomorphes (fig. 2). Le groupe 2 peut être déterminé par les mêmes enzymes, sauf PGM qui présente chez lui une variabilité. On note l'aspect hétérozygote des loci PGI et 6PG pour les zymosouches 2, 2a et 2b, et du locus PGM pour 2 et 2a. L'aspect hétérozygote de ICD, que nous avons observé en gel d'amidon chez la zymosouche 2 (Tibayrenc et Miles, 1982) n'a pas été retrouvé en acétate de cellulose. En attendant des études comparatives, nous avons considéré ce locus comme homozygote pour le groupe 2. Les autres

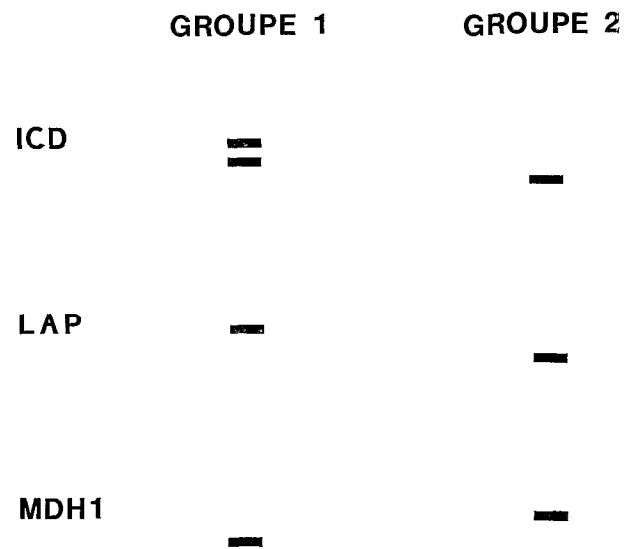


FIG. 2. — Zymogrammes des loci ICD, LAP et MDH1 pouvant caractériser les groupes de zymosouches 1 et 2

loci présentent une forte variabilité (photo 1). On note que, seule au milieu du groupe 1, la zymosouche 1b présente le « pattern » ME du groupe 2. Ce fait insolite ne suffit pas à faire invoquer une sexualité classique (recombinaison de tout le génome) chez *T. cruzi*. Par contre, il est compatible avec l'hypothèse de phénomènes de parasexualité (échange entre souches d'une petite portion du génome), qui apparaîtraient alors comme très exceptionnels. Pour terminer avec cette question de la valeur diagnostique des loci, on note que 8 des 9 zymosouches auraient pu être détectées avec les 5 enzymes que nous employons de façon routinière : PGM, PGI, 6PG, ME et ICD.

antigène devrait grandement faciliter sa purification pour toutes études appliquées (Tibayrenc, 1982). Les meilleurs candidats sont les enzymes à très forte activité. Chez *T. cruzi*, c'est le cas pour GD (photo 2). ME présente chez un parasite apparenté (*T. rangeli*) une activité également remarquable. Si la ME de ce trypanosome présente des propriétés antigéniques croisées avec *T. cruzi*, ceci peut être un biais pour obtenir la purification en grande quantité de cet antigène (on utiliserait comme source le *T. rangeli*). Si au contraire, cette enzyme a des propriétés antigéniques spécifiques de *T. rangeli*, ceci peut permettre d'obtenir un diagnostic immunologique spécifique des infections à *T. rangeli*.

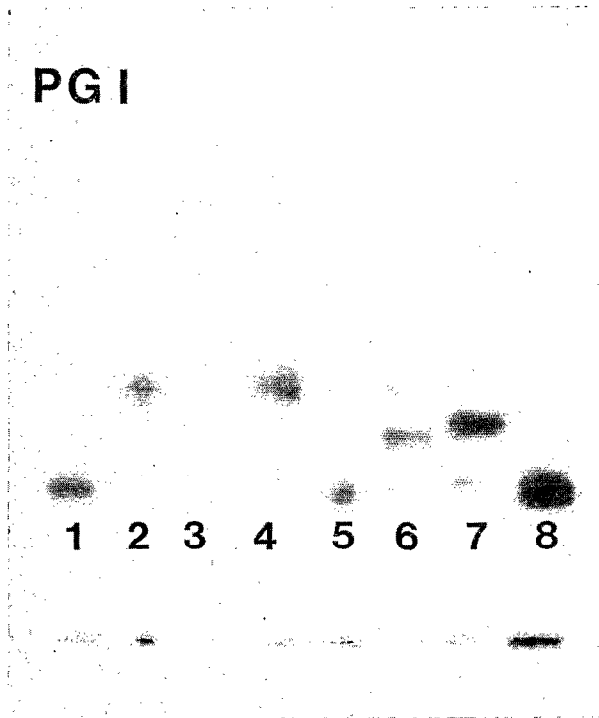


PHOTO 1. — Zymogramme de l'enzyme PGI pour différentes zymosouches ; 4 allèles visibles, numérotés de 1 à 4, du plus rapide au plus lent. Échantillons 1, 3, 5 et 8 : Zymosouche 1 (génotype homozygote 4/4) ; échantillons 2 et 4 : Zymosouche 2c (homozygote 2/2) ; échantillon 6 : zymosouche 2a (hétérozygote 2/3) ; échantillon 7 : zymosouche 2 (hétérozygote 1/3) ; l'enzyme ayant une structure dimérique, les hétérozygotes montrent un zymogramme à 3 bandes, la bande médiane étant plus intense que les 2 extrêmes.

— Valeur immunologique des isoenzymes : si certaines enzymes présentent une activité antigénique, le fait de connaître la nature biochimique d'un

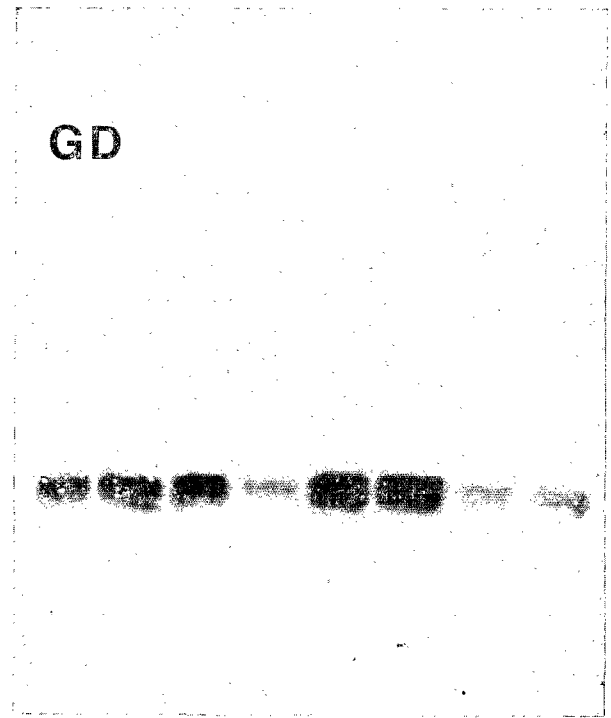


PHOTO 2. — Zymogramme de l'enzyme GD. Toutes les bandes sont au même niveau, quelle que soit la zymosouche : enzyme monomorphe. Remarquer la forte intensité des bandes (10 minutes de révélation)

— La répartition des zymosouches en Bolivie (fig. 3) peut se décrire provisoirement comme suit : les deux zymosouches apparemment les plus fréquentes (ZS1 et ZS2) semblent ubiquistes, au moins en cycle urbain, et ont été retrouvées dans des endroits très divers (Tibayrenc et Desjeux, 1982), Tibayrenc et *al.*, à paraître). La zymosouche 2c

(apparentée au zymodème 2 du Brésil) n'a été retrouvée qu'à Tupiza, à l'extrême-sud du pays, dans une zone où les échanges de travailleurs migrants avec l'Argentine sont intenses. La zymosouche 2a (très proche de ZS2, n'en différant que par 1 allèle), semble épidémiologiquement importante, car elle se retrouve aux USA, au Chili, au Brésil et dans les Guyanes. En Bolivie, elle n'a été observée que dans le sud (Tupiza, Tarija). La zymosouche 2b, constituée par 1 seul isolat, n'a été trouvée qu'à Tarija. La zymosouche 1b (1 seul isolat), très spéciale d'un point de vue taxonomique, n'a été trouvée que dans la ville de Sucre.

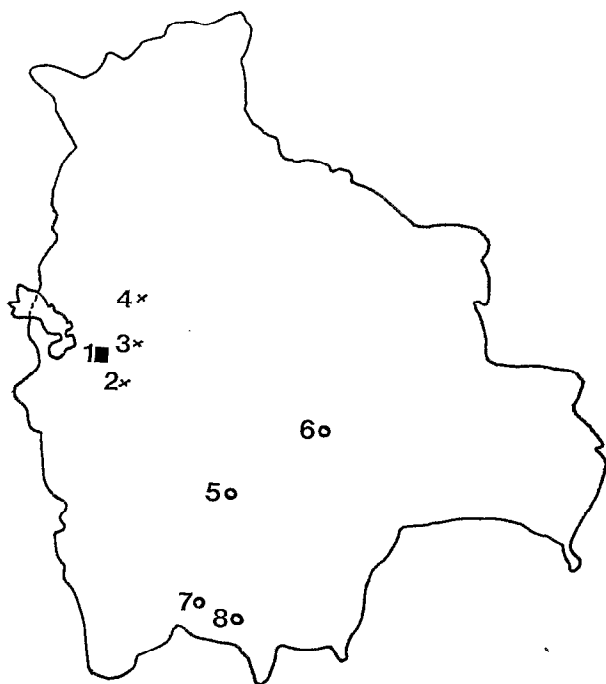


FIG. 3. — Carte de Bolivie montrant la provenance des différentes zymosouches (voir aussi tabl. II) : 1 = La Paz ; 2 = Chiwisivi ; 3 = Yungas ; 4 = Alto Beni ; 5 = Sucre ; 6 = Santa Cruz ; 7 = Tupiza ; 8 = Tarija

— Les données boliviennes ne montrent pas la spécificité vectorielle qui a été soupçonnée au Brésil pour les zymodèmes (Miles *et al.*, 1981 a). Toutes les zymosouches semblent en Bolivie transmises massivement et sympatricquement (Tibayrenc *et al.*, soumis pour publication) par le même vecteur *Triatoma infestans*, au moins en cycle urbain. La seule spécificité épidémiologique semble résider pour l'instant dans les différences de fréquences géographiques des zymosouches.

— Pour terminer, il nous faut souligner certaines limites de la classification biochimique. Certains auteurs ont cherché à mettre en évidence des relations entre les données isoenzymatiques et d'autres propriétés du parasite. Ainsi, Miles *et al.* (1981 b) ont souligné une relation statistique en un même lieu entre fréquence des zymodèmes et formes cliniques de la maladie de Chagas. Dvorak *et al.* (1980) ont montré une relation entre cinétique de culture et zymodème. Garcia et Dvorak (1982) ont remarqué une infectivité différente du triatome par chaque zymodème. Cependant, il faut souligner que de telles concordances ne sont pas obligatoires a priori, et doivent faire l'objet de soigneuses vérifications statistiques. En effet, la classification par distances génétiques reflète l'évolution protéique, laquelle apparaît pour une grande part neutre face à la sélection naturelle (Wilson *et al.*, 1977). Au contraire, les caractères épidémiologiques ou pathogéniques sont probablement adaptatifs, et leurs rythmes évolutifs peuvent donc être très différents de ceux de l'évolution protéique. Un cas illustratif est fourni par la résistance aux drogues : celle-ci pourrait être au moins dans certains cas sous la dépendance de gènes régulateurs, comme les résistances observées dans certains cas chez les bactéries (Ninio, 1979). Et de même qu'on observe au sein d'une même taxon bactérien des mutants résistants, pourtant semblables taxonomiquement à leurs congénères, de même peut-on imaginer au sein d'une même zymosouche de *T. cruzi* des isolats plus ou moins résistants aux drogues. Les résultats d'une étude *in vitro* réalisée à l'IBBA (Barnabé et Tibayrenc) montrent que si la résistance aux drogues semble suivre la classification en zymosouches, elle n'est pas proportionnelle aux distances génétiques, et que la variabilité d'un isolat à l'autre au sein d'une même zymosouche est assez forte.

Conclusion

La classification des souches isoenzymatiques (zymosouches) de *Trypanosoma cruzi* par distances génétiques constitue une approche rationnelle pour hiérarchiser les subdivisions de ce taxon (taxonomie phylétique). Elle devrait absolument être prise en compte pour toute étude (immunologique, épidémiologique, pharmacologique, génétique...) concernant ce parasite, même si les corrélations entre les données isoenzymatiques et les autres propriétés du parasite ne sont pas obligatoires a priori.

L'insuffisance de nos connaissances sur la variabilité isoenzymatique totale de *T. cruzi* oblige cependant à s'en tenir à une terminologie d'attente, chaque variant isoenzymatique recevant le nom de « zymosouche » quelle que soit son importance taxonomique ou médicale.

La répartition des zymosouches en Bolivie montre en cycle urbain une absence totale de spécificité vectorielle, toutes les zymosouches étant transmises par *Triatoma infestans*. Ces zymosouches

sont étroitement sympatriques, avec cependant des fréquences très différentes selon les localités.

L'étude se poursuit en Bolivie et dans d'autres pays d'endémie pour donner un tableau définitif de la variabilité isoenzymatique de *T. cruzi*, et de ses relations avec les données médicales et épidémiologiques.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.
le 4 mars 1983.

BIBLIOGRAPHIE

- AYALA (F. J.), 1982. — Biologie moléculaire et Évolution. Masson Éd., Paris.
- BARNABÉ (C.) et TIBAYRENC (M.). — A pharmacological study of some bolivian isoenzymic strains in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, à paraître.
- CRONIN (J. E.), BOAZ (N. T.), STRINGER (C. B.) et RAK (Y.), 1981. — Tempo and mode in hominoid evolution. *Nature*, 292 : 113-122.
- DVORAK (J. A.), HARTMAN (D. L.) et MILES (M. A.), 1980. — *Trypanosoma cruzi* : correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from varied sources. *J. Protozool.*, 27, 4 : 472-474.
- GARCIA (E. S.) et DVORAK (J. A.), 1982. — Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 2 : 259-262.
- GÉNÉRMONT (J.), 1976. — Le problème de l'espèce chez les Protozoaires. *Mém. Soc. zool.*, France, 38, 1 : 375-403.
- GÉNÉRMONT (J.), 1980. — Les animaux à reproduction uniparentale. *Mém. Soc. zool.*, France, 40, 3 : 287-331.
- GIBSON (W. C.), MARSHALL (T. F. de C.) et GODFREY (D. G.), 1980. — Numerical analysis of enzyme polymorphism : a new approach to the Epidemiology and Taxonomy of Trypanosomes of the genus *Trypanozoon*. *Adv. Parasitol.*, 18 : 175-246.
- LANAR (D. E.), LEVY (L. S.) et MANNING (J. E.), 1981. — The complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 5 : 327-341.
- LANHAM (S. M.), GRENDON (J. M.), MILES (M. A.), POVOA (M.) et DE SOUZA (A. A.), 1981. — A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of *Trypanosomatids*. I : Standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75, 5 : 742-750.
- LANOTTE (G.), RIOUX (J. A.), MAZOUN (R.), PASTEUR (N.), PRATLONG (F.) et LEPART (J.), 1981. — Application de la méthode numérique à la taxonomie du genre *Leishmania* Ross 1903. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien Monde. Utilisation des allozymes. Corrélatifs épidémiologiques et phylétiques. *Ann. Paras. hum. comp.*, 56, 6 : 575-592.
- LEMESRE (J. L.) et TIBAYRENC (M.). — Measurement of the DNA quantity among different isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi*. Inferences on the ploidy of these strains. *Exp. Parasitol.*, à paraître.
- MAZOUN (R.), LANOTTE (G.), RIOUX (J. A.), PASTEUR (N.), KILICK-KENDRICK (R.) et PRATLONG (F.), 1981. — Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanies. A propos de trois souches hétérozygotes de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 et *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973. *Aun. Parasit. humol. comp.*, 56, 5 : 467-475.
- MILES (M. A.), TOYES (P. J.), OSWALD (S. C.) et GODFREY (D. G.), 1977. — The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 3 : 217-225.
- MILES (M. A.), LANHAM (S. M.), DE SOUZA (A. A.) et POVOA (M.), 1980. — Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 2 : 221-237.
- MILES (M. A.), POVOA (M.), DE SOUZA (A. A.), LAINSON (R.), SHAW (J. J.) et KETTERIDGE (D. S.), 1981 a. — Chagas' disease in the Amazon basin. II : the distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, North Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75, 5 : 667-674.
- MILES (M. A.), POVOA (M.), PRATA (A.), CEDILLOS (R. A.), DE SOUZA (A. A.) et MACEDO (V.), 1981 b. — Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease ? *The Lancet*, June 20 : 1338-1340.
- NEI (M.), 1972. — Genetic distances between populations. *Amer. Natural.*, 106 : 283-292.
- NEI (M.), 1975. — Molecular population Genetics and Evolution. American Elsevier Publ. Comp., New York.
- NINIO (J.), 1979. — Approches moléculaires de l'Évolution. Masson Éd., Paris.
- READY (P. D.) et MILES (M. A.), 1980. — Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 2 : 238-242.
- SHAW (C. R.) et PRASAD (R.), 1970. — Starch gel electrophoresis : a compilation of recipes. *Biochem. Genetics*, 4 : 297-320.
- TAIT (A.), 1980. — Evidence for mating and diploidy in *Trypanosomes*. *Nature*, 287 : 536-537.
- TIBAYRENC (M.), 1980. — Application of the calculations of genetic distances for Flagellate Systematics. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, vol. XVIII, n° 3 : 301-302.
- TIBAYRENC (M.), 1982. — Considérations sur les propriétés immunologiques des enzymes de parasites (en particulier *Trypanosoma cruzi*) et sur leurs applications pos-

Sept nouveaux variants isoenzymatiques de *T. cruzi* en Bolivie

- sibles. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XX, n° 4 : 319-320.
- TIBAYRENC (M.), CARIOU (M. L.) et SOLIGNAC (M.), 1981 a. — Interprétation génétique des zymogrammes de flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 292 : 623-625.
- TIBAYRENC (M.), CARIOU (M. L.), SOLIGNAC (M.) et CARLIER (Y.), 1981 b. — Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*. Implications taxinomiques. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 293 : 207-209.
- TIBAYRENC (M.) et DESJEUX (P.), 1982. — The presence in Bolivia of two distinct zymodemes of *Trypanosoma cruzi*, circulating sympatrically in a domestic transmission cycle. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, sous presse.
- TIBAYRENC (M.), ECHALAR (L.) et DESJEUX (P.), 1982. — Une méthode simple pour obtenir directement des isolats de *Trypanosoma cruzi* à partir du tube digestif du Triatome vecteur. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XX, n° 3 : 187-188.
- TIBAYRENC (M.), ECHALAR (L.) et DESJEUX (P.). — The microrepartition of *Trypanosoma cruzi* isoenzymic strains in Southern Bolivia; presence of three new variants; further arguments against actual mating in *T. cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, soumis pour publication.
- TIBAYRENC (M.) et MILES (M. A.), 1982. — A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, sous presse.
- WILSON (A. C.), CARLSON (S. S.) et WHITE (T. J.), 1977. — Biochemical Evolution. *Ann. Rev. Biochem.*, 46 : 573-639.

ANNEXE

Les quantités indiquées donnent 100 ml de solution de révélation = 10 doses si l'on utilise des plaques d'acétate de cellulose pour 12 échantillons (Helena n° 3024) ou 20 doses si l'on se sert de plaques à 8 échantillons (Helena n° 3000). Toutes les migrations se font à 200 volts pendant 30 minutes.

Tampons de migration :

- 1 = n° 3 Lanham *et al.*, 1981
 - 2 = n° III Shaw et Prasad, 1970
 - 3 = n° 4 Lanham *et al.*, 1981
 - 4 = HR Helena dilué à 750 ml + 1mM MgCl²
 - 5 = n° II Shaw et Prasad, 1970
- Tous tampons additionnés de 20 % de sucrose.

Les plaques d'acétate sont imbibées dans le tampon de migration pendant 20 mn avant le dépôt des échantillons. Pour GPI et 6GP, on emploie pour cela le tampon de migration dilué au 1/14.

Tampons de révélation :

- A = C Lanham *et al.*, 1981
- B = E Lanham *et al.*, 1981
- C = B Lanham *et al.*, 1981
- D = I Miles *et al.*, 1980
- E = Tris maleate PH 6,0 (Shaw et Prasad, 1970)
- F = Tris 0,05M Glutamic acid 0,1M ajusté à pH 7,0.

(1) Pour 1 dose : NBT (10 mg/ml) : 500 µl ; PMS (10 mg/ml) : 360 µl (plaques à 12 échantillons ; pour plaques à 8 échantillons, diminuer de moitié). Ajouter juste avant emploi.

(2) Pour 1 dose (plaques à 12 échantillons) : 2 mg dans 75 µl éthanol. Ajouter juste avant emploi.

(3) Pour 1 dose (plaques à 12 échantillons) : 5 mg. Ajouter juste avant emploi.

(4) Quantité pour 1 dose (plaques à 12 échantillons). Ajouter juste avant emploi.

Tous réactifs obtenus de Sigma Ltd. N° de catalogue : NADP N5755 ; NAD N7004 ; G6PD G8878 ; L Aminoacid oxidase A9253 ; Peroxidase P8125 ; Glucose 1P G1259 ; DL Isocitric acid I1252 ; Fructose 6P F3627 ; 6 Phosphogluconic acid P7877 ; D Glucose 6P G7879 ; Leucyl leucyl leucine L0879 ; L Leucyl β Naphthylamide L0376 ; L Glutamic acid G1626 ; DL Malic acid M0875 ; NBT N6876 ; PMS P9625 ; 3 Amino 9 Ethylcarbazole A5754 ; Fast black K salt F7253.

Pour la révélation, on mêle 10 ml de solution de révélation (plaques à 12 places) à 10 ml agarose 1,2 % à 60°, et on coule en boîtes de Pétri en plastique.