

UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

Discipline : Génétique de population  
Formation Doctorale : Biologie de l'évolution et l'écologie  
Ecole Doctorale : Biologie Integrative

Présentée et soutenue publiquement

Par  
**Jenny TELLERIA**

Le 18 décembre 2003

Titre :

**Analyse phylogénique intraspécifique de *Trypanosoma cruzi* par étude des séquences codantes exprimées et des séquences hypervariables des minicercles de l'ADN kinétoplastique. Implications sur le taux d'évolution clonale et de recombinaison génétique du parasite.**

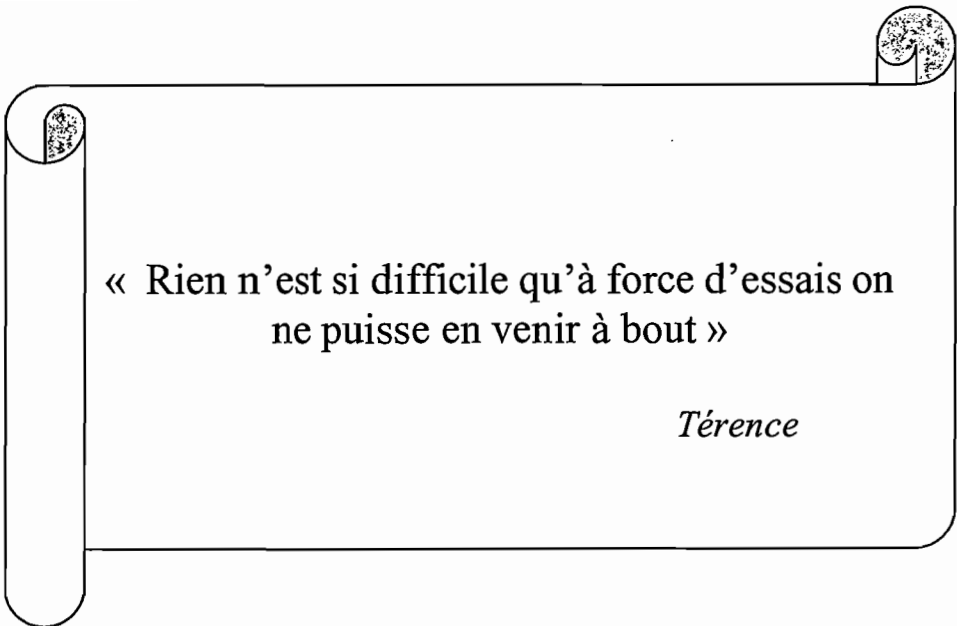
**JURY**

M. Michal Svoboda	Directeur de Recherche Université Libre de Bruxelles	Rapporteur
M. André Théron	Directeur de Recherche Université de Perpignan	Rapporteur
M. Bernard Godelle	Professeur Université Montpellier II	Examinateur
Mme. Frédérique Bréniere	Chargé de Recherche IRD	Examinatrice
M. Michel Tibayrenc	Directeur de Recherche IRD	Directeur de Thèse

*A Yelitza.....*

*A Favio.....*

*A mes parents Jaime et Carmen*



« Rien n'est si difficile qu'à force d'essais on  
ne puisse en venir à bout »

*Térence*

## **Remerciements**

*Je voudrais exprimer ma profonde gratitude au Dr. Michel Tibayrenc qui a exercé la difficile fonction de directeur de thèse et m'a offert l'opportunité de réaliser ce travail au sein de son laboratoire. Tout au long de ces quatre dernières années il m'a encouragée et aidée, non seulement par sa remarquable expérience scientifique mais également par son soutien constant. Je le remercie pour sa grande patience et son amitié. Qu'il reçoive toute ma gratitude et mon plus profond respect.*

*Je suis également très reconnaissante au Dr. Michal Svoboda pour l'immense aide qu'il m'a accordée, sa constante disponibilité, et pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail. Je le remercie pour sa contribution à la réalisation de ce travail de par sa grande expérience et sa générosité, ainsi que pour ses encouragements.. Il a constitué une aide très précieuse, pour cela, qu'il soit assuré de ma reconnaissance et mon amitié.*

*Je dois naturellement remercier Christian Barnabé pour sa gentillesse et sa constante disponibilité. Il m'a enseignée de nombreux éléments indispensables pour réaliser ce travail, et m'a toujours aidée d'une manière ou d'une autre. C'est un plaisir pour moi de lui faire part de ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie le Dr. Bénédicte Lafay pour m'avoir apporté son aide dans les moments de plus grande d'incertitude, avec sa patience et son expérience. Je la remercie pour ses encouragements, son optimisme, son ouverture d'esprit et son ouverture vers les autres, et bien sûr pour sa grande amitié (...et pour les cafés !).*

*Je tiens également à remercier Malorie Hide et le Dr. Anne-Laure Bañuls qui m'ont initiée à la technique de RADES, et on pris la peine de s'occuper de moi à mon arrivée à Montpellier.*

*Je remercie les membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et consacré du temps à la lecture de ce manuscrit. Je remercie particulièrement le Dr. Frédérique Brenière avec qui j'ai effectué mes premiers pas dans la recherche et qui, aujourd'hui, fait partie de ce jury.*

*Je remercie toute le personnels de l'UMR 9926 pour m'avoir entourée lors de mes premiers pas en France, ainsi que pour leur disponibilité et leur patience face à mes difficultés vis à vis de la langue dans les moments où j'en avais le plus besoin. Je remercie particulièrement Mme Nadine Maury, la secrétaire de notre unité.*

*Je ne peux pas oublier la sincère amitié et les efforts de Philippe Boussès pour essayer de me corriger mon « mœauvais français », ainsi que Eric Delacour pour avoir « jeté un œil » sur une partie de ce manuscrit.*

*J'exprime aussi ma reconnaissance à Myrna Virreira pour sa gentillesse et sa bonne volonté.*

*Je ne saurais oublier de remercier mon époux Favio pour m'avoir aidée à la réalisation de figures ainsi que pour le soutien moral et l'amour qu'il m'a apportée au cours de cette dernière période (¡Gracias !).*

*J'ai été rétribuée pendant cette thèse, d'abord par une bourse du programme européen ALFA, puis par une allocation de recherche de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Je remercie ces organisations pour leur précieux soutien.*

*Cette liste de personnes n'est pas exhaustive, loin de là, et je ne peux y mettre fin sans citer, bien sûr , celles et ceux de la population française qui m'ont accueillie dans cette région, et m'ont offert très spontanément leur hospitalité.*

*Montpellier, 1 novembre 2003*

## Table des matières

Résumé	
Abstract	
Introduction.....	1
<b>Généralités</b>	
1. La maladie de Chagas.....	3
1.1. Historique.....	3
1.2. Epidémiologie.....	4
1.2.1. Cultures précolombiennes.....	4
1.2.2. Importance de la maladie de Chagas.....	5
1.2.3. Répartition géographique en Amérique.....	5
1.3. Description de la «Maladie de Chagas».....	7
1.3.1. Phase aiguë.....	7
1.3.2. Phase indéterminée.....	7
1.3.3. Phase chronique.....	8
1.3.3.1. Pathologie cardiaque.....	8
1.3.3.2. Pathologie digestive.....	8
1.3.3.3. Pathologies neurologique et congénitale.....	9
1.3.4. Pathogénie.....	9
1.4. Diagnostic.....	10
1.4.1. En phase aiguë.....	10
1.4.2. En phase chronique.....	10
1.5. Thérapeutique.....	11
1.6. Formes de transmission.....	12
1.6.1. Transmission vectorielle.....	12
1.6.2. Transmission transfusionnelle.....	12
1.6.3. Transmission congénitale.....	13
1.7. Les vecteurs.....	13
1.7.1. Taxinomie et critères de différenciation.....	13
1.7.2. Comportement et répartition.....	14
1.8. Réservoirs.....	16
1.9. Méthodes de lutte contre la maladie de Chagas.....	19
2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	20
2.1. Taxinomie.....	20
2.2. Organisation cellulaire.....	22
2.2.1. Le flagelle.....	24
2.2.2. Les corps basaux.....	24
2.2.3. Les microtubules sous-pelliculaires.....	25
2.2.4. Le kinétoplaste.....	25
2.3. Formes cellulaires.....	27
2.3.1. Les trypomastigotes.....	27
2.3.2. Les amastigotes.....	29
2.3.3. Les epimastigotes.....	29
2.4. Le cycle biologique.....	29

2.5. Métabolisme.....	31
2.6. Le génome de <i>T. cruzi</i> .....	32
2.6.1. Génome nucléaire.....	32
2.6.1.1. Caryotype.....	32
2.6.1.2. Structure.....	32
2.6.1.3. Gènes codant les ARN ribosomaux.....	34
2.6.1.4. Mini-exon.....	34
2.6.2. Génome kinetoplastique.....	37
2.6.2.1. Les maxicercles.....	37
2.6.2.2. Les minicercles.....	37
2.6.2.3. Rôle : Edition des ARNm.....	37
2.6.3. Le cycle cellulaire.....	40
3. Polymorphisme et biodiversité de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	41
3.1. Polymorphisme biologique de <i>T. cruzi</i> .....	41
3.1.1. Tropicisme tissulaire.....	41
3.1.2. Pathogénicité.....	41
3.1.3. Virulence.....	42
3.1.4. Sensibilité aux médicaments.....	42
3.2. Populations naturelles de <i>T. cruzi</i> .....	43
3.2.1. Polymorphisme génétique.....	43
3.2.2. Variabilité génétique de <i>T. cruzi</i> .....	43
3.2.2.1. Multilocus Enzyme Electrophoreses (MLEE).....	43
3.2.2.2. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP).....	44
3.2.2.3. Polymorphisme caryotypique.....	44
3.2.2.4. Amplification de l'ADN par amorces aléatoires on random amplified polymorphic ADN (RAPD).....	45
3.2.2.5. Microsatellites.....	46
3.2.3. Structure de populations naturelles de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	46
3.3. Conséquences de la variabilité génétique sur des propriétés biologiques.....	50

**Chapitre I :           Analyse du polymorphisme des gènes exprimés chez  
Trypanosoma cruzi par la technique RADES**

1. Introduction.....	52
2. Matériel et méthodes.....	53
2.1. Stocks de <i>T. cruzi</i> .....	53
2.2. Culture de parasites in vitro.....	55
2.2.1. Epimastigotes.....	55
2.2.1.1. Comptage parasitaire.....	55
2.2.2. Trypomastigotes.....	56
2.2.3. Cryoconservation.....	57
2.3. Contrôle du génotype.....	57
2.3.1. Electrophorèse des isoenzymes.....	57
2.3.1.1. Préparation des extraits enzymatiques.....	57
2.3.1.2. La migration.....	58
2.3.1.3. La révélation.....	58
2.4. Technique de Random Amplified Differentially Expressed Sequences (RADES)	58

2.4.1. Principe.....	58
2.4.2. Extraction de l'ARN messenger.....	59
2.4.2.1. Dosage d'ARNm.....	59
2.4.3. Préparation de l'ADNc.....	60
2.4.3.1. Rétrotranscription.....	60
2.4.3.2. Purification de l'ADN complémentaire (ADNc) .....	60
2.4.3.3. Amplification de l'ADNc.....	62
2.5. Technique d'amplification aléatoire de l'ADN : RAPD.....	63
2.5.1. Principe.....	63
2.5.2. Extraction de l'ADN .....	63
2.5.2.1. Lyse cellulaire.....	63
2.5.2.2. Déprotéinisation.....	63
2.5.3. Précipitation de l'ADN.....	63
2.5.4. Amplification aléatoire de l'ADN.....	64
2.5.4.1. Thermocyclage.....	64
2.5.4.2. Migration et révélation.....	64
2.5.4.3. Interprétation des bandes.....	64
2.6. Clonage de fragments synapomorphes spécifiques de DTU.....	65
2.6.1. Purification d'ADN a partir de bandes synapomorphes.....	65
2.6.2. Ligation.....	65
2.6.3. Transformation.....	66
2.6.4. Minipréparations.....	66
2.6.5. Digestion enzymatique.....	66
2.6.6. Séquençage .....	66
2.7. Méthode d'analyse .....	67
2.7.1. Indices de la variabilité génétique.....	67
2.7.1.1. Taux de polymorphisme.....	67
2.7.1.2. Diversité génétique moyenne.....	67
2.7.1.3. Indice de diversité génotypique.....	68
2.7.2. Analyses phylogénétiques.....	69
2.7.2.1 Méthodes phénétiques .....	69
2.7.2.2. Distance génétique de Jaccard .....	69
2.7.2.3. Méthodes d'agglomérations.....	70
2.7.2.4. Méthode de « bootstrap » .....	71
2.7.3. Méthode d'analyse de génétique des populations : .....	72
2.7.3.1. La génétique des populations.....	72
2.7.3.2. Test de corrélation de Mantel ou test « G » .....	72
3. Résultats.....	73
3.1. Polymorphisme isoenzymatique.....	73
3.1.1. Profils isoenzymatiques.....	73
3.2. Polymorphisme de l'ADN génomique.....	76
3.2.1. Profils de RAPD.....	76
3.2.2. Analyses de profils RAPD.....	78
3.3. Polymorphisme de l'ARNm.....	82
3.3.1. Profils de RADES.....	82
3.3.2. Analyses par RADES.....	83
3.4. Trypomastigotes.....	88
3.5. Séquences spécifiques de DTU.....	89
3.6. Recherche protéique des séquences.....	93

3.7. Polymorphisme comparée entre RAPD/RADES .....	94
3.7.1 Profils RAPD/RADES .....	94
3.7.2. Analyses RAPD/RADES.....	95
4. Discussion.....	98

## **Chapitre II : Variabilité du génome kinétoplastique**

1. Introduction.....	101
2. Matériel et Méthodes.....	102
2.1. Stocks de <i>T. cruzi</i> .....	102
2.2. Culture de parasites in vitro.....	104
2.3. Contrôle du génotype.....	104
2.4. Extraction de l'ADN total.....	104
2.5. Amplification de fragments d'ADNk par la technique PCR (Polymerase Chain Réaction) .....	104
2.5.1. Thermocyclage.....	104
2.5.2. Electrophorèse en gel d'agarose.....	106
2.6. Clonage des fragments de la région variable de l'ADNk.....	106
2.6.1. Principe.....	106
2.6.2. Clonage des amplicons.....	106
2.6.2.1. Ligation .....	106
2.6.2.2. Transformation.....	107
2.6.2.3. Minipréparation.....	107
2.6.3. Digestion enzymatique.....	108
2.7. Séquençage de l'ADN.....	108
2.8. Hybridations moléculaires.....	108
2.8.1. Préparation des sondes ADNk.....	108
2.8.2. Préparation des membranes .....	108
2.8.3. Hybridation.....	111
2.8.3.1. Pré-hybridation.....	111
2.8.3.2. Hybridation.....	111
2.8.3.3. Lavage des membranes.....	111
2.8.3.4. Détection de la sonde et révélation.....	111
2.9. Méthode d'analyse.....	112
2.9.1. Alignement des séquences.....	112
2.9.2. Recherche de similarité par « Blast » .....	112
3. Résultats.....	113
3.1. Stocks étudiés.....	113
3.2. Polymorphisme isoenzymatique.....	113
3.3. Amplification par PCR de l'ADNk.....	115
3.3.1. Sélection d'amorces.....	115
3.3.2. Profils d'amplification.....	115
3.3.3. Sensibilité et spécificité .....	116
3.4. Séquences complètes des minicercles de l'ADNk.....	118
3.5. Hybridation avec des sondes .....	122
3.6. Analyses des régions variables des minicercles de l'ADNk.....	123
3.7. Analyse de la diversité des séquences des régions variables d'ADNk.....	126
4. Discussion.....	132

<i>Conclusion générale</i> .....	135
<i>Bibliographie</i> .....	138
<i>Annexes</i> .....	160
<i>Articles :</i>	

## *Résumé*

### **Analyse phylogénique intraspécifique de *Trypanosoma cruzi* par étude des séquences codantes exprimées et des séquences hypervariables des minicercles de l'ADN kinétoplastique. Implications sur le taux d'évolution clonale et de recombinaison génétique du parasite.**

Les populations naturelles de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, présentent un déséquilibre de liaison considérable, vérifié pour de nombreux marqueurs génétiques (isoenzymes, RAPD, RFLP, microsatellites). Ceci a permis de postuler que ce parasite subit une évolution clonale prépondérante, avec recombinaison génétique rare. Cependant, ce modèle a été remis en question par la découverte d'hybrides naturels et par l'obtention d'hybrides expérimentaux.

Dans le cadre de ce débat, nous avons mené deux analyses complémentaires de la diversité génétique de *T. cruzi*, sur un échantillonnage de souches représentatives de cette diversité.

Nous avons d'abord étudié le polymorphisme des séquences codantes exprimées, par purification des ARN messagers et amplification aléatoire des ADN-copie correspondants (RADES). Nous avons trouvé une corrélation statistique très forte entre les distances génétiques RADES et celles basées sur les isoenzymes ou les RAPD. Cette corrélation a été vérifiée visuellement par le fait que les arbres phylogénétiques RADES étaient très similaires aux arbres basés sur les autres techniques. Ceci montre que l'évolution clonale est suffisamment prépondérante pour imprimer sa marque pour la grande majorité des séquences du génome du parasite, y compris les séquences codantes exprimées, qui sont cependant soumises à sélection naturelle. Nous avons mis en évidence plusieurs séquences codantes exprimées spécifiques de l'espèce, de ses subdivisions génétiques et de ses stades (épimastigotes, trypomastigotes, amastigotes). Ces séquences seront analysées en détail.

Nous avons ensuite séquencé les parties variables des minicercles de l'ADN kinétoplastique. Les phylogénies obtenues étaient hautement incohérentes. Ceci peut s'expliquer: soit parce que notre sondage était insuffisant pour mettre en exergue les séquences majoritaires, soit du fait de la recombinaison génétique, soit pour les deux raisons combinées. Cette analyse sera poursuivie avec des échantillons plus forts.

**Mots clés :** Evolution clonale, recombinaison, séquence codante exprimée, sélection naturelle, génome mitochondrial.

## *Abstract*

### **Subspecific phylogenetic analysis of *Trypanosoma cruzi* by studying coding expressed sequences and hypervariable sequences of kinetoplast DNA minicircles. Implications on this parasite's rate of clonal evolution and genetic recombination.**

Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, exhibit a considerable linkage disequilibrium, verified with many genetic markers (isoenzymes, RAPD, RFLP, microsatellites). This led to postulate that this parasites undergoes predominant clonal evolution with rare recombination events. However, this model has been challenged by the discovery of natural hybrids and the obtention of experimental hybrids.

In the framework of this debate, we have performed two complementary analyses of *T. cruzi* genetic diversity on a sample of strains representative of this diversity.

We have first studied the polymorphism of coding expressed sequences by purifying messenger RNAs and random amplification of the corresponding copy dans. We have found a very strong statistical correlation between RADES genetic distances and those based on isoenzymes and RAPD. This correlation has been visually verified by the fact taht the RADES phylogenetic trees were very similar to those based on the other techniques. This shows that clonal evolution is preponderant enough to carve its print on the vast majority of the sequences of this parasite's genome., including expressed coding sequences, although they undergo natural selection. We have evidenced several coding expressed sequences specific of the species, of its genetic subdivisions and of its stages (epimastigotes, trypomastigotes, amastigotes). These sequences will be analyzed in details.

We have then sequenced the variable parts of kinetoplast DNA minicircle. The obtained phylogenies were highly incoherent. This can be explained either because our sample was not sufficient enough to reveal the dominant sequences or because of genetic recombination or both reasons. This analysis will be continued with broader samples.

**Key words :** Clonal evolution, recombination coding expressed sequence, natural selection, mitochondrial genome.

## Introduction

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine est une antroponose, dont l'agent causal a été découvert par Carlos Chagas en 1909. Elle est provoquée par le protozoaire flagellé *Trypanosoma cruzi*. Ce micro-organisme est transmis à l'homme par des insectes vecteurs hématophages (hémiptères Réduvidés). Les trois plus importantes espèces vectrices du point de vue épidémiologique, appartiennent aux genres *Panstrongylus*, *Rhodnius* et *Triatoma*. Dans le genre *Triatoma*, le vecteur principal « *Triatoma infestans* » est extrêmement répandu en Amérique du Sud. Il est responsable de plus de la moitié des infections humaines car il est presque exclusivement domestique. De nombreux mammifères domestiques ou sauvages constituent le réservoir du parasite.

Cette maladie constitue un problème considérable de santé publique en Amérique Latine où 18 à 20 millions d'habitants souffrent de la maladie et où 90 millions de personnes sont potentiellement exposées à l'infection. En effet, l'infection est endémique et répandue sur des faciès géographiques et climatologiques très diversifiés. Du fait de son aire d'expansion importante, elle constitue une menace épidémiologique et par conséquent, un obstacle majeur au développement socio-économique des régions infestées.

La Maladie de Chagas comporte trois phases cliniques :

- une phase aiguë, caractérisée par une parasitémie patente ;
- une phase indéterminée caractérisée par la présence d'anticorps anti-*T. cruzi*, qui, chez certains patients, (60 à 70 %), dure toute la vie, avec absence de symptômes cliniques.
- une phase chronique, qui évolue sur 10 à 30 ans après la contamination. Les formes cliniques peuvent être cardiaques (cardiopathie chronique chagastique) ou digestives (mégacœsophage ou mégacôlon chagastiques).

Le déterminisme de l'évolution de la maladie vers les différentes formes cliniques n'est pas élucidé. *T. cruzi* présente chez les populations naturelles un polymorphisme génétique considérable, dont le rôle a été suspecté dans le déterminisme du polymorphisme clinique de la maladie. On pense plus généralement que ce polymorphisme génétique pourrait avoir un rôle notable ou important sur toutes les propriétés médicalement importantes du parasite,

comme sa sensibilité aux drogues anti-chagasiques, ou sa transmissibilité par les diverses espèces d'insectes vecteurs.

Dans le polymorphisme clinique de la maladie, les facteurs génétiques de l'hôte et les facteurs environnementaux (nutrition par exemple) jouent certainement un rôle. Mais pour mieux étudier cette question, il importe de cerner parfaitement ce qui est imputable à l'agent pathogène, d'où ma nécessité, non seulement d'avoir une connaissance approfondie du polymorphisme génétique de *T. cruzi* et de ses modalités d'apparition.

Le présent travail s'inscrit dans le domaine d'excellence du laboratoire, qui est la génétique évolutive des agents pathogènes. *Trypanosoma cruzi* est le modèle infectieux qui a été le plus approfondi dans notre laboratoire d'accueil. Notre étude reprend l'hypothèse de travail (évolution clonale prépondérante de *T. cruzi*), en considérant deux approches nouvelles:

(a) l'impact de l'évolution clonale sur le polymorphisme de gènes codants exprimés, par la technique de RADES (produit de l'expression génique à partir de l'ARNm).

(b) la comparaison entre phylogénies basées sur le polymorphisme de gènes nucléaires d'une part, et la diversité des régions variables des minicercles de l'ADN de kinétoplastique (ADNk) d'autre part.

En effet, le modèle clonal chez *T. cruzi* fait toujours l'objet de vifs débats, qui ont été récemment stimulés par la découverte de lignées hybrides dans les populations naturelles du parasite (Bogliolo *et al.*, 1996 ; Carrasco *et al.*, 1996 ; Machado & Ayala, 2001 ; Brisse *et al.*, 2003) et par l'obtention de recombinants génétiques expérimentaux, montrant que la potentialité d'échanges génétiques existe toujours chez l'agent de la maladie de Chagas (Gaunt *et al.*, 2003)

Ces nouvelles données reposent le problème de l'impact respectif de l'évolution clonale et des échanges génétiques chez *T. cruzi*. Le présent travail apporte des éléments à cette question avec les approches nouvelles exposées ci-dessus.

# Généralités

## 1 La maladie de Chagas

### 1.1 Historique

Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), scientifique brésilien, fondateur du premier Institut de Recherche en Maladies Tropicales du Brésil, s'est investi dès 1903 dans la recherche sur le paludisme, et fut chargé, en 1909, d'y combattre une épidémie de paludisme qui décimait un grand nombre d'ouvriers employés à la construction de la ligne de chemin de fer Rio de Janeiro-Belem do Para. Puis, Carlos Chagas s'installa dans une localité appelée Lassance, située dans la région supérieure de l'état de Minas Gerais. Pendant son séjour, il a noté la présence constante d'insectes hématophages qui pullulaient dans les habitations, insalubres, insectes surnommés « barbeiros » par les colons. Ces insectes furent identifiés comme appartenant à l'espèce *Panstrongylus megistus* (Hemiptera : Reduviidae, Triatominae). Carlos Chagas s'est alors intéressé à la biologie de ces insectes hématophages.

C'est dans l'intestin de cet insecte qu'il découvrit, dans son laboratoire de fortune installé dans un wagon de chemin de fer, des micro-organismes flagellés. Il nomma ce nouveau micro-organisme *Trypanosoma cruzi* en l'honneur de son collaborateur, le professeur Oswaldo Cruz (1871-1917).

Par la suite, Carlos Chagas a retrouvé ce même parasite dans le sang d'une petite fille de 2 ans, souffrant de fièvre et présentant des adénopathies et une anémie. Ce fut le premier cas décrit de la maladie, qui portera son nom, « Maladie de Chagas ». Poursuivant ses investigations, Carlos Chagas constata que ce même micro-organisme était présent dans le sang de divers animaux domestiques.

En 1911, il écrit le « Nova Trypanosomiase humaine » dans les mémoires de l'Institut Oswaldo Cruz » où il décrit pour la première fois la voie de transmission et les phases aiguës et chroniques de cette maladie.

Ainsi l'œuvre de Chagas est unique et exceptionnelle dans l'histoire de la médecine du fait qu'un seul homme a pu appréhender pratiquement tous les aspects d'une infection : le cycle de la maladie, l'agent étiologique, les hôtes infectés ainsi que les insectes vecteurs. De plus, il découvrit le parasite chez le vecteur avant la maladie elle-même.

En 1939, Salvador Maza décrivit dans le foie des patients chagasiques des nodules lymphocytaires et hystiocytaires . Un autre chercheur, Cecilio Romaña, découvrit un signe particulier de porte d'entrée du parasite, le complexe ophtalmoganglionnaire typique, qui porte son nom. (Romaña, 1935). La découverte de ce signe a permis la détection de milliers de nouveaux cas de la maladie sur l'ensemble du continent sud-américain.

## **1.2 Epidémiologie**

### **1.2.1 Cultures précolombiennes**

Des arguments paléoparasitologiques et linguistiques suggèrent que la domiciliation du Triatome et la transmission de *T. cruzi* à l'homme sont apparues à l'époque précolombienne dans certaines régions andines. L'infection a été détectée chez des momies péruviennes et chiliennes de 500 à plus de 4000 ans d'âge (Guhl *et al.*, 1999).

Le principal vecteur domestique de la maladie de Chagas, *Triatoma infestans*, n'est rencontré à l'état sauvage que dans les vallées de Bolivie. L'infection humaine serait donc possiblement apparue dans ce pays. En effet, dans cette région, la population quechua a l'habitude de capturer des cobayes sauvages pour les élever et les consommer, ce qui aurait progressivement entraîné la domiciliation du vecteur. Puis, les migrations de populations humaines, notamment pendant l'empire Inca, emportant leurs objets et leurs biens auraient ensuite dispersé *Triatoma infestans* et l'infection humaine à travers l'Amérique latine (Carlier *et al.*, 2002) : les chroniques espagnoles des XVI<sup>e</sup> et XVII<sup>e</sup> siècles donnent déjà des descriptions de la maladie et font référence au triatome domestique. Cependant, il semble que la principale expansion de la maladie humaine ait eu lieu durant le XIX<sup>e</sup> ème et le début du XX<sup>e</sup> ème siècle (Carlier *et al.*, 2002)

### **1.2.2 Importance de la maladie de Chagas**

En 1960, l'Organisation Mondiale de la Santé estimait que 35 millions d'individus environ étaient exposés au risque d'infection par *Trypanosoma cruzi*. Le taux d'infection

après enquêtes épidémiologiques effectuées sur le terrain, était en moyenne de 20%, c'est-à-dire que 7 millions de personnes souffraient de la maladie. A cette époque, la plupart des responsables des pouvoirs publics accordaient peu d'intérêt à cette épidémie. Elle se propageait dans presque tous les pays d'Amérique Centrale et du Sud, mais restait cantonnée dans les villages et les quartiers périphériques des villes.

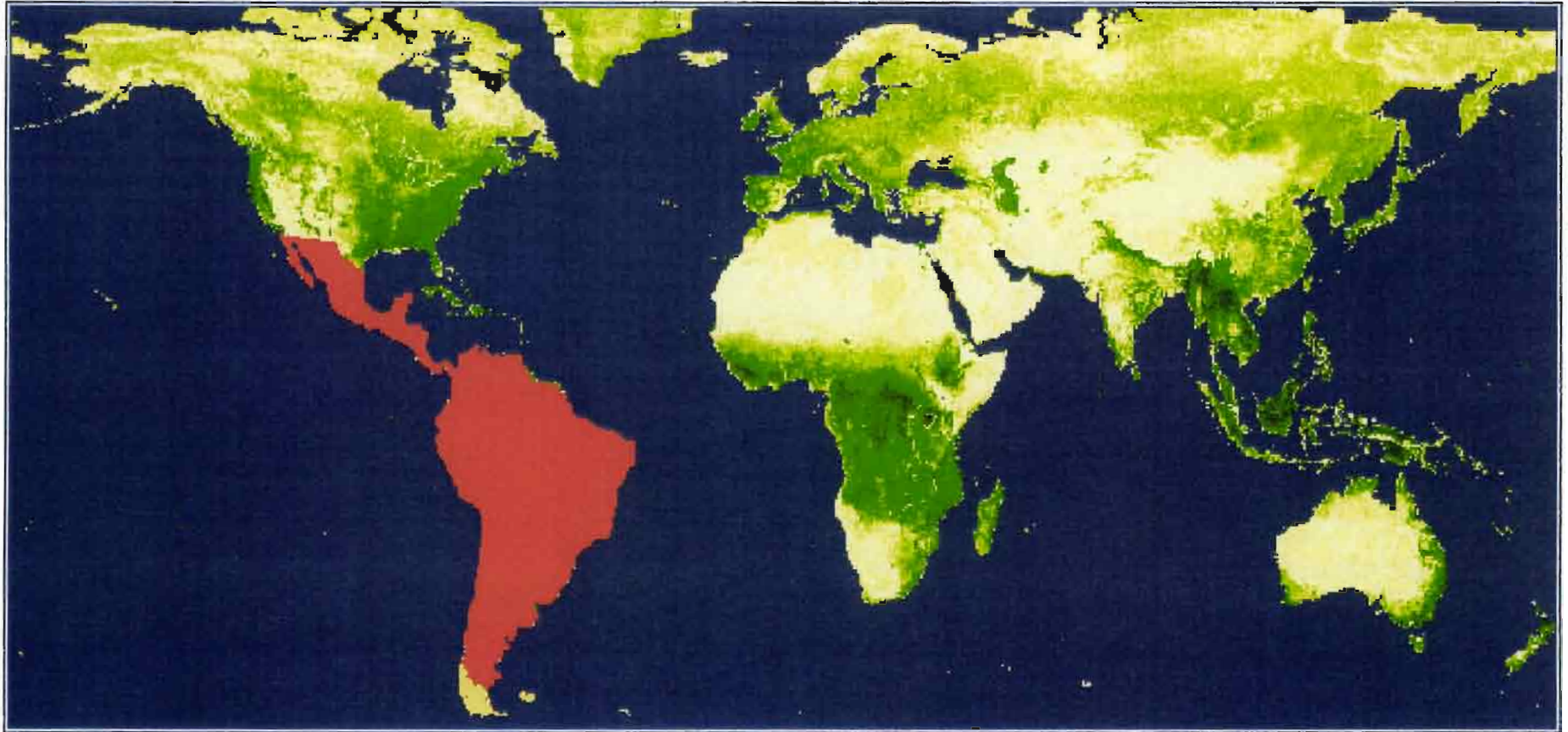
Des données plus récentes de l'OMS (1991) indiquent que la maladie de Chagas est une endémie qui sévit sur une population évaluée à 360 millions d'habitants, dont 25% sont potentiellement exposés, soit 90 millions d'habitants, 18 millions d'entre eux étant effectivement parasités ; environ 17 à 25 % de la population d'Amérique latine est exposée au risque d'infection. La population des villes est également confrontée à la maladie.

En 1993, la maladie de Chagas était considérée par l'OMS et la Banque Mondiale comme la quatrième maladie transmissible (après les infections respiratoires aiguës, les diarrhées, et l'infection par le virus d'immunodéficience humaine (HIV)) ayant un impact majeur sur la santé publique en Amérique latine. Le coût médical et l'impact économique de la maladie de Chagas sont très élevés. Il a ainsi été estimé qu'environ 2.74 millions d'années potentielles de vie active sont perdues suite aux incapacités et à la mortalité liées à la maladie en Amérique latine, pour un coût annuel estimé à 20 milliards d'euros (Carlier *et al.*, 2002).

### **1.2.3 Répartition géographique en Amérique**

La Maladie de Chagas est un problème majeur de santé publique. La parasitose est présente à l'état endémique sur la plus grande partie du continent sud-américain (fig.1). En effet, l'infection s'est progressivement étendue à la plupart des pays de l'Amérique du sud, et d'Amérique centrale. Elle atteint actuellement le Mexique, et les insectes vecteurs infestés par *T. cruzi* ont été identifiés jusque dans les états du sud des Etats-Unis. En effet, l'aire d'extension des trypanosomes chez l'animal et les vecteurs dépasse largement celle de la maladie humaine, ce qui représente une menace épidémiologique.

La Maladie de Chagas touche des faciès géographiques et climatologiques très diversifiés. Dans les climats chauds, la transmission de l'infection s'opère tout au long de l'année. Dans les régions tempérées, elle se produit presque exclusivement au cours de la moitié chaude de l'année. L'altitude modifie aussi la transmission du parasite, les triatomes ne pouvant s'acclimater au dessus de 3500 m (record d'altitude enregistré en Bolivie).



Foyers d'expansion

Figure 1: Répartition géographique en Amérique

Du point de vue social, la maladie de Chagas est originaire des zones rurales mais la maladie a tendance à sévir aussi dans les zones urbaines et périurbaines. Un accroissement du risque de la transmission est dû à la migration rurale vers les villes, où les migrants s'entassent dans les bidonvilles de la périphérie dépourvus de l'hygiène la plus élémentaire.

### **1.3 Description de la Maladie de Chagas**

Chez l'homme, la maladie présente trois phases, une phase aiguë de courte durée, une phase asymptomatique appelée phase indéterminée et une phase chronique qui est inconstante (OMS/OPS, 1991).

#### **1.3.1 Phase aiguë**

Au lieu de pénétration du parasite (porte d'entrée), on observe une réaction inflammatoire locale (chagome) d'intensité variable:

- au niveau de la face (chagome oculaire): œdème palpébral et périoculaire (signe de Romaña),
- au niveau de la peau: aspect furonculoïde et adénopathies.

La période aiguë est caractérisée par l'abondance des trypanosomes dans le sang. La multiplication des formes amastigotes intracellulaires (voir section suivante) a lieu principalement dans les macrophages mais aussi dans les cellules musculaires et gliales.

Cette phase dure 8 à 10 semaines et est accompagnée par :

- des symptômes généraux: fièvre, hépatosplénomégalie, œdèmes généralisés, asthénie, céphalées, myalgies, adénopathies,
- des symptômes locaux: formes œdémateuses, respiratoires, neurologiques (méningo-encéphalite), troubles gastro-intestinaux (anorexie, diarrhée, vomissements), troubles cardiaques (myocardite aiguë).

La forme aiguë peut être totalement asymptomatique, ou avoir une symptomatologie très discrète, ce qui rend le diagnostic difficile.

#### **1.3.2 Phase indéterminée**

Après deux à trois mois, le parasite se raréfie dans le sang, et devient également difficile à détecter dans les cellules. La maladie de Chagas entre alors dans une phase appelée indéterminée. Cette phase est asymptomatique. Elle peut avoir deux issues:

- soit ne pas évoluer, rester latente ;
- soit s'aggraver progressivement, débouchant sur la phase chronique avec symptômes.

Pendant cette phase, d'importantes réactions inflammatoires locales peuvent avoir lieu sous forme d'infiltrats cellulaires polynucléés (myocardite). Une action toxique des granules éosinophiles sur les cellules musculaires cardiaques pourrait être à l'origine des lésions cardiaques observées (Molina and Kierszenbaum, 1989).

La réponse immunologique spécifique est bien développée et la détection de l'infection se fait alors par sérologie ou par xénodiagnostic (on fait piquer le patient par des triatomes non infectés, et on recherche les formes infestantes du parasite dans les fécès de ces triatomes).

### **1.3.3 Phase chronique**

Vingt cinq pour cent des cas environ évoluent vers une forme chronique symptomatique.

Les lésions histologiques causées par la maladie de Chagas sont dues à la destruction des cellules infectées. De plus, pendant cette phase, des lésions nouvelles peuvent apparaître dans d'autres tissus, notamment le cœur et le tube digestif ou au niveau des ganglions nerveux.

Les formes de présentation de la maladie sont variables selon les individus. On estime à 27% les cas de cardiopathies chagasiennes chroniques et 3% les syndromes digestifs.

#### ***1.3.3.1 Pathologie cardiaque***

La pathologie cardiaque est caractérisée par des troubles de la conduction (anomalies de l'électrocardiogramme), une insuffisance cardiaque progressive de fâcheux pronostic et une cardiomégalie. L'apparition de signes cliniques parfois discrets (palpitations précordiales, perte de conscience) ou plus importants (accident thromboembolique chez un sujet jeune, signe de début d'une insuffisance cardiaque bi-ventriculaire) révèle la gravité des lésions qui ont évolué progressivement à bas bruit pendant 10 à 20 ans. A ce stade, les parois ventriculaires sont amincies et un anévrisme de la pointe existe parfois. La mort subite est souvent l'issue de cette pathologie.

#### ***1.3.3.2 Pathologie digestive***

La pathologie digestive est due à une dénervation du plexus mésentérique, ayant comme conséquences la perte de la motricité et le développement à court terme de mégaviscères. Les principaux organes touchés sont l'œsophage et le côlon. Les manifestations cliniques sont principalement:

- dans le cas de mégaœsophage des régurgitations et dysphagies ;
- dans le cas de mégacôlon, de la constipation, des fécalomes et des volvulus.

Les dilatations du côlon peuvent être énormes, d'une capacité de 30 à 40 litres. et d'une longueur de 2 mètres.

### 1.3.3.3 Pathologies neurologique et congénitale

La forme neurologique, qui est rare, touche le système nerveux central, périphérique et végétatif. Les patients peuvent présenter des altérations fonctionnelles du cerveau, des convulsions et des anomalies psychiatriques dues aux conséquences des lésions méningoencéphaliques de la période aiguë.

L'infestation intra-utérine provoque des avortements ou des accouchements prématurés. Dans le cas des nouveau-nés à terme, on trouve une discrète hépatosplénomégalie.

Le déterminisme de l'évolution chronique de la maladie de Chagas n'est pas clairement établi. Le génotype du parasite infectant pourrait être impliqué, comme le suggère la répartition géographique discontinue des incidences des pathologies cardiaques et digestives (Miles *et al.*, 1981). Certains auteurs invoquent également des réactions auto-immunitaires (Cossio *et al.*, 1974; Hudson and Britten, 1985).

### 1.3.4 Pathogénie

Le mécanisme par lequel *T. cruzi* provoque les lésions de la maladie de Chagas est imparfaitement compris. Il peut s'expliquer par un effet direct des amastigotes sur les cellules nerveuses, avec conduction altérée au niveau du myocarde et des organes creux.

Les cellules musculaires détruites laissent la place à du tissu cicatriciel non fonctionnel. Au niveau des neurones, une destruction importante pendant la phase aiguë (réaction inflammatoire) pourrait produire des effets tardifs par désorganisation des fibres.

Il pourrait aussi s'agir d'une réaction auto-immunitaire, s'expliquant par une similitude des antigènes de *T. cruzi* et des tissus de l'hôte ou par un mécanisme qui causerait la couverture des cellules de l'hôte par des antigènes de *T. cruzi*. Dans les deux cas, les anticorps spécifiquement dirigés contre le parasite détruiraient les cellules de l'hôte. En effet, on a pu montrer récemment, à l'aide d'immuns-sérums de cardiopathies chagasiques, que l'épitope « JL5 » d'antigène de *T. cruzi* (peptide constitué d'une séquence de 11 acides aminés) reconnu par les anticorps est identique à une séquence de la protéine « P » ribosomale humaine.

Au niveau du myocarde, une réaction d'hypersensibilité pourrait produire une inflammation chronique par présence de cellules immuno-compétentes, avec composante vasculaire et fibrose, même en l'absence de parasites.

## **1.4 Diagnostic**

Le diagnostic est malaisé du fait de la variabilité clinique de l'affection et de la brève durée de la parasitémie. Le procédé de diagnostic est différent pendant la phase aiguë et pendant la phase chronique.

### **1.4.1 En phase aiguë**

Dans la phase aiguë, étant donnée la fréquence de symptômes discrets ou absents, le diagnostic est très rarement clinique. Donc, le diagnostic se tourne vers la recherche du parasite qui s'effectue sur une goutte de sang. La parasitémie est en général très élevée en phase aiguë, et donc la recherche directe du parasite durant cette phase est la plus pertinente.

Les résultats de cette analyse de sang ont été améliorés par la méthode de micro-centrifugation (LaFuente *et al.*, 1985). Cette technique permet la confirmation de l'identification de parasites par leur morphologie.

### **1.4.2 En phase chronique**

Dans la phase chronique, le diagnostic parasitologique n'est plus adéquat, car le nombre de parasites circulants a fortement diminué (Van Meirvenne and Le Ray, 1985). Une méthode indirecte, anciennement répandue, permet d'isoler le parasite par xénodiagnostic. La méthode consiste à faire prendre un repas sanguin à des triatomés non infectés (stades larvaires L3), directement sur les patients. Si le patient est effectivement contaminé, on peut détecter l'apparition de trypanosomes dans les fèces des insectes. Cette méthode est spécifique mais inconfortable (20 minutes d'attente pour les repas sanguins) et lente (les déjections de la punaise sont examinées après quatre semaines). Elle détecte seulement 50% des cas.

Une autre méthode moins utilisée est l'hémoculture, le sang du malade est inoculé dans des milieux de culture permettant le développement du parasite *in vitro*, mais le pourcentage de détection positive est seulement de 30 à 40% des cas (Chari *et al.*, 1989).

Le diagnostic le plus adéquat de la phase indéterminée ainsi que de la phase chronique, est la sérologie de la réponse immunitaire. Les premiers anticorps qui sont développés durant la phase aiguë sont les IgM, qui apparaissent tout de suite puis décroissent au bout de peu de temps (Wincker *et al.*, 1997). Les IgG sont produites ultérieurement et demeurent constantes tout au long de la maladie. Le dosage de ces dernières permet donc le diagnostic. Parmi toutes les

techniques actuellement utilisées, deux tests sont recommandés, ELISA et immunofluorescence indirecte (Breniere *et al.*, 1987 ; Carrasco *et al.*, 1985). Une protéine recombinante a également été proposée pour améliorer le diagnostic (Vergara *et al.*, 1991).

Les diagnostics avec des méthodes moléculaires deviennent de plus en plus utilisés. Néanmoins, les techniques habituellement utilisées pour la caractérisation sub-spécifique des souches de *T. cruzi* nécessitent une étape obligatoire de multiplication du parasite *in vitro*, ce qui peut occasionner une certaine sélection des génotypes (Tibayrenc *et al.*, 1986, 1993). Plusieurs méthodes ont été proposées pour éviter ces inconvénients (Brisse *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2001). La méthode de Réaction de polymérisation en Chaîne (PCR) présente potentiellement une très grande sensibilité de détection et a été proposée très tôt pour le diagnostic de la maladie en prenant comme cible aussi bien les séquences répétées de l'ADN nucléaire (Sturm *et al.*, 1989; Veas *et al.*, 1991; Avila *et al.*, 1991). Plus tard, de nouveaux travaux ont permis d'affiner cette technique (Wincker *et al.*, 1994; Centurion-Lara *et al.*, 1994; Kirchhoff *et al.*, 1996). Elle peut donc être utilisée en complément de la sérologie, notamment dans le suivi des traitements. Toutefois, des volumes de sang non négligeables doivent être utilisés, aussi, la méthodologie reste peu adaptée pour les bébés (Russomando *et al.*, 1998). Une autre application potentiellement prometteuse de la PCR, est le diagnostic d'infection congénitale de *T. cruzi*.

## **1.5 Thérapeutique**

Parmi un grand nombre de molécules disponibles qui ont une activité trypanocide, seuls deux médicaments sont actifs chez l'homme et sont utilisés sur une large échelle : le Nifurtimox, dérivé du nitrofurane, et le Benznidazole, un nitro-2 imidazole. Ces molécules agissent contre les formes trypomastigotes et amastigotes circulantes et expérimentalement, contre les formes épimastigotes (voir section suivante). En conséquence, elles sont indiqués pour traiter la maladie en phase aiguë et indéterminée. D'autre part, ces molécules ne sont pas dépourvues de toxicité et leur administration requiert une surveillance médicale très rigoureuse. Elles peuvent en effet provoquer des réactions d'hypersensibilité, des neuropathies, des troubles gastro-intestinaux, une leucopénie grave qui peut exiger l'arrêt du traitement.

Si le Benznidazole est particulièrement efficace contre les formes aiguës et congénitales, ses effets antiparasitaires chez les patients en phase chronique restent controversés. Néanmoins, 56% des enfants présentant une infection chronique récente (< 10 ans) ont été guéris par un traitement précoce au Benznidazole. C'est la raison pour laquelle

son utilisation est aussi préconisée dans les cas chroniques à infection récente (Noireau, 1999). Sa posologie est de 5 à 7 mg par kg par jour, pendant 30 à 60 jours (OMS, 1990).

En ce qui concerne le Nifurtimox, les effets secondaires sont principalement d'ordre digestif, mais des complications neurologiques ont été décrites comme par exemple des neuropathies périphériques. Sa posologie chez l'enfant est de 10 mg/kg et par jour pendant 60 à 90 jours.

La difluorométhylorithine (DFMO) est un puissant inhibiteur de l'ornithine décarboxylase qui participe à la biosynthèse des polyamines. Ce produit a révélé une puissante action trypanocide et est actuellement essayé pour le traitement de la maladie.

Actuellement, d'autres molécules, telle que l'itraconazole sont en cours d'essai pour traiter la maladie. Elle est administrée pendant 120 jours, à une dose de 6 mg/kg. L'allopurinol est essayé à une dose de 600 mg à 900 mg par jour, pendant 60 jours. Les résultats montrent que ces drogues sont efficaces contre la forme chronique et bien tolérées par le malade (Noireau, 1999).

## **1.6 Modalités de transmission**

### **1.6.1 Transmission vectorielle**

La transmission la plus fréquente de la maladie de Chagas se fait par contamination de l'homme par les déjections de l'insecte vecteur contenant les formes trypomastigotes infectantes métacycliques (voir section suivante). L'insecte défèque lors de son repas sanguin et les parasites pénètrent la peau au niveau des lésions de grattage ou par des muqueuses. Cette transmission peut se faire par plus de 100 espèces de Triatomines dans les zones endémiques.

Les personnes les plus exposées sont celles qui occupent des habitations rurales ou des quartiers périphériques des villes, qui sont des niches propices aux triatomes. C'est d'ailleurs pour cela qu'un des principaux moyens de lutte contre les vecteurs domestiques consiste en l'amélioration de l'habitat, qui doit être réalisée à l'échelle de la localité entière en parallèle avec l'assainissement des zones péri-domestiques, du fait de l'infection très fréquente des abris pour les animaux par les triatomes et du comportement de dispersion des vecteurs domestiques (Dujardin *et al.*, 1988).

### **1.6.2 Transmission transfusionnelle**

La transmission par la transfusion sanguine est un des risques d'infection dans les centres urbains. Elle est devenue une forme de contamination très fréquente en Amérique latine. Un rapport de l'OMS de 1993 montre une prévalence d'infestation estimée à 50% chez

des donneurs de sang en Bolivie. Il faudrait faire une sélection minutieuse des donneurs de sang, avec sérologie spécifique de la maladie.

Depuis 1951, on dispose d'une technique simple qui permet de « détrypanosomer » le sang par le violet de gentiane, à la concentration de 1/4000 du volume du sang, dans un délai minimum de 24 h ; ce délai handicape son utilisation en situation d'urgence.

### **1.6.3 Transmission congénitale**

La transmission par voie transplacentaire devient de plus en plus importante dans les zones de forte transmission, provoquant une infection congénitale, laquelle, selon l'état immunoparasitaire de la mère, peut conduire soit à une infection très grave entraînant la mort du fœtus, soit à une infection bénigne qui laisse survivre le nouveau-né sans aucun symptôme important (Freilij *et al.*, 1983). Les mécanismes de transmission maternofoetale du parasite n'ont pas encore clairement élucidés. Sa prévalence varie selon les régions endémiques des gestantes infectées (Carlier *et al.*, 2002). Les enfants nés infectés devront être traités avec les produits pharmacologiques disponibles. Il serait souhaitable de pratiquer à titre préventif une sérologie spécifique et systématique chez les femmes enceintes ainsi que des examens parasitologiques.

## **1.7 Les vecteurs**

### **1.7.1 Taxinomie et critères de différenciation**

Au niveau taxinomique, les insectes vecteurs de la maladie de Chagas appartiennent à la classe des Insecta, ordre Hemiptera, Famille Reduviidae et sous-famille Triatominae.

Les Triatominae sont distribués en 4 tribus (Usinger *et al.*, 1966) dont 2 ont une importance épidémiologique : les Triatomini (avec les genres *Triatoma* et *Panstrongylus*) et Rhodniini (avec le genre *Rhodnius*).

La plupart des espèces de vecteurs sont actuellement identifiables à travers des caractères morphologiques externes (Lent & Wygodzinsky, 1979). Les méthodes de classification conventionnelles (morphologie externe et génitale) peuvent être complétées par de nouvelles techniques de détermination comme la cytogénétique (Veshima *et al.*, 1966 ; Veshima *et al.*, 1979 ; Vaio *et al.*, 1985 ; Mello *et al.*, 1986), l'analyse de la variabilité isoenzymatique (Dujardin & Tibayrenc, 1985) et la morphométrie (Casini *et al.*, 1995). Les critères de distinction entre les trois genres mentionnés se définissent comme suit :

- Le genre *Rhodnius* présente une tête allongée, des antennes insérées sur le devant au niveau de l'antéclypéus.
- Le genre *Triatoma* a une tête moins allongée, des antennes insérées entre les yeux et l'antéclypéus.
- Le genre *Panstrongylus* a une tête très courte et large, des antennes insérées à l'avant des yeux.

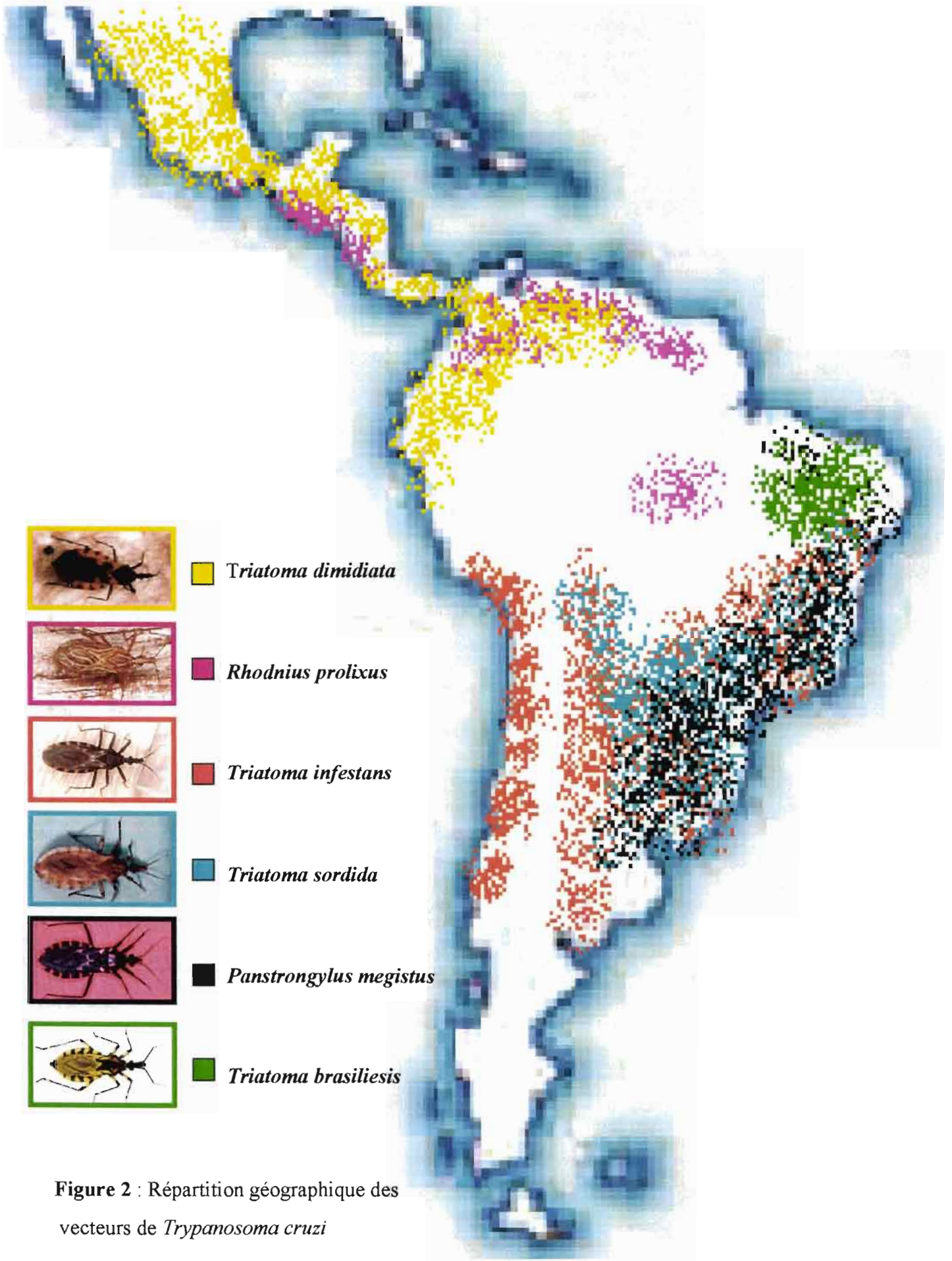
Les espèces les plus importantes du point de vue épidémiologique sont : *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* et *Rhodnius pallescens* (OMS, 1991), (fig. 2). L'espèce domestique *Triatoma infestans* est extrêmement répandue en Amérique du Sud au sud du bassin amazonien. C'est le vecteur majeur dans les pays andins.

### 1.7.2 Comportement et répartition

Tous les triatominés sont obligatoirement hématoiphages tant chez les larves que chez l'adulte, mâle ou femelle. Le repas sanguin (qui peut comporter jusqu'à 0,5 ml chez l'adulte) est pris suivant les disponibilités toutes les une à deux semaines. Ce facteur est très variable en fonction des espèces et des conditions de température.

Ces insectes ont des activités principalement nocturnes et peuvent vivre jusqu'à des altitudes de 3500 m. Par contre, le climat est un facteur qui conditionne la croissance des populations de triatominés. Dans les climats où la température est presque constante tout au long de l'année, il existe deux générations de triatomes par an.

La colonisation de la première habitation peut être active par des femelles d'insectes migrantes (Carcavello *et al.*, 1978) ou passive, par exemple par un transport d'œufs ou de larves de triatomes par des animaux (comme les marsupiaux, rongeurs, etc.) venant se réfugier dans les maisons (Pifano *et al.*, 1973). Ensuite la prolifération de maison en maison peut se faire de manière active ou passive. Une fois le processus de domestication engagé, celui-ci semble irréversible.



**Figure 2** : Répartition géographique des vecteurs de *Trypanosoma cruzi*

Les insectes trouvent un microclimat très favorable dans les fissures des murs et dans les toits en palme. De plus, ils trouvent là une abondance de sources alimentaires et une protection contre les prédateurs, donc des conditions idéales pour leur maintien et leur prolifération (Schofield, 1985).

À l'intérieur des maisons, la répartition spatiale des Triatominae n'est pas régulière, les insectes se regroupant près des sources trophiques. Ce phénomène pourrait être associé à l'émission de phéromones d'agrégation dans les fécès des insectes (Schofield & Patterson, 1977).

Les espèces péridomestiques envahissent occasionnellement les maisons et exploitent les dépendances des maisons, comme les poulaillers.

Selon Carvalho (1978) et selon OPS/OMS (1975) *T. cruzi* participe dans la nature à 3 cycles : le cycle sylvestre, le cycle péridomestique et le cycle domestique. Le cycle sylvestre est restreint à une transmission vectorielle dans la forêt à des mammifères sans l'intégration de l'homme. Dans le cycle domestique, l'homme participe de manière active. Enfin, le cycle péridomestique, est un cycle intermédiaire entre les cycles sylvestre et domestique, dans lequel l'infection de l'homme est accidentelle.

## 1.8 Réservoirs

Le réservoir animal de la maladie de Chagas domestique et sauvage est extrêmement large. Six ordres de mammifères comprenant quinze familles, composées elles-même de quatorze genres différents et plus de 150 espèces constituent les réservoirs sauvages qui maintiennent aujourd'hui la chaîne épidémiologique de cette zoonose (fig. 3). Trois catégories parmi ces 15 familles méritent une mention spéciale :

- **Marsupiaux :**

La principale famille incriminée est celle des Didelphidés, appartenant à la dernière des 9 familles de marsupiaux. Cette famille comprend onze genres différents. Parmi les cinq genres habitant l'Amérique latine, seuls deux d'entre eux, *Marmosa* et *Didelphis*, intéressent la maladie de Chagas. Les *Didelphis* se rencontrent des Etats Unis jusqu'à l'Argentine (fig. 4A). Signalons *Didelphis azarae*, *Didelphis marsupialis* et *Didelphis virginiana*, morphologiquement proches. La première espèce est à poche marsupiale incomplète, la deuxième est carnivore et la troisième est surtout localisée aux Etats-Unis. Ce sont les hôtes principaux de *T. cruzi* avec *Marmosa* (Ripert, 1996).



**Figure 3** : Distribution géographique des réservoirs de *T. cruzi*



**Figure 4** : Réservoirs de *Trypanosoma cruzi* A) *Didelphis vigiani*,  
B) *Chaetophractus villosus*

- **Edentés :**

Dans l'ordre des Edentés les Dasypodidés ou tatous sont des espèces qui se localisent dans le Nouveau Monde. Malgré leur nom, les Edentés possèdent des dents. Leur corps est revêtu d'écailles recouvertes d'une lame cornée, qui forment une véritable cuirasse.

En Amérique centrale, on trouve *Dasypus novemcinctus* et en Amérique du Sud, les tatous velus (*Chaetophractus villosus*), en particulier en Bolivie (fig. 4B). Le tatou géant (*Pridontes gigantescus*), se trouve dans les forêts de Guyane, du Brésil, du Paraguay, de Bolivie et d'Argentine.

- **Rongeurs :**

Dans l'ordre des Rongeurs, deux familles peuvent héberger *T. cruzi* : les Cricétidés et les Sciuridés (écureuils).

La liste actuelle des mammifères réservoirs de la trypanosomiase particulière à l'Amérique latine n'est certainement pas exhaustive. Dans la plupart des régions en cause, il n'y a guère de contact entre les animaux sauvages et l'homme. Néanmoins, dès lors qu'on construit des habitations offrant un habitat aux triatomes, les infestations sauvages peuvent rapidement revêtir un caractère domestique. Nos connaissances sur les espèces vectorielles s'attaquant aux hôtes sauvages, et sur l'invasion des habitations humaines par des espèces sylvatiques detriatomines sont fragmentaires.

Il conviendrait d'élargir les études sur le terrain afin de délimiter d'une façon précise le rôle de chacune des espèces de mammifères impliqués dans la transmission de la maladie de Chagas.

### **1.9 Méthodes de lutte contre la maladie de Chagas**

Compte tenu du manque d'efficacité des traitements spécifiques actuels, de leur coût élevé, ainsi que de l'absence de prévention médicamenteuse, seul un programme de lutte pour le contrôle de la transmission de cette affection semble aujourd'hui réalisable.

La base de la lutte contre cette maladie consiste actuellement en une diminution de la densité vectorielle. Pour un contrôle durable de la maladie de Chagas, il ne suffit pas d'éliminer les Réduvidés, mais il est aussi impératif d'améliorer d'une part, les mauvaises conditions de l'habitat liées aux problèmes économiques de la population, et d'autre part de réaliser des campagnes éducatives dans le domaine de l'hygiène. L'élimination des insectes

des habitations par utilisation massive d'insecticides par le personnel spécialisé (les "vinchuceros", du nom vernaculaire des triatominés dans les pays andins: "vinchucas") est appuyée par un programme d'éducation sanitaire. Il est évident que dans les zones à faible revenu il est également nécessaire d'améliorer l'état de l'habitat humain, notamment dans le secteur périurbain et rural. De plus, il faut non seulement traiter les malades mais aussi les porteurs de trypanosomes, sains en apparence, qu'il faut d'abord dépister.

Le programme d'épandage d'insecticides pour éliminer les Réduvidés tient compte, dans la mesure du possible, de la bio-écologie de ces vecteurs. Toutefois, les insecticides agissant par contact, relativement persistants doivent être de prix raisonnable.

Dans les années 50 et 60 les insecticides chlorés ont été les plus utilisés. Le DDT (1(p,p'-dichlorodiphenyl)-2-trichloroéthane) et le HCH ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) ont des effets assez persistants (30 à 180 jours), mais ces composés ne sont pas biodégradables.

Les carbamates, comme le "Propoxur", donnent de bons résultats, mais ils sont trop onéreux pour être employés à grande échelle. Les organophosphorés, "Malathion" et "Fenitrothion", introduits en 1975, sont très efficaces et permettent d'espacer les épandages de 1 à 2 ans. L'inconvénient majeur est qu'ils dégagent une odeur forte et très désagréable, mal supportée par les villageois.

D'autres procédés modernes de lutte sont de plus en plus employés. Il s'agit des cartouches fumigènes et de peintures à insecticides, faisant appel à toute une gamme de produits à libération lente. La cartouche, quand elle est activée, libère un gaz qui contient un insecticide, le "Dichlorvos" ou le "Fenitrothion". Les peintures insecticides contiennent le plus souvent l'insecticide "Malathion", à libération lente, mélangé à de l'acétate de polyvinyle. Cette peinture reste efficace 2 ans après son application. Et elle conserve un effet létal sur plus de 85% de nymphes du premier stade.

## **2 *Trypanosoma cruzi***

### **2.1 *Taxinomie***

*Trypanosoma cruzi* appartient au règne Euglenozoa, embranchement Mastigophora, au sous-embranchement Sarcostigophora et à l'ordre Kinetoplastida. Les kinetoplastidés sont divisés en deux sous-ordres : Bodonida et Trypanosomatida. Ce dernier ne comporte qu'une famille, les trypanosomatidae, divisée en 8 genres : *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania* et *Trypanosoma*.

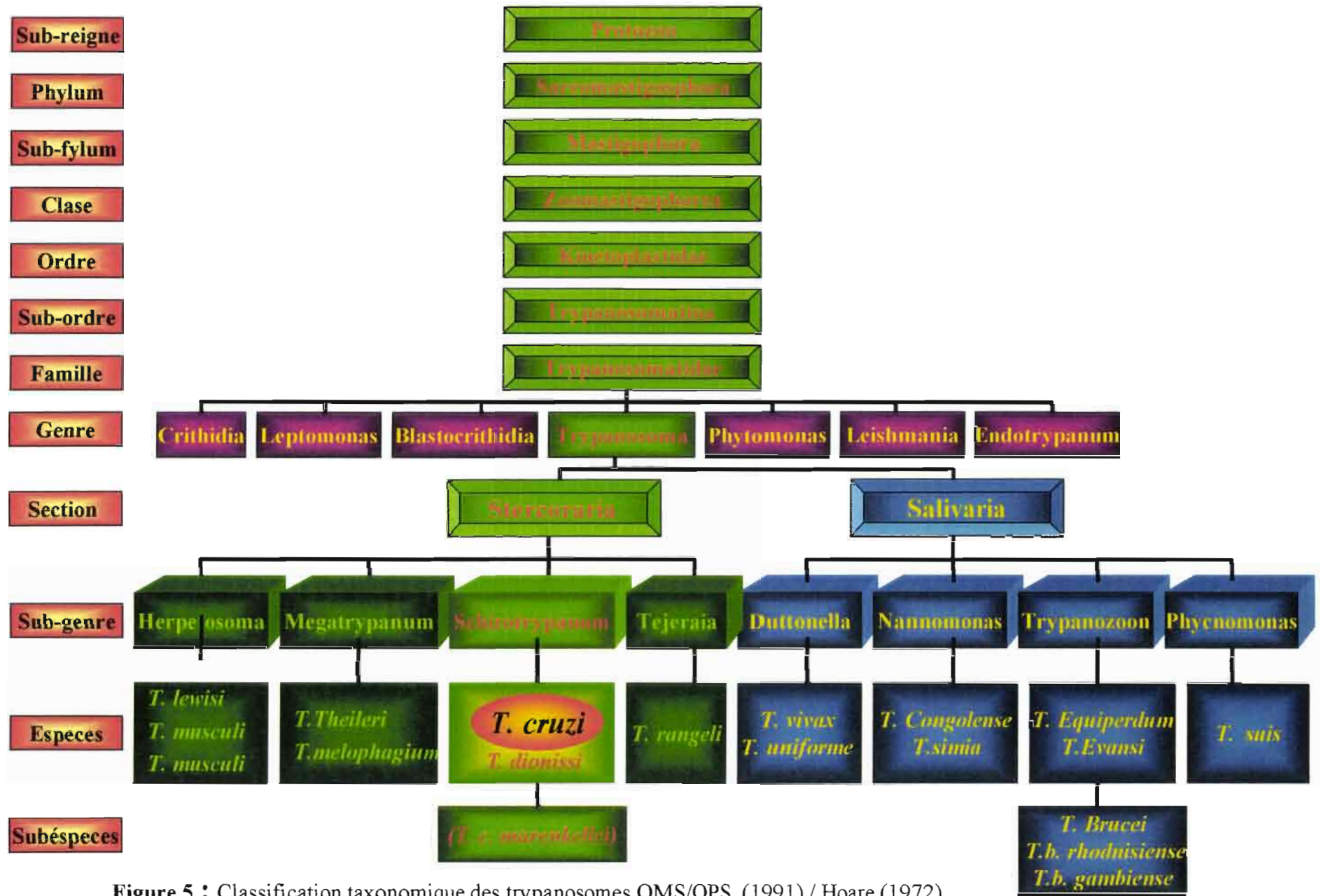


Figure 5 : Classification taxonomique des trypanosomes OMS/OPS, (1991) / Hoare (1972).

Note: le sus-espèce *Trypanosoma cruzi marinkellei* se trouve exclusivement chez des chauves-souris.

Les 4 premiers genres comprennent des parasites monoxènes, trouvés presque exclusivement chez les insectes. Les parasites du genre *Phytomonas*, transmis par des insectes phytophages, sont trouvés dans les plantes. Les genres *Leishmania*, *Endotrypanum* et *Trypanosoma* ont un cycle biologique dixène, faisant participer un hôte vertébré et un hôte invertébré.

Le genre *Trypanosoma* est divisé en 2 sections (Hoare, 1972) :

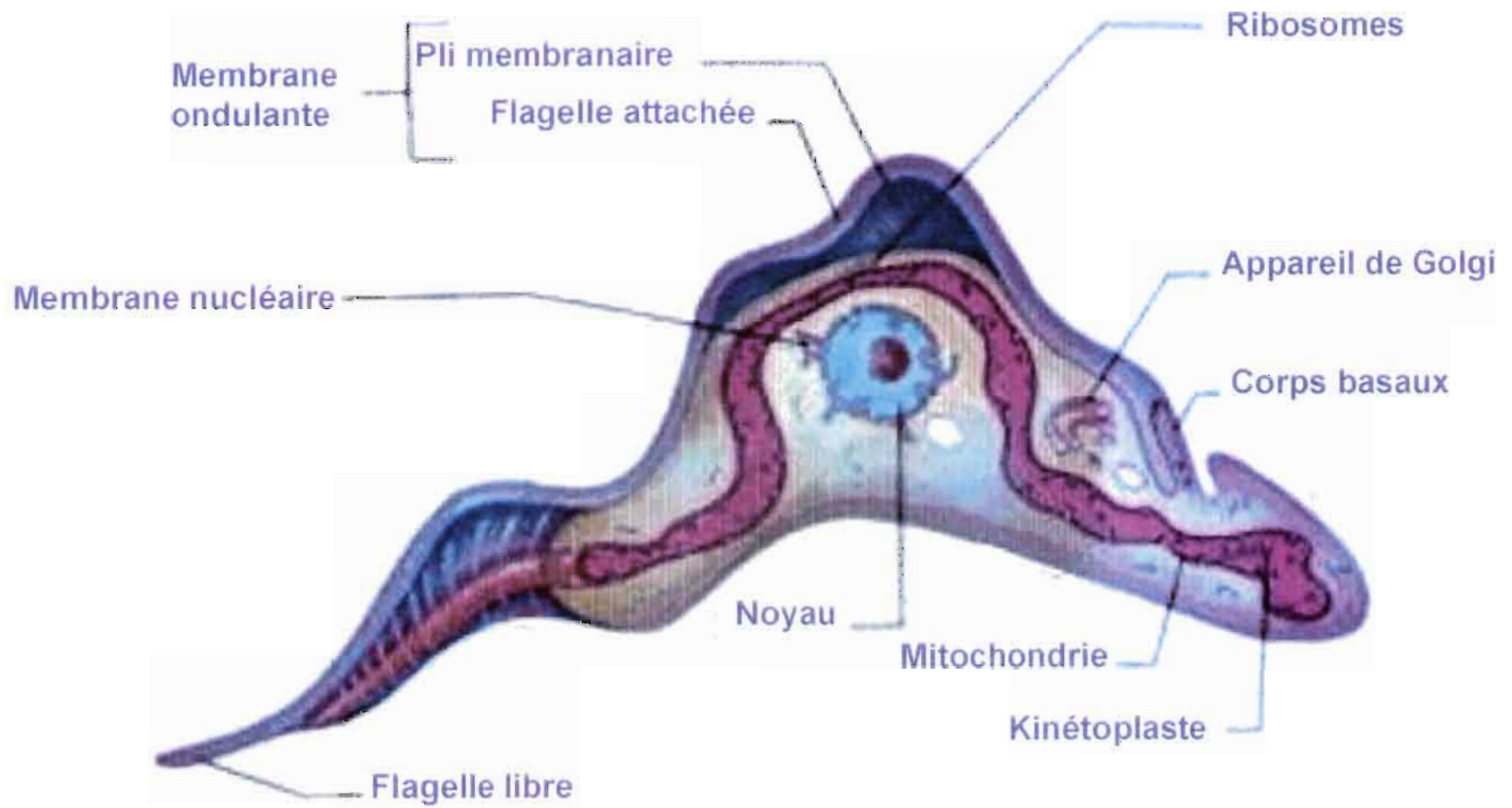
- Salivaria, qui regroupe les parasites se développant dans les glandes salivaires de l'insecte vecteur,
- Stercoraria, qui regroupe les parasites se développant dans l'intestin postérieur du vecteur. Trois sous-genres constituent cette section : *Megatrypanum*, *Herpetosoma* et *Schizotrypanum*. A ce sous-genre appartient *Trypanosoma cruzi*, qui est la seule espèce pathogène pour l'homme dans ce sous-genre (fig. 5).

Par ailleurs, dans l'évolution de la taxinomie de *Trypanosoma cruzi* a été introduite une sous-espèce dénommée *Trypanosoma cruzi marinkellei*, qui a été trouvée spécifiquement dans les chauve-souris d'Amérique latine.

## **2.2 Organisation cellulaire**

La structure intime de *T. cruzi* (représentée sur la figure 6) révèle des particularités uniques dans le monde vivant. Elle est caractérisée par la présence d'un flagelle (appareil de locomotion) et d'une seule mitochondrie tubulaire dans laquelle est situé le kinétoplaste.

Leur cytosquelette comprend principalement les microtubules de l'axonème flagellaire, des corps basaux et du réseau sous-pelliculaire. Ce sont pour la plupart des microtubules stables, non dépolymérisés par le froid, peu sensibles à la composition des tampons utilisés au cours de la purification du cytosquelette (Schneider *et al.*, 1987; Sherwin *et al.*, 1989) et aux drogues anti-microtubulaires induisant une dépolymérisation rapide des microtubules. Ces microtubules sont constituées par des protéines (tubulines  $\alpha$  ou  $\beta$ ) qui représentent les différents stades biologiques de *T. cruzi*.



**Figure 6:** Structure cellulaire de *Trypanosome cruzi*

### 2.2.1 Le flagelle

Le flagelle des trypanosomes prend son origine sur un corps basal (le kinétosome), il est responsable du mouvement mais joue également un rôle dans l'attachement de la cellule à un substrat. Le flagelle se compose d'un axonème de structure microtubulaire classique. Il émerge d'une invagination de la membrane plasmique formant la poche flagellaire (site actif d'endo et d'exocytose) (voir revue (Webster & Russell, 1993) puis s'étend le long du corps cellulaire en formant la membrane ondulante.

Le flagelle est formé de neuf paires de microtubules périphériques longitudinaux et d'une paire centrale (axonème) entourées d'une gaine qui est une extension tubulaire de la membrane cellulaire (Cooper *et al.* 1993). Cette zone de contact entre le flagelle et le corps cellulaire a été appelée zone d'attachement flagellaire ou FAZ (Sherwin *et al.*, 1989; Woods *et al.*, 1989; RuizMoreno *et al.*, 1995). Dans cette zone, la fibronectine joue un rôle d'attachement au site d'adhésion cellulaire. Ce site en effet, serait composé d'une séquence Arg-Gly-Asp-Ser et *T. cruzi* posséderait un récepteur d'attache à la fibronectine par lequel il se fixerait aux macrophages. Ce récepteur est composé d'une protéine majeure (80-85 kDa) et d'une bande de moindre poids moléculaire (58-68 kDa) (Ripert, 1996).

Deflorin *et al.*, (1994), suggère que la fibre paraflagellaire serait construite à partir d'une réaction de polymérisation d'hétérodimères comparable à ceux observés dans les microtubules et les filaments intermédiaires et que ses fonctions seraient régulées par des protéines associées.

### 2.2.2 Les corps basaux

Le flagelle des trypanosomes est initié à partir d'un corps basal de structure centriolaire classique à 9 triplets, associé perpendiculairement à un centriole secondaire sans flagelle (corps pro-basal). Récemment, deux polypeptides de poids moléculaire 43 et 47 kDa ont été localisés par immunofluorescence au niveau des corps basaux (Woods *et al.*, 1989; Woodward *et al.*, 1995). Des études ultrastructurales ont montré que la mitochondrie des trypanosomes s'étend sur toute la longueur de la cellule et que le kinétoplaste contenant l'ADN mitochondrial est toujours localisé à proximité des corps basaux suggérant des liens entre ces deux organelles (Vickerman *et al.*, 1962). Après congélation rapide d'épimastigotes de *T. cruzi*, des filaments d'environ 11 nm de diamètre, dont la nature chimique est encore inconnue, ont été décrits entre les corps basaux et le kinétoplaste (Souto-Padron *et al.*, 1984).

Par la suite, Robinson et Gull (1991) ont confirmé que le kinétoplaste et les corps basaux sont physiquement liés.

### **2.2.3 Les microtubules sous-pelliculaires**

La forme des trypanosomes est maintenue par un réseau hélicoïdal dense de microtubules tapissant la membrane plasmique sur sa face interne (Angepoulos *et al.*, 1970; deSouza *et al.*, 1989; Seebeck *et al.*, 1990). Leur nombre est en relation directe avec le diamètre de la cellule; ils sont environ une centaine dans le plan de la poche flagellaire et leur nombre décroît vers chaque extrémité de la cellule (Meyer & deSouza, 1976). Le réseau de microtubules sous-pelliculaires de plusieurs espèces, observé après étalement de cellules ouvertes par tension superficielle, montre que leur origine est située dans la région des corps basaux (Angepoulos *et al.* 1970). Des connections avec un corps basal ont été observées initialement chez *Trypanosoma lewisi* pour un groupe de 4 microtubules sous-pelliculaires longeant la cellule parallèlement à la zone d'adhésion du flagelle au corps cellulaire (Anderson *et al.*, 1965).

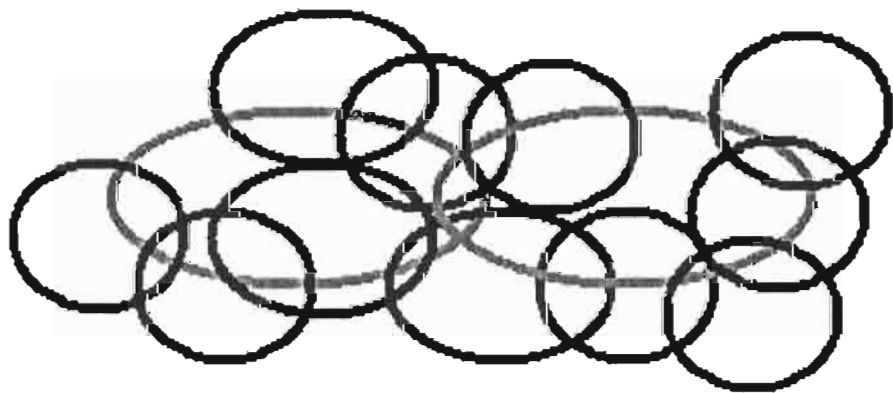
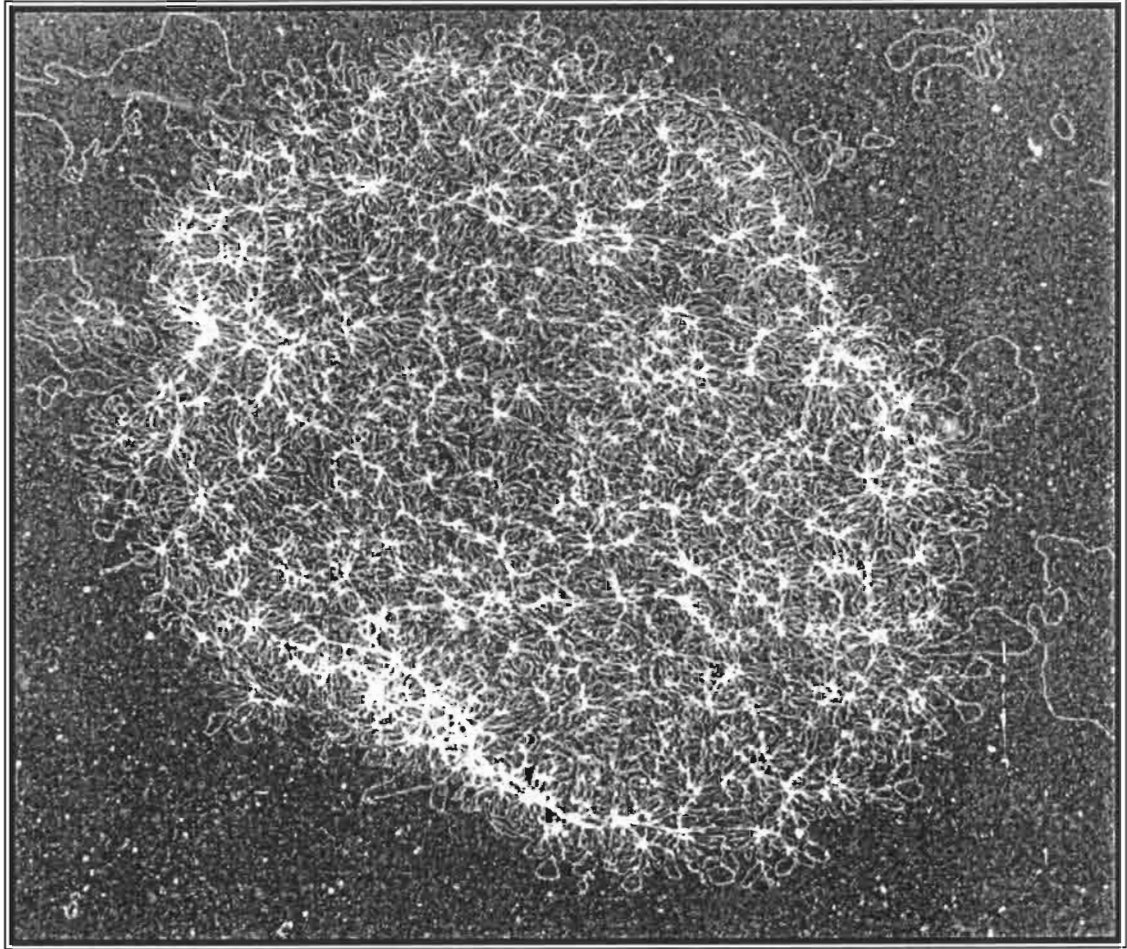
Par la suite, Taylor et Godfrey (1969) ont observé au niveau ultrastructural ce groupe de microtubules chez d'autres espèces de trypanosomes sans cependant mettre en évidence des relations avec les corps basaux. Ces quatre microtubules sont caractérisés par une grande stabilité et par une étroite association avec une vésicule du réticulum endoplasmique (Fuge *et al.*, 1968).

### **2.2.4 Le kinétoplaste**

Le kinétoplaste est un organite qui contient l'ADN mitochondrial, et présente une structure et un mécanisme d'expression très original. Il est situé à la base du flagelle locomoteur, et inclus dans l'unique mitochondrie de *T. cruzi*.

Le kinétoplaste a une structure très compacte, constituée de cercles d'ADN mitochondriaux entrelacés les uns dans les autres: le réseau est composé de maxicercles et de minicercles (fig. 7) (Englund *et al.*, 1993).

Cet ADN représente une partie non négligeable de l'ADN total (jusqu'à 1/3 de la totalité de l'ADN). Celui-ci présente une structure particulière, qui a été analysée par une combinaison de techniques d'électrophorèse en champ pulsé, de digestion par des ADNases, des topoisomérases et des enzymes de restriction.



**Figure 7 :** Microphotographie de kinétoplaste où s'observe le réseau concaténé d'ADN

## 2.3 Formes cellulaires

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés de l'ordre des Kinetoplastidae caractérisés par la présence à l'intérieur de leur mitochondrie unique d'une structure composée essentiellement d'ADN: le kinétoplaste. Classiquement, leur cycle évolutif se réfère à des étapes bien précises identifiées par la forme de la cellule, la position du complexe corps basal-kinétoplaste par rapport au noyau, et l'extension de l'appareil flagellaire.

Des différences morphologiques et des caractéristiques intrinsèques sont utilisables pour distinguer les souches de *T. cruzi* et les différents stades de développement. Il existe trois principales formes de développement, les amastigotes, les épimastigotes et les trypomastigotes. La position du flagelle sur le corps du kinétoplaste caractérise chacun de ces stades de développement (Hoare & Wallace, 1966).

### 2.3.1 Les trypomastigotes

C'est la forme infectante transmise par les fécès du vecteur. Elles présentent un flagelle dans la région antérieure et le kinétoplaste est en position post-nucléaire (Hoare & Wallace, 1966). Ce sont des formes allongées de 12µm à 31 µm, dont le flagelle, d'une largeur de 2µm et d'une longueur de 12 µm, reste libre (fig. 8A).

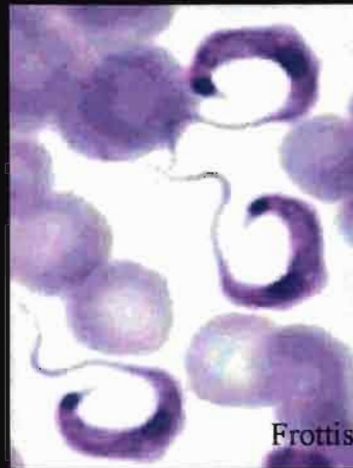
Ces formes sont des cellules différenciées qui ne se divisent pas. Elles circulent dans le sang des vertébrés et dans l'ampoule rectale des insectes vecteurs. Ces formes sont résistantes au complexe d'attaque membranaire du complément et sont donc incapables d'activer la C3 convertase de la voie alterne. Cette incapacité résulte d'une fixation trop faible du facteur amplificateur B ou d'une fixation du facteur H protéolytique selon les populations parasitaires (Joiner *et al.*, 1986).

La surface de la membrane est recouverte de glycoprotéines et de glycolipides, ce qui est important lors de l'invasion cellulaire (Markel, 1990).

Les trypomastigotes sont programmés pour se transformer en amastigotes, qu'il y ait ou non pénétration à l'intérieur des cellules. Cette différenciation se produit dans le sang de l'hôte vertébré (Andrews *et al.*, 1987). L'analyse des protéines et antigènes de surface révèle une forte hétérogénéité chez les génotypes de *T. cruzi*, corrélée à la variabilité isoenzymatique (Brenière *et al.*, 1992).

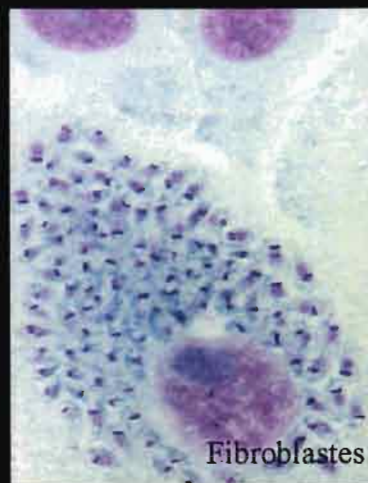
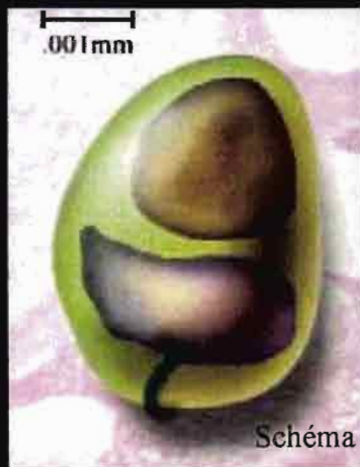
A

### Trypomastigotes



B

### Amastigotes



C

### Epimastigotes

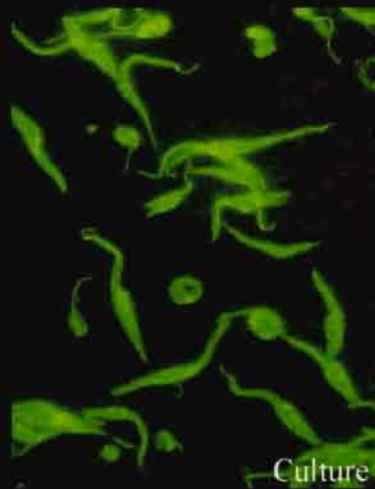


Figure 8: Morphologie de *Trypanosoma cruzi*

### 2.3.2 Les amastigotes

C'est un stade de développement intracellulaire présent de manière caractéristique chez les vertébrés.

Ce sont des formes rondes ou ovoïdes de 3 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre, ne présentant pas de flagelle et dont les seules structures caractéristiques sont le noyau et le kinétoplaste (fig. 8B). Le parasite se divise activement sous cette forme et cause la destruction de la cellule hôte. Libérés dans le sang, les amastigotes se transforment en trypomastigotes. Certains cependant sont repris tels quels par d'autres macrophages et phagocytés. Ne fixant pas les composants du complément.

Les trypomastigotes utiliseraient pour adhérer à leur cellule cible, une opsonine plasmatique, la fibronectine. Pour les cellules non phagocytaires (musculaires, nerveuses), la pénétration se ferait de façon active et la multiplication aurait lieu sans problème sous la forme amastigote.

Si la cellule cible est un macrophage il y a phagocytose. Les trypomastigotes, tout comme les amastigotes immédiatement repris par les macrophages au moment de l'éclatement d'une cellule hôte, sont alors enfermés dans une vacuole parasitophore où ils devraient être détruits lors de la fusion de celle-ci avec les lysosomes. Mais les parasites parviendraient dans les minutes qui suivent à détruire la membrane de la vacuole parasitophore et à se réfugier dans le cytoplasme où ils se multiplient sans être détruits sous forme amastigote (Wéry, 1995).

### 2.3.3 Les épimastigotes

Ces formes sont des formes de multiplication dans le tube digestif de l'insecte. Elles possèdent un corps fusiforme avec un noyau en position centrale et un flagelle en position postérieure qui traverse tout le corps, appelé « membrane ondulante ». Il mesure de 15  $\mu\text{m}$  à 40  $\mu\text{m}$ . Le kinétoplaste est situé à l'origine du flagelle (fig. 8C). Ces formes sont en général sensibles au complexe d'attaque du système du complément des hôtes vertébrés. Elles sont capables de fixer le C3 par la voie alterne.

## 2.4 Le cycle biologique

Le schéma du cycle biologique de *T. cruzi*, est présenté dans la figure 9. Ce parasite est dixène. Il possède deux stades obligatoires pour effectuer son cycle biologique.

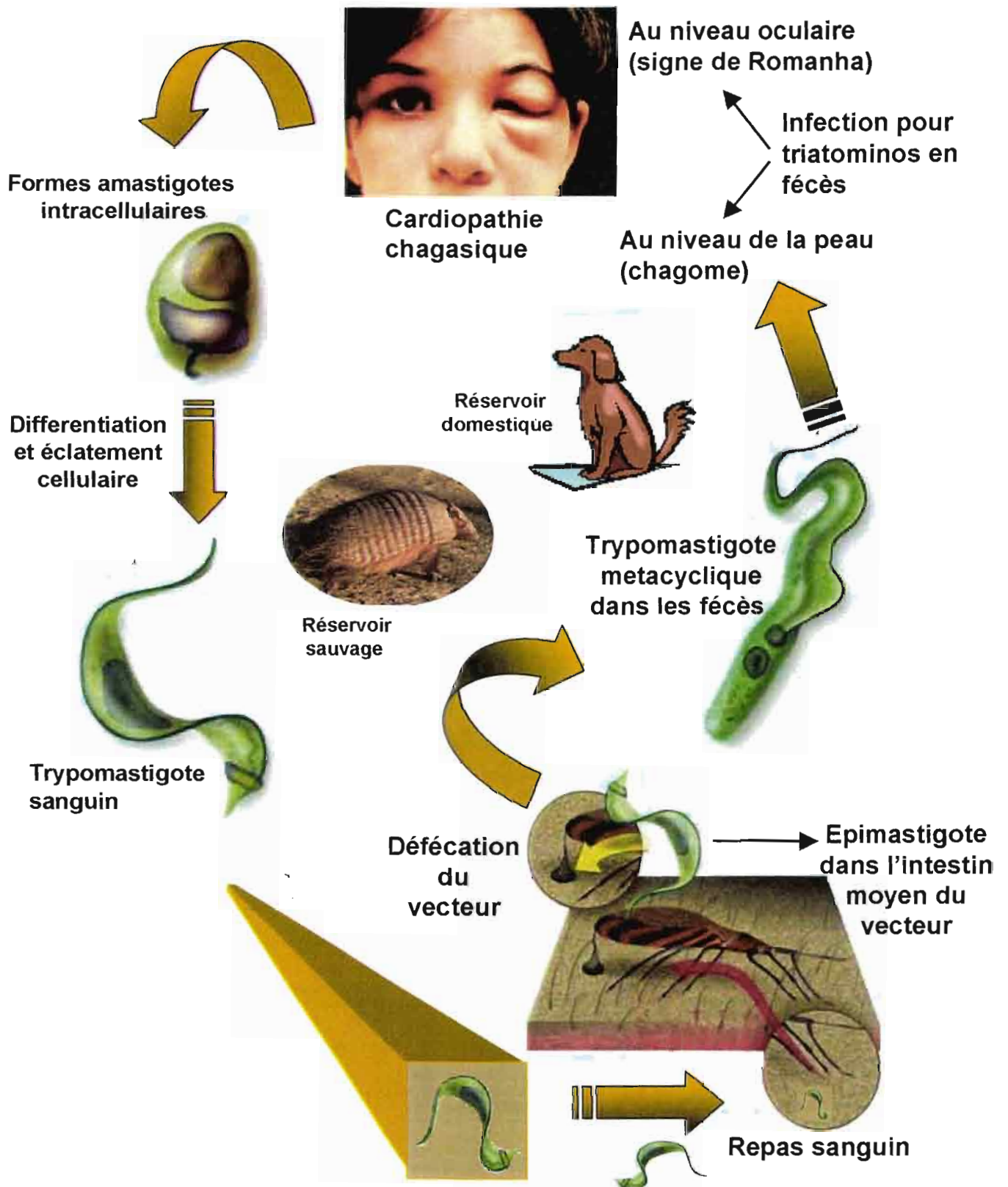


Figure 9 : Cycle biologique de *Trypanosoma cruzi*

Lors de leur repas sanguin, les triatomes défèquent et les trypomastigotes métacycliques infectants présents dans les fécès de l'insecte sont introduits par effraction cutanée ou par voie muqueuse dans le mammifère-hôte. Ces trypomastigotes entrent alors dans le macrophage au niveau du tissu sous-cutané. Après quelques heures, ils se différencient en formes amastigotes qui se multiplient par plusieurs cycles de divisions binaires et évoluent en trypomastigotes. Les cellules infectées éclatent sous la charge parasitaire et les trypomastigotes libérés vont infecter d'autres cellules (cellules nerveuses, macrophages, cellules musculaires).

Dans les vecteurs : le vecteur peut s'infecter en ingérant des formes trypomastigotes de l'hôte (formes circulantes dans le sang des hôtes). Celles-ci se différencient en épimastigotes qui se multiplient ensuite activement dans l'intestin moyen de l'insecte. Dans la partie postérieure de l'intestin (rectum), les parasites se différencient à nouveau en trypomastigotes métacycliques infectants, complétant ainsi le cycle du parasite (Vickerman *et al.*, 1985).

## **2.5 Métabolisme**

Les trypanosomes utilisent comme éléments nutritifs le glucose, les acides aminés et les peptides.

Les trypanosomes trouvent le glucose en quantité suffisante dans le sang et dans les sérosités interstitielles. Ils sont capables de métaboliser en une heure leur poids en glucose.

Le métabolisme glucidique a lieu dans les structures placées près de la membrane cytoplasmique, les glycosomes, lysosomes adaptés à la digestion du glucose, et il se réalise grâce aux enzymes suivants : hexokinase, phosphofructo-kinase, 3-phosphoglycérinate-kinase, aldolase et 6-phosphoglucose-isomérase. Les glycosomes constituant 4% du volume cellulaire, au nombre de 200 à 300 organites limités par une membrane, se chargent de la fonction glycolytique.

Dans le métabolisme protidique, les trypanosomes utilisent les acides aminés présents dans le sang, particulièrement le tryptophane. La sécrétion des protéases serait responsable des lésions vasculaires provoquées par le parasite, donnant souvent lieu à l'apparition d'œdèmes. Les acides aminés sont différents selon les espèces de trypanosomes et peuvent fixer, à des degrés variables, les composés fluorescents (chromomycine A), ce qui permet de les différencier par cytofluorométrie (Ripert, 1996).

## **2.6 Le génome de *T. cruzi***

### **2.6.1 Génome nucléaire**

La quantité totale d'ADN par parasite est estimée entre 125 et 280 fg. (Dvorak et al., 1982). L'ADN nucléaire posséderait donc une taille totale de 100 à 150 Mb, environ 2/3 de l'ADN total. Une estimation basée sur la densitométrie donne une valeur de 87 Mb (Cano et al., 1995).

Actuellement, les banques de séquences contiennent plus de trois cents séquences du génome de *T. cruzi*, parmi lesquelles de nombreuses ont été associées à une protéine ou une fonction particulière.

Actuellement, plusieurs payses travaillent sur le projet du génome *T. cruzi*, il a été concrétisé dans un congrès "WHO/TDR - Fiocruz co-sponsored Parasite Genome Network Planning Meeting" à Fiocruz (Rio de Janeiro, 14-15 avril de 1994. Brésil). Les objectifs annoncés de ce projet sont de mieux comprendre la maladie et ses interactions hôte / parasite, ainsi que de développer de nouveaux traitements plus efficaces pour combattre la maladie.

#### **2.6.1.1 Caryotype**

L'ADN nucléaire est fragmenté en plusieurs molécules linéaires d'ADN qui constituent les chromosomes. Chez *T. cruzi*, différentes études basées sur l'électrophorèse en champs pulsés suivie éventuellement d'hybridations moléculaires, montrent que le caryotype est très diversifié. Toutefois, la chromatine de *T. cruzi* est faiblement condensée pendant la mitose et les chromosomes sont mal visualisés par les méthodes classiques de microscopie. Par contre, certains auteurs ont montré la présence d'environ 20 bandes chromosomiques allant de 450 Kb à 1,6 Kb. (Gibson & Miles, 1986). Néanmoins, les dernières études montrent jusqu'à 64 bandes chromosomiques pour certains stocks (Cano *et al.*, 1995).

#### **2.6.1.2 Structure**

La structure physique du génome peut être décrite suivant différents aspects, dont un des plus importants est la structure répétitive du génome, constituée de plusieurs classes d'ADN suivant leurs niveaux de répétition. Chez *T. cruzi*, on définit trois classes :

- **Les séquences uniques ou très peu répétées**

La majeure partie de l'ADN a une proportion de séquences fonctionnelles très faible. Cet ADN possède un grand nombre de pseudogènes. Les pseudogènes sont des

séquences d'ADN qui présentent une grande homologie avec un gène fonctionnel mais dont la structure n'est plus fonctionnelle. Au cours de l'évolution ces gènes ont accumulé des mutations (ponctuelles, délétions, insertions) qui ont eu pour conséquence la perte de l'expression. Les pseudogènes divergent rapidement de leur séquence d'origine. A un certain seuil de similitude, la probabilité de phénomènes de conversion génique diminue fortement et la divergence entre séquences apparentées devient irréversible. La vitesse de divergence des pseudogènes est plus faible en absence de pression sélective.

- **Les séquences moyennement répétées**

La majorité des séquences moyennement répétées correspond à des séquences codantes. On peut penser que l'existence de ces ADN est consécutive de duplications répétées de segments spécifiques de l'ADN au cours de l'évolution. Selon de nombreux auteurs, les gènes de *T. cruzi* sont organisés en tandem, par exemple, les gènes d'histones H2A, H2B et H3 (Puerta *et al.*, 1994) ou les gènes codants pour l'actine et la tubuline.

- **Les séquences hautement répétées**

Les séquences répétées peuvent être classées en deux familles :

- les séquences qui sont regroupées en série sont dites « localisées »,
- les autres sont dites « dispersées ».

Dans le génome de *T. cruzi*, il existe une séquence hautement répétée (localisée) appelée séquence satellite, de 195-196 pb. Elle est répétée approximativement 120.000 fois (Gonzales *et al.*, 1984). Cette séquence est distribuée sur plusieurs chromosomes de *T. cruzi* (Cano *et al.*, 1995), et les répétitions sont organisées en tandem. Elle représente environ 9 % du génome nucléaire.

Parmi les éléments répétés dispersés, on trouve les transposons, qui sont des éléments génétiques ayant la faculté de se déplacer dans le génome. Ce déplacement peut impliquer directement une molécule d'ADN ou passer par l'intermédiaire d'une molécule d'ARN, ce dernier mécanisme est appelé rétroposition, et les éléments transposables correspondants, des "rétroéléments".

On peut distinguer quatre types de rétroéléments :

- les rétrovirus (qui sont caractérisés par la capacité à former des particules virales),
- les rétrotransposons (qui ne possèdent pas le gène *env.*, nécessaire à l'élaboration de la capsid virale).

- les rétroposones (qui ne possèdent ni le gène env., ni les longues répétitions terminales –LTR des rétrovirus) et les rétrotranscrits ou rétroséquences.

Dans le génome de *T. cruzi*, ont été identifiés des rétrotransposons et des séquences similaires aux rétrotransposons. Un élément appelé CZAR (cruzi associated retrotransposon) contient deux cadres ouverts de lecture similaires aux gènes *gag* et *pol* des rétrovirus et est inséré dans le gène du mini-exon (Villanueva *et al.*, 1991).

Ces éléments répétés dispersés jouent un rôle important dans l'évolution des génomes : ils peuvent promouvoir les recombinaisons, limiter les phénomènes de conversion génique et déplacer des segments d'ADN à travers le génome, soit par rétroposition de séquences adjacentes, soit par recombinaison.

### **2.6.1.3 Gènes codant pour les ARN ribosomiaux**

Les gènes ribosomiaux (ADNr) sont transcrits en grandes unités de transcription, lesquelles sont groupées en tandem sur 2 ou 3 chromosomes (Vahnamme *et al.*, 1995). Chez *T. cruzi* le site d'initiation de la transcription de l'unité d'ARNr ha été localisé à 1768 bases du gène d'ARNr 18S.

Les unités de transcription codent pour les ARNr 18S et 5.8S. Les ARNr de 28S sont codés indépendamment. Ils sont atypiques, sous la forme de 2 grandes molécules (24 $\alpha$  et 24 $\beta$ ) et 4 petites molécules d'ARN de respectivement 220, 180, 140 et 70 nucléotides (Hernandes & Castaneda, 1983).

L'ADN qui code pour l'ARNr 5S est localisé en un locus indépendant à l'unité de transcription, même si les deux locus sont répétés en tandem. Il existe 16 fois plus de copies du gène de l'ARNr 5S que de l'unité principale de transcription, qui se répète 100 fois par noyau (Hernandez *et al.*, 1980).

Ces particularités ne sont pas encore bien connues, et elles pourraient représenter de nouveaux modèles d'interaction du ribosome avec l'ARNm.

### **2.6.1.4 Mini-exon**

Une particularité qui caractérise des trypanosomatidés est le mini-exon. Le mini-exon est une séquence de 39 nucléotides localisée entre le promoteur et les région codantes de chaque unité de transcription. On ne connaît pas sa véritable fonction. Ce mini-exon est transcrit en un ARN qui n'est pas traduit, mais c'est à partir de cet ARN que sont transcrits des ARN polycistroniques (Gonzales *et al.*, 1985). La variation du nombre de mini-exons a été impliquée dans la variation de taille de chromosomes (Wagner & So, 1990).

L'expression des gènes des *Trypanosomatidae* présente de nombreuses et importantes différences avec celle des eucaryotes supérieurs. Le mécanisme d'expression comparée des trypanosomatidae et des eucaryotes supérieurs est présenté à la figure 10.

La structure du génome est dynamique : la taille du génome d'une espèce donnée reflète le bilan des processus de perte ou de gain d'ADN au cours de son évolution.

Les gènes du mini-exon sont répétés en tandem et sont très conservés chez les kinetoplastidés (Muhich *et al.*, 1987). Par contre, la région intergénique est plus variable.

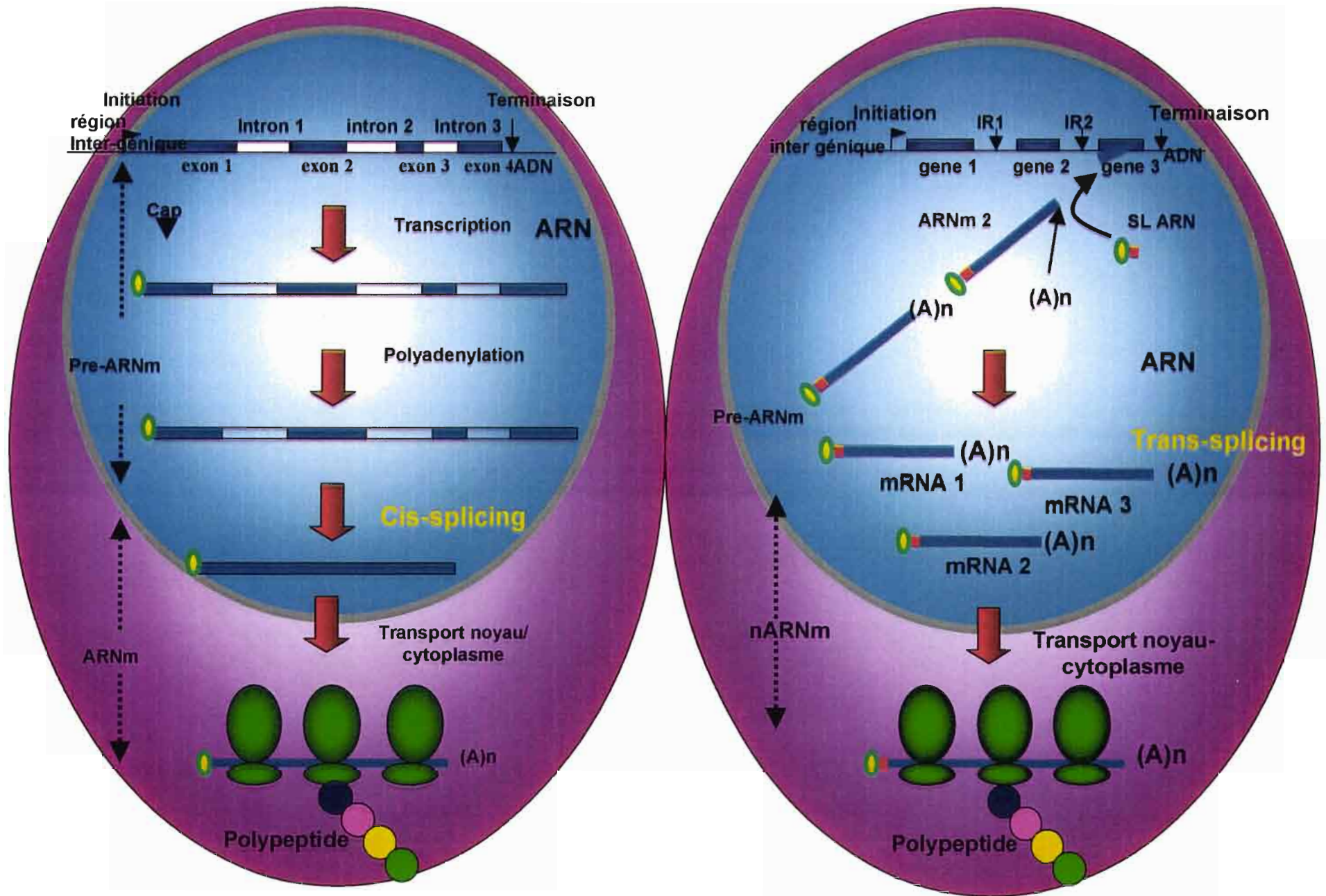
*T. cruzi*, est un organisme qui présente une grande variabilité de mécanismes atypiques dans l'expression de son génome. Pour les caractéristiques de pathogénicité, les études d'organisation et d'expressions du génome sont d'un grand intérêt biologique et biomédical.

Les différences de séquences de cette région inter génique chez 4 stocks de *T. cruzi* (Cl, Y, X10 et Tulahuen) ont suggéré la présence de deux groupes : les trois premiers d'un côté, et de l'autre la souche Tulahuen (Souto *et al.*, 1996).

Sur la base de ces études, des oligonucléotides amplifiant spécifiquement chacun des groupes de 300 et 350 pb ont été décrits.

Chez *T. cruzi* les gènes codant pour des protéines sont organisés en unités de transcription polycistroniques, de façon comparable à ce qui est rencontré chez les procaryotes : des gènes en tandem séparés par des régions inter-géniques sont transcrits simultanément.

Tous les gènes décrits jusqu'à maintenant chez *T. cruzi* n'ont pas d'intron. Cela indique que le processus de maturation d'ARN messenger est différent de celui des eucaryotes. Ce processus, appelée trans-splicing (différent du cis-splicing des eucaryotes) consiste en la jonction de l'extrémité 5' d'ARN messenger au mini-exon commun à tous les transcrits (Stuart *et al.*, 1989) : la séquence-guide ou « spliced leader » (SL). C'est une séquence de 39 nucléotides. Tous les ARN messagers de *T. cruzi* portent en leur partie 3' les 35 nucléotides du mini-exon (Agabian, 1990). Cette séquence SL dérive d'une séquence, précurseur de 110 bases (SL-RNA), dont les gènes sont organisés en groupes de 0,6 kb. Au cours d'un processus couplé avec le précédent, les transcrits individuels sont également polyadénylés (Matthews *et al.*, 1994). L'addition de ce mini-exon donne comme résultat une addition d'un « cap » de 5'methyl-guanosine qui confère une stabilité au transcrit.



**Figure 10 :** Comparaison des mécanismes d'expression génétique A) chez les eucaryotes supérieurs B) chez les Trypanosomatidés. Noter la procédure « trans splicing » chez les trypanosomatidés, différente du « cis-splicing » des eucaryotes supérieures.

La polyadénylation semble être en relation avec le trans-splicing. Néanmoins, on n'a identifié aucune séquence consensus dans la région non traduite dans l'extrémité 3' de l'ARNm dans le cadre de ce processus. Il semble que l'existence d'une région riche en pyrimidines à l'intérieur de la région inter-génique puisse permettre de contrôler la polyadénylation (Graham, 1995).

## **2.6.2 Génome kinetoplastique**

### **2.6.2.1 Les maxicercles**

Ce sont des molécules circulaires d'ADN double brin de 20 à 25 kb présentant 25 à 50 copies par cellule. Les séquences des maxicercles sont similaires à celles de l'ADN mitochondrial des eucaryotes supérieurs. Toutefois chez *T. cruzi*, l'ADN qui code pour les gènes mitochondriaux ne contient pas de phases de lecture intactes. Celles-ci sont soit dépourvues de codon d'initiation, ou de codons stop, soit présentent des décalages de phase. Par contre, au niveau structural, les maxicercles présentent deux régions : une région variable (10 kb) et une région constante de 15 à 17 kb, appelée région informative, dans laquelle se trouvent les gènes codant pour les ARNs ribosomiques mitochondriaux et les protéines de la chaîne respiratoire (Simpson, 1987).

### **2.6.2.2 Les minicercles**

Ce sont des molécules circulaires d'ADN double-brin, d'une taille de 1400 pb. (Markel, 1990). Elles sont organisées en quatre régions variables séparées par quatre régions constantes situées à intervalle de 90° autour du cercle (Degrave *et al.*, 1998). Ils sont au nombre de 5.000 à 10.000 par parasite. Pendant longtemps, le rôle exact des minicercles est resté inexplicé. Mais récemment leur fonction a été élucidée. Les minicercles représentent la majorité du réseau d'ADN kinétoplastique et codent pour de petits ARN appelés ARN guides (ARNg) (Kable *et al.*, 1996).

### **2.6.2.3 Rôle : Edition des ARNm**

Depuis la découverte de l'édition des ARNm mitochondriaux, on sait que ce processus résulte d'une parfaite collaboration des gènes contenus dans les maxicercles et les minicercles. Les maxicercles fournissent les ARN pré-édités et quelques ARN guides, les minicercles apportent la majorité des ARN guides.

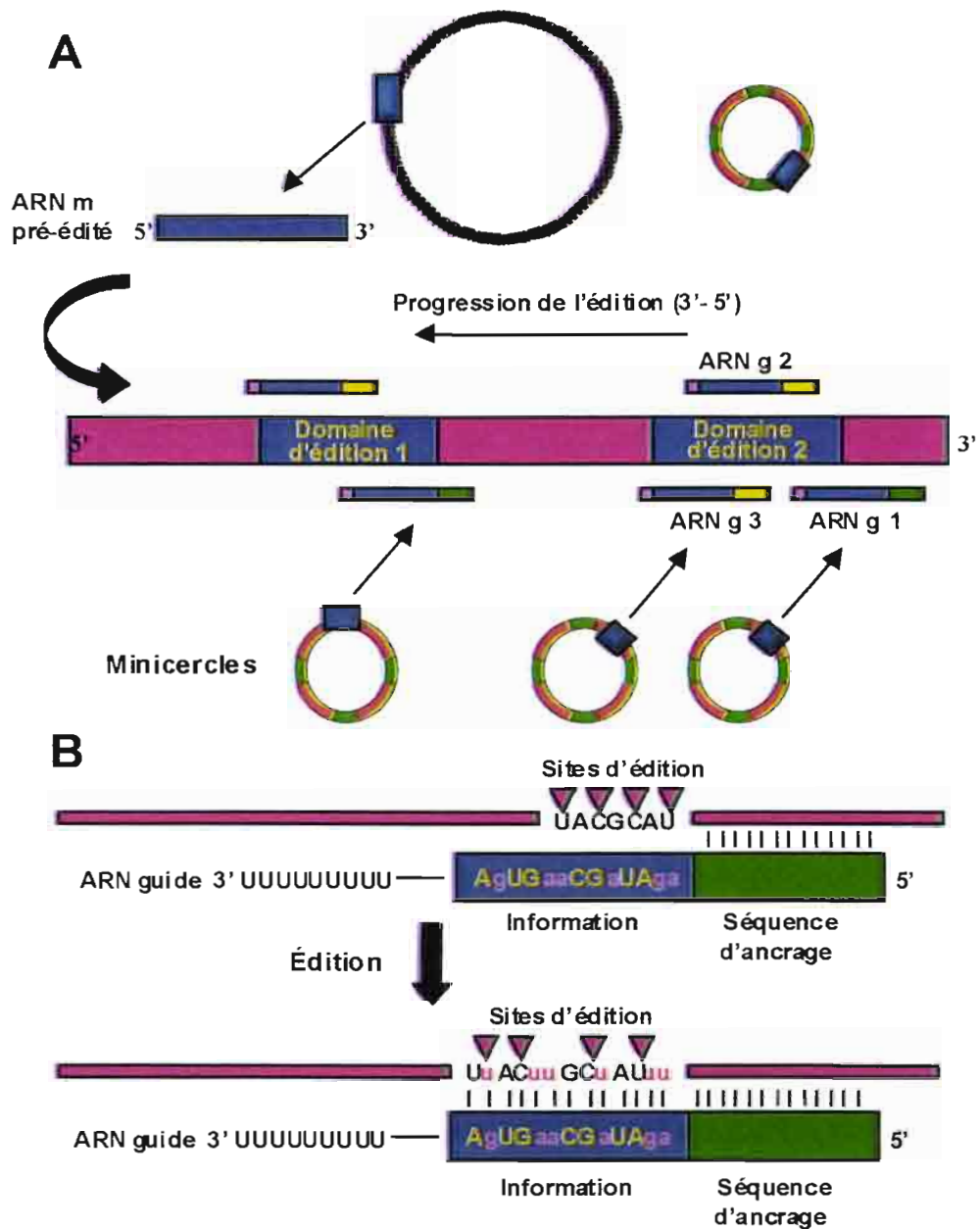
L'information contenue dans une séquence génomique, est dans la plupart des cas fidèlement retrouvée dans l'ARN. Dans certains cas le transcrit subit une véritable correction qui modifie sa séquence, ce processus est appelé « édition de l'ARN ». Il regroupe des mécanismes d'ajout, suppression ou conversion des nucléotides dans des positions précises de la région codante des transcrits primaires de certains gènes mitochondriaux (Stuart, 1991).

Chez *T. cruzi*, le processus d'édition des ARN se fait par les minicercles et désigne un phénomène d'insertion ou de délétion de l'uridine principalement et plus rarement de conversion des nucléotides. Ce processus peut être défini comme une altération programmée de la structure primaire de l'ARN permettant de produire une séquence fonctionnelle. (Sturm and Simpson, 1990). L'édition de l'ARN doit donc être extrêmement précis afin d'éviter que l'insertion ou la suppression d'un mauvais nombre d'uridines fausse l'édition de l'ADN.

La conséquence de telles erreurs peut conduire à la synthèse d'un cadre de lecture non traduisible ou modifier une séquence non-sens pour donner un cadre de lecture complet. La clé de cette précision réside dans les ARN guides (ARNg) (fig. 11) (Blanc *et al.*, 2002). Ils possèdent une séquence complémentaire de la région éditée qui détermine le nombre précis d'uridines à ajouter à supprimer ou à convertir. Par ailleurs, cette séquence, dans sa région 5', présente une séquence appelée « séquence d'encrage », qui s'apparie aux transcrits pré-édités, et leur région 3', particulière aux ARNg, est une queue de poly (U) qui pourrait être impliquée dans la stabilisation du complexe ARNm-ARNg.

La formation du premier complexe ARNm-ARNg est cruciale dans le déclenchement du processus d'édition. L'ARNg associé au transcrit sert de matrice pour l'insertion ou la suppression des uridines. Dans certains cas, l'édition crée un nouveau site d'encrage pour un second ARNg. L'action consécutive des ARNg fait de l'édition un processus orienté (3'-5') qui se répète jusqu'à ce que l'ARNm soit complètement édité.

Une série de réactions enzymatiques déclenchées par l'appariement de l'ARNg permet à une endonucléase de cliver l'ARN messager au niveau de la première base mal appariée. Le fragment 5' ainsi formé est maintenu à proximité du fragment 3' via des interactions ARN-ARN mettant en jeu la queue poly (U) de l'ARNg (Blum *et al.* 1990) et de protéines. Cet ensemble est appelé « editosome ».



**Figure 11 :** A) Mécanisme d'édition des ARNm chez les trypanosomes  
 B) Éléments structuraux des ARN guides.

Dans un deuxième temps, en 3' du fragmente 5', s'effectue l'addition, la suppression ou la conversion d'uridines, grâce à l'uridine transférase (TUTasa). Les uridines nouvellement ajoutées s'apparient à l'ARNg. Les deux fragments d'ARN (5' et 3') qui sont maintenus ensemble par complémentarité avec l'ARNg sont finalement liés par une ligase de l'ARN pour reconstituer le transcrit mature. Le processus d'édition affecte ainsi les transcrits codant pour les protéines mitochondriales de la chaîne respiratoire (sous-unité de la NADH déshydrogénase, cytochrome oxydase, ATP synthase et apocytochrome b) (Blanc *et al.*, 2002).

### 2.6.3 Le cycle cellulaire

La description classique du cycle cellulaire des eucaryotes comporte quatre périodes relatives à l'activité nucléaire : une phase S de synthèse d'ADN, une phase G1 et une phase G2 suivi de la mitose ou phase M (Howard & Pelc, 1953). Chez les trypanosomes, la phase S existe à la fois pour le noyau et pour le kinétoplaste. La duplication et la ségrégation des ces deux génomes, doivent donc être coordonnées (Mattheu & Gull, 1994a).

Néanmoins, l'analyse précise des différents événements du cycle cellulaire révèle un certain degré d'asynchronisme entre les cycles cellulaires relatifs au noyau et au kinétoplaste (Sherwin & Gull, 1989). La chronologie montre que la duplication et la séparation du kinétoplaste précèdent la division nucléaire.

En effet, bien que l'initiation de la phase S de synthèse de l'ADN nucléaire et mitochondrial débute approximativement au même moment, la synthèse d'ADN du kinétoplaste se termine plus tôt. En conséquence, la mitose et la division du kinétoplaste s'effectuent d'une façon asynchrone, la division du kinétoplaste étant réalisée au cours de la phase G2 du cycle cellulaire relatif au noyau (Woodward & Gull, 1990). Ceci suggère l'existence au cours du cycle cellulaire d'un certain degré de régulation intra-organelle.

La séquence complexe des événements associés au cycle cellulaire n'est pas dominée par la formation et l'activité du fuseau mitotique mais apparaît en grande partie contrôlée par les corps basaux. Woodward et Gull (1990) proposent en effet que la réplication des corps basaux est un des événements précoces du cycle cellulaire et coïncide approximativement avec l'initiation de la synthèse d'ADN nucléaire et mitochondrial. D'autre part, au cours de la cytodièrese, la mise en place spatiale et l'orientation du sillon de division sont indépendantes de la position et de l'orientation du fuseau mitotique.

### 3 Polymorphisme et biodiversité de *Trypanosoma cruzi*

#### 3.1 Polymorphisme biologique de *T. cruzi*

Depuis longtemps, les chercheurs distinguent des variations intra-spécifiques chez *T. cruzi* :

- au niveau morphologique (formes fines, comme la souche Y, et formes larges comme la souche CL) ;
- au niveau de son tropisme cellulaire (vers les macrophages, les myocytes ou les cellules nerveuses) ;
- au niveau de sa pathogénicité pour les différents hôtes vertébrés ou invertébrés ;
- au niveau de sa sensibilité aux agents chimiques;
- au niveau de ses caractéristiques de surface.

##### 3.1.1 Tropisme tissulaire

*T. cruzi* ne colonise pas tous les tissus du mammifère-hôte de manière homogène, mais envahit certains tissus de manière préférentielle, en particulier les myocytes, ce qui a été décrit pour la première fois en 1911 par Viana.

Ultérieurement, Bladinez (1945) a distingué deux types d'histotropisme. Le type 1, qui a une préférence pour le système musculaire et le type II, qui a une préférence pour le système réticulo-endothélial. Puis, Andrade et Andrade (1966) ont montré un tropisme différent chez la souris selon les diverses origines géographiques des souches étudiées. Ces auteurs ont montré que les parasites trouvés dans la partie nord de l'Amérique du sud sont des souches myotropiques (Andrade *et al.*, 1973).

Il a été aussi rapporté que les capacités d'infection varient selon plusieurs facteurs qui agissent sur la capacité de pénétration intracellulaire des parasites *in vitro*, avec d'importants différences selon les stocks parasitaires (Ouaissi & Capron, 1989).

##### 3.1.2 Pathogénicité

La pathogénicité de *T. cruzi* est très variable et le déterminisme moléculaire de cette pathogénicité et de sa variabilité n'est pas encore bien connu.

La distribution géographique discontinue des symptômes de la maladie a fait suspecter le rôle de la souche infectieuse dans l'évolution de la maladie (Rezende, 1976). La présentation de la maladie est très variable en phase aiguë : soit le patient infecté montre les symptômes typiques, soit le patient infecté ne manifeste aucun signe clinique. Pendant la phase chronique de la maladie peuvent se présenter soit une forme clinique cardiaque, soit une forme digestive ou les deux simultanément. Enfin, la maladie peut rester totalement asymptomatique.

Dans les pays les plus au sud, les syndromes digestifs sont les plus fréquents, alors qu'ils sont très rares dans les pays d'Amérique Centrale, ce qui fait conclure à cet auteur que les parasites impliqués dans l'infection ne sont probablement pas les mêmes dans ces deux zones. La variabilité de la susceptibilité des populations humaines pourrait également être impliquée (Rezende, 1976). Ces facteurs qui peuvent intervenir dans la pathogénicité ne sont encore bien connus, mais il est probable qu'il existe de nombreux facteurs influençant la diversité des perturbations observées au cours de la maladie (Krieger *et al.*, 1981).

### **3.1.3 Virulence**

La virulence et la parasitémie ont été parmi les critères les plus utilisés pour démontrer la variation intra-spécifique de *T. cruzi*. Les premières études montrent trois types de souches en fonction de leur origine géographique : très virulente au Brésil, moyennement virulente au Guatemala et peu virulente au Panama. (VonBrand *et al.*, 1949). De la même manière, Andrade *et al.* (1966) ont suggéré l'existence de trois groupes de souches de *T. cruzi* en fonction de la parasitémie suivie chez la souris; Type I : souches avec une faible virulence et une parasitémie peu élevée, avec une absence de mortalité. Type II : souches présentant une virulence moyenne, avec une haute parasitémie, mais une absence de mortalité. Type III : souches à virulence très élevée, présentant une très haute parasitémie et caractérisées par une forte mortalité.

### **3.1.4 Sensibilité aux médicaments**

Les différences de sensibilité aux médicaments observées expérimentalement sont connues depuis longtemps (Hauschka, 1949 ; Croft, 1986 ; Tsuhako *et al.*, 1949).

Freman *et al.* (1975) ont classé les souches de *T. cruzi* en trois groupes sur la base de leur sensibilité à certains médicaments. Andrade (1985) a suggéré l'existence d'une forte concordance entre la diversité génétique de stocks et des différences de propriétés biologiques, dont la sensibilité aux médicaments. Les souches de type I sont plus sensibles

aux médicaments que les souches de type II, qui sont très résistantes, tandis que les souches de type III sont faiblement sensibles.

### **3.2 Populations naturelles de *T. cruzi***

#### **3.2.1 Polymorphisme génétique**

Le polymorphisme génétique est défini comme la rencontre dans une population de deux ou plusieurs génotypes alternatifs. Selon une limite très généralement acceptée, un locus est dit polymorphe si le ou les allèles les plus rare(s) y ont une fréquence au moins égale à 0,01, et si par conséquent, l'hétéozygotie pour cet allèle se produit avec une fréquence d'au moins 2 pour 100. Une autre limite souvent adoptée est une fréquence d'au moins 0,05 pour l'allèle le plus rare.

#### **3.2.2 Variabilité génétique de *T. cruzi***

*Trypanosoma cruzi* est probablement un des microorganismes pathogènes dont la variabilité génétique a été la plus étudiée. Les chercheurs des années 70 et 80 qui étudiaient ce parasite se sont largement appuyés sur l'avènement de nombreux marqueurs biochimiques et moléculaires qui ont largement contribué au développement de la génétique des populations. Nous exposons ci-dessous les principaux marqueurs qui ont été utilisés chez *T. cruzi*.

##### **3.2.2.1 Electrophorèse d'isoenzymes multilocus, ou Multilocus Enzyme Electrophoreses (MLEE)**

Le terme Isoenzymes désigne des protéines de même fonction enzymatique mais de mobilité différente en électrophorèse. Cette variabilité traduit une différence de charge électrique globale de la molécule, qui est le reflet de la variation de la structure primaire de la séquence en acides aminés de la protéine. Cette variation de séquence est elle-même une traduction de la variabilité de séquence du gène codant. La variabilité isoenzymatique, bien que de nature phénotypique, reflète donc bien une variabilité génétique, bien qu'un pourcentage limité de la variabilité soit dû à des modifications post-traductionnelles. Les isoenzymes ont été utilisés massivement en génétique des populations, et leur héritance mendélienne est très bien connue. Ils sont considérés comme sélectivement neutres, bien que cette donnée fasse encore l'objet de débats. Il a été rapidement constaté que beaucoup de bandes isoenzymatiques étaient assimilables à des allèles ("alloenzymes" ou "allozymes"). Dans l'étude des protozoaires parasites, les isoenzymes ont été tout d'abord utilisés de manière empirique, descriptive, car leur déterminisme génétique était inconnu. Les « zymodèmes » ont

été définis comme des ensembles de souches présentant le même profil isoenzymatique pour une série de systèmes enzymatiques donnée (Godfrey & Kilgour, 1976).

Chez *T. cruzi*, les études pionnières de Miles *et al.* (1977 ; 1978) ont révélé la présence de 3 groupes isoenzymatiques principaux, ou "principal zymodemes I, II and III".

Par la suite, l'analyse du polymorphisme isoenzymatique en termes de génétique des populations a conduit à l'élaboration de l'hypothèse d'évolution clonale prépondérante chez *T. cruzi* (voir plus loin) (Tibayrenc *et al.*, 1981 ;1986).

### **3.2.2.2 Polymorphisme de longueur de fragments de restriction, ou Restriction fragment length polymorphisms (RFLP)**

La source fondamentale de la variabilité génétique se situe au niveau des séquences d'ADN dont on peut révéler les polymorphismes en utilisant des enzymes de restriction qui coupent les molécules d'ADN à des sites précis de la séquence nucléotidiques (les sites de restriction des enzymes). La plupart des enzymes de restriction qui sont utilisées dans les études de population ont des sites de restriction constitués soit de quatre, soit de six nucléotides.

Le polymorphisme qui entraîne la présence ou l'absence de sites de restriction est reconnaissables par la longueur des fragments de restriction : RFLP (Restriction fragment length polymorphisms). Ces fragments de restriction d'ADN sont séparés sur gels d'agarose.. Dans le cas particulier de *T. cruzi*, on a mis à profit le caractère hautement répété de l'ADN kinétoplastique pour caractériser les souches de ce parasite. Une série de souches présentant le même profil RFLP pour leur ADN kinétoplastique est appelée un "schizodème", par analogie avec les zymodèmes basés sur le polymorphisme isoenzymatique (Morel *et al.*, 1980).

L'analyse schizodémique de différentes souches de *T. cruzi* caractérisées par isoenzymes, a montré une forte corrélation entre ces deux marqueurs (Tibayrenc & Ayala, 1987 ; Solari *et al.*, 1992). Cette observation a constitué l'idée de départ de la deuxième partie de ce travail de thèse (comparaison entre les phylogénies issues de marqueurs nucléaires et les phylogénies basées sur les séquences des parties variables des minicercles de l'ADN kinétoplastique).

### **3.2.2.3 Polymorphisme caryotypique**

Le polymorphisme caryotypique de *T. cruzi* peut être analysé par la technique d'électrophorèse en champ pulsé (Gibson & Miles, 1986). Le caryotype de *T. cruzi* semble être stable dans les différents stades de développement, et semble être représentatif tout au long de sa vie (Aymerich & Goldenberg, 1989). Par contre, des réarrangements des

chromosomes portant sur les mini-exons ont été observés (Wagner and So, 1990). Ces réarrangements sont dus à un changement du nombre de copies du mini-exon. Ces gènes ont été trouvés sur un élément extra chromosomique appelé LED qui pourrait être impliqué dans le réarrangement du chromosome portant ces gènes (Wagner and So, 1990).

Une indication que le caryotype est relativement stable à l'échelle évolutive est la corrélation existant entre la variation de taille de chromosomes et le polymorphisme isoenzymatique (Henriksson *et al.*, 1993). Le même auteur (Henriksson *et al.*, 1995) suggère que le polymorphisme de taille des chromosomes chez *T. cruzi* dépend principalement d'amplifications ou de délétions de séquences répétées et de gènes répétés en tandem, avec l'occurrence de phénomènes de translocations. Cette tendance à accumuler plus de copies a été suggérée pour rendre compte de la taille supérieure de nombreux chromosomes des souches appartenant au groupe du zymodème ZII de Miles.

De plus, il a été constaté que la souche CL Brenner (celle qui a été utilisée pour le projet *T. cruzi* génome project) contient une plus grande quantité de séquences répétées que les autres souches. Ces séquences pourraient être responsables de la variation de taille des chromosomes.

#### **3.2.2.4 Amplification de l'ADN par amorces aléatoires ou random amplified polymorphic DNA (RAPD)**

L'analyse RAPD est basée sur l'utilisation d'amorces ou primers de réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction ou PCR), dont la séquence est déterminée aléatoirement. Une seule amorce, en général décamérique, est utilisée par réaction. Il a été montré (Welsh & McClelland, 1990 ; Williams *et al.*, 1990) que l'amorce utilisée, dans des conditions de stringence assez faible, se branchait en deux points aux séquences complémentaires de celle de l'amorce, et amplifiait le fragment d'ADN situé entre ces deux points, générant des fragments d'amplification.

Pour une série d'individus ou de souches donnés, des amorces différentes révèlent un polymorphisme différent, ce qui fait que le pouvoir de résolution de la méthode est très grand, le nombre possible d'amorces étant virtuellement illimité.

En dépit de critiques répétées, la résolution de la méthode est satisfaisante, pourvu que les paramètres expérimentaux soient bien contrôlés. Cependant, le RAPD est davantage un outil de recherche qu'une méthode de typage de routine.

Dans le cas de *T. cruzi*, le RAPD a révélé une forte concordance, autrement dit un déséquilibre de liaison, entre la variabilité isoenzymatique et la variabilité RAPD (Tibayrenc

*et al.*, 1993; Brisse *et al.*, 2000). Cette concordance a constitué un argument additionnel robuste en faveur de l'hypothèse clonale.

### 3.2.2.5 *Microsatellites*

Plusieurs locus microsatellites ont été décrits chez *T. cruzi*, et ont été étudiés pour caractériser les populations naturelles de ce parasite. Il est informatif de noter que les subdivisions révélées par les microsatellites sont identiques à celles qui sont mises en évidence par les isoenzymes et par les RAPD (Oliveira *et al.*, 1998). La mise en évidence de cette concordance est d'autant plus fiable que les études concernées ont utilisé un grand nombre de souches que notre laboratoire avait lui-même caractérisées par isoenzymes et RAPD.

### 3.2.3 *Structure des populations naturelles de Trypanosoma cruzi*

Les premières analyses de *T. cruzi* en termes de génétique des populations ont été réalisées par Tibayrenc *et al.*, (1981, 1986), et ont suggéré l'absence ou la rareté de reproduction sexuée mendélienne avec évolution clonale prépondérante. Les arguments sont indirects ("circumstantial evidence") et sont basés sur l'absence des conséquences attendues de reproduction sexuée, à savoir la ségrégation des allèles à un locus donné, et la recombinaison de génotypes à des locus différents. L'absence de recombinaison se manifeste par le déséquilibre de liaison, ou association non aléatoire de génotypes à des locus différents.

Le modèle clonal ne stipule pas que les échanges génétiques sont absents, mais seulement qu'ils sont rares et n'ont d'impact notable sur la structure des populations naturelles qu'à une échelle évolutive. Les clones naturels de *T. cruzi* mis en évidence par l'analyse de génétique des populations apparaissent stables sur de longues périodes de temps et capables de se propager sur de vastes zones géographiques. Certains génotypes clonaux dominants et ubiquistes ont été dénommés "clones majeurs" (Tibayrenc et Ayala, 1988).

L'utilisation d'autres marqueurs génétiques a corroboré l'hypothèse clonale chez *T. cruzi*. C'est le cas de l'hybridation moléculaire sur les séquences variables du minicercle de l'ADN kinétoplastique. Ce marqueur identifie spécifiquement des groupes de génotypes isoenzymatiques, ce qui traduit un déséquilibre de liaison entre les gènes codant pour les isoenzymes et les gènes des minicercles (Brenière *et al.*, 1992; Veas *et al.*, 1991). Le même déséquilibre de liaison s'observe entre les isoenzymes et les RAPD (Tibayrenc *et al.*, 1993; Brisse *et al.*, 2000).

Dans l'optique de l'hypothèse clonale, les variants génétiques de *T. cruzi* (zymodèmes, schizodèmes) sont assimilables à des clones naturels, ou plus exactement, à des familles de clones naturels étroitement apparentés. Le terme de "clonet" a été proposé pour désigner une série de souches qui apparaissent comme identiques avec une batterie de marqueurs génétiques déterminés dans une espèce à évolution clonale prépondérante (Tibayrenc & Ayala, 1991). Des distances évolutives importantes ("distances génétiques") séparent les génotypes clonaux les plus distants. Ainsi, avec 15 locus isoenzymatiques, Tibayrenc *et al.* (1986) ont trouvé des distances génétiques (Nei, 1972). supérieures à 2,0 entre certains génotypes clonaux de *T. cruzi*. A titre de comparaison, avec les mêmes marqueurs, la distance génétique entre l'homme et le chimpanzé est d'environ 0,5.

De nombreux auteurs se sont penchés sur le problème de la structure populationnelle de *T. cruzi*. Il est apparu que les génotypes du parasite sont distribués en deux subdivisions principales (Souto *et al.*, 1996 ; Tibayrenc, 1995). Un panel d'experts a décidé de désigner ces deux subdivisions sous le nom de *T. cruzi* I et *T. cruzi* II (TC I, TC II) (Momen, 1999). Cette dénomination ne préjuge pas de la nature évolutive de ces subdivisions. Celle-ci en effet fait problème. En dépit de l'évolution clonale prépondérante, il semble maintenant avéré que des échanges génétiques occasionnels se produisent chez l'agent de la maladie de Chagas. Ceci a été postulé chez des isolats naturels (Bogliolo *et al.*, 1996 ; Carrasco, *et al.*, 1996 ; Machado & Ayala, 2001 ; Brisse *et al.*, 2003), et a été récemment vérifié par des expérimentations (Gaunt *et al.*, 2003).

Certains clonets de *T. cruzi* sont en fait des lignées hybrides stabilisées par l'évolution clonale. Du fait de ce modèle réticulé avec transferts horizontaux de gènes, et du fait que certaines lignées génétiques *de T. cruzi*, de nature hybride, ont deux ancêtres au lieu d'un, le concept de lignée phylogénétique ou de clade, basé sur l'existence d'un seul ancêtre et sur l'isolement génétique total entre lignées, est inapplicable.

Ce cas de figure évolutif étant fréquent chez les microorganismes pathogènes, Tibayrenc (1998) a proposé le concept descriptif d'"unité de typage discrète" ou Discrete Typing Unit" (DTU), qui désigne une collection de génotypes plus apparentés entre eux qu'ils ne le sont avec aucun autre génotype, et qui sont identifiables par un ou plusieurs marqueurs spécifiques désignés "tags". Dans cette optique, *T. cruzi* dans son ensemble apparaît comme une DTU unique, subdivisée en deux DTUs majeures, qui correspondent à TC I et TC II. Des travaux menés dans notre laboratoire (Barnabé *et al.*, 2000 ; Brisse *et al.*, 2000) ont montré que la DTU II pouvait être subdivisée à son tour en 5 DTUs, qui ont été désignées DTUs IIa à

e. De nombreux "tags" isoenzymatiques ou RAPD ont été identifiés, qui sont spécifiques de DTU I et II, et de DTU II a à e.

La figure 12 montre un double arbre phylogénétique (isoenzymes et RAPD) montrant les 6 DTUs identifiables chez *T. cruzi* (Brisse, Barnabé et Tibayrenc, 2000).

La variabilité génétique de *T. cruzi* ayant été décrite par de nombreux auteurs avec des méthodes différentes, il en est résulté une terminologie complexe. Le tableau 1 donne une correspondance entre ces nomenclatures. Nous utiliserons dans le présent travail la nomenclature DTU proposée par notre laboratoire (DTU I, DTU II a – e).

**Table 1 :** Différentes nomenclatures de classification chez *Trypanosoma cruzi*.

Clasification							Bases (clasification)	Auteur
DTU I	DTU II						22 zymodèmes	Tibayrenc et al., 1995
DTU I		DTU II a	DTU II b	DTU II c	DTU II d	DTU II e	Subdivision du DTU II	Brisse, Barnabé & Tibayrenc, 1998
<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II	----	---	---	----	----	2 groupes <i>T.cruzi</i>	* International Simposium, 1999
1, 2, 3, 4, 6, 8	5, 9, 10	---	---	---	---	---	10 zymodèmes	Higo et al 1997
Lineage 2	Lineage 1	---	---	---	---	---	2 lignées génétiques	Souto et al., 1996
Z2, Z5, Z7, Z10, Z12	---	---	Z4, Z11	---	Z1, Z3, Z9	---	12 zymodemes	De Luca D'Oro et al., 1993
clones 1 - 25	clones 26 - 43	clones 27 - 29	clones 30 - 34	clones 35 - 36	clones 37 - 39	clones 40 - 43	43 génotypes clonaux	Tibayrenc & Ayala, 1988
Z1 (Bol.et Bres.)	----	Z3 (Bres.)	Z2 (Bres.)	----	Z2 (Bol.)	---	4 zymodèmes	Tibayrenc & Miles, 1983
ZIV	----	---	Z1	---	---	Z3	4 zymodèmes	Romana et al., 1979
ZI	---	Z III	Z II	---	---	---	3 zymodèmes	Miles et al., 1978

\* *Intenational Simposium to commemorate the 90 th Aniversary of the Discovery of Chagas Disease. Recommendations from a Satellite Meeting (1999).*

Note : La correspondance entre les zymodemes ZII (Romana et al., 1979) et Z6 -Z8 (DeLuca D 'Oro et al., 1993) a été impossible à établir avec la classification utilisée dans ce travail.

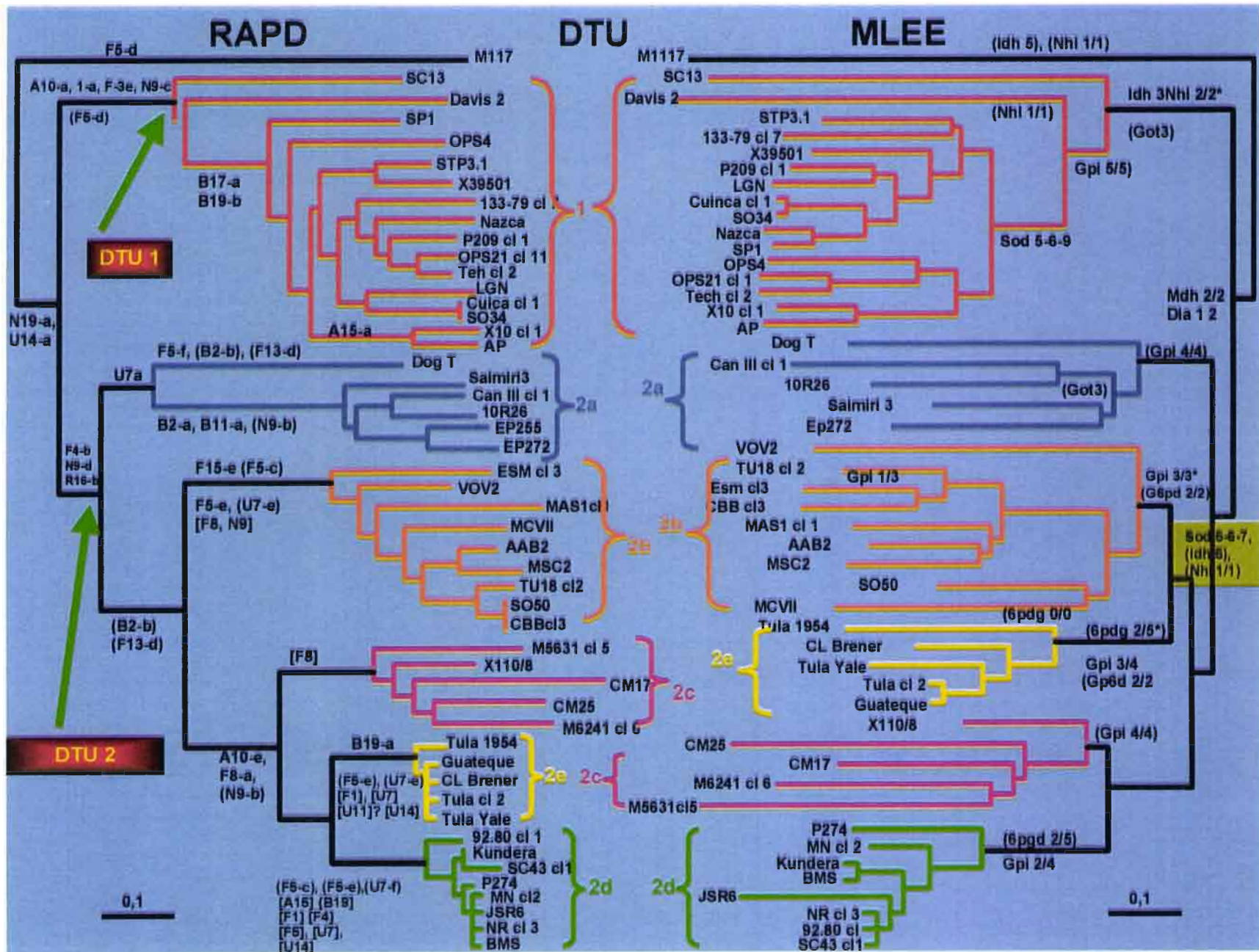


Figure 12 : Arbre phylogénétique montrant les 6 DTUs qui subdivisent l'espèce *Trypanosoma cruzi*. A gauche, données RAPD. A droite, données isoenzymatiques (Brisse, Barnabé et Tibayrenc, 2000).

### **3.3 Conséquences de la variabilité génétique sur les propriétés biologiques du parasite**

Les trois "principal zymodemes" décrits par Miles *et al.* (1978 ; 1977) étaient décrits comme ayant des spécificités épidémiologiques:

- Z1 regroupait les souches du cycle sylvestre,
- Z2 regroupait les souches isolées chez l'homme et les animaux domestiques,
- Z3 regroupait les souches isolées de patients en phase aiguë de la maladie (Miles *et al.*, 1980).

En fait, le tableau est certainement plus complexe. Tibayrenc *et al.* (1984) ont échantillonné de nombreuses souches apparentées au Z1 (DTU I) en cycle domestique, et des souches apparentées au Z3 (DTU 2a) viennent d'être identifiées en Equateur chez des patients chagasiques chroniques (Garzón *et al.*, 2002).

La maladie peut varier dans sa gravité d'une région géographique à l'autre : fréquence et sévérité des cardiopathies, sévérité des lésions intestinales, fréquence et longueur des épisodes aigus. Au Venezuela où les dilatations des viscères (« mégas ») n'existent pas, le zymodème Z1 est prédominant tandis que Z3 est rare. En Amazonie brésilienne, où on observe surtout des infections sylvatiques avec des cas humains sporadiques, les deux zymodèmes Z1 et Z3 sont retrouvés. Au Brésil central et oriental (régions côtières), où les « mégas » sont fréquents, on trouve le zymodème Z2.

En Bolivie, en dessous de 1000 mètres d'altitude, les cardiopathies sont bénignes et les « mégas », rares (région de Santa Cruz) tandis qu'entre 1500 et 3000 m., on rencontre des cardiopathies sévères et des lésions digestives fréquentes (région de Cochabamba).

Cependant, bien que l'hypothèse de travail d'une spécificité pathogénique des zymodèmes ait été proposée dès 1981 ( Miles *et al.*, 1981) on n'a toujours pas pu rattacher à des zymodèmes particulières les tropismes digestifs ou cardiaques, pas plus que la présence ou l'absence de pathogénicité, bien que des résultats récents plaident en faveur de cette hypothèse (Montanat *et al.*, 1996).

Une des difficultés de ces études réside dans le fait que de nombreux malades sont infectés par deux ou plusieurs génotypes clonaux (Brenière *et al.*, 1985). Or, il n'est pas

certain que les essais d'isolement à partir d'un patient permettent le développement de toutes les souches (génotypes clonaux) dont il est porteur (Wéry, 1995).

Une autre approche pour étudier les spécificités biologiques des génotypes de *T. cruzi* est l'approche expérimentale. Sur la base de caractéristiques biologiques et des profils histopathologiques expérimentaux sur animaux, Andrade et Magalhanes (1997) ont proposé le terme de biodème pour définir un ensemble de souches présentant des caractéristiques biologiques identiques ou similaires.

Des travaux de longue haleine ont été menés dans notre laboratoire, ou en collaboration avec d'anciens stagiaires de notre laboratoire, tous basés sur la même approche de base: un échantillon standard de souches représentatives de la diversité génétique totale de l'espèce, clonées au laboratoire avec vérification sous le microscope, sont testées pour un certain nombre de paramètres expérimentaux quantifiés dont les principaux sont la vitesse de croissance en culture, l'infectiosité pour les cellules « vero », la sensibilité aux drogues anti-chagasiques in vitro et in vivo, la pathogénicité chez la souris, et la transmissibilité par *Triatoma infestans*. On cherche alors une association statistique entre le génotype des souches et leurs propriétés biologiques. Pour plus de 90% des caractères analysés, on a retrouvé une telle association, avec un degré de signification statistique élevé. Cependant, la variance des données est importante, ce qui signifie que pour un génotype donné, les données sont dispersées, et qu'il y a un chevauchement des valeurs entre génotypes différents, bien que les différences de moyennes entre valeurs obtenues pour des génotypes différents soient hautement significatives (Laurent *et al.*, 1997, De Lana *et al.*, 1998 ; Pinto *et al.*, 1998 ; Revollo *et al.*, 1998 ; De Lana *et al.*, 2000 ; Pinto 2000 ; Toledo *et al.*, 2002 ; 2003). Enfin, Macedo & Pena (1998) ont récemment proposé que les génotypes clonaux de *T. cruzi* avaient un tropisme tissulaire spécifique.

# **Analyse du polymorphisme des gènes exprimés chez *Trypanosoma cruzi* par la technique RADES**

## **1 Introduction**

Comme nous l'avons rappelé dans le précédent chapitre, la grande variabilité des symptômes de la « Maladie de Chagas » et sa répartition géographique, pourrait être due en partie à l'hétérogénéité génétique de *T. cruzi*. Il est donc crucial d'avoir une connaissance approfondie de cette hétérogénéité et de ses mécanismes d'apparition.

La façon dont se distribue la diversité génétique du parasite fait toujours l'objet de vifs débats, même si les grandes lignes (existence de deux subdivisions principales, importance de l'évolution clonale) font l'objet d'un consensus.

Comme il a été rappelé dans le chapitre précédent, plusieurs auteurs ont proposé que la diversité génétique de *T. cruzi* pouvait avoir un fort impact sur ses propriétés médicalement importantes, en particulier sa transmissibilité chez l'insecte vecteur, sa sensibilité aux drogues anti-chagasiques et sa pathogénicité (formes cliniques de la maladie de Chagas).

Les marqueurs qui ont permis de rassembler nos connaissances actuelles sur la diversité génétique de *T. cruzi* (modèle clonal, total de 6 DTUs identifiables à ce jour) sont avant tout les isoenzymes (Tibayrenc *et al.*, 1981 ; 1986 ; Barnabé *et al.*, 2000), les RAPD (Tibayrenc *et al.*, 1993 ; Brisse *et al.* 2000), et les microsatellites (Oliveira *et al.*, 1998).

Les microsatellites sont considérés comme sélectivement neutres, et la même hypothèse de travail est généralement retenue pour les isoenzymes (Ayala, 1982). Les RAPD sondent le génome au hasard. On pense que le génome de *T. cruzi* contient environ 50% de séquences non codantes (El Sayed, communication personnelle).

Quant aux séquences codantes, comme pour tout organisme vivant, à tel moment et pour tel état physiologique, une grande partie est réprimée, non exprimée.

Les RAPD amplifient indistinctement les séquences exprimées et les séquences non exprimées.

Dans la première partie de notre travail, exposée dans le présent chapitre, nous avons cherché à analyser le polymorphisme génétique de gènes **exprimés**. Ce sont donc, (1) des séquences codantes, qui par nature, sont susceptibles d'être soumises à la sélection naturelle, puisqu'elles sont à l'origine de l'expression phénotypique du parasite; (2) ce sont para ailleurs un sous-tirage des séquences codantes, correspondant aux seuls gènes exprimés au moment de l'analyse.

Cette approche repose sur l'isolement et la caractérisation des ARN messagers par la technique de « random amplified differentially expressed sequences » (RADES; Murphy & Pellé 1994) .

## **2 Matériel et méthodes**

### **2.1 Stocks de *Trypanosoma cruzi***

Les stocks utilisés pour cette étude sont d'origines géographiques variées et ont été isolés chez des hôtes divers. Dix neuf souches de référence, représentatives de la diversité génétique totale de l'espèce *Trypanosoma cruzi* ont été sélectionnés et clonés dans notre laboratoire avec vérification du clonage sous le microscope.

La table 2 présente les origines et le génotype (DTU) des stocks utilisés dans cette étude.

Espece	Code	DTU	Genre sp.	Country	Locality
<i>T. cruzi</i> (1)	Cutia Cl1	I	<i>Dasyprocta aguti</i>	Brazil	Espiritu Santo, Colatina
<i>T. cruzi</i> (2)	SP 104 cl1	I	<i>Triatoma spinolai</i>	Chile	Region IV, Combarbala
<i>T. cruzi</i> (3)	P 209 cl93	I	<i>Homme</i>	Bolivia	Sucre
<i>T. cruzi</i> (4)	92122102	II a	<i>Procyon lotor</i>	USA	Georgia, Statesboro, Bulloch
<i>T. cruzi</i> (5)	CanIII cl1 z3	II a	<i>Homme</i>	Bresil	Bèlem
<i>T. cruzi</i> (6)	Tu 18 cl 93	II b	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivie	Tupiza
<i>T. cruzi</i> (7)	CBB cl 3	II b	<i>Homme</i>	Chili	Region IV, Tulahuèn
<i>T. cruzi</i> (8)	Mas cl 1	II b	<i>Homme</i>	Bresil	Brasilia
<i>T. cruzi</i> (9)	lw cl4	II b	<i>Homme</i>	Chili	Region IV, Coquirbo
<i>T. cruzi</i> (10)	CM17	II c	<i>Dasybus sp.</i>	Colombie	Meta, Carinaga
<i>T. cruzi</i> (11)	M 5631 cl3	II c	<i>Didelphis novemcinctus</i>	Bresil	Selva Terra
<i>T. cruzi</i> (12)	M 6241	II c	<i>Homme</i>	Bresil	Belen
<i>T. cruzi</i> (13)	MN cl 2	II d	<i>Homme</i>	Chili	Region IV, Llapel
<i>T. cruzi</i> (14)	Bug2148 cl1	II d	<i>Triatoma infestans</i>	Brésil	Rio Grande do Sul
<i>T. cruzi</i> (15)	SO 3 cl5	II d	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivie	Potosi
<i>T. cruzi</i> (16)	Sc 43 cl1	II d	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivie	Santa cruz
<i>T. cruzi</i> (17)	Cl Brener	II e	<i>Triatoma infestans</i>	Brésil	South Brazil, Rio Grande do Sul
<i>T. cruzi</i> (18)	P63 cl1	II e	<i>Triatoma infestans</i>	Paraguay	Makhlawaiya
<i>T. cruzi</i> (19)	Tula cl2	II e	<i>Homme</i>	Chili	Region IV, Tulahuèn
<i>T.c.marenkellei</i>	B3	-	<i>Phyllostomum discolor</i>	Brazil	Bahia
<i>T.c.marenkellei</i>	M109	-	<i>Phyllostomum discolor</i>	Venezuela	Caracas

**Table 2** : Liste des stocks étudiés dans la présente étude

Les numéros entre parenthèses ( ) correspondent aux numéros indiqués sur les figures.

La figure 13 (page 49) résume les degrés de parenté génétique entre les 6 DTUs , dont les souches analysées dans le présent travail sont représentatives.

## **2.2 Culture de parasites in vitro**

### **2.2.1 Epimastigotes**

Les stocks parasitaires conservés dans l'azote liquide (-180°C) sont décongelés à 37 °C. La vivacité des parasites est contrôlée sous microscope. Les stocks sont par la suite cultivés sur un milieu biphasique NNN (Novy, Mc Neal, Nicolle, annexe 1). La phase solide 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 constituée de milieu de culture Lit (Liver Infusion Tryptose, annexe 2) supplémenté de 20% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF) (45 min à 56°C).

Les parasites sont ensuite repiqués sur un mélange v/v de Lit / RPMI (annexe 3) supplémenté par 20% SVF. Une fois les parasites acclimatés, on passe sur un milieu de culture RPMI supplémenté par 20 % de SVF.

Les cultures sont repiquées dans des tubes Falcon de 15 ml quand les parasites ont atteint la phase exponentielle de croissance avec une densité cellulaire suffisante (environ  $2 \times 10^6$  parasites/ml) ce qui arrive approximativement tous les cinq jours. Les stocks sont récoltés en phase de croissance exponentielle.

Ces stocks sont récoltés par centrifugation dans le tube de culture à 1484g pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot parasitaire est resuspendu dans 1 ml de tampon PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) puis transféré dans un tube eppendorf de 1,5 ml et recentrifugés à nouveau pendant 20 min à 1484g. Dans certains cas, les culots sont en plus lavés une deuxième, ou même une troisième fois si nécessaire, selon le même protocole. Après la pesée, les culots sont conservés à -80°C.

#### **2.2.1.1 Comptage parasitaire**

Le jour de récolte de chaque souche est déterminé au moyen d'une courbe de croissance. Une homogénéisation journalière des parasites est réalisée sur cellule de Thomas.

Le nombre de parasites est calculé selon la formule suivante :

$$\text{N}^{\circ} \text{ de parasites/ml} = \text{Facteur de dilution} \times \text{Facteur de la caméra de Thomas} (250^* \times 10^3 \square).$$

\* = N<sup>o</sup> de carrés ;  $\square$  = N<sup>o</sup> de divisions de chaque carré.

Ce calcul permet d'évaluer la concentration de parasites. Les prélèvements sont dilués en fonction de leur densité avec une solution de fixation (PBS 0.01M, NaCl 190 mM, formaldéhyde 0.75%). La majorité des stocks a été récolté le 5<sup>ème</sup> jour (voir annexe 4).

### 2.2.2 Trypomastigotes

La culture de trypomastigotes est réalisée sur fibroblastes de rein du singe vert (cellules Vero). A cet effet,  $2 \times 10^5$  cellules (conservées en azote liquide) sont décongelées puis déposées dans une boîte Falcon de 75 ml dans un milieu de culture RPMI SVF5 %. Elles sont cultivées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Pour un repiquage, on utilise une solution de trypsine-EDTA (environ 1 ml jusqu'à recouvrement de la surface cellulaire) qui sépare les cellules de la paroi de la boîte. Le changement de milieu a été fait tous les deux jours. Les cellules adhèrent immédiatement à la paroi de la boîte en formant une monocouche. C'est à ce stade que l'on réalise l'infection des cellules à partir d'une culture âgée d'épimastigotes contenant quelques trypomastigotes.

Après 24 h de contact parasites-cellules, la boîte est lavée avec du PBS 1X pour éliminer les parasites qui n'ont pas adhéré aux cellules ou ceux qui demeurent encore sous la forme d'épimastigotes.

Les cultures sont vérifiées chaque jour sous microscope et leur milieu, remplacé tous les deux jours, selon les conditions décrites précédemment. Après quelques jours, la majorité des cellules est infectée. La récolte des parasites se déroule au moment de la lyse cellulaire et de l'échappement total des trypomastigotes. Les surnageants sont récupérés puis centrifugés à 835g pendant 5 min.

Lors de cette récolte, la présence d'amastigotes et de restes cellulaires est inévitable. Le culot des trypomastigotes est resuspendu dans 2 ml de PBS 1X, et les trypomastigotes sont purifiés par une centrifugation sur un gradient de saccharose.

### • Gradient de saccharose

Trois ml de chaque concentration de saccharose, 40%, 20% et 10% (poids/poids) dans le PBS 1X, sont déposés par ordre croissant de concentration dans un tube Falcon de 15 ml en prenant soin de bien séparer les phases. La solution contenant des parasites est ensuite superposée et les tubes sont centrifugés 10 min à 1484g. Sous microscope, les trypomastigotes sont visibles dans l'interphase de la couche de 10%. Cette phase est reprise et immédiatement centrifugée à 1484g. Les culots sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cette étape est très délicate du fait de la fragilité et de l'instabilité des trypomastigotes.

### 2.2.3 Cryoconservation

Pour préserver les stocks sur une longue période, nous avons utilisé la cryoconservation dans l'azote liquide: Un ml de culture en phase exponentielle est transvasée dans un cryotube Nunc de 2 ml. On y ajoute, en mélangeant doucement, goutte à goutte 50  $\mu\text{l}$ . de DMSO (diméthylsulfoxyde). Les cryotubes sont ensuite soumis à une diminution progressive de température pour atteindre respectivement  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à  $-120^{\circ}\text{C}$  (Appareil à conservation de cryo-Rivoire). Dès que cette dernière température est atteinte, les tubes sont transférés dans l'azote liquide ( $-160^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.3 Contrôle du génotype

Afin d'éliminer toute erreur de manipulation ou de contamination, une analyse isoenzymatique de l'ensemble des stocks est réalisée avant leur utilisation. L'identification isoenzymatique est basée sur cinq systèmes. Les systèmes utilisés sont présentés dans le tableau 2.

### 2.3.1 Electrophorèse des isoenzymes

#### 2.3.1.1 Préparation des extraits enzymatiques

Les parasites sont lysés par l'addition d'un volume égal d'une solution hypotonique "stabilisatrice d'enzymes" (dithiothreitol 2mM, acide  $\epsilon$ -aminocaproïque 2 mM, EDTA 2mM pH 7,4) à  $4^{\circ}\text{C}$ , suivie d'une incubation de 20 min dans la glace. Puis ce lysat est centrifugé à 156g pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les surnageants sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.1.2 La migration**

L'électrophorèse est réalisée sur plaques d'acétate de cellulose (Helena® Beaumont, Texas, dimension 9,5 cm. x 7,5 cm.), préalablement imbibées pendant 20 min dans un tampon spécifique pour chaque système.

Ensuite, 10 µl de l'extrait cellulaire est déposé dans un réceptacle spécifique (Helena®) et environ 0,3 µl sont appliqués sur la plaque d'acétate au moyen d'un peigne. Enfin, la migration est lancée dans des conditions spécifiques à chaque enzyme (annexe 5).

### **2.3.1.3 La révélation**

Les isoenzymes sont révélées par des procédés biochimiques en présence de leur substrat spécifique, et des cofacteurs nécessaires à leur activité (coenzymes de liaison, ions).

Pour mettre en évidence la position de l'enzyme, il est nécessaire d'ajouter au substrat une substance colorée susceptible de réagir avec le produit de la réaction catalysée. Les solutions colorantes spécifiques sont ajoutées à l'avance au milieu d'agarose à 1,2% qui contient également les substrats spécifiques à chaque système (annexe 5). Les gels sont conservés dans l'obscurité avant usage.

A l'arrêt de la migration, les plaques d'acétate sont déposées sur les gels de révélation et incubées à 37°C. Lorsque les bandes sont nettes, la réaction est bloquée par immersion dans de l'acide acétique à 5% pendant 10 min. Les plaques sont ensuite rincées à l'eau distillée et séchées à l'air ambiant.

## **2.4 Technique de Random Amplified Differentially Expressed Sequences (RADES)**

### **2.4.1 Principe**

Cette méthode dérive de celle du « RNA Differential Display » (Liang & Pardee, 1992). Elle est basée sur l'étude de l'ARN messager. Le RADES (Random Amplified Differentially Expressed Sequences; (Murphy & Pellé, 1994). a été mis a point pour *Leishmania sp.* dans notre laboratoire par Mallorie Hide. Cette technique permet d'explorer l'ARN qui est rétrotranscrit par la synthèse du brin complémentaire (ADNc) de l'ARNm .

## 2.4.2 Extraction de l'ARN messenger

Les ARNm sont isolés à partir de culots parasitaires cultivés et récoltés grâce à un système de billes magnétiques (Dynal ®) de 2.8µm de diamètre. A la surface des billes sont liées les oligonucléotides de 25 déoxythymidines (dT 25).

Ces billes sont mises sur un portoir magnétique où le tampon de conservation est remplacé pour un tampon de lyse (100mM Tris-HCl, pH 7,5, 500mM LiCl, 10 mM EDTA, pH 8, 1% LiDS, 5mM dithiothreitol).

Le culot parasitaire est resuspendu dans 500 µl de tampon de lyse à 4°C. La solution des parasites lysés est mise en contact avec des billes pour permettre l'hybridation des queues poly(A) des ARNm avec l'oligo (déoxythymidines). Pour assurer un meilleur contact avec les billes, ils sont mélangés sur une roue pendant 5 min a température ambiante.

La solution est ensuite placée sur un portoir magnétique pendant 5 min, durant lesquelles les billes qui ont leur oligodéoxythymidines déjà associées à l'ARNm, se concentrent sur la paroi du tube par attraction magnétique.

Le lavage des billes chargés en ARNm est réalisé d'abord avec 600 µl de tampon de lavage A (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1mM EDTA, 0.1% LiDS). Ensuite, trois à quatre lavages a température ambiante sont réalisés avec le tampon B (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1mM EDTA).

L'ARNm est élué avec 20 µl d'une solution 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 à une température de 65°C pendant 2 min. Le surnageant contenant l'ARNm est gardé à -80°C.

### 2.4.2.1 Dosage d'ARNm

Deux µl d'ARNm sont dilués avec 73 µl d'eau et l'absorption est mesuré à 260 nm. La quantité d'ARNm est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration ARNm (ng/}\mu\text{l)} = \text{Densité optique (260 nm)} \times \text{Facteur de dilution (37.5)} \times 40$$

Où :

$$1 \text{ Densité optique (260nm)} = 40 \text{ ng /}\mu\text{l d'ADN simple brin.}$$

## 2.4.3 Préparation de l'ADNc

### 2.4.3.1 Rétrotranscription

L'ARNm qui vient d'être extrait est hybridé avec une amorce complémentaire à la queue poly(A) qui possède l'ARNm. Cette amorce est constituée de 18 bases de déoxythymidine (dT18) et 0,5 µg amorce par 1 µg d'ARNm est dilué avec de l'eau ("RNase free") dans un volume de 15 µl. La solution est incubée pendant 5 min à 70 °C, afin de dénaturer les structures secondaires de l'ARNm et de favoriser l'hybridation de l'oligo (dT). Puis le tube est immédiatement placé sur de la glace pendant 5 min.

Pour que la rétrotranscription soit réalisée, on ajoute sur cette dernière solution les dNTP à une concentration de 12,5 nmol/µg d'ARNm un inhibiteur de la ribonucléase (RNAsin, Promega) et 5µl de tampon de réaction 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl, 50 mM Dithiothreitol, 2,5 mM spermidine) ainsi que 15 U (par µg d'ARNm) de AMV Reverse Transcriptase (Promega) dans un volume final de 20 µl. Le milieu de la réaction est incubé à 42°C pendant 60 minutes. La figure 13 montre la procédure d'obtention de l'ADNc.

### 2.4.3.2 Purification de l'ADN complémentaire (ADNc)

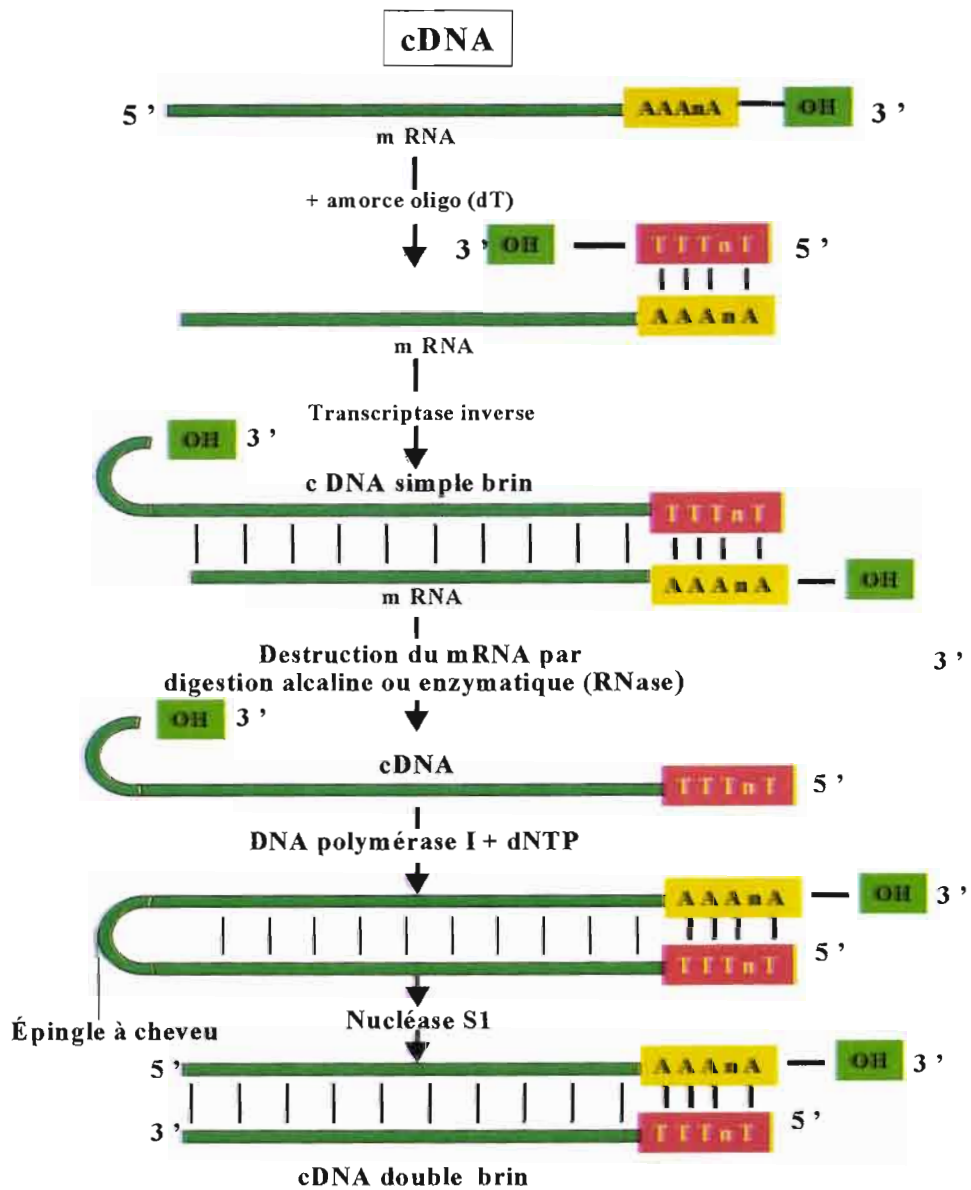
La purification est réalisée grâce au kit d'extraction "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen) selon le protocole du fabricant. En bref, l'ADN est dilué dans une solution dénaturante qui facilite la liaison de l'ADN sur une membrane disposée dans adaptateur sur un tube eppendorf. Après le lavage de la membrane, l'ADN est élué par une solution de 10 mM Tris-HCl (pH 8,5). Ce procédé permet d'éliminer les amorces de moins de 40 bases, les dNTP, les enzymes, et toutes autres impuretés.

L'ADNc est dosé par spectrophotométrie à 260 nm. (voir section précédente). La concentration est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration ADNc (ng/}\mu\text{l)} = \text{Densité optique (260 nm)} \times \text{Facteur de dilution (37.5)} \times 33$$

Où :

$$1 \text{ Densité optique (260nm)} = 33 \text{ ng /}\mu\text{l d'ADN simple brin}$$



**Figure 13** : Procédé de rétrotranscription

### 2.4.3.3 Amplification de l'ADNc

Les ADNc obtenus après rétrotranscription étant en quantité insuffisante pour une analyse RAPD multi-amorces,, il faut les amplifier par PCR avec une amorce complémentaire de la séquence conservée du mini-exon (séquence leader de 39 nucléotides en position 5', présente sur tous les ARN messagers matures des Trypanosomatidae {Laird1989}). La SL de *T. cruzi* est 5' AAC UAA CGC UAU UAU UG/A UAC AGU UUC UGU ACU AUA UUG...3'

Sur cette première séquence, une amorce de 23 b appelée SL est synthétisé (5'GAT ACA GTT TCT GTA CTA TAT TG 3') (MWG-Biotech). L'amplification est faite de manière bidirectionnelle, (deux amorces sont ajoutées). SL d'un côté et oligo (dT18) de l'autre. Trente ng d'ADNc sont amplifiés par réaction. Le mélange réactionnel contient 80µM de chaque dNTP, 3 µl de tampon 10X (1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10 mM de tris-HCl, pH 8.3), 1 U de Taq polymérase (Boeringer), l'amorce SL (0,6 µM) et l'amorce dT18 (0,6 µM). Le volume final est amené à 30 µl.

Le premier cycle d'amplification : dénaturation à 94°C pendant 2 min, hybridation à 61°C pendant 1min 30sec et élongation de 3 min à 72°C, est suivi de 10 cycles de: 30 sec à 94°C, 1 min30 sec à 61°C et 3 min à 72°C. Ensuite, on applique 25 cycles de 30 sec à 94°C, 1 min 30 sec à 45 °C, et 3 min à 72°C. Enfin, un dernier cycle de température d'élongation à 72°C pendant 5 min est appliqué. Les produits amplifiés sont séparés sur un gel d'agarose à 1,6% et visualisés avec du bromure d'ethidium.

L'ADN obtenu est purifié une deuxième fois par le kit "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen) selon le protocole de fabricant.

Enfin, l'ADN est dosé par spectrophotométrie (260 nm) avec la formule suivante:

$$\text{Concentration ADNc (ng/}\mu\text{l)} = \text{Densité optique (260 nm)} \times \text{Facteur de dilution (37.5)} \times 50$$

Où :

$$1 \text{ Densité optique (260nm)} = 50 \text{ ng /}\mu\text{l d'ADN double brin}$$

Ces ADNc sont ensuite utilisés dans les expériences de la technique de RAPD.

## **2.5 Technique d'amplification aléatoire de l'ADN : RAPD**

### **2.5.1 Extraction de l'ADN**

L'ADN est purifié à partir de culot de parasites. Trois étapes vont suivre : la lyse parasitaire, la déprotéinisation et la précipitation de l'ADN.

#### **2.5.1.1 Lyse cellulaire**

Les culots sont resuspendus dans 500µl du tampon de lyse (Tris-HCl 10mM (pH 8), EDTA 1mM, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 1% en présence de 100 µg/ml de RNase A et incubés 2 h à 37°C. Ensuite, la protéinase K (200 µg/ml) est ajoutée à la suspension cellulaire et le mélange est incubé à 55°C pendant une nuit.

#### **2.5.1.2 Déprotéinisation**

Les restes de protéines et les lipides sont éliminés au moyen d'une série d'extractions phénol/chloroforme. La suspension cellulaire est mélangée avec un volume égal de phénol, puis homogénéisée pendant 1 minute, et centrifugée à température ambiante à 156g pendant 5 min. La phase aqueuse contenant l'ADN est prélevée et déposée sur autre microtube, lequel subit une deuxième extraction au phénol. Ensuite, une extraction phénol chloroforme / alcool isoamylique (24 :1) est réalisée afin d'éliminer les lipides et les lipoprotéines. Enfin, deux extractions au chloroforme sont faites pour enlever toute trace de phénol.

### **2.5.2 Précipitation de l'ADN**

La précipitation est réalisée par addition d'éthanol (froid) 2,5 volume en présence d'acétate de sodium 0,3M pendant 1 h à -20°C. Les ADN sont ensuite centrifugés 20 min à 4 °C à 9279g, puis, après élimination du surnageant, le culot d'ADN est lavé à l'éthanol à 70% et séché à température ambiante. En dernier lieu, l'ADN est resuspendu dans 50 µl de TE (Tris-HCl pH 8, 10 mM, EDTA 10mM).

Les ADN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm en triplicata, puis stockés à -20°C avant utilisation.

## **2.5.3 Amplification aléatoire de l'ADN**

### **2.5.3.1 Thermocyclage**

Des nombreuses amorces décarnériques testées, dix-huit ont été retenues ; elles appartiennent aux kits A, E, F, N, R, et U (Operon Technologies, Alameda, USA) (annexe 6).

Les milieux de réaction sont préparés dans des conditions stériles qui contiennent 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.3, 100 µM de chaque dNTP 200 µM d'amorce et 0,9 unités de Taq polymérase (Boehringer Mannheim).

Les concentrations des ADNc sont déterminées par spectrophotométrie à 260 nm. Avant leur utilisation, les ADNc sont dilués à une concentration finale de 10 ng/µl. Vingt ng d'ADNc (2µl.) sont ajoutés au milieu de réaction, pour un volume final de 60 µl.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur PTC-100 (MJ Research Inc, USA) à couvercle chauffant. Le programme a été standardisé au laboratoire. Il comprend une étape de dénaturation initiale de la matrice d'ADN à 94°C pendant 5 min, suivie de 45 cycles comprenant 1 min à 94°C, 1 min à 36°C, 2 min à 72°C, suivis d'une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C.

Pour vérifier la spécificité des bandes et donc l'absence d'ADN contaminant, chaque série de cinq amplifications est réalisée avec un témoin négatif (eau).

### **2.5.3.2 Migration et révélation**

Dix µl de chaque amplification sont mélangés avec 1 µl de solution de Bleu de Bromophénol 0,25 % et de xylène cyanol FF 1,5 %, puis déposés dans un puits de gel d'agarose à 1,6 %. La migration est faite dans un tampon TAE 0,5 X (40 mM Tris Acétate, 1 mM EDTA) pendant 30 min à 100 V. Le gel est ensuite coloré dans un bain de TAE contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Les produits d'ADN amplifiés sont séparés selon leur poids moléculaire et visualisés sous UV.

### **2.5.3.3 Interprétation des bandes**

Chacun des profils correspond à l'amplification par une amorce RAPD donnée, compte tenu que les amorces RAPD amplifient des régions anonymes du génome. Par contre on ne peut pas faire une interprétation allélique des profils obtenus. Le RAPD est un marqueur assimilable à un caractère génétique, même si chaque amorce est susceptible

d'amplifier plusieurs locus chez une même souche, et/ou d'amplifier des locus différents d'une souche à l'autre. Donc le génotype d'une souche sera constitué par la combinaison de la totalité des profils d'amplification.

Pour l'analyse en génétique des populations, ce traitement des données est admis {Tibayrenc1995} car les risques que deux amorces amplifient les mêmes locus sont négligeables. En effet, l'important est que deux amorces différentes amplifient des séries de locus indépendants les uns des autres.

## **2.6 Clonage de fragments spécifiques de DTU ("tags")**

Les amplifications générées par les amorces décamériques sont nombreuses et de tailles diverses. Le fragment à cloner est d'abord découpé après migration sur gel d'agarose. Le découpage se fait par contrôle visuel sous rayons UV.

Comme la quantité disponible d'ADN est faible, il est nécessaire de faire une réamplification avec la même amorce décamérique. Ensuite, nous obtenons une quantité suffisante d'ADN du fragment qui nous intéresse. Il est donc nécessaire de nouveau de découper la bande sur le gel d'agarose préalablement coloré avec du BET.

### **2.6.1 Purification d'ADN à partir de bandes spécifiques de DTUs**

La purification est effectuée, grâce à l'aide du kit "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen) selon le protocole du fabricant. En bref, la bande découpée qui contient l'ADN, est submergée dans une solution QG fournie dans le kit (3 volume de tampon pour 1 volume de gel où 100 mg de gel est équivalent à 100 µl). Ce mélange est incubé à 50° C pendant 10 min. Un volume identique d'isopropanol est alors ajouté, et le mélange est déposé dans une mini- colonne séparatrice Quiagen. Puis la colonne est centrifugé à 133g pendant 1 min.

Ensuite, on ajoute 750 µl d'une solution de lavage suivi d'une centrifugation à 133g pendant 1 min. L'ADN est récupéré dans un microtube propre dans 50 µl de solution d'éluion [10 mM Tris-HCl (pH 8,5)].

### **2.6.2 Ligation**

La ligation est réalisée dans un volume final de 10 µl. Le mélange réactionnel est composé de 1µl de T4DNA ligase, 1 µl de tampon 10X 1 µl de vecteur pGEM-T, 7 µl

d'ADN (la quantité de vecteur pGEM-T doit être équimolaire par rapport à la quantité d'ADN). Le produit de ligation est incubé à 4°C pendant une nuit.

### **2.6.3 Transformation**

Nous avons utilisé les bactéries compétentes JM109. Certaines font partie du kit pGEM-Easy (Promega) et les autres ont été préparées dans notre laboratoire (annexe 7).

Dans les deux cas, les cellules sont stockées à -80°C, puis décongelées quelques minutes avant leur utilisation. Nous avons mis 100 µl de cellules compétentes en présence de 5 µl de produit de ligation. Le mélange est incubé dans la glace pendant 20 min. Ensuite un choc thermique est appliqué: 42°C pendant 50 sec. Les tubes sont remis sur la glace pendant 2 min, ensuite on ajoute 900 µl de milieu LB (annexe 8) et les bactéries sont incubées sous agitation pendant 90 min. à 37°C.

Finalement, 200 µl de produit de transformation en culture sont mélangés avec 50 µl d'IPTG 100 mM et 20 µl de X-gal 2%. Ensuite 200 µl de ce mélange est étalé sur des boîtes de Pétri contenant un milieu LB-agar additionné de 50 µg/ml d'ampicilline.

### **2.6.4 Minipréparations**

Les minipréparations ont été effectuées grâce au kit "QIAquick minipreps kit" (Qiagen) selon le protocole du fournisseur.

### **2.6.5 Digestion enzymatique**

Deux µl de solution d'ADN plasmidique sont digérés pendant 1 h à 37°C en présence de l'enzyme *EcoRI* (2 unités par tube) et du tampon approprié. La digestion est effectuée dans un volume final de 10 µl. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour le contrôle de la présence et de la taille du fragment cloné.

### **2.6.6 Séquençage**

Les réactions de séquençage ont été réalisées pour les deux brins complémentaires. Le volume de réaction est de 20µl. Le milieu contient 2µl de Terminator Ready Mix, 6 µl de tampon de séquençage (Tris-HCL 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), 300 ng d'ADN (environs) et une amorce « T7 » qui amorce le séquençage sur le plasmide dans le sens de 3'→ 5' ou « M13 reverse » qui amorce dans le sens 5'→3'.

Le programme de synthèse est le suivant : 25 cycles ( 96°C 10 sec, 50°C 10 sec, 60°C 4 min) sur un Thermo-cycleur GeneAmp®2400. L'ADN synthétisé est purifié par précipitation pour éliminer tous les terminateurs de chaînes fluorescents libres et les sels qui peuvent gêner la lecture des séquences. Cette procédure est réalisée dans un microtube de 1,5 ml où nous avons transféré les 20µl du produit d'extension, 16 µl d'eau et 64 µl d'éthanol 96% (concentration finale 60 +/- 3% où à la place de celui-ci, 80 µl d'isopropanol 75%). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 15 min pour précipiter les produits d'extensions. Les tubes sont centrifugés à 156g pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et les culots sont rincés avec 250 µl d'éthanol 70% (si la précipitation a été faite avec de l'isopropanol, le rinçage se fait avec 250 µl d'isopropanol 75%), vortexés, et centrifugés 10 min à 156g. Enfin le surnageant est aspiré délicatement et les tubes laissées ouverts pour les sécher complètement.

Pour le chargement des échantillons dans l'appareil de séquençage ABI-PRISM 3700, les culots d'ADN sont repris dans 20 µl de formamide déionisée et transférés dans des multiplaques 96 puits.

## **2.7 Méthodes d'analyse**

### **2.7.1 Indices de variabilité génétique**

#### **2.7.1.1 Taux de polymorphisme**

Il représente le pourcentage de locus polymorphes sur la totalité des locus étudiés. Dans le cas des RAPD, le polymorphisme généré par une amorce donnée est considéré comme un locus dans les calculs statistiques, bien qu'en général, il corresponde en fait à une série de locus. Mais les séries de locus amplifiés par deux amorces différentes sont indépendantes, ce qui est la chose importante pour les analyses de génétique des populations et les analyses phylogénétiques (Tibayrenc et al., 1993). Les locus dont le polymorphisme repose uniquement sur des variants très rares ne sont pas pris en compte. Par convention, les locus considérés comme polymorphes seront ceux dont le variant le plus fréquent présente une fréquence supérieure ou égale à 0,01 ou à 0,05.

#### **2.7.1.2 Diversité génétique moyenne**

Sa formule est identique à celle de l'hétérozygotie théorique moyenne, c'est-à-dire à la fréquence théorique moyenne des génotypes à l'état hétérozygote dans l'échantillon.

La formule peut être appliquée dans le cas des RADES et RAPD, en assimilant le produit d'amplification obtenu par chaque amorce à un locus (voir plus haut).

La diversité génétique ( $h_j$ ) pour un locus  $j$  donné est calculée selon la formule suivante :

$$h_j = 1 - \sum x_{ij}^2 [n/(n-1)]$$

Où

$N$  : nombre d'amorces RADES ou RAPD pour chaque stock

$x_{ij}^2$  : fréquence relative du premier allèle au locus  $j$  (la fréquence du génotype pour une amorce donnée).

La diversité génétique moyenne par locus ( $H$ ) est la moyenne arithmétique de ( $h_j$ ) pour tous les locus considérés. Sa formule est :

$$H = \sum h_j / r$$

Où

$r$  : nombre de locus considérés

La diversité génétique à chaque locus ( $h_j$ ) et la diversité génétique moyenne ( $H$ ) sont calculées à partir des fréquences alléliques générées par le logiciel Genetics ToolBox (Sébastien Noël, CEPM, IRD, Montpellier)

### 2.7.1.3 *Indice de diversité génotypique*

L'indice de diversité génotypique est le rapport du nombre de génotypes différents sur le nombre total d'individus (souches). Il peut être calculé pour un locus donné, ou pour un ensemble de locus.

## 2.7.2 Analyses phylogénétiques

Les méthodes phylogénétiques sont utilisées pour reconstruire l'histoire évolutive d'une espèce donnée.

Cette analyse nous permet de comparer les organismes entre eux et de reconstruire leurs liens de parenté sur la base des données obtenues de différents marqueurs génétiques.

Les arbres obtenus peuvent être interprétés comme des arbres phylogénétiques vrais uniquement dans le cas d'une évolution clonale, au cours de laquelle les différentes lignées clonales ont évolué de façon indépendante, c'est-à-dire sans échanger de matériel génétique entre elles. Chaque clone est alors assimilable à une unité évolutive. Comme nous l'avons exposé dans le chapitre 1, ceci n'est pas totalement vérifié dans le cas de *T. cruzi*.

Il existe différentes méthodes pour construire des phylogénies, nous présentons ici celles utilisées au cours de ce travail.

### 2.7.2.1 Méthodes phénétiques

Ces méthodes se proposent d'établir des arbres sur la base de la ressemblance globale entre unités évolutives. Elles se fondent donc sur l'estimation d'une distance entre chaque paire d'unités évolutives.

La ressemblance est globale et très importante entre deux unités évolutives quand leurs liens de parenté sont étroits. La parenté est fondée sur tous les caractères, non seulement les synapomorphies (caractères dérivés partagés entre plusieurs individus ou plusieurs lignées), mais également les caractères plésiomorphes (ancestraux) et les caractères homoplasiques (= caractères dont la ressemblance n'est pas due à une ancestralité commune). Sur ce point ils se distinguent des autres méthodes.

### 2.7.2.2 Distance génétique de Jaccard

La distance utilisée dans ce travail est la distance génétique de Jaccard qui permet de quantifier la dissemblance entre deux génotypes par le calcul du pourcentage de bandes communes sur le total de bandes.

Sa formule est la suivante :

$$D = 1 - A/(A+B+C)$$

A = nombre de bandes communes entre les deux génotypes

B = nombre de bandes présentes dans le 1° génotype et absentes dans le 2°

C = nombre de bandes présentes dans le 2° et absentes dans le 1°

Pour ce calcul de distances nous avons utilisé le programme informatique « Genetics » élaboré dans notre laboratoire.

### **2.7.2.3 Méthodes d'agglomérations**

Les méthodes agglomératives regroupent entre elles les unités évolutives qui se ressemblent le plus et situent des niveaux de hiérarchie entre elles sur la base de ces ressemblances.

Les dendrogrammes sont construits à partir de la matrice de distances de Jaccard (hiérarchique ascendante) avec la méthode UPGMA (unweighted pair group method of arithmetic averages, (Sneath & Sokal 1973)). Les unités évolutives les plus similaires y sont regroupées successivement dans le but d'inclure chaque unité dans une subdivision, puis de lier et de hiérarchiser ces subdivisions.

A chaque étape de regroupement, la distance de l'ensemble ainsi créé à toutes les autres unités évolutives est calculée comme la moyenne arithmétique des distances de chaque unité incluse dans le groupe, aux unités externes au groupe. Cette méthode est sans doute la plus utilisée à l'heure actuelle, mais elle implique l'hypothèse d'un taux d'évolution constant dans toutes les branches de l'arbre (ultra-métrie ou horloge moléculaire fixe).

La méthode dite du « Neighbor-Joining » ou NJ (Saitou & Nei, 1987) est une méthode qui ne pose pas l'hypothèse d'un taux évolutif constant dans les arbres. Donc, l'hypothèse évolutive d'horloge moléculaire n'est pas posée. En revanche, les distances doivent être métriques et additives. Elle produit un arbre non enraciné. La racine peut cependant être localisée par l'utilisation d'un groupe externe, c'est-à-dire d'une unité évolutive dont on sait qu'elle a divergé antérieurement à toutes les autres. Nous avons utilisé l'algorithme NJ du programme Neighbour du logiciel PHYLIP (Felstein, 1993).

Les dendrogrammes ainsi construits peuvent être considérés comme des arbres phylogénétiques dans la mesure où les hypothèses de travail sont respectées. Ces arbres

(UPGMA et Neighbor-Joining) ont été dessinés grâce au programme Tree View (Page, 1996).

#### 2.7.2.4 Méthode de « bootstrap »

La méthode de « bootstrap » est une procédure de re-échantillonnage suivi d'une analyse phénétique ou phylogénétique conduisant à l'obtention d'un arbre consensus. Elle consiste à tirer au hasard avec remise en jeu un ensemble de K caractères parmi les K caractères que constituent les données brutes. Elle revient à pondérer les caractères de manière aléatoire. Le tirage au hasard se faisant avec remise signifie que le nouvel échantillon est constitué lui aussi de K caractères. Il peut contenir plusieurs fois des mêmes caractères, retirés après remise, ou au contraire, d'autres caractères absents qui ne sont jamais tirés.

Cette procédure de ré-échantillonnage peut être effectuée N fois (dans ce travail N correspond à 100 fois), et est suivie à chaque fois d'une recherche d'arbre. A partir de ces N arbres obtenus (qui peuvent éventuellement être différents), un arbre est construit selon le principe de consensus majoritaire. L'arbre consensus obtenu présente à chaque nœud les valeurs de bootstrap, celles qu'indiquent le nombre de fois où l'on a obtenu les mêmes associations sur l'ensemble de re-échantillonnages effectués. La méthode de bootstrap est une méthode statistique qui permet d'avoir une idée sur la robustesse des nœuds. D'un point de vue pragmatique, elle peut donner des informations intéressantes même si elles ne sont pas interprétables en termes de théorie des tests.

Pour tester l'existence d'une unité évolutive (quelle que soit l'organisation phylogénétique interne), il suffit de dénombrer combien de fois on la retrouve parmi les N arbres. Si l'on donne la valeur 1 à la présence et 0 à l'absence de l'unité évolutive à tester, le paramètre testé est l'occurrence de l'unité évolutive. Par exemple, une unité évolutive retrouvée dans 95% des échantillons signifie qu'il y a 5 chances sur 100 de se tromper.

Les procédures de bootstrap et de construction d'arbre consensus ont été réalisées à l'aide du programmes Seqbot Mix du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993). L'arbre consensus a été dessiné grâce au programme Tree View.

## 2.7.3 Méthode d'analyse de génétique des populations

### 2.7.3.1 *La génétique des populations*

Dans le cas de micro-organismes, l'analyse de génétique des populations de l'organisme s'est focalisée sur le débat "clonalité/sexualité". Les tests statistiques proposés par Tibayrenc, Kjellberg & Ayala (1990) utilisent comme hypothèse nulle une situation panmictique (échanges génétiques libres) et sont basés sur les deux conséquences fondamentales d'une reproduction sexuée, la ségrégation des allèles à des locus donnés et la recombinaison des génotypes d'un locus à l'autre. Donc, ces tests sont de deux types : (i) les tests de ségrégation (fondés sur l'équilibre d'Hardy-Weinberg) et (ii) les tests de recombinaison (fondés sur l'étude du déséquilibre de liaison, ou association non aléatoire de génotypes à des locus différents). Les tests de ségrégation et de recombinaison ont été exposés en détail par Tibayrenc, Kjellberg & Ayala (1990). Dans le présent travail, nous avons utilisé uniquement le suivant:

### 2.7.3.2 *Test de corrélation entre des séries de marqueurs génétiques indépendants ou test « G »*

Le test G (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990) analyse un cas extrême de déséquilibre de liaison, l'association entre séries de marqueurs génétiques différents (par exemple isenzymes et RAPD, ou RAPD et microsatellites). On recherche une corrélation entre les distances génétiques générées par ces marqueurs indépendants pour une série donnée de souches. On utilise un test non paramétrique de Mantel (1967) avec simulations de Monte Carlo avec  $10^4$  tirages qui permutent au hasard les différentes cellules de l'une des deux matrices de distances. Le test ne fait aucune inférence quand au degré de liberté, à la différence d'un test de corrélation classique.

Ce calcul de corrélation est réalisé sur la base des matrices de distances de Jaccard par le programme informatique Génetics Toolbox.

### 3 Résultats

#### 3.1 Polymorphisme isoenzymatique

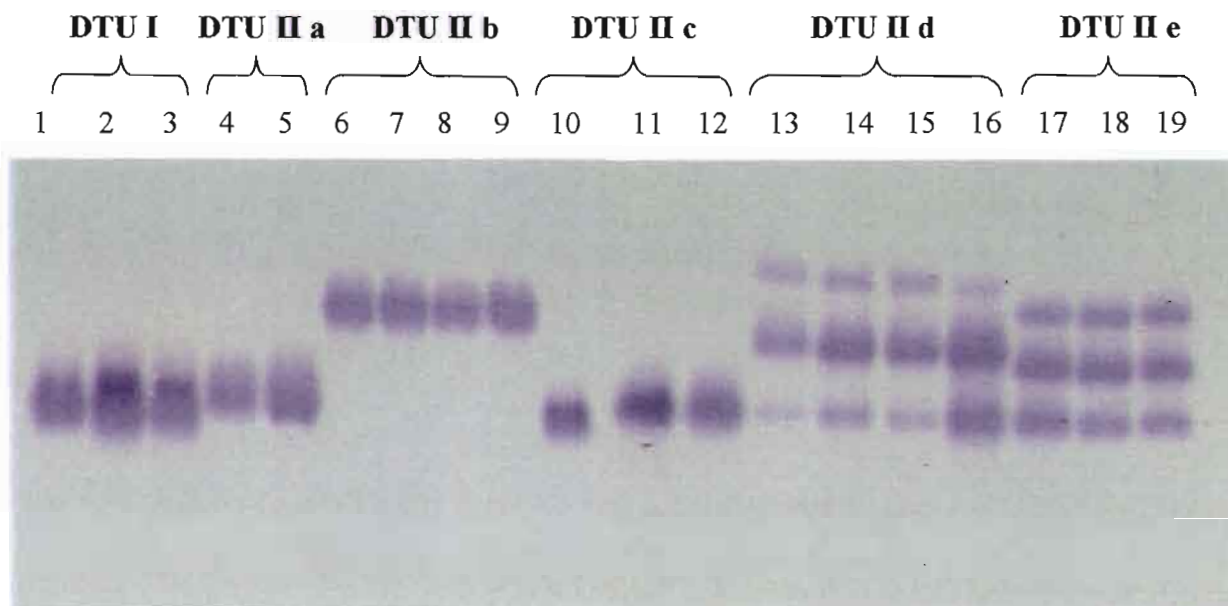
##### 3.1.1 Profils isoenzymatiques

L'analyse isoenzymatique réalisée dans ce travail s'est fondée sur 6 systèmes isoenzymatiques (tab. 3).

Code	Enzyme
6PGD	Phosphogluconate deshydrogenase
ME	Malic enzyme
GPI	Glucose-phosphate isomerase
IDH	Isocitrate deshydrogenase
GDH	Glutamate deshydrogenase
DIA	Diaphorase

**Tableau 3:** Codes et noms des 6 systèmes utilisés dans notre travail.

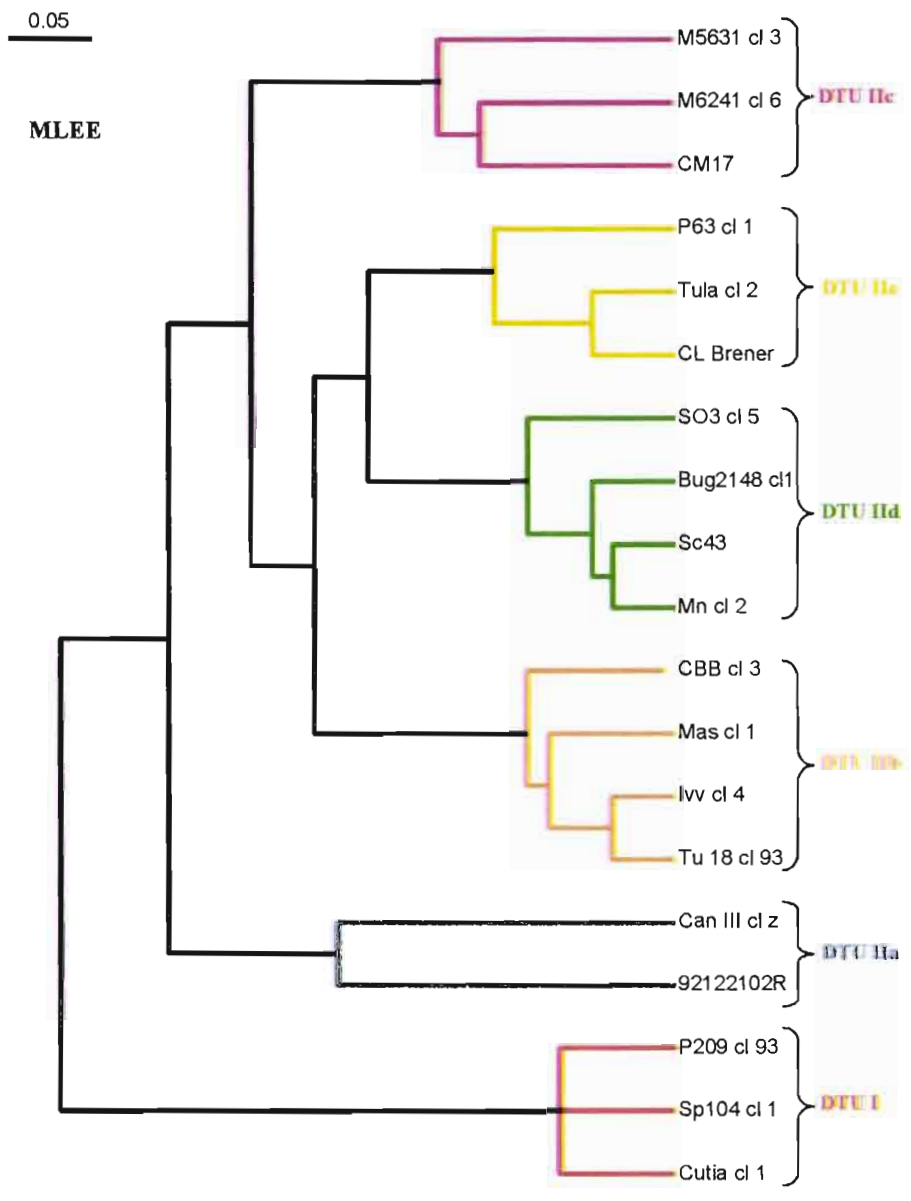
Ces systèmes isoenzymatiques nous ont permis de confirmer les subdivisions génétiques (DTUs) dans leurs grandes lignes ainsi que de montrer un polymorphisme inter DTU et intra DTU. En effet, les 6 locus se sont révélés polymorphes, et l'examen des profils montre qu'il existe des bandes partagées par tous les stocks présentant un DTU déterminé. A chaque DTU correspond un profil électrophorétique particulier reproductible pour des souches correspondant au même DTU (fig.14). Ces résultats confirment les données obtenues pour ces mêmes souches par Barnabé, Brisse et Tibayrenc (2000).



**Figure 14 :** Profil isoenzymatique de la GPI obtenu pour tout les stocks de *T. cruzi* permettant de distinguer les DTUs.

En conséquence, l'utilisation de marqueurs isoenzymatiques pour toutes les souches de *T. cruzi* nous a permis d'une part de corroborer la variabilité antérieurement décrite, et d'autre part à chaque fois de confirmer l'identité de la souche, ce qui a évité les erreurs sur le matériel d'étude.

Un dendrogramme UPGMA a été construit (fig.15), , à partir des 22 locus enzymatiques caractérisés au laboratoire par C. Barnabé et M. Tibayrenc (2000). Les 6 systèmes isoenzymatiques utilisés dans notre étude appartiennent font partie des 22 locus isoenzymatiques qui sont à la base de la construction de cet arbre phylogénétique.



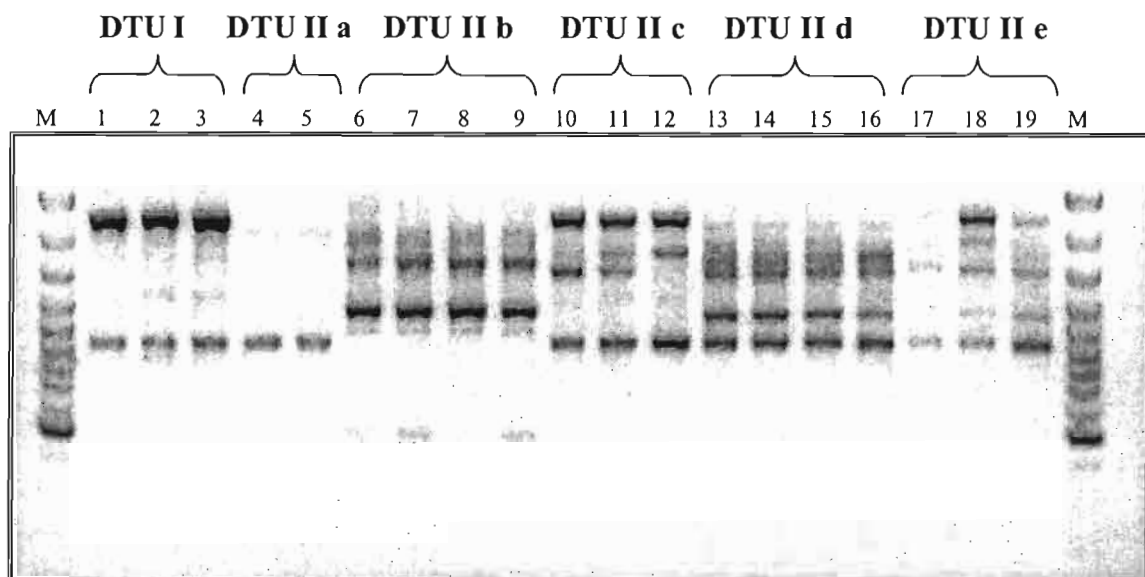
**Figure 15:** Dendrogramme UPGMA construit sur la base de distances génétiques de Jaccard calculées à partir des données isoenzymatiques (Barnabé *et al.*, 2000).

## 3.2 Polymorphisme de l'ADN génomique

### 3.2.1 Profils RAPD

La technique RAPD a été réalisée sur 19 souches avec 50 amorces décarnériques, parmi lesquelles 18 amorces ont été retenues. Ces amorces sont issues de 6 kits, A, B, F, N, R et U (annexe 6) appliqués sur des ADN de *T. cruzi* qui nous ont permis d'analyser l'ADN génomique du parasite ainsi que les relations génétiques entre stocks. Ce travail a confirmé les relations génétiques décrites par Tibayrenc *et al.* (1993) et par Brisse, Barnabé & Tibayrenc (2000).

Les profils multi-bandes obtenus en amplification par ces amorces montrent un polymorphisme génétique considérable et une forte parenté entre stocks de la même DTU, ainsi que des différences entre stocks appartenant à des DTUs différentes (fig. 16).



**Figure 16:** Profil RAPD obtenu avec l'amorce A10. L'ordre des stocks correspond à la table 1 (voir Matériel et Méthodes). La DTU d'appartenance est indiquée.

A la lecture des bandes obtenues par RAPD, nous avons trouvé 11 fragments différents pour les 19 stocks étudiés.

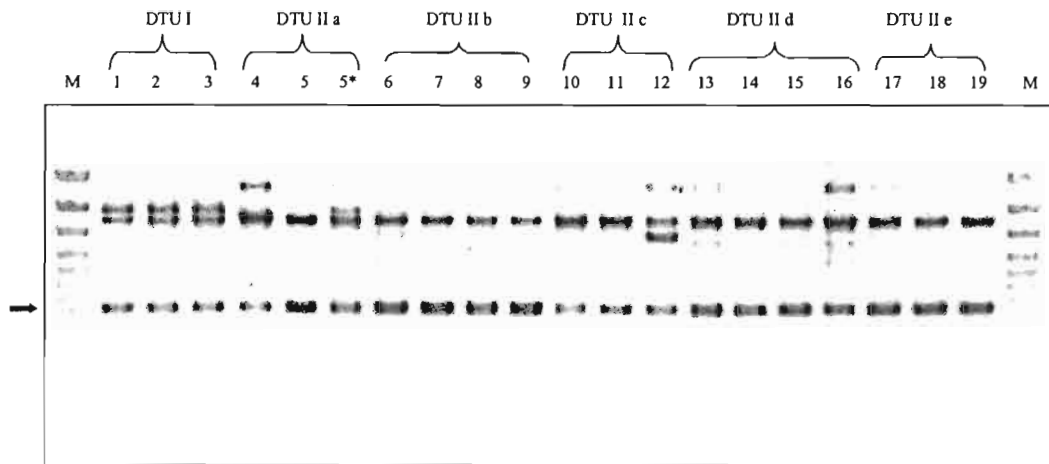
L'examen de ces profils a montré qu'il existe rarement des fragments communs à tous les stocks.

Pour l'analyse de la diversité génétique des stocks de *T. cruzi* nous avons utilisé comme groupe externe ("outgroup") des stocks de *T. cruzi marinkellei*. A l'observation des fragments de *T. cruzi marinkellei* amplifiés avec les mêmes amorces que pour *T. cruzi*, nous avons trouvé un grand nombre de bandes communes entre les deux taxons et un nombre limité de bandes spécifiques de *T. cruzi marinkellei* par rapport à *T. cruzi*.

Cette observation rend possible l'utilisation de *T. cruzi marinkellei* comme groupe externe pour enraciner les arbres phylogénétiques représentant les relations entre les stocks de *T. cruzi*.

Les bandes communes à toutes les souches de *T. cruzi* sont moins nombreuses. Il est intéressant d'analyser ces bandes, puisque leur présence correspond à une région génétique déterminée monomorphe dans tout le taxon. Nous avons choisi de montrer ci-dessous le fragment amplifié par l'amorce U16.

La figure 17 présente le profil obtenu pour tous les stocks étudiés. Il faut noter qu'au même niveau, les souches appartenant à la DTU I présentent une bande commune additionnelle.



**Figure 17 :** Bande commune dans un profil électrophoretique RAPD su 20 stocks de *Trypanosoma cruzi*. Amorce U16.

Note : 5\* corresponde a la souche 10R26 appartenant a la DTU II a.

### 3.2.2 Analyse des profils RAPD

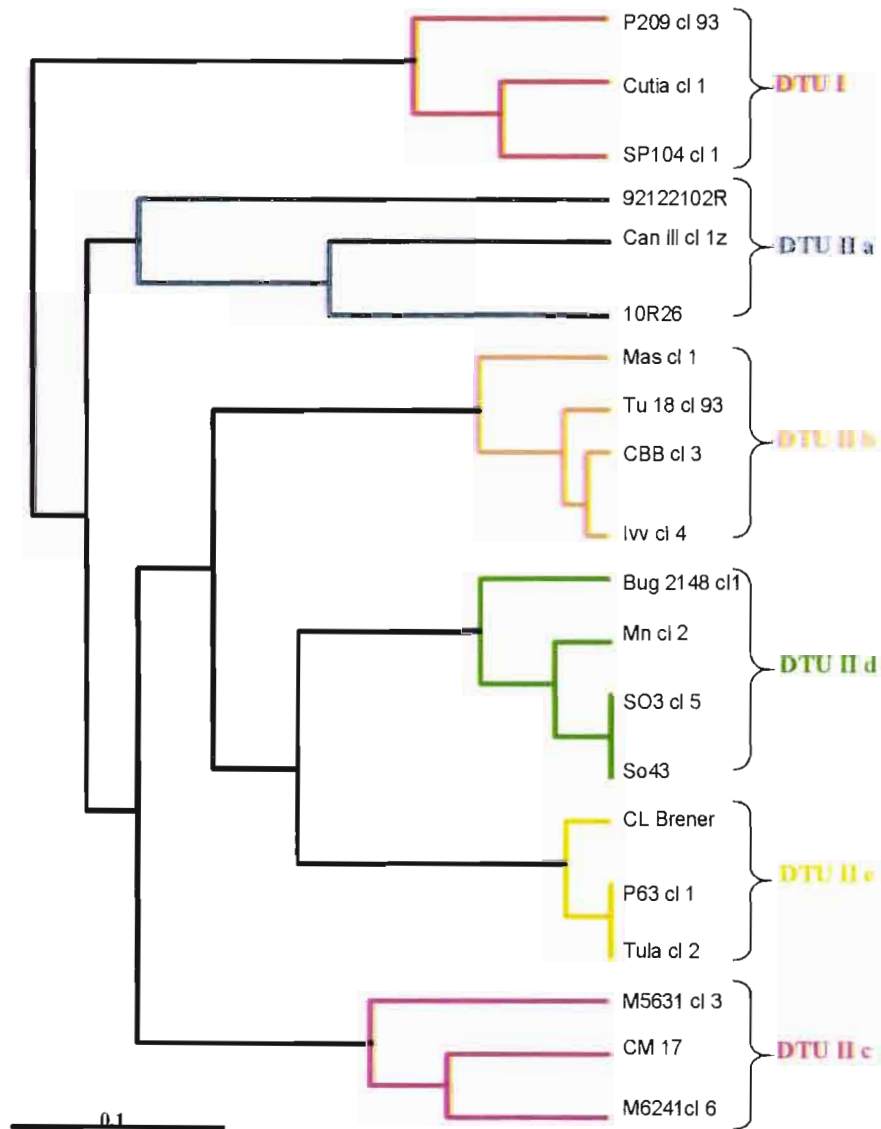
Le polymorphisme obtenu avec les 18 amorces par amplification de 19 stocks de *T. cruzi* et 2 stocks de *T. cruzi marenkellei* a été utilisé pour calculer les distances génétiques de Jaccard entre ces stocks.

Les index sont présentés dans le tableau 4 : la diversité génétique moyenne est de 0,74, alors que la diversité génotypique est égale à 1, car à chaque souche étudiée correspond un génotype RAPD particulier.

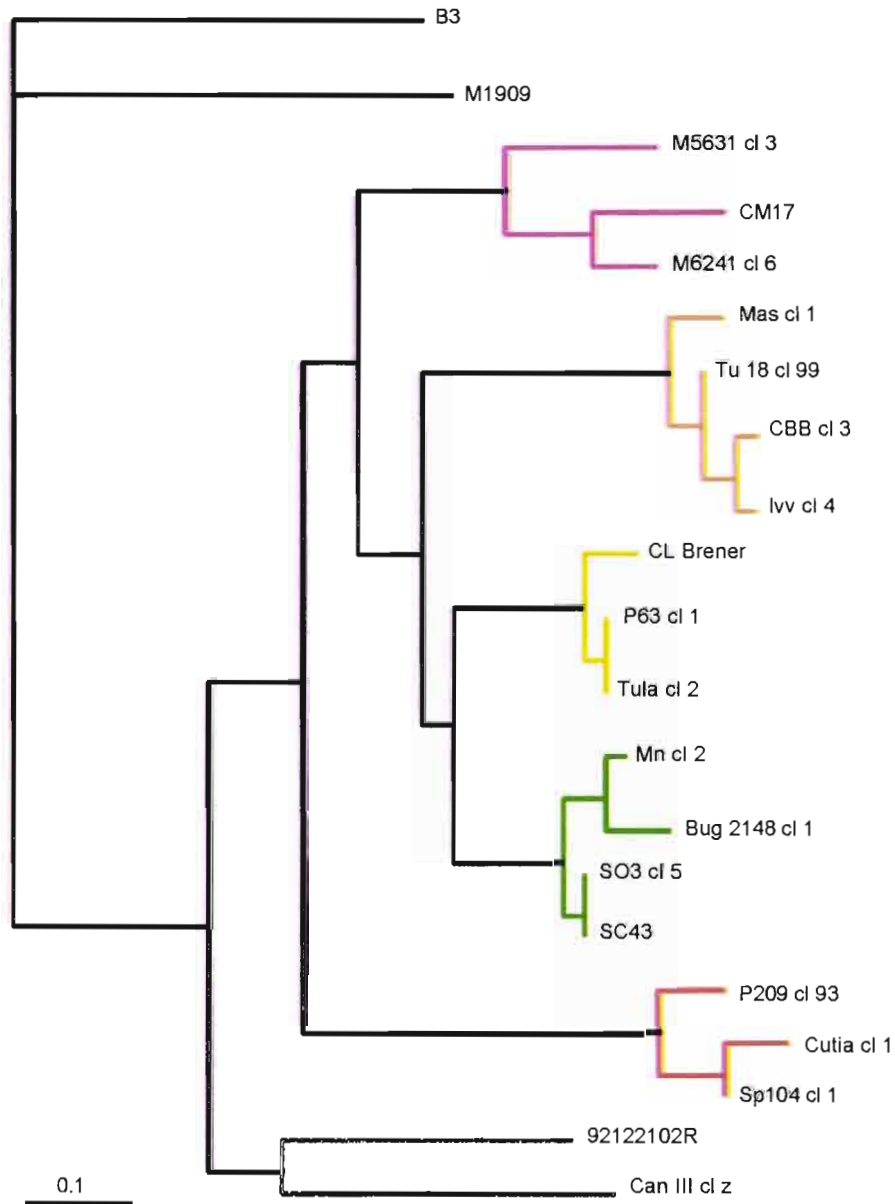
La distance génétique de Jaccard moyenne par la technique de RAPD est de 0,53 (écart-type = 0,22). A partir de cette matrice de distances génétiques de Jaccard, deux méthodes d'arbres ont été utilisées. Ces méthodes on été employées pour représenter les relations hiérarchiques entre les stocks. Les deux méthodes diffèrent par l'hypothèse sur lesquelles elles sont fondées. La méthode UPGMA (Sneath & Sokal, 1973). repose sur l'hypothèse d'une évolution à taux constant tandis que la méthode du Neighbor-Joining (Saitou, 1987) accepte des taux d'évolution variables. Ceci rend nécessaire un groupe externe pour enraciner l'arbre.

Les arbres UPGMA (fig. 18) et Neighbor-Joining (fig. 19) ainsi construit, montrent une identité de structuration des arbres. Ainsi ils révèlent une structure de population avec

une grande longueur de branches entre les différents DTUs. Ces résultats sont en accord avec les regroupements des stocks obtenus par plusieurs auteurs (Tibayrenc *et al.*, 1993 ; Barnabé *et al.*, 2000 ; Brisse *et al.*, 2000).

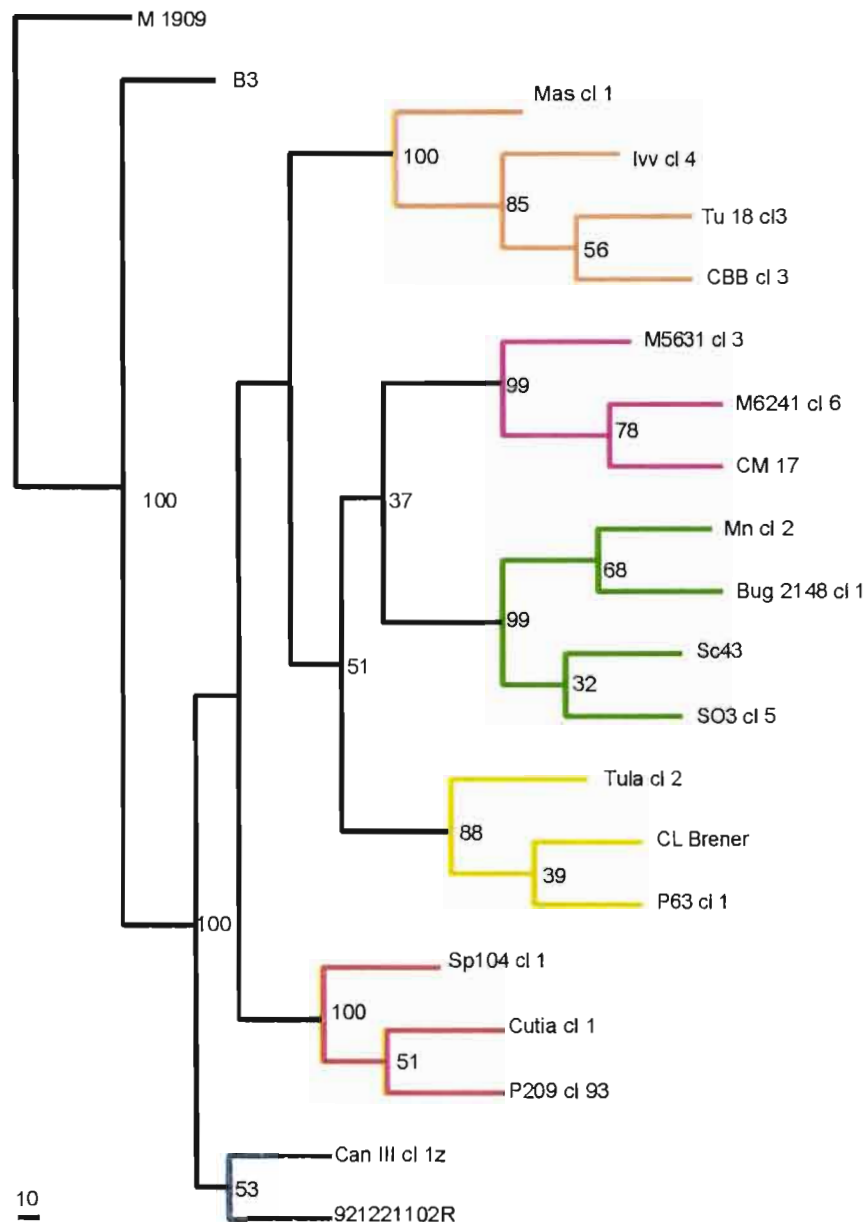


**Figure 18:** Dendrogramme UPGMA construit à partir de la matrice des distances de Jaccard calculées sur la base de données RAPD.



**Figure 19:** Dendrogramme Neighbor Joining construit à partir de la matrice des distances de Jaccard calculées sur la base des données RAPD.

Afin de tester la solidité des nœuds des arbres construits, nous avons des procédures de rééchantillonnage (bootstrap), pratiquées sur la matrice de distances des données brutes. Celles ci ont été mises en œuvre suivant la méthode du bootstrap (Felsenstein, 1985) (fig. 20). Toutes les valeurs sont supérieures à 80%, ce qui confirme la robustesse des nœuds de ces arbres.



**Figure 20:** Arbre obtenu après 100 rééchantillonnages (test de bootstrap) sur la base de données RAPD. Les stocks appartenant au taxon *T. cruzi marinkellei* ont été utilisés comme groupe externe.

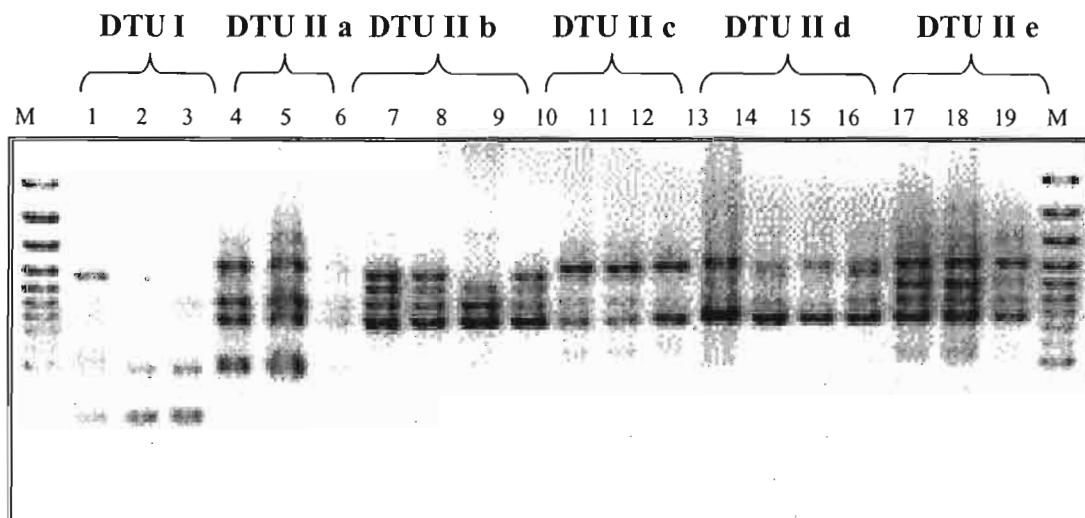
### 3.3 Polymorphisme de l'ARNm

#### 3.3.1 Profils RADES

Afin d'analyser le polymorphisme des gènes exprimés, nous avons exploré l'ARNm des mêmes 19 stocks de *T. cruzi* ainsi que des 2 stocks de *T. cruzi marinkellei*. Pour cela, nous avons rétrotranscrit l'ARNm pour obtenir de l'ADNc. Nous avons choisi d'utiliser l'ADNc comme cible puisque la fragilité de l'ARNm est bien connue.

Comme la quantité d'ADNc était insuffisante pour une analyse RAPD, une amplification a d'abord été effectuée grâce à une amorce spécifique de la séquence du mini-exon. L'ADNc ainsi pré-amplifié était utilisable pour une amplification par des amorces décāmériques aléatoires. Le choix des amorces s'est basé sur les résultats obtenus par l'analyse RAPD. En conséquence nous avons utilisés les mêmes amorces pour les deux techniques appartenant au kit A, B, E, F, N, R et U.

Les résultats obtenus par amplification des 19 stocks ont révélé un profil polymorphe au sein du taxon *T. cruzi*. Les profils obtenus sont souvent nettement distincts entre les différents DTUs (fig. 21).



**Figure 21:** Profil RADES obtenu avec l'amorce B18. L'ordre des stocks correspond au tableau 1 (voir Matériel et Méthodes). On remarque que les profils sont similaires au sein d'une DTU donnée. La ligne M correspond au marqueur de poids moléculaire.

Comme contrôle, nous avons amplifié les ADNc de deux souches de *T. marenkellei*. Le profil obtenu est différent, il y a des bandes qui sont absentes dans le groupe des souches de *T. cruzi*. Dans notre observation, il y a quelques bandes communes à toutes les souches, tandis que d'autres sont seulement présentes pour cette sous-espèce.

### 3.3.2 Analyses par RADES

Pour l'analyse des résultats, nous avons considéré chaque produit d'amplification comme un locus indépendant, comme pour le RAPD.

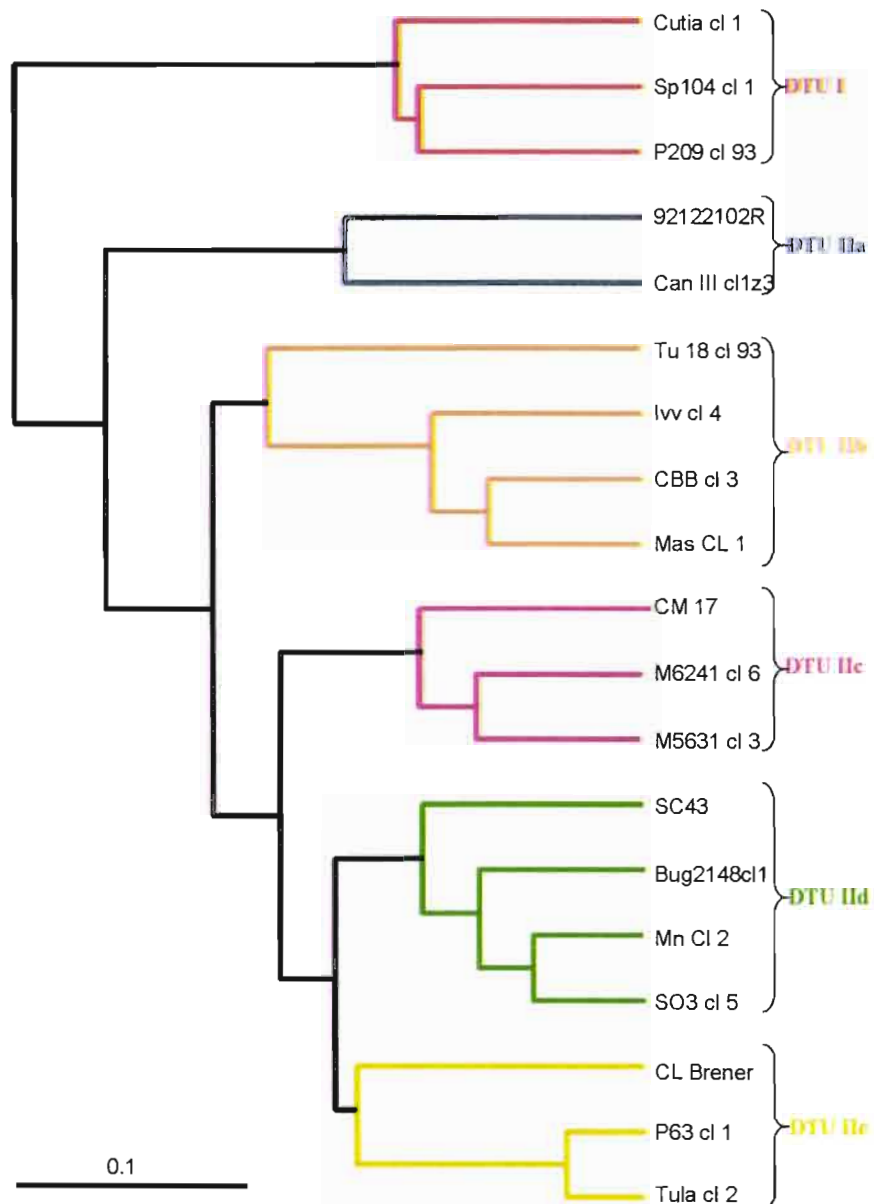
La diversité génétique moyenne (présentée dans le tableau 4) est de 0,74, égale à la diversité génétique moyenne observée avec l'analyse RAPD. La diversité génotypique est égale à 1 ce qui montre qu'à chaque souche étudiée correspond un génotype particulier.

Nous avons une valeur de 0,49 comme distance moyenne de Jaccard qui n'est pas significativement différente de la distance génétique moyenne observée pour l'ADN génomique (écart-type = 0,2).

Indices de diversité génotypique	RADES	RAPD
Diversité génétique moyen	0,74	0,74
Diversité génotypique	1	1
Distance de Jaccard maximal	0,87	0,89
Distance de Jaccard minimal	0,05	0
Distance de Jaccard moyenne	0,49	0,53
Ecart-type	0,2	0,22

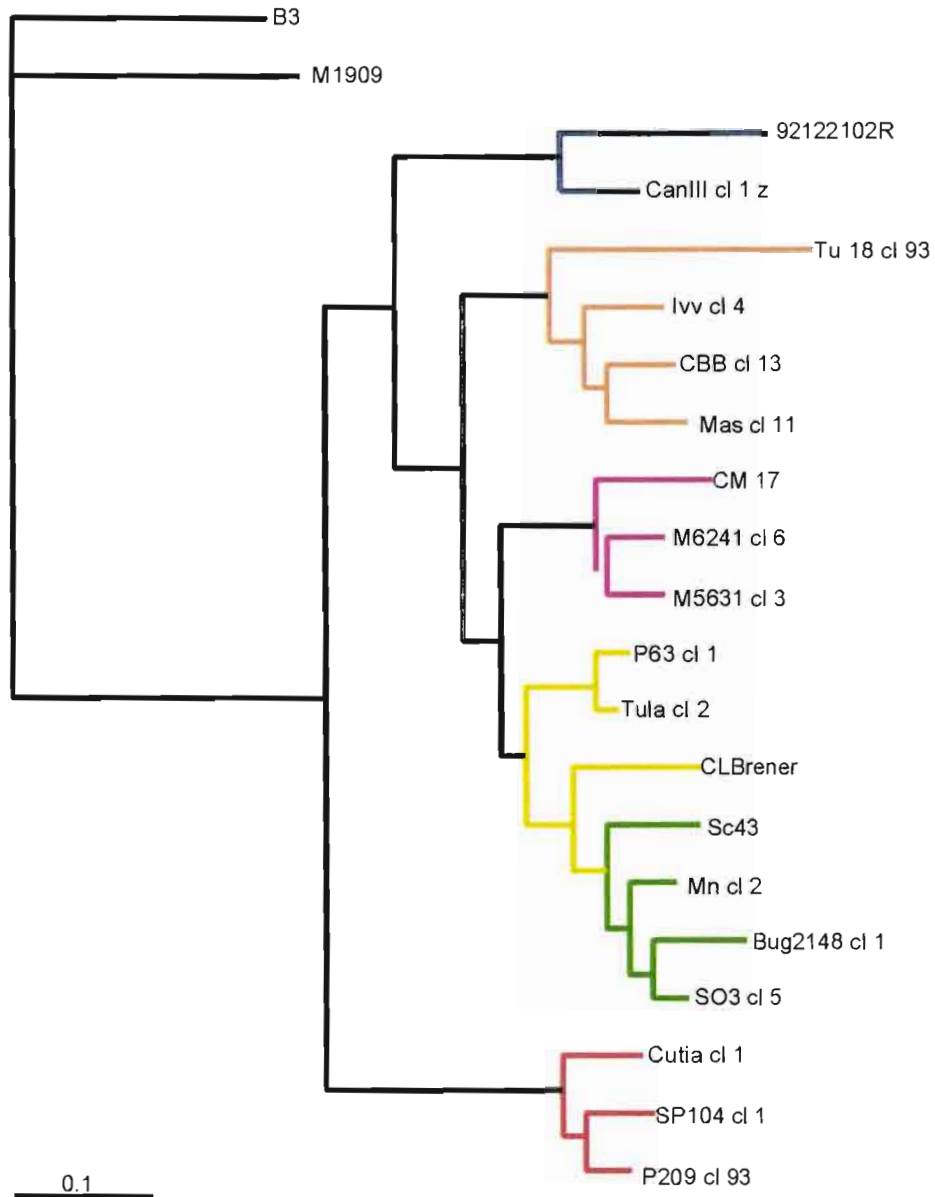
**Tableau 4:** Indices de diversité génotypique de RADES et RAPD.

De la même manière que pour l'analyse de l'ADN génomique, les deux mêmes méthodes d'arbres ont été utilisées. L'arbre UPGMA (fig. 22) montre les mêmes DTUs que l'arbre UPGMA RAPD (fig. 18).



**Figure 22:** Arbre UPGMA construit sur la base de distances de Jaccard calculées à partir des données RADES.

Une deuxième analyse a été effectuée par la méthode de Neighbor-Joining (fig. 23).

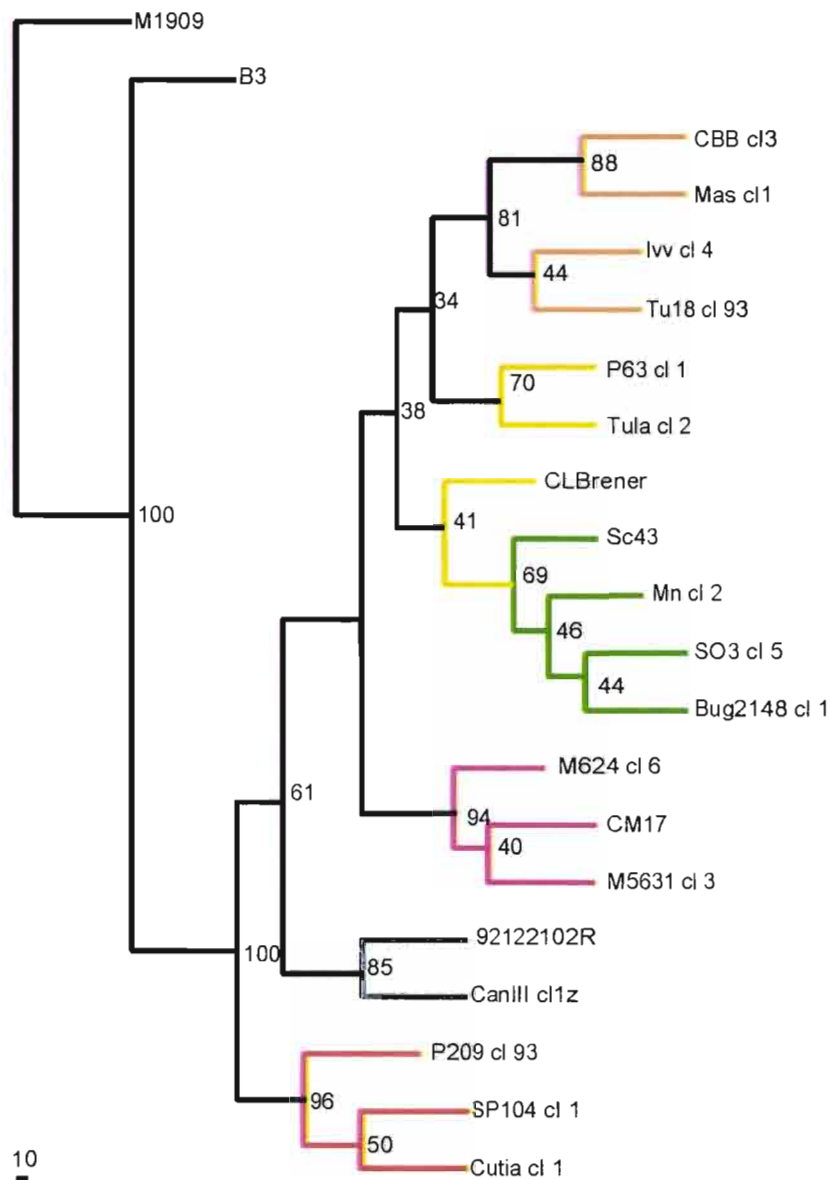


**Figure 23:** Dendrogramme Neighbor Joining construit sur la base des distances de Jaccard calculées à partir des données RADES pour l'étude de *Trypanosoma cruzi*.

La distribution des souches par les deux méthodes (UPGMA et NJ), est très similaire, bien que ces deux méthodes de construction d'arbres reposent sur des principes différents.

Les amplifications de *T. cruzi marinkellei* ont été sélectionnées comme groupe externe pour enraciner l'arbre construit par la méthode Neighbor Joining.

Dans l'analyse phylogénétique il est intéressant de constater que la hiérarchisation globale est strictement respectée pour l'ensemble des souches. Une évaluation de la robustesse des nœuds des arbres a été effectuée par la méthode de rééchantillonnage des caractères (Bootstrap, Felsenstein, 1985) sur 100 répétitions. L'arbre de consensus majoritaire est représenté sur la figure 24 avec des valeurs de bootstrap (indiquées aux nœuds) qui sont hautement significatives (supérieures à 80%) entre les différentes DTUs. Les résultats obtenus avec la technique RADES sont très similaires à ceux obtenus par les autres approches (isoenzymes et RAPD).



10

**Figure 24:** Arbre obtenue par le test de bootstrap après 100 rééchantillonnage sur la base de données RADES. Le groupe externe correspond aux stocks de *T. cruzi. marinkellei*.

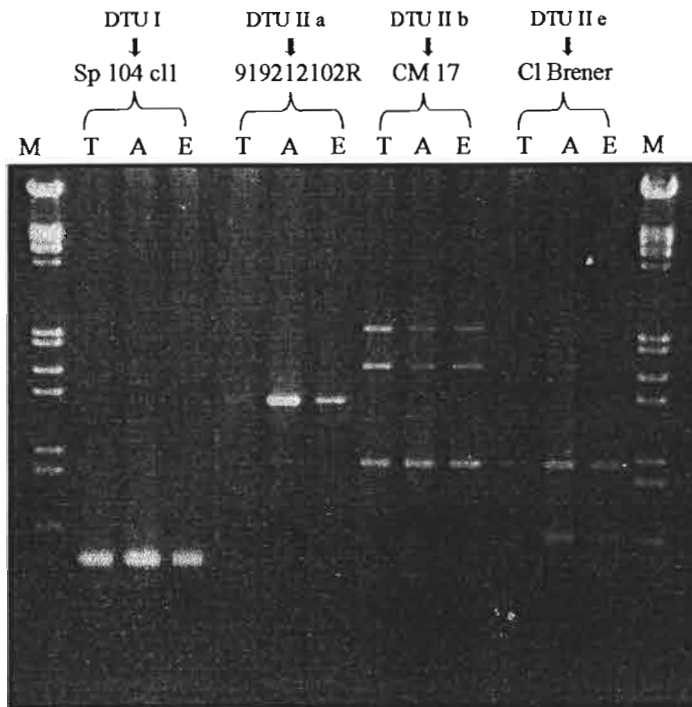
### 3.4 *Trypomastigotes*

Pour des raisons de temps, seules 5 souches ont fait l'objet de cette étude longue et difficile. Elles sont cependant assez représentatives de la diversité génétique totale du parasite (2 souches pour DTU 1, 3 souches pour DTU 2; tab. 5 ).

<b>DTU</b>	<b>Stock</b>
DTU I	Sp104 c11
DTU I	P209 c193
DTU II a	92122102R
DTU II c	CM 17
DTU II e	C1 Brener

**Tableau 5** : Stocks de formes trypomastigotes cultivées

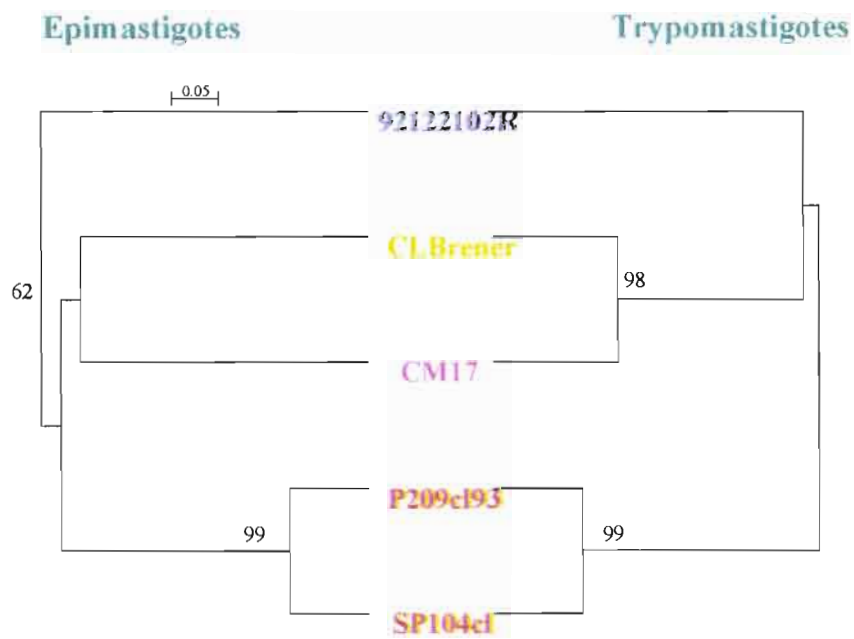
Le but de cette étude était d'évaluer l'expression génétique à deux stades différents de développement du parasite. Pour cela, nous avons soumis les formes trypomastigotes de ces 5 souches à l'analyse RADES. Nous avons amplifié l'ADNc avec 17 amorces décarnériques. Nous avons aussi des résultats parcellaires pour les formes amastigotes. Les profils obtenus montrent le plus souvent des bandes polymorphes similaires aux bandes obtenues chez les souches à l'état d'épimastigotes et d'amastigotes (fig. 25).



**Figure 25 :** Gel d'agarose al 1,6% . Ligne T : a partir des formes trypomastigotes. Ligne A : a partir de formes amastigotes. Ligne E : a partir de formes épimastigotes. Lignes M : Marqueur de poids moléculaire.

A l'analyse phylogénétique, nos résultats révèlent une même structuration génétique du polymorphisme RADES pour les formes épimastigotes et trypomastigotes. (fig. 26). La concordance entre matrices de distances génétiques de Jaccard obtenues pour données de trypomastigotes et épimastigotes montre un coefficient de corrélation de 0,79 avec une probabilité très significative ( $p = 4,6 \times 10^{-3}$ ).

Il faudrait certainement procéder à une évaluation plus approfondie, avec un nombre de souches plus important. Il serait également utile de séquencer les bandes spécifiques de stade.



**Figure 26 :** Deux dendrogrammes UPGMA reflétant le polymorphisme RADES de 5 souches de *Trypanosoma cruzi*. (distances de Jaccard). À droite : arbre construit à partir des données trypomastigotes; à gauche : arbre construit à partir des données épimastigotes. Les nombres indiqués à la base des subdivisions sont les valeurs de bootstrap.

### 3.5 Séquences spécifiques de DTU

Des nombreux fragments obtenus à partir de données RADES sont particulièrement intéressants car ils sont amplifiés chez certaines souches appartenant à une DTU déterminée. Par contre, les mêmes fragments est absent chez les souches des autres DTUs. Ces fragments sont donc spécifiques de DTU.

Trois fragments spécifiques de DTU ("tags"; Tibayrenc, 1998) ont été séquencés. Chaque fragment est originaire de trois souches pour le DTU I, trois autres pour le DTU II c, et finalement deux fragment pour le DTU IIa . De tels fragments constituent de bons candidats pour développer des diagnostics PCR spécifiques de DTUs.

Dans tous les cas, les fragments de même taille se sont révélés homologues. Une hypothèse acceptable est donc que des fragments qui migrent à la même position sont des fragments homologues. Le risque de considérer de fausses homologies subsiste cependant. Pour cela notre approche consiste a séquencer des fragments spécifiques de chaque DTU.

Les séquences ont été établies par clonage dans le vecteur pGM-T et séquencées à l'aide des amorces directes et inverses du phage M13 (voir matériel et méthodes). L'alignement des séquences des fragments spécifiques a été effectué avec le logiciel Clustal X 1.8. Le résultat d'alignement montre 95 % d'homologie entre les séquences de souches appartenant au même DTU. Une séquence consensus pour chaque DTU est présentée dans le figure 27 A.

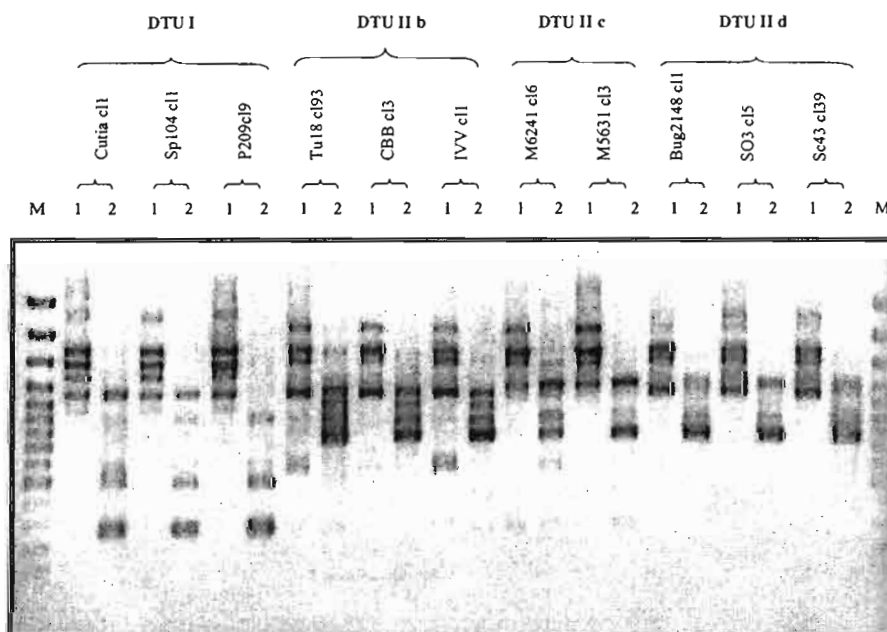
La comparaison de séquences montre que le polymorphisme de séquence à l'intérieur de chaque DTU est faible. Chaque DTU est donc caractérisée par une séquence spécifique. Par contre, il existe une variation entre les différentes DTU ce qui suggère une expression génétique différente à chaque DTU, ceci correspondant à des mutations ponctuelles présentes dans une ou plusieurs souches analysées d'une même DTU.

### 3.7 Polymorphisme comparée entre RAPD/RADES

#### 3.7.1 Profils RAPD/RADES

Un objectif important de notre étude était de comparer les profils RAPD (sondage au hasard du génome, y compris séquences non codantes et séquence codantes non exprimées) et RADES (amplification des seules séquences exprimées).

Afin d'étudier ces relations nous avons analysé pour les 19 stocks de *T. cruzi*, les profils multi-bandes révélées par les 18 amorces décameriques sélectionnées. Nous avons confronté l'un à l'autre les profils électrophorétiques polymorphes que chacune des amorces a générés indépendamment (fig. 28).



**Figure 28:** Profils d'amplification RAPD /RADES obtenues avec l'amorce B18. Lignes 1 : amplifications obtenues par RAPD, Lignes 2 : amplifications obtenues par RADES. Ligne M : Marqueur de poids moléculaire. Les noms des souches comparées sont indiqués sur chacune des amplifications.

Par ailleurs, nous avons observé que quelques amorces ont amplifié des bandes de même taille moléculaire communes à toutes les DTUs. Celles-ci étaient présentes dans l'analyse de RADES et absentes dans l'analyse RAPD et vice-versa, ce qui nous fait suspecter la présence de séquences exprimées communes à tout le taxon. Une exploration a été effectuée sur une bande commune à l'ensemble de souches étudiée. Nous avons obtenu une séquence identique dans toutes les souches de *T. cruzi*. Le fragment spécifique a été amplifié par l'amorce décamerique appartenant au kit U 16. La séquence est présentée à la figure 27 B.

### **3.6 Recherche de séquences protéiques**

Les séquences de ces fragments spécifiques ont été systématiquement analysées grâce à des programmes informatiques. Ceux-ci jouent un rôle essentiel dans la recherche de variation de séquence et l'analyse phylogénique, puisque la quantité d'information produite est trop grande pour une analyse individuelle et manuelle. L'informatique intervient déjà lors de l'acquisition automatique des données (séquences), de leur exploitation, de leur archivage et de leur distribution. Ces méthodes sont mises à la disposition de la communauté scientifique via des serveurs qui permettent de consulter les résultats disponibles dans les bases de données. Il existe de multiples bases de données internationales, mais notre recherche de similarité de séquence a été effectuée dans une banque de séquences de *T. cruzi* (EMBL Gen Bank) puis dans la GenBank ([ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

Le seul résultat paraissant significatif a été obtenu pour les séquences R1, amplifiant un fragment spécifique de la DTU II a qui montre une homologie pour une protéine caractérisée chez de nombreux organismes, la glutamate déshydrogénase. Le pourcentage de similitude est de 97% sur 953 pb. Aucune autre similitude significative n'a été rencontrée pour d'autres fragments séquencés.

Figure 27 : A) : Séquences consensus pour trois fragments RADES

Consensus F-13

```
GGCTGCAGAAAGGGTTTSCAGACCNAAGTCTNTCTAACGATAAGATGTNTGGGTGGAAACCTAAGCNACNACTACGCCAAGAGTCGAAATGTTAAGAGANNACANCCGGCACA TGC  
TCTGTGAGGAATTTGAAAGNAGGATGAGGTTTAAATGGAGAGATCCATTCNCCCACCAFTTGTCCNC AAAAGAACTGATCCFTCAA NAAAGAGNTTAAAGNCGTTCACGCTTGAAAAAT  
AGTNTTTGATGTTCGGTCGTTCTTTTCTGTTTTTCTCTCTGTTTATCTATCGAGATNNTTCTGCAAGCAA NNCCAA TAA NTAAA TTNNAGATGAGTTA TTTAGGTAGCGGT  
TTGTTTTTCAGTTCTTCCCAGCAGGGGTATGTCGGTGTGTCTGTGTAGTATGTTGCTGTTCTGCAACC
```

Consensus N-15

```
CAGCGACTGTGGTTCAGAGGACGACCTGC AAAAGCTNTTGTGATCTCC AAGGTAGGAAAGAAAAACA TGGAAA CATCGCATCTCAGCCGGCAGGCTCAAGACACACA CCCATATG  
CTCTTCTGAGACTGATCGGGAGCTCAA TCCGCGCACAGCGAACAA CAGGCTGCACGGAA TCCTTCTC ATCCCTCTCATTTTAAAA CAACGGGCSSA TGTAGTGGCCGATA CNCC  
ACCGGCCCAACGACATGTACGTCCGGGTATGAGGAGCGCAAA TTTTCGTCATCATAGTATTTC CCTGAAAAGGACGCCATGTACATGGTCCCTTTTGTGATAGTGCATGAAAAAG  
AGGCAGCAACTTCTTCAACAAAGGCGTGTCAAGACCGCCTGCGCAAGGCAGAGCGACGAAGCCAGAGCTGCNCTCACGGAAAAAAA CGATGACTCAAA TACA CTGCGCCATGCCCCT  
ACGGAGATCAAAAAGCCATGATGGTCTTCCAAAGGATATCGATGTACCFACGAA TGAAGCTAGAA CAGACTGAA CCGTCCCTCAATGATAGTCTCATCAAA TTCCCTCATG  
GGAGCGCAAAAGGAATGCAGAACATACACACCGGGAGGTGCGGGGTACCN GAAAGCNTGGGAA TAAAAAA TGAAGTCCCTG
```

Consensus R-1

```
TGCGGGTCCATAAACCAATTAATTTATGGAAGAACCTAAA TATTTACCAATAATTTGAAACGTTATCAGAACCTGAACGAGCAATACAA TTTCGTTGTTTGTGGTGGTTAGAT  
TGATAATGGTGTTC AAAGAAAAATCGTTGTTTTCTGTTCAA TATAATAGTGCCTTGGGTCCTTACAAAGGTGGTTTACGA TTTCA TCCA TCAGTTAA TTTATCTATTTGAAAA  
TTTTTAGGATTTGAACAAATATTTAAAAATTTCTTTAACAGGTTTATCAATGGGAGGGGTAAAGGTAGGTAAAGGTGGTTCGGATTTGCGATCCTAAAGGAAAA TCAGATAATGAAN  
TTTTAAANTTTTGTCAAGCNTTTATGAATGAATTATATAGACATATAGGCCCATGCAACCATGTACCTGCTGGAGATATTTGTTGGTGGTCGAGAAAA TTGGTTATTTATATGGT  
CAATATAAAAAAATTTGAAATAGTTTTAATGGTACCTTAAACGGGTAAAAATG TAAAA TGGGTGGTTCTAA TTTAAGAGTGGAACTACTGGGTTATGUNTATGTA TACTTTATT  
TTGGGAAGTATTA AAAATCATTAAAAATATTCAGNANGAAAAANCAA ACTGCNTGTTGTEANTTGGTAGTGGTAA TGGTNGCAC TTTAATNGTGTTCAGAAANTTATTA CATTAAA  
TGNTTAAAGTTTTAAACCTTAAGNGNCAANNANTGGTTATGTATATGAACCCNAATGGNTTACTCATGANAAC TTTGAA TTTCTTATAGATTTAAAA GAA GAAAAAAAAGGTAGA  
ATCAAAAGAA TACTTAATACCATCTCATCTACAGCTAAATATTG TCCCAATGAAAA NNNCCNGCAGACCATGGGTTTACCA TGTACATTAAGCTTTCCCATGTGCAACACAACAA  
TGAATAAATCTTGAAGATAGCAAAATATTACAAAAAATGGTTTATCTTNA GTTGGGGAAGGAGCAACCCATATGCCATCAACC GTAGAAAGGACCCGCCAGGACCCGCA
```

Figure 27 B) : Séquence fragmente U16 pour toute le stock de *Trypanosoma cruzi*

Fragmente U-16

```
CTGCGCTGGAGAAAAAGGAGAA TTTTTTCTGGTGA AAAAAATTTGAAAA TCCCTCCATAAAACTGCCAAGACGATCAA TTTCTGCTTGAAGTCTGTCAACTGCCGTTGCTGTTCCCTCCA  
CAGTATGAGAAAAGCGTTTCAGTCACTCTGCTTGAATCCCCCTCCGTGTCGGATTTT TTTTCTGAAATAATTTCCGCTTTTATCGGTGGCAGCTTCATCTCAGCAACAAAGTGGAA  
TCCGTGGTGGAAAGAAATGGGCTCATCGCAGAGCGGACATCTTTACGTCGTTTCTCTCTCTTCTCGGACAGGCAATTTTCAACA TCCGGCGCCCTCAACCTCCACTTGATGAGC  
ATTTGTTTTGGGCTCCTCATCTGTTGTTTTGTACACTGCGTTGGTTCCCTGCTGCCCTTTTCGCCATACTCAAAAAATTTGCAACGTGTCCTTCTGTTGGTCCGATCGTCAAT  
CGTGAACATCATCNTTGGGNA TCTGGCAATTTAAGTTCTTTTAGNAACGGGCTCCNAAGTACTCCNTCCNCTGTNCCGTANTGCGGC
```

Les profil d'amplification par RADES montrent certaines bandes semblables à celles des profils RAPD pour une même souche. En revanche, ces profils montrent aussi la présence des bandes spécifiques pour le RADES. Ces bandes sont particulièrement intéressantes car elles représentent un caractère spécifique à étudier.

### 3.7.2 Analyses RAPD/RADES

Nous avons calculé les différents indices de diversité génétique, parmi lesquels se trouvent le taux de polymorphisme, la diversité génotypique, ainsi que la diversité génétique, et ceci, pour l'ensemble des souches à partir des données RAPD et RADES.

Le tableau 6 montre les génotypes comparés entre RADES et RAPD.

Comme il a été déjà indiqué, la diversité génétique moyenne observée pour le RAPD et la diversité génétique moyenne observée pour le RADES sont proches. D'autre part, la distance génétique de Jaccard moyenne pour le RADES n'est pas significativement différente de la distance génétique moyenne de Jaccard pour le RAPD (voir tableau 4).

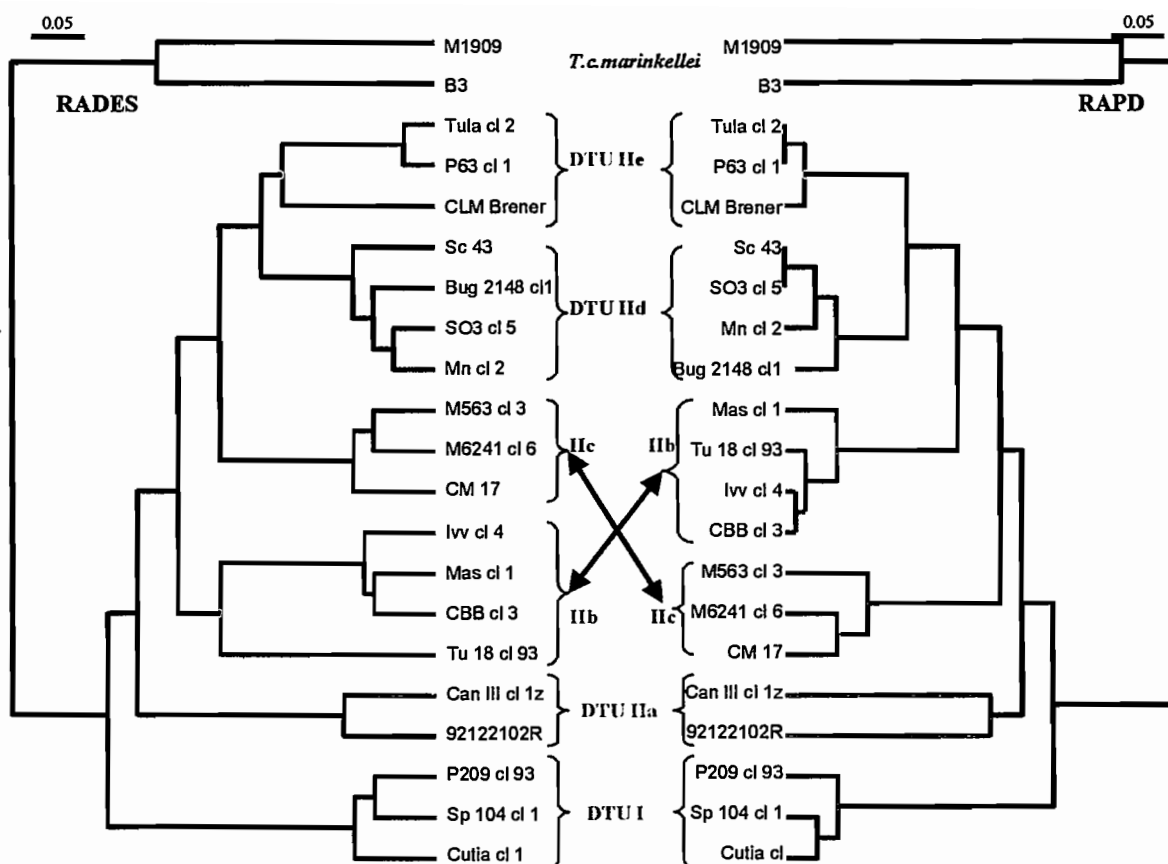
La méthode de construction d'arbres Neighbor Joining a été employée pour présenter les relations hiérarchiques entre les souches de *T. cruzi* à partir de la matrice des distances génétiques de Jaccard pour le RAPD et le RADES.

Les dendrogrammes ainsi construits (fig. 29) montrent une très bonne concordance. Le groupe externe que nous avons utilisées : *T. cruzi. marinkellei*, apparaît en position externe par rapport à l'ensemble des stocks de *T. cruzi* pour le RADES aussi bien que pour le RAPD.

DTU	Stock	*	A2	A7	A9	A10	E3	B1	B11	B18	F13	N4	N15	R1	R2	R8	R10	U16	U20
I	1	RAPD	1-2	1-2-4-8-9	1-6	2-5	2-3-4	1-2	2-3	2-3-4-5	1-2-3-5-8	2-3-6-8-9	1-4-6-9-10	2	2-5	1-2-3-4-5	3	1-4	1-2
I		RADES	6	3-4-8-9	6	5-6	4-5-6-7	3-5-6-7	3	5-9-10	6-7-8	8	9	3-5	5	4	4-5	3-4	1-2
I	2	RAPD	1-2	1-2-4-8-9	1-6	2-5	2-3-4	1-2-3	2-3-4	2-3-4-5	2-3-5-8	3-6-8-9	1-4-6-9-10	2	2-3-5	1-2-3-4-5	3	1-4	1-2
I		RADES	6	3-4-8-9	6-8	5-6	6	3-5-6-7	3-5	5-9-10	6-7-8	11	9	3-5	5	4	4-5	3-4	1-2
I	3	RAPD	1-2	1-2-4-8-9	1-6	2-5	2-3-4	1-2-3	2-3-4	2-3-4-5	1-2-3-5-8	3-6-8-9	1-4-6-9-10	2-4	2-5	1-2-3-4-5	3	1-4	1-2
I		RADES	6	3-4-8-9	6	5-6	6	3-5-6-7	3-4-5	6-9-10	6-7-8	8-10	9	3-5	5	1-4	4-5	3-4	1-2
IIa	5	RAPD	2	4-7	2-5	1-2-3	2-4	1-4-5	3-5	2-3-5	2-3-6	6-8-9-10	2-6	2-3-5	2-3-5	1-2	2	2-4	1-2
IIa		RADES	3	3	3-5	0	4-6-7	3-5-6-7	3-4-5	4-6-8-9	6	8-10-11	10	3-6-8	6	3-4		4	1-2
IIa		RAPD	2	4-7	2-5	1-2-3	2-3-6	1-3-5	1	2-3-5	2-3-6	6-9-10	4-6	1-2-5-6	2-3-5	1-2	3	2-4	1-2
IIa		RADES	3	3	3-5	3-5	3-6	3-5-6-7	3-4-5	4-6-8-9	6	8-10-11	8-9-10	3-6-8	6	3-4	3-5	4	1-2
IIb	6	RAPD	2	3-6-7	2-4	1-3-4-5	1-2-3-6	2-4-5-7	3-4	2-3-5	2-4-5-6	6-9-10	2-3-4	3	3-6	3-4	1-2	2-4	1-2
IIb		RADES	2-3-4-5	6-7	5-7-8	5	5-6	3-4	3-6	2-5-6-7-8	3-6	2-3-6-9-11	8-9-11	3	6	1-2-3-4	0	4	1-2
IIb	7	RAPD	2	3-6-7	2-4	1-3-4-5	1-2-3-6	2-4-5-7	3-4	2-3-5	2-4-5-6	6-9-10	2-3-4	3	3-6	1-3-4	1-2	2-4	1-2
IIb		RADES	2-3-5-6	6-7	5-7	5-6	5-6	3-4-5-7	3-6	2-5-6-7-8	3-6	2-10	8-9-11	2-3-4-6	6	1-2-3-4-5	3-5	4	1-2
IIb	8	RAPD	2	3-6-7	2-4	1-3-4-5	1-2-3-6	2-4-5-7	3-4	2-3-5	2-4-5-6	6-9-10	2-3-4	3	2-3-6	1-3-4	2	2-4	1-2
IIb		RADES	2-3-4-5	6-7	5	5-6	6	3-4-5-7	3-4-6	2-5-6-7-8	3-6	2-10	8-9-11	2-3-4-6	6	1-2-3-4-5	3-5	4	1-2
IIb	9	RAPD	2	3-6-7	2-4	1-3-4-5	1-2-3-6	2-4-5-7	3-4	2-3-5	2-4-5-6	6-9-10	2-3-4	3	3-6	1-3-4	1-2	2-4	1-2
IIb		RADES	2-3-5-6	6-7	5-7	5-6	5-6	3-4-5-7	3-4-6	2-5-6-7-8	3-6	2-3-6-9-12	8-9-11	2-3-4-6	6	1-2-3-4	5	4	1-2
IIc	10	RAPD	2	3-4-5-6-7	1-2-3-5	3-4-6	2-7	2-4-5	2-4	1-2-3-5	1-3-5-6	1-9-10-12	2-4-5-9-10	1-2-3	1-2-4	1-4	1-2	2-4	1-2
IIc		RADES	4-6	6-7	6	6	3-5-7	5-6	3-4-6	5-8	3-6	3-6-9-12	10	2-4-6	5-6	1-2-3-4	3-4-5	4	1-2
IIc	11	RAPD	2	3-4-5-6-7	1-2-3-5	3-4-6	2-7	2-4-5	2-4	1-2-3-5	1-3-5-6	9-10-12	2-4-5-9-10	1-2-3	1-2-4	1-4	1-2	2-4	1-2
IIc		RADES	6	6-7	5-7	6	3-5-7	5-6	3-4-6	5-8	3-6	3-6-9-12	8-9-10	3-5-6	5-6	1-2-3-4	3	4	1-2
IIc	12	RAPD	2-6	3-4-5-6-7	1-2-3-5	3-4-6	1-2-7	2-4-5	1-4	1-2-3-5	1-3-5-6	9-10-12	2-4-5-9-10	1-2-3	1-2-3-4-5	1-4	2	2-4	1-2
IIc		RADES	2-6	6-7	5-7	6	3-5-7	5-6	3-4-6	5-8	3-6	3-6-9-12	8-9-10	4-5	5-6	1-2-3-4	3-4-5	4	1-2
II d	13	RAPD	2	3-6	3-4-5	6	1-3-6	2-4-5	4	1-2-3-5	3-4-5-6	1-5-9	2-3-5-6-7-10	1-3-5	1-2-3-4	1-3-4	1-2-3	2-4	1-2
II d		RADES	3-6	6-7	5-7-8	6	4-5-6-7	4-5-6	2-3	5-8	3-6	3-8-10	9-10	3-4-6	4-5-6	2-4	3-5	4	1-2
II d	14	RAPD	2	3-6	3-4-5	6	3-6	2-4-5	4	1-2-3-5	3-4-5-6	1-5-9	2-3-5-6	1-3-5	1-2-3-4	1-3-4	1-2-3	2-4	1-2
II d		RADES	3-6	6-7	5-7-8	4-5-6	4-5-6-7	4-5-6	2-3	5-8	3-6	3-10	9-10	3-4-6	4-5-6	6	2	4	1-2
II d	15	RAPD	2	3-6	3-4-5	3-4-6	1-3-6	2-4-5	4	1-2-3-5	3-4-5-6	1-5-9	2-3-5-6-7-10	1-3-5	1-2-3-4	1-3-4	1-2-3	2-4	1-2
II d		RADES	3-6	6-7	5-7-8	4-5-6	4-5-6-7	4-5-6	2-3	5-8	3-6	3-8-10	9-10	3-4-6	4-5-6	4-6	5	4	1-2
II d	16	RAPD	2	3-6	3-4-5	3-4-6	1-3-6	2-4-5	4	1-2-3-5	3-4-5-6	1-5-9	2-3-5-6-7-10	1-3-5	1-2-3-4	1-3-4	1-2-3	2-4	1-2
II d		RADES	3-6	6-7	5-7-8	4-5-6	5-6	4-5-6	2-3	5-8	3-6	3-10	9-10	3-4-6	4-5-6	0	3-5	4	1-2
II e	17	RAPD	2	4-6-7	1-2-3-5	3-4-6	1-3-4	2-3-4-5	4	2-5-9	3-5-6	1-8-9	2-4-6	2-3-4	2-3-4	1-3-4-5	3	2-4	1-2
II e		RADES	3-4-6	6-7	5-7	4-5-6	6	6	4-5	3-5-6-7-8	6	2-9-10	9-10	3	4	4-6	5	4	1-2
II e	18	RAPD	2	4-6-7	1-2-3-5	3-4-6	1-3-4-7	2-3-4-5	4	2-5-9	3-5-6	1-8-9	2-4-6	2-3-4	2-3-4	1-3-4	3	2-4	1-2
II e		RADES	3-4-6	5-6-7	5-6-7	4-5-6	6	6-7	4-5-6	3-5-6-7-8	3-6	2-9-10	9-10	3-5-6	4-5	4-5-6	3-5	4	1-2
II e	19	RAPD	2	4-6-7	1-2-3-5	3-4-6	1-3-4-7	2-3-4-5	4	2-5-9	3-5-6	1-8-9	2-4-6	2-3-4	2-3-4	1-3-4-5	3	2-4	1-2
II e		RADES	3-4-6	5-6-7	5-7	4-5-6	6	6-7	4-5	3-5-6-7-8	3-6	2-9-10	9-10	3-5-6	4-5	4-5-6	3-5	4	1-2

Table 6 : Génotypes obtenus par données RAPD et RADES.

Note : \* Amorce, • Technique .



**Figure 29:** Deux dendrogrammes UPGMA construits à partir du calcul des distances génétiques de Jaccard. À droite: arbre construit à partir des données RAPD ; à gauche : arbre construit à partir des données RADES.

Cette concordance établie entre les matrices des distances de Jaccard obtenues sur la base des données RAPD et RADES a été vérifiée statistiquement par le test de Mantel (1967) ; (Test G de Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990). Une très forte corrélation a été observée entre les résultats RADES et les résultats RAPD. Nous avons également testé la corrélation entre les données MLEE et RAPD, et entre les données MLEE et RADES. Elles se sont également révélées fortement significatives (tableau 7).

	MLEE	RAPD	RADES
MLEE	-		
RAPD	$r = 0,89 \text{ p} < 10^{-4}$	-	
RADES	$r = 0,83 \text{ p} < 10^{-4}$	$r = 0,85 \text{ p} < 10^{-4}$	-

**Tableau 7** : Résultats obtenues par le test de Mantel (1967). Le calcul a été fait entre les trois marqueurs génétiques : RAPD, RADES et MLEE. La matrice a été faite avec des stocks de *T. cruzi* et n'inclut pas les stocks de *T. cruzi marinkellei*.

Nous avons également calculé la corrélation entre RAPD et RADES incluant les stocks de *T. cruzi marinkellei*. Le résultat obtenu est hautement significatif ( $r = 0.92$ ,  $p < 10^{-4}$ ).

## 4 Discussion

L'échantillon étudié est constitué des stocks représentatifs de la variabilité génétique de *T. cruzi*. Ils ont été sélectionnés en fonction des résultats sur 15 locus isoenzymatiques (Tibayrenc *et al.*, 1986) qui ont permis d'introduire le modèle clonal pour ce taxon (subdivision de l'espèce en clones naturels, stables dans l'espace et dans le temps, avec recombinaison génétique rare ou absente). Ces clones ont été groupés en deux lignées majeures, DTU I et DTU II (Tibayrenc, 1995) puis ont été révélées à l'intérieur de la DTU II, en DTU II a –e (Barnabé *et al.* 2000 ; Brisse *et al.*, 2000).

De manière intéressante, le résultat obtenu avec la phylogénie à partir des données RADES apparaît très similaire aux phylogénies obtenues avec les données MLEE et RAPD et respecte les principaux liens de parenté établis par ces deux dernières méthodes.

Les indices de diversité génétique calculés à partir de données RADES / RAPD / MLEE sont similaires. Ils montrent une grande hétérogénéité du parasite, mais gardent le groupement en six lignées clonales ou DTUs. Ce résultat suggère que les distances évolutives entre DTUs chez *T. cruzi* sont si fortes qu'elles impriment leur marque dans la

plupart des gènes du parasite, y compris les gènes codants soumis à pression de sélection naturelle.

La concordance entre les résultats RAPD, RADES et MLEE, vérifiable visuellement sur les arbres, a été corroborée statistiquement par le test de Mantel (1967).

Il peut venir à l'esprit que les résultats, au moins ceux concernant la corrélation entre RAPD et RADES, s'expliqueraient simplement par le fait que les profils RADES ne constituent qu'un sous-tirage des profils RAPD. Il n'en est rien. L'examen des profils amorcé par amorce et souche par souche (voir tableau 6) montre clairement que les profils RADES sont en règle différents des profils RAPD, et même, qu'ils sont souvent plus complexes. Ceci n'a finalement rien d'étonnant. Comme nous l'avons déjà souligné, les séquences-cible du RAPD et du RADES sont fortement différentes: le RADES amplifie spécifiquement les séquences codantes exprimées, alors que le RAPD amplifie indifféremment les séquences, qu'elles soient codantes ou non codantes, qu'elles soient exprimées ou non. Cependant, pour éliminer définitivement ce biais possible du "sous-tirage", nous avons fait la comparaison RAPD/RADES pour des amorces différentes. Nous avons partagé la série d'amorces en deux lots aléatoires, et nous avons pris les profils RAPD pour le premier lot, et les profils RADES pour le deuxième lot. Le risque d'un "sous-tirage" est alors nul. Cependant, (1) le test de Mantel reste hautement significatif (0,89,  $p < 10^{-4}$ ; 0,83,  $p < 10^{-4}$  et 0,85,  $p < 10^{-4}$ , pour MLEE/RAPD; MLEE/RADES et RAPD/RADES respectivement). (2) Le double arbre obtenu montre toujours une excellente concordance entre les deux marqueurs (fig. 29). Enfin, nous avons voulu voir dans quelle mesure le déséquilibre de liaison très fort entre polymorphismes RAPD et RADES pouvait persister en prenant, d'une part un échantillonnage basé sur le polymorphisme RAPD de formes **épimastigotes** pour une première série d'amorces, d'autre part un échantillon basé sur le polymorphisme RADES de formes **trypomastigotes** pour une série d'amorces différentes. Nous nous plaçons ainsi dans les plus mauvaises conditions possibles pour obtenir une corrélation entre les deux séries de marqueurs, d'autant plus que le nombre limité de souches (cinq) introduit là un risque important de manque de puissance statistique (erreur de type II). Cependant, le test de Mantel reste très significatif, et les deux arbres obtenus montrent une excellente adéquation (coefficient de corrélation = 0,78,  $p = 1,17 \times 10^{-2}$ ).

Les conclusions principales qui peuvent être tirées de cette partie de notre travail sont les suivantes:

(1) En dépit du fait que les profils RADES ne peuvent pas être considérés comme un simple "sous-tirage" des profils RAPD, un déséquilibre de liaison considérable est observé entre les deux types de polymorphisme. Or, les profils RADES expriment le polymorphisme de séquences:

- (a) **codantes**, donc par nature soumises à la pression de la sélection naturelle, puisque de telles séquences codantes sont à l'origine du phénotype de l'organisme à l'étude;
- (b) codantes **exprimées**, ce qui garantit qu'elles correspondent à un sous-tirage très limité du génome général.

Le déséquilibre de liaison très important observé, non seulement entre RAPD et RADES, mais aussi entre isoenzymes (considérés comme sélectivement neutres) et RADES, vérifié statistiquement et visuellement par l'adéquation des arbres, montre que l'évolution clonale prépondérante sur le long terme a littéralement sculpté le génome nucléaire du parasite dans tous les types de séquences analysés jusqu'à présent (gènes d'isoenzymes, séquence non codantes, séquences codantes non exprimées, séquences codantes exprimées, microsatellites). Ceci est un argument très fort pour dire que les événement de recombinaison dont l'existence est maintenant bien démontrée (Bogliolo *et al.*, 1996 ; Carrasco *et al.*, 1996 ; Machado & Ayala, 2001 ; Brisse *et al.*, 2003) ne constituent apparemment qu'un mécanisme additionnel de génération de la diversité génétique, et que l'existence de gènes "mosaïque" (Gaunt *et al.*, 2003) interfèrent avec la dynamique évolutive du parasite seulement de façon limitée.

(2) De nombreuses bandes RADES spécifiques de *T. cruzi* (par rapport au taxon proche *T. cruzi marenkellei*, ou de DTUs) ont été observées. Ces séquences codantes exprimées spécifiques de l'espèce ou de ses subdivisions génétiques feront l'objet d'études approfondies ultérieures.

(3) Les profils RADES (séquences codantes exprimées) changent relativement peu quand le parasite change de forme (épimastigote, trypomastigote, amastigote). Cependant, quelques bandes spécifiques de chaque forme apparaissent cependant. Là aussi, ces séquences spécifiques seront analysées en détail.

# Variabilité du génome kinétoplastique

## 1 Introduction

Comme tous les kinétopalstidés, *T. cruzi* possède deux génomes, le génome nucléaire (celui qui a été étudié dans la première partie de notre thèse), et le génome kinétoplastique. Le kinétoplaste est un organelle situé à la base du flagelle, qui contient une masse d'ADN constituant de 20 à 30% de l'ADN total du parasite. Comme nous l'avons rappelé auparavant, il y a deux types de séquences dans l'ADN kinétoplastique,

- (a) les maxicercles, de quelques dizaines de milliers de paires de bases, existant à quelques milliers d'exemplaires dans le kinétoplaste, et dont la fonction est similaire à celle des mitochondries des organismes supérieurs (respiration cellulaire).
- (b) Les minicercles, d'environ un millier de paires de bases, répétés plusieurs dizaines de milliers de fois, et qui sont impliqués dans l'édition de l'ARN.

L'ADN kinétoplastique est très aisé à séparer de l'ADN nucléaire (il peut sédimenter par simple gravité, du fait de son caractère hautement concaténé). Par ailleurs, le fait qu'il soit hautement répété en a fait une cible de choix pour des techniques de caractérisation moléculaire des souches du parasite. L'analyse RFLP simple de l'ADN kinétoplastique a révélé un polymorphisme considérable, permettant de caractériser les souches de *T. cruzi* ("analyse schizodémique" (Morel *et al.*, 1980).

Une première tentative d'interpréter ce polymorphisme en termes de génétique évolutive a été faite par Tibayrenc & Ayala (1987) qui ont montré une corrélation statistiquement très significative entre la diversité isoenzymatique et le polymorphisme RFLP de l'ADN kinétoplastique chez *T. cruzi*. Ce déséquilibre de liaison indiquait que l'évolution des génomes nucléaire et kinétoplastique chez ce parasite était corrélée, non indépendante. Cette hypothèse de travail a été mise à profit pour bâtir des marqueurs moléculaires spécifiques (réaction PCR + sondes) de clones génétiques de *T. cruzi*, prenant pour cible la

partie hypervariable du minicercle (Veas *et al.*, 1990 ; 1991 ; Brenière *et al.*, 1992 ; 1995 ; 1998; Bosseno *et al.*, 1995 ; 1996).

Les *Leishmania* ayant également une évolution clonale prépondérante (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990), la même approche a été utilisée pour l'identification d'espèces de *Leishmania*, avec la même hypothèse de travail d'un déséquilibre de liaison entre les génomes nucléaire et kinétoplastique (Brenière *et al.*, 1999 ; Telleria *et al.*, 1999).

Cette approche a été également appliquée avec succès (Mathieu-Daudé *et al.*, 1994) pour la caractérisation du groupe de trypanosomes africains dénommé *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1 (Gibson, 1986).

L'hypothèse de travail que ces résultats suggèrent est que l'évolution clonale prépondérante chez *T. cruzi* et chez d'autres parasites apparentés porte son empreinte également sur le polymorphisme de l'ADN kinétoplastique. Cette hypothèse de travail a été remise en question par la découverte d'hybrides naturels de *T. cruzi* (Bogliolo *et al.*, 1996; Carrasco *et al.*, 1996; Machado & Ayala, 2001; Brisse *et al.*, 2003), et également, par l'obtention de recombinants expérimentaux montrant que l'ADN kinétoplastique était transmis par un seul des deux clones parentaux (Gaunt *et al.*, 2003). Cette dernière hypothèse, si elle indique que l'ADN kinétoplastique est transmis de façon uniparentale, impliquerait en revanche que son histoire phylogénétique ne serait pas parallèle à celle de l'ADN nucléaire, exactement comme l'ADN mitochondrial (à transmission maternelle) et l'ADN nucléaire (à transmission biparentale) chez les eucaryotes supérieurs.

Nous avons donc entrepris de faire une étude phylogénétique des séquences du minicercle de l'ADN kinétoplastique, avec deux objectifs synergiques et complémentaires: (a) tester de façon plus approfondie l'impact respectif de l'évolution clonale et de la recombinaison génétique sur le polymorphisme de cet ADN. (b) Donner une base solide aux approches empiriques de typage de souches prenant cet ADN pour cellule-cible, chez *T. cruzi* ou chez *Leishmania* sp. (Morel *et al.*, 1980; Veas *et al.*, 1990, 1991; Brenière *et al.*, 1992).

## 2 Matériel et Méthodes

### 2.1 Stocks de *Trypanosoma cruzi*

La population de souches étudiées est d'origine géographique variée et a été isolée à partir de patients différents, à partir de plusieurs espèces différentes de mammifères et de vecteurs.. La table 8 donne l'origine des stocks utilisés pour cette étude et leur détermination génétique (DTU).

Espèce	Code	DTU	Genre sp.	Pays	Localité
<i>T. cruzi</i> (1)	P 209 cl93	I	Homme	Bolivie	Sucre
<i>T. cruzi</i> (2)	Cutia C1	I	<i>Dasyprocta aguti</i>	Bresil	Espintu Santo, Colatina
<i>T. cruzi</i> (3)	SO34 cl4	I	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivie	Potosi
<i>T. cruzi</i> (4)	SP 104 cl1	I	<i>Triatoma spinolai</i>	Chili	Region IV, Combarbala
<i>T. cruzi</i> (5)	X10 cl1 Z1	I	Homme	Brésil	Belem
<i>T. cruzi</i> (6)	OPS21 cl11	I	Homme	Vénézuéla	Macuayas, Cojedes
<i>T. cruzi</i> (7)	lw cl4	II b	Homme	Chili	Region IV, Coquimbo
<i>T. cruzi</i> (8)	ESM. cl3 Z2	II b	Homme	Brésil	Sao Felipe Bahia
<i>T. cruzi</i> (9)	Mas cl 1	II b	Homme	Brésil	Brasilia
<i>T. cruzi</i> (10)	CBB cl 3	II b	Homme	Chili	Region IV, Tulahuén
<i>T. cruzi</i> (11)	Bug2148 cl1	II d	<i>Triatoma infestans</i>	Brésil	Rio Grande do Sul
<i>T. cruzi</i> (12)	RN-PCR-O	II d	Homme	Chili	Santiago-Region métropolitaine
<i>T. cruzi</i> (13)	TPK1	II d	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivie	Khala Khala Cochabamba
<i>T. cruzi</i> (14)	MN cl 2	II d	Homme	Chili	Region IV, Llapel
<i>T. cruzi</i> (15)	Sc 43 cl1	II d	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivie	Santa cruz
<i>T. cruzi</i> (16)	Cl Brener	II e	<i>Triatoma infestans</i>	Brésil	South Brazil, Rio Grande do Sul
<i>T. cruzi</i> (17)	VMV4	II e	<i>Triatoma infestans</i>	Chili	Francia-Region I
<i>T. cruzi</i> (18)	X1547	II e	<i>Canis familiaris</i>	Paraguay	Makhlawaiya
<i>T. cruzi</i> (19)	Tula cl2	II e	Homme	Chili	Region IV, Tulahuén
<i>T.c.marinkellei</i>	B3	-	<i>Phyllostomum discolor</i>	Brazil	Bahia
<i>T.c.marinkellei</i>	M109	-	<i>Phyllostomum discolor</i>	Vénézuéla	Caracas

**Tableau 8 :** Origine des 19 stocks de *Trypanosoma cruzi* utilisées pour cette étude.

## **2.2 Culture de parasites in vitro**

Pour préserver les stocks sur une longue période, nous avons utilisé la cryoconservation dans l'azote liquide. La procédure de culture parasitaire ainsi que la cryoconservation a été effectuée de la manière décrite dans le chapitre I.

## **2.3 Contrôle du génotype**

Afin d'éliminer toute erreur de manipulations ou de contamination, une analyse isoenzymatique de l'ensemble des stocks est réalisée avant leur utilisation.

L'identification isoenzymatique est basée sur cinq systèmes (voir chapitre 1). Pour certaines souches, l'identification avait été faite précédemment par un autre expérimentateur (Christian Barnabé) sur 22 systèmes isoenzymatiques.

## **2.4 Extraction de l'ADN total**

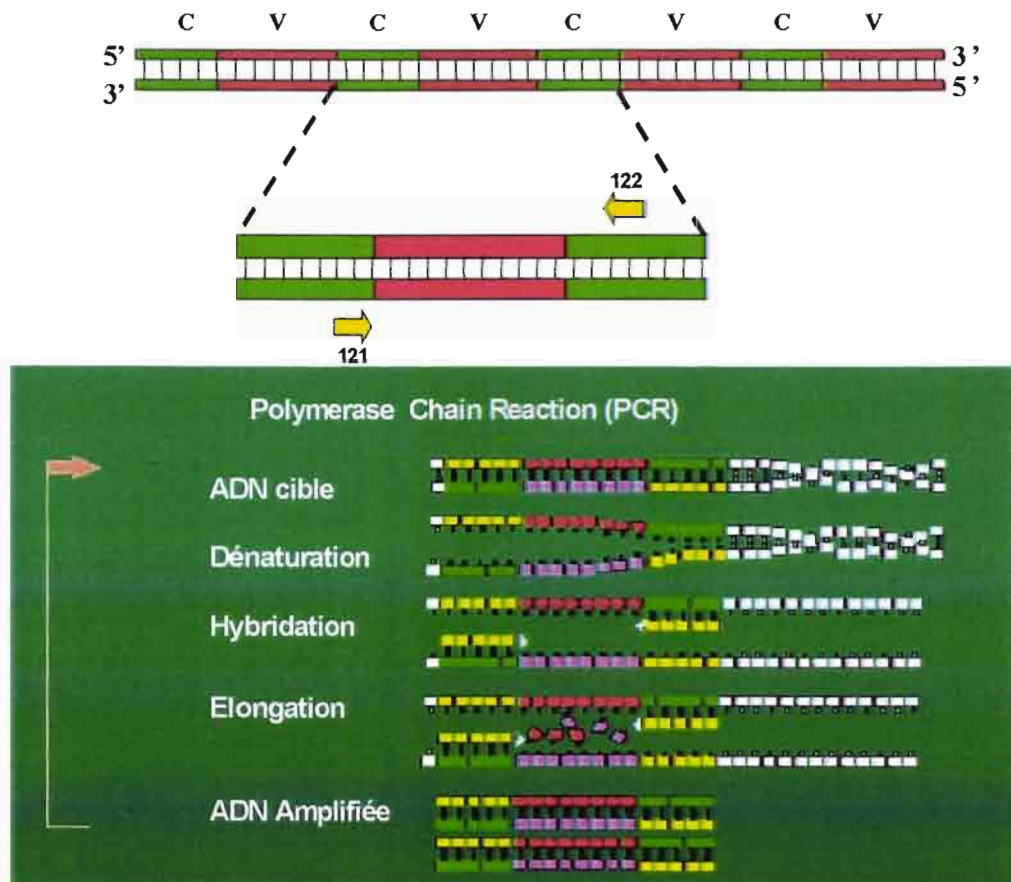
L'ADN a été purifié à partir de culot de parasites en trois étapes : la lyse parasitaire, la déprotéinisation et la précipitation de l'ADN. Ces trois étapes sont décrites en détail dans le chapitre I.

Comme notre cible est l'ADNk qui a une structure fortement compactée, nous avons suivi un protocole complémentaire de décompactation de cet ADN, afin d'obtenir une bonne purification des minicercles. Pour cela, nous avons soumis l'ADN avant amplification par PCR à une température de 95°C pendant 10 minutes, une homogénéisation par vortex, avant d'être tout de suite conservé sur la glace.

## **2.5 Amplification de fragments d'ADNk par la technique PCR (Polymerase Chain Réaction)**

### **2.5.1 Thermocyclage**

L'ADNk est amplifié par PCR au moyen d'une amorce complémentaire de la séquence conservée du minicercle du kinétoplaste (fig. 30).



**Figure 30 :** Position des amorces et procédure de la technique d'amplification par PCR

Les amorces appelées 121 (5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA 3') et 122 (5' AAA TAA TGT ACG GGG GAC ATG CAT GA 3') de 26 nt déjà décrites dans la littérature (Wincker *et al.*, 1994a ; Virreira *et al.*, 2001 ) ont été utilisées. La mise au point a consisté à déterminer l'optimum de chaque paramètre de la réaction PCR avec les réactifs et l'appareil à notre disposition. Une gamme a été testée pour chacun de ces paramètres et les conditions optimales pour un volume final de 20µl. ont été : 1,9 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,5 µM de chaque amorce, 121 et 122 et 0,12 U de Taq

polymérase. Plusieurs programmes de températures ont été testés ; le programme retenu fut : 5 min à 94 °C pour la dénaturation de l'ADNk, suivi de 40 cycles (20 sec à 94°C, 10 sec à 57°C, 30 sec à 72°C) et finalement 7 min d'extension à 72°C.

### **2.5.2 Electrophorèse en gel d'agarose**

Les produits amplifiés sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,6% dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate, EDTA) à 100 volts. Les gels sont colorés par incubation de 20 min dans un bac rempli de TAE 1X contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Après un rinçage de 5 min dans l'eau, les gels sont observés sous UV (306 nm).

## **2.6 Clonage des fragments de la région variable de l'ADNk**

### **2.6.1 Principe**

Le clonage consiste en l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur, ce vecteur étant propagé dans une cellule hôte. La culture de cette cellule et la purification ultérieure du vecteur permettent de produire des quantités quasi illimitées du fragment d'ADN cloné. Les vecteurs de clonage sont principalement les plasmides. Ils permettent de véhiculer des fragments dont les tailles sont de 100 pb à 10 Kb.

### **2.6.2 Clonage des amplicons**

Nous avons essayé différentes méthodes de clonage les fragments obtenus après l'amplification des régions variables des kinétoplastes. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant le système TOPO-TA cloning kit de Invitrogen. Ce kit utilise la méthodologie dite de clonage T/A. En effet, la Taq polymérase ajoute un A supplémentaire aux extrémités 3' d'une partie (30% environ) des amplicons. Cela crée donc une extrémité 3' dA. Le plasmide qu'on utilise pour la ligation (pCR2.1) est ouvert et possède des extrémités 3' dT. La ligation est donc grandement facilitée par l'hybridation de dA et de dT.

#### **2.6.2.1 Ligation**

Nous avons suivi le protocole et les recommandations du fabricant: les ligations ont été réalisées dans un volume final de 6µl. Chaque réaction contenait 1 µl de milieu de PCR et 1 µl du mélange plasmide pCR2.1/topoisomérase. La ligation utilisant la

topoisomérase est extrêmement rapide, en une dizaine de minutes d'incubation à la température ordinaire. Le mélange est utilisé pour transformer les bactéries compétentes.

### **2.6.2.2 Transformation**

Nous avons utilisé la bactérie *Escherichia coli*, souche TOPO10, livrée avec le TOPO-TA cloning kit de Invitrogen. Nous avons modifié le protocole du kit et n'avons utilisé que la moitié des cellules. En bref, les bactéries sont décongelées dans la glace, juste avant la transformation. Ensuite, on ajoute 1 µl de milieu de ligation à 25 µl de suspension des cellules compétentes. La suspension est laissée dans la glace pendant 30 minutes, puis on applique le choc thermique par incubation au bain-marie à 42°C pendant 30 sec. La suspension est remise dans la glace durant 2 minutes. Finalement, 250 µl de milieu de culture SOC est ajouté et le mélange est incubé à 37 °C pendant 30 minutes. Cent µl de ce mélange sont ensuite étalés sur boîte de Pétri contenant un milieu LB agar additionné de 75 µg/ml d'ampicilline. Afin de détecter les clones recombinants, 40 µl de X-Gal (20mg/ml) sont étalés au préalable sur les boîtes. Les boîtes sont incubées pendant toute la nuit à 37 °C.

### **2.6.2.3 Minipréparation**

Les colonies bactériennes recombinantes sont individuellement repiquées dans 2 ml de milieu liquide Luria Broth (LB) avec ampicilline 75µg/ml. Le milieu est incubé une nuit à 37°C sous agitation.

Le lendemain, 1 ml de milieu est centrifugé à 3340g pendant 5 min et le surnageant est éliminé et le culot repris dans 300 µl de solution P1 (Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 10 mM, RNase 50 µg/ml). Après mélange vigoureux, on ajoute 300 µl de la solution P2 (NaOH 0,2M, SDS 1%), l'homogénéisation se fait par inversion de tube. Enfin, on ajoute 300µl d'une solution P3 qui contient de l'acétate de potassium 3 M (pH 4,5). L'ajout de cette solution provoque une précipitation en masse de PDS (dodécylsulfate de potassium) insoluble avec les complexes PDS-protéines, ainsi que la précipitation de l'ADN génomique dénaturé. Seul l'ADN plasmidique et l'ARN restent en solution.

Les tubes sont centrifugés à 9279g pendant 30 min. 500 µl de surnageant sont prélevés et l'ADN plasmidique est précipité par ajout de 500 µl d'isopropanol. Après une centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est rincé par 300 µl d'éthanol 75% et

séché sous vide. Enfin, le culot est repris dans 20 µl de tampon TER (Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM, Rnase 20 µg/ml).

### **2.6.3 Digestion enzymatique**

Deux µl de solution d'ADN plasmidique sont digérés pendant 1 h à 37°C dans un volume final de 10 µl en présence de l'enzyme *Eco* RI (2 unités par tube) et du tampon approprié. Les produits de digestion sont alors séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour le contrôle de la présence et de la taille du fragment cloné.

## **2.7 Séquençage de l'ADN**

Le séquençage des produits PCR clonées des régions variables de l'ADNk a été réalisé comme précédemment décrit (chapitre I).

## **2.8 Hybridations moléculaires**

### **2.8.1 Préparation des membranes**

Nous avons utilisé la technique du «dot blot», consistant à déposer en un point précis d'une membrane les ADN de toutes les souches étudiées, puis à hybrider la membrane avec une sonde constituée de fragments spécifiques.

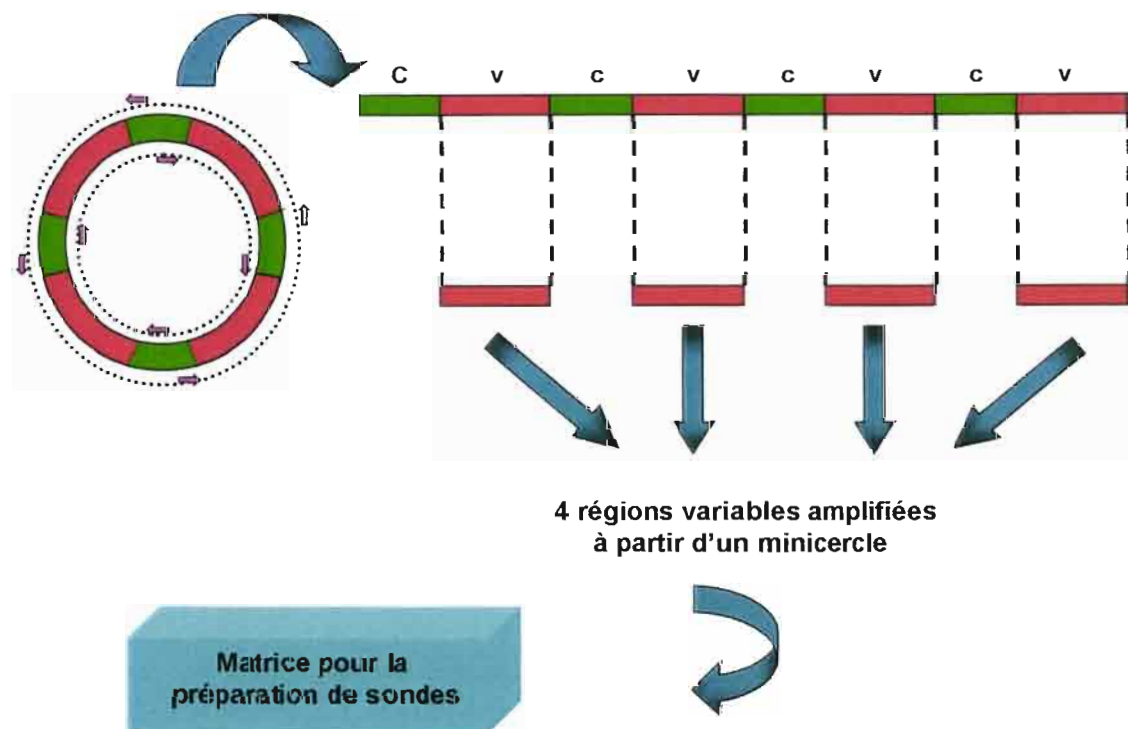
La membrane de Nylon (Amersham) est imbibée dans la solution de dénaturation (NaOH 0,5 M – NaCl 1,5M) pendant 5 min, placée sur un papier 3MM. Elle est ensuite placée entre les deux parties de l'appareil à «dot blot» en Plexiglas doté de 96 puits. Le vide est réalisé au moyen d'une pompe à eau (400 mbar) et les échantillons sont alors déposés. Lorsque la totalité du volume est passée, la membrane est rincée en 2 X SSC (NaCl 0,3M, Na<sub>3</sub> citrate 0,03M pH=7,2) puis séchée à l'air ambiant.

Afin d'obtenir une fixation efficace de l'ADN sur la membrane, nous avons utilisé la fixation par la chaleur : la membrane est placée à l'incubateur pendant 10 min.

### **2.8.2 Préparation des sondes ADNk**

Trois sondes appartenant aux DTU II a, II b, II d et II e ont été obtenues à partir des souches P209 c193, CBB c13 et Mn c12 respectivement. Elles ont été obtenues grâce à l'amplification par PCR de la région variable du kinétoplaste avec des amorces flanquant cette région.

Les amorces utilisées sont CV1 (5' GAT TGG CGT TGG AGT ACT ACT AT 3') et CV2 (5' TTG AAC GGC CCT CCG AAA AC 3'). Elles sont situées en zones flanquantes des régions variables des minicercles. La figure 31 présente la localisation de CV1 et CV2, leur sens d'élongation pendant la PCR et les 4 régions variables amplifiées par minicercle, qui ont été employées pour la construction de sondes. Les séquences de ces amorces comprennent des sites de coupure par deux enzymes de restriction, ce qui permet après amplification de les éliminer et ne conserver que les régions variables.



**Figure 31 :** Fragments des régions variables des minicercles par la construction des sondes produites de PCR.

L'amplification a été réalisée dans un volume final de 40  $\mu$ l, où le tampon de réaction contient MgCl 1,8 mM, CV1 et CV2 20 pM (concentration finale), 25 mM de dNTP, et 1 U de Taq polymerase. Les cycles de PCR comprennent un cycle initial 5' à 94°C, 2 min à 48°C, 2 min à 72°C suivi de 30 cycles de 5 sec à 95°C, 30 sec à 48°C, 1 min à 72°C.

Chaque stock de référence choisi (P209 cl93, CBB cl3 et Mn cl2) a été amplifié 10 fois. Les produits obtenus de 270 pb (bande correspondante aux régions variables des minicercles) ont été extraits d'un gel préparatif (agarose low-melting 2 %), puis plongés dans un bain de bromure d'ethidium afin de visualiser les bandes. Les produits d'amplification sont récupérés en découpant les bandes du gel et purifiés par le kit "QIAquick PCR purification kit". En bref, la bande découpée qui contient l'ADN est immergée dans une solution QG fournie dans le kit et incubée à 50° C pendant 10 min. Pour la précipitation, un volume d'isopropanol est ajouté, et le mélange est déposé dans une mini-colonne séparatrice Quiagen. Grâce à la centrifugation (9279g) pendant 1 min, on élimine tous les contaminants. Pour favoriser l'élimination de restes d'agarose, on effectue un lavage avec une solution qui vient aussi avec le kit (750  $\mu$ l), suivi d'une centrifugation à 9279g pendant 1 min. L'ADN est récupéré dans un microtube propre dans 50  $\mu$ l de solution d'éluion [10 mM Tris-HCl (pH 8.5)].

Les séquences amplifiées sont composées de régions variables des minicercles d'ADNk, avec à chaque extrémité un morceau complémentaire à des régions conservées qui correspondent aux amorces. Pour éliminer ce facteur de faux positifs potentiels, ces régions d'ADN ont été éliminées par digestion enzymatique. La première enzyme utilisée est *Sca I* dans un volume de 50  $\mu$ l. L'ADN digéré est précipité par l'éthanol/acétate. Une deuxième digestion est réalisée par *Sau 96I*. Après la précipitation de l'ADN par l'éthanol/acétate, les culots d'ADN sont resuspendus dans 16  $\mu$ l d'eau.

Le marquage a été fait grâce au kit « DIG-Nick Translation Mix » (Roche). Ce kit permet de produire une sonde marquée par l'introduction dans l'ADN des nucléotides couplés à un antigène (digoxigénine). Les nucléotides sont incorporés dans l'ADN après coupure d'une des deux chaînes de l'ADN par DNase I. A partir de chaque coupure, l'ADN polymérase I recopie (activité ADN polymérasique) la chaîne de l'ADN en utilisant les nucléotides triphosphates présents dans le milieu. La sonde immobilisée après l'hybridation est détectée par des anticorps.

Pour le marquage, nous avons suivi le protocole du fournisseur. En bref, 1 µg d'ADN est dilué dans 16 µl d'eau stérile. Ensuite, on ajoute 4 µl de DIG-Nick Translation Mix (DNA polymérase I, DNase I, digoxigenin [DIG]-11-dUTP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Et on incube 90 min à 15°C. Enfin la réaction est arrêtée par addition de 1 µl de EDTA 0,5 M (pH8).

### **2.8.3 Hybridation**

La technique d'hybridation permet de détecter une séquence donnée parmi une population d'autres séquences, à l'aide d'une sonde (fragment d'ADN dont la séquence est complémentaire de celle recherchée).

L'hybridation comprend 3 étapes :

#### **2.8.3.1 Pré-hybridation**

Cette étape consiste à saturer tous les sites de fixation non spécifiques. La membrane est incubée dans le tampon d'hybridation, à raison de 75 µl de tampon / cm<sup>2</sup> de membrane. En condition standard, la durée est de 2 à 4 heures.

#### **2.8.3.2 Hybridation**

Cette étape a une durée de 12 à 16 heures, durant laquelle le filtre est mis en présence de la sonde marquée.

La sonde est dénaturée pour bien séparer les deux brins d'ADN par un chauffage à 100°C pendant 10 min. Ensuite, elle est immédiatement ajoutée au tampon d'hybridation (5X SSC, 5X de solution de Denhardt, 0,5% SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé). L'hybridation se poursuit toute la nuit à 65°C.

#### **2.8.3.3 Lavage des membranes**

Les membranes sont lavées deux fois 10 minutes à température ambiante avec 2X SSC, 0,1% SDS, et une fois avec 1X SSC, 0,1% SDS à 65°C pendant 15 min. On effectue ensuite un autre lavage à 65°C avec 0,5X SSC, 0,1% SDS pendant 15 min.

#### **2.8.3.4 Détection de la sonde et révélation**

Les membranes sont lavées avec le tampon 1 (DIG- Nucleic Acid Detection kit, Roche) qui contient 0,3% de Tween 20. Ensuite, une incubation avec 100 ml de tampon 2 est effectuée pendant 30 min.

La détection de la sonde est réalisée en incubant la membrane pendant 30 min avec des anticorps antidigoxigénine-AP (150mU/ml en tampon 2),

Pour éliminer l'excès d'anticorps, la membrane est lavée 2 fois pendant 15 min avec le tampon 1. Ensuite, le substrat (X- phosphate) coloré (NBT et BCIP) est mis en contact avec la membrane et incubé pendant 5 H.

Les membranes sont ensuite brièvement lavées et épongées sur papier Wattman 3MM, puis séchées à température ambiante.

## **2.9 Méthode d'analyse**

### **2.9.1 Alignement des séquences**

L'analyse comparative des séquences nécessite que les séquences soient homologues. En pratique, cela revient à obtenir un alignement des séquences où la condition d'homologie des sites nucléotidiques soit respectée.

Tous les alignements de séquences sont fondés sur des programmes informatiques d'alignement multiple, qui commencent par aligner les séquences les plus similaires et ajoutent progressivement les séquences les plus divergentes. Les séquences sont alignées par addition d'indels (insertion/délétion), qui sont placés dans les positions où il n'y a pas de similarité. Cette introduction d'indels doit ensuite être vérifiée par un ajustement « à l'œil » (Baldauf, 2003).

Nous avons utilisé le programme d'alignement « Clustal X ». (Thompson *et al.* 1997) puis ajusté l'alignement obtenu grâce à l'éditeur de séquence « Sea View » (Galtier *et al.* 1996).

### **2.9.2 Recherche de similarité de séquence par « Blast »**

Blast est un programme de recherche de similarité de séquence (Altschul, 1990, 1991) de consensus. Il a une interprétation statistique bien définie, qui facilite la distinction de couples aléatoires même si elles sont très éloignées. Blast présente différentes options d'application en fonction du type de recherche. Pour notre étude, nous avons utilisé le programme Blastn pour comparer chacune nos séquences avec une base de données formée de l'ensemble de nos séquences.

A chaque comparaison de séquences, le programme donne un « bit score », calculé par assignation d'un score de 1 pour chaque « match » (bon appariement) et 0 pour un « mismatch » (mauvais appariement) avec soustraction du nombre d'indel. La « E-value » correspond au nombre de « match par rapport à la base de données de séquence considérée, intervenant au hasard. Plus la valeur de la E-value est faible, plus il y a de chances que la similarité soit « réelle » autrement dit, plus il y a de chances que cette similarité reflète une ascendance commune. L'interface Internet du programme Blast sur la liste d'analyse des séquences d'Infobiogen ([http://www.infobiogen.fr/services.analyseq/cgi-bin/blast2\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services.analyseq/cgi-bin/blast2_in.pl)) a été utilisée pour ces analyses.

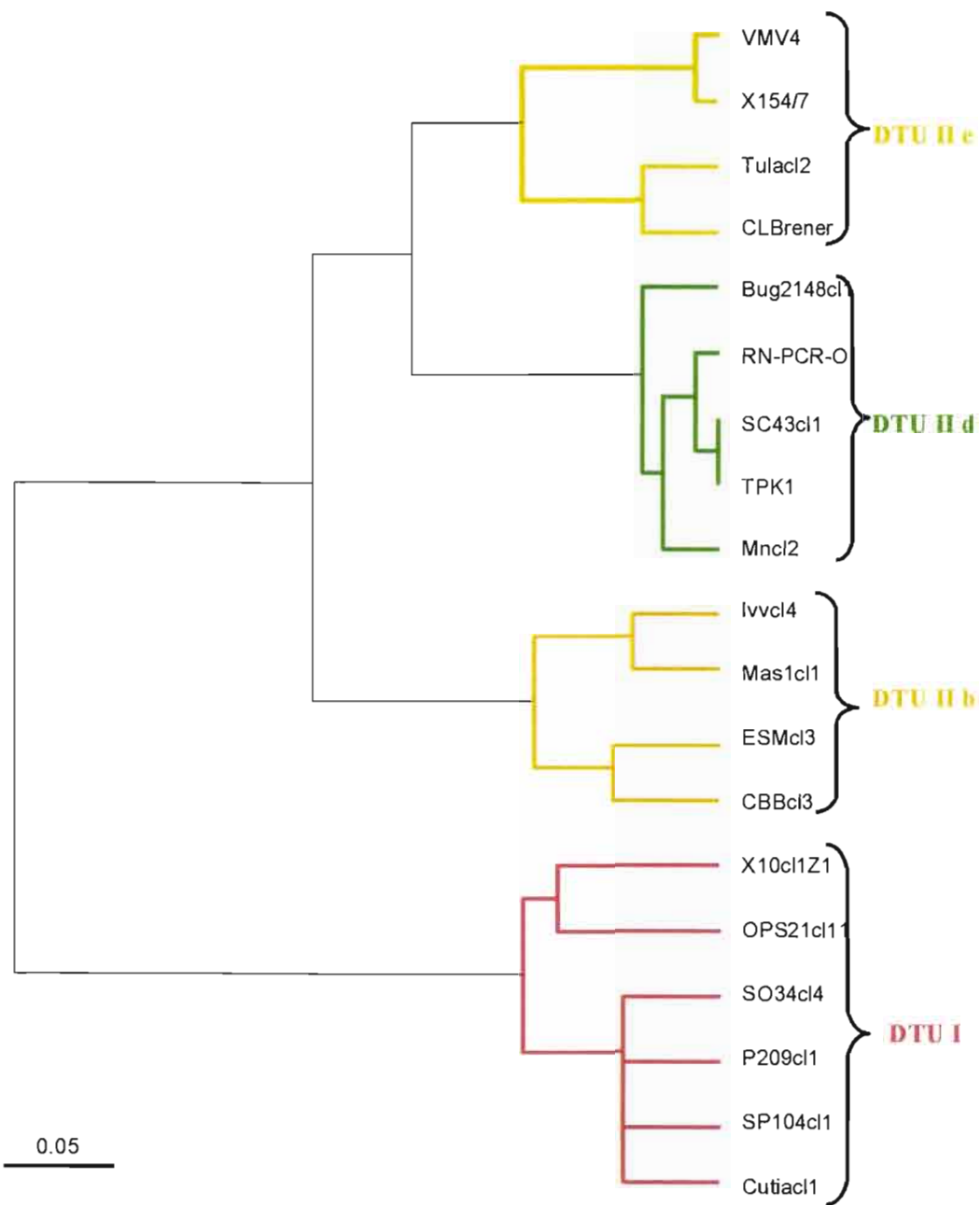
### **3 Résultats**

#### **3.1 Stocks étudiés**

Notre étude porte sur les DTUs I, IIb, IIc et Iie, avec 6 souches pour chaque DTU. Nous avons utilisé les souches de *T. cruzi marenkellei* comme groupe externe.

#### **3.2 Polymorphisme isoenzymatique**

La structuration de la diversité génétique de *T. cruzi* à partir des données isoenzymatiques des 19 souches utilisées au cours de ce travail est présentée sur la figure 32. Les subdivisions mises en évidence sont en accord avec les résultats obtenus précédemment au sein de l'équipe (Tibayrenc *et al.*, 1986, 1993; Barnabé, Brisse et Tibayrenc, 2000).



**Figure 32** : Arbre UPGMA construit à partir des données isoenzymatiques pour les souches analysées pour l'ADNk.

### **3.3 Amplification par PCR de l'ADNk**

La technique de PCR consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN encadré par l'enchaînement de cycles successifs de dénaturation de l'ADN cible, hybridation d'amorces, et polymérisation d'une molécule d'ADN complémentaire à celle située entre les amorces, chacun de ces cycles est dépendant de la température à laquelle est placé le mélange réactionnel, ce qui justifie l'utilisation d'une polymérase thermostable.

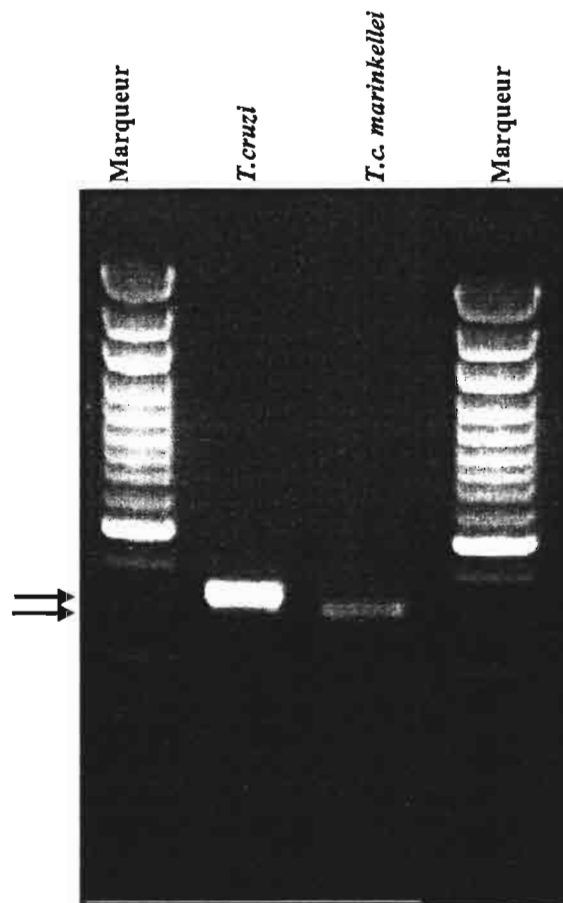
Les conditions que nous avons appliquées pour l'amplification, ont été mises au point sur des souches représentant chacune des DTUs de *T. cruzi* analysées dans le présent travail.

#### **3.3.1 Sélection d'amorces**

Nous avons testé des amorces S35 et S36 mais un bruit de fond assez important a été observé. Nous avons donc gardé l'amorce 121/122, très semblables à S35/S36, mais juste un peu plus longue que ces dernières et décalée de quelques nucléotides. Ces amorces (121 et 122) nous ont donné des résultats avec une bande nette, où tout bruit de fond a quasiment disparu. En conséquence, nous avons décidé d'utiliser les amorces 121/122 pour nos expériences de sous-clonage.

#### **3.3.2 Profils d'amplification**

Toutes les stocks de *T. cruzi* utilisés ont montré après amplification une bande de 330 pb de longueur. La taille du fragment est identique chez toutes les souches de *T. cruzi*. Néanmoins, les fragments amplifiés chez les *T. cruzi marinkellei* présentent des petites variations de taille (fig.33).

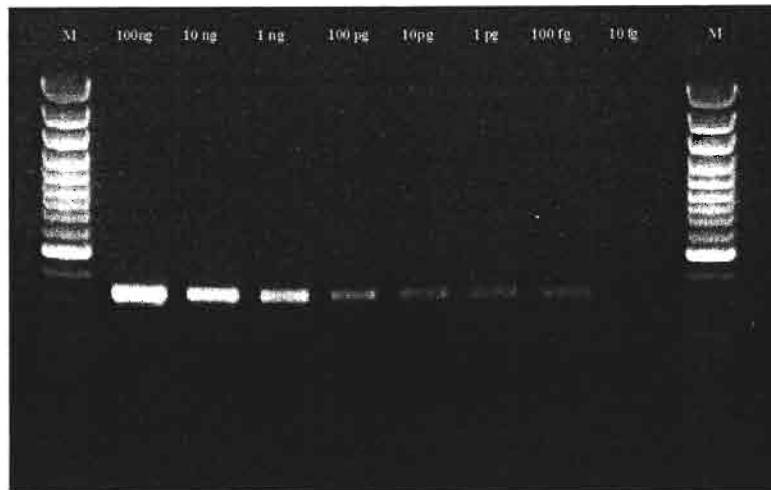


**Figure 33 :** Gel d'agarose à 1,6 %. Ligne M : Marqueur de poids moléculaire. Ligne 1 (amplicon de *Trypanosoma cruzi*). Ligne 2 : amplicon de *T. cruzi marinkellei*.

### 3.3.3 Sensibilité et spécificité

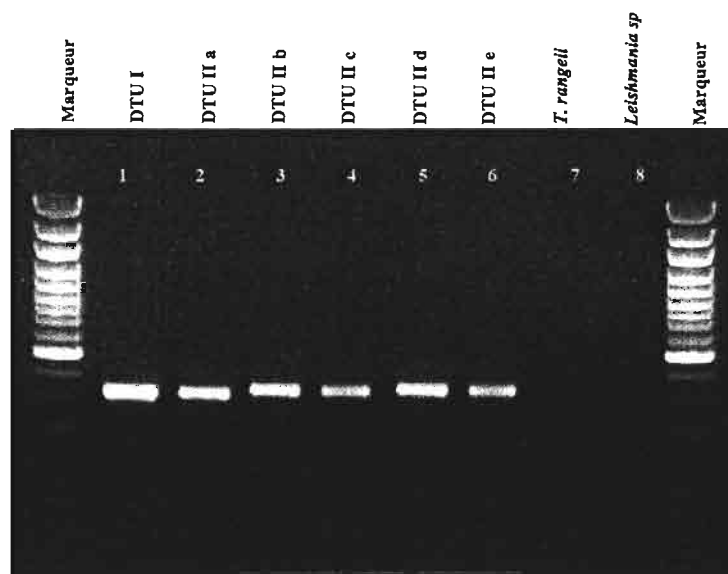
La sensibilité de la technique a été évaluée sur une gamme de concentration d'ADN des stocks parasitaires sur plusieurs souches représentant les différentes DTUs, lesquelles ont donné la même sensibilité, L'amplification pour la souche Sc43 c11 représentante du DTU II d es présentée en exemple.

La quantité minimale amplifiée correspond à 10 fg. On considère qu'un parasite contient 150 fg d'ADN total. Cette technique permet donc théoriquement de détecter un seul parasite par échantillon (fig. 34).



**Figure 34 :** Gel d'agarose à 1,6%. Notez les quantités d'ADN utilisées pour l'amplification par PCR.

La spécificité a été évaluée par comparaison avec les ADN de *Trypanosoma rangeli* et de *Leishmania*, pour lesquels aucun profil n'est vu (fig. 35).



**Figure 35 :** Produits d'amplification par PCR. Lignes 1-6 : *Trypanosoma cruzi*. Ligne 7 : *T. rangeli*. Ligne 8 : *Leishmania sp*. Ligne M : Marqueur de poids moléculaire.

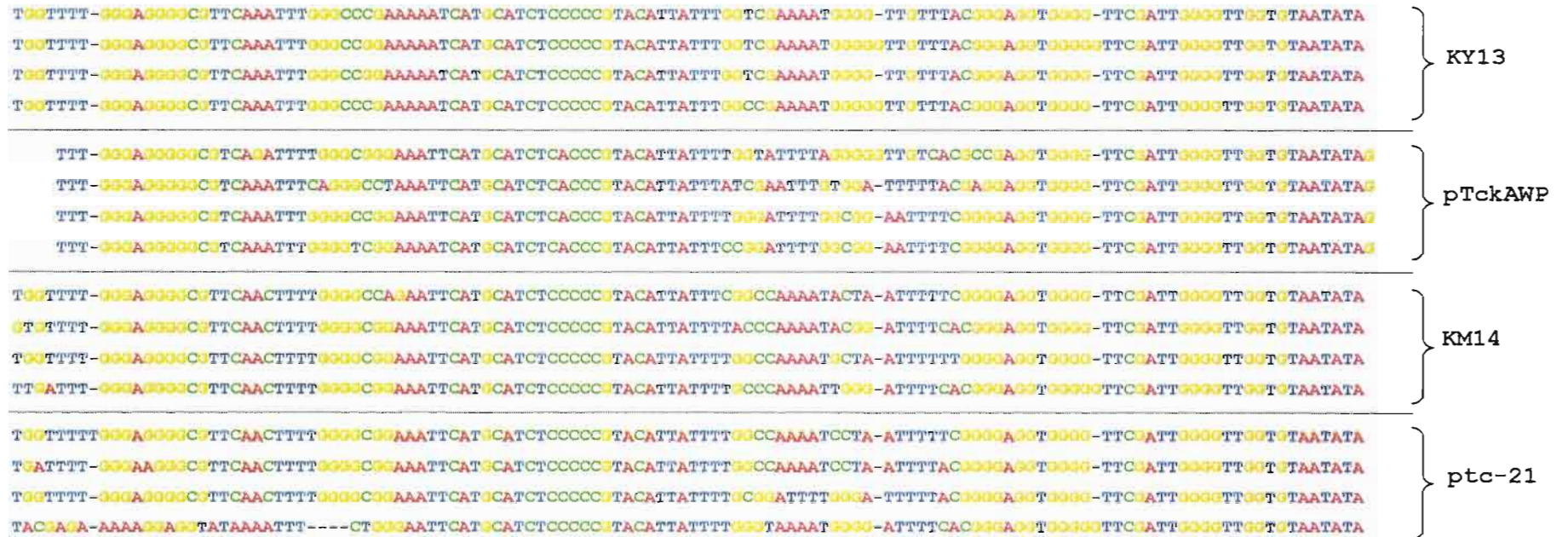
### **3.4 Séquences complètes de minicercles d'ADNk**

Des études menées par Macina (1986) et Degrave (1988) démontrent que les séquences des minicercles d'ADNk présentent quatre régions conservées et quatre régions variables à l'intérieur d'un même minicercle, les souches étudiées étaient KY13, ptckAWP, KM14, et ptc-21. La souche KY13 appartient à la « souche Y » ; la souche ptckAWP est une souche non clonée, et les souches KM14 et ptc-21 appartiennent à la « souche CL ». La « souche Y » est comparable aux DTUs II b/d (deux génotypes différents) et sont d'origine sylvestres La « souche CL » appartient au DTU II e. Sur la figure 36, nous présentons les séquences alignées des quatres régions conservées et pour chacune de ces quatre souches.

Pour chaque minicercle, nous avons calculé le pourcentage de similarité des régions conservées, et nous observons une homologie de 76 a 99 %. (tab. 9).

A l'analyse des régions variables, on observe que les 4 régions sont de séquence unique, il n'existe aucune homologie entre elles. Les séquences variables alignées par clustal X des mêmes minicercles sont présentées dans la figure 37. On constate qu'il n'est pas possible d'obtenir un alignement de bonne qualité.

Figure 36 : Régions conservées de minicercles individuels d'ADNk de *Trypanosoma cruzi*



<b>KY13</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>C1</b>		99,17	99,17	99,17
<b>C2</b>	1		100	98,36
<b>C3</b>	1	0		98,35
<b>C4</b>	1	2	2	

<b>pTckAWP</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>C1</b>		83,9	88,98	85,59
<b>C2</b>	19		86,44	85,59
<b>C3</b>	13	16		96,61
<b>C4</b>	17	17	4	

<b>KM14</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>C1</b>		89,26	95,04	88,43
<b>C2</b>	13		91,74	95,87
<b>C3</b>	6	10		91,74
<b>C4</b>	14	5	10	

<b>ptc-21</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>C1</b>		97,52	90,91	76,92
<b>C2</b>	3		90,08	76,07
<b>C3</b>	11	12		76,07
<b>C4</b>	27	28	28	

**Tableau 9 :** Pourcentage de similarité des régions conservées par minicercle (chaque minicercle appartient à une souche différente).

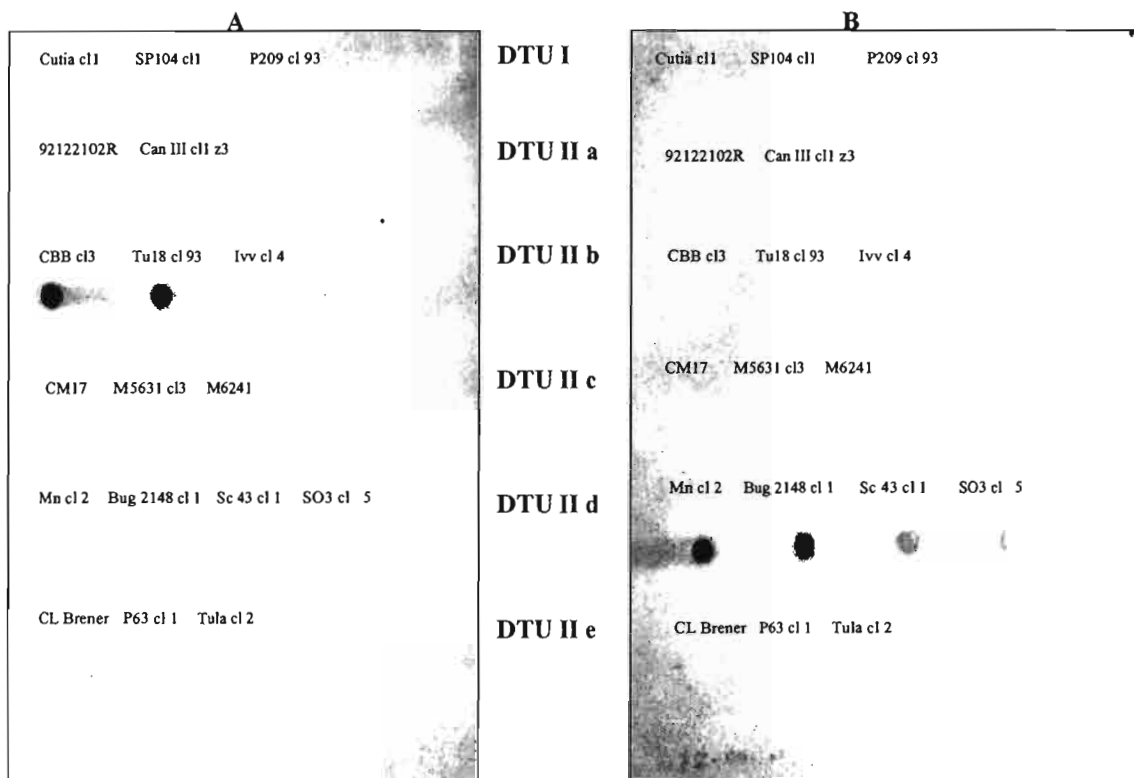
Figure 37 : Régions variables de minicercles individuels d'ADNk de *Trypanosoma cruzi*

<pre> ----TAGACTAG--AT--TGGATT--ATTGGATTATGGATGAGGTATATA-GTTGATTATGTTTGT--GT--ACGATG-ACTATGATGTG-AGTTGGAGGTTA-TTATTGACTATA----TATTGGTGA--TTATTGT- -AGCAAGAGTGGTTAT--TGTATT--TTAGAATTATGATTAGAACGTATATGATGTTTATAGATGTGAGTTCAGAGTAAAGTAAATTCAGTGGTGTAAAGACTTAGATTGTGTATATA----TAGTATGTTG--TTAATCG- -----GGGATTA--TGGTGGGTATGATAGAATGGTAGAATATA-GT--TAGTTGA--TATGATTATAAATATGTGTACAGAAGTGTGATGAATGTAGTGGAGTTACTTAATGAAAGTGTATCTGAAGTT- -----GGCACTATGTGTGAGTTG--GAGGGGTG--TATAGTATAAATAGTTTATGA-T-TGAGATA--GAGTTATATA-TGTGATA-GTGACGTGTTTGTGAGTGGATAAAGATAAATATTCTTGAGATTGTTACTGATTAA- -----GTGCAGA-AGAGTTT TAGGATTTTATTGGATGCG-TAT-----GTATGATGTCGTT----ACGGTGTACTATGAGTTTG--TTCTTAGTAGTGT----TAATGTGATT--TGTTATA -----GACAGATTGTTT CAGAATFG--TTAATAGTG-GTTTTGATTATTGAATGTATGT-TCCGTGT-TGTGATGATTG-ATGTTGACGAGGCCAGAGATAAGGTTGTTGAGAATGTTTATAGGATTTTATTGTTATAG- -----GACAGAGTGTGGGTTAA--TGATGGTGTATGTTTGTGTTTGTAGTCTAT-----GATAGATGTCCTATA----GAGACCTTGTATGTATGAAGATGAAGATCTAGT---AAGTTTATGT--TGTTTGT --GGCGTGGGTGTGAGTATAGATTGA-ATGTTATTTT GATTTTGTGTTGTTG-TGTAT-TGATAGTATGATGTTACTG-TAACGGTG-AGAATGAGTGTGAGTTAGTAGATGAGTA---TAGATTGATTG-TTATTATT -----GTA---TACTTGCG-TATTTGATTTT TAGAATTTG---AGTTTT--GACTTGTATTCTGTGATGGGTAGTAGAACATAGACGATACTCAGATTGTAGTAGAGATAAGATTTGATGTT- -----GTAATTGA-TTCATAATG-GTTTGTAGAATTTGATAAC--T-TGAATAT-AATGTTTATTGTTAGATGTTAGGAGCCGATATAAGTTTTTGGAGTATAGAAGAGATGATGGAAGTATATTT- CAACTGGTATGGCTATAATGGATTT--ATTTGATTTGAGTTTTGAATATTAGTTTTATT-TATGTGGAAGTTATGAAG-ATAA--AAGTGAGATGGTAATGTGTGTGATGATAGTGG---TAGTATATAG--TTATCAT- --GACGGGTTGG--AT--TATATTG--ATTAATAATGTATTCTATGTATTCT-GTAGATTATGTGATT-TGTGATGATGATTGTGTAGTA-TGTAGTAATCAATTGAGGATGACA---TAGAGTTGAA--TTAATAT- -----GCATGGGTTGCGGTTGTTATTTATGGTGTATTGTTGATTTATGGTTT-TGTGTATTGGGATTAGTG---ACTATG-ATTAGAACAACATTATATAGAGATAGG---TGTTAGATGTT-TCAGTTT- -----GGCATATAGATTATAGATTGTTATTTTGTGCTATGA-T---GAATTTGATGATGC-ATGTTGACACATATAAAGATATCACAGGAGAGATAA---TGATTTAGTT---GATTAT- GGATCTGATTTGGGAGGTAAGTTGGTATATTAAATGTTAGTTTGGTAGTTTTA-TATT-----GCTTGGTGTATTG-T-ATGATCTATAATGAAGGTC----TGACGTGAGGTA---AGAAGTAGAT---AGTGGTA -----GGCATTG-GTCTGAGTTG-TGTTAGTG-TTTAGATAATGAGTTGTG---TATTTA-GTGTAGGTT-TATGACATATCAAGTTTTAAGGTAGAGGAGAAGAATA-----AGATAGTT--TAATT-- </pre>	<p>} KY13</p> <hr/> <p>} pTckAWP</p> <hr/> <p>} KM14</p> <hr/> <p>} ptc-21</p>
<pre> GTT-TATATAAATG---AT--TTAACGATATAGTTTGTAT----TGCAAGGTAGGGTGT-GG-GGTTGTGTTTGTAGTAGTGGTATAGGTTTATTGATTACGGTAAC-GGAGGTCTGTAATTTTGTGAAAACG GTTATACATTAATGTTTATGCAGGTGTGTTGAGTGTGTAATATGATGGGTTGTGTTG-AGATGATGGTGTGGTTGTTAGTATG-TGTTTGAATTACTGAAATTAGGGGTTCCGAAAATAGGAAAATCCT TGTGAATTGTATTATAAAGTTTGTATAAATTTGTTGAAT--AAAG-GTGTGTTGGT--GGCATGTGGGTTTGTGTCGACCACTGG-ATACATTAT-----GAGGGTGGAAATTCGAAAATGT GTTTAGTGTATATATGATCTATTGT-GTAATTCCTTAATT--AT-ATATTTAGTTGTT-TGGATTGGTGTAGGTTGTGGTAGTTAGGTGTTGCCTGCAATAAA-AGGGGTTTGGGAATTCGGGTTGGA </pre>	<p>} KY13</p> <hr/> <p>} pTckAWP</p> <hr/> <p>} KM14</p> <hr/> <p>} ptc-21</p>
<pre> ATTTGATGTGATGC-TGTATAAT--GTGT-TA--ACTATAATTGAATGGTGGTAGTG-GTA--TATGTTGGGAGTGTGTTG-ATG--TTATTGTTGCAGAAATGTCCGGAAAAATTCAGAAAATCCTG TTTAAATGATAAGTATTATGTTATAATTTAATTTAGGAG--GTGG-GTAGGGTAG--AATATATGGTTGTATGGTTGAAGATGGATATATGTTATTGGATA-TTGAGGGCTAAAATTACGTGAATGTTGTG GTTTGAAGTTTAGTA-CATGTGTT--AAACGTAT-ACTATAGGTTGGTGTGGGTTGTG-TTAATGGTGTATGAGTACAATCTTG-AAA----AATATTGAGG-----TT-AAAAATTCACGGAAAGTTGGT GTTAGTTATCGATTT-TGATTGTT-GAATATA--ATAGTGTATGAGAGGTAGTTACT-GGT--TAGTGGTTGAAGGAATGGTT-GTAGATTATGGATGTAACA--TGTCTGAAAATTC-TGGAAGCTTG </pre>	<p>} KY13</p> <hr/> <p>} pTckAWP</p> <hr/> <p>} KM14</p> <hr/> <p>} ptc-21</p>
<pre> AGATAGTTGGTGT-TACTATATAGTTATAGATTTATACTT--ATGTTATGAAGTGGGT-GTAGTTGGTATATGGTACGTGCATGGGTTGGGTTGTTCCCTGAAA-ATAGGGGTTAGAAATTCGGGAATGT ATTCATTGTTGCTATTTATGTAATATATATATTCTGTAAT--GTTGTATCTGGGTTGGTATGTGGGTTGGTTGTTTAGGTACAG-GTGTGTTGTTGTTAAA-TTTGGGTTAGAAAATTCGGGAAAGT AGTTAAAGTTTAT-----TATCGATGTTATATGTTGTGT-----TATATTTTGTG-GAGGGGTTGA-AGGTTGGGGTGTACTGGTTAAATTTGGTTACT--GAAAATCCGGAAATTTG AGT-T-TATTTGTA--ATGTTGATATTATAATACCTATA--TGTTAGTTTATGTTT-GGTAGTTTGGTGATTTGTTATGGTGTGTGGCTGATTACGAGAAAAAGGAGGTATAAAAATTTCT </pre>	<p>} KY13</p> <hr/> <p>} pTckAWP</p> <hr/> <p>} KM14</p> <hr/> <p>} ptc-21</p>
<pre> GTTTATTGTATG---TATATCATT-GTTTATACTGTTATTTATTTATTTCTTGCCTG-GTGGTGGGGTTGGGTTGTGTGATA-GGTTTGTATCCTAAAATTTTGGTACCTAGAAATTTGGGGAATTT -TGGAATGTATA-AC-TACATATTA-AAGTATAT-AATATTTAGAGATGGGTTGTGTT-GTG--TGT--TTGGTAGAGCGTGT--GATCCCTAATTTTGTGG-----TCAAGAAA-TACGGAGAAAC GTGATTTGTAAAATAT-TGTATGATG-GTGTATAG-ACTATAAATAATATGTTGTGTTT-GTA--TAG-GTTAGTTGTGGTAGTA-GGGTATTGTTACTAAAATTTGGGTTACGGAAA-TTCGGGAAATC GTGTAATGAATGT-TGAACGTTATT-ATACTTGTCTGT---AT-TTATGTGGTGGTA-GGTAATGGTGTAGGTTGGTGTGTT--GTTGACGCTGACGATAA-AGGGGTTCCGAAAATTTCCGAAAATTT </pre>	<p>} KY13</p> <hr/> <p>} pTckAWP</p> <hr/> <p>} KM14</p> <hr/> <p>} ptc-21</p>

### **3.5 Hybridation avec des sondes**

Les régions variables des minicercles des ADNk de 3 souches ont servi pour la construction de sondes . Chaque sonde est hybridée sur le produit d'amplification par PCR des 19 souches étudiées, préalablement déposé sur une membrane de Nylon par la méthode de « dot blot » (voir matériel et méthodes). Les produits d'amplification sont disposés en colonne, où chaque colonne correspond à une DTU déterminée.

On observe que les hybridations ont une intensité différente. La figure 38 montre des hybridations avec la sonde CBB qui a 5 H d'exposition. Elle produit un signal avec l'ADN de la souche CBB et celui d'une autre souche de la même DTU (Mas cl1). Par contre, une troisième souche (IVV cl4) n'est pas reconnue. Par ailleurs, lors d'une hybridation avec une autre sonde (Mn cl 2) correspondant à la DTU II d, on observe que les intensités de signal sont aussi différentes selon la souche. Il faut noter que le signal le plus fort correspond à l'ADN homologue (souche Mn cl 2), mais que les autres souches de la même DTU ne sont reconnues qu'avec un signal plus faible. Ce résultat suggère que dans une même DTU la proportion des séquences répétées d'une souche sont significativement différentes selon les souches.



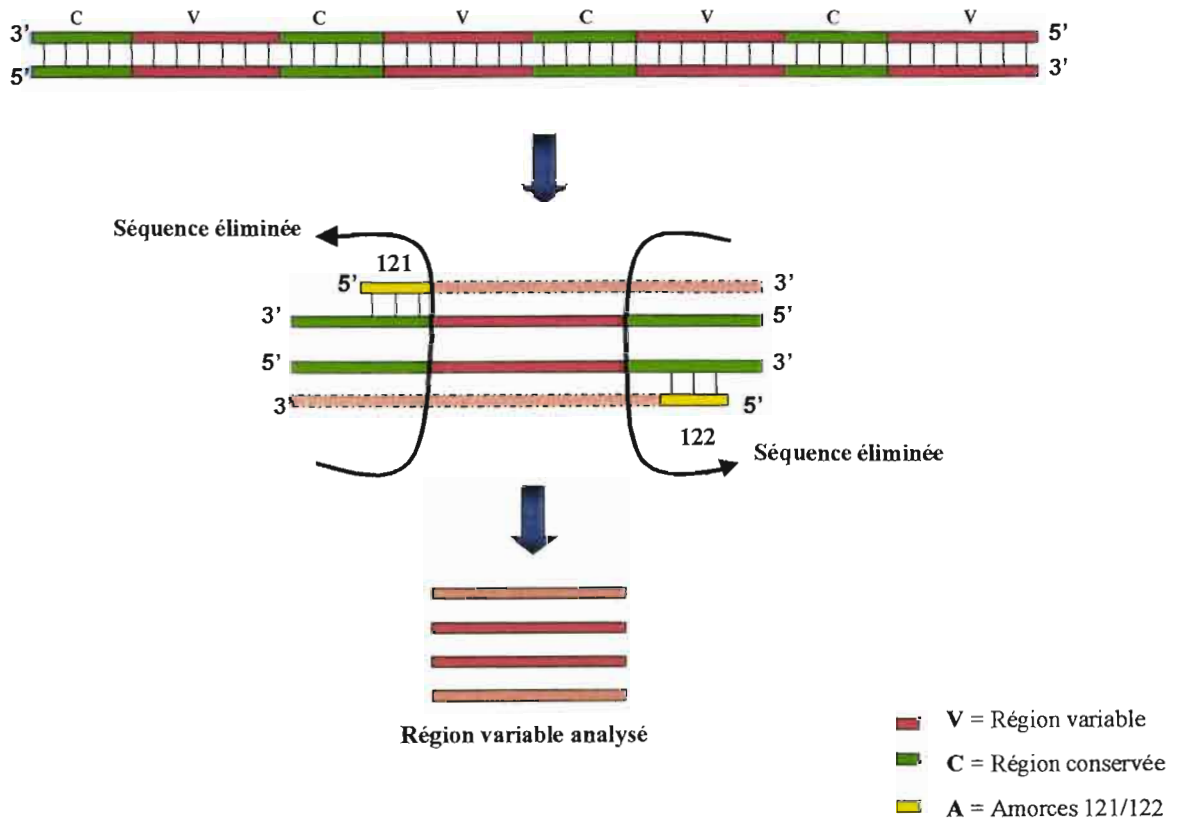
**Figure 38 :** Hybridation sur une série de souches représentatives de la variabilité génétique de *Trypanosoma cruzi* avec deux sondes A) Sonde CBB cl 3. B) Sonde Mn cl2.

### 3.6 Analyses des régions variables des minicercles ADNk

Nous avons, cloné le produit de PCR contenant plusieurs fragments des régions variables des minicercles d'ADNk des 19 souches appartenant à 4 DTUs (I, II b, II d, II e).

Des séquences obtenues n'a été gardée que la région variable. Il faut noter que la taille de la bande amplifiée est de l'ordre de 330 pb, alors que la taille de la région variable

oscille entre 200 et 240 pb. Cette différence est due à la position des amorces utilisées par l'amplification par PCR dans la région conservée (voir matériel et méthodes). Pour l'analyse des séquences nous avons donc éliminé le couple d'amorces utilisées pour la PCR ainsi que les nucléotides appartenant à la région conservée (fig. 39).



**Figure 39 :** Séquences variables analysées dans cet étude.

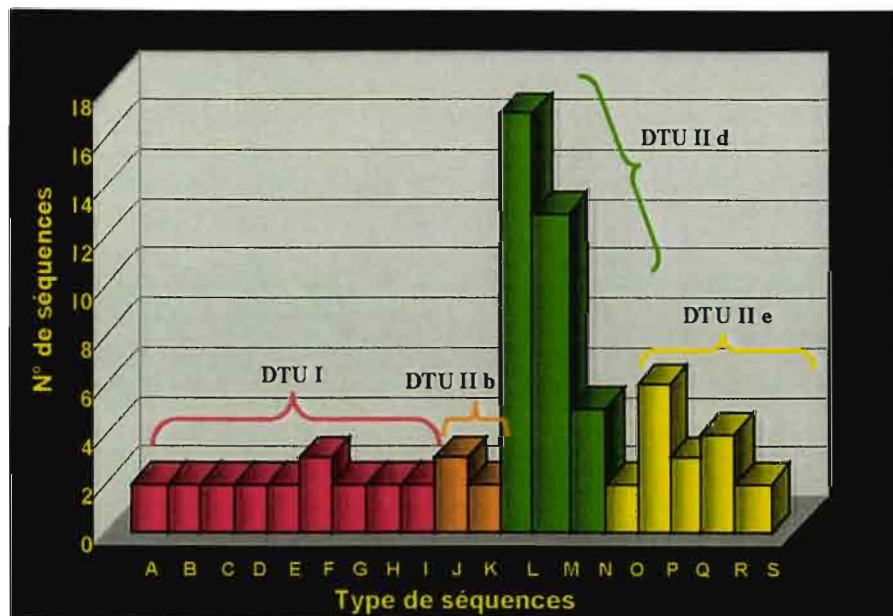
L'alignement des régions variables des minicercles d'ADNk a été effectué grâce au logiciel Clustal X 1.8 et au programme Sea View.

De manière inattendue, une forte divergence des séquences est clairement observée. Néanmoins, lors de l'alignement des séquences, on observe qu'il y a quelques séquences homologues, mais qu'une grande majorité semblent être des séquences uniques.

Un analyse plus fine de recherche d'homologie à alors été effectuée, par le programme Blast grâce au service offert par Infobiogen ([http://www.infobiogen.fr/services.analyseq/cgi-bin/blast2\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services.analyseq/cgi-bin/blast2_in.pl)). Nous avons ainsi comparé les 157 séquences des régions variables d'ADNk de *T. cruzi* avec elles-mêmes. La comparaison a été effectuée pour chaque séquence par rapport a une banque génétique constituée de l'ensemble de nos données.

Le résultat comparatif est montré dans l'annexe 9. Le score trouvé pour 70% des séquences analysées est inférieur à 1, ce qui démontre le faible pourcentage d'homologie parmi l'ensemble de séquences. 30 % de séquences présentent des homologies, ce qui nous a amené à faire une classification de « type » de séquences en fonction des groupes d'homologies trouvés. Nous avons donc dénommé ces types de manière aléatoire par une lettre (A, B, C, D,.....).

Ces « types » nous permettent de mieux visualiser la diversité des séquences. La figure 40 présente le nombre de séquences représentant un type. Il est à noter que les types ne sont chacun présents que dans une seule DTU.



**Figure 40 :** Nombre de séquences représentant un type de région variable d'ADNk de *Trypanosoma cruzi*.

En exemple, la figure 41 montre les 14 séquences des régions variables des minicercles de la souche Ivv cl4. Il faut noter que la grande majorité sont des séquences uniques (64,2%). Néanmoins, il existe deux types de région variables non uniques; type J (21,4%) et type K (14,2%).

L'ensemble des séquences analysées classées par DTU, avec identification des types de région variable, est présenté dans l'annexe 10.

De même nous avons suivi le même protocole d'amplification par PCR de l'ADNk pour deux souches de *T. cruzi marinkellei*. Six séquences de la région variable de chaque souche ont été analysées. A l'alignement, on trouve que toutes sont des séquences uniques (fig. 42) et aucune similitude avec les données de *T. cruzi* n'est trouvée.

Pour pouvoir comprendre la diversité obtenue, nous avons calculé le %GC parmi les 157 séquences (présenté dans l'annexe 9). Il n'existe aucune variation significative, même pour la comparaison avec *T. cruzi marinkellei*. La moyenne de %GC est de 34% pour *T. cruzi* et 35% pour *T. cruzi marinkellei*.

### **3.7 Analyse de la diversité des séquences des régions variables d'ADNk**

A l'examen de la figure 40 et de l'annexe 10, on se rend compte qu'il y a un nombre de séquences identiques répétées plus grand parmi les DTU II d et II e que parmi les DTU I et DTU II b.

Le tableau 10 présente les souches classées par DTU et par type de séquence. On voit que pour les DTU II d et II e, il existe un nombre plus faible de séquences uniques, contrairement aux DTU I et DTU II b.

Dans le même tableau sont également présentées les souches de référence (KM14, KY13, ptc-21 et ptcAWP) ainsi que *T. cruzi marinkellei*. Toutes ces souches présentent des séquences uniques.

Le % de similarité à l'intérieur de chacun des types de région variable est présenté dans le tableau 11 a – 8s.

Il faut noter que les types qui sont peu représentés présentent un pourcentage de similarité supérieur à 98,7% (souche CL Brener, type de séquence « O »). Pour les types « L », « M », et « P », le pourcentage de similarité est supérieure à 96%, 97% et 99 % respectivement.





DTU	Souche	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	unique	Total
I	P209 cl93	2	2																		8	12
I	Cutia cl1			2	3					2											3	10
I	SO34 cl4					2															3	5
I	SP 104 cl1						2	2	2												1	7
I	X10 cl21						1														6	7
I	OPS21																				2	2
Iib	Ivc4										3	2									9	14
Iib	Esmeraldo cl3																				5	5
Iib	Mas cl1																				5	5
Ild	Bug2148 cl1													3							0	3
Ild	RN PCRO												5	1							2	8
Ild	TPK1												1	5							1	7
Ild	MN cl2												11								1	12
Ild	Sc43													4	4						0	8
Ile	CL-Brener															2				2	2	6
Ile	VMV4																3	2	1		3	9
Ile	X 154/7																2	1	2		1	6
Ile	Tulaci2																1		1		1	3
CL	KM14																				4	4
Y	KY13																				4	4
CL	ptc21																				4	4
CL	ptckAWP																				4	4
<i>T.c.marinkellei</i>	B3																				6	6
<i>T.c.marinkellei</i>	M109																				6	6
	TOTAL	2	2	2	3	2	3	2	2	2	3	2	17	13	4	2	6	3	4	2	81	157

Table 10 : Nombre des séquences des régions variables d 'ADNk de chaque souche étudiée représentant un type donné.

**Table 11 : Pourcentage de similarité à l'intérieur de chaque type de régions variable**

A	P209.69	P209.50
P209.69	1	99,59
P209.50		

B	P209.61	P209.56
P209.61	1	99,56
P209.56		

C	Cutia.126	Cutia.130
Cutia.126	1	100
Cutia.130	0	

D	Cutia.128	Cutia.131	Cutia.132
Cutia.128	1	100	99,58
Cutia.131	0	1	99,58
Cutia.132	1	1	

E	so34_mp27	so34_mp110
so34_mp27	1	97,92
so34_mp110	5	

F	sp104_mp102	sp104_mp105	XI0_mp102
sp104_mp102	1	100	100
sp104_mp105	0	1	100
XI0_mp102	0	0	

G	SP104_mp4	SP104.H02
SP104_mp4	1	99,56
SP104.H02		

H	SP104.D03	SP104_mp12
SP104.D03	1	100
SP104_mp12	0	

I	Cutia.122	Cutia.124
Cutia.122	1	100
Cutia.124	0	

J	IVV_02mp102	IVV_02mp105	IVV_02mp103
IVV_02mp102	1	100	100
IVV_02mp105	0	1	100
IVV_02mp103	0	0	

K	IVV_02mp100	IVV_02mp104
IVV_02mp100	1	100
IVV_02mp104	0	

Table 11 (suite)

L	MN_02mp01	MN_02mp02	MN_awmp273	MN_awmp274	MN_awmp275	MN_awmp276	MN_awmp278	MN_awmp280	MN_awmp281	MN_awmp282	MN_awmp283	RN_awmp297	RN_awmp298	RN_awmp299	RN_awmp301	RN_awmp302	tpkl_awmp268
MN_02mp01		100	99,57	99,56	99,57	99,13	99,57	99,13	99,57	99,57	99,56	96,97	98,69	93,51	99,57	99,57	100
MN_02mp02	0		99,57	99,56	99,57	99,13	99,57	99,13	99,57	99,57	99,56	96,97	98,69	93,51	99,57	99,57	100
MN_awmp273	1	1		100	99,57	99,57	100	99,57	100	99,57	100	96,54	98,25	93,94	99,13	99,13	99,57
MN_awmp274	1	1	0		99,56	99,56	100	99,56	100	99,56	100	96,51	98,24	93,89	99,13	99,13	99,56
MN_awmp275	1	1	1	1		99,13	99,57	99,13	99,57	99,57	99,56	96,52	98,25	93,48	99,13	99,13	99,57
MN_awmp276	2	2	1	1	2		99,57	99,13	99,57	99,13	99,56	96,1	98,69	94,37	98,7	98,7	99,13
MN_awmp278	1	1	0	0	1	1		99,57	100	99,57	100	96,54	98,25	93,94	99,13	99,13	99,57
MN_awmp280	2	2	1	1	2	2	1		99,57	99,13	99,56	96,09	97,81	93,48	98,7	98,7	99,13
MN_awmp281	1	1	0	0	1	1	0	1		99,57	100	96,54	98,25	93,94	99,13	99,13	99,57
MN_awmp282	1	1	1	1	1	2	1	2	1		99,56	96,54	98,25	93,51	99,13	99,13	99,57
MN_awmp283	1	1	0	0	1	1	0	1	1			96,89	98,65	94,22	99,11	99,11	99,56
RN_awmp297	7	7	8	8	8	9	8	9	8	8	7		97,38	96,54	97,4	97,4	96,97
RN_awmp298	3	3	4	4	4	3	4	5	4	4	3	6		95,2	99,13	99,13	98,69
RN_awmp299	15	15	14	14	15	13	14	15	14	15	13	8	11		93,94	93,94	93,51
RN_awmp301	1	1	2	2	2	3	2	3	2	2	2	6	2	14		100	99,57
RN_awmp302	1	1	2	2	2	3	2	3	2	2	2	6	2	14	0		99,57
tpkl_awmp268	0	0	1	1	1	2	1	2	1	1	1	7	3	15	1	1	

M	RN_awmp305	BUG_awmp256	BUG_awmp257	BUG_awmp251	tpkl_awmp261	tpkl_awmp269	tpkl_awmp270	tpkl_awmp271	tpkl_awmp272	SC43-701	SC43-703	SC43-704	SC43-707	SC43-709
RN_awmp305		99,18	99,18	98,35	97,94	99,17	99,18	99,18	99,18	99,59	98,77	98,77	99,59	98,77
BUG_awmp256	2		99,18	99,18	98,77	99,17	98,35	99,18	99,18	99,59	98,77	98,77	99,59	98,77
BUG_awmp257	2	2		98,35	97,94	99,17	98,35	99,18	99,18	99,59	98,77	98,77	99,59	98,77
BUG_awmp251	4	2	4		98,77	98,76	97,53	98,35	98,35	98,77	97,94	97,94	98,77	97,94
tpkl_awmp261	5	3	5	3		99,17	97,12	97,94	98,77	98,35	97,53	97,53	98,35	97,53
tpkl_awmp269	2	2	2	3	2		98,35	99,17	100	99,59	98,76	98,76	99,59	98,76
tpkl_awmp270	2	4	4	6	7	4		98,35	98,35	98,77	97,94	97,94	98,77	97,94
tpkl_awmp271	2	2	2	4	5	2	4		99,18	99,59	98,77	98,77	99,59	98,77
tpkl_awmp272	2	2	2	4	3	0	4	2		99,59	98,77	98,77	99,59	98,77
SC43-701	1	1	1	3	4	1	3	1	1		99,18	99,18	100	99,18
SC43-703	3	3	3	5	6	3	5	3	3	2		98,35	99,18	100
SC43-704	3	3	3	5	6	3	5	3	3	2	4		99,18	98,35
SC43-707	1	1	1	3	4	1	3	1	1	0	2	2		99,18
SC43-709	3	3	3	5	6	3	5	3	3	2	0	4	2	

**Table 11 (suite et fin)**

N	SC43-705	SC43-706	SC43-702	SC43-708
SC43-705		100	100	100
SC43-706	0		100	100
SC43-702	0	0		100
SC43-708	0	0	0	

O	CL-Brener726	CL-Brener727
CL-Brener726		98,75
CL-Brener727	3	

P	VMV716	VMV717	XI54-707	XI54-702	VMV719-2	Tula736
VMV716		100	100	100	99,57	99,57
VMV717	0		100	100	99,57	99,57
XI54-707	0	0		100	99,57	99,57
XI54-702	0	0	0		99,57	99,57
VMV719-2	1	1	1	1		99,13
Tula736	1	1	1	1	2	

Q	VMV715	VMV718	XI54-703
VMV715		100	100
VMV718	0		100
XI54-703	0	0	

R	XI54-701	VMV713	XI54-708	Tula738-2
XI54-701		99,58	99,58	99,58
VMV713	1		99,16	99,16
XI54-708	1	2		99,16
Tula738-2	1	2	2	

S	CL-Brener728	CL-Brener730
CL-Brener728		99,16
CL-Brener730	2	

## 4 Discussion

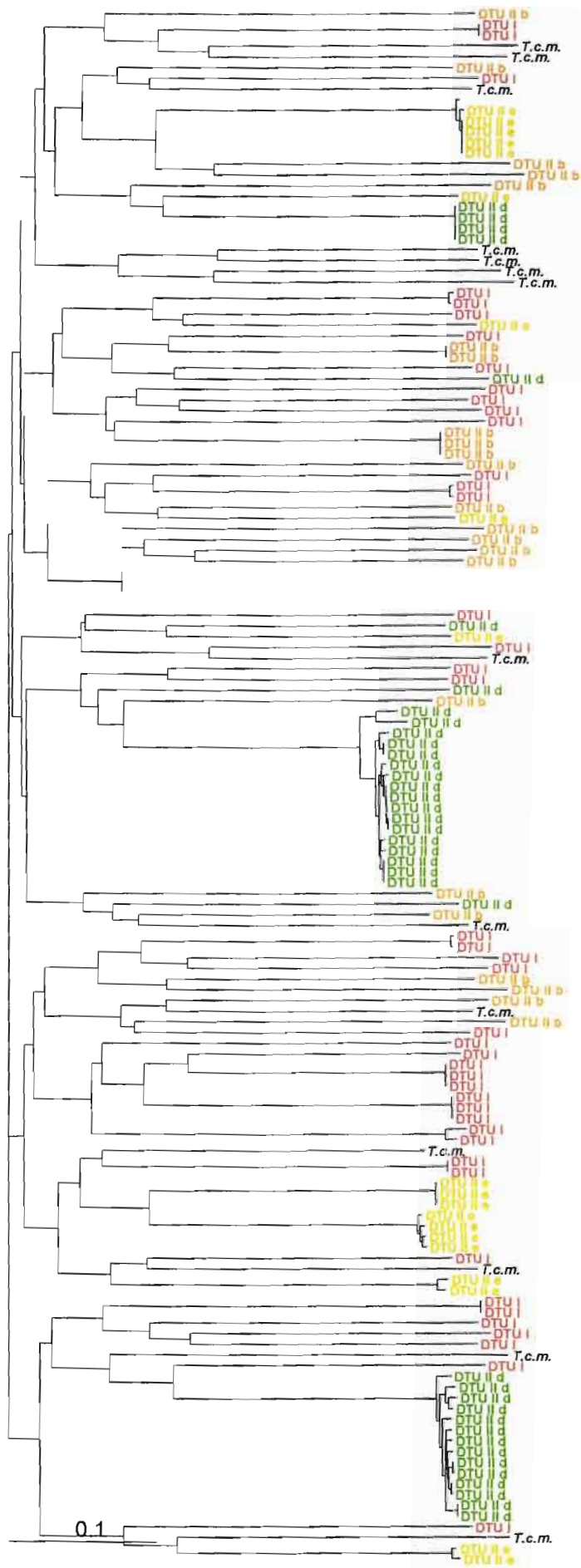
Cette étude montre les premières expériences de séquençage sur des régions variables, portant sur un échantillonnage diversifié de souches représentatives de la diversité génétique et éco-épidémiologique du parasite.

D'autres études (Brenière *et al.*, 1992 ; Veas *et al.*, 1990, 1991) ont montré que l'hybridation avec des sondes construites par amplification par PCR est spécifique de DTU, ce qui suggère une homologie des séquences, et nous fait penser à l'existence de familles de séquences attribuables à une DTU déterminée. Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord réalisé des expériences d'hybridation avec des sondes construites à partir de produits d'amplification par PCR.

Notre résultat montre dans certains cas une absence d'hybridation sur des souches appartenant à la même DTU. Le fait que le signal soit variable entre les souches d'une même DTU nous suggère que la similitude de séquences n'est que partielle et que ces fragments ne sont pas répartis de manière homogène dans les stocks de la même DTU. Ceci suggère que l'information phylogénétique qu'ils portent n'est pas strictement spécifique des DTUs.

Différents auteurs (Macina *et al.*, 1986, Degraeve *et al.*, 1988) ont séquencé un minicercle complet. Il faut noter que les 4 régions variables sont différentes dans un même minicercle. Dans notre étude, nous avons séquencé plusieurs fragments variables de plusieurs minicercles mais d'une même souche, et plusieurs souches de différentes DTU. Le résultat montre une grande diversité des séquences, ne permettant pas de reconstruire une phylogénie cohérente. L'arbre montré à la figure 43 montre clairement que les souches des différentes DTUs sont totalement dispersées, et qu'il n'y a aucune cohérence avec la phylogénie générale obtenue par les marqueurs nucléaires (Tibayrenc *et al.*, 1986, 1993; Barnabé, Brisse et Tibayrenc, 2000; Brisse, Barnabé et Tibayrenc, 2000).

Une limite de ce travail est le faible nombre de séquences obtenues pour chaque souche du fait de la quantité de travail, pouvant expliquer ces résultats, nécessaire, ce qui fait que la signification de ce résultat est difficile à évaluer. Néanmoins, on peut constater que la variabilité génétique dans des régions variables des minicercles est beaucoup plus importante que ce qui était attendu.



**Figure 43:** Arbre construit à partir de séquences variables des minicercles chez *Trypanosoma cruzi*

Par contre, on constate tout de même que les DTU I et II sont plus divergentes l'une de l'autre que ne le sont les DTU II (b, d, e) entre elles, ce qui est en accord avec ce qu'on connaît des phylogénies basées sur le polymorphisme des gènes nucléaires (Tibayrenc, 1995, Souto *et al.*, 1996, Barnabé, Brisse et Tibayrenc, 2000, Brisse, Barnabé et Tibayrenc, 2000). Par ailleurs, on observe que les DTUs II d et II e sont plus homogènes que les autres DTUs ce qui suggère que ces DTUs sont plus récentes. De manière intéressante, ces DTU sont celles qui sont supposées avoir une origine hybride (Brisse *et al.*, 2003). D'autres auteurs (Schofield *et al.*, 1998 ; Dujardin *et al.*, 1990) ont postulé une expansion passive des vecteurs de la maladie de Chagas dans toute le continent latino-américain, attribuée principalement aux migrations humaines, ce qui a pu favoriser la mise en contact de souches de *T. cruzi* génétiquement dissemblables et leur hybridation. Ceci peut expliquer la genèse et l'âge récent de ces lignées hybrides, et le fait que la diversité de leurs séquences minicercles soit inférieure à celle des autres DTUs.

A ce stade, nos résultats ne permettent pas d'apporter d'éléments très informatifs dans le cadre du débat sur l'impact respectif de l'évolution clonale et de la recombinaison génétique dans l'évolution moléculaire du parasite. Nous sommes tombés sur une extrême hétérogénéité de séquences, non seulement entre souches appartenant à des DTUs différentes, mais également entre souches d'une même DTU, et même, au sein de la même souche. Notre but est de continuer l'analyse des séquences variables des minicercles sur un échantillon plus grand afin de trouver des séquences dominantes représentatives de DTU. La mise en évidence de ceci nous permettra de faire des analyses phylogénétiques fiables qui nous permettront de comparer l'évolution moléculaire des génomes nucléaires et kinétoplastiques. La mise en évidence d'éventuelles séquences dominantes nous permettra par ailleurs de reprendre l'élaboration de sondes et de diagnostics PCR épidémiologiquement informatifs sur des bases non empiriques.

## Conclusion générale

Les études épidémiologiques conduites dans les régions endémiques ont souligné la grande variabilité de symptômes de la maladie de Chagas ainsi que la répartition géographique discontinue de cette maladie. Ces données ont fait suspecter de longue date que l'hétérogénéité génétique du parasite pourrait être un facteur majeur dans l'évolution de la maladie. (Rezende, 1976 ; Miles et al., 1981).

L'hypothèse d'une évolution clonale prépondérante chez *Trypanosoma cruzi* (Tibayrenc, Cariou & Solignac, 1981; Tibayrenc *et al.*, 1986) a été proposée principalement sur la base de l'observation d'un déséquilibre de liaison considérable (association non aléatoire de génotypes à des locus différents). Ce déséquilibre de liaison a tout d'abord été observé entre locus codant pour des isoenzymes, c'est-à-dire des gènes codants, mais dont le polymorphisme est considéré comme peu ou pas soumis à la pression de la sélection naturelle (Ayala, 1982). On a constaté par la suite que le déséquilibre de liaison s'étendait :

- (a) au polymorphisme RFLP de l'ADN kinétoplastique (Tibayrenc & Ayala, 1987), c'est-à-dire à un génome extra-nucléaire aux fonctions très spéciales (respiration cellulaire pour les maxicercles, édition de l'ARN pour les minicercles);
- (b) au polymorphisme RAPD (Tibayrenc *et al.*, 1993; Brisse, Barnabé & Tibayrenc, 2000), qui sonde indifféremment toutes les parties du génome: séquences non codantes, séquences codantes exprimées ou non;
- (c) au polymorphisme des microsatellites (Oliveira *et al.*, 1998), considéré comme sélectivement neutre.

Il semble donc que l'évolution clonale prépondérante chez *T. cruzi* ait littéralement sculpté toutes les parties du génome de ce parasite. Il semble aussi qu'elle ait un impact fort sur de nombreuses propriétés biologiques du parasite explorées par des expérimentations (Laurent *et al.*, 1997 ; De Lana *et al.*, 1998 ; 2000 ; Pinto et al., 1998 ; 2000; Revollo et al., 1998 ; Toledo et al., 2002 ; 2003). Cependant, ces paramètres expérimentaux représentent des phénotypes très complexes, d'origine probablement multigénique, dans

lesquels interviennent de nombreux phénomènes de régulation, et qui sont certainement très dépendants de l'état physiologique des souches et des conditions environnementales. Les expérimentations citées ci-dessus n'ont pas trouvé de concordance à 100% entre diversité clonale et biologique, mais seulement de très fortes corrélations statistiques. Sur la totalité des paramètres explorés, environ 10% n'indiquaient pas de corrélation.

Le modèle clonal n'énonce pas que la recombinaison génétique est absente, mais seulement qu'elle n'est pas suffisamment fréquente pour empêcher la divergence évolutive des clones naturels du parasites, aboutissant à l'établissement de subdivisions génétiques stables et bien individualisées. Ce modèle n'est donc pas remis en question fondamentalement par la découverte de lignées hybrides naturelles (Bogliolo *et al.*, 1996 ; Carrasco *et al.*, 1996. Machado & Ayala, 2001 ; Brisse *et al.*, 2003) , d'autant plus qu'il semble avéré que ces hybrides naturels sont stabilisés par la propagation clonale, et correspondent bien à des subdivisions génétiques stables de l'espèce, même si ces dernières ne répondent pas à la définition stricte de lignée phylogénétique ou de clade ("discrete typing units ou DTUs, Tibayrenc, 1998).

L'obtention d'hybrides expérimentaux (Gaunt *et al.*, 2003) a cependant réactivé le débat de la **fréquence** de ces phénomènes d'hybridation, d'autant plus que ces expérimentations ont mis en évidence des gènes en mosaïque, indiquant des phénomènes de recombinaison intragénique, et posant donc la question de l'impact réel de l'évolution clonale sur la structure des gènes.

Notre analyse du polymorphisme des gènes **codants exprimés** par le RADES indique sans ambiguïté que le déséquilibre de liaison s'imprime fortement sur ce sous-échantillon très spécifique du génome. Ceci n'était pas évident a priori, puisque de telles séquences sont soumises par nature à la sélection naturelle. Or il est bien connu que les marqueurs neutres sont de bien meilleurs marqueurs phylogénétiques que les marqueurs sélectionnés. Nos résultats RADES plaident donc en faveur de l'hypothèse que le déséquilibre de liaison dû à l'évolution clonale prépondérante s'étend à la grande majorité des séquences du génome nucléaire de *T. cruzi*. Ormis cette conclusion claire, notre analyse RADES débouche potentiellement sur des applications prometteuses: caractérisation de séquences codantes spécifiques de *T. cruzi* car non retrouvées chez le taxon proche *T. cruzi marenkellei*, spécifiques des subdivisions génétiques (DTUs I et II a-e) du parasite, spécifiques de ses différents stades (épimastigotes, trypomastigotes, amastigotes).

Le déséquilibre de liaison s'étendant apparemment au génome kinétoplastique, (Tibayrenc & Ayala, 1987) nous avons voulu étendre l'analyse à cette partie du génome, en séquençant les parties variables du minicercle d'un échantillonnage de souches représentatif de la diversité génétique du parasite. Il est connu qu'au sein d'une même cellule, de nombreux types de séquences cohabitent, et que les 4 parties hypervariables d'un minicercle sont différentes (Macina *et al.*, 1986, Degraeve *et al.*, 1988).

Ces faits sont probablement, au moins en partie, à l'origine des résultats difficilement interprétables que nous avons obtenus: les phylogénies observées ne concordent absolument pas avec les phylogénies basées sur des marqueurs nucléaires. Ceci peut être du, soit au fait que notre sondage était trop faible pour faire ressortir l'existence d'éventuelles séquences dominantes, soit au fait que l'existence des échanges génétiques brouille ces phylogénies, soit aux deux. Cette étude sera poursuivie avec des sondages plus forts.

## Bibliographie

Agabian (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNA. *Cell* **61** : 1157-1160.

Altschul SF., Gish W., Miller W, Myers EW., Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol Biol.*, 215 (3) : 403-10.

Anderson W.A. & Ellis R.A. (1965). Ultrastructure of *Trypanosoma lewisi*: flagellum, microtubules and kinetoplast. *J. Protozool.*, **12** : 483-489.

Angepoulos E. (1970). Pellicular microtubules in the family *Trypanosomatidae*. *J. Protozool.*, **17** : 39-51.

Andrade, S.G. & Magalhaes, J. B. (1997) Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains : correlation with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medecina Tropical* **30** : 27-35.

Andrade, S. G. (1985). Morphological & behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicine Tropical* **18** : 39-46.

Andrade, S. G., (1973). Caracteriçao de cepas do *Trypanosoma cruzi* isolados no Recôncavo Baiano. Tese, Universidade Federal de Bahia, Brésil.

Andrade, S.G. and Andrade, Z.A. (1966). [Comparative histopathological study of lesions produced by 2 strains of *Trypanosoma cruzi*]. *Hospital. (Rio J. )* **70** : 1267-1278.

Andrews, N.W., Hong, K.S., Robbins, E.S., and Nussenzweig, V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **64** : 474-484.

Avila, H.A., Sigman, D.S., Cohen, L.M., Millikan, R.C., and Simpson, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **48** : 211-221.

Ayala, F.J. 1982. Biologie moléculaire et évolution. Masson Ed., Paris]

Aymerich, S. and Goldenberg, S. (1989). The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other T. cruzi strains and trypanosomatids. *Exp. Parasitol.* **69** : 107-115.

Barnabe, C., Brisse, S., and Tibayrenc, M. (2000). Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis *Approach. Parasitology* **12** : ( Pt 5), 513-526.

Blanc V., Farré J.C., Litvak S., Araya A., (2002). Réécriture du matériel génétique : fonctions et mécanisme de l'édition de l'ARN. *Medecine/Sciences* **18** : 181-192.

Blum, B., Bakalara, N., and Simpson, L. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* **60** : 189-198.

Bogliolo, A.R., Lauriapires, L. & Gibson, W.C. (1996). Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: Evidence of genetic recombination. *Acta Tropica* **61**: 31-40.

Brenière S.F., Telleria J., Bosseno M.F., Buitrago R., Bastrenta B., Cuny G., Banuls A.L, Brewster S. and Barker D.C. 1999. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kADN probes. *Acta Tropica* **73**, 283-293]

Brenière SF, Bosséno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacksic N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabé C, Wincker P, and Tibayenc M. 1998. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones : transmission and circulation in Bolivian young patients. *Experimental Parasitology.* **89** : 285-295.

Brenière, S.F., M.F Bosseno, J. Telleria, R. Carrasco, F. Vargas N. Yaksic & F. Noireau. 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, (2) : 179 - 184.

Breniere, S.F., Bosseno, M.F., Revollo, S., Rivera, M.T., Carlier, Y., and Tibayrenc, M. (1992). Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46 : 335-341.

Brenière, S.F., Tibayrenc, M., Antezana, G., Pabon, J., Carrasco, R., Selaès, H. & 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.

Brisse, S., Barnabe, C., Banuls, A.L., Sidibe, I., Noel, S., and Tibayrenc, M. (1998). A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92 : 253-263.

Brisse, S., Henriksson, J., Barnabé, C., Douzery, E.J.P., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M.R.C., Buck, G.A., Dujardin, J.C. & Tibayrenc, (M. 2003). Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution*: 2 (3): 173-183.

Brisse, S., Verhoef, J., and Tibayrenc, M. (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31 : 1218-1226.

Brisse, S., Barnabe, C., and Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* 30 : 35-44.

Bogliolo, A.R., Lauriapires, L. & Gibson, W.C. (1996). Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: Evidence of genetic recombination. *Acta Tropica* **61**: 31-40.

Bosseno M.F., Telleria J., Vargas F., Yaksic N., Noireau F., Morin A., Brenière S.F. 1996. *Trypanosoma cruzi* : study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp. Parasitol.*, **83**, 275 - 282.

Bosseno M.F., Torrico F., Telleria J., Noireau F., Brenière S.F. 1995. Reacción de polimerización en cadena: detección y caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi* en niños chagásicos. *Medicina* **55**, (3): 277 - 279.

Cano, M.I., Gruber, A., Vazquez, M., Cortes, A., Levin, M.J., Gonzalez, A., Degrave, W., Rondinelli, E., Zingales, B., Ramirez, J.L., and . (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol. Biochem. Parasitol.* **71** : 273-278.

Carrasco, H.J., Frame, I.A., Valente, S.A. & Miles, M.A. (1996). Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **54**: 418-424

Carlier, Y., Pinto Dias, J.C., Ostermayer Luquetti, A.O., Hontebeyrie, M., Torrico, F., and Truyens, C. (2002). Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. In *Encycl Méd Chir, Maladies Infectieuses*, Elsevier SAS, ed. (Paris: pp. 8-505-A-20, 21p.

Carcavello, R.U., Tonn R.J., Ortega R., Betancourt P. & Carrasquero B., 1978. Notas sobre la biología, ecología y distribución geográfica de *Rhodnius prolixus* Stal 1859 (Hemiptera : Reduviidae). *Bol. Dir. Malariol. San. Ambi.*, **18** : 175-198.

Carvalho R., Galindez I., Jurberg J., Lent H., Atlas « Dos vectores da doença de Chagas nas Américas ». 1997. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro-Brasil (Rodrigo Zeledon Infecção do inseto vetor pelo *Trypanosoma cruzi*).

Cassini, C.E., Dujardin, J.P., Martinez, M., Pereira, A.B., & Salvatella, R. (1995). Morphometric differentiation between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. *Research and Reviews in Parasitology*

Centurion-Lara, A., Barrett, L., and Van Voorhis, W.C. (1994). Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect. Dis.* **170** : 1334-1339.

Chagas, C. 1909. Nova tripanosomiase humana. !estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. n.gen., n.sp. Agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1** : 159-218.

Chagas, C. 1911. Nova entidade morbida do homen : resumo geral de estudos etiologicos e clinicos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **3** : 1976-1986.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA 1989.Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* **22** : 19-23.

Cooper, R., de Jesus, A.R., and Cross, G.A. (1993). Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **122** : 149-156.

Cossio, P.M., Diez, C., Szarfman, A., Kreutzer, E., Candiolo, B., and Arana, R.M. (1974). Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* **49** : 13-21.

Croft, S.L. (1986). In vitro screens in the experimental chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Parasitology Today* **2** (3) : 64-69.

da Silveira, P.A., de Lana, M., Britto, C., Bastrenta, B., and Tibayrenc, M. (2000). Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int. J. Parasitol.* **30** : 843-848.

de Lana, M., da Silveira, P.A., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S., and Tibayrenc, M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* **90** : 20-25.

De Lana, M., Pinto, A., Bastrenta, B., Barnabé, C., Noël, S. & Tibayrenc, M. (2000). *Trypanosoma cruzi*: Infectivity of clonal genotypes infections in acute and chronic phases in mice. *Exp. Parasitol.* **96**: 61-66.

de Souza W. (1989). Components of the cell surface of Trypanosomatids. *Progress Protistol.*, **3** : 87-184.

de Souza W. & Souto-Padron T. (1980). The paraxial structure of the flagellum of Trypanosomatidae. *J.Parasitol.*, **66** : 229-235.

Deane, M.P., Sousa, M.A., Pereira, N.M., Goncalves, A.M., Momen, H., and Morel, C.M. (1984). *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *J. Protozool.* **31** : 276-280.

Deflorin, J., Rudolf, M., and Seebeck, T. (1994). The major components of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* are two similar, but distinct proteins which are encoded by two different gene loci. *J. Biol. Chem.* **269** : 28745-28751.

Degrave, W., Fragoso S.P., Britto C., Van Heuverswym H., Kidane G.Z., Cardoso M. A. B., Mueller R. U., Simpson L. et Morel C.M. (1988). Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27** : 63 -70.

Diaz, C., Nussenzweig, V., and Gonzalez, A. (1992). An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am. J Trop. Med. Hyg.* **46** : 616-623.

Dujardin, J.P. (1990). Interet de la génétique des populations dans l'étude des vecteurs de la tripanosomiase américaine. Thèse de doctorat, Université de Liege. Belgique.

Dujardin, J.P., La Fuente, C., Cardoso, L., Tibayrenc, M. (1988). Dispersing behaviour of *T. infestans* : evidence from a genetical study of field populations in Bolivia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Supl. 1. **83** : 435-440.

Dujardin, JP. & Tibayrenc, M. (1985). Etude de 11 enzymes et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae). *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **65** : 271-280.

Dvorak, J.A., Hall, T.E., Crane, M.S., Engel, J.C., McDaniel, J.P., and Uriegas, R. (1982). *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* **29** : 430-437.

Englund P.T. Hadjuk, S.L. et Marini J.C. (1982). The molecular biology of trypanosomes. *Annual Review of Microbiology* **51**: 695-726.

Erlich, A. (1989). PCR Tecnology : Principles and amplifications for DNA amplification. *Ed. Stockton Press, United States of America.*

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39** : 783-791.

Felsenstein J. 1993. PHYLIP: phylogenetic Inference Package. Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Freeman, F., Wilson, P.L. & Kazan, B.H. (1975). *Trypanosoma cruzi* : antimicrobial activity and strain differentiating properties of some five and six-membered heterocyclic compounds on trypomastigotes. *Experimental Parasitology* **38** : 181-190.

Freilij, H., Muller, L., and Gonzalez Cappa, S.M. (1983). Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **18** : 327-330.

- Graham. S.V.(1995) *Parasitologie Today* 11(6). 217-223.
- Galtier, N., Goudy, M., Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN : two tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Compt. Appl. Biosci.*, **12** : 543-548.
- Garzón, E. A., Barnabé, C., Córdova, X., Bowen, C., Paredes, W., Gómez, E., Ouaiissi, A., Tibayrenc, M. & Guevara, A. G. (2002). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (4): 378-382
- Gaunt, M.W., Yeo, M., Frame, I.A., tothard, J.R., Carrasco, H.J., Taylor, M.C., Mena, S.S., Veazey, P., Miles, G.A., Acosta, N., Rojas de Arias, A. & Miles, M.A. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* **421**: 936-939.]
- Gibson, F. & Miles (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi* EMBO Journal 5, 1299-1305.
- Gibson, W.C. 1986. Will the real *Trypanosoma brucei gambiense* please stand up? *Parasitol. Today*, 2: 255-257].
- Godfrey, D.G. & Kilgour, V. (1976). Enzyme electrophoresis in characterizing the causative agent of Gambian Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**: 217-225].
- Gonzales, A., Lanar, T.J., Huecas, M.E., Sosa-Pineda, B., Nogueira, N., Lizardi P.M. (1985). Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acides Research* 13: 5789-5804.
- Gonzales, (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: It's use in a high-sensitive parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3356-3360.
- Guhl, F., Jaramillo C Vallejo, G.A. Yockteng R. Cardenas-Arroyo F. Fornaciari G. (1999). Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4 000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Antropol.* **108** : 401-407.

Haushka, T.S. (1949). Persistence of strains-specific behaviour in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *Journal of Parasitology* **35** : 593-599.

Henriksson, J., Pettersson, U., and Solari, A. (1993). *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.* **77** : 334-348.

Henriksson, J., Porcel, B., Rydaker, M., Ruiz, A., Sabaj, V., Galanti, N., Cazzulo, J.J., Frasch, A.C., and Pettersson, U. (1995). Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73** : 63-74.

Hernandez R, Castaneda M. (1983). An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* Aug;8 **4** : 305-15.

Hide, M. 1999. Etude de l'expression génique différentielle de différentes espèces de *Leishmania* par la technique d'amplification aléatoire de séquences exprimées. DEA de Parasitologie Université Montpellier II.

Hoare CA 1972. The Trypanosomes of Mammals, *Blackwell*, Oxford. 749 pp.

Hoare C.A. & Wallace F.G. (1966). Development stages of trypanosomids flagellates: a new terminology. *Nature*, **212** : 1385-1386.

Howard A. & Pelc S.R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity, Lond.(suppl.)*, **6** : 261-273.

Hudson, L. and Britten, V. (1985). Immune response to South American trypanosomiasis and its relationship to Chagas' disease. *Br. Med. Bull.* **41** : 175-180.

Joiner, K., Sher, A., Gaither, T. & Hammer, C. (1986). Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **83** : 6593.

Kable, M.L., Seiwert, S.D., Heidmann, S., and Stuart, K. (1996). RNA editing: a mechanism for gRNA-specified uridylyate insertion into precursor mRNA. *Science* **273** : 1189-1195.

Kirchhoff, L.V., Votava, J.R., Ochs, D.E., and Moser, D.R. (1996). Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin. Microbiol.* **34** : 1171-1175.

Krieger, H., Chiari, E., Diaz, J. C. P & Cabello, P. H. 1981. Aspectos epidemiológicos do tropismo do trypanosome cruzi em populações brasileiras . VIII Reuniao Anual sobre Pesquisa basica em doença de Chagas, Caxambu, Brasil. R. 08.

La Fuente, C., Urjel, R., Darras, C., and Saucedo, E. (1985). [Use of microhematocrit tubes for the rapid diagnosis of Chagas disease and malaria]. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **65 Suppl 1**, 95-99.

Laurent, J.P., Barnabé, C., Quesney, V., Noël, S. & Tibayrenc, M. 1997. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, **114**: 213-218.

Lent, H & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas'disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, N.Y., **163. 3** : 125-520.

Liang, P. & Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-97.

Machado, C.A. and Ayala, F.J. (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** : 7396-7401.

Macedo, A.M. & Pena, S.D.J. 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas'disease. *Parasitol. Today* **14** : 119-124.

Macina, R., Sanchez, D., Gluchankof,D., Burrone, O., Frasch, A. (1986). Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **21**: 25-32.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-220.

Markel, E. 1990. Parasitologia Medica. Ed. Interamericana, Mc Grau Hill, Madrid-España.

Mattei, D.M., Goldenberg, S., and Morel, C. (1977). Biochemical strain characterization of *Trypanosoma cruzi* by restriction endonuclease cleavage of kinetoplast-DNA. *FEBS Lett.* **74** : 264-268.

Mathieu-Daudé, F., Bicart-See, A., Bosseno, M.F., Brenière, S.F. & Tibayrenc, M. 1994. Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* group I. by a specific kinetoplast DNA probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50(1): 13-19]

Matthews K.R. & Gull K. (1994a). Cycles within cycles: the interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol.Today*, **10** : 473-476.

Matthews, K.R., Tschudi, C., and Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* **8** : 491-501.

Meyer, H. and de Souza, W. (1976). Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. *J. Protozool.* **23** : 385-390.

Miles, M., Lanham, S.M., Sousa, A.A. & Pavao, M.M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strains identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **74** : 221-237.

Miles M.A., Cedillos R.A., Pova M.M., et al. (1981 a). Do radically dissimilar *T. cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease ? *Lancet*, I 1338-1340.

Miles, M.A., Pova, M., Prata, A., Cedillos, R.A., De Souza, A.A. & Macedo, V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet*, **8234**: 1336-1340.

Miles, M.A., Souza, A., Pova, M., Shaw, J.J., Lainson, R. & Toyé, P.J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, **272**: 819-821

Miles, M.A., Toyé, P.J., Oswald, S.C. & 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.

Molina, H.A. and Kierszenbaum, F. (1989). Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. *Immunology* **66** : 289-295.

Momen, H. (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* **94**, Suppl 1: 181-184.

Montanat, E.E., De Luca, G.M., Gallerano, R.H., Sosa, R. & Blanco, A. (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical pictures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 625-628

Morel, C., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J., and Simpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of

restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77 : 6810-6814.

Muhich, M.L., Hughes D.E., Simpson A.M., Simpson, L. (1987). The monogenetic kinetoplastid protozoan, *Crithidia fasciculata*, contains a transcriptionally active, multicopy mini exon sequence. *Nucleic Acids Res* 15: 3141-3153.

Murphy, N.B. & Pellé, R. 1994. The use of arbitrary primers and the RADES method for the rapid identification of developmentally regulated genes in trypanosomes. *Gene* 141: 53-61.

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283-292

Noireau, F. (1999). La enfermedad de Chagas sus particularidades epidemiológicas en Bolivia, pp17-47. In: Cassab, J.A. Noireau, F. y Guillen, G (eds). La enfermedad de Chagas en Bolivia. conocimientos científicos de salud y prevision social. OMS/OPS IRD /IBBA. La Paz, 259 pp.

Oliveira, R.P., Broude, N.E., Macedo, A.M., Cantor, C.R., Smith, C.L. & Pena, S.D.J. (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 3776-3780

OMS, (1993) Chagas' disease., Eleventh Programme Report of the UNDO/World Bank/WHO. Tropical Disease Research. Progress 1991-92, 67-75.

Organizacion Panamericana de la Salud (OPS/PAHO). (1996). Pautas para la preventon de infections oportunistas en personas con VIH o sida en américa Lartina y el Caribe. *Bol. Ofic Sanit Panam*, 121 : 377-403.

OMS.1991. Lutte contre la Maladie de Chagas. Rapport d'un comité d'experts OMS 91.

Ouassi, A. & Capron, A. (1989). Some aspects of protozoan parasite-host cell interactions with special reference to RGD- mediated recognition process. *Microbial Pathogenesis* 6 : 1-5.

Page, R. D. (1996). TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.

Pinto A.S., de Lana, M., Britto, C., Bastrenta, M. & Tibayrenc, M. (2000). Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: Detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int. J. Parasitol.*30: 843-848.

Pinto, A. da S., de Lana, M., Bastrenta, B., Barnabé, C., Quesney, V., Noël, S. & Tibayrenc, M. 1998. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitol. Res.* 84: 348-353.

Puerta, C., Martin, J., Alonso, C., and Lopez, M.C. (1994). Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64 : 1-10.

Revollo, S., Oury, B., Laurent, J.P., Barnabé, C., Quesney, V., Carrière, V., Noël, S. & Tibayrenc, M. 1998. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.* 89: 30-39.

Ripert, Christian. 1996. Epidemiologie des maladies parasitaires. Tomo 1 : Protozooses. Editions Médicales Internationales

Rezende J.M.F. (1976). Chagasic mega syndromes and regional differences. In *New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Proceedings of an International Symposium*, Belo Horizonte, MG, Brazil, 18 – 21 march 1975. Pan American Health Organization, Washington. Scientific Publication N° 318.

Robinson, D., Beattie, P., Sherwin, T., and Gull, K. (1991). Microtubules, tubulin, and microtubule-associated proteins of trypanosomes. *Methods Enzymol.* 196 : 285-299.

Romana C. (1935). Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnostico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanozica unilateral (Hipotesis sobre puerta de entrada conjuntivale de la enfermedad). *Publicaciones MEPR* 22 : 16-18.

Ruiz-Moreno L., Bijovsky A.T., Pudles J., Alves M.J.M. & Colli W. (1995). *Trypanosoma cruzi*: monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. *Exp.Parasitol.*, 80 : 605-615.

Russomando, G., de Tomassone, M.M., de, G., I, Acosta, N., Vera, N., Almiron, M., Candia, N., Calcena, M.F., and Figueredo, A. (1998). Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am. J Trop. Med. Hyg.* 59 : 487-491.

Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973) *Numerical Taxonomy. The principle and practice of numerical classification.* (Kenedy, D. and Park R.B; eds) (Freeman, San Francisco) Page 537.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining Method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular and Biological Evolution*, 4. (4) : 406-425.

Schneider A., Sherwin T., Sasse R., Russel D.G., Gull K. & Seebeck T. (1987). Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* contain the same alpha-tubulin isoforms. *J.Cell Biol.*, 104 : 431-438.

Schofield, C.J. (1985). Control of Chagas' disease vectors. *Br. Med. Bull.* 41, 187-194.

Schofield, C.J. and Patterson, J.W. (1977). Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 13 : 727-734.

Seebeck T., Hemphill A. & Lawson D. (1990). The cytoskeleton of trypanosomes. *Parasitol.Today*, 6 : 49-52.

Sherwin T. & Gull K. (1989a). The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B*, **323** : 573-588.

Sherwin, T. and Gull, K. (1989). Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell* **57** : 211-221.

Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **41** : 363-382.

Solari A, Munoz S, Venegas J, Wallace A, Aguilera X, Apt W, Breniere SF, Tibayrenc M. (1992). Characterization of Chilean, Bolivian, and Argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Exp Parasitol.* Sep;75 (2):187-95.

Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., and Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83** : 141-152.

Souto-Padron T., de Souza W. & Heuser J. (1984). Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas magaseliae*. *J.Cell Sci.*, **69** : 167-178.

Stuart, K. (1991). RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1** : 412-416.

Sturm, N.R., Degraeve, W., Morel, C., and Simpson, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast

minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33** : 205-214.

Sturm, N.R. and Simpson, L. (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* **61** : 879-884.

Taylor A.E.R. & Godfrey D.G. (1969). A new organelle of bloodstream salivarian trypanosomes. *J. Protozool.*, **16** : 446-470.

Telleria J, Bosseno MF, Tarifa T, Buitrago R, Martinez E, Torrez M., Le pont F, Brenière F. 1999. Putative reservoirs of *Leishmania amzonensis* in a Sub Andean Bolivian focus identified by kDNA-PCR. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol 94 (1) 5-6 .

Tibayrenc, M (1998a). Beyond strain typing and molecular epidemiologie : integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasitology Today*, **14** : 323 – 329.

Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* **28** : 85-104.

Tibayrenc, M. (1998c). Integrated genetic epidemiology of infectious diseases : the Chagas model. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93** : 577 – 580.

Tibayrenc, M., (1995). Population Genetics of Parasitic Protozoa and other Microorganisms. *Advances in Parasitology* (Eds. Baker, J.R., Muller, R. and Rollinson, D.): **36** : 47-115.

Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D., and Ayala, F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90** : 1335-1339.

Tibayrenc, M. Kjellberg, F et Ayala, F.J. (1991). The clonal theory of parasitic protozoa: a taxonomic proposal applicable to other clonal organisms. *BioScience*, **41** : 277-774.

Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*: 7 (9): 228-232].

Tibayrenc, M., Kjellberg, F.& et Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2414-2418

Tibayrenc, M. et Ayala, F.J. ( 1988). Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi* the agent of Chagas disease: genetical and epidemiological significance. *Evolution*. **42** : 277-292.

Tibayrenc, M. et Ayala, F.J. (1987). Forte corrélation entre classification isoenzymatique et variabilité de l'ADN kinétoplastique chez *Trypanosoma cruzi* compte rendus de l'Académie de Sciences de Paris. **304** : 89-93.

Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., and Ayala, F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83** : 115-119.

Tibayrenc, M., Echalar, L., Dujardin, J.P., Poch, O. & Desjeux, P. (1984). The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in Southern Bolivia. New isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**: 519-525

Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M. & Carlier, Y. (1981). Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*; implications taxinomiques. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **293**: 207-209.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4876-4882

Toledo, M. J. de O., de Lana, M., Carneiro, C.M., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G.L.L., Veloso, V.M., Barnabé, C., Tibayrenc, M. & Tafuri, W.L. (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp. Parasitol.* **100**: 161-172.

Toledo, M.J. de O., Bahia, M.T., Carneiro, C.M., Martins-Filho, O.A., Tibayrenc, M., Barnabé, C., Tafuri, W.L. & de Lana, M. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (1): 223-230]

Toye (1974). Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **68** : 147

Tsuhako, M.H., Alves, M.J.M., Colli, W., Filardi, L.S., Brener, Z., and Augusto, O. (1991). Comparative studies of nifurtimox uptake and metabolism by drug-resistant and susceptible strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemical Physiology* **99** (3) : 317-321.

Ullu, E, C Tschudi, and A Günzl (1996). Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. In *Frontiers in Molecular Biology - Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. D.F. Smith and M. Parsons, eds, IRL Press, Oxford. Pages 115-133.

Usinger, R.L., Wygodzinsky, P., and Ryckman, R.E. (1966). The biosystematics of Triatominae. *Annu. Rev. Entomol.* **11**: 309-330.

Van Meirvenne, N. and Le Ray, D. (1985). Diagnosis of African and American trypanosomiases. *Br. Med. Bull.* **41** : 156-161.

Veas, F., Breniere, S.F., Cuny, G., Brengues, C., Solari, A., and Tibayrenc, M. (1991). General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol. Biol.* **37** : 73-84.

- Veas, F., Cuny, G., Brenière, S.F. & Tibayrenc, M. 1990. Subspecific kDNA probes for major clones of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*: 48 (1): 79-82.
- Vergara, U., Lorca, M., Veloso, C., Gonzalez, A., Engstrom, A., Aslund, L., Pettersson, U., and Frasc, A.C. (1991). Assay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* **29** : 2034-2037.
- Vickerman, K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic Trypanosomes. *British Medical Bulletin* 41: 105-114.
- Vianna, G. (1911). Contribuição para o estudo da anatomia patologica da "Moléstia de Carlos Chagas". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **3**: 276-294.
- Vickerman, K. (1962). The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **56** : 487-495.
- Villanueva, M.S., Williams, S.P., Beard, C.B., Richards, F.F., and Aksoy, S. (1991). A new member of a family of site-specific retrotransposons is present in the spliced leader RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Cell Biol.* **11** : 6139-6148.
- Von Brand, T., Tobie, E. J., Kissling, R. E. and Admas, G. (1949). Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infectious Diseases* **85** : 5-16.
- Wagner, W. and So, M. (1990). Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect. Immun.* **58** : 3217-3224.
- WEBSTER P. & RUSSELL D.G. (1993). The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol. Today*, **9** : 201-205.
- Welsh, J. et Mc Clelland M., (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18** : 7213 – 7218.

Wéry Marc., Protozoologie médicale. Agence francophone pour l'enseignement et la recherche. Editions De Boeck Université. Bruxelles-Belgium. 1995.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.*, **18**: 6531-6535]

Wincker, P., Britto, C., Pereira, J.B., Cardoso, M.A., Oelemann, W., and Morel, C.M. (1994). Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J Trop. Med. Hyg.* **51** : 771-777.

Wincker, P., Bosseno, M.F., Britto, C., Yaksic, N., Cardoso, M.A., Morel, C.M., and Breniere, S.F. (1994a). High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**, 419-423.

Wincker, P., Telleria, J., Bosseno, M.F., Cardoso, M.A., Marques, P., Yaksic, N., Aznar, C., Liegeard, P., Hontebeyrie, M., Noireau, F., Morel, C.M., and Breniere, S.F. (1997). PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology* **114** : (Pt 4), 367-373.

WHO/TDR - Fiocruz co-sponsored Parasite Genome Network Planning Meeting" à Fiocruz (Rio de Janeiro, 14-15 avril de 1994. Brésil).

Woods A., Sherwin T., Sasse R., McRaet., Baines A.J. & Gull K. (1989). Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.*, **93**: 491-500.

Woodward R., Carden M.J. & Gull K. (1995). Immunological characterization of cytoskeletal proteins associated with the basal body, axoneme and flagellum attachment zone of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, **111**: 77-85.

Woodward R. & Gull K. (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J.Cell Sci.*, **95**: 49-57.

# Annexes

## Annexe 1

### Milieu de culture NNN (Novy, Mc Neal, Nicolle)

Composantes :

Bacto-tryptose	15 g
Bacto-agar	15 g
NaCl	4 g
Na <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> . 12H <sub>2</sub> O	5 g
KCl	0,4 g
Eau qsp	1 litre

Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau sur une plaque chauffante avec agitateur, ensuite ajuster le pH à 7,6.

Autoclaver les aliquots de 80 ml à 120°C pendant 20 minutes.

Pour la culture de parasites :

- Reliquéfier la solution en la chauffant à 56°C pendant 30 minutes et rajouter sous une hotte stérile du sang de lapin stérile prélevé sur anticoagulant (héparine ou citrate de sodium) à une concentration finale de 20%.
- Bien mélanger la solution et la répartir par volumes de 2 ml dans des tubes en verre (10 mm x 100 mm) stériles.
- Afin de vérifier leur stérilité, incuber un tube témoin à 37°C pendant 24 heures.

## Annexe 2

### Milieu de culture LIT (Liver Infusion Tryptose)

Composantes :

NaCl	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g
Tryptose	5 g
Yeast Extract 1	3 g
Liver infusion	3 g
KCl	4 g
H <sub>2</sub> O csp	1 lt

Dissoudre les composantes dans l'eau, puis ajuster le pH à 7,4 avec NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M.  
Autoclaver le milieu pendant 20 min.

Ajouter :

Hemine	20 mg
--------	-------

- Pour 1 litre de milieu préparer environ 3 ml de solution d'hémine à 10 mg dans triéthanolamine et eau (50/50), après une bonne dissolution.
- Pour stériliser la solution filtrer avec un filtre de 0,22 et puis ajouter à la solution antérieurement préparée.
- Enfin, ajouter de la gentamicine à une concentration finale de 50 µg/ml.

### Annexe 3

#### Milieu de culture RPMI - 1654

Composants :

RPMI- 1654 (Gibco)	10,4 g
Hepes	5,95 g.
NaHCO	2 g.
H2O qsp	1 lt

- Dissoudre les composants dans l'eau, puis ajuster à pH 7,0 autoclaver pendant 20 min. Après, ajouter l'antibiotique dans la hotte et filtrer.

gentamicine	200 mM
-------------	--------

- Avant l'utilisation, on ajoute l'estabilix (50 ug /ml) et le sérum de veau fœtal 10% (préalablement décomplémenté à 56 ° C pendant 45 min).

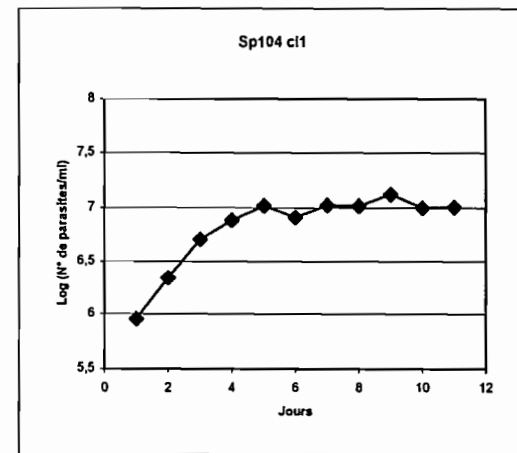
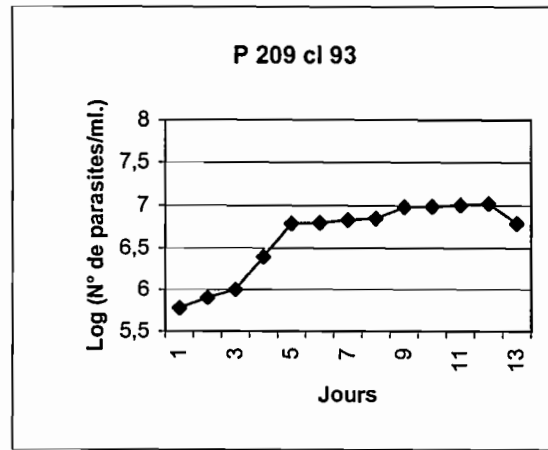
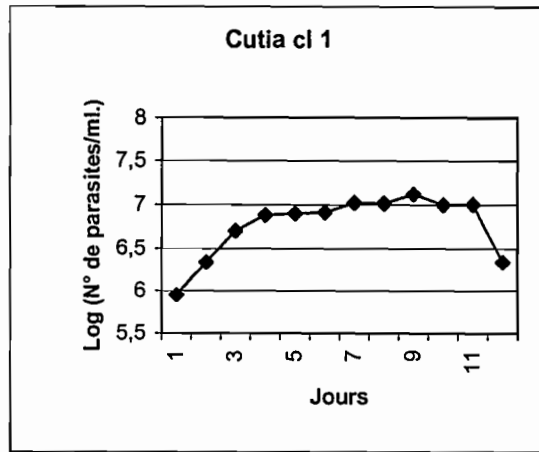
Estabilix	10 ml
-----------	-------

- Après filtration, on ajoute à la solution antérieurement préparée.

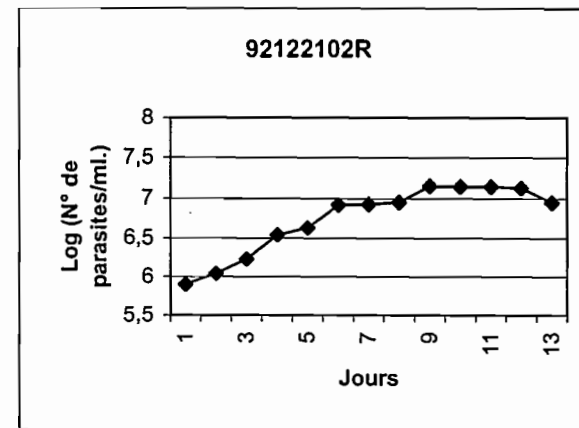
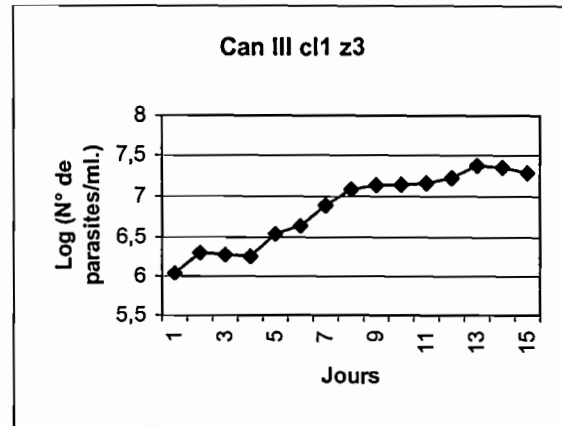
## Annexe 4

### Courbes de croissance des stocks de *Trypanosoma cruzi* en RPMI

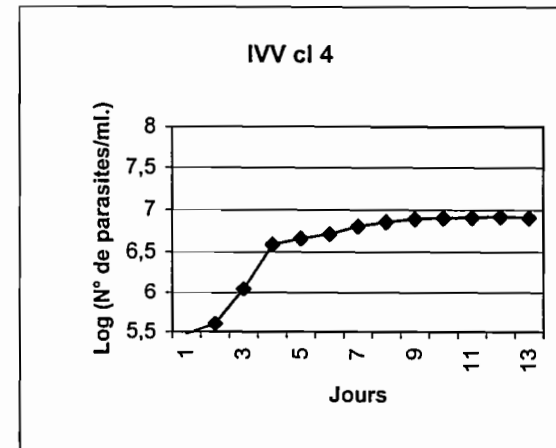
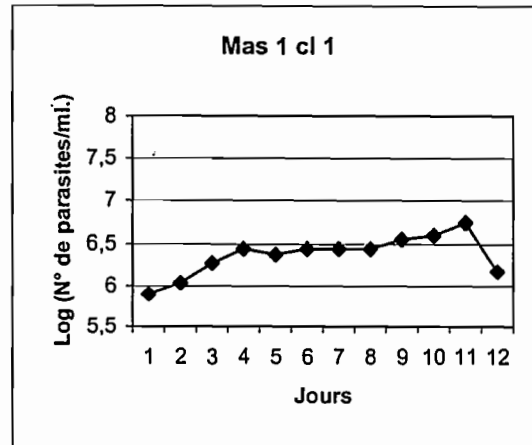
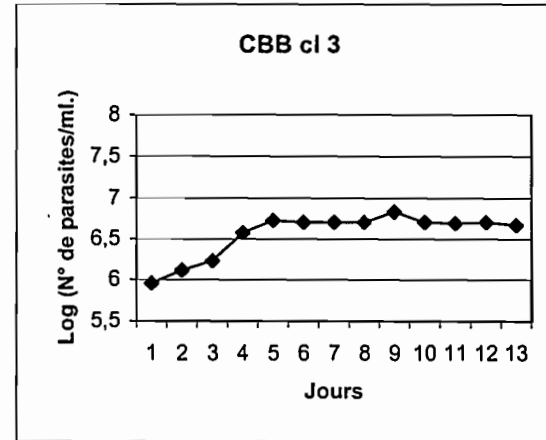
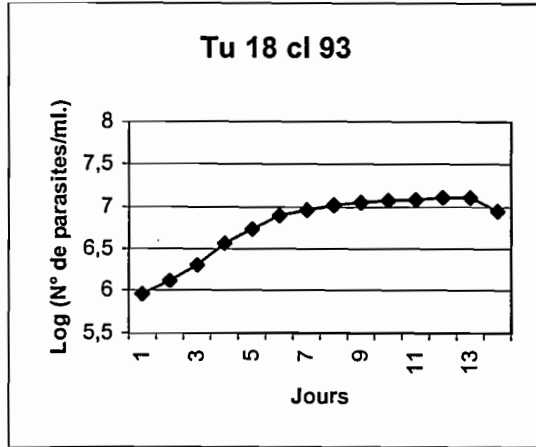
#### DTU I



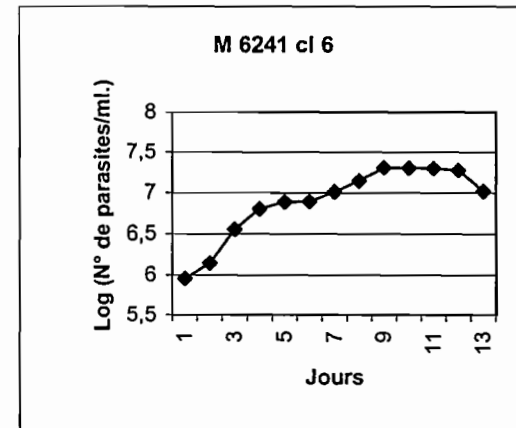
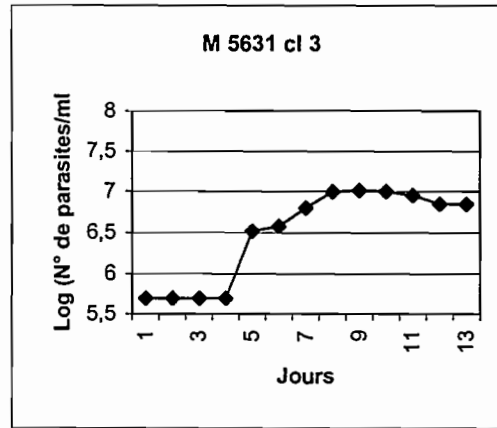
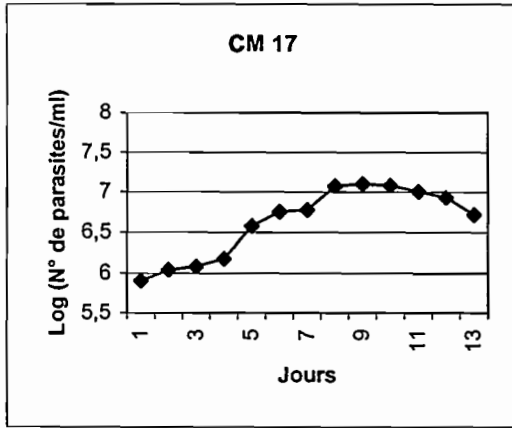
#### DTU II a



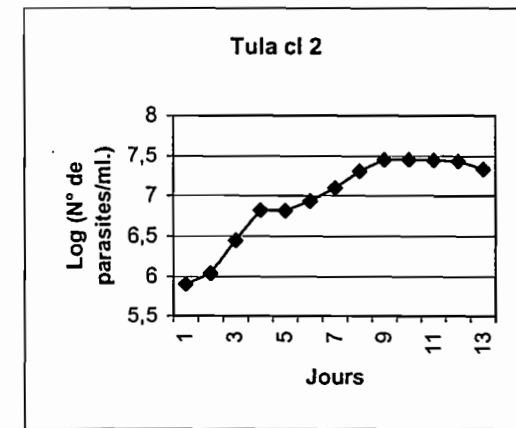
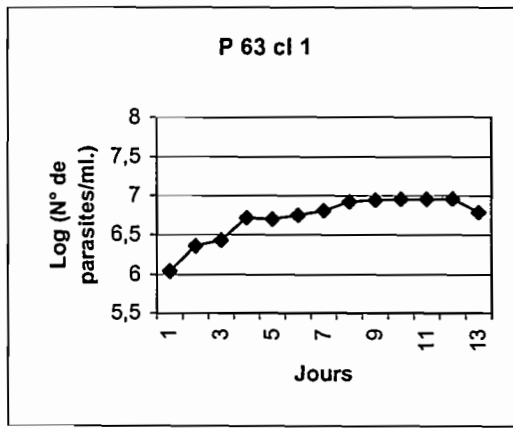
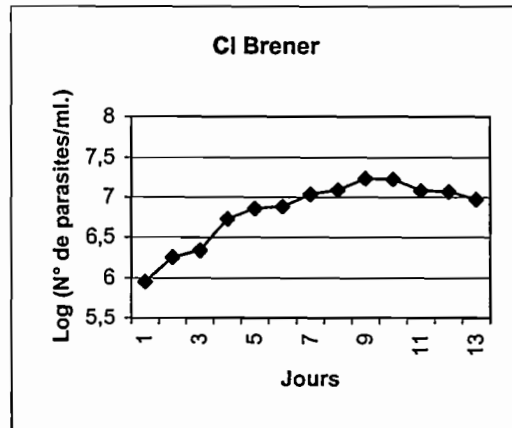
Annexe 4 (suite)  
DTU II b



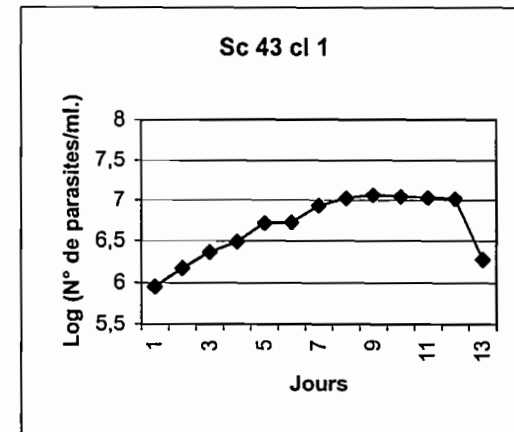
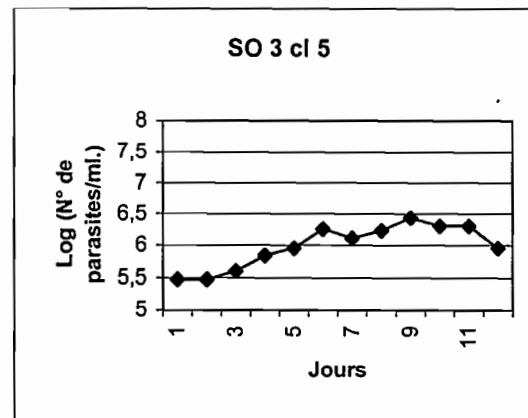
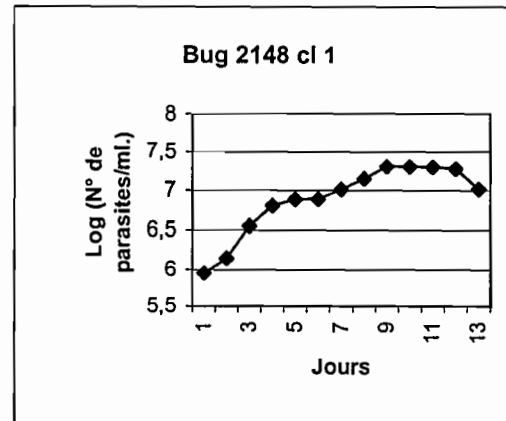
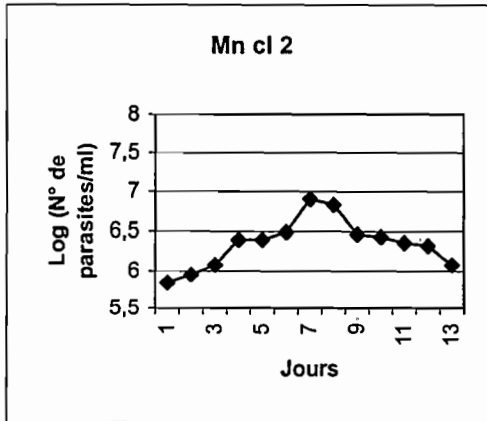
Annexe 4 (suite)  
DTU II c



DTU II e



Annexe 4 (suite et fin)  
DTU II d



## Annexe 5

Systèmes isoenzymatiques utilisés pour caractériser les stocks de *Trypanosoma cruzi*

Code	Systeme	Substrat	Migration	
			Tampon	Voltage
<b>6GPD</b>	Glucose-6-phosphate1-deshydrogenase	10mg D-glucose-6-phosphate	HR	200 v
<b>ME</b>	Malic enzyme	600µl Malate 1M pH 7	III Shaw	160 v
<b>GPI</b>	Glucose-phosphate isomerase	10mg D-Fructose 6-phosphate DH	III Shaw	200 v
<b>IDH</b>	Isocitrate deshydrogenase	10mg DL-isocitric acid	III Shaw	200
<b>GDH</b>	Glutamete deshydrogenase	170mg L-glutamic acid pH 8	III Shaw	160 v
<b>DIA</b>	Diaphorase	-	III Shaw	200 v

**Note :** Pour toutes les systèmes isoenzymatiques nous avons utilisé les colorantes suivantes :  
200µl NBT (25mg/ml), 100µl PMS (30mg/ml).

Le système DIA n'utilise pas de substrat, est un système basé sur la déshydrogénation du NADPH

## Annexe 6

### Liste d'amorces décimériques utilisées pour les techniques RAPD et RADES

A 02	TGCCGAGCTG
A - 03	AGTCAGCCAC
A - 07	GAAACGGGTG
A - 09	GGGTAACGCC
A - 10	GTGATCGCAG
B - 01	GTTTCGCTCC
B - 11	GTAGACCCGT
B - 18	CCACAGCAGT
E - 03	CCAGATGCAC
F - 13	GGCTGCAGAA
N - 04	GACCGACCCA
N - 15	CAGCGACTGT
R - 01	TGCGGGTCCT
R - 02	CACAGCTGCC
R - 08	CCCGTTGCCT
R - 10	CCATTCCCA
U - 16	CTGCGCTGGA
U - 20	ACAGCCCCCA

## Annexe 7

### Préparation de bactéries compétentes

- Décongeler un stock de bactéries de la souche JM109 et incuber dans 50 ml de milieu LB (Luria Broth) pendant 1 h à 37 °C au bain-marie sans agitation. Ensuite incuber pendant 2 à 3 h à 37 °C avec agitation de 5g. Jusqu'à une DO 550 de 045.
- Transférer 40 ml de cette solution dans un tube de 50 ml et centrifuger 15 min à 5g à une température de 4 °C.
- Jeter le surnageant en égouttant au maximum et reprendre le culot dans 20 ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub> (100 mM) stérile et refroidie à 4°C. Après une resuspension totale, incuber 15 min dans de la glace.
- Centrifuger pendant 15 min à 2500 rpm à 4 °C.
- Jeter le surnageant, et reprendre le culot dans 4 ml de CaCl<sub>2</sub> (100 mM)

#### Congélation :

- Aliquoter la solution précédente par doses 166 µl dans des microtubes. Ensuite, ajouter à chaque tube 34 µl de glycérol.
- Les microtubes sont conservées a – 70 °C.

#### Préparation de CaCl<sub>2</sub> 100 mM :

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,47 g
Eau milli-Q	100 ml

Pour la stérilisation, la solution est filtrée à travers un filtre de 0,22 µm.

## Annexe 8

### Milieu de culture LB (Luria Broth)

#### Milieu liquide :

Bacto tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O qsp	1000 ml

- Dissoudre les composantes dans l'eau, et stériliser pendant 20 min. Ajouter une solution d'ampicilline auparavant filtrée à une concentration de 25 mg/ ml).

#### Milieu solide :

- On prépare une solution avec les mêmes composants utilisés pour le milieu liquide, ensuite on ajoute :

Bacto agar	15 g
------------	------

- Cette solution est stérilisée par autoclave. Quand elle est refroidie, on ajoute une solution d'ampicilline (25mg/ml), puis on répartit 20 ml de milieu par boîte de Pétri.
- Se conserve pendant une semaine à 4°C.

## Annexe 9

### Comparaison des séquences hypervariables des minicercles chez *Trypanosoma cruzi* et *Trypanosoma cruzi marinkellei*

<i>T. cruzi</i> et <i>T. c. marinkellei</i>		Séquences Variables des ADNk				Analyse par Blast	
DTU	Souche	Clone	Longueur (pb)	% GC	Type	Score	E-value
I	P209 cl93	P209-50	244	34,3	A	441	e-127
I	P209 cl93	P209-69	244	34,2	A	472	e-136
I	P209 cl93	P209-56	230	32,8	B	394	e-113
I	P209 cl93	P209-61	230	30,5	B	436	e-125
I	Cutia Cl1	cutia-126	239	33,3	C	474	e137
I	Cutia Cl1	cutia-130	239	33,3	C	474	e-137
I	Cutia Cl1	cutia-128	239	39,4	D	472	e-136
I	Cutia Cl1	cutia-131	239	39,4	D	472	e-136
I	Cutia Cl1	cutia-132	239	40,2	D	472	e-136
I	SO34 cl4	so34-110	246	32,0	E	394	e-113
I	SO34 cl4	so34-27	246	31,1	E	452	e-130
I	SP 104 cl1	sp104-102	239	35,9	F	474	e-137
I	SP 104 cl1	sp104-105	239	35,9	F	474	e-137
I	X10 cl21	x10-102	239	35,9	F	474	e-137
I	SP 104 cl1	sp104-H02	226	31,4	G	406	e-116
I	SP 104 cl1	sp104-mp4	229	32,0	G	442	e-127
I	SP 104 cl1	sp104-D03	242	34,3	H	480	e-139
I	SP 104 cl1	sp104-mp12	242	34,3	H	480	e-139
I	Cutia Cl1	cutia-122	220	31,3	I	436	e-125
I	Cutia Cl1	cutia-124	220	31,3	I	436	e-125
I	Cutia Cl1	cutia-120	245	31,4	--	28	0,011
I	Cutia Cl1	cutia-121	254	31,6	--	30	0,003
I	Cutia Cl1	cutia-127	255	32,9	--	28	0,011
I	OPS21	ops21-11	244	35,2	--	26	0,042
I	OPS21	ops21-15	237	33,3	--	28	0,01
I	P209 cl93	P209-54	240	34,2	--	28	0,01
I	P209 cl93	P209-59	241	31,9	--	32	7e-04
I	P209 cl93	P209-63	248	32,4	--	24	0,17
I	P209 cl93	P209-64	228	32,4	--	24	0,15
I	P209 cl93	P209-65	237	31,5	--	28	0,01
I	P209 cl93	P209-66	238	33,8	--	26	0,041
I	P209 cl93	P209-68	236	33,8	--	34	2e-04
I	P209 cl93	P209-70	244	34,7	--	26	0,042
I	SO34 cl4	so34-116	236	34,8	--	26	0,04
I	SO34 cl4	so34-26	239	34,4	--	26	0,041
I	SO34 cl4	so34-29	229	31,9	--	28	0,001
I	SP 104 cl1	sp104-mp103	238	36,7	--	28	0,01
I	X10 cl21	x10-105	249	36,3	--	26	0,043
I	X10 cl21	x10-38	236	34,3	--	26	0,04
I	X10 cl21	x10-39	230	35,4	--	26	0,039
I	X10 cl21	x10-41	237	33,8	--	28	0,01

## Annexe 9 (suite)

IIb	lw cl4	lw_mp102	242	35,6	J	480	e-139
IIb	lw cl4	lw_mp103	242	35,6	J	480	e-139
IIb	lw cl4	lw_mp105	242	35,6	J	480	e-139
IIb	lw cl4	lw_mp100	235	34,3	K	466	e-134
IIb	lw cl4	lw_mp104	235	34,3	K	466	e-134
IIb	Esmeraldo cl3	esm_awmp226	240	30,6	-	26	0,041
IIb	Esmeraldo cl3	esm_awmp228	228	33,8	-	34	2e-04
IIb	Esmeraldo cl3	esm_awmp229	235	33,8	-	32	7e-04
IIb	Esmeraldo cl3	esm_awmp231	251	32,5	-	24	0,17
IIb	Esmeraldo cl3	esm_awmp236	226	32,3	-	30	0,002
IIb	lw cl4	lw_awmp287	253	38,6	-	26	0,044
IIb	lw cl4	lw_awmp288	227	33,3	-	26	0,039
IIb	lw cl4	lw_awmp292	225	30,4	-	26	0,038
IIb	lw cl4	lw_awmp293	225	36,7	-	28	0,01
IIb	lw cl4	lw_awmp294	246	35,1	-	28	0,011
IIb	lw cl4	lw_mp101	245	34,3	-	26	0,042
IIb	lw cl4	lw_mp106	240	36,0	-	26	0,041
IIb	lw cl4	lw_mp107	232	32,9	-	26	0,04
IIb	lw cl4	lw_mp109	244	39,0	-	28	0,011
IIb	Mas cl1	mas-241	243	36,0	-	28	0,011
IIb	Mas cl1	mas-242	247	34,2	-	26	0,042
IIb	Mas cl1	mas-243	251	35,1	-	28	0,011
IIb	Mas cl1	mas-247	233	33,3	-	26	0,04
IIb	Mas cl1	mas-248	255	31,7	-	30	0,03
IIId	MN cl2	MN-01	230	36,4	L	335	3e-95
IIId	MN cl2	MN-02	230	36,4	L	335	3e-95
IIId	MN cl2	MN-273	230	36,4	L	341	5e-97
IIId	MN cl2	MN-274	230	34,3	L	321	5e-91
IIId	MN cl2	MN-275	230	33,8	L	321	5e-91
IIId	MN cl2	MN-276	230	36,9	L	341	5e-97
IIId	MN cl2	MN-278	230	36,4	L	341	5e-97
IIId	MN cl2	MN-280	230	34,3	L	327	8e-93
IIId	MN cl2	MN-281	230	35,3	L	351	e-100
IIId	MN cl2	MN-282	230	36,4	L	335	3e-95
IIId	MN cl2	MN-283	230	35,9	L	287	7e-81
IIId	RN PCRO	RN-297	230	38,4	L	341	5e-97
IIId	RN PCRO	RN-298	230	35,2	L	327	8e-93
IIId	RN PCRO	RN-299	230	37,6	L	357	e-102
IIId	RN PCRO	RN-301	230	35,9	L	335	3e-95
IIId	RN PCRO	RN-302	230	35,9	L	335	3e-95
IIId	TPK1	tpk1-268	230	36,4	L	335	3e-95
IIId	Bug2148 cl1	Bug-251	243	32,0	M	422	e-121
IIId	Bug2148 cl1	Bug-256	243	31,6	M	422	e-121
IIId	Bug2148 cl1	Bug-257	243	32,0	M	422	e-121
IIId	RN PCRO	RN-305	243	32,4	M	422	e121
IIId	TPK1	tpk1-261	243	31,6	M	422	e-121
IIId	TPK1	tpk1-269	243	32,0	M	422	e-121
IIId	TPK1	tpk1-270	243	32,0	M	422	e-121
IIId	TPK1	tpk1-271	243	32,4	M	422	e121
IIId	TPK1	tpk1-272	243	32,0	M	422	e-121

## Annexe 9 (suite)

IId	SC43	SC43-703	242	32,0	M	460	e-132
IId	SC43	SC43-704	242	32,0	M	460	e-132
IId	SC43	SC43-701	242	32,0	M	460	e-132
IId	SC43	SC43-709	242	32,0	M	460	e-132
IId	SC43	SC43-705	238	32,9	N	466	e-134
IId	SC43	SC43-706	238	32,9	N	466	e-134
IId	SC43	SC43-702	238	32,9	N	466	e-134
IId	SC43	SC43-708	238	32,9	N	466	e-134
IId	MN cl2	MN-03	238	31,4	–	28	0,010
IId	RN PCRO	RN-303	240	36,1	–	26	0,041
IId	RN PCRO	RN-304	241	32,9	–	28	0,010
IId	TPK1	tpk1-267	226	35,9	–	24	0,15
Ile	CL Brener	CL Brener726	240	33,3	O	220	2e-60
Ile	CL Brener	CL Brener727	240	32,0	O	220	2e-60
Ile	VMV 4	VMV-716	234	33,3	P	428	e-123
Ile	VMV 4	VMV-717	234	33,3	P	428	e-123
Ile	VMV 4	VMV-19-2	234	31,4	P	428	e-123
Ile	X154/7	X154-707	234	33,3	P	428	e-123
Ile	X154/7	X154-702	234	33,3	P	428	e-123
Ile	Tulacl2	Tula-736	234	33,8	P	428	e-123
Ile	VMV 4	VMV-715	248	31,1	Q	492	e-142
Ile	VMV 4	VMV-718	248	31,1	Q	492	e-142
Ile	X154/7	X154-703	248	31,1	Q	492	e-142
Ile	VMV 4	VMV-713	238	28,1	R	466	e-134
Ile	X154/7	X154-701	238	28,6	R	466	e-134
Ile	X154/7	X154-708	238	29,0	R	466	e-134
Ile	Tulacl2	Tula-738-2	238	28,1	R	466	e-134
Ile	CL Brener	CL Brener728	239	35,6	S	462	e-133
Ile	CL Brener	CL Brener730	239	36,4	S	462	e-133
Ile	CL-Brener	CL-Brener729	239	31,0	–	190	2e-51
Ile	CL-Brener	CL-Brener731	229	33,8	–	26	0,07
Ile	Tulacl2	Tula742	245	36,4	–	30	0,005
Ile	VMV 4	VMV711	244	33,3	–	30	0,05
Ile	VMV 4	VMV712	233	40,4	–	30	0,005
Ile	X 154/7	X154-704	233	35,3	–	26	0,071
Y (II b+e)	KY13	KY13-V1	232	32,9	–	28	0,01
Y (II b+e)	KY13	KY13-V2	255	33,3	–	26	0,044
Y (II b+e)	KY13	KY13-V3	230	32,9	–	28	0,01
Y (II b+e)	KY13	KY13-V4	246	35,2	–	36	4e-05
CL (Ile)	ptckAWP	V1 ptckAWP	219	36,0	–	26	0,037
CL (Ile)	ptckAWP	V2 ptckAWP	253	32,4	–	32	7e-04
CL (Ile)	ptckAWP	V3 ptckAWP	226	34,3	–	28	0,010
CL (Ile)	ptckAWP	V4 ptckAWP	250	32,9	–	28	0,011
CL (Ile)	KM14	KM14-V1	240	32,4	–	26	0,041
CL (Ile)	KM14	KM14-V2	215	32,3	–	28	0,009
CL (Ile)	KM14	KM14-V3	239	33,3	–	32	7e-04
CL (Ile)	KM14	KM14-V4	230	36,3	–	30	0,003
CL (Ile)	ptc21	ptc-21-V1	231	35,7	–	30	0,003
CL (Ile)	ptc21	ptc-21-V2	240	31,6	–	42	7e-07
CL (Ile)	ptc21	ptc-21-V3	233	30,9	–	26	0,04
CL (Ile)	ptc21	ptc-21-V4	235	28,9	–	28	0,01

## Annexe 9 (suite)

<i>T.marinkellei</i>	B3	T_m01	191	30,2	--	26	0,032
<i>T.marinkellei</i>	B3	T_m02	192	33,9	--	24	0,13
<i>T.marinkellei</i>	B3	T_m03	281	45,3	--	28	0,012
<i>T.marinkellei</i>	B3	T_m04	218	30,6	--	34	2e-04
<i>T.marinkellei</i>	B3	T_m06	233	36,8	--	26	0,038
<i>T.marinkellei</i>	B3	T_m07	190	33,3	--	26	0,032
<i>T.marinkellei</i>	M109	T_m09	242	34,3	--	26	0,042
<i>T.marinkellei</i>	M109	T_m10	220	36,4	--	26	0,038
<i>T.marinkellei</i>	M109	T_m12	221	37,6	--	28	0,01
<i>T.marinkellei</i>	M109	T_m13	240	35,2	--	30	0,003
<i>T.marinkellei</i>	M109	T_m14	195	36,1	--	24	0,13
<i>T.marinkellei</i>	M109	T_m15	192	34,5	--	24	0,13









Annexe 10 (suite)

Régions variables de l'ADNk de souches appartenant a la DTU II d de *Trypanosoma cruzi*

MN_02mp01	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	} type L
MN_02mp02	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
MN_awmp273	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
MN_awmp274	GGCTTAGG-TGTGGATAAG-AGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATACCATGGATGATTAA	
MN_awmp275	GGCTTAGG-TGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
MN_awmp276	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
MN_awmp278	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
MN_awmp280	GGCTTAGG-TGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTAAA-CATGGATGATTAA	
MN_awmp281	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATACCATGGATGATTAA	
MN_awmp282	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAAATGGATGATTAA	
MN_awmp283	GGCTTAGG-TGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGTTG----ATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATA-CATGGATGATTAA	
RN_awmp297	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGCCCCCGTTTGAACCTTGTGTTTGGTTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
RN_awmp298	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGTTTGGTTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTGT--CGTGGATGATTAA	
RN_awmp299	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGCCCCCGTTTGTCTGTTTGGTTGGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATCG-CCTGGATGATTAA	
RN_awmp301	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
RN_awmp302	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
tpk1_awmp268	GGCTTAGGGTGTGGATAAGGAGCTTAAATTGTTAAGTTTAAATAATATTGTTAGATATGTTGATTATGTTTGAACCTTGTGATTGATTTGGTTGTAGTAAGATTTGTATAGATGGATGATTAA	
RN_awmp305	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAATTATGATTGAAATTTTTCAGGTTGATAAGTGGACAGA	} type M
BUG_awmp256	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
BUG_awmp257	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
BUG_awmp251	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGATTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
tpk1_awmp261	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
tpk1_awmp269	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
tpk1_awmp270	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
tpk1_awmp271	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
tpk1_awmp272	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
SC43-701	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
SC43-703	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
SC43-704	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
SC43-707	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
SC43-709	GTCTCTTTGGTGTATGTTAAGGATTAAGGTATACTTAAGTCTATAAGTTTATTATTATTTCCGGTTTATTTATTGAATTTGATAAGTGGACAGA	
SC43-705	GGCAGTATTATGTTGGTTATGTATGTTGTTGGGTTGTAAGTGTATAGTATTATTTAAGTGTGTTATTGGTTTATAAGTTATAATTGAATTGTGTATATTTGTTTATCAATTTATTCCGG	} type N
SC43-706	GGCAGTATTATGTTGGTTATGTATGTTGTTGGGTTGTAAGTGTATAGTATTATTTAAGTGTGTTATTGGTTTATAAGTTATAATTGAATTGTGTATATTTGTTTATCAATTTATTCCGG	
SC43-02	GGCAGTATTATGTTGGTTATGTATGTTGTTGGGTTGTAAGTGTATAGTATTATTTAAGTGTGTTATTGGTTTATAAGTTATAATTGAATTGTGTATATTTGTTTATCAATTTATTCCGG	
SC43-708	GGCAGTATTATGTTGGTTATGTATGTTGTTGGGTTGTAAGTGTATAGTATTATTTAAGTGTGTTATTGGTTTATAAGTTATAATTGAATTGTGTATATTTGTTTATCAATTTATTCCGG	
MN_02mp03	GATGGTGTGTAAGCTGAGAAATTAACCTTGATTATGATTTAGATATGATTATAGTATACATGATTTTTCATTATCAATTTTAAATTTATGTTACAAAAGATAATAATTTGTTTGTGTTGA	} types unques
RN_awmp303	GGTGTGTTGACGATGGGTAATATTTAAATATCTTTGTTCCGATACAGATATAATGATTTATGAATCTAGTGTGTAAGATTGAGGATGATGATGAAATAAATTTGTTTGTGTTGTTCA	
RN_awmp304	GCATAAATGTTTGGATTGTTTAAATATAAATATTTGAAATATTGGTGTGATTATGTTATTTCTGTATAAATGATGAAAGACAAAAGAAAATGAGGAAATTAAGGATGTTACCATT	
tpk1_awmp267	GGCTGTAGGTTGTGGATGAGATTTACTATAGATTTGATGATTGCATGCAATGATGTTTAAATTAGATAAATGAGTAAGTATATTAATTTGAGTAAAGATTTATGATTTCACTTGGATGTTAAATT	

# Annexe 10 (suite)

MN_02mp01	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	} type L
MN_02mp02	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp273	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp274	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp275	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp276	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp278	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp280	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp281	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp282	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
MN_awmp283	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
RN_awmp297	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
RN_awmp298	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
RN_awmp299	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
RN_awmp301	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
RN_awmp302	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
tpk1_awmp268	T AATTT TATT AATTA TGT TTAAA CTATAAT TT TAATT TT TAA GTT TAT GGT TTC C AATAAAT GA A GTTTC GAATTC GGA AAA TT GG	
RN_awmp305	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	} type M
BUG_awmp256	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
BUG_awmp257	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
tpk1_awmp261	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
tpk1_awmp269	GAATATATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
tpk1_awmp270	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
tpk1_awmp271	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
tpk1_awmp272	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
SC43-701	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
SC43-703	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
SC43-704	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
SC43-707	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
SC43-709	GAAGAAATAGAAATGATGTTGATTGTTGATTTGAATTTACTAGAAATATGATGTTATACAATAATATGTTTTGTTATCATTGTGGGTTGAAAAACTGAAAAATTTGG	
SC43-705	ATGTTAATTTGATTTATGATGATGTTTCAATATACTTTAATAGATAATGTTGAATTTGATAAAATATTATTTTAATTATGGCTACGGAAATCAAGAAACTCT	} type N
SC43-706	ATGTTAATTTGATTTATGATGATGTTTCAATATACTTTAATAGATAATGTTGAATTTGATAAAATATTATTTTAATTATGGCTACGGAAATCAAGAAACTCT	
SC43-02	ATGTTAATTTGATTTATGATGATGTTTCAATATACTTTAATAGATAATGTTGAATTTGATAAAATATTATTTTAATTATGGCTACGGAAATCAAGAAACTCT	
SC43-708	ATGTTAATTTGATTTATGATGATGTTTCAATATACTTTAATAGATAATGTTGAATTTGATAAAATATTATTTTAATTATGGCTACGGAAATCAAGAAACTCT	
MN_02mp03	TAAATATTGTTAAATTTTPTATTTTATACTTGTATGATTTGTTGTTAATTTAATTTCTTATGGGTTGGCTAAATTTGGGGTTAATTTCTNGGAAATTTTAA	} types uniques
RN_awmp303	TGTTAATATTGTTAAATTTTPTATTTTATACTTGTATGATTTGTTGTTAATTTAATTTCTTATGGGTTGGCTAAATTTGGGGTTAATTTCTNGGAAATTTTAA	
RN_awmp304	TATGATGTTAATTTAATTTCTTATGATTTGTTAATTTAATTTCTTATGGGTTGGCTAAATTTGGGGTTAATTTCTNGGAAATTTTAA	
tpk1_awmp267	TGTTAATATTGTTAAATTTTPTATTTTATACTTGTATGATTTGTTGTTAATTTAATTTCTTATGGGTTGGCTAAATTTGGGGTTAATTTCTNGGAAATTTTAA	

Annexe 10 (suite)

Régions variables de l'ADNk de souches appartenant à la DTU II e de *Trypanosoma cruzi*

CL-Brener726	A000CT0T000TAA0ATAACA0TTTTTAAT0TATTTATA0TTTTATATTTAT00TTAT0TACT0A00T0ATA0TCATATATA0TTA0TATACA0T0AT0AT0ATA00T0A00T0AT0AT0ATT0TTTAAT	} type O
CL-Brener727	A000CT0T000TAA0ATAACA0TTTTTAAT0TATTTATA0TTTTATATTTAT00TTAT0TACT0A00T0ATA0TCATATATA0TTA0TATACA0T0AT0AT0ATA00T0A00T0AT0AT0ATT0TTTAAT	
VMV716	TATAC0T0T0ATTTA0AAT0TAGA0TATAGA0TATTAGATTAT0T0ATATACTTTAATAAC0A00A000AA0TTTA0TA0TATT0A0T0A0T0AT0ATTATATTAT0TTCATTAT0TATATTATAC00TTAC	} type P
VMV717	TATAC0T0T0ATTTA0AAT0TAGA0TATAGA0TATTAGATTAT0T0ATATACTTTAATAAC0A00A000AA0TTTA0TA0TATT0A0T0A0T0AT0ATTATATTAT0TTCATTAT0TATATTATAC00TTAC	
X154-707	TATAC0T0T0ATTTA0AAT0TAGA0TATAGA0TATTAGATTAT0T0ATATACTTTAATAAC0A00A000AA0TTTA0TA0TATT0A0T0A0T0AT0ATTATATTAT0TTCATTAT0TATATTATAC00TTAC	
X154-702	TATAC0T0T0ATTTA0AAT0TAGA0TATAGA0TATTAGATTAT0T0ATATACTTTAATAAC0A00A000AA0TTTA0TA0TATT0A0T0A0T0AT0ATTATATTAT0TTCATTAT0TATATTATAC00TTAC	
VMV719-2	TATAC0T0T0ATTTA0AAT0TAGA0TATAGA0TATTAGATTAT0T0ATATACTTTAATAAC0A00A000AA0TTTA0TA0TATT0A0T0A0T0AT0ATTATATTAT0TTCATTAT0TATATTATAC00TTAC	
Tula736	TATAC0T0T0ATTTA0AAT0TAGA0TATAGA0TATTAGATTAT0T0ATATACTTTAATAAC0A00A000AA0TTTA0TA0TATT0A0T0A0T0AT0ATTATATTAT0TTCATTAT0TATATTATAC00TTAC	
VMV715	0ACATA0T00TCATTATAATTTT0T0TATA0TTTAAATAT0T0CCTTTT0TATA0ATAA0A0TA0T0ATA0TT0TATTCA0TAAATATAAA0TTCT0TAA0AT00TA0AT0A00ATA0AATT0ATACT0T0T	} type Q
VMV718	0ACATA0T00TCATTATAATTTT0T0TATA0TTTAAATAT0T0CCTTTT0TATA0ATAA0A0TA0T0ATA0TT0TATTCA0TAAATATAAA0TTCT0TAA0AT00TA0AT0A00ATA0AATT0ATACT0T0T	
X154-703	0ACATA0T00TCATTATAATTTT0T0TATA0TTTAAATAT0T0CCTTTT0TATA0ATAA0A0TA0T0ATA0TT0TATTCA0TAAATATAAA0TTCT0TAA0AT00TA0AT0A00ATA0AATT0ATACT0T0T	
X154-701	0AT00TT0TTACA00TAT00TTA0ATTTAT0TATA0TAAT0T0T0TCTATAATA00TA0TAT0TT0TATATTTATA0T00TAT0TTT0A0TTACATT0TA0AA0TATA00T0ATA0TTTAT0T0TATA0C	} type R
VMV713	0AT00TT0TTACA00TAT00TTA0ATTTAT0TATA0TAAT0T0T0TCTATAATA00TA0TAT0TT0TATATTTATA0T00TAT0TTT0A0TTACATT0TA0AA0TATA00T0ATA0TTTAT0T0TATA0C	
X154-708	0AT00TT0TTACA00TAT00TTA0ATTTAT0TATA0TAAT0T0T0TCTATAATA00TA0TAT0TT0TATATTTATA0T00TAT0TTT0A0TTACATT0TA0AA0TATA00T0ATA0TTTAT0T0TATA0C	
Tula738-2	0AT00TT0TTACA00TAT00TTA0ATTTAT0TATA0TAAT0T0T0TCTATAATA00TA0TAT0TT0TATATTTATA0T00TAT0TTT0A0TTACATT0TA0AA0TATA00T0ATA0TTTAT0T0TATA0C	
CL-Brener728	00T0CT0T0T00CCT00T0AATTA00AT0ATTATTA0ATTT0TTTATTTAT0T0ATTT00ATA00T0ATA0AT00TA0TATACAAA0A00T0A00T0TTTATTAT0T0T0A0000TTATT0CAT0TTT0TT	} type S
CL-Brener730	00T0CT0T0T00CCT00T0AATTA00AT0ATTATTA0ATTT0TTTATTTAT0T0ATTT00AT000T0ATA0AT00TA0TATACAAA0A00T0A00T0TTTATTAT0T0T0A0000TTATT0CAT0TTT0TT	
CL-Brener729	0AT000AA00T0ATAAT00TA0AAAT0ATATTATTATA0TTTTT0TTTACCT0CTA0TATA0TAT0TTATC0T0AT0T0T00CA0N0ATAAACTTTT0T0A0TTAT0AT00T0CTATATA0ATTAT0TA0T	} types uniques
CL-Brener731	ATTC0ATAA000TTCA00T0T0TTA0TT00ATATT00ATTATATT0T0AT00TATTA0A0TACACA0T0A0AT0T0ATTT0AATT0TATACA0TAATTTATA0AT0ATATAT0TTCAAT0TTATATTT0ATA	
Tula742	0T0CAC000TTATAATATA0TTTA00CCTTT0ATTTATATATTAT0AA0TT0A0T0TACATT0AATAATCTA0A0T0T000A00A0AT0AA0AAA0TTT0ATTT0TTT0AAT0AA0T00TTAA0CAT0TAT0	
VMV711	0T0T0TT0A00CT0AA0000TT0CATACTATAAT0TTATTTT0TAATT0T0TA0A0TT0TTAT0ATATATAT0ACATAT0TATTCACACA0ATT0A0AAA00T00T0A00T0A0AAAT0TATTTT0ATTA	
VMV712	000CT000TT00TA0T0TT0A0TTT0TATT0TAT00AT0A00TT0TAT00AT00TT0T0AA0A0ATAA0AATATCATTAAAT0TTA0T0A0T0TATAAT0AATT0TTT0AT0TC0AATCTTAAAT0TTAT0T	
X154-704	0CATTAGT00CACAG00T0ATTTA0A0TTAGT00T0T0CA00T0ATA00TTA0TTTAT0ATAT0A0TTT0AATAT0TTATTT0T0TTATT0A0TAT0TAT0ACTATT0TAT0ATAAACT0TAA0A00TT0A	



## *Articles*

# Sylvatic Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: Trends Toward Domesticity and Possible Infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)

FRANCOIS NOIREAU,<sup>1</sup> MARIE-FRANCE BOSSENO,<sup>2</sup> ROXANA CARRASCO,<sup>3</sup>  
JENNY TELLERIA,<sup>1</sup> FERNANDO VARGAS,<sup>1</sup> CLARA CAMACHO,<sup>3</sup>  
NINA YAKSIC,<sup>3</sup> AND SIMONE FREDERIQUE BRENIÈRE<sup>2</sup>

J. Med. Entomol. 32(5): 594-598 (1995)

**ABSTRACT** The risk of domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* (Chagas) by sylvatic triatomines was assessed in an isolated area of the subandean region of Bolivia. None of the 390 residents examined had serological evidence of infection. Two sylvatic triatomine species, *Eratyrus mucronatus* (Stål) and *Triatoma sordida* (Stål), were found in houses and in peri-domestic structures. The collection of nymphal instars of both species from some houses indicated possible domesticity. Microscopic examination of feces from 92 insects showed no parasites, and cultures from the guts of 30 insects were negative. Nevertheless, a polymerase chain reaction (PCR) test performed on the same fecal samples showed the presence of *T. cruzi* DNA in 19.1 and 12.5% of *E. mucronatus* and *T. sordida*, respectively. These 16 PCR-positive samples were hybridized with 2 *T. cruzi*-specific probes known from the domestic cycle in Bolivia (clones 20 and 39). At least 1 of these clones was identified in 7 bugs (5 *E. mucronatus* and 2 *T. sordida*). Moreover, no hybridization was observed with these probes in 8 *E. mucronatus* and 1 *T. sordida* samples that showed an amplified band by PCR. These data indicated that *T. cruzi* clones, genetically unrelated to clones 20 and 39, also were circulating in this area. Based on these results, the 2 sylvatic triatomine species encountered in Apolo should not be overlooked as possible local vectors of *T. cruzi*.

**KEY WORDS** *Eratyrus mucronatus*, *Triatoma sordida*, sylvatic triatomines, domiciliation, *Trypanosoma cruzi* characterization, Bolivia

CHAGAS DISEASE is a significant cause of morbidity and mortality in Bolivia (WHO 1992). More than 3 million people live in endemic regions, and seropositivity indicative of infection reaches 75% in several areas (Pless et al. 1992). *Triatoma infestans* (Klug) is the main vector in Bolivia, although several sylvatic triatomine species have been reported to be infected with *Trypanosoma cruzi* (Lent and Wygodzinsky 1979, Bermudez and Balderama 1991). With the exception of the sylvatic focus of *T. infestans* described by Djardín et al. (1987) and the isolation of *T. cruzi* from sylvatic mammals as *Saimiri sciureus* (L.), *Didelphis marsupialis* (L.), and *Dasyppus novemcinctus* (L.) (D'Alessandro et al. 1986, Valette et al. 1988), little is known about the sylvatic cycle and vectors in Bolivia. Several sylvatic triatomines may become vectors of *T. cruzi* after *T. infestans* control is achieved or after artificial environmental change (WHO 1992, Lainson et al. 1979). Thus, a more thorough knowledge of the ecology of the sylvatic triatomine species and the *T. cruzi* strains infecting them is essential to assess the risk of transmission.

*Trypanosoma cruzi* is present in nature as natural clones as demonstrated by population genetic studies (Tibayrenc and Ayala 1988). Among the large number of *T. cruzi* clones, some major clones appear to be ubiquitous and are encountered frequently in endemic areas. Among these, clones 20 and 39 are dominant in Bolivia (Tibayrenc and Ayala 1988, Brenière et al. 1989).

The current research was undertaken in an isolated area of Bolivia where seropositivity for *T. cruzi* in humans was low and where uninfected adult stages of a sylvatic triatomine species (*Eratyrus mucronatus* Stål 1859) were found occasionally in houses (Valencia Telleria 1990). To provide baseline data in preparation for the National Control Program of Chagas Disease in Bolivia, our objective was to assess the risk of domestic transmission. Specifically, we evaluated the seroprevalence of *T. cruzi* in humans, investigated a possible trend toward domiciliary infestation by sylvatic triatomines, and determined their infection rate with *T. cruzi*.

## Materials and Methods

**Study Area.** Field work was carried out in the small town of Apolo (14° 44' S, 68° 30' W; population 4,000), department of La Paz, Bolivia, which is situated ≈200 km northwest of La Paz in the subandean region of the eastern Cordillera. The

<sup>1</sup> Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, Casilla 9214, La Paz, Bolivia.

<sup>2</sup> UMR CNRS/ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex, France.

<sup>3</sup> Instituto Boliviano de Biología de Altura, Casilla 641, La Paz, Bolivia.

elevation is 1,430 m, and the climate is subtropical with a mean annual temperature of 21°C and mean annual precipitation between 1,200 and 1,400 mm. The dwellings of Apolo are mainly of mud and wattle construction or made of unplastered adobe bricks. Houses are roofed with zinc sheets or straw. The walls surrounding the houses are made of adobe covered by straw. The town is situated on an isolated plain, is not accessible by major roads, and has not experienced substantial human migrations. The plain is covered by shrub savannah interspersed with a few patches of forest. A serological survey conducted in 1990 by Valencia Telleria (1990) found that 3.6% of the population was positive for *T. cruzi* infection, but cases were not questioned about previous residency in endemic areas.

**Serology.** In March 1993, blood from 390 residents of Apolo was collected by fingerprick on Whatman No. 3 filter paper. Overall, 53.6% (209) of the subjects were <18 yr old. Blood samples were air dried, stored in a desiccator, and tested for antibodies to *T. cruzi* using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) described by Brenière et al. (1984). For comparison, 45 blood samples were analyzed from soldiers residing in the Apolo military base. Many of these soldiers originally were residents of endemic areas in Bolivia.

**Triatomine Studies.** Triatomines were collected inside houses and in peridomestic structures during October 1992 and March 1993. Bugs were placed in plastic bottles containing filter paper and transported to the laboratory in La Paz for morphological identification according to Lent and Wygodzinsky (1979). Feces were obtained by gently squeezing the live insects. The feces were mixed with phosphate buffered saline and examined for the presence of flagellates. Feces aliquots obtained from the same triatomines were stored at -20°C for later polymerase chain reaction (PCR) amplification. The intestinal tract of some insects was placed in NNN medium in an attempt to cultivate *T. cruzi*.

**Polymerase Chain Reaction Analysis of Feces and *T. cruzi* Clones Characterization.** Infection of the triatomine bugs was determined by PCR amplification of the hypervariable regions of kinetoplast DNA minicircles (HVRm) of *T. cruzi* from triatomine bug feces according to Brenière et al. (1992). Specific clones were identified by subsequent hybridization using probes specific for *T. cruzi* clones (Veas et al. 1991, Brenière et al. 1992).

Samples of triatomine feces (10–20 µl) were collected individually in sterile microtubes and stored at -20°C. The forceps and gloves were rinsed with disinfectant (bleach) between each sample. This procedure was performed in a room free of *T. cruzi* manipulation. Samples were diluted in 200 µl of distilled water, boiled for 10 min, and centrifuged twice at 8,000 × g for 10 min. Ten microliters of the supernatant was used as a template in the PCR assay. Each protocol always included 1 positive

control using total DNA as a template (DNA from a reference *T. cruzi* strain) and 2 negative controls using water, the 1st before addition of the sample and the 2nd treated the same way as the feces. The water template treated the same way as the feces was the best contamination control because it was free of possible DNA polymerase inhibiting factors. To avoid contamination, the successive steps of the amplification procedure were performed in 3 different places: the 1st one, free of *T. cruzi* manipulation, was used for repartition of amplification products and addition of *Taq* polymerase; the 2nd place, also free of *T. cruzi* manipulation, was used for the addition of the different samples to each tube; and the 3rd place was the PCR products electrophoresis laboratory. Moreover, each protocol included <10 fecal samples at the same time. Protocols with incorrect controls were discarded. The repartition of PCR reagents (buffer, primers, oligonucleotides, water, and mineral oil) was done in 30–40 sterile microtubes, and 1 tube was run previously with water template to control the amplification products. As a final PCR control, we assayed feces from known negative bugs reared in laboratory and always fed on chickens (7 *E. mucronatus* and 18 *T. sordida* Stål 1859).

Following PCR, one-tenth of the sample was loaded onto 0.8% agarose gel, separated by electrophoresis, and stained with ethidium bromide. Clone-specific identification of PCR-positive samples was performed using probes specific for major clones 20 and 39 derived from SO34 c14 and TPK1 stocks, respectively (Tibayrenc and Ayala 1988, Brenière et al. 1992).

## Results

None of 390 sera from people living in Apolo had antibodies to *T. cruzi* when tested by ELISA. However, 7 of 45 soldiers living in the military base 2 km from the town were seropositive. All of the men testing positive previously had spent several years in an area endemic for Chagas disease.

In total, 209 triatomines were captured in 11 houses and 25 peridomestic structures (chicken-coops and adobe walls surrounding houses). *E. mucronatus* was the dominant species both in domestic (84.1% of total bugs) and in peridomestic habitats (64.5%). This was the only species found in 9 houses. In 2 other houses, it was associated with *T. sordida*, the only other species collected in Apolo. In peridomestic structures, *E. mucronatus* was collected alone on 17 occasions, *T. sordida* alone on 2, and both species together on 6 occasions. Details of the infestation of the domestic habitat and peridomestic structures by *E. mucronatus* and *T. sordida* and the instar distribution are presented in Table 1. *E. mucronatus* immatures were found colonizing 4 houses, and *T. sordida* immatures in 2 houses. In 7 houses, only *E. mucronatus* adult stages were discovered.

Table 1. Age structure of triatomine bugs in domestic and peridomestic habitats at Apolo, Bolivia

Collection sites	<i>E. mucronatus</i>					<i>T. sordida</i>				
	No. positive sites	Nymph		Adult		No. positive sites	Nymph		Adult	
		Instars 1-4	Instar 5	M	F		Instars 1-4	Instar 5	M	F
Domestic habitats	11	10	14	21	29	2	4	4	3	3
Peridomestic structures	23	15	14	29	20	8	16	8	7	12
Total	34	25	28	50	49	10	20	12	10	15

Feces from 68 *E. mucronatus* and 24 *T. sordida* were examined microscopically for flagellates with negative results. Intestinal tracts from 30 bugs (20 from *E. mucronatus* and 10 from *T. sordida*) were suspended in NNN medium in an attempt to culture Trypanosomatidae. Flagellated parasites were not observed after 12 wk, and the cultures were discarded.

Fecal samples derived from the same 68 *E. mucronatus* and 24 *T. sordida* also were tested by the PCR procedure. Agarose gel electrophoretic analysis of PCR products detected 16 positive specimens, as determined by visualization of a band at 270 bp after staining the gels with ethidium bromide (Table 2; Fig. 1A). Overall, 13 (19.1%) *E. mucronatus* and 3 (12.5%) *T. sordida* were positive by PCR. Among the 30 fecal samples culture negative, 2 were PCR positive. The 25 fecal control samples from laboratory reared triatomines were PCR negative.

To assess whether or not these vectors were infected with the major clones circulating in Bolivia, the 16 PCR-positive samples were hybridized with clone-specific probes (Table 2). This procedure identified clone 20 (or a genetically related clone) in 3 *E. mucronatus* and in 2 *T. sordida* samples (Fig. 1B). Clone 39 (or a genetically related clone) was identified in 4 *E. mucronatus* and in 1 *T. sordida* samples (Fig. 1C). In 3 triatomine bugs (2 *E. mucronatus* and 1 *T. sordida*), a mixed infection with both clones 20 and 39 was detected. No hybridization was observed with either probe in 8 *E. mucronatus* and 1 *T. sordida* samples, all of which were positive by the PCR analysis. These triatomines presumably were infected by clones whose taxonomic status remains to be determined.

### Discussion

Both *E. mucronatus* and *T. sordida* were captured from houses and peridomestic structures in

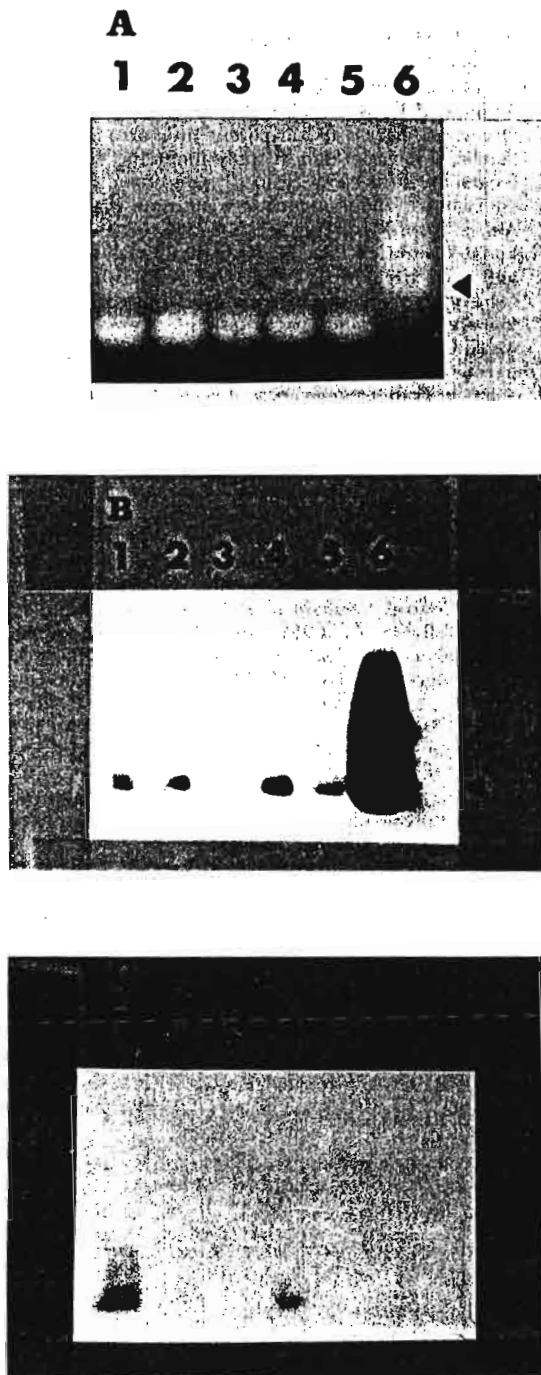
Table 2. Characterization of *T. cruzi* clones in the feces of triatomine bugs from Apolo, Bolivia, using a PCR method

Triatomine species	Bugs examined	PCR + (%)	Hybridization pattern		
			Clone 20	Clone 39	Clone 20 and 39
<i>mucronatus</i>	68	13 (19.1)	1	2	2
<i>sordida</i>	24	3 (12.5)	1	0	1

Apolo. Until now very few *E. mucronatus* have been found inside human habitations in Peru and Bolivia (Torrico 1946, Lent and Wygodzinsky 1979). This species has been reported to be naturally infected by *T. cruzi*, and also was collected outside houses in urban and rural areas, particularly in hollow trees where they feed on porcupines and bats (Lumbreras 1960, D'Alessandro et al. 1971, Lent and Wygodzinsky 1979, Miles et al. 1981).

An entomological survey previously carried out at Apolo in 1990 collected only the adult stages of *E. mucronatus* in 45% of houses and in peridomestic structures (Valencia Telleria 1990). Our finding of nymphs in some houses may represent recent colonization by adult specimens attracted by electric lights. In addition the presence of nymphs in the adobe walls surrounding the property of infested houses indicated the possibility that peridomestic structures also may be refugia for domestic colonization. Nevertheless, we cannot exclude the introduction of *E. mucronatus* by straw or wattle used as construction material. However, these data demonstrate, for the 1st time, a trend toward domesticity by *E. mucronatus*. In contrast to *E. mucronatus*, *T. sordida* is a known sylvatic and peridomestic species that has become domiciliated in several areas (WHO 1992). The destruction of the natural habitats has forced this species to colonize domestic and peridomestic habitats. The absence of *T. sordida* during the 1990 survey and the finding of nymphs in our study supports the recent colonization of household environments by this species, considered 1 of the vectors of epidemiological significance in South America (WHO 1992). In addition, the absence of infected humans in Apolo supported our hypothesis of very recent domiciliation.

The PCR technique performed on fecal samples from *T. sordida* and *E. mucronatus* detected the presence of *T. cruzi* DNA in 16 insects, all of which were negative by microscopic examination. Contamination by previous amplification products, the main problem of the PCR technique, was disregarded based on the following arguments: (1) negative and positive controls were satisfactory, (2) fecal samples from triatomines reared in laboratory were PCR negative, (3) the majority of positive samples (11/16) gave weak bands but several (5/16) gave distinct ones (generally contamination



**Fig. 1.** (A) Ethidium bromide-stained 0.8% agarose gel containing PCR products from *T. sordida* (lanes 1 and 3) and *E. mucronatus* (lanes 2, 4, and 5) fecal samples; all 5 samples are positive. Lane 6 contains positive control (100 ng of total DNA from reference *T. cruzi* stock corresponding to natural clone 20). Arrow, major amplified band of 270 bp. (B and C) Hybridization patterns of PCR products with probes corresponding to natural clones 20 and 39; (B) positive hybridization patterns with clone 20 in lanes 1, 2, 4, 5, and 6; (C) positive hybridization patterns with clone 39 in lanes 1 and 4. Arrow, major amplified band of 270 bp.

gives weak bands), and (4) hybridization patterns indicated a heterogeneity of *T. cruzi* clones (among 16 amplified products, only 7 were recognized by probes 20 or 39).

In agreement with Shikanai-Yasuda et al. (1993), the enhanced sensitivity of PCR may explain the discrepancy between microscopic examination and PCR results. Our PCR results indicated the potential vectoral role of triatomines in our sample. The PCR technique detects only *T. cruzi* DNA, without information on whether or not the vector is carrying infectious forms of parasite. The discrepancy between microscopy and PCR supports the hypothesis of relatively poor rectal metacyclogenesis by both triatomine species.

Previous work has shown that the HVRm of the *T. cruzi* kinetoplast DNA exhibits sequences that are specific for the natural clones identified by multilocus isozyme analysis (Veas et al. 1991). This has led to the development of DNA probes for 2 *T. cruzi* major clones circulating in Bolivia: natural clones 20 and 39 (Tibayrenc and Ayala 1988). Using these 2 DNA probes, the presence of *T. cruzi* clones 20 and 39 (or genetically related ones) was observed in 7 sylvatic triatomine bugs. The domestic or sylvatic origin of these clones remains unresolved.

Both *T. sordida* and *E. mucronatus* have adapted to domestic habitat in Apolo. The phenomenon of domiciliation probably is still in progress, because Valencia Telleria (1990) detected only *E. mucronatus* adults in human dwellings. The suspicion of *T. cruzi* major clones in any triatomine bug indicates the risk of transmission. As the area is still apparently free of human *T. cruzi* infection, several ecological, biological, and behavioral parameters of these 2 triatomine species require further investigation.

#### Acknowledgments

The advices of C. J. Schofield and J. P. Dujardin were greatly appreciated. We are deeply grateful to Dolly Garvizu for technical assistance in the field and to Patricia Dorn for invaluable help in correction of the manuscript. This study received financial support from the United Nations Development Programme/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (grant 940209) and from the French Ministry of Research and Technology (grant 91L0743).

#### References Cited

- Bermudez, H. and F. Balderrama. 1991. Triatomines de Bolivia: lista actualizada, distribución geográfica y clave pictórica de tribus, géneros y especies de triatomines de Bolivia. Ministerio de Prevención Social y Salud Pública, La Paz, Bolivia.
- Brenière, S. F., R. Carrasco, H. Miguez, J. L. Lemesre, and Y. Carlier. 1984. Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas' disease in Bolivian patients. *Trop. Geog. Med.* 37: 231-238.
- Brenière, S. F., R. Carrasco, S. Revollo, G. Aparicio, P. Desjeux, and M. Tibayrenc. 1989. Chagas' dis-

- ease in Bolivia: clinical and epidemiological features; zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* stocks isolated from patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41: 521-529.
- Brenière, S. F., M. F. Bosseno, S. Revollo, M. T. Rivera, Y. Carlier, and M. Tibayrenc. 1992. Direct identification of *T. cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 335-341.
- D'Alessandro, A., P. Barreto, and R.C.A. Duarte. 1971. Distribution of triatomine-transmitted trypanosomiasis in Colombia and new records of the bugs and infections. *J. Med. Entomol.* 8: 159-172.
- D'Alessandro, A., M. Eberhard, O. De Hincapié, and S. Halstead. 1986. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in *Saimiri sciureus* from Bolivia and *Saimiri mistax* from Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 285-289.
- Dujardin, J. P., M. Tibayrenc, E. Venegas, L. Maldonado, P. Desjeux, and F. J. Ayala. 1987. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol.* 24: 40-45.
- Lainson, R., J. J. Shaw, H. Fraiha, M. A. Miles, and C. C. Draper. 1979. Chagas' disease in the Amazon basin: I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the state of Para, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 193-204.
- Lent, H. and P. Wygodzinsky. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163: 125-520.
- Lumbreras, H. 1960. Über das vorkommen der Reduviiden *Eratyrus mucronatus* Stål, 1859, und *Rhodnius ecuadoriense* Lent & Leon, 1858, in Peru und eine erneute beschreibung dieser arten. *Tropenmed. Parasitol.* 11: 213-222.
- Miles, M. A., A. A. de Souza, and M. Povoá. 1981. Chagas' disease in the Amazon basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belém, Para State, Brazil. *J. Med. Entomol.* 18: 266-278.
- Pless, M., D. Juranek, P. Kosarsky, F. Steurer, G. Tapia, and H. Bermudez. 1992. The epidemiology of Chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroreactivity to *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnosis, and domiciliary triatomine distribution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 539-546.
- Shikanai-Yasuda, M. A., D. E. Ochs, J. E. Tolezano, and L. V. Kirchhoff. 1993. Use of PCR for detecting *Trypanosoma cruzi* in reduviid bugs fed on patients with chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.* 88: 260 (suppl.).
- Tibayrenc, M. and F. J. Ayala. 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.
- Tibayrenc, M. and S. F. Brenière. 1988. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.* 83: 249-255.
- Torrico, R. A. 1946. Hallazgo de *Eratyrus mucronatus*, infestación natural de "vinchucas" de cerro y *Eutriatoma sordida* en Cochabamba. *Anales del Laboratorio Central, Cochabamba, Bolivia* 1: 19-23.
- Valencia Telleria, A. 1990. Investigación epidemiológica nacional de la enfermedad de Chagas. Ministerio de Prevención Social y Salud Pública, La Paz, Bolivia.
- Valette, E., S. F. Brenière, F. Le Pont, and P. Desjeux. 1988. Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild mammals in Bolivia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.* 83: 139-140.
- Vens, F., G. Cuny, S. F. Brenière, and M. Tibayrenc. 1991. Subspecific kDNA probes for major clones of *T. cruzi*. *Acta Trop.* 48: 79-82.
- WHO. 1992. Control of Chagas disease. *Tech. Rep. Ser.* 811: 95.

Received for publication 16 May 1994; accepted 6 March 1995.

## CARTAS AL COMITE DE REDACCION

### **Reacción de polimerasa en cadena: detección y caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi* en niños chagásicos**

A través de un estudio de niños hospitalizados por diversas patologías en el hospital Materno Infantil Germán Urquidi de la ciudad de Cochabamba, zona altamente endémica para la enfermedad de Chagas<sup>4</sup>, se efectuó una detección sistemática de la infección por *Trypanosoma cruzi*, comparando los tests de diagnóstico clásicos (parasitológicos y serológicos) con la técnica de polimerización en cadena (PCR).

Así, con sondas de DNA, se detectó la presencia de cepas de *T. cruzi*, correspondientes a dos clones mayores circulando en Bolivia en el ciclo doméstico y se evaluó el número de infecciones dobles.

Al mismo tiempo, se obtuvieron los datos clínicos de cada uno de los pacientes en estudio para correlacionarlos con la infección por *T. cruzi*.

El estudio incluyó 31 niños, los que según los exámenes clásicos de detección fueron divididos en 3 grupos. El primero estuvo constituido por 12 niños que presentaban una parasitemia positiva, puesta en evidencia mediante la búsqueda de parásitos móviles observados en la interfase de al menos uno de cuatro tubos capilares heparinizados y centrifugados a 9000 rpm durante 5 minutos; en 8 de estos casos la parasitemia aparecía asociada a una serología específica anti-*T. cruzi* positiva (inmunofluorescencia y hemaglutinación indirecta). El segundo grupo estuvo constituido por 9 niños que presentaban una parasitemia negativa asociada a una serología anti-*T. cruzi* positiva y el tercero por 10 niños con parasitemia y serología negativas.

La técnica de PCR fue realizada en muestras de sangre (interfases correspondientes a 5 ml de sangre total) según una metodología previamente descrita<sup>2</sup>, introduciéndose en cada protocolo los controles adecuados. Se utilizaron iniciadores que circundaban las partes hipervariables de los minicírculos del kDNA (HVRm) para amplificar estas secuencias de tamaño específico de *T. cruzi* (270 pb)<sup>6</sup>. Tras «southern blot» se procedió a la hibridización de los productos de amplificación con dos sondas de kDNA. Estas sondas fueron elaboradas a partir de la HVRm de dos cepas de referencia correspondientes a dos clones mayores circulantes en Bolivia, numerados 20 y

39<sup>5, 6</sup>, estas sondas son además específicas de cada clon y no generan ninguna reacción cruzada entre ellas. Se realizó la hibridización con marcado no radioactivo, utilizándose el ECL como sistema de detección de genes<sup>1</sup>. El conjunto de los resultados aparece en la tabla 1.

Según se resume en la tabla 1, el grupo 1, constituido por 12 pacientes en la fase aguda de la enfermedad, presentaba 83% de positividad en PCR; en el grupo 2, para el cual los tests parasitológicos de los 9 pacientes eran negativos, se detectó 63% de positividad en PCR; dos casos del tercer grupo presentaron un test PCR positivo, pudiendo corresponder a pacientes en fase inicial de la infección, en la que la parasitemia es todavía escasa y la respuesta inmune (IgG) todavía no se ha desarrollado.

Estos resultados demuestran una mayor sensibilidad de la PCR como examen parasitológico de la enfermedad de Chagas. Aproximadamente 60% de los pacientes estudiados fueron positivos por PCR mientras que el examen directo de la interfase de los tubos capilares reveló solamente 32% de positividad. En cambio, la búsqueda de parásitos circulantes por medio de observación microscópica directa resultó poco sensible, ya que los casos positivos evidenciaron generalmente muy pocos parásitos, además de requerir un observador muy experimentado.

Al analizar las causas clínicas de admisión de los pacientes no se observó ninguna diferencia significativa entre el número de pacientes hospitalizados por diarrea, deshidratación y desnutrición entre los tres grupos. El análisis clínico detectó un síndrome digestivo en 64,5% de los pacientes, un síndrome pulmonar en 22,6%, 2 casos de tuberculosis, 2 casos de meningitis y 4 casos diversos. Ninguno de estos síndromes fue más frecuente en un grupo particular. Por otro lado, ningún diagnóstico clínico de internación permitió sospechar una infección chagásica en estos pacientes.

La metodología de PCR presentada en este trabajo permite, gracias a la especificidad de las HVRm para cada clon o grupo de clones genéticamente relacionados, caracterizar directamente en la sangre las cepas circulantes. Este método evita las etapas de aislamiento y cultivo masivo de cepas que dan lugar a selección de cepas en caso de infecciones mixtas<sup>3</sup>. Los resultados confirman la alta frecuencia de los clones 20

TABLA 1.— Presencia de los clones 20 y 39\* de *Trypanosoma cruzi* en niños chagásicos

Grupos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Nº de niños	12	9	10	31
Edad media (meses)	14,3 ± 7,8	28,2 ± 21,0	15 ± 17,0	18,2 ± 16,7
Parasitemia (%)	100	0	0	
Anticuerpos (%)	66,6	100	0	
PCR positiva (%)	83,3	66,6	20,0	58,0
clones de <i>T. cruzi</i>				
clon 20	3	0	0	3
clon 39	3	2	2	7
clones 20 + 39	1	3	0	4
otro clon**	1	0	0	1

\* ver clasificación según Tibayrenc y Ayala

\*\* la ausencia de reconocimiento de los productos de amplificación por las sondas específicas de los clones 20 y 39 marca la presencia de un otro clon de *T. cruzi*.

y 39 en Bolivia. Para un solo paciente, los productos de amplificación (270 pb) no fueron hibridados por una de las dos sondas 20 y 39; este paciente podría ser infectado por una cepa de *T. cruzi* no perteneciente al clon 20 ni al clon 39. Observamos casos de infecciones mixtas por el reconocimiento de los productos de amplificación por las dos sondas. El porcentaje de infecciones mixtas parece significativamente más importante en el grupo 2 (3/5 casos) que en los pacientes en fase inicial de la enfermedad que incluye todos los pacientes del grupo 1 y los dos pacientes del grupo 3 con PCR positiva (1/10 casos), ( $\chi^2 = 4,24$   $p < 0.05$ ). Esta diferencia de tasas de infecciones mixtas podría ser explicada por reinfecciones; si así fuera, se admitiría una ausencia de premunición a la reinfección.

Resultados de estudios anteriores realizados en 9 localidades del departamento de Cochabamba nos permitieron observar un promedio de 52,3% de infecciones dobles con los clones 20 y 39 en el vector doméstico (*Triatoma infestans*); en ninguna localidad fue encontrado un porcentaje inferior a 28,6% (comunicación personal por S.F. Brenière y M.F. Bosseno). El 10% de infecciones dobles encontrados en este trabajo en los pacientes en fase inicial (grupo 1 y los dos casos del grupo 3), sería más bajo de lo esperado en caso de transmisión de los parásitos en ausencia de selección. Este resultado dejar suponer que (i) solamente un número sumamente re-

ducido de parásitos podría iniciar una infección o (ii) que tendría lugar una selección de clones de *T. cruzi*.

La metodología presentada en este trabajo para la caracterización directa de cepas de *T. cruzi* en los huéspedes abre hipótesis de trabajo en cuanto a la transmisión de este parásito y merece una ampliación con mayor muestreo. Por otro lado, la introducción del nuevo método de PCR, muy sensible para la detección de los parásitos en niños, podría en consecuencia ayudar a estudios pre y post tratamiento.

Marie F. Bosseno, Faustino Torrico, Jenny Telleria, François Noireau, Simone F. Brenière

ORSTOM, Institut Français de Recherche pour le Développement en Coopération, CP 9214, La Paz, Bolivia

1. Brenière SF, Bosseno MF, Barnabé C, Urdaneta Morales S, Tibayrenc M. Copy number differences in the 195 bp repeated satellite DNA from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: potential use for epidemiologic survey. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1993; 88: 163-5.
2. Brenière SF, Bosseno MF, Revollo S, Rivera MT, Carlier Y, Tibayrenc M. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 36: 335-41.
3. Miles MA, Cibulskis RE. Zymodeme characterization

- of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 1986; 2: 94-8.
4. Pless M, Juraneck D, Kosarsky P, Steurev F, Tapia G, Bermúdez H. The epidemiology of chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroactivity to *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnosis and domiciliary triatomine distribution. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 539-46.
  5. Tibayrenc M, Ayala FJ. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 1988; 42: 277-92.
  6. Veas F, Brenière SF, Cuny G, Brengues C, Solari A, Tibayrenc M. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by Polymerase Chain Reaction. *Cell Mol Biol* 1991; 37: 73-84.

### Diagnóstico molecular de la enfermedad de Gaucher en pacientes argentinos

Las patologías por atesoramiento lisosomal son entidades genéticas caracterizadas por la acumulación intralisosomal de material no degradado (glicosaminoglicanos, esfingilípidos, glucógeno, lípidos neutros, mucolípidos, glicoproteínas) debido a un defecto de una hidrolasa específica o bien acumulación de productos degradados (ácido siálico, cisteína) que no pueden ser excluidos de la organela. La Enfermedad de Gaucher es la de mayor prevalencia del creciente número de las patologías por atesoramiento lisosomal y ella se refiere a los heterogéneos signos y síntomas encontrados en pacientes con severa deficiencia de la glucocerebrosidasa o  $\beta$ -glucosidasa ácida que conlleva a la acumulación de gluco-silceramida en monocitos y macrófagos (células de Gaucher) causante de manifestaciones en bazo, hígado, médula ósea y otros órganos viscerales. Esto se traduce frecuentemente en anemia, trombocitopenia y severo compromiso esquelético. Un progresivo deterioro neurológico ocurre en una minoridad de los pacientes. Aunque más frecuente en algunas etnias como la Norrboltnian al norte de Suecia (Enfermedad de Gaucher Tipo III) o entre judíos de origen Ashkenazi (Enfermedad de Gaucher Tipo I), la enfermedad puede afectar cualquier raza<sup>1</sup>. Estudios de familias afectadas han permitido determinar la transmisión autosómica recesiva, lo que implica que el fenotipo clásico se expresará úni-

camente cuando ambos cromosomas de un par tengan los correspondientes alelos mutados. Más de treinta mutaciones diferentes en el gen de la glucocerebrosidasa (cromosoma 1q21) pueden ocasionar esta alteración genética. Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen la propuesta más ampliamente utilizada para el diagnóstico molecular de mutaciones asociadas con la Enfermedad de Gaucher<sup>2</sup>.

Una situación inédita en la historia de las patologías por atesoramiento lisosomal y que marca uno de los hitos más trascendentes en la denominada era de la bioterapéutica, es la disponibilidad del reemplazo de la glucocerebrosidasa en la Enfermedad de Gaucher. La identificación de las enzimas lisosomales como glicoproteínas, el descubrimiento de que los macrófagos tienen en su superficie receptores de alta afinidad para glicoproteínas con manosa terminales y la captación de glucocerebrosidasa por las células hepáticas<sup>3</sup>, permitieron básicamente, la aplicación exitosa en la Enfermedad de Gaucher (Tipo I) de la denominada «alglucerasa» (Ceredase (R) Genzyme Co. Cambridge, MA, USA),  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana obtenida de placenta y modificada en las cadenas oligosacáridos que conduce a la exposición de residuos manosa a los receptores de macrófagos.

Lo que antecede, lleva al médico tratante de pacientes con Enfermedad de Gaucher a enfrentarse con los siguientes aspectos no definitivamente resueltos: a) si bien el diagnóstico definitivo se efectúa mediante ensayo enzimático en leucocitos o fibroblastos, el nivel de la actividad determinada "in vitro" no se correlaciona con la gran complejidad de la heterogeneidad clínica; b) este ensayo enzimático, igual que la biopsia de médula ósea, no es útil para la detección de portadores ya que un 20% de los heterocigotas obligados no se logran diferenciar de los niveles de actividad enzimática normal; y c) importantes progresos ya se consiguieron en usar prácticamente, el valor predictivo del genotipo en relación con el estado de la enfermedad, si bien los criterios no están aún totalmente establecidos<sup>5</sup>.

La caracterización de alelos mutantes de Enfermedad de Gaucher no ha sido descrita en la Argentina. Nosotros comunicamos aquí los resultados del análisis molecular que efectuamos a homocigotas enfermas y heterocigotas obligadas

## FIELD APPLICATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION DIAGNOSIS AND STRAIN TYPING OF *TRYPANOSOMA CRUZI* IN BOLIVIAN TRIATOMINES

S. F. BRENIERE, M. F. BOSSENO, J. TELLERIA, R. CARRASCO,  
F. VARGAS, N. YAKSIC, AND F. NOIREAU

Unite Mixte de Recherche CNRS/ORSTOM, Genetique Moleculaire des Parasites et des Vecteurs,  
ORSTOM, Montpellier, France; ORSTOM, Institut Francais de Recherche pour le Developpement en  
Cooperation, La Paz, Bolivia; Facultad de Bioquimica-Farmacologia e Instituto Boliviano de Biologia  
de Altura, Universidad Mayor de San Andres, La Paz, Bolivia

**Abstract.** A new approach for direct identification and characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks in biological samples was tested for field applicability on an extensive sample of feces collected from triatomine vectors from four different species found in Bolivia. The first step of the technique is polymerase chain reaction (PCR) amplification of the hypervariable region of kinetoplast DNA minicircles of *T. cruzi* parasites. In this report, 345 fecal samples were analyzed and the PCR results were compared with microscopic examination. For *Triatoma infestans*, the principal Bolivian vector, both techniques were in concordance 85.3% of the time. For the three other species, *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus*, and *Triatoma sordida*, the fecal samples were all negative by microscopic examination whereas PCR results showed several *T. cruzi*-infected insects in each species. The second step of the procedure is the characterization of the *T. cruzi* clones by means of hybridization of the PCR products with clone-specific probes generated by the PCR. We used two probes corresponding to major clones circulating in high frequency in Bolivia (as shown by previous population genetic studies using isoenzyme characterization). We obtained four primary results: 1) we confirm the importance of two major clones in Bolivia in two distinct regions; 2) we report high rates of mixed infections (multiple clones in a single vector) in *Triatoma infestans*, up to 22% and 35% in Cochabamba and La Paz departments, respectively; 3) the results favor the absence of interaction between different clones; and 4) we find, for the first time, evidence of the major clones circulating in three species of triatomines that are known as mainly sylvatic species. The origin of these clones, sylvatic or domestic, is also discussed.

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, is present as numerous natural clones as evidenced by population genetic studies; these natural clones appear to be evolving with time and dispersing over geographic locations without genetic exchange between organisms, thus maintaining genetically similar populations.<sup>1</sup> Some natural clones are ubiquitous and are the ones most frequently isolated from domestic vectors and from humans; these have been designated as major clones.<sup>2</sup> Until recently, the characterization of the different clones of *T. cruzi* has been performed by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) after isolation and massive culture of the parasite to obtain sufficient quantities for this analysis. The process of culturing clearly selects for particular clones and may reduce an initial isolate that is composed of several clones to a single clone.<sup>3</sup> Even by MLEE analysis, infection of an individual vector with multiple clones is found in approximately 10% of the cases, as has been previously demonstrated by the visualization of double isoenzyme patterns.<sup>4</sup> This percentage is probably an underestimate because of the necessity of first culturing the parasites.

We and other investigators have recently described a new technique for direct identification of *T. cruzi* stocks in the feces of triatomine vectors and in mammalian blood based on polymerase chain reaction (PCR) amplification of a portion of the minicircle of kinetoplast DNA (kDNA).<sup>5-7</sup> Moreover, we have demonstrated the clone specificity of the hypervariable region of the kDNA minicircle (HVRm) based on a population genetics approach.<sup>6</sup> This result makes possible the development of clone-specific DNA probes that may be used for direct genetic characterization of the natural clones found in the various hosts.<sup>7</sup> In this paper, we report

the construction of two probes by the PCR that correspond to two major clones of *T. cruzi* circulating in Bolivia.<sup>6</sup> We hybridized these probes to PCR-amplified kDNA from field samples of triatomine feces to determine the clone infecting each vector, and we assessed the field applicability of this technique by testing a large number of samples from different Bolivian triatomines species, both domestic and sylvatic.

### MATERIALS AND METHODS

**Vectors.** The triatomines tested include four different species found in Bolivia: *Triatoma infestans*, *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus*, and *Triatoma sordida*. *Triatoma infestans* is a domestic vector whereas the remaining are usually considered sylvatic vectors. The different specimens were captured in the field at different locations (see Table 1 for numbers and collection sites). Moreover, we used as negative controls 28 laboratory-reared, noninfected insects (*Triatoma infestans*).

**Microscopic observation.** The microscopic observation was considered positive if flagellated parasites were observed in the feces of a triatome specimen during a 5-min examination of a drop of feces mixed with phosphate-buffered saline at a 400 × magnification.

**Processing of triatomine feces for the PCR.** Feces samples were prepared by the addition of distilled water, followed by boiling and centrifugation. Briefly, 10-20 µl of triatomine feces were individually collected in sterile Eppendorf (Hamburg, Germany) tubes using forceps and gloves rinsed in bleach between handling of each sample, and the samples were stored -20°C. The samples were collected in the entomologic room that was separate from the other room where the PCR procedure was undertaken. They

TABLE I  
Geographic origin and collection site of the vectors

Department	Province	Triatomine species*	No. of communities sampled	Collection sites	No. of triatomines analyzed
Cochabamba	Campero	<i>T. infestans</i>	1	Houses/chicken coop	6
	Capinota	<i>T. infestans</i>	6	Houses/chicken coop	34
La Paz	Nor Yungas	<i>T. infestans</i>	12	Houses/chicken coop	124
	Caranavi	<i>T. infestans</i>	1	Houses/chicken coop	53
	Sud Yungas	<i>R. pictipes</i>	1	Chicken coop	36
	Franz Tamayo	<i>E. mucronatus</i>	1	Houses/chicken coop	68
		<i>T. sordida</i>	1	Houses/chicken coop	24

\* *T.* = *triatoma*; *R.* = *Rhodnius*; *E.* = *Eratyris*.

were diluted by the addition of 200  $\mu$ l of distilled water. The parasites were lysed by boiling for 10 min followed by two 10-min centrifugation at 8,000  $\times$  g. As a control, one tube with water was subjected to the same treatment as the fecal samples (boiled and centrifuged). We believe that the water template is a good negative control because it is free of the possible presence of PCR inhibitors. Ten microliters of the supernatant was used as a template in each of the PCR assays. One-tenth of the PCR product was analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide.

**Polymerase chain reaction.** The PCR was performed according to a previously described method.<sup>7</sup> Briefly, the sequences of the oligonucleotide primers used were CV1: 5'-GATTGGGGTTGGAGTACTACTAT-3' and CV2: 5'-TTGAACGGCCCTCCGAAAAC-3' (chosen to amplify all *T. cruzi* isolates). They were obtained from the Genset Laboratory (Paris, France).<sup>6</sup> Two restriction sites (*Sca* I and *Sau* 96 I) were artificially introduced at the 3' end of each oligonucleotide and used for purification of the HVRm-amplified sequence away from the oligonucleotide primers that contain part of the conserved region of the minicircle. Samples were amplified in 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM mercaptoethanol, 0.01 mg/ml of bovine serum albumin, 75 pM of each deoxynucleotide triphosphate, and 75 pM of each oligonucleotide in a total reaction volume of 50  $\mu$ l. For the amplification, which was performed using a Trio thermoblock PCR device (Biometra, Gottingen, Germany), 2.5 U of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (Promega, Madison, WI) was used. The amplification involved three distinct steps: 1) an initiation step with DNA denaturation (95°C for 5 min), oligonucleotide primer annealing (48°C for 2 min), and elongation (72°C for 2 min); 2) an amplification step with 30 cycles (95°C for 5 sec, 48°C for 30 sec, and 72°C for 1 min), and 3) a cooling step (4°C for variable times). Each run include 1) one positive control of total DNA template and 2) two negative controls with water instead of DNA template, with one of them subjected to the same treatment as each feces sample as described above. A systematic aliquoting of the PCR components (buffer, primers, oligonucleotides, and water) was done in 30–40 sterile microtubes. Each aliquot was covered with 50  $\mu$ l of paraffin to prevent evaporation and was stored at -20°C until use. The absence of contamination in the aliquots was previously checked by a test using a water template.

**Sensitivity of detection.** The sensitivity was evaluated by

the addition of 10 fg to 20 pg of *T. cruzi* total DNA (reference strain) in the feces samples from different laboratory-reared *Triatoma infestans*.

**Southern blot.** One-tenth of each PCR-positive sample was subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose gel and transferred after alkali denaturation (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl, twice for 15 min) onto charged nylon membranes (Hybond N+; Amersham, Buckinghamshire, UK) by vacuum blotting. For the vacuum transfer, the gel was placed on a prewetted membrane, which consisted of filter paper backed with a piece of diaper. This sandwich was covered with plastic wrap and placed on a gel dryer (Bio-Rad, Richmond, CA) and vacuum was applied for 10 min without heat.

**Probes.** The two clone-specific probes (20 and 39) were purified from their respective HVRm DNA fragments produced by the PCR from Tpk1 (clone 39) and So34 c14 (clone 20) *T. cruzi* stocks.<sup>1,6,8</sup> Briefly, the PCR-amplified 270-basepair HVRm fragments from 10 runs were purified by electrophoresis on 0.8% preparative agarose gel (Sigma, St Louis, MO). The fragments were eluted by electroelution using a 422 electro-eluter devise (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions, precipitated with 0.2 M NaCl in 2.5 volume/volume (v/v) of pure ethanol, and resuspended in 100  $\mu$ l of Tris-EDTA buffer. The DNA was digested with the restriction endonucleases *Sau* 96 I and *Sca* I (Promega) to eliminate part of the oligonucleotide primers selected in the conserved region of the minicircle. After digestion, the DNA was precipitated with ethanol and resuspended in a volume of 100  $\mu$ l, as described above. The amount of DNA was quantitated by electrophoresis of sequenced dilutions. These probes have previously been shown to be highly specific for *T. cruzi* clones 20 and 39 and genetically closely related clones.<sup>6,7</sup>

**Labeling and hybridization conditions.** The probes were labeled and the filters were hybridized using the enhanced chemiluminescence gene detection system according to the manufacturer's recommendations (Amersham). Briefly, the membranes were incubated at 42°C in hybridization buffer (0.12 ml/cm<sup>2</sup>) for 15 min. At the same time, each of the purified probes was labeled for 10 min at 37°C. A total of 10 ng of labeled probe was added to the membranes per milliliter of hybridization buffer. Hybridization was performed at 42°C overnight in a rotary oven (Appligen, Illkirch, France). To remove nonspecific hybridization products, the membranes were washed twice under highly stringent conditions (6 M urea, 0.1 $\times$  SSC [1 $\times$  SSC = 0.15 M NaCl,

TABLE 2

Detection of parasites in feces: comparison of microscopic observation and the polymerase chain reaction (PCR) technique

Triatomine species*	No.	Microscopic results				Comparison of both techniques				
		+		-		% sensitivity†		% concordance‡	% discrepancy§	
		+	-	+	-	MOB	PCR		A	B
<i>T. infestans</i>	217	95	22	10	90	92.1	82.7	85.3	10.1	4.6
<i>E. mucronatus</i>	68	0	0	13	55	—	—	80.9	—	19.1
<i>T. sordida</i>	24	0	0	3	21	—	—	87.5	—	12.5
<i>R. pictipes</i>	36	0	0	19	17	—	—	47.2	—	52.8

\* *T.* = *Triatoma*; *E.* = *Eraryrus*; *R.* = *Rhodnius*.† The sensitivity of each technique was calculated by the following formula:  $ni/N$  with  $ni$  = positive by a particular technique and  $N$  = positive by either technique. MOB = microscopic observation.

‡ % concordance = % of samples positive or negative by both techniques.

§ % discrepancy A = % of samples positive by microscopy and negative by PCR; B = % of samples positive by PCR and negative by microscopy.

0.015 M sodium citrate] in 0.4% sodium dodecyl sulfate at 42°C for 20 min), and then twice in 2× SSC at room temperature for 10 min. Two exposures were performed (1 min and 30 min) on autoradiography film (Hyperfilm<sup>®</sup>-MP; Amersham).

## RESULTS

To test the field applicability and sensitivity of PCR-based diagnosis of *T. cruzi*, we analyzed 345 fecal samples from four triatomine species obtained from domestic and peridomestic habitats (Table 1) for the presence of parasites by direct microscopic observation and by PCR. The results are summarized in Table 2.

Among the 217 fecal samples recovered from *Triatoma infestans*, 117 showed flagellated parasites by microscopic observation, whereas only 105 showed an amplified band by PCR. The two techniques were in agreement 85.3% of the time. Discrepancy between the techniques occurred with two different patterns. The first showed a negative PCR result when the microscopic observation was positive; this pattern occurred in 10% of the insects examined. This rate of false-negative results was higher than expected. The second showed a positive PCR result when the microscopic observation was negative; this pattern occurred in 5% of the samples examined. Considering the sum of positive samples (positive by microscopic observation and/or positive by PCR), we compared the sensitivity of both techniques. Microscopic observation appears to be significantly more sensitive than the PCR technique (Yates'  $\chi^2 = 5.18$ ,  $P < 0.05$ ). We did not find significant differences in the sensitivity of the PCR technique between locales (La Paz and Cochabamba Departments). The 28 fecal samples from laboratory-reared *Triatoma infestans* were all PCR-negative as expected. Likewise, the sensitivity evaluated by the addition of *T. cruzi* total DNA to fecal samples of laboratory-reared *Triatoma infestans* insects always gave a positive amplification with 0.2 pg of DNA. On the other hand, the PCR was positive in only 30% of fecal samples artificially infected with either 10 or 100 fg of DNA. If one considers that a cell contains approximately 150–200 fg of DNA, the PCR method permitted the detection of one parasite in a feces sample. A discrepancy in the sensitivity of the PCR-based diagnosis was observed when comparing the results of studies of the 217 fecal samples recovered from the field with the fecal samples from artificially infected, laboratory-reared insects.

The relative sensitivities of the PCR and microscopic observations were reversed (higher) for the three sylvatic species compared with the results obtained with *Triatoma infestans*. All of the fecal samples collected from *R. pictipes*, *E. mucronatus*, and *Triatoma sordida* species were negative by microscopic observation. However, we obtained 52.8%, 19.1%, and 12.5% positive results, respectively, by the PCR.

We then proceeded to identify the particular clones present in the infected triatomines (Figure 1). A total of 136 PCR-positive samples were hybridized with probes specific for the two *T. cruzi* clones previously identified by isoenzyme analysis as major clones circulating in the domestic cycle in Bolivia (clones 20 and 39, see Materials and Methods). A large majority of the samples tested (77.9%) were recognized by one, or in the case of mixed infections, both probes (Table 3). Clones 20 and 39 were present in both domestic and sylvatic vectors. However, 30 samples (22.1%) were not recognized by either probe and the percentage of unrecognized samples was higher among sylvatic species of vectors (51.4%) than in domestic ones (11.9%) (Table 3).

We detected a much higher percentage of mixed infections in *Triatoma infestans*, up to 22.7% and 35.4% in Cochabamba and La Paz samples, respectively, (Table 4) than had been previously reported; 10% of the mixed infections were identified by isoenzyme analysis.<sup>4,9</sup> Mixed infections were also observed in *E. mucronatus* and *Triatoma sordida*. To determine whether or not infection with one clone affected the likelihood of infection with the other (inhibition or facilitation), we compared the observed rates of mixed infections with theoretical rates based on observed rates of infection of each clone in the population. The calculated numbers ( $N \times (\% 20 \times \% 39)$ , with  $N$  = total population number,  $\% 20$  = observed % of triatomines infected by clone 20 and  $\% 39$  = observed % of triatomines infected by clone 39) did not differ significantly from the observed rates when they were compared by Yates' modified chi-square test (Table 4).

## DISCUSSION

In this study, we have demonstrated the applicability of PCR-based diagnosis and strain typing for epidemiologic studies of *T. cruzi*. The first effort was to evaluate the sensitivity of the PCR technique. The level of sensitivity of the PCR reached 82.6% with samples from *Triatoma infestans*, a rate lower than expected considering the high theoretical sensitivity of the PCR. This may be explained by the lack

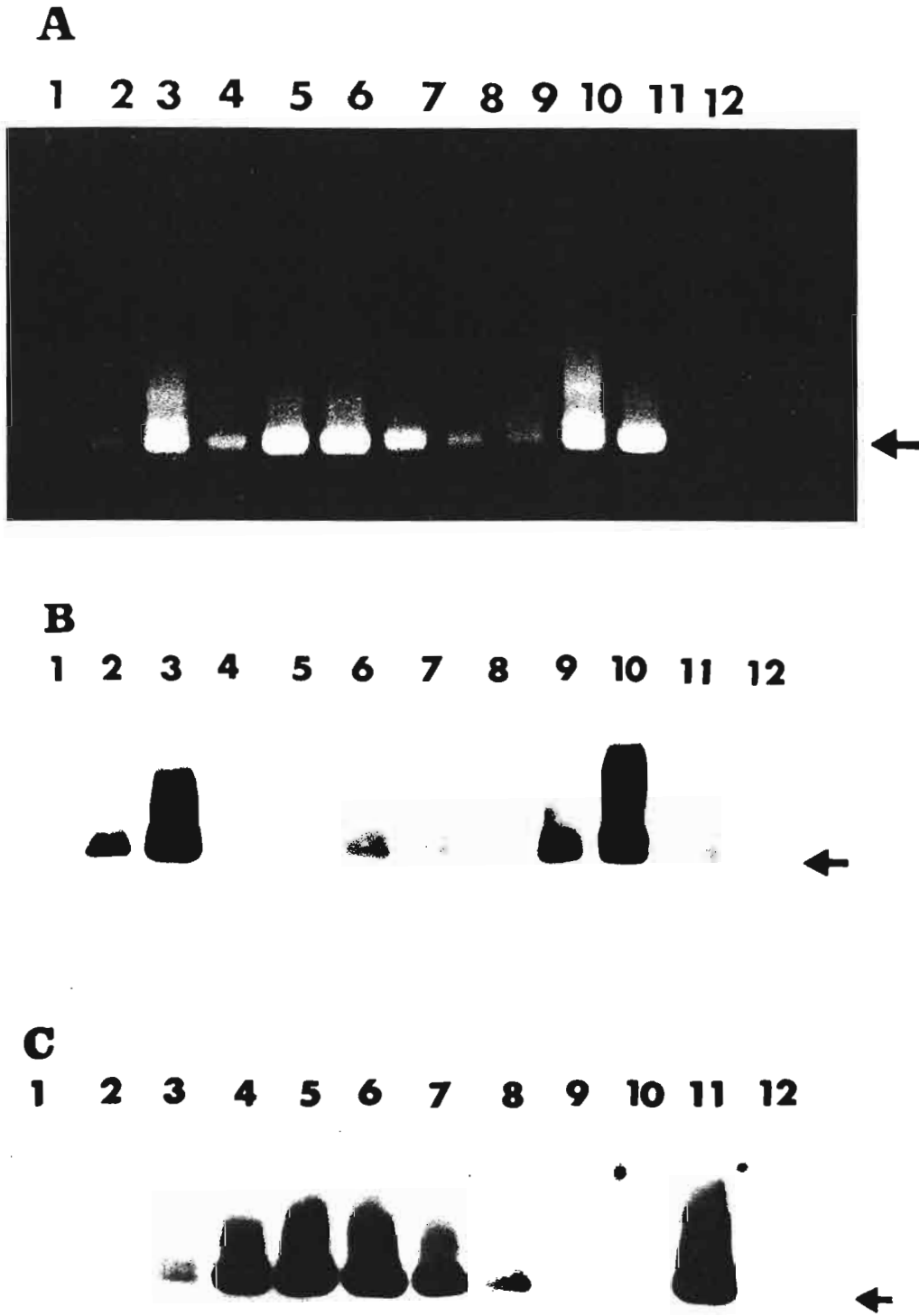


FIGURE 1. **A**, ethidium bromide-stained 0.8% agarose gel containing polymerase chain reaction products from *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans* feces. **B** and **C**, hybridization patterns of these products with clone-specific probes corresponding to natural clones 20 and 39, respectively. Lanes 1 and 12, control samples (using distilled water as the template); lanes 2–10, positive *Triatoma infestans* feces from Cochabamba Department; lane 11, positive control (using 10 ng of total DNA from the reference *T. cruzi* stock pertaining to natural clone 39 as the template). The arrows indicate the major amplified bands (270 basepairs).

TABLE 3

Identification of major clones 20 and 39 of *Trypanosoma cruzi* by specific DNA probes in polymerase chain reaction-amplified feces of vectors

Triatomine species*	Department	No.	Clone identification, no. (%)†			
			20 only	39 only	20 + 39	neither 20 nor 39
<i>T. infestans</i>	Cochabamba	22	15 (68.2)	0 (0)	5 (22.7)	2 (9.1)
	La Paz	79	24 (30.4)	17 (21.5)	28 (35.4)	10 (12.7)
Total		101	39 (38.6)	17 (16.8)	33 (32.7)	12 (11.9)
<i>E. mucronatus</i>	La Paz	13	1 (7.7)	2 (15.4)	2 (15.4)	8 (61.5)
<i>T. sordida</i>	La Paz	3	1 (-)	0 (-)	1 (-)	1 (-)
<i>R. pictipes</i>	La Paz	19	8 (42.1)	2 (10.5)	0 (0)	9 (47.4)
Total		35	10 (28.6)	4 (11.4)	3 (8.6)	18 (51.4)

\* *T.* = *Triatoma*; *E.* = *Eratyryrus*; *R.* = *Rhodnius*.

† - = not calculated (sample too small).

of DNA purification. In fact, we have chosen a very simple method of template preparation, involving just boiling the feces in water, to facilitate processing large numbers of samples and to avoid cross-contamination. This crude lysate may contain various factors that are inhibitory in the PCR. Some of these inhibitors include blood breakdown products, such as heme,<sup>10</sup> which may vary in quantity and quality, depending on the digestive status of blood present in the gut of individual bugs. It is worth noting that the relationship between the percentage positive by microscopic observation and the percentage negative by PCR-based diagnosis varies between localities and in some, the false-negative PCR responses are absent. However, we have observed 35.7% and 58.3% false-negative PCR samples in two localities. The estimated sensitivity of the PCR technique is approximately one parasite per sample. The presence of PCR inhibitors in bug feces may explain the failure to detect a single parasite in some samples. The PCR technique was able to identify *T. cruzi* in some samples that could not be identified by microscopic examination (4.6% for *Triatoma infestans*, 19.1% for *E. mucronatus*, 12.5% for *Triatoma sordida*, and 52.8% for *R. pictipes*). Most notably, the PCR detected *T. cruzi* in three sylvatic species that were not detected by microscopic examination. We believe that the discrepancy in the techniques is due to the low parasite burden in these sylvatic species, which is missed by microscopic examination but detected by the PCR. These results bring to light a potential vector role for these sylvatic species in Bolivia.

Contamination with previous amplification products is the

main problem with the PCR technique, but we do not believe it is an explanation for the discrepancy between negative microscopic examination results and positive PCR results in this study because of the following arguments. Among positive samples that showed a negative result by microscope observation, some give weak PCR amplification but others give strong amplification (generally contamination gives a weak band), and the negative and positive controls of each protocol always gave appropriate results. The hybridization patterns (see below) indicate the presence of several clones of *T. cruzi* in a group of triatomine samples tested in each experiment, and false-positive PCR results (contamination) occurred mostly due to the same source (the same clone of *T. cruzi*). It is worth noting that some samples were not recognized by either of the two probes that were used.

The PCR has the advantage of providing a more specific diagnosis than one that relies only on the detection of flagellated parasites in areas where other parasites, such as *T. rangeli* or *T. cruzi marenkellei*, could be present as well.

The second part of the investigation was to characterize the clones circulating in the vectors. We used two probes made with the PCR that encompass the HVRm of kDNA and hybridized these to PCR products from each sample of feces. We found high levels of two major clones that were previously reported from the same area using nuclear DNA markers (isozymes). Clones 20 and 39 (or closely related clones) were identified from the domestic vector (*Triatoma infestans*). The PCR-based analysis is therefore a powerful tool for determining the distribution of clones because of the

TABLE 4

Prevalence of mixed *Trypanosoma cruzi* clone infections: comparison of the observed and theoretical rates

Triatomine species*	Department	No.	No. (%) recognized†		Mixed infections‡		P§
			By probe 20	By probe 39	Observed	Expected	
					No. (%)		
<i>T. infestans</i>	Cochabamba	22	20 (90.9)	5 (22.7)	5 (22.7)	5 (22.7)	>0.05
	La Paz	79	52 (65.8)	45 (57.0)	28 (35.4)	30 (38.0)	>0.05
<i>E. mucronatus</i>	La Paz	13	3 (23.1)	4 (30.8)	2 (15.4)	1 (7.7)	>0.05
<i>T. sordida</i>	La Paz	3	1 (-)	0 (-)	1 (-)	-	
<i>R. pictipes</i>	La Paz	19	8 (42.1)	2 (10.5)	0 (0)	1 (5.3)	>0.05

\* *T.* = *Triatoma*; *E.* = *Eratyryrus*; *R.* = *Rhodnius*.

† - = not calculated (sample too small).

‡ Mixed infections observed = number and % of fecal samples hybridizing with both probes 20 and 39. Mixed infections expected = number of fecal samples calculated by the formula:  $N \times (\%20 \times \%39)$  with  $N$  = number of studied samples and  $\%20$  and  $\%39$  = observed % of fecal samples hybridized by probes 20 and 39, respectively. The expected % are deducted dividing the expected numbers by the total number of samples.

§ By Yates' chi-square test,  $ddl = 1$ .

facility of the method in dealing with large numbers of samples without the time, expense, and loss of clones during culturing, which is required for isoenzyme analysis.

The results of the PCR with *Triatoma infestans* confirm earlier work with isoenzymes indicating the importance of major clones 20 and 39 in the domestic cycle in Bolivia.<sup>1</sup> Although the sample sizes are as yet too small to allow epidemiologic conclusions, this technique is clearly able to identify the microdistribution of particular clones: e.g., in our sample, the Department of Cochabamba showed a significantly higher percentage of clone 20 (90.9%) than the Department of La Paz (65.8%, Table 3, Yates'  $\chi^2 = 5.65$ ,  $P < 0.05$ ).

Of particular interest is finding clones 20 and 39 in three nondomestic species. This is the first report of the presence of these major clones, known from the domestic cycle, in sylvatic species in Bolivia. Since these normally sylvatic triatomines were collected in domestic and peridomestic areas, it is not clear whether these vectors are tending towards domesticity and acquiring domestic clones or whether clones 20 and 39 exist in the sylvatic situation as well. The origin of these major clones, sylvatic or domestic, remains to be determined. Application of this PCR-based technique to sylvatic mammals and triatomines should resolve this issue. Contrary to what was observed in *Triatoma infestans*, the majority of the clones present in *E. mucronatus* and *R. pictipes* are neither clone 20 nor clone 39 and thus likely represent infections by additional clones whose taxonomic status remains to be determined.

Amplification with the PCR followed by hybridization was also a much more powerful technique than MLEE for detecting mixed infections. The probes used here do not cross-hybridize, as previously verified on a large range of reference strains (characterized by isoenzymes) pertaining to natural clones 20, 39, and others.<sup>6</sup> This result strongly suggests the detection of mixed infections (clone 20 and clone 39).<sup>6</sup> As more specific *T. cruzi* clone probes are developed and more strains are identified, we expect to find even higher rates of mixed infections. Since the expected rates of mixed infections with clones 20 and 39 (Table 4) did not differ significantly from the observed rates, we have no evidence for interaction between the clones in which the presence of one would affect the presence or development of the other.

The approach developed here should allow characterization of many clones from different regions. When the PCR products from an infected host (vector or mammal) do not hybridize with the probes that are used, it will be possible to develop a new probe from these PCR products. This new probe will be hybridized first with strains that have been genetically characterized (by MLEE) to determine its specificity and then used to test biological samples for epidemiologic studies if the specificity results are satisfactory. If we consider the clonal nature of *T. cruzi* populations as well as the linkage between HVRm DNA and nuclear DNA, it should be possible to develop specific probes from HVRm kDNA. Moreover, this approach, when applied to human infection, should allow investigation of the medical conse-

quences of infection with a particular clone or multiple clones.

**Acknowledgments:** We thank Dr. Patricia Dorn (Hope College, Holland, MI) for critical review of the manuscript, and Dr. Michel Tibayrenc for help in initiating this work. We also thank Jean Charles Soria for technical assistance.

**Financial support:** Funds for this research were provided by the World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (ID 910273) and the French Ministry of Research and Technology (no. 91L0743).

**Authors' addresses:** S. F. Breniere, UMR CNRS/ORSTOM No. 9926, Genetique Moleculaire des Parasites et des Vecteurs, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France (present address: ORSTOM Mission Bolivia, Casilla 9214, La Paz, Bolivia). M. F. Bosseno, F. Vargas, and F. Noireau, ORSTOM, Institut Francais de Recherche pour le Developpement en Cooperation, CP 9214, La Paz, Bolivia. J. Telleria, Facultad de Bioquimica-Farmacologia, Universidad Mayor de San Andres, La Paz, Bolivia. R. Carrasco and N. Yaksic, Instituto Boliviano de Biologia de Altura, Universidad Mayor de San Andres, La Paz, Bolivia.

**Reprint requests:** S. F. Breniere, ORSTOM Mission Bolivia, Casilla 9214, La Paz, Bolivia.

#### REFERENCES

1. Tibayrenc M, Ayala FJ, 1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.
2. Tibayrenc M, Breniere SF, 1988. *Trypanosoma cruzi* major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 249-255.
3. Miles MA, Cilbulskis RE, 1986. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 2: 94-101.
4. Tibayrenc M, Cariou ML, Solignac M, Dedet JP, Poch O, Desjeux P, 1985. New electrophoretic evidence of genetic variation and ploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Genetica* 67: 223-230.
5. Avila H, Sigman D, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L, 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 48: 211-222.
6. Veas F, Breniere SF, Cuny G, Brengues C, Solari A, Tibayrenc M, 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol* 37: 73-84.
7. Breniere SF, Bosseno MF, Revollo S, Rivera MT, Carlier Y, Tibayrenc M, 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am J Trop Med Hyg* 46: 335-341.
8. Breniere SF, Braquemond P, Solari A, Agnese JF, Tibayrenc M, 1991. An isoenzyme study of naturally occurring clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from both sides of the West Andes highland. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 62-66.
9. Breniere SF, Carrasco R, Revollo S, Aparicio O, Desjeux P, Tibayrenc M, 1989. Chagas' disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am J Trop Med Hyg* 41: 521-529.
10. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K, 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of the polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 39: 167-172.

## *Trypanosoma cruzi*: Study of the Distribution of Two Widespread Clonal Genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* Vectors Shows a High Frequency of Mixed Infections

MARIE-FRANCE BOSSENO,\* JENNY TELLERIA,† FERNANDO VARGAS,† NINA YAKSIC,†  
FRANÇOIS NOIREAU,‡ ANNIE MORIN,§ AND SIMONE FRÉDÉRIQUE BRENIÈRE\*

\*UMR ORSTOM/CNRS No. 9926: "Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs," C.P. 9214, La Paz, Bolivia; †Instituto Boliviano de Biología de Altura, Universidad Mayor de San Andrés, C.P. 641 La Paz, Bolivia; ‡ORSTOM, Institut Français de Recherche pour le Développement en Coopération, C.P. 9214, La Paz, Bolivia; and §IFSIC/IRISA, Université de Rennes 1, Rennes cedex 35042, France

BOSSENO, M.-F., TELLERIA, J., VARGAS, F., YAKSIC, N., NOIREAU, F., MORIN, A., AND BRENIÈRE, S. F. 1996. *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Experimental Parasitology* 83, 275–282. The detection of two widespread *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (20 and 39) in feces of Bolivian specimens of the vector *Triatoma infestans* was performed by a combination of polymerase chain reaction and clone-specific DNA hybridization. The hybridization pattern of 186 PCR positive samples of *T. infestans* feces collected in two Bolivian departments identified clone 20 in 74.2% and clone 39 in 63.4% of the triatomine bugs. For the first time, a high percentage (mean:  $43.2 \pm 26\%$ ) of mixed infections (presence of both clones in a given fecal sample) in various localities was recorded. Results were in agreement with the two assumptions of independent transmission of clones 20 and 39 and of the absence of selection in the natural cycles under survey. Statistical analysis of the geographical distribution of clones 20 and 39 favored the hypotheses that the frequencies of *T. cruzi* natural clones are different among localities and that these differences are not proportional to the distances that separate the localities. The epidemiological significance of these results is discussed. © 1996 Academic Press, Inc.

INDEX DESCRIPTORS AND ABBREVIATIONS: *Trypanosoma cruzi*; *Triatoma infestans*; clones, PCR, polymerase chain reaction.

### INTRODUCTION

*Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, exhibits in nature a basically clonal population structure. Isozyme analysis at 15 genetic loci made it possible to identify 43 different clonal genotypes (Tibayrenc *et al.* 1986a). Some clones appeared widespread and abundant and were named "major clones" (Tibayrenc and Brenière 1988). In Bolivia, major clones 19, 20, and 39 (numberings according to Tibayrenc *et al.* 1986a) are abundant in domestic cycle (Tibayrenc *et al.* 1986b). Clones 19 and 20 are genetically closely related to each other (only one allelic difference) and are both distantly related to clone 39. (Tibayrenc and Ayala 1988; Tibayrenc *et al.* 1986b; Brenière *et al.* 1989). The genotypes identified with a limited num-

ber of genetic markers should not be regarded as actual clones, but rather as families of closely related clones. The use of a broader range of genetic markers is bound to show evidence of additional variability within each of the formerly described "clones"; the term "clonet" has been coined to designate the genotypes that appear to be identical for a given set of genetic markers in a clonal species (Tibayrenc and Ayala 1988; Tibayrenc *et al.* 1991). As a matter of fact, the use of 22 enzyme loci instead of 15 (Tibayrenc *et al.* 1993) gives evidence of additional variability within each of the formerly described major clones (which are "clonets" delimited by 15 enzyme loci). Nevertheless, the overall phylogenetic picture formerly drawn from 15 loci remained valid. Indeed, all stocks formerly attributed to either clone 19 or clone 20 were

still closely related, and this was also true for all stocks formerly attributed to clone 39, while the first and the second remained separated by vast evolutionary distances.

We have previously designed a molecular identification tool based on both kDNA PCR amplification and Southern hybridization with specific probes (Brenière *et al.* 1992). Probe 20 identifies stocks attributed to clonet 20 and some stocks attributed to clonet 19, while probe 39 identifies stocks attributed to clonet 39. These probes therefore identify two radically distinct groups of clonal genotypes that are abundant in Bolivia. The present work aimed at using the probes to evaluate the frequency of these two groups without undergoing the possible bias due to culture selection (Miles and Cibulskis 1986). For simplicity's sake, in the rest of the text, these two groups of clonal genotypes will be referred to as "clonet 20" and "clonet 39," respectively, although the first group probably involves some genotypes that were previously attributed to clonet 19.

## MATERIALS AND METHODS

**Vectors.** Specimens of *Triatoma infestans* (1331) were captured from domestic and peridomestic habitats of different locations in Cochabamba and La Paz departments (Table I). These two departments are considered areas of high and low endemicity for Chagas' disease, respectively (Valencia 1990).

**Microscopic observation.** Microscopic observation was considered positive if flagellate parasites were observed in the feces of a triatome specimen during 5 min examination of a drop feces mixed with phosphate-buffered saline at a 400 $\times$  magnification.

**Processing of triatomine feces for PCR.** A sample of 186 positive triatomes (microscopic observation) from different locations were processed by PCR (Table 1). To prevent contamination, fecal samples were collected and processed in different locations. Briefly, 1 to 20  $\mu$ l of triatomine feces was individually collected in sterile microtubes using forceps and gloves rinsed in bleach between each sample. Samples were then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . In a second room devoted to the preparation of PCR samples (free of all sources of contamination), the samples were prepared by addition of 200  $\mu$ l of distilled water (free from DNA contamination) followed by two cycles of boiling (10 min) and centrifugation at 8000g. Negative controls included mock-treated water or feces from *T. infestans* reared in the laboratory and known as *T. cruzi*

free. Ten microliters of the supernatant was used as a template in each of the PCR assays.

**PCR procedure.** PCR was performed as previously described (Veas *et al.* 1991a). The sequences of the oligonucleotide primers chosen to amplify the hypervariable region of kDNA minicircles (HVRm) for all *T. cruzi* stocks were CV1: 5'-GATTGGGGTTGGAGTACTAT-3' and CV2: 5'-TTGAACGGCCCTCCGAAAAC-3' (Genset laboratory, Paris, France). The amplification buffer has been previously described (Veas *et al.* 1991a), and the total reaction volume was 50  $\mu$ l using 2.5 U of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (Promega, Madison, WI). The PCR reagents (buffer, primers, oligonucleotides, water, and mineral oil) were prepared beforehand, aliquoted in sterile microtubes, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . This "Master mix" was quality tested by amplification of one tube with water template (negative control) and another with *T. cruzi* DNA template (positive control). In addition, each assay included no more than 10 fecal samples. The amplification was performed on a Biometra, Trio thermoblock PCR device (Göttingen, Germany) and involved three distinct steps: (i) an initiation step: DNA denaturation ( $95^{\circ}\text{C}$ , 5 min), oligonucleotide primer annealing ( $48^{\circ}\text{C}$ , 2 min), elongation ( $72^{\circ}\text{C}$ , 2 min); (ii) an amplification step: 30 cycles ( $95^{\circ}\text{C}$  for 5 s, then  $48^{\circ}\text{C}$  for 30 s, then  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min), and finally (iii) a cooling step ( $4^{\circ}\text{C}$  for variable times). Each run included: (i) one positive control of total DNA template of *T. cruzi* reference stock and (ii) two negative controls with water instead of DNA template, one of them having been treated identically to the fecal samples. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

**Southern blot.** One-tenth of each PCR samples was electrophoresed on a 0.8% agarose gel (alkali denaturated) (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl, twice for 15 min each) and then transferred onto charged Hybond N+ nylon membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK) by vacuum blotting. For the vacuum transfer, the gel was placed on a prewet membrane, with filter paper followed by a piece of diaper below. This "sandwich" was covered with plastic wrap and placed on a gel dryer (Bio-Rad, Paris, France) and vacuum applied for 10 min without heat. Each membrane included a negative control (water template), two PCR positive controls corresponding to clonets 20 and 39, as well as PCR reactions from uninfected feces.

**Probes.** The two clone-specific probes (numbered 20 and 39) were purified from their respective HVRm DNA fragments produced by the PCR from two *T. cruzi* reference stocks, namely, TPk1, attributed to clonet 39, and S034 cl4, attributed to clonet 20 (Brenière *et al.* 1992). The DNA were digested with the restriction endonuclease *Sau96* and *ScaI* (Promega) to eliminate part of the oligonucleotide primers selected in the conserved region of the minicircle.

**Labeling and hybridization conditions.** Membranes were hybridized using the enhanced chemiluminescence

gene detection system (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) and the probes were labeled according to the manufacturer's recommendations for ECL. Briefly, the membranes were incubated at 42°C in hybridization buffer (0.12 ml/cm<sup>2</sup>) for 15 min. Each of the purified probes was labeled for 10 min at 37°C. Ten nanograms of labeled probe per milliliter of hybridization buffer was added to the membranes. Hybridization was performed at 42°C overnight in a rotating oven. The membranes were washed twice under highly stringent conditions (6 M urea, 0.1 SSC at 42°C for 20 min) and then twice in 2× SSC at room temperature for 10 min. Two exposures were performed (1 and 30 min) on Hyperfilm-MP (Amersham, Buckinghamshire, UK).

**Data analysis.** Statistical analysis was performed using the programs 4F and CA of BMDP (Biomedical package). The earlier versions of BMDP were developed at the National Institute of Health and at UCLA in the 1960s and were initially devoted to biomedical applications. The association between rates of triatomine infection and mixed infections was tested by the correlation coefficient of Spearman (Schwartz 1963). The random association of the two clones in triatomines was tested in the whole population and in each region by the  $\chi^2$  test applied between observed and expected sizes of mixed infections; the expected sizes were calculated according to the formula:  $N \times (\% 20 \times \% 39)$ , where  $N$  = number of studied samples and % 20 and % 39 = observed percentage of fecal samples hybridized by probes 20 and 39, respectively. Differences in *T. cruzi* clonet frequencies in triatomine bugs among localities were analyzed using the program 4F, which handles frequency tables and analyzes two-way and multiway frequency tables: we could simply examine cross-tabulations and their percentages, or compute measures of association such the  $\chi^2$ , or fit loglinear models to multiway contingency tables. We calculated similarity coefficients of clonet distribution among localities using the Phi2 index and the dendrogram of distances between localities constructed using the unweighted paired-group method of averaging (UPGMA).

## RESULTS

Following PCR amplification, 186 positive fecal samples were examined by hybridization with the two probes obtained from two reference *T. cruzi* stocks attributed to clonets 20 and 39, respectively. Figure 1a shows the PCR results after ethidium bromide staining from several fecal samples and controls. Figures 1b and 1c show the patterns obtained after Southern blotting on nylon membrane and hybridization with each of the two probes. All positive PCR samples showed a major band of 270 bp previously demonstrated to be specific

for the *T. cruzi* species (Veas *et al.* 1991b). Hybridization of the positive PCR products revealed three different hybridization patterns: (i) samples positive with either probe 20 or probe 39 (lanes 6, 7, 8, 9, 10, and 11); (ii) samples positive with both probes (mixed infections, lane 12); (iii) samples negative with both probes (lane 13). The 28 fecal samples from laboratory-reared *T. infestans* and the water template (controls) were all PCR negative, as expected (Fig. 1a). Moreover, no hybridization with either probe to these controls was observed. The same result was obtained with 10 *T. infestans* fecal samples from the field that yielded no PCR amplification products (Figs. 1a, 1b and 1c). The hybridization results are summarized in Table I. Subsequently we have analyzed (i) the rates of triatomine bug infection by each clonet; (ii) the rate of mixed infections; and (iii) the geographical distribution of the clones.

The majority of *T. cruzi* positive bugs captured in both departments were infected by clonet 20, or clonet 39, or a mixture of both clonets. Clonet 20 was present in 74.2% of triatomines and clonet 39 in 63.4%. A low percentage of samples (8.0%) was not recognized by either probe 20 or 39. These remaining samples were probably infected by clonal genotypes different from both clonets 20 and 39. Their phylogenetic position remains to be determined. The rate of triatomine infections (microscopic observation) in the different locations is not associated with the respective rates of clones (clone 20,  $\rho = 0.76$ ; clone 39,  $\rho = 0.91$ ;  $n = 9$ ).

The percentage of mixed infections ranged from 7.7 to 85.7% according to the localities, with an average of  $43.2 \pm 26.0\%$ . The null hypothesis of independent transmission and absence of interaction of the two groups of clones identified by probes 20 and 39 was taken to perform a  $\chi^2$  statistical test on the whole population: the result ( $\chi^2 = 0.04$ ,  $P > 0.05$ ) did not make it possible to reject this null hypothesis. The same analysis gave similar results for each province: Mizque,  $\chi^2 = 0.06$ ,  $P > 0.05$ ; Campero,  $\chi^2 = 0.04$ ,  $P > 0.05$ ; Capinota,  $\chi^2 = 0$ ,  $P > 0.05$ ; Caranavi,

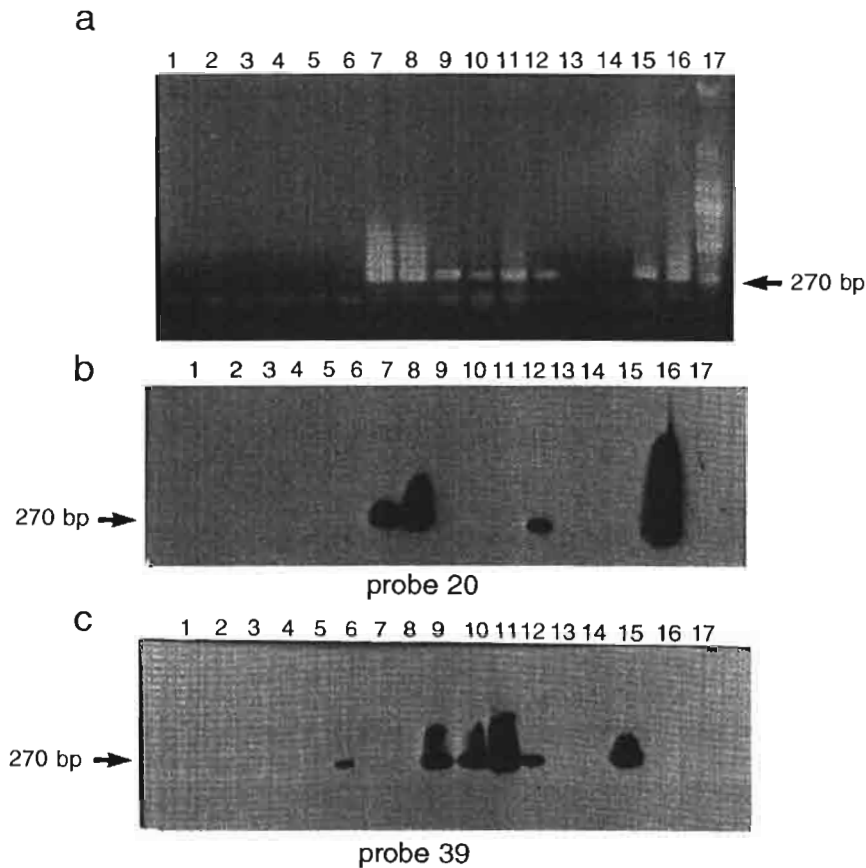


FIG. 1. (a) Ethidium bromide-stained 0.8% agarose gel containing polymerase chain reaction products from *Triatoma infestans* feces. (b and c) Hybridization patterns of these products with clone-specific probes corresponding to natural clones 20 and 39, respectively lanes 1 to 3, control samples (using feces from laboratory-reared *T. infestans*); lanes 4 and 5, negative controls (using distilled water as the template); lanes 6 to 13, positive *T. infestans* feces samples; lane 14, negative *T. infestans* feces sample; lane 15 and 16, positive controls (using 10 ng of total DNA from the reference *T. cruzi* stocks pertaining to natural clones 39 and 20, respectively, as the template); lane 17, DNA size marker *RsaI* digest of pUC 19. The arrows indicate the major amplified band (270 bp).

$\chi^2 = 0.20$ ,  $P > 0.05$ ; North Yungas,  $\chi^2 = 0.12$   $P > 0.05$ . We obtained a significant correlation between rates of triatomine infection in the different locations (microscopic observation) and mixed infections ( $\rho = 0.38$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.05$ ).

Moreover, clonot distribution among localities was tested by taking the null hypothesis that this repartition was homogeneous (triatomes from "other" localities in the department of La Paz were excluded). Four different possible hybridization patterns were considered: (i) fecal samples recognized by probe 20 only; (ii) samples recognized by probe 39 only; (iii) samples recognized by both probes; (iv) fecal samples not recog-

nized by any of the two probes. The null hypothesis was rejected ( $\chi^2 = 38.65$ ,  $df = 21$ ,  $\rho < 0.01$ ). The analysis of likelihood ratio  $\chi^2$  showed that various localities (Quiroga, Capinota, Caranavi, and Pararani) presented exceptional patterns contributing to the rejection of the hypothesis of geographical homogeneity. At Pararani and Caranavi, we observed a high percentage of fecal samples not recognized by either of the two probes. At Quiroga, samples recognized by probe 20 were constantly recognized by probe 39 also. At Capinota, an exceptionally high percentage of triatomines with only clone 20 were observed. We used an analysis of Phi2 distances to summarize the differences of distri-

TABLE I  
Detection of *T. cruzi* Clones 20 and 39<sup>a</sup> in *T. infestans* from Two Bolivian Departments

Department and provinces	Localities	No. of triatomas	No. and % recognized			
			By probe 20 only	By probe 39 only	Neither probe 20 nor 39	By probes 20 and 39
<b>Cochabamba</b>						
Mizque	Mizque	32	9 (28.1)	6 (18.7)	2 (6.3)	15 (46.9)
Campero	Ailquile	39	9 (23.0)	6 (15.4)	1 (2.5)	23 (59.0)
	Quiroga	14	0	2 (14.3)	0	12 (85.7)
Capinota	Near Capinota	22	11 (50.0)	2 (9.1)	2 (9.1)	7 (31.8)
Total		107	29 (27.1)	16 (14.9)	5 (4.7)	57 (53.3)
<b>La Paz</b>						
Caranavi	Near Caranavi	12	3 (25.0)	2 (16.7)	3 (25.0)	4 (33.3)
North Yungas	Trinidad-Pampa	32	9 (28.1)	4 (12.5)	3 (9.4)	16 (50.0)
	Pararani	13	6 (46.1)	2 (15.4)	4 (30.8)	1 (7.7)
	San Juan	9	1 (11.1)	2 (22.2)	0	6 (66.6)
	Others	13	5 (38.5)	7 (53.8)	0	1 (7.7)
Total		79	24 (30.4)	17 (21.5)	10 (12.6)	28 (35.4)
Cochabamba and La Paz	Entire population	186	53 (28.5)	33 (17.8)	15 (8.0)	85 (45.7)

<sup>a</sup> *T. cruzi* clones 20 and 39 are defined by the genetic classification of Tibayrenc and Ayala (1988)

bution among localities of the four hybridization patterns above exposed. The corresponding dendrogram indicated two groups of localities and three localities. The first group was constituted by the localities of Mizque, Trinidad Pampa, and Caranavi; the second group was constituted by the localities of San-Juan and Ailquile. The three other localities showed distributions of hybridization patterns different from each other and from those of the two groups (Fig. 2).

#### DISCUSSION

The present results confirm to a large extent previous data reported by Tibayrenc *et al.* (1986b) dealing with isozyme identification of 419 *T. cruzi* stocks from Bolivia. Indeed, these authors give evidence for the presence in Bolivia of three abundant and widespread "clonets," namely, clonets 19, 20, and 39. Clonets 19 and 20 on the one hand and clonet 39 on the other hand represent two groups of clonal genotypes within which genetic diversity remains limited and which are separated

from each other by vast evolutionary distances. Probes 20 and 39 used in the present study, which identify specifically stocks attributed to each of these two groups of clonal genotypes, made it possible to reach more precise results and to consider with a better resolution the relevant problem of mixtures of clones in a given individual host.

In the La Paz and Cochabamba departments, previous isoenzyme typing found only one stock that was radically different from clonets 20 and 39 (2.8%) and only one mixed infection (Tibayrenc *et al.* 1986b). The rate of mixed infections in triatomine bugs for the whole of Bolivia, as estimated by isozyme analysis, was 10% (Tibayrenc *et al.* 1986b). In contrast, the present study made it possible to reach the following results: (i) Several PCR products which are not recognized by either of the two probes were scored (8%). They probably correspond to clonal genotypes that are different from both clonets 20 and 39 and whose phylogenetic positions remain to be clarified. (ii) High frequencies of mixed infections were recorded (more than 50% in various

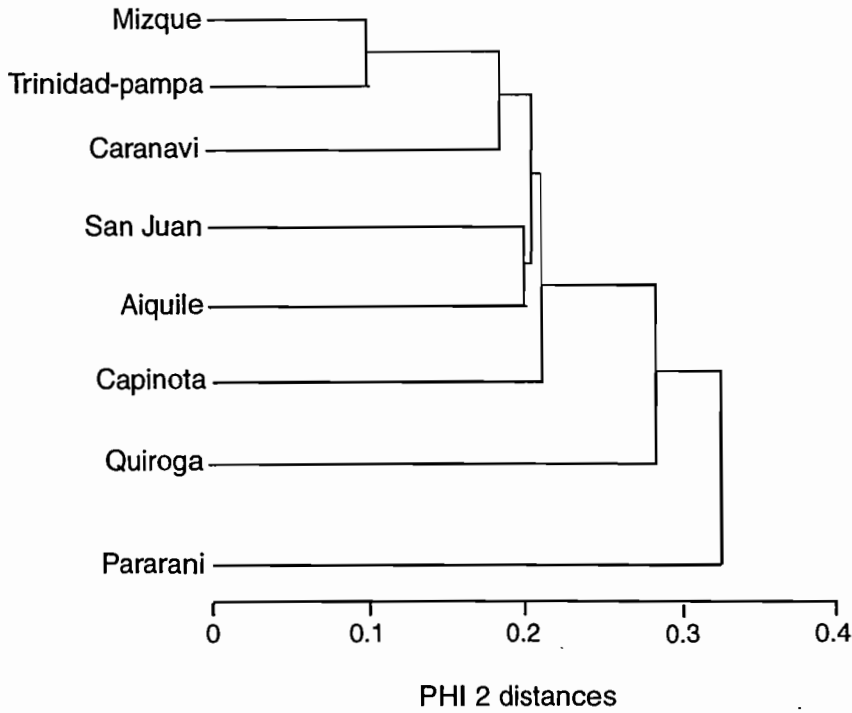


FIG. 2. Dendrogram constructed using the unweighted pair-group method of averaging (UPGMA) from Phi2 similarity coefficient, based on distribution of *T. cruzi* natural clones 20 and 39 in feces of *T. infestans* insects.

localities). It is worth noting that the rate of mixed infections evidenced by our PCR/hybridization method is probably an underestimation, because only the mixed infections of clones 20 and 39 were considered in the present study. The rates of mixed infection found were variable according to the locations and correlated to rate of triatomine infections. If triatomines present a high probability of infection, higher levels of mixed infection are expected since an insect needs several meals for its development.

The lower rate of mixed infection scored by isozyme analysis can be attributed to two factors, not mutually exclusive: (i) isozyme typing could have a lower resolution for evidencing such mixtures and (ii) the culture step required for isozyme analysis could tend to eliminate, or at least lower the abundance of, one of the clones entering the mixture.

Comparisons of results obtained years apart should be tentative. Nevertheless, in the present study, we were able to directly compare the results obtained from either isozyme analysis or PCR-hybridization. Thirty-eight tri-

atomine bugs were submitted to PCR-hybridization, while the trypanosome stocks of these bugs were isolated, cultured, and analyzed by isozyme typing. Only 1 mixture was shown by this last method, while PCR-hybridization showed the presence of 18 mixtures. This last result does confirm that PCR-hybridization has a higher level of resolution than isozyme analysis for showing the presence of these mixtures. Similarly, recent characterization by PCR-hybridization of *T. cruzi* stocks in blood of chagasic patients during acute and chronic phases recorded particularly high rates of mixed infections during the chronic phase (Bosseno *et al.* 1995; no published data), while former isozyme studies had detected only 10% of mixed infections in Bolivian chronic chagasic patients (Brenière *et al.* 1989).

The comparison of the clone 20 and 39 frequencies in vectors and patients previously obtained by isoenzyme studies (Tibayrenc *et al.* 1986b; Brenière *et al.* 1989) with our present data is limited by the size of the previous samples and the unknown precise origin of strain

isolated before. Nevertheless, we note in vectors higher actual frequencies of both clones which depend on the best detection of mixed infections.

This new approach allows the detection of a high percentage of mixed infections in vectors. The expected number of patients presenting mixed infections in the areas studied should be very important since mixed infections can be acquired in two ways: (i) infection by fecal samples presenting a mixed infection and (ii) reinfection by another *T. cruzi* clonal genotype. The human mixed infections could reach almost all of the patients. The clinical, pathological, and immunological consequences of the presence of various clones in a single human infection is unknown. Experimental studies of mouse infections have thoroughly demonstrated the variability of biological properties of *T. cruzi* stocks according to their genetic characteristics (Andrade 1990; Marsden *et al.* 1979; Tanuri *et al.* 1985). Finally, various authors have shown the high virulence of stocks belonging to clonet 20, in contrast to the low virulence observed for clonet 39 (Sanchez *et al.* 1990). Nevertheless, data of experimental co-infections remain scarce and roughly show different interactions between clones according to the schedule of infections, as does the work of Deane *et al.* (1984).

The null hypothesis of independent transmission and lack of interaction between the two groups of clones identified by our probes could not be rejected by a  $\chi^2$  test. This result suggests an absence of natural selection during the cycle through the vectors and mammalian host. In addition, the absence of a significant correlation between infection rates and the prevalence of any clone sustains these results. These results conflict with some studies showing selection of clones by mice (Sanchez *et al.* 1990; Deane *et al.* 1984). However, selection of clones during human infection is not reported.

We have compared the geographic distribution of clonets 20 and 39. The results show that the frequencies of the clonets are different among localities and that these differences are

not proportional to the distances that separate the localities. The two groups shown by the dendrogram in Fig. 2 (Mizque-Trinidad Pampa and San Juan-Ailquile) are located in the departments of La Paz and Cochabamba, respectively, and are at least 400 km apart. It is worth noting that other clonal genotypes (neither clonet 20 nor clonet 39) were present in Pararani but were not recorded in San Juan, while the two localities are only 29 km apart. This favors the hypothesis that clonet exchanges between different localities are limited.

Population genetic studies of vectors (Dujardin *et al.* 1994) strongly suggest that exchanges of *T. infestans* populations are limited between different localities. *T. cruzi* clonet repartition, as shown in the present study, fits this picture and could suggest that clonet repartition is partly or mainly governed by the structure and dynamics of triatomine bugs. Work is under way to test this hypothesis on a finer geographical scale.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (No. 910273). We thank Dr. David Campbell (University of California, Los Angeles) and Dr. Michel Tibayrenc (UMR ORSTOM/CNRS No. 9926 in Montpellier, France) for critical review of the manuscript.

#### REFERENCES

- ANDRADE, S. G. 1990. Influence of *Trypanosoma cruzi* strains on the pathogenesis of chronic myocardialopathy in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **85**, 17–27.
- BRENIÈRE, S. F., BOSSENO, M. F., REVOLLO, S., RIVERA, M. T., CARLIER, Y., AND TIBAYRENC, M. 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 335–341.
- BRENIÈRE, S. F., CARRASCO, R., REVOLLO, S., APARICIO, O., DESJEUX, P., AND TIBAYRENC, M. 1989. Chagas' disease in Bolivia: Clinical and epidemiological features; zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* stocks isolated from patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **41**, 521–529.
- BOSSENO, M. F., TORRICO, F., TELLERIA, J., NOIREAU, F., AND BRENIÈRE, S. F. 1995. Reacción de polimerización

- en cadena: Detección y caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi* en niños chagásicos. *Medicina*, **55**, 277–278.
- DEANE, M. P., SOUSA, M. A., PEREIRA, N. M., GONÇALVES, A. M., MOMEN, H., AND MOREL, C. M. 1984. *Trypanosoma cruzi*: Inoculation schedules and reisolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. *Journal of Protozoology* **31**, 276–280.
- DUJARDIN, J. P., PEREIRA, J., SOLANO, P., AND TIBAYRENC, M. 1994. Les réponses de la Génétique des Populations aux problèmes soulevés par la lutte contre les vecteurs de la maladie de Chagas. "Vers une épidémiologie totale," *Compte-rendus du colloque et des Ateliers "Homme, Santé, Tropiques"* Ed. Association "Homme, Santé, Tropiques" pp. 121–125.
- MARSDEN, P. D., ALVARENGA, N. J., SOARES, V. A., AND GAMA, M. P. 1979. Attempts to produce megasyndrome in mice using stocks of *Trypanosoma cruzi* associated with megaesophagus in man. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **73**, 651–655.
- MILES, M. A., AND CIBULSKIS, R. E. 1986. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* **2**, 94–98.
- SANCHEZ, G., WALLACE, A., OLIVARES, N., AGUILERA, X., APT, W., AND SOLARI, A. 1990. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodeme in vitro: Differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. *Experimental Parasitology* **71**, 125–133.
- SCHWARTZ, D. 1963. *Méthodes de statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. Médecin-Sciences Flammarion, 12<sup>ème</sup> eds, p. 303, Paris VIe.
- SNEATH, P. H. A., AND SOKAL, R. R. 1973. "Numerical Taxonomy. The Principle and Practice of Muneral Classification" (D. Kennedy and R. B. Park, Eds.), p. 537. Freeman, San Francisco.
- TANURI, A., DE ANDRADE, P. P., DE ALMEIRA, D. F. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Isolation of cloned strains and characterization of their infectivity. *Journal of Parasitology*, **71**, 397–402.
- TIBAYRENC, M., AND AYALA, F. J. 1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: Genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* **42**, 277–292.
- TIBAYRENC, M., AND BRENÈRE, S. F. 1988. *Trypanosoma cruzi* major clones rather than principal zymodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **83**, 249–255.
- TIBAYRENC, M., CARIOU, M. L., SOLIGNAC, M., DEDET, J. P., POCH, O., AND DESJEUX, P. 1985. New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the Causative agent of Chagas disease. *Genetica* **67**, 223–230.
- TIBAYRENC, M., WARD, P., MOYA, A., AND AYALA, F. J. 1986a. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **83**, 115–119.
- TIBAYRENC, M., HOFFMAN, A., POCH, O., ECHALAR, L., LE PONT, F., LESMERE, J. L., DESJEUX, P., AND AYALA, F. 1986b. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isomyc stocks encountered in Bolivian domestic transmission cycles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **80**, 442–447.
- TIBAYRENC, M., KJELLBERG, F., AND AYALA, F. J. 1991. The clonal theory of parasitic protozoa: a taxonomic proposal applicable to other clonal organisms. *Bioscience* **41**, 767–774.
- TIBAYRENC, M., NEUBAUER, K., BARNABE, C., GUERRINI, F., SKARECKY, D., AND AYALA, F. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy Science USA* **90**, 1335–1339.
- VALENCIA TELLERIA, A. 1990. Investigación Epidemiológica Nacional de la Enfermedad de Chagas. Ministerio de Prevision Social y Salud Pública, Secretaria Ejecutiva PL 480. Titulo III La Paz, Bolivia.
- VEAS, F., BRENÈRE, S. F., CUNY, G., BREGUES, C., SOLARI, A., AND TIBAYRENC, M. 1991a. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by Polymerase Chain Reaction. *Cellular and Molecular Biology* **37**, 73–84.
- VEAS, F., CUNY, G., BRENÈRE, S. F., AND TIBAYRENC, M. 1991b. Subspecific kDNA probes for major clones of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **48**, 79–82.

Received 4 December 1995; accepted with revision 23 April 1996

# PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis

P. WINCKER<sup>1,2\*</sup>, J. TELLERIA<sup>3</sup>, M. F. BOSSENO<sup>3</sup>, M. A. CARDOSO<sup>1</sup>, P. MARQUES<sup>1</sup>, N. YAKSIC<sup>4</sup>, C. AZNAR<sup>5</sup>, P. LIEGEARD<sup>5</sup>, M. HONTEBEYRIE<sup>5</sup>, F. NOIREAU<sup>6</sup>, C. M. MOREL<sup>1</sup> and S. F. BRENIERE<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Laboratoire Génome des Parasites, Parasitologie, Faculté de Médecine, 163 rue Auguste Broussonet, 34000 Montpellier, France

<sup>3</sup> UR41, UMR ORSTOM/CNRS 9926 "Généétique moléculaire des Parasites et des Vecteurs", CP 9214, La Paz, Bolivia

<sup>4</sup> Universidad mayor de San Andres, IBBA, CP 641, La Paz, Bolivia

<sup>5</sup> Institut Pasteur, Département d'Immunologie et Centre de Biologie médicale, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

<sup>6</sup> UR 41 ORSTOM, C.P. 9214, La Paz, Bolivia

(Received 9 July 1996; revised 30 September 1996; accepted 1 October 1996)

## SUMMARY

A large field study has been performed in the Cochabamba region of Bolivia with the aim of comparing the polymerase chain reaction (PCR) with other diagnostic methods for Chagas' disease. The amplification of *Trypanosoma cruzi*-specific kinetoplast DNA sequences in blood samples was compared with classical serological methods, specific IgM detection and direct parasite visualization for 268 school children in a single village where Chagas' disease transmission is active. Of 113 children positive by classical serology or buffy coat examination, 106 were detected by PCR (sensitivity: 93.8%). We did not observe any significant difference of PCR sensitivity between initial (IgM and/or buffy coat positive) and indeterminate stage (only IgG positive) patients. Among the remaining 155 children unconfirmed as chagasic (who were either only IgM positive, IgG-, IgM-, and buffy coat -negative) only 1 case was PCR positive. This case may be due to DNA contamination, or to a very recent infection not detected otherwise, or to specific immune depression. These results show that PCR is a very sensitive parasitological test for Chagas' disease in active transmission regions. The future follow-up of the possibly infected patients who were only IgM-positive should clarify the interest of PCR and IgM tests in the detection of starting infections.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, PCR diagnosis, serological diagnosis.

## INTRODUCTION

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the aetiological agent of Chagas' disease, a very important public health problem in Latin America. It is transmitted by triatomine bugs during their blood meals. Albeit an important control programme has been started some years ago to eliminate the domiciliary species of triatomines, many regions in Latin America still have an active transmission cycle due to economic difficulties in implementing it (Moncayo, 1993). Consequently, sensitive methods for Chagas' disease diagnosis are particularly important in these poorest regions to precisely assess the rate of infection and the impact of future control programmes.

\* Corresponding author: Laboratoire Génome des Parasites, Parasitologie-Faculté de Médecine, 163 rue Auguste Broussonet, 34000 Montpellier, France. Tel: +33 467 63 55 13. Fax: +33 467 63 00 49.

The diagnosis of Chagas' disease relies primarily on serological techniques. However, these techniques present many problems of specificity (Camargo, 1992). An additional problem that occurs in regions of active transmission is the failure of the traditional serological methods, based on the detection of anti-*T. cruzi* IgG, to detect recent infections. To circumvent these difficulties, it has been suggested that serological diagnosis may be complemented by an efficient parasitological method. These methods include the xenodiagnosis, the haemoculture and the direct microscopical examination of fresh blood (Chiari *et al.* 1989). The specificity of these techniques is high, but unfortunately their sensitivities cannot be compared to that of serology, due to the low parasite concentration in the blood of chagasic patients, principally during the chronic phase of the disease. Recently, the definition of different PCR amplification methods for detecting low quantities of

*T. cruzi* DNA have led to the hope of a new, highly sensitive parasitological technique for Chagas' disease diagnosis (Moser, Kirchoff & Donelson, 1989; Sturm *et al.* 1989; Taibi *et al.* 1995).

A series of recent studies have focused on the use of PCR amplification of kinetoplast DNA sequences in the diagnosis of chronic chagasic patients in different regions of Brazil (Avila *et al.* 1993; Wincker *et al.* 1994a; Britto *et al.* 1995a, b; Junqueira, Chiari & Wincker, 1996). They have shown that this technique can be almost 100% specific, and that its sensitivity can reach 45–96.5% as compared with serology. Most importantly, direct comparisons were performed with xenodiagnosis or haemoculture during these studies. In every case, the PCR proved to be a markedly more sensitive method (Wincker *et al.* 1994a; Britto *et al.* 1995a; Junqueira *et al.* 1996). The main limit observed with PCR was that its sensitivity never reached that of serology. A semi-quantitative analysis of these results showed that this was due to the very low concentration of *T. cruzi* in the blood of chronic patients in some particular regions, and that this probably reflects the genetic constitution of the parasite strains circulating there (Britto *et al.* 1995b; Junqueira *et al.* 1996). It is therefore clear that the main use of PCR in Chagas' disease diagnosis is to complement serological methods.

Another application of PCR can be found in active transmission areas, where acute and chronic cases co-exist. As the most recently infected individuals generally have a high parasitaemia, but present a delay in raising their antibody response, it may be hypothesized that PCR could be useful in this situation. A preliminary study made with 45 children in Bolivia revealed a high correlation of PCR and IgG serology in these cases and confirms that PCR can detect chagasic individuals with a negative IgG serology (Wincker *et al.* 1994b). In the present work, we analysed a large number of children from this endemic area of active transmission, and compared the PCR and IgG serology results with other methods used to diagnose recent infections.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and sera

The individuals examined in this study were children (free of treatment) living in Mizque village located in a highly endemic region of Bolivia (Cochabamba department). The blood samples were collected at the same time, mainly in the elementary school. The average age was 7.7 years old ranging from 1 to 15 years old. None of these children presented clinical symptoms of acute-phase illness. Ten ml of blood were collected from each child and 5 ml of it were immediately mixed with an equal volume of 6 M guanidine HCl/200 mM EDTA, pH 8 (Avila *et al.* 1991). The remaining blood was processed for

parasite visualization in the buffy coat (BC test; La Fuente, Saucedo & Urgel, 1984) and serum preparation.

### Serological techniques

Specific anti-*T. cruzi* IgG were detected in 4 assays. First, haemagglutination (HEMAVE test, Polychaco, Buenos Aires, Argentina) was carried out in the field. Second, immunofluorescence was performed according to Alvarez, Cerisola & Rohwèder (1968) at the IBBA, La Paz, using *T. cruzi* epimastigotes fixed by 1% glutaraldehyde, and a mouse FITC-labelled anti-human IgG (H+L) conjugate (Biosys, Compiegne, France) diluted 1/200. A detection limit of 1/32 was selected. Finally, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed in 2 different laboratories (IBBA, La Paz and Institut Pasteur, Paris) according to previous studies (Brenière *et al.* 1984; Aznar *et al.* 1995). The sheep peroxidase-conjugated anti-human IgG (H+L) used in IBBA, was from Biosys (Compiegne, France) and used at a dilution of 1/2500. The goat F(ab')<sub>2</sub> alkaline phosphatase-conjugated anti-human IgG used in Institut Pasteur was from Caltag (San Francisco, USA) and diluted 1/4000. Sera were diluted 1/200 in both cases and the limit extinction values of ELISA and optical density ratio were 0.2 and 1.00 respectively. The diagnosis was based on positivity or negativity of 3 out of 4 tests. Moreover, specific IgM antibodies were detected by ELISA technique in the Institut Pasteur using the *T. cruzi* antigen as previously described (Aznar *et al.* 1995). The antigen was diluted to a final concentration of 2.5 µg/ml in PBS (pH 7.2). It was successively incubated with sera diluted 1/200 and goat F(ab')<sub>2</sub> peroxidase-conjugated anti-human IgM (Diagnostic Sanofi Pasteur) diluted 1/2000.

### DNA extraction and PCR conditions

The tubes containing the guanidine-EDTA-blood lysates were immersed for 15 min in a boiling water bath to split the kDNA network (Britto *et al.* 1993). They were cooled to room temperature, and two 100 µl aliquots were taken for DNA preparation. These aliquots were extracted once with phenol-chloroform and once with chloroform, and then precipitated with 2 volumes of ethanol in 100 mM sodium acetate. After centrifugation, the pellets were resuspended in 50 µl of distilled water.

The amplifications were carried out in a final volume of 75 µl using the hot-start procedure with a solid paraffin barrier separating the oligonucleotides and the *Taq* polymerase (Chou *et al.* 1992). The lower solution consisted of 5 µl of *Taq* polymerase reaction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 7.2 µl of a dNTPs mixture (10 mM each), 13.5 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 ng of the *T. cruzi*-specific primers (5' AAATAATGTACGGG(T/G)-

Table 1. PCR-based diagnosis: comparison with conventional tests (BC = Buffy coat test; IgG = specific anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulins G; IgM = specific anti-*T. cruzi* immunoglobulins M; confirmed chagasic patients are patients with BC and/or IgG tests positive.)

Patients (number)	IgG	IgM	PCR
Confirmed chagasic (113)			
With positive BC test			
No. positive	9	3	11
No. negative	3	9	1
With negative BC test			
No. positive	101	15	95
No. negative	0	86	6
Possibly infected (10)			
No. positive	0	10	0
No. negative	10	0	10
Uninfected (145)			
No. positive	0	0	1
No. negative	145	145	144

GAGATGCATGA 3' and 5' GGTTTCGATTGG-GGTTGGTGTAAATATA 3'), and water to a final volume of 50  $\mu$ l in a thin-walled reaction tube. The upper phase was made of 7.5  $\mu$ l of the DNA sample, 2.5  $\mu$ l of 10 $\times$  *Taq* polymerase buffer, 2.5  $\mu$ l of *Taq* DNA polymerase and 12.5  $\mu$ l of water. The PCR reaction was immediately started using a DNA thermocycler 480 (Perkin-Elmer) with the following parameters: 2 cycles at 98 °C for 1 min and 64 °C for 1 min, 33 cycles at 94 °C for 1 min and 64 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The same protocol allowed the amplification of the human  $\beta$ -globin sequences with the primers 5' ACA-CAAAGTGTGTTCACTAGC 3' and 5' CAACT-TCATCCACGTTCCACC 3'. The PCR products were analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

## RESULTS

### *Prevalence of Chagas' disease in the endemic area*

The present study was conducted in a rural setting in the Cochabamba region where no insect control programme has been implemented yet. A total of 268 school children (1–15 years old) was randomly selected to be diagnosed for Chagas' disease. Before performing the PCR diagnosis test, we first applied a serological diagnosis aimed at detecting IgG in the blood using 4 different techniques (described in the Materials and Methods section). Two further tests were performed on all children to detect possible recent infections. First, a direct examination for parasites after concentration in the buffy coat was performed. Second, an IgM-specific detection reaction was made at the Institut Pasteur. Table 1 summarizes the results. One-hundred and thirteen children (42.2%) were positive in at least 3 of the 4 tests detecting specific IgG and/or positive in direct

parasitological diagnosis (buffy coat), and were considered infected by *T. cruzi* (we will refer to them as 'confirmed chagasic patients' from now). This result shows the high prevalence and the active transmission of the disease in this region. Among the confirmed chagasic patients group, 12 patients presented a positive buffy coat and 15 a positive specific IgG reaction associated to a positive specific IgM reaction (Table 2) with a negative buffy coat, and were considered recently infected (23.9%). The other 86 confirmed chagasic patients were classified as in an indeterminate state of the disease. Furthermore, 10 patients presented only a positive specific IgM detection with a negative specific IgG reaction and a negative buffy coat and were considered as possible *T. cruzi* infections (3.7% of the entire population). We note that in this last group the majority of the patients present a high rate of IgM antibodies (Table 2). The other 145 patients with negative serological and negative buffy coat were considered free of *T. cruzi* infection.

### *PCR diagnosis*

All 268 children previously examined were further submitted to a PCR diagnosis test. This test used specific amplification of minicircle sequences and was previously shown to be sensitive enough to detect 1 parasite in 20 ml of blood (Britto *et al.* 1993). A typical result for a series of PCR tests, including the positive and negative controls systematically included, is presented in Fig. 1. We found that, out of 113 chagasic patients, 106 were PCR positive (93.8%). Moreover, we did not observe significant differences in the PCR tests between the recent infections and the indeterminate group (88.8% and 95% of positivity respectively, Chi 2 = 1.47,  $P > 0.05$ ). In the group of non-infected children, the PCR test was positive in 1 case (see

Table 2. Specific IgM antibodies in the blood of Bolivian children (BC = Buffy coat test; IgG = specific anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulins G.)

Specific IgM values	Patients status				Total no. of cases
	BC +		BC -		
	IgG +	IgG -	IgG +	IgG -	
OD ratio < 1.00	8	1	86	145	240
1.00 < OD ratio < 1.10	1	1	2	4	8
OD ratio > 1.10	0	1	13	6	20

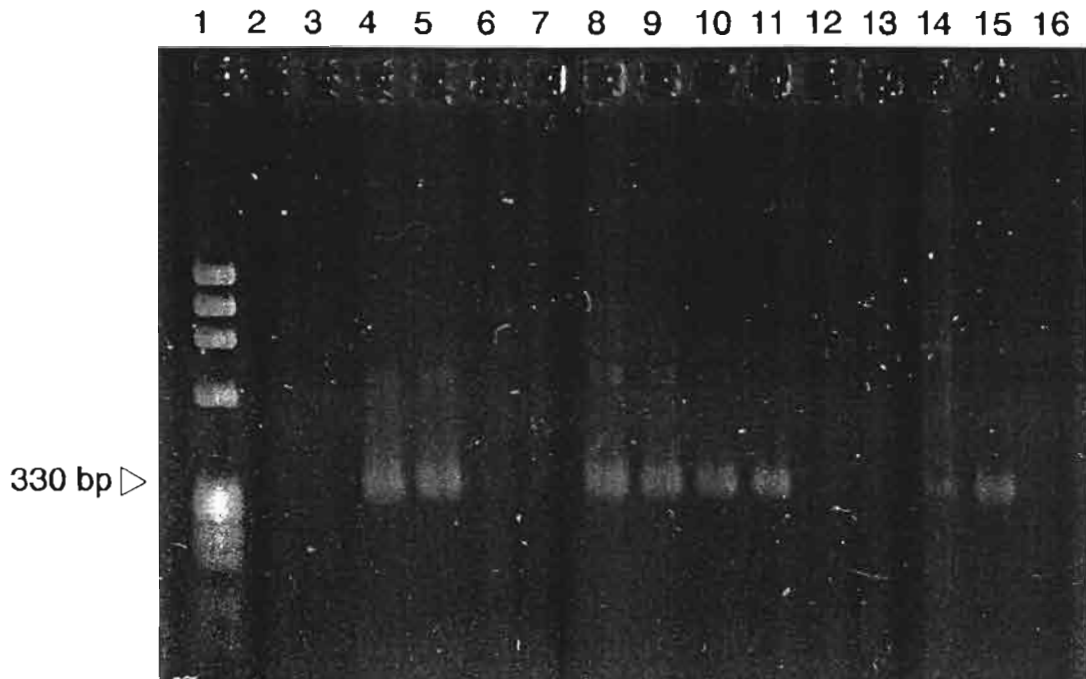


Fig. 1. Typical PCR diagnosis experiment. Lane 1, molecular weight marker ( $\Phi$ X174 DNA-*Hae* III digested); lanes 2 and 3, negative controls (normal individual); lanes 4 and 5-12 and 13, Bolivian children; lane 14, positive control (confirmed chagasic patient with low parasitaemia); lane 15, positive control (confirmed chagasic patient with high parasitaemia); lane 16, negative control of the reaction (no DNA added). All reactions except the positive controls were performed with duplicate DNA preparations, using 35 amplification cycles in a volume of 75  $\mu$ l. Fifteen  $\mu$ l were applied to each gel lane, and the results were revealed using U.V. transillumination after ethidium bromide staining. All the negative DNA preparations were checked for possible inhibition using a human  $\beta$ -globin amplification.

Discussion section). Finally, the PCR test was always negative in the possibly infected group (only IgM positive).

It is worth noting that the PCR test reached a high level of accordance only with the specific IgG test (96.6%). Out of 12 positive buffy coats, 11 PCR tests were positive (91.6%). Moreover, out of 28 patients presenting positive IgM, 16 had a positive PCR test (57.1%). We also observed that the values of positive IgM antibodies ranged from 1.02 to 2.63 (optical density ratio) and that 20 patients present an IgM optical density ratio of > 1.10 (71.43%, Table 2). We did not observe significant differences in the PCR test between these 2 groups presenting low and high levels of IgM antibodies.

When comparing the results obtained in the confirmed chagasic patients group, we found that out

of 18 IgM positive cases, 14 were IgG and PCR positive, while 2 were only PCR positive and 2 only IgG positive.

#### DISCUSSION

The present study was intended to test the interest of PCR diagnosis for Chagas' disease in a situation of active transmission. It complements previous studies carried out in areas where transmission was stopped. In these studies the sensitivity of PCR, when compared to serology (IgG detection), was found to be dependent on the level of parasitaemia observed with the strains circulating in each area. It reached 45, 60 and 96.5% for 3 Brazilian regions where the circulating strains gave rise to low, intermediate and high parasitaemia, respectively (Britto *et al.* 1995b;

Junqueira *et al.* 1996; Wincker *et al.* 1994a). The results of the present study demonstrate that we can expect a high degree of sensitivity in an active transmission area. This result may be related to a high frequency of re-infection, to the low immune status of the patients (perhaps in relation with their poor living conditions) or to the genetic constitution of the *T. cruzi* strains circulating in the area. It is worth noting that in the 3 Brazilian areas mentioned above, the transmission had been stopped and therefore the hypothesis of frequent reinfections was not applicable. On the contrary, it is known that experimental infections with different clones of *T. cruzi* induced different patterns of parasitaemia (Sanchez *et al.* 1990; Laurent, 1994). This supports the hypothesis of a variation of parasitaemia rates in human relating in part to the genetic constitution of *T. cruzi* clones. Further work is needed to address these points.

Taken together, all these previous results indicate that PCR, although not sufficiently sensitive to be used for Chagas' disease diagnosis alone, is the best complementary technique to serology for this purpose. Its very high specificity is also an advantage for the diagnosis of difficult cases, e.g. patients with a borderline response in serology. With the data obtained in the present work, we can discuss for the first time the interest of the PCR test for the early diagnosis of Chagas' disease. The high specificity and sensitivity of PCR are particularly important for recent infections, as the drugs presently in use for Chagas' disease treatment are much more efficient in the acute phase than in the chronic phase (De Castro, 1993). A rapid and sensitive diagnosis is therefore needed to decide the start-up of the treatment. Acute stage or initial infection is commonly defined by the presence of circulating parasites evidenced by direct parasitological examination which is difficult and depends on the microscopist. An alternative is the detection of specific anti-*T. cruzi* IgM antibodies, as these appear 3–4 days after infection, present a peak around 15–20 days later and decrease progressively (Braun & Titto, 1985). Specific IgG antibodies are detectable 10–15 days after infection (Vattuone, Szarfman & Gonzalez-Cappa, 1978; Schmunis *et al.* 1980). Consequently, patients presenting IgM antibodies associated or not with specific IgG, are considered in the initial stage of the infection. In this last group of patients, the sensitivity of the PCR test was low (57.1%). This may indicate that PCR is of low interest for the diagnosis of these cases or, alternatively, that the specificity of the IgM detection may be low and had led to some false-positive results.

The single case of a PCR-positive individual who remained negative with all other techniques may be explained either by DNA contamination, or a very recent infection not detected otherwise or a patient presenting specific immune suppression (Brenière *et*

*al.* 1984). DNA contamination is extremely unlikely, as the PCR test was carried out in duplicate after 2 independent DNA extractions and was positive in both assays. A long-term follow-up of this individual will be necessary to discriminate among these hypotheses.

The analysis of the different tests obtained among the 268 patients permits proposal of a kinetic model for specific antibodies and parasitaemia: first synthesis of IgM (few days after infection) followed by synthesis of IgG and later increase of parasitaemia. This model explains 264 cases out of 268. In particular, we observed 10 patients with positive IgM alone, 15 patients with positive IgG and IgM but with negative direct parasitaemia (buffy coat) and finally, out of 12 patients with a positive buffy coat, 8 presenting already IgG positivity without IgM positivity. If the rise in parasitaemia occurred before or simultaneously with IgG synthesis the last 2 groups would remain difficult to explain. According to this model, the PCR test would fail to diagnose only the earliest cases of infection (positive IgM antibodies alone). This work must be complemented by a follow-up of young populations presenting IgM antibodies to assess the interest of this marker compared with PCR in detecting early cases of Chagas' disease.

An overt advantage of the PCR detection of *T. cruzi* in blood over other methods of parasite detection as buffy coat examination, haemoculture or xenodiagnosis, is the gain of sensitivity, consistently documented in all studies performed to date. This is particularly important for epidemiological surveys, as the samplings carried out with classical methods were probably biased towards the fastest-growing strains isolated after a culture step. With the PCR test used in the present study, an amplified product corresponding to the minicircle content of a whole infective population of parasites can be obtained. Recent studies have shown that these amplified products could be useful as hybridization probes to study the strains infecting a particular patient (Britto *et al.* 1995b) or to look at the triatomine population in which a particular strain is circulating (Brenière *et al.* 1992, 1995). A future development of the present work would be the application of such hybridization techniques to study the *T. cruzi* strains involved in current transmission.

This investigation received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (contracts n° 910273 and 910276), PAPES-Fiocruz, CNPq and FINEP.

#### REFERENCES

- ALVAREZ, M., CERISOLA, J. A. & ROHWEDER, R. W. (1968). Test de inmunofluorescencia para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bolletín Chileno de Parasitología* 23, 4–9.

- AVILA, H. A., SIGMAN, D. S., COHEN, L. M., MILLIKAN, R. C. & SIMPSON, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **48**, 211–222.
- AVILA, H. A., BORGES PEREIRA, J., THIEMANN, O., DE PAIVA, E., DEGRAVE, W., MOREL, C. M. & SIMPSON, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 2421–2426.
- AZNAR, C., LOPEZ-BERGAMI, P., BRANDARIZ, S., MARIETTE, C., LIEGEARD, P., ALVES, M. DE C. DE D., BARRIERO, E. L., CARRASCO, R., LAFON, S., KAPLAN, D., MIGUEZ, H., CAMACHO, C., LEVITUS, G., LEVIN, M. J. & HONTEBEYRIE, M. (1995). Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **12**, 231–238.
- BRAUN, M. & TITO, E. (1985). Respuesta immune al *Trypanosoma cruzi*. Un enfoque de patogenia en la enfermedad de Chagas. *Acta Physiologica Pharmacologica Latinoamericana* **35**, 1–47.
- BRENIÈRE, S. F., CARRASCO, R., MIGUEZ, H., LEMESRE, J. L. & CARLIER, Y. (1984). Comparison of immunological tests for serodiagnosis of Chagas disease in Bolivian patients. *Tropical and Geographical Medicine* **37**, 231–238.
- BRENIÈRE, S. F., BOSSENO, M. F., REVOLLO, S., RIVERA, M. T., CARLIER, Y. & TIBAYRENC, M. (1992). Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 335–341.
- BRENIÈRE, S. F., BOSSENO, M. F., TELLERIA, J., CARRASCO, R., VARGAS, F., YAKSIC, N. & NOIREAU, F. (1995). Field application of PCR diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **53**, 179–184.
- BRITTO, C., CARDOSO, M. A., WINCKER, P. & MOREL, C. M. (1993). A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **88**, 171–172.
- BRITTO, C., CARDOSO, M. A., MONTEIRO VANNI, C., HASSLOCHER-MORENO, A., XAVIER, S. S., OELEMANN, W., SANTORO, A., PIRMEZ, C., MOREL, C. M. & WINCKER, P. (1995a). Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* **110**, 241–247.
- BRITTO, C., CARDOSO, M. A., RAVEL, C., SANTORO, A., BORGES PEREIRA, J., COURA, J. R., MOREL, C. M. & WINCKER, P. (1995b). *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and non-radioactive hybridization. *Experimental Parasitology* **81**, 462–471.
- CAMARGO, M. E. (1992). An appraisal of Chagas' disease serodiagnosis. In *Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine* (ISBT Brazil 1992. ed.) pp. 165–178. ISBT, Sao Paulo.
- CHIARI, E., DIAS, J. C. P., LANA, M. & CHIARI, C. A. (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **22**, 19–23.
- CHOU, Q., RUSSELL, M., BIRCH, D. E., RAYMOND, J. & BLOCH, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy number amplifications. *Nucleic Acids Research* **20**, 1717–1723.
- DE CASTRO, S. L. (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **53**, 83–98.
- JUNQUEIRA, A. C. V., CHIARI, E. & WINCKER, P. (1996). Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease patients in a north-eastern endemic region of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **90**, 129–132.
- LA FUENTE, C., SAUCEDO, E. & URGEL, R. (1984). The use of microhaematocrit tubes for the rapid diagnosis of Chagas' disease and malaria. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **78**, 278–279.
- LAURENT, J. P. (1994). Comparaison des proprietes biologiques de differents clones naturels de *Trypanosoma cruzi*. Theses sciences, Université Montpellier II, France.
- MONCAYO, A. (1993). Chagas' disease. In *TDR Eleventh Programme Report*, pp. 67–75. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- MOSER, D. R., KIRCHHOFF, L. V. & DONELSON, J. E. (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 1477–1482.
- SANCHEZ, G., WALLACE, M., OLIVARES, M., DIAZ, N., AGUILERA, X., APT, W. & SOLARI, A. (1990). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: *in vitro* differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. *Experimental Parasitology* **71**, 125–133.
- SCHMUNIS, G. A., SZARFMAN, A., COARASA, L., GUILLERON, C. & PERALTA, J. M. (1980). Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **29**, 170–178.
- STURM, N., DEGRAVE, W., MOREL, C. M. & SIMPSON, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 205–214.
- TAIBI, A., GUEVARA-ESPINOSA, A., SCHÖNECK, R., YAHIAOUI, B. & OUAISSI, A. (1995). Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification of polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology* **111**, 581–590.
- VATTUONE, N. H., SZARFMAN, A. & GONZALEZ-CAPPA, S. M. (1978). Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute Chagas' disease. A following up study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **27**, 473–477.
- WINCKER, P., BRITTO, C., BORGES PEREIRA, J., CARDOSO, M. A., OELEMANN, W. & MOREL, C. M. (1994a). Use of

a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51**, 771-777.

WINCKER, P., BOSSENO, M. F., BRITTO, C., YAKSIC, N.,

CARDOSO, M. A., MCREL, C. M. & BRENIERE, S. F. (1994). High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiology Letters* **124**, 419-424.

## Different Behavior of Two *Trypanosoma cruzi* Major Clones: Transmission and Circulation in Young Bolivian Patients

Simone Frédérique Brenière,<sup>\*1</sup> Marie-France Bosseno,<sup>\*</sup> Jenny Telleria,<sup>\*</sup> Brigitte Bastrenta,<sup>\*</sup> Nina Yacsik,<sup>†</sup> François Noireau,<sup>‡</sup> Jose-Luis Alcazar,<sup>§</sup> Christian Barnabé,<sup>\*</sup> Patrick Wincker,<sup>¶2</sup> and Michel Tibayrenc<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>UMR CNRS/ORSTOM No. 9926, BP5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France; <sup>†</sup>Universidad Mayor de San Andres, IBBA, Instituto Boliviano de Biología de Altura, CP 641, La Paz, Bolivia; <sup>‡</sup>ORSTOM, Institut Français de Recherche pour le Développement en Coopération, CP 9214, La Paz Bolivia; <sup>§</sup>Universidad Mayor de San Simon, Cochabamba, Bolivia; and <sup>¶</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Brenière, S. F., Bosseno, M.-F., Telleria, J., Bastrenta, B., Yacsik, N., Noireau, F., Alcazar, J.-L., Barnabé, C., Wincker, P., and Tibayrenc, M. 1998. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: Transmission and circulation in young Bolivian patients. *Experimental Parasitology* 89, 285-295. Specificity of two widespread *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes or "clonets" (20 and 39) was first analyzed by hybridization with a large set of *T. cruzi* stocks characterized by multigenic study relying on both MLEE and RAPD. Then, these clonets were detected in the blood of Chagasic children from a Bolivian endemic area by a combination of polymerase chain reaction and clonet-specific DNA hybridization. The distribution of these clonets in patients was significantly different from that observed in the vectors of the same area (*Triatoma infestans*). In vectors, clonets 20 and 39 are found with comparable frequencies (0.69 and 0.67, respectively) in contrast with patients, in whom clonet 20 and mixed infections exhibit low frequencies. The Chagasic population can be divided into acute infections and latent infections above the accepted criterion of parasitemia (direct microscopic examination). The results suggest a limited selection in the transmission of the two clonets and a further drastic control of clonet 20 parasitemia by the immune system of children patients. © 1998 Academic Press

**Index Descriptors and Abbreviations:** *Trypanosoma cruzi*; *Triatoma infestans*; Chagas disease; clones; PCR; MLEE; RAPD; human transmission.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomedicas, AP 70 228, Mexico City 04510, Mexico.

<sup>2</sup>Present address: Laboratoire Génome des Parasites, Faculté de Médecine, 34000 Montpellier, France.

## INTRODUCTION

*Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, exhibits in nature a high genetic variability, as widely demonstrated by different genetic markers (Miles 1983; Tibayrenc and Ayala 1988; Gibson and Miles 1986; Solari *et al.* 1992; Steindel *et al.* 1993; Tibayrenc *et al.* 1993). The *T. cruzi* populations have a basically clonal population structure (Tibayrenc *et al.* 1986), but genetic exchange may occur in a particular sylvatic cycle (Carrasco *et al.* 1996). The term "clonet" was proposed by Tibayrenc and Ayala (1991) to identify all isolates that appear identical in a clonal species with a given set of genetic markers. The "clones" delimited in *T. cruzi* by either isoenzyme characterization or random primer amplified DNA (RAPD) fingerprinting should rather be considered "clonets." Some clonets appeared widespread and abundant and were named "major clones" (Tibayrenc and Brenière 1988). Lastly, several authors proposed the existence of two major lineages of *T. cruzi* (Tibayrenc 1995; Souto *et al.* 1996).

Previously, we designed a molecular clonet identification based upon variable region of minicircle kDNA polymerase chain reaction (PCR) followed by Southern hybridization with clonet-specific kDNA probes of 248 bp (Brenière *et al.* 1992). Probe 20 identified stocks attributed to clonet 20 and certain stocks attributed to clonet 19, whereas probe 39 identified stocks attributable only to clonet 39 [numbering

according to Tibayrenc *et al.* (1986)]. The direct identification and characterization of *T. cruzi* clonets circulating in the principal vector of Chagas disease in Bolivia (*Triatoma infestans*) with these probes revealed the actual frequencies of these clonets in the Bolivian domestic cycle and demonstrated an appreciable incidence of mixed infections (Brenière *et al.* 1995; Bosseno *et al.* 1996). A preliminary study also detected the presence of mixed infections in certain patients (Bosseno *et al.* 1995). People living in endemic areas are probably submitted to various reinfections that increase the number of mixed infections detectable in the course of the disease. Nevertheless, the medical consequences of mixed infections in human beings remain to be determined. We applied a modified PCR technique for amplification in blood samples of the variable kDNA minicircles and obtained an optimal sensitivity of this technique compared with conventional serology (Wincker *et al.* 1994).

Chagas disease is a long-persisting chronic infection starting with an acute period lasting 1 or 2 months, in which parasites can be detected in blood by direct microscopic observation. Then the infection becomes latent for a long period in which parasitemia is subpatent. Several factors may take part in the control of parasites, and antibodies seem to play an essential role. Antibodies against *T. cruzi* are able to lyse trypomastigotes and partly block parasite penetration of host cells (Krettli and Brener 1982).

Medical and biological properties of different clonets are poorly documented, although significant biological differences between clonets are observed *in vitro* and *in vivo* (Sanchez *et al.* 1990; Laurent *et al.* 1997; Revollo *et al.* in press).

Given the existence in the Bolivian domestic cycle of two principal clonets (20 and 39), the aim of this work was to improve the direct detection of the major clonets in the blood of young children and to compare their frequencies with those found in *T. infestans* vectors.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients.** A population of 270 school-age children from 5 to 10 years old living in the community of Mizque (Cochabamba department), a high endemic Chagas disease area, was simultaneously screened for parasitological and serological diagnosis as well as PCR-based detection. Then 137 of 270 products of amplification, including PCR positive (93) and negative products randomly selected, were Southern hybridized to detect clonets 20 and 39. The parasitemia of these cases was individually controlled by using four buffy coat tubes (BC test, La Fuente *et al.* 1984) for examination. None of these children presented clinical symptoms suggesting a Chagas acute phase.

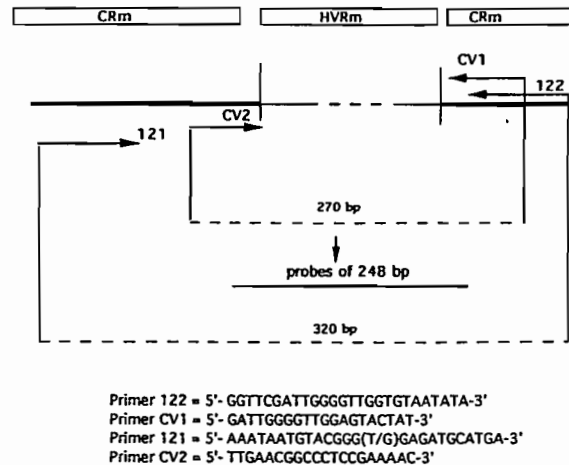
**Vectors.** A sample of 128 *Triatoma infestans* was captured from 11 domestic and peridomestic sites in the community of Mizque during

the study of the human population. We also captured from various sites 1013 *T. infestans* in four other locations in the Cochabamba department (Ailquile, Quiroga, and Capinota communities and Cochabamba city). The sex of the adults and the nymphal instars was determined for each insect. To detect *T. cruzi* infection, a drop of feces from each insect was mixed with phosphate-buffered saline and microscopically observed for 5 min at an  $\times 400$  magnification.

**Serological diagnosis.** Four assays were used for detection of specific IgG antibodies according to the protocol communicated by Wincker *et al.* (1997): hemagglutination (HEMAVE test, Polychaco, Buenos Aires, Argentine), immunofluorescence (IF), and two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAS) performed in two different laboratories, with the use of crude antigens obtained from epimastigote lysis forms. The diagnosis was based on positivity or negativity of three of four tests.

**Polymerase chain reaction diagnosis.** The procedure for PCR of fecal samples was according to Brenière *et al.* (1995) with the use of primers CV1 and CV2 (Genset Laboratory, Paris, France), chosen to amplify the hypervariable region of kDNA minicircles (HVRm, Fig. 1). The PCR was applied to microscopically positive feces samples collected in the different localities as well as to negative controls and certain fecal negative microscopic samples.

The PCR procedure in blood was performed in duplicate according to the method described by Wincker *et al.* (1994). The amplification was performed with oligonucleotide primers 121 and 122 (Britto *et al.* 1995), chosen also to amplify the hypervariable region of kDNA minicircles (HVRm). Figure 1 shows the annealing positions of the two sets of primers and their sequences. According to previous experiments, the first set of primers (CV1 and CV2) is useful for direct detection of clones in feces of vectors (Brenière *et al.* 1995), and the second set of primers (121 and 122) appears more sensitive in blood samples (unpublished data). The two sets of primers were also used to amplify the variable regions of minicircles from total DNAs (10 ng) of 45 *T. cruzi* reference stocks characterized by genetic markers



**FIG. 1.** Diagram of a segment of minicircle of kinetoplast DNA. CRm, conserved region of minicircle; HVRm, hypervariable region of minicircle. Arrows indicate the relative hybridization locations of the CV1 and CV2 set of primers and the 121 and 122 set of primers, which give 270-bp and 320-bp products, respectively. Probes 20 and 39 used in this work (248 bp) are purified from the 270-bp products.

(see later discussion). PCR products were analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose gels in TAE  $\times$  0.5 and visualized by ethidium bromide staining.

**Southern blot.** One-tenth of each PCR sample was electrophoresed on an 0.8% agarose in TAE  $\times$  0.5 gel that was alkali denatured (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl, twice for 15 min each) and then transferred onto charged nylon membranes (Hybond N+; Amersham, Buckinghamshire, U.K.) by vacuum blotting. For the vacuum transfer, the gel was placed on a prewet membrane, with filter paper followed by a piece of diaper below. This "sandwich" was covered with plastic wrap and placed on a gel dryer (Bio Rad, Paris, France), and vacuum was applied for 10 min without heat. Each membrane included negative controls and two PCR positive controls corresponding to clonets 20 and 39.

**Probes.** Two clonet-specific probes (numbered 20 and 39) were purified from their respective HVRm DNA fragments produced by the PCR (CV1 and CV2 set of primers) from two *T. cruzi* reference stocks—namely, TPK1, attributed to clonet 39, and S034 c14, attributed to clonet 20 (Brenière *et al.* 1992). The DNA was digested with restriction endonucleases *Sau* 96 I and *Sca* I (Promega, Madison, WI) to eliminate part of the oligonucleotide primers selected in the conserved region of the minicircle.

**Labeling and hybridization conditions.** Membranes were hybridized by using the enhanced chemiluminescence gene detection system (ECL, Amersham, Buckinghamshire, U.K.). Probes were labeled according to the manufacturer's recommendations for ECL. Briefly, the membranes were incubated at 42°C in hybridization buffer (0.12 ml/cm<sup>2</sup>) for 15 min. Each of the purified probes was labeled for 10 min at 37°C. Ten nanograms of labeled probe per milliliter of hybridization buffer was added to the membranes. Hybridization was performed at 42°C overnight in a rotating oven. The membranes were washed twice under highly stringent conditions (6 M urea, 0.1 SSC at 42°C for 20 min) and then twice in 2  $\times$  SSC at room temperature for 10 min. Two exposures were performed (1 and 30 min) on Hyperfilm-MP (Amersham, Buckinghamshire, U.K.).

**Genetic characterization of reference stocks.** Table I summarizes the times of isolation, places, and hosts of the 45 stocks. Among them, 30 were previously characterized by 15–22 isoenzyme loci (Tibayrenc and Ayala, 1988; Brenière *et al.* 1989; Brenière *et al.* 1991; Lewicka *et al.* 1995) and were selected to give a reliable picture of genetic diversity within *T. cruzi*. To diversify the host and geographical origin of the sample, the others stocks were selected. Stocks were sampled from nine different countries (Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, French Guyana, Honduras, Mexico, the United States, and Venezuela) and were isolated from various vectors, human and sylvatic mammals. Parasites were bulk-cultured in LIT medium and harvested by centrifugation. Genetic characterization was performed with a total of 22 isoenzyme loci and by RAPD fingerprinting with the use of seven 10-mer primers. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) was carried out on cellulose acetate plates according to Ben Abderrazak *et al.* (1993). The following 20 enzyme systems were used: aconitase (ACON, EC 4.2.1.3), alanine aminotransferase (ALAT, EC 2.6.1.2), diaphorase (DIA, EC 1.6.\*.\*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD, EC 1.2.1.12), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT, EC 2.6.1.1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49), glucose phosphate isomerase (GPI, EC 5.3.1.9), glutamate dehydrogenase NAD<sup>+</sup> (GDH NAD<sup>+</sup>, EC 1.4.1.2), glutamate dehydrogenase NADP<sup>+</sup> (GDH NADP<sup>+</sup>, EC 1.4.1.4), isocitrate dehydrogenase (IDH, EC 1.1.1.42), leucine aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11. or 13.\*.\*), malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40), mannose phosphate isomerase (MPI, EC 5.3.1.8), nucleoside hydrolase (inosine) (NHi, EC 2.4.2.\*.\*), peptidases

(substrates: l-leucylleucineleucine and l-leucyl-l-alanine) (PEP, EC 3.4.11. or 13.\*.\*), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44), phosphoglucomutase (PGM, EC 2.7.5.1.), and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1). For the RAPD analysis, seven 10-mer primers, A1, A2, A4, A7, A9, A10, and A19 (Appligene, Illkirch, France), were used, and conditions were as published in Williams *et al.* (1990) and recommended by Boehringer (Mannheim, France) supplier of the Taq DNA polymerase. Briefly, amplification reactions were performed in a volume of 60  $\mu$ l containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.001% gelatine, 10  $\mu$ M each of dNTP, 0.2  $\mu$ M primer, 10 ng of genomic DNA, and 0.6 U of Taq DNA polymerase. After mixing, the tubes were placed in a PTC 100, MJ Research Inc. thermal cycler for 45 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 36°C, and 2 min at 72°C. A final extension was performed at 72°C for 7 min. Each protocol included controls without DNA template. Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.6% agarose gels and detected by staining with ethidium bromide. The conditions were optimized to obtain reproducible patterns.

**Data analysis.** Each RAPD reproducible gel band was coded with a number, starting with 1 for the slowest band (largest DNA fragment). Each stock was thus represented by a set of numbers for each primer. A matrix of presence and absence of each band was deduced from these data for all stocks. The same method was used for the generation of MLEE matrix.

Variability among stocks was estimated by Jaccard's phenetic distances for both MLEE and RAPD (Jaccard, 1908; Tibayrenc *et al.* 1993). The correlation between the two sets of similarity index (Jaccard's distances) was estimated by the Mantel *t*-test (Mantel, 1967).

Genetic variability among stocks was also estimated by patristic distances calculated from one matrix (presence or absence) joining RAPD and MLEE matrixes. Phylogenetic relationships among the stocks were visualized by a minimum-length unrooted Wagner network (Farris 1970; Felsenstein 1978). The support of each node was tested by a bootstrap analysis (Felsenstein 1985).

Comparison of the clonet frequencies were performed by the  $\chi^2$  statistical test.

## RESULTS

**Overall phylogenetic diversity.** MLEE and RAPD data gave congruent results, shown by similar topologies of the two dendrograms obtained from Jaccard's distances generated by each method (data not shown). Moreover, a significant correlation between distances was evidenced by the Mantel correlation test ( $P < 10^{-4}$ ). Practically, this means that stocks that appear to be closely related by the use of isoenzymes tend statistically to be closely related when RAPD fingerprinting is used, and conversely. The minimum-length unrooted Wagner network constructed from a unique matrix plotting MLEE and RAPD data (29 loci) is presented in Fig. 2. The stocks are clustered in two groups genetically distant—namely, 1 and 2—except stocks A0087 and A0083 isolated from sylvatic mammals, the taxonomic identity of which remains to be determined. Bootstrap analysis shows

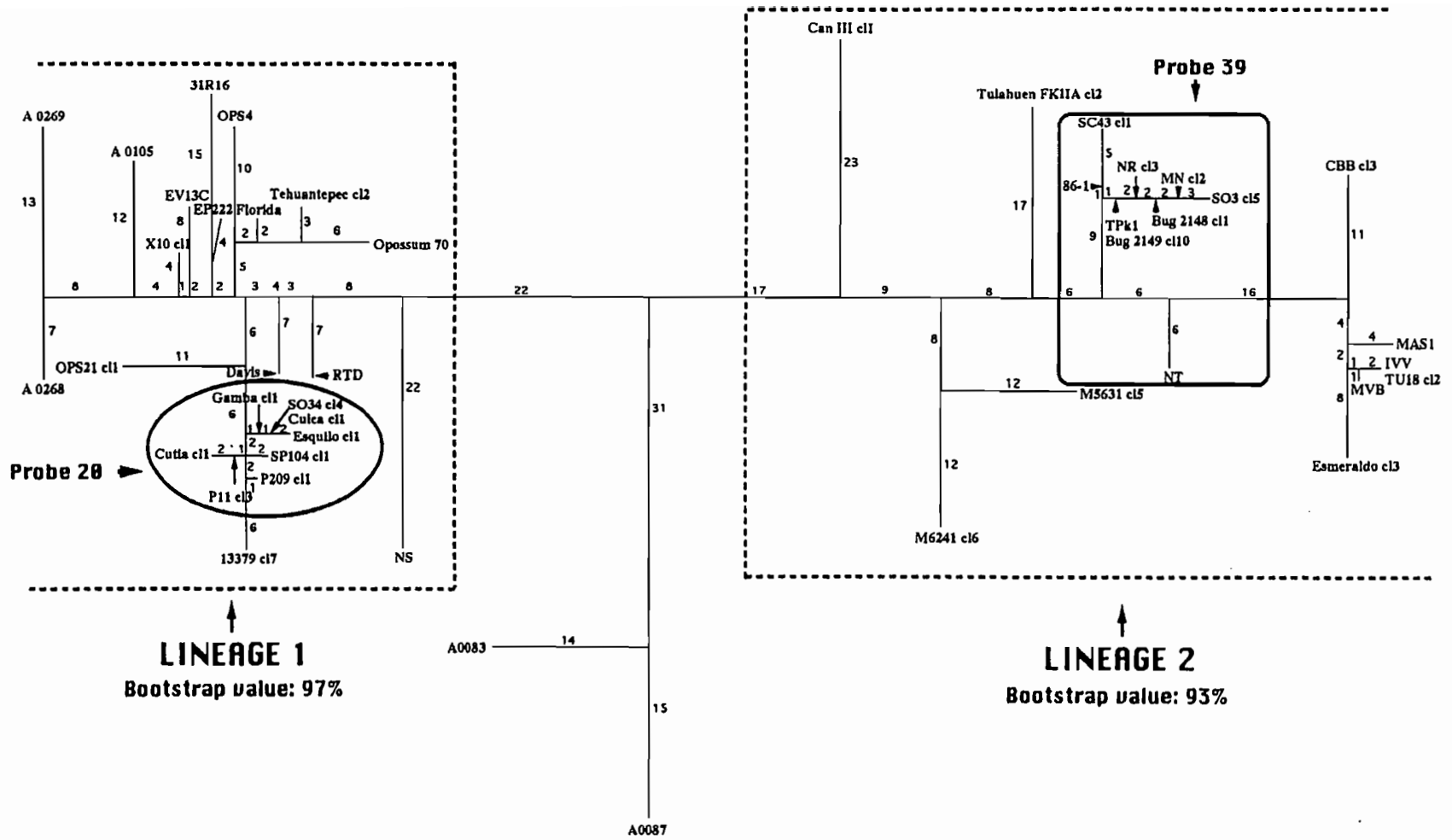
TABLE I

Geographic Origin, Code Number, Date of Collection, and Host of the 45 *Trypanosoma cruzi* Stocks Studied by Isoenzyme and RAPD Genetic Markers

Stock	Host	Locality	Date	MLEE**
Cutia c11*	<i>Dasyprocta aguti</i>	Esperito Santo, Colatina, Brazil		1
Cuica c11*	<i>Philander opossum</i>	São Paulo, Riberao Preto, Brazil	nk	1
SO34 c14*	<i>Triatoma infestans</i>	Potosi, Toropalca, Bolivia	7/86	3
Gamba c11*	<i>Didelphis azarae</i>	São Paulo, Riberao Preto, Brazil	nk	1
P11 c13*	Human	Cochabamba, Cochabamba, Bolivia	2/80	2
Esquilo c11*	<i>Sciurus aestuans ingrami</i>	São Paulo, Franca, Brazil	nk	1
SP104 c11*	<i>Triatoma spinolai</i>	IVa region, Combaralá, Chile	nk	ND
P209 c11*	Human	Chuquisaca, Sucre, Bolivia	9/83	2
13379 c17*	Human	Santa-Cruz, Santa-Cruz, Bolivia	79	1
EV 13-C	<i>Rodnius prolixus</i>	Meta, Calaguala, Colombia	81	ND
RTD	<i>Didelphis marsupialis</i>	Tolima, Coyaima, Colombia	nk	ND
EP222	<i>Rodnius prolixus</i>	Casanare, Cravo Sur, Colombia	79	ND
X10 c11 Z1*	Human	Para, Belem, Brazil	nk	1
Florida	<i>Triatoma sanguisuga</i>	Gainesville, FL, U.S.A.	nk	ND
Tehuantepec c12*	Triatominae	—, Mexico	38	1
Davis	<i>Triatoma dimidiata</i>	—, Tegucigalpa, Honduras	83	ND
OPS21 c11*	Human	Cojedes, Macuayas, Venezuela	6/77	1
OPS4	<i>Didelphis marsupialis</i>	Carabobo, El Yagual, Venezuela	12/76	1
Opossum 70	<i>Didelphis marsupialis</i>	New Orleans, Crown Point, U.S.A.	70	ND
A0105	<i>Didelphis marsupialis</i>	—, Cacao, French Guyana	4/83	1,4
31R16	Human	Santa-Cruz, Santa-Cruz, Bolivia	83	1
NS	Human	Sucre, Galeras, Colombia	nk	ND
A0269	<i>Philander opossum</i>	—, Cacao, French Guyana	86	4
A0268	<i>Philander opossum</i>	—, Cacao, French Guyana	86	4
CBB c13*	Human	IVa region, Tulahuén, Chile	nk	3
MAS1	Human	Brazilia, —, Brazil	nk	ND
IVV	Human	IVa region, —, Chile	nk	ND
TU18 c12*	<i>Triatoma infestans</i>	Potosi, —, Bolivia	nk	ND
MVB	Human	IVa region, —, Chile	nk	ND
Esmeraldo c13 Z2*	Human	Bahia, Sao Felipe, Brazil	nk	1
NT	Human	IVa region, Chilpepin, Chile	nk	ND
SO3 c15*	<i>Triatoma infestans</i>	Potosi, Otavi, Bolivia	6/86	3
MN c12*	Human	IVa region, —, Chile	nk	3
SC43 c11*	<i>Triatoma infestans</i>	Santa-Cruz, Santa-Cruz, Bolivia	5/81	1
86-1	not known	Santa-Cruz, Santa-Cruz, Bolivia	nk	ND
Bug 2149 c110*	<i>Triatoma infestans</i>	Rio Grande do Sul, —, Brazil	nk	1
NR c13*	Human	IIIa region, Salvador, Chile	nk	3
TPK1	<i>Triatoma infestans</i>	La Paz, Khala Khala, Bolivia	10/86	3
Bug 2148 c11*	<i>Triatoma infestans</i>	Rio Grande do Sul, —, Brazil	nk	ND
Tulahuen FKIIA c12*	Human	IVa region, Tulahuén, Chile	nk	1
M5631 c15*	<i>Didelphis novemcinctus</i>	Pará, Selvaterra, Brazil	nk	1
M6241 c16*	Human	Pará, Belém, Brazil	nk	1
Can III c11 Z3*	Human	Pará, Belém, Brazil	nk	1
A0083	<i>Didelphis marsupialis</i>	—, Montsinery, French Guyana	82	4
A0087	<i>Didelphis marsupialis</i>	—, Montsinery, French Guyana	82	4

\*Laboratory cloned stocks

\*\*Previous isoenzyme characterization for 15–20 gene loci, 1, Tibayrenc and Ayala (1988); 2, Brenière *et al.* (1989); 3, Brenière *et al.* (1991); 4, Lewicka *et al.* (1995), ND, not done, nk, not known.



**FIG. 2.** A minimum-length unrooted Wagner network of 437 steps linking 45 stocks of *Trypanosoma cruzi* analyzed by MLEE and RAPD together. The name of each stock is given at each terminal point branch. The numbers along the branches are the patristic (evolutionary) steps. The circles indicate the groups of stocks recognized by probes 20 and 39, respectively.

that groups 1 and 2 occurred 97 and 93 times out of 100 replicates, respectively. This result supports the existence of two major phylogenetic lineages, as previously proposed (Tibayrenc, 1995). Nevertheless, each lineage is composed of stocks presenting high diversity. Bootstrap analysis shows that, within each lineage, some stocks are gathered together with a high probability. It is worth noting that, in lineage 1, nine stocks (SP104 c11, Cutia c11, P11 c13, 13379 c17, P209 c11, Cuica c11, Esquilo c11, SO34 c13, and Gamba c11) are truly gathered; this group occurred 82 times out of 100 replicates. In lineage 2, we observed six stocks (IVV, TU18 c12, MVB, Esmeraldo c13, MAS1, and CBB c13) and eight stocks (TPK1, Bug 2149 c110, NR c13, SO3 c15, MN c12, Bug2148 c11, 86-1, and SC43 c11) clustered with probabilities of 92% and 89%, respectively.

**Specificity of probes 20 and 39.** The hybridization patterns of the PCR products of DNA reference stocks generated by each set of primers (CV1 and CV2, 121 and 122) were identical. Thus, any of these primers can be used for direct detection of clonets 20 and 39 in biological samples.

For either probe 20 or probe 39, each hybridization pattern was restricted to a limited number of stocks, and we did not observe any cross-reaction between the probes (Fig. 2). Except for stock 13379 c17, probe 20 hybridized all closely related stocks, which fall into a specific cluster, as evidenced by the Wagner network and the bootstrap analysis (Fig. 2). Similarly, probe 39 hybridized stocks gathered with a high probability and the NT outside group stock.

**Identification of clonets 20 and 39 in vectors.** All investigated areas are situated in Cochabamba department, where *T. infestans* is well established in domestic and peridomestic sites. The infection rates of the triatomines determined by microscopic observation were 42.6% for the entire population and were even high (30.2%) in the urban area of Cochabamba city (Table II). Hybridization results obtained after transfer of the PCR positive products of fecal samples onto membranes are summarized in Table II. All positive PCR samples showed a major band of 270 bp previously demonstrated to be specific for the *T. cruzi* species (Veas *et al.* 1991). Three different hybridization patterns were observed: (1) samples positive with either probe 20 or probe 39; (2) samples positive with both probes (mixed infections); and (3) samples negative with both probes. The control samples were all PCR and hybridization negative as expected.

In the Mizque community, the frequencies of clonets 20 and 39 were 0.69 and 0.67, respectively, of which 43.1% were mixed infections. The vast majority of the insects appeared to be infected by clonet 20 or 39 or both. However, four samples (7.8%) were not recognized by either of the two

probes, suggestive of the presence of other clonal genotypes, whose taxonomic identity remains to be determined.

In the other localities of the Cochabamba department, we also observed similar frequencies of clonets 20 and 39, except in the Capinota region, where clonet 20 appeared to be more frequent than clonet 39. Mixed infections also were abundant, ranging from 31.1% to 85.7% in the locality of Quiroga. In these other locations, 7.4% of the insects were probably infected by other clones (samples that are not recognized by probe 20 or 39). This percentage is similar to that found in the locality of Mizque. In the whole population, clonet distribution was analyzed according to sex and nymphal instars by the  $\chi^2$  test (Table III). The results suggest an absence of clone selection according to sex or nymphal instars of the insect (Yates's corrected  $\chi^2 = 15.68$ ,  $df = 9$ ,  $P > 0.05$ ).

**Identification of clonets 20 and 39 in patients.** Among the 270 schoolchildren surveyed, 110 presented a positive IgG serology (40.7%); 1 gave a doubtful result (two positive tests and two negative tests). In the whole population, 12 (4.4%) children presented a positive direct parasitological diagnosis (buffy coat) and were considered recently infected (acute cases). One hundred six children were PCR (+) (39.2%), and the agreement between the two techniques (PCR and IgG serology) was 95.5%. The patient with doubtful results presented a PCR (+). Table IV presents the hybridization results of 137 PCR products including the majority of PCR (+) and 44 randomly selected PCR (-) products as hybridization control. We routinely prepared one negative control (a blood lysate from a normal person) and one positive control (a blood lysate from a positive Chagasic patient) for every five samples tested. Each DNA extraction was performed in duplicate for each patient, and PCR was performed independently on these two preparations; a typical result for a series of PCR tests is shown in Fig. 3. As for vector feces hybridization, we observed three different hybridization patterns (Fig. 4) that correspond to the identification of either clonet 20 or clonet 39 or both. The cases of PCR (+) with absence of recognition of amplified products by any of the two probes probably correspond to other clones genetically unrelated to clonets 20 and 39. Among the 44 PCR (-) products, 41 showed no hybridization, as expected (Table IV). Nevertheless, 3 of these PCR (-) samples were hybridized by probe 39. Two of them corresponded to patients with positive IgG serology (Chagasic patients). The hybridization step can be sensitive enough to detect amplified products not detectable by ethidium bromide staining. The third patient had a negative IgG serology and a contamination problem can be suspected. Among the 93 PCR (+) products, a large majority were hybridized by

TABLE II

Identification of Clonets 20 and 39 of *Trypanosoma cruzi* by Specific Probes in PCR-Amplified Feces of Vectors

Location	Microscopic Results		Clonet Identification, No. (%)				
	No.	% of Positive	No.	20 only	39 only	20 and 39	Neither 20 nor 39
Mizque	128	74 (57.8)	51	13 (25.5)	12 (23.6)	22 (43.1)	4 (7.8)
Ailquile	205	72 (35.1)	38	10 (26.3)	6 (15.8)	21 (55.3)	1 (2.6)
Quiroga	57	31 (54.4)	14	0 (0.0)	2 (14.3)	12 (85.7)	0 (0.0)
Capinota region	506	235 (46.4)	22	10 (45.5)	2 (9.1)	8 (36.3)	2 (9.1)
Cochabamba	245	74 (30.2)	74	23 (31.1)	20 (27.0)	23 (31.1)	8 (10.8)
Total	1141	486 (42.6)	199	56 (28.1)	42 (21.1)	86 (43.2)	15 (7.6)

probe 39 (85%). In only one patient did we identify clonet 20 alone, and 18.3% of the patients presented a mixture of the two clonets. Nine of 93 patients with PCR (+) presented a positive buffy coat (acute cases). Clonet distribution in this group therefore appears different from the clonet distribution in the group of patients with negative buffy coat (84 latent infections, Tables IV and V). The patients in the acute phase present a higher frequency of clonet 20 and of mixed infections (Yates's corrected  $\chi^2 = 12.8$  and  $= 14.0$ , respectively, with  $df = 1$  and  $P < 0.001$ ).

*Comparison of the clonet distribution in vectors and patients.* Table V summarizes the clonet identification in the vectors and in the patients of Mizque according to the stage of infection. The clonet distribution is radically different in vectors and in the entire population of patients ( $\chi^2 = 41.8$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0.0001$ ). Clonet 20, which is abundant in vectors (frequency = 0.69), is little represented in the blood circulation of patients (frequency = 0.19),  $\chi^2 = 35.4$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ . The number of mixed infections falls proportionally in patients,  $\chi^2 = 10.8$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ . A significant

increase in the percentage of patients infected by clonet 39 is observed ( $\chi^2 = 6.8$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.02$ ). In contrast, when we compared the distribution of the clonets in vectors and in the patients presenting a positive buffy coat (acute cases), we did not observe a significant difference between the respective infection rates by clonet 20 ( $\chi^2 = 0.01$ ,  $df = 1$ ,  $P > 0.05$ ). The clonet distribution in the group of latent infections is similar to that obtained for the entire population.

## DISCUSSION

*Phylogenetic specificity of probes 20 and 39.* The present results make it possible to have a better idea of the specificity of probes 20 and 39. As supported by the phylogenetic analysis with MLEE and RAPD on representative set of stocks, the

TABLE III

Instar Distribution of Clonets 20 and 39 in *T. infestans*.

	Clonet Identification No. (%)			
	Adults		Nymphs	
	Male	Female	Instars 1-4	Instar 5
20 only	14 (25.5)	14 (24.1)	18 (29.5)	5 (33.3)
39 only	8 (14.5)	13 (22.4)	15 (24.6)	6 (40.0)
20 and 39	30 (54.5)	29 (50.0)	20 (32.8)	4 (26.7)
Neither 20 nor 39	3 (5.5)	2 (3.5)	8 (13.1)	0 (0.0)
Total	55	58	61	15

Note.  $\chi^2 = 15.68$ ;  $df = 9$ ;  $P > 0.05$ .

TABLE IV

Identification of *Trypanosoma cruzi* Clonets 20 and 39 by Specific Probes in PCR Amplified Blood Samples of Mizque Infantile Population

PCR	Buffy Coat*	Clonet Identification, No. (%)**			
		No. 20 only	39 only	20 and 39	Absence of Recognition
+	+	9 0 (0.0)	3 (33.3)	6 (66.7)	0 (0.0)
	-	84 1 (1.2)	59 (70.2)	11 (13.1)	13 (15.5)
-	+	1 0 (—)	0 (—)	0 (—)	1 (—)
	-	43 0 (0.0)	3 (6.9)	0 (0.0)	40 (93.1)

\*Buffy coat, direct parasitological diagnosis by microscopical examination of four capillary interphases.

\*\* (—), not calculated (sample too small).

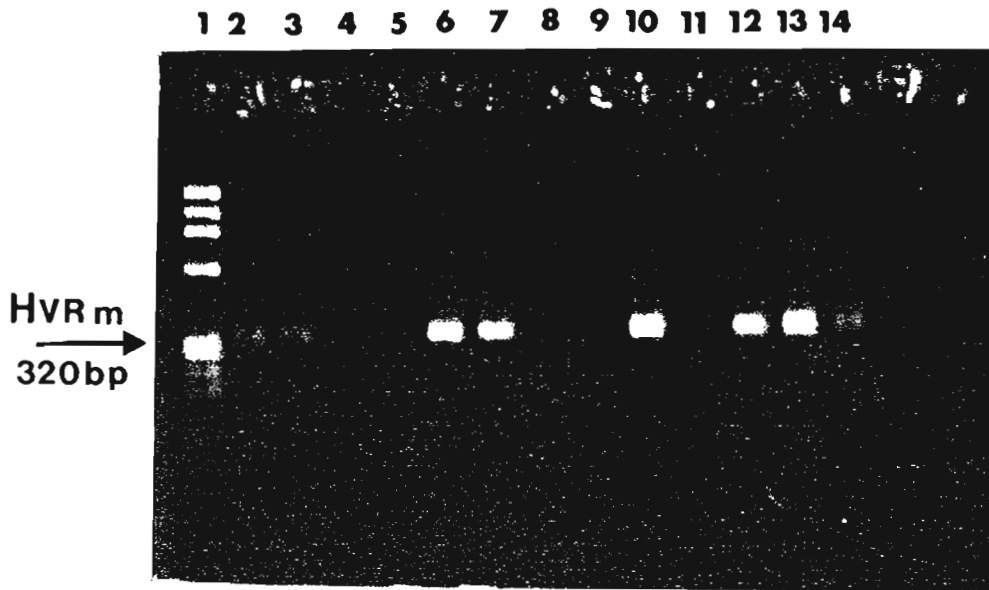


FIG. 3. Typical PCR-based diagnosis by using samples from five children of Mizque, processed and amplified in duplicate and revealed by ethidium bromide staining after migration on 2% agarose gel. Lane 1, *Hae* III digested OX 174 DNA. Lanes 8 and 9, negative control sample (from a non-Chagasic person processed together with the five children). Lanes 14, positive control (confirmed Chagasic patient). Lanes 2 and 3, 6 and 7, and 10 through 13, four different patients with a positive PCR-based diagnosis. Lanes 4 and 5, one patient with a negative PCR-based diagnosis.

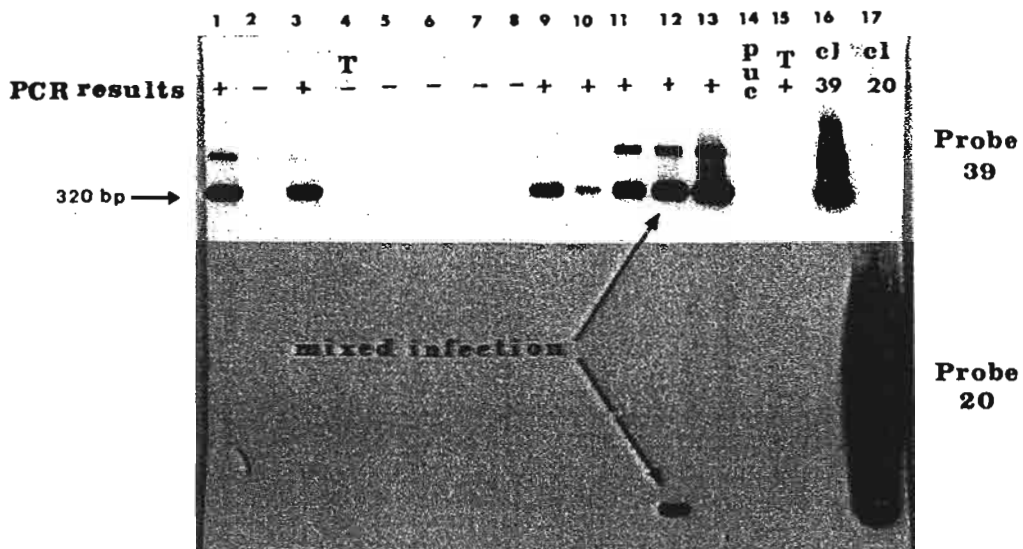


FIG. 4. Hybridization patterns of PCR products from 12 different children with clone-specific probes 20 (below) and 39 (above). Lane 4, negative control (from a non-Chagasic person). Lane 15, positive control (confirmed Chagasic patient with positive PCR); this patient is from Brazil and is not infected by clone 20 or 39. Lanes 16 and 17, positive controls, DNAs of reference *T. cruzi* stocks pertaining to natural clones 20 and 39, respectively. Lanes 1, 3, 9 through 11, and 13, patients presenting a positive PCR; the products are recognized only by probe 39. Lane 12, patient presenting a positive PCR; the products are recognized by both probe 20 and probe 39 (mixed infection). Lanes 2 and 5 through 8, patients presenting a negative PCR. Lane 14, DNA size marker *Rsa* I digested by *Puc* 19.

TABLE V  
Comparison of the Clonet Distribution in Vectors and Patients from the Mizque Locality

	Clonets Identification in			
	Vectors	Entire population of chagasic patients*	Acute cases	Latent infections
20 only	13 (25.5%)	1 (1.1%)	0 (—)	1 (1.2%)
39 only	12 (23.6%)	64 (67.4%)	3 (33.3%)	61 (70.9%)
20 + 39	22 (43.1%)	17 (17.8%)	6 (66.7%)	11 (12.8%)
Neither 20 nor 39	4 (7.8%)	13 (13.7%)	0 (—)	13 (15.1%)
Total	51	95	9	86
Frequency of clonet 20	0.69	0.19	0.67	0.14
Frequency of clonet 39	0.67	0.85	1.00	0.84

\*Includes the patients with positive PCR and the two patients with negative PCR but positive hybridization associated with positive IgG serology.

two probes specifically label delimited clusters that probably correspond to phylogenetic clades. Probes 20 and 39 should be equated to synapomorphic characters (derived characters that are common to all members of a given clade, and only to them). The two clonets appear to exhibit radically distinct biological properties and tend to behave as distinct taxa (Laurent *et al.* 1997; Revollo, 1995). Interestingly, other major clonets (32 and 33, see Tibayrenc *et al.* 1986) were also present in the set of stocks analyzed by MLEE and RAPD. They were not recognized by probes 20 and 39 (Veas *et al.* 1991), which corroborates the strict specificity of these probes. Agreement between MLEE and RAPD results, on the one hand, and kDNA probe results, on the other hand, confirms overall parallel evolution between nuclear and kinetoplast genomes (Tibayrenc and Ayala, 1988). These results do not favor the hypothesis that kDNA is similar to bacterial plasmids. Moreover, parallel results between nuclear (MLEE, RAPD) and kDNA (probes 20 and 39) markers indicate a strong linkage disequilibrium between the two sets of markers, which is additional evidence for clonal evolution in *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.* 1986; Tibayrenc 1995).

*Compared frequencies of clonets 20 and 39.* *Triatoma infestans* is the main vector in the domestic cycle in Bolivia, where it makes a steady active transmission of Chagas disease in various departments. In Cochabamba department, clonets 20 and 39 are always found frequently, as well as in the La Paz department, where we reported 65.8% and 56.9% of triatomines infected by clonets 20 and 39, respectively (Bosseno *et al.* 1996). Both clonets appear to be widespread over large geographical distances, because the localities surveyed in the La Paz and Cochabamba departments are about 400 to 600 km apart.

We observed a high discrepancy in the clonet distribution

in vectors and in patients of the Mizque community. If the null hypothesis of independent transmission and a lack of interaction between the two groups of clonets are assumed, similar distributions of the clonets in vectors and patients are expected. Several hypotheses could explain this discrepancy.

(1) *Temporal fluctuation of clonet frequencies in vectors.* The clonets were detected in vectors and patients simultaneously. Chagas disease is a long-lasting infection, and a majority of the patients were probably infected several years before the study. A different clonet distribution in vectors in the past could explain the discrepancy currently observed. Twelve years ago, Tibayrenc *et al.* (1986) reported in various locations of Bolivia and in Cochabamba department comparable high frequencies of the two clonets in vectors. This result and the lasting presence of the two clonets in vectors over large geographical distances support the absence of temporal fluctuations in the clonet frequencies in vectors.

(2) *Selection of a specific clonet in humans.* The selection of one specific clonet in patients should be explained by differences of infectivity or parasitemia control by the immune system. To analyze the infectivity of the clonets, it is necessary to compare the clonet distributions in vectors and in patients with recent infection. If the absence of an established immune response and the low probability of multiinfection are assumed, a similar distribution in these patients and vectors is expected. In the current sample, the distribution of the clonets in patients presenting a positive parasitemia, patients that should correspond to those with most recent infection, was not significantly different from that of the vectors. Moreover, in a previous study, we observed a similar result; we reported the presence of clonets 20 and 39 in children living in Cochabamba city (Bosseno *et al.* 1995). These patients, between a few months of age and 2

years old, had a recent infection (acute cases), as confirmed by a positive parasitemia. Among these 15 patients, 3 were infected by clonnet 20 only, 7 were infected by clonnet 39 only, 4 were infected by the two clonnets together, and 1 was not infected by either of the two clonnets. The distribution of the clonnets in this second group of children is similar to that found in the vectors of Cochabamba city ( $\chi^2 = 2.4$ ,  $df = 3$ ,  $P > 0.05$ , see Table II). The results of the two samples of patients in acute phase favor the hypothesis of similar transmission behavior of the two clonnets. Consequently, the selection should occur later in the infection.

Previously, 89 stocks isolated by xenodiagnosis from adult Bolivian patients (chronic infection) were characterized by isoenzyme analysis after culture: 42% and 50% of them were infected by clonnets 20 and 39, respectively (Brenière *et al.* 1989); among them, the patients from the Cochabamba department presented similar frequencies of the two clonnets. The discrepancy between these results and the current observation in children of clonnet 39 predominance can be explained by two recent experimental works. Stocks belonging to clonnet 20 present a higher multiplication rate in *T. infestans* (Pinto *et al.* in press). Moreover, the growth velocity of clonnet 20 is superior to that of stocks belonging to clonnet 39 (Laurent *et al.* 1997). Consequently, the indirect characterization of patient stocks presents a significant bias, and a direct characterization by PCR is more suitable.

**Epidemiological model.** We proposed an epidemiological model that might explain the major detection of clonnet 39 and the low frequency of clonnet 20 in patients, in view of the maintenance of the two clonnets in vectors.

(1) *Human multiinfecting contacts.* Because clonnet 20 and 39 are dominant and frequently associated together in vectors, the rate of human mixed infections should increase rapidly after various infecting contacts. The patients infected by only one of the two clonnets should be the exception. As observed, inferring the lack of clonnet 20 detection, only clonnet 39 should be detected in most patients. This model of multiple human infections is mostly according to the observed clonnet frequencies.

(2) *Synanthropic mammals-vector cycle.* In a previous study, we analyzed the proportion of clonnets 20 and 39 and of mixed infections in vectors from various Bolivian areas (Bosseno *et al.* 1996), showing the absence of natural selection during the cycle. These data are in apparent conflict with the present work, which supports a selection of clonnet 39 by the human host. Consequently, a restricted human-vector cycle should tend to the disappearance of clonnet 20 in vectors. The synanthropic animals—dogs, cats, and rodents—should play an important role for the maintenance of the two clonnets. Each mammal host could present different

susceptibility to the clonnets. In an experimental mouse model, authors showed the high infectivity and parasitemia of stocks belonging to clonnet 20, in contrast with clonnet 39 (Sanchez *et al.* 1990; Laurent, 1997).

Therefore, the intervention of various hosts in the domestic cycle could explain the persistence of clonnet diversity in vectors.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a grant from the World Health Organization Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (No. 910273).

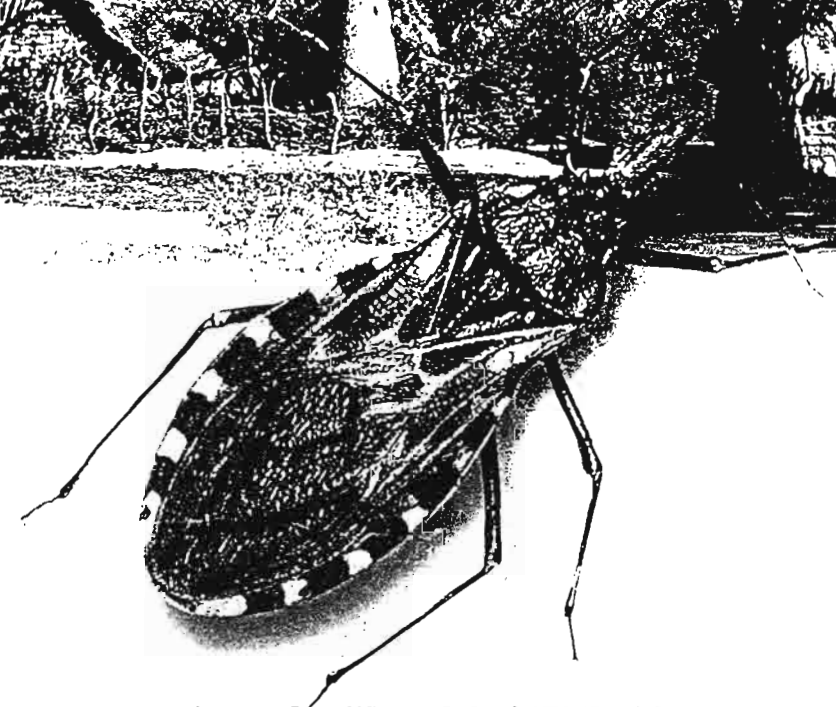
#### REFERENCES

- Ben Abderrazak, S., Guerrini, F., Mathieu-Daude, F., Truc, P., Neubauer, K., Lewicka, K., Barnabe, C., and Tibayrenc, M. 1993. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. In "Methods in Molecular Biology" pp. 361–382. (J. E. Hyde, Ed.), Humana Press, Totowa, NJ.
- Bosseno, M. F., Torrico, F., Telleria, J., Noireau, F., and Brenière, S. F. 1995. Reacción de polimerización en cadena: Detección y caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi* en niños Chagásicos. *Medicina* 55, 277–279.
- Bosseno, M. F., Telleria, J., Vargas, F., Yaksic, N., Noireau, F., Morin, A., and Breniere, S. F. 1996. *Trypanosoma cruzi*: Study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Experimental Parasitology* 83, 275–282.
- Brenière, S. F., Bosseno, M. F., Revollo, S., Rivera, M. T., Carlier, Y., and Tibayrenc, M. 1992. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46, 335–341.
- Brenière, S. F., Carrasco, R., Revollo, S., Aparicio, O., Desjeux, P., and Tibayrenc, M. 1989. Chagas disease in Bolivia: Clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41, 521–529.
- Brenière, S. F., Braquemond, P., Solari, A., Agnès, J. F., and Tibayrenc, M. 1991. An isoenzyme study of naturally occurring clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from both sides of the West Andes highland. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 62–66.
- Brenière, S. F., Bosseno, M. F., Telleria, J., Carrasco, R., Vargas, F., Yaksic, N., and Noireau, F. 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53, 179–184.
- Britto, C., Cardozo, M. A., Vanni, C. M. M., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S. S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C. M., and Wincker, P. 1995. Polymerase chain reaction detection of

- Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110, 241–247.
- Carrasco, H. J., Frame, I. A., Valente, S. A., and Miles, M. A. 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic population of *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Medicine and Hygiene* 54, 418–424.
- Farris, J. S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* 19, 83–92.
- Felsenstein, J. 1978. The number of the evolutionary trees. *Systematic Zoology* 27, 27–33.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach utilizing the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Gibson, W. C., and Miles, M. A. 1986. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO Journal* 5, 1299–1305.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles* 44, 223–270.
- Kretzli, A. U., and Brener, Z. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of Immunology* 128, 2009–2012.
- La Fuente, C., Saucedo, E., and Urjel, R. 1984. The use of microhaematocrit tubes for the rapid diagnosis of Chagas' disease and malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 278–279.
- Laurent, J. P., Barnabe, C., Quesney, V., Noel, S., and Tibayrenc, M. 1997. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 114, 213–218.
- Lewicka, K., Brenière, S. F., Barnabe, C., Dedet, J. P., and Tibayrenc, M. 1995. An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. *Experimental Parasitology* 81, 20–28.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209–220.
- Miles, M. A. 1983. The epidemiology of South American trypanosomiasis: Biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 5–23.
- Pinto Da Silva, A., De Lana, M., Bastrenta, B., Barnabé, C., Quesney, V., Noel, S., and Tibayrenc, M. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*, in press.
- Revollo, S. 1995. Impact de l'évolution clonale de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, sur certaines propriétés biologiques médicalement importantes du parasite. Ph.D. thesis in Sciences, Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, France, 209 pp.
- Revollo, S., Oury, B., Laurent, J. P., Barnabé, C., Quesney, V., Carriere, V., Noel, S., and Tibayrenc, M. *Trypanosoma cruzi*: Impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Experimental Parasitology*, in press.
- Sanchez, G., Wallace, A., Olivares, M., Diaz, N., Aguilera, X., Apt, W., and Solari, A. 1990. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodeme *in vitro*: Differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. *Experimental Parasitology* 71, 125–133.
- Solari, A., Muñoz, S., Venegas, J., Wallace, A., Aguilera, X., Apt, W., Brenière, S. F., and Tibayrenc, M. 1992. Characterization of Chilean, Bolivian and Argentinean *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Experimental Parasitology* 75, 187–195.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., and Zingales, B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83, 141–152.
- Steindel, M., Dias Neto, E., De—Nenezes, C. L. P., Romanha, A. J., and Simpson, A. J. G. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular and Biochemical Parasitology* 60, 71–80.
- Tibayrenc, M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology* 36, 48–115.
- Tibayrenc, M., and Ayala, F. J. 1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: Genetic, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277–292.
- Tibayrenc, M., and Ayala, F. J. 1991. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic Protozoa. *Parasitology Today* 7, 228–232.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., and Ayala, F. J. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83, 115–119.
- Tibayrenc, M., and Brenière, S. F. 1988. *Trypanosoma cruzi*: Major clones rather than principal zymodemes. *Memorias de Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 83 (suppl. 1), 249–255.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guierini, F., Sarkesky, D., and Ayala, F. J. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random primer DNA typing and multilocus isoenzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90, 1335–1339.
- Veas, F., Brenière, S. F., Cuny, G., Brengues, C., Solari, A., and Tibayrenc, M. 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cellular and Molecular Biology* 37, 73–84.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531–6535.
- Wincker, P., Bosseno, M. F., Britto, C., Yaksic, N., Cardoso, M. A., Morel, C. M., and Brenière, S. F. 1994. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiology Letters* 124, 419–423.
- Wincker, P., Telleria, J., Bosseno, M. F., Cardoso, M. A., Marques, P., Yaksic, N., Aznar, C., Liegeard, P., Hontebeyrie, M., Noireau, N., Morel, C. M., and Brenière, S. F. 1997. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: Comparison with conventional serology and parasitological diagnosis. *Parasitology* 114, 367–373.



# LA ENFERMEDAD EN BOLIVIA



CONOCIMIENTOS CIENTIFICOS  
AL INICIO DEL PROGRAMA DE CONTROL (1998 - 2000)

Julio R. Alfred Cassab - François Noireau - Germán Guillé



LA PAZ - BOLIVIA

# IDENTIFICACION DE LOS CLONET 20 Y 39 EN HECES DE *TRITOMA INFESTANS* POR LA REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Brenière S.F.<sup>1</sup>, Bosseno M.F.<sup>1</sup>, Noireau F.<sup>1</sup>, Vargas F.<sup>2</sup>, Yacsik N.<sup>2</sup>,  
Alcazar J.L.<sup>3</sup> & Telleria J.<sup>2</sup>

## Introducción

Actualmente, la caracterización genética de las cepas de *Trypanosoma cruzi* consiste en el análisis isoenzimático o análisis del ADN del genoma e implica el aislamiento y cultivo masivo de cada cepa. En la naturaleza los vectores y los mamíferos son frecuentemente infectados por poblaciones heterogéneas (varios clones) y, en el curso del aislamiento y cultivo masivo, la diversidad de los clones que infectan un huésped puede reducirse por selección de ciertos clones (Miles y Cibulskis, 1986; Brenière *et al.*, 1989).

Para obviar la etapa del cultivo de las cepas, nosotros y otros investigadores aplicamos una nueva metodología para la detección directa y sensible de *T. cruzi* en las heces de triatominos y en la sangre de mamíferos. Amplificamos por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) las partes variables de los minicírculos del ADN del cinetoplasto (HVRm) (Veas *et al.*, 1991; Avila *et al.*, 1991). Además, establecimos que las secuencias de las HVRm son específicas de subgrupos de clones filogenéticamente distintos (Brenière *et al.*, 1998). Este resultado determinó el desarrollo de dos sondas (sondas 20 y 39) a partir de las HVRm a fin de detectar por PCR y hibridación los grupos de clones correspondientes (nombrados clonnet 20 y clonnet 39) en los diferentes huéspedes sin aislar las cepas.

Este trabajo presenta los resultados de la detección directa de los clonnet 20 y 39 en heces de *Triatoma infestans* capturados en tres departamentos bolivia-

---

<sup>1</sup> IRD, calle Cicerón n° 609, Col. Los Morales, AP 11530, México DF.

<sup>2</sup> IBBA, La Paz, Bolivia.

<sup>3</sup> UMSS, Cochabamba, Bolivia.

nos. *T. infestans* es el único vector de importancia epidemiológica y que se encuentra distribuido en todo el país.

## Material y métodos

Los especímenes de *T. infestans* provienen de 3 departamentos, Cochabamba, La Paz y Santa Cruz; son ninfas y adultos capturados en las casas y en las áreas peridomésticas (gallineros, conejeras, patios). La Tabla 1 presenta los detalles de la muestra. Las tasas de infecciones de los insectos fueron determinadas por la observación de las heces en el microscopio. La mayoría de los insectos positivos y una muestra de negativos escogida al azar fueron procesados por PCR con los controles adecuados (insectos de crianza no infectados). Las etapas de la PCR, la preparación de las muestras, el método de producción de las dos sondas y las condiciones de hibridación fueron previamente descritos (Brenière *et al.*, 1992). Así, las HVRm de las cepas de *T. cruzi* fueron amplificadas por PCR de cada muestra de heces infectada. Luego los productos de PCR, transferidos sobre membranas después de su electroforesis, fueron hibridados con las sondas 20 y 39.

## Resultados

La Tabla 1 presenta las tasas de infección de los triatominos en las regiones estudiadas. En el departamento de La Paz se visitaron poblaciones situadas en Los Yungas Altos, región subandina, que presenta una baja tasa de infección de los vectores. En esta región se detectaron algunos casos de infección humana de transmisión local (2.2% < 18 años; 10.1% > 18 años), que corresponden a una baja tasa de infección (6.8%) comparativamente a otras regiones bolivianas. En cambio, el departamento de Cochabamba está considerado como una zona altamente endémica (Pless *et al.*, 1992). En la provincia de Mizque se examinaron 490 personas, niños y adultos, y la seroprevalencia fue del 42,5%. En la Provincia de Cordillera la tasa de infección de los triatominos es muy elevada, y la tasa de infestación de las casas por triatominos es más o menos del 100%. No se hizo encuestas serológicas pero la transmisión sería muy elevada.

Tabla 1. Origen geográfico de las colectas y tasa de infección de los triatominos.

Departamento	Provincia	No. de comunidades	Examinados	Tasa de infección*	
				No. positivos	% infección
La Paz	Nor Yungas	12	858	127	14.8
	Sud Yungas	4	292	27	9.2
	Caranavi	17	236	14	5.9
	Total	33	1386	168	12.1
Cochabamba	Campero/Mizque	4	361	162	44.9
	Capinota	15	498	229	46.0
	Cercado	1	235	127	54.0
	Total	20	1094	518	47.3
Santa Cruz	Cordillera	2	387	158	40.8
Total		55	2867	844	29.4

\* Examen de las heces de cada insecto en el microscopio

Tabla 2. Comparación de la detección de flagelados en las heces por microscopía y PCR

Departamento	OBM		Comparación de las dos técnicas							
	+		-		% sensibilidad <sup>1</sup>		% concordancia <sup>2</sup>	% discrepancias <sup>3</sup>		
	No.	+	-	+	-	OBM		PCR	A	B
La Paz	177	73	13	6	85	93.0	86.0	89.3	7.3	3.4
Cochabamba	319	202	36	12	69	95.0	86.0	85.0	11.3	3.7
Santa Cruz	179	94	84	1	0	99.0	53.0	52.5	47.0	0.5
Total	675	369	133	19	154	96.0	74.0	77.5	19.7	2.8

<sup>1</sup> La sensibilidad de cada técnica esta calculada según la formula siguiente: ni/N, ni=número de positivos por una técnica en particular, N = número de positivos por cualquiera de las dos técnicas, OBM = observación al microscopio.

<sup>2</sup> % de concordancia = % de muestras positivas o negativas en ambas técnicas.

<sup>3</sup> % de discrepancias A = % de muestras positivas por microscopía y negativas por PCR; B = % de muestras positivas por PCR y negativas por microscopía.

**Tabla 3.** Identificación de los clonet 20 y 39 de *T. cruzi* en heces de *T. infestans* por PCR e hibridación con sondas de ADN específicas.

Departamento	No.	No. y % reconocidos								Valor del X <sup>2</sup> #
		Por la sonda 20 sola		Por la sonda 39 sola		Por las 2 sondas		Por ninguna de las dos sondas		
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
La Paz	79	24	30.4	17	21.5	28	35.4	10	12.7	0.9* 64.4** 37.4**
Cochabamba	214	62	29.0	44	20.6	87	40.7	21	9.8	
Santa Cruz	95	17	17.9	42	44.2	5	5.3	31	32.6	
Total	388	103	26.5	103	26.5	120	30.9	62	16.0	

# : El valor del Chi cuadrado esta calculado entre las poblaciones 2 a 2 (gl = 3): \*  $P > 0.05$ . \*\*  $P < 0.001$

**Tabla 4.** Prevalencia de las infecciones mixtas: comparación de las tasas observadas y teóricas.

Departamento	No.	Frecuencias*		Infecciones mixtas**			
		clonet 20	clonet 39	No. observado	No. teórico	Chi 2	P
La Paz	79	0.66	0.57	28	29.7	0.1	>0.05
Cochabamba	214	0.70	0.61	87	91.4	0.2	>0.05
Santa Cruz	95	0.23	0.49	5	10.7	2.3	>0.05
Total	388	0.57	0.57	120	126	0.2	>0.05

\* Las frecuencias de los clonet son calculadas a partir de los datos de la Tabla 3.

\*\* Infecciones mixtas observadas = no. de muestras de heces hibridadas por las sondas 20 y 39 a la vez (datos en Tabla 3). Infecciones mixtas teóricas = no. de muestras calculado con la fórmula siguiente:  $N \times (\text{frecuencia clonet 20}) \times (\text{frecuencia clonet 39})$ , con  $N$  = número de muestras estudiadas.  $P$  estimado de las diferencias entre observados y teóricos por el test del Chi-cuadrado (gl = 1).

Para investigar el beneficio y la sensibilidad de la PCR para la detección de *T. cruzi* en heces se analizó un total de 675 muestras de estos tres departamentos, de las cuales 502 presentaron flagelados al microscopio (Tabla 2). Las muestras PCR + exhibieron una banda mayor de 270 pb, anteriormente deter-

minada como específica de *T. cruzi* (Veas *et al.*, 1991). Los controles (heces no infectadas procedentes de los insectos de laboratorio y las muestras de agua) fueron todos PCR - como se esperaba. Las dos técnicas presentaron una tasa de concordancia del 77,14% (Tabla 2). Los casos de discrepancias fueron en su mayoría aquellos con la falta de amplificación por PCR de muestras positivas al microscopio (87%). Sin la muestra de la provincia Cordillera (179 insectos de los cuales 178 fueron positivos al microscopio), la concordancia entre ambas técnicas fue más elevada, 86,2%. Los falsos negativos por PCR representaron en este caso el 15% de las muestras positivas al microscopio. Además el 10% de las muestras negativas al microscopio presentaron una PCR +. Para evaluar la sensibilidad de la técnica de PCR, varias concentraciones de ADN purificado de una cepa de *T. cruzi* fueron añadidas a varios extractos de las heces de triatomos de crianzas. Para una concentración de 0,2 pg de ADN equivalente aproximadamente a un parásito, la PCR fue siempre positiva. En concentraciones más bajas (10 a 100 fg) solamente 30% de las muestras fueron positivas. Si se considera que un parásito contiene alrededor de 150-200 fg de ADN, la PCR permite detectar un sólo parásito en una muestra de heces.

Se observaron diferencias entre la sensibilidad de la técnica aplicada a muestras del campo y muestras artificialmente infectadas. Además, el análisis detallado por localidades mostró que la sensibilidad fue variable y que podía en ciertos lugares ser sorpresivamente baja (data no presentado).

Se procedió luego a la detección de los clonets 20 y 39 por hibridación de los productos de amplificación PCR + con las sondas específicas correspondientes. Tres perfiles de hibridación se observaron (Fig. 1) :

- Muestras reconocidas por una de las dos sondas correspondientes a infecciones por cepas del clonet 20 o 39.
- Muestras reconocidas por las dos sondas correspondientes a infecciones mixtas por los dos clonet a la vez.
- Muestras no reconocidas por ninguna de las dos sondas correspondientes a infecciones por otros clones de *T. cruzi* que no pertenecen ni al clonet 20 ni al 39.

De un total de 388 muestras PCR + hibridadas, la mayoría (84%) fue reconocida por una o, en el caso de infección mixta, las dos sondas (Tabla 3). En el muestreo total, los clonet 20 y 39 estuvieron presentes cada uno en 57.4% de los triatomos. Un total de 62 muestras no fueron reconocidas por ninguna de las sondas (16%), correspondiendo a insectos infectados (PCR +) por otros clo-

nes que no pertenecieron al clon 20 ni 39 y su estatus taxonómico quedó indeterminado. El porcentaje de los otros clones fue más elevado en el muestreo del departamento de Santa Cruz comparado a los dos otros departamentos. Por otra parte, la distribución de los clones en Santa Cruz se distinguió a la de La Paz y Cochabamba; en La Paz y Cochabamba no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ; ver Tabla 3). El porcentaje de asociación del clon 20 con el 39 en un mismo insecto fue muy elevado, 30.9% para el muestreo total, llegando a 40.7% en Cochabamba. Bajo la hipótesis nula de transmisión independiente de los clones identificados por las sondas 20 y 39 se pudo calcular el número teórico de infecciones mixtas en los triatomíneos a partir de las estimaciones de las frecuencias de los clones en la población. Los resultados de la Tabla 4 se dedujeron de los datos de la Tabla 3 e indicaron que no hay diferencia significativa entre los números observado y teórico de infecciones mixtas para cada departamento.

## Discusión

En este trabajo se demostró la utilidad de la PCR como diagnóstico y método de tipificación de cepas de *T. cruzi* para estudios epidemiológicos. La sensibilidad de la PCR para el muestreo total llegó al 74%, un porcentaje más bajo de lo teóricamente esperado. Esto se explica por la falta de purificación del ADN a partir de las muestras fecales. Para procesar grandes cantidades de muestras y evitar la contaminación de una muestra a la otra, se escogió una preparación sencilla, con dilución de la muestra en agua, hervido y centrifugado. Este extracto pudo contener varios factores inhibidores de la polimerasa, entre otros productos de la sangre ingerida por el insecto. Evidenciamos previamente que la tasa de heces positivas en el microscopio con PCR - varió mucho de una localidad a la otra (Brenière *et al.*, 1995). Los insectos procedentes de la provincia Cordillera (2 localidades próximas) dieron un resultado similar que no se pudo explicar por condiciones experimentales. La presencia de inhibidores de PCR en las muestras fecales sería responsable de la falta de detección de un solo parásito en ciertas muestras. En cambio, en ciertas muestras negativas en el microscopio se tuvo una PCR +. La probabilidad que esta positividad se debió a contaminaciones es baja: los controles introducidos en cada ensayo de preparación de muestras fueron negativos como se esperaba, la intensidad de la amplificación fue variable entre muestras, además fue intensa en algunas de ellas (las contaminaciones dan generalmente bandas débiles), las hibridaciones sobre estos productos exhibieron los diferentes perfiles posibles, resultados poco compatibles con una contaminación que proviene generalmente de una misma fuente.

La segunda parte de este trabajo fue la caracterización de los clones circulantes en los vectores. Se utilizaron dos sondas que reconocen dos grupos de clones, llamados clon 20 y 39. Cada clon está compuesto de clones presentando una diversidad genética reducida pero los dos clones están separados entre sí por distancias evolutivas grandes. Encontramos que estos 2 clones son mayoritarios en *T. infestans* y se encuentran ampliamente distribuidos en Bolivia. La caracterización isoenzimática de 419 cepas bolivianas por Tibayrenc *et al.* (1986) identificó también clones extremadamente representados, los cuales corresponden a los clones 20 y 39. La caracterización directa, que evita la etapa del cultivo, confirmó el resultado. La diferencia entre los dos tipos de estudios fue el mayor número de infecciones mixtas identificado por la PCR/hibridación. El análisis isoenzimático detectó solamente 10% de infecciones mixtas y la caracterización directa más del 50% en varias localidades. Esta estimación es probablemente una subestimación porque se detectaron solamente infecciones mixtas de clon 20 y 39. Se obtuvo una correlación significativa entre las tasas de infección de los triatomíneos de las diferentes comunidades estudiadas y los números de infecciones mixtas (dato no presentado).

Dos puntos adicionales pudieron ser analizados gracias a la detección directa de los clones :

- La distribución de los clones 20 y 39 fue diferente entre comunidades e independiente de las distancias geográficas, y se notó diferencias notables entre localidades cercanas. Este resultado sugiere que los contactos entre poblaciones son relativamente limitados, lo que coincide con la baja capacidad de dispersión de los triatomíneos (fuerte estructuración entre poblaciones de comunidades cercanas).
- La hipótesis de una ausencia de interacciones entre los dos clones no pudo ser rechazada. Esto nos sugiere que durante el ciclo del parásito a través del vector y de sus huéspedes mamíferos no existe selección de un clon particular. Esto no impide la selección de clones por ciertos huéspedes pero la diversidad del parásito parece conservada a través del ciclo completo.

El punto original de este trabajo fue la puesta en evidencia de infecciones mixtas muy abundantes en *T. infestans*. El hombre puede adquirir infecciones mixtas por picaduras de vectores con infecciones mixtas o por reinfección a partir de un vector portador de otro clon. En Bolivia, la alta incidencia de las infecciones mixtas y la alta prevalencia de los clones 20 y 39 implican que el número teórico de infecciones humanas por los dos clones al mismo tiempo

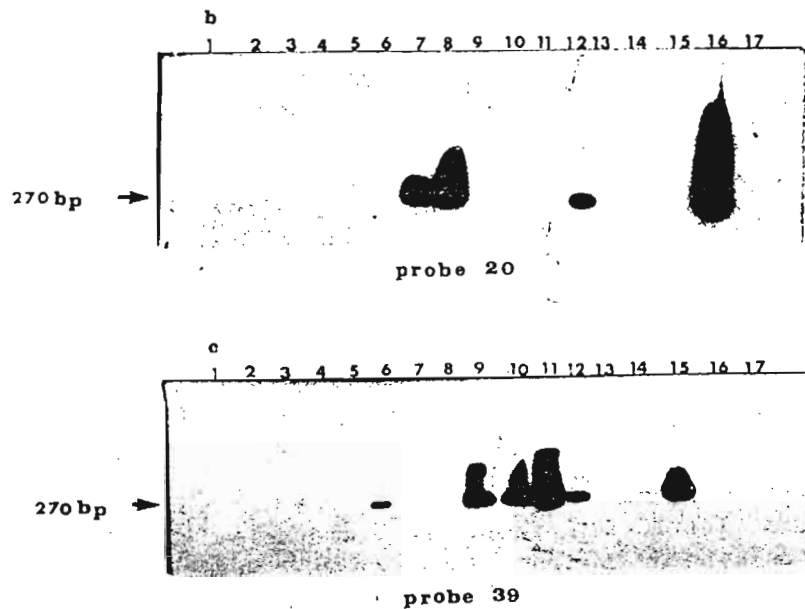
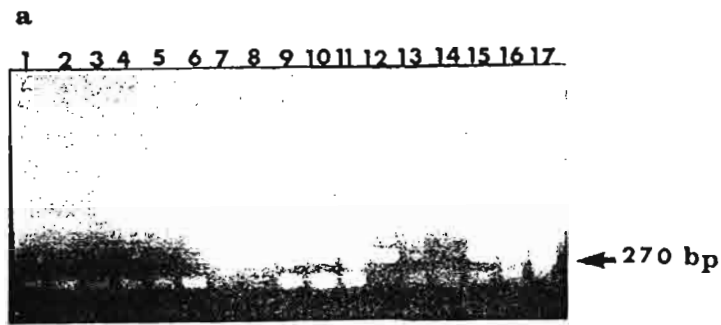


Figura 1. (a) Gel de agarosa al 0.8% con productos de PCR de heces de *T. infestans* teñido con bromuro de etidio. (b & c) Perfiles de hibridación de estos productos con las sondas específicas de los clonet 20 y 39 respectivamente; fila 1 a 3, controles (utilizando heces de *T. infestans* de crianza); filas 4 y 5, controles negativos (utilizando como blanco agua destilada); filas 6 a 13, muestras positivas de *T. infestans*; fila 14, muestra negativa de *T. infestans*; filas 15 y 16, controles positivos (usando 10 ng de ADN de cepas de referencias de *T. cruzi* pertenecientes a los clonet 20 y 39 respectivamente); fila 17, marcador de peso molecular, pUC 19 dirigido por *Rsa*I. Las flechas indican la banda mayor amplificada (270 bp).

debería ser sumamente elevado. Varios trabajos experimentales sobre cepas pertenecientes a estos dos clonet mostraron grandes diferencias de virulencia y de comportamiento biológico (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Pinto da Silva *et al.*, 1998), pero los análisis de coinfecciones son escasos y los efectos desconocidos. La situación de coinfecciones humanas por clones de *T. cruzi* que presentan diferencias genéticas importantes sería la regla general en Bolivia. Las consecuencias de tal asociación sobre la patología de la enfermedad queda por determinar.

## Discusión

Casos de infecciones por poblaciones heterogéneas de *T. cruzi* fueron descritos en varias ocasiones gracias a la visualización de perfiles isoenzimáticos superpuestos correspondientes a dos zimodemas o por el aislamiento de varios zimodemas en un mismo huésped. Así, se evaluó alrededor de 10% de mezclas en vectores y pacientes en Bolivia (Tibayrenc *et al.*, 1986; Brenière *et al.*, 1989). Sin embargo, gracias a la caracterización directa por PCR/hibridación, identificamos tasas de infecciones mixta mucho más elevadas en *T. infestans* (Bosseno *et al.*, 1996).

El presente trabajo demostró que la detección de las mezclas en cepas aisladas y cultivadas fue poco sensible y que el clonete 20 se aísla más fácilmente que el clonete 39. Anteriores trabajos mostraron que las cepas de *T. cruzi*, clonadas en el laboratorio, exhibieron grandes diferencias de velocidad de crecimiento *in vitro* (Dvorak *et al.*, 1980) y Laurent *et al.* (1997) mostraron que los clones pertenecientes al clonete 20 crecieron mejor que los del clonete 39. Estos resultados concuerdan con los nuestros y explican la selección del clonete 20 durante la etapa del cultivo cuando los triatominos presentan al inicio infecciones por los dos clones. La composición clonal después del cultivo sería dependiente de las características de crecimiento *in vitro* de cada clon.

La caracterización directa de los clones de las poblaciones naturales en las muestras biológicas (heces y sangre) es indispensable para obtener un resultado más exacto de la composición clonal en un huésped. De tal manera, se necesita desarrollar herramientas apropiadas a la detección y caracterización de las cepas circulando en una cierta área geográfica (ej. sondas de ADN, cebadores específicos de fila...). La técnica debe ser sensible para detectar los parásitos particularmente en los huéspedes (mamíferos) donde, en la mayoría de las fases de la infección, la parasitemia es muy baja. Las partes hipervariables de los minicírculos del cinetoplasto, fácilmente amplificadas por PCR, presentan múltiples copias y sus secuencias son muy similares entre clones genéticamente relacionados. La producción de sondas suplementarias de ADN del cinetoplasto, específicas de otras familias de clones, podría permitir el desarrollo de la detección directa de clones en otras áreas endémicas.

## EN BOLIVIA, LOS PACIENTES CHAGASICOS SON MAS INFECTADOS POR EL CLONETE 39 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Brenière S.F.<sup>1</sup>, Telleria J.<sup>2</sup> & Bosseno M.F.<sup>1</sup>

### Introducción

Los clones de *Trypanosoma cruzi* exhiben una gran heterogeneidad biológica (Dvorak, 1984; Gonzalez *et al.*, 1995; Mirkin *et al.*, 1997; Kirchhoff *et al.*, 1984) y se propuso que sus propiedades biológicas puedan estar relacionadas a su constitución genética (Dvorak *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981; Flint *et al.*, 1984; Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 1998).

En Bolivia, identificamos dos grupos mayores de clones genéticamente distintos con importantes distancias evolutivas, los clones 20 y 39 (Brenière *et al.*, 1992 & 1995). Estos dos clones son ampliamente distribuidos, frecuentemente asociados en un mismo insecto (Bosseno *et al.*, 1996) y reconocidos específicamente por dos sondas de ADN del cinetoplasto (Veas *et al.*, 1991; Brenière *et al.*, 1995 & 1998). Como los dos clones son los más abundantes en Bolivia y genéticamente muy diferentes (grandes distancias evolutivas), sus trascendencias sobre la enfermedad de Chagas podrían ser exclusivas (virulencia, patología, resistencia a las drogas). Para probar esta hipótesis, detectamos estos clones en los pacientes adultos y niños de una comunidad de alta endemicidad para relacionar las diferentes infecciones con otros factores como la distribución de los clones en los vectores, la patología y la respuesta inmune.

### Material y métodos

*Pacientes* - Una población de 490 adultos y niños escolares, nativos de la comunidad de Mizque (dpto. de Cochabamba), fue sometida a exámenes para-

<sup>1</sup>IRD, calle Cicerón n° 609, Col. Los Morales, AP.11530, México DF.

<sup>2</sup>IBBA, La Paz, Bolivia

sitológico y serológico para la detección de infecciones por *T. cruzi*. Luego, los clonet 20 y 39 fueron identificados en la sangre por PCR e hibridación. La comunidad de Mizque pertenece a una zona altamente endémica para el Mal de Chagas presentando una transmisión activa de la enfermedad. El estudio fue realizado antes de una acción de control de los vectores. La parasitemia del grupo de niños de edad inferior a 12 años fue controlada en cada individuo por el examen en microscopio de la interfase de 4 capilares de sangre según La Fuente et al. (1984). La serología fue establecida a partir de los resultados de 3 o 4 pruebas de detección de los IgG específicos según Wincker et al. (1997). El diagnóstico fue basado sobre la positividad o negatividad de por lo menos 3 pruebas. Todos los pacientes fueron sometidos a un examen clínico pero en ningún paciente se detectaron síntomas clínicos evocadores de la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

**Vectores** - Una muestra de 128 *T. infestans* de 11 viviendas de la comunidad de Mizque, capturados en sitios domésticos (dormitorios) y peridomésticos (gallineros, conejeras, patios), fue estudiada. La presencia de flagelados en las heces fue analizada en cada individuo por observación en microscopio. Para la mayoría de los insectos positivos y una muestra al azar de los negativos se recolectó una gota de heces para el estudio PCR seguido de la hibridación de los productos de amplificación por las sondas 20 y 39. Mil trece insectos capturados en otras comunidades del dpto. de Cochabamba fueron igualmente procesados para la identificación de los clonet.

**Caracterización de los clonet 20 y 39 por PCR/hibridación** - El procedimiento de la PCR/hibridación a partir de las heces y de la sangre fue descrito por Brenière et al. (1998). Se identificaron los clonet en la mayoría de las heces positivas y en la mayoría de los pacientes con una serología positiva. Varias muestras de pacientes con serología negativa fueron también procesadas al mismo tiempo. Los controles, insectos de crianza y sangre de personas no infectadas, fueron introducidos en cada procedimiento de muestras. Para las muestras de sangre la PCR fue procesada en duplicado. La hibridación de los productos PCR + permitió identificar en las muestras los clonet 20 y/o 39, y en ausencia de hibridación por las dos sondas infecciones por otros clones de *T. cruzi*.

## Resultados

**Identificación de los clonet 20 y 39 en los vectores** - El gran número de insectos capturados en todas las comunidades visitadas confirmó que las pobla-

ciones de *T. infestans* están totalmente establecidas en las áreas domésticas y peridomésticas (Tabla 1). La tasa de infección en la población total fue de 42,6% y fue todavía muy elevada en el barrio de la ciudad de Cochabamba (30,2%). En la comunidad de Mizque, las frecuencias de los clonet 20 y 39 fueron respectivamente de 0,69 y 0,67, con 43,1% de infecciones mixtas (Tabla 1); solamente 7,8% de las muestras no fueron hibridadas por ninguna de las sondas, indicando la presencia de otros clones de *T. cruzi* en estos insectos. En las otras localidades se observaron frecuencias similares de los clonet excepto en la Provincia de Capinota donde el clonet 20 fue por supuesto más frecuente que el clonet 39. Las infecciones mixtas fueron también abundantes, de 31,1% a 85,7% en la localidad de Quiroga.

Tabla 1. Origen geográfico de las colectas y tasa de infección de los triatomos

Provincia	Comunidad	Tasa de infección*		No.	Identificación de los clonet, No. (%)			
		No.	% de positivos		Clonet 20 solo	Clonet 39 solo	Clonet 20 + 39	Otros clones
Mizque	Mizque	128	57,8	51	13 (25,5)	12 (23,6)	22 (43,1)	4 (7,8)
Campero	Aiquile	205	35,1	38	10 (26,3)	6 (15,8)	21 (55,3)	1 (2,6)
	Quiroga	57	54,4	14	0 (0,0)	2 (14,3)	12 (85,7)	0 (0,0)
Capinota	Capinota y 13 localidades cercanas	506	46,4	22	10 (45,5)	2 (9,1)	8 (36,3)	2 (9,1)
Cochabamba	Cochabamba (barrio de Huayra K'asa)	245	30,2	74	23 (31,1)	20 (27,0)	23 (31,1)	8 (10,8)
Total		1141	42,6	199	56 (28,1)	42 (21,1)	86 (43,2)	15 (7,6)

\* Exámen de las heces de cada insecto en el microscopio

**Identificación de los clonet 20 y 39 en la sangre de los pacientes** - De los 490 pacientes, 42,5% presentaron una serología positiva; 3 dieron un resultado dudoso. La Tabla 2 indica los porcentajes de las seroprevalencias de acuerdo con las clases de edades: 1 niño de 4 años y 3 niños de 5 años presentaron una serología positiva; la seroprevalencia de los niños menores de 11 años fue del 38,7%. Este resultado acreditó la importancia de la transmisión activa de la enfermedad de Chagas en esta población. Además, la seroprevalencia aumentó notablemente en función de la edad de los pacientes. De los 270 niños examinados por la presencia de parásitos en la sangre periférica (examen al microscopio), 12 (4,4%) fueron positivos y considerados como casos de reciente infección

(casos agudos). Trescientas setenta y una muestras fueron procesadas por PCR, y la concordancia entre ambas técnicas (PCR y serología) fue del 90%. De los 3 pacientes con una serología dudosa, 1 fue PCR + y presentaba un examen parasitológico positivo. Los dos otros fueron PCR -.

**Tabla 2.** Seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en la población de Mizque

	Mujeres			Hombres			Total
	No. examinados	Seropositivos		No. examinados	Seropositivos		Seropositivos %
		No.	%		No.	%	
< 5 años	9	0	0	11	1		5
5 a 10 años	78	36	46.2	145*	57	39.3	41.7
11 a 15 años	62	27	43.5	67*	19	28.3	35.6
16 a 20 años	21	7	33.3	17*	9	52.9	42.1
21 a 30 años	8	4	50.0	13	8	61.5	57.1
31 a 45 años	21	17	80.1	9	2	22.2	63.3
> a 45 años	11	10	90.1	8	8	100	94.7

\* un paciente presentó una serología dudosa

La Tabla 3 presenta los resultados de las hibridaciones de 236 productos de PCR incluyendo la mayoría de los PCR + y 75 PCR - escogidos al azar como controles. Los controles positivos y negativos (paciente chagásico y paciente no infectado) fueron introducidos cada 5 muestras procesadas en duplicado. Los perfiles de hibridación, como para los vectores, correspondieron a la identificación en la sangre de los clonot 20 y/o 39, u otros clones de *T. cruzi*. De los 75 productos de PCR -, 68 no fueron hibridados como se lo esperaba; de los 7 que presentaron una hibridación 6 correspondieron a pacientes con una serología positiva (pacientes chagásicos) y una PCR -. La etapa de hibridación puede ser adecuadamente sensible para detectar productos de amplificación no visibles por la coloración con el bromuro de etidio. El otro paciente presentó una serología negativa y un problema de contaminación fue presumido. De los 161 productos PCR +, la gran mayoría fue hibridada por la sonda 39 (84.5%). Solamente en 4 pacientes el clonot 20 solo fue identificado y 16.1% de los pacientes presentaron una mezcla de los dos clonot. La repartición de los clonot no fue diferente según las clases de edades ( $P > 0.05$ ; Fig. 1). De la población total, los clonot 20 y 39 fueron identificados en 9 pacientes con una parasitemia positiva (casos

agudos): 6 de ellos presentaron una infección mixta (66.7%) y 3 por el clonot 39 solo.

**Tabla 3.** Identificación de los clonot 20 y 39 en la sangre de los pacientes

PCR	Serología	Hibridación positiva			Hibridación negativa
		Sonda 20 sola	Sonda 39 sola	Sondas 20 + 39	
PCR + n = 161	+	4	109	25	20
	Dudosa	0	0	1	0
	-	0	1	0	1
PCR - n = 75	+	0	5	1	23
	Dudosa	0	0	0	2
	-	0	1	0	43
Total		4	116	27	89

*Comparación de la distribución de los clonot en los vectores y los pacientes* - La distribución de los clonot fue radicalmente diferente entre los vectores y la población total de los pacientes ( $P < 0.001$ ). El clonot 20 que fue abundante en los vectores (frecuencia = 0.69) fue poco representado en la sangre de los pacientes (frecuencia = 0.19;  $P < 0.001$ ). El número de infecciones mixtas (clonot 20 + 39) cayó proporcionalmente en los pacientes ( $P < 0.001$ ). El incremento del clonot 39 en los pacientes fue significativo ( $P < 0.01$ ). En cambio, no se encontraron diferencias de la distribución de los clonot entre la población de los pacientes en fase aguda (9 pacientes) y de los vectores.

## Discusión

*Comparación de las frecuencias de los clonot 20 y 39 en los vectores y los pacientes* - Los clonot 20 y 39 fueron siempre muy abundantes en *T. infestans* capturados en Bolivia pero se detectó en la gran mayoría de los pacientes de la comunidad de Mizque el clonot 39. En esta comunidad la transmisión es mayormente vectorial y en caso de transmisión al azar de los clonot las frecuencias en el hombre deberían ser análogas que en los vectores. Varias hipótesis pueden explicar esta diferencia :

- i) Fluctuaciones temporales de los clonot en los vectores : Los clonot fueron detectados al mismo tiempo en los vectores y en los pacientes. La enfermedad

de Chagas es una infección crónica, la mayoría de los pacientes fueron probablemente infectados varios años antes del estudio. Variaciones de la distribución de los clonot en los vectores en el pasado podrían explicar la diferencia observada. Hace 12 años, Tibayrenc *et al.* (1986) reportaron en el departamento de Cochabamba frecuencias de los clonot en los vectores similares a las actuales. Este resultado y la amplia dispersión de los dos clonot en otras regiones de Bolivia apoya la ausencia de fluctuaciones temporales de los clonot en los vectores.

ii) Selección de un clonot particular en el hombre : La selección de un clonot en los pacientes puede explicarse por diferencias de infectividad o tasas diferentes de parasitemia según el clonot. Para comparar la infectividad de los clonot es necesario estudiar a los pacientes en la fase inicial de la infección. Al principio de la infección la parasitemia es más elevada (casos agudos), la respuesta inmune es todavía mal establecida y la probabilidad de ser reinfectado es mínima. Así, en esta población, la distribución de los clonot debería estar similar a la de los vectores. En 9 pacientes con parasitemia indetectada en microscopio (casos agudos), la distribución de los clonot no es diferente a la de los vectores. Obtuvimos un resultado similar para pacientes menores de 2 años de la ciudad de Cochabamba que presentaron una parasitemia directa positiva: de 15 pacientes, 3 fueron infectados solamente por el clonot 20, 9 solamente por el clonot 39, 4 por los dos clonot a la vez y 1 por ninguno de los clonot. La distribución de los clonot en este segundo grupo no fue diferente de los vectores del barrio de la ciudad de Cochabamba. Los resultados de los dos estudios de pacientes en la fase inicial de la infección apoyaron la hipótesis de una transmisión al azar de los clonot. La selección llegaría más tarde en la infección. Después de la fase inicial de la infección, la parasitemia baja para establecerse a un nivel infra microscópico debido probablemente a la intervención de la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, el control de la parasitemia parece más eficiente contra los parásitos pertenecientes al clonot 20 para después prolongarse durante toda la infección (resultados idénticos en las diferentes clases de edades). De igual manera, algunos trabajos experimentales en el ratón, indicaron que la virulencia y la parasitemia fueron dependientes de la variabilidad genética de los clones de *T. cruzi* (Sánchez *et al.*, 1990, Laurent *et al.*, 1997).

¿Como persiste el clonot 20 en los vectores? La existencia de un ciclo de transmisión limitado al hombre/vector debería provocar la eliminación del clonot 20 en el ciclo doméstico. Consecuentemente, los animales domésticos como

perros, gatos, conejos y pequeños roedores jugarían un papel importante en la persistencia de los dos clonot. Es muy probable que la virulencia y la parasitemia de los clones varíen entre especies diferentes de mamíferos. Así, la intervención de numerosos huéspedes en el ciclo doméstico puede explicar la persistencia de la diversidad clonal en los vectores.

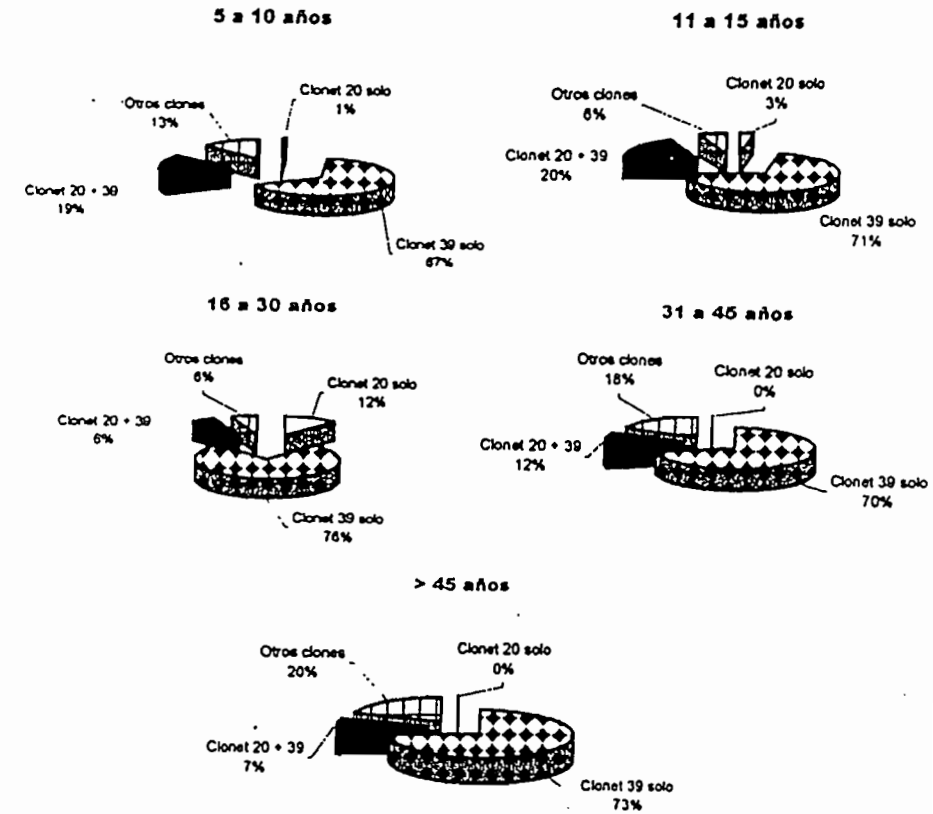


Figura 1. Distribución de los clonot en los pacientes chagásicos según las clases de edades

## RESEARCH NOTE

## Putative Reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a Sub-andean Focus of Bolivia Identified by kDNA-Polymerase Chain Reaction

J Telleria, MF Bosseno\*, T Tarifa\*\*, R Buitrago, E Martinez, M Torrez, F Le Pont\*, SF Brenière\*/+

Universidad Mayor de San Andrés, Instituto Boliviano de Biología de Altura, CP 641, La Paz, Bolivia

\*UMR CNRS/ORSTOM No. 9926: "Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs", ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cédex 01, France

\*\*UMSA, Colección Boliviana de Fauna, La Paz, Bolivia

Key words: *Leishmania amazonensis* - *Leishmania* complex - reservoirs - Sub-andean region - polymerase chain reaction - Bolivia

From 1994 to 1996, an outbreak of leishmaniasis was described in Cajuata and surrounding communities in Inquisivi province, La Paz Department, Bolivia; eight strains were isolated from patients with cutaneous ulcers and characterized by isoenzyme typing using 11 loci. All of these stocks were genetically related to *Leishmania amazonensis*. In the current work, new ubiquitous primers L1 : 5'-CCT ACC CAG AGG CCT GTC GGG-3' L2 : 5'-TAA TAT AGT GGG CCG CGC AC-3', purchased from Genset laboratory (Paris, France) were designed from the minicircle sequence of MHOM/BR/75/M2904 *L. braziliensis* strain (MHL de Bruijn & DC Barker 1992 *Acta Tropica* 52: 45-

58) to amplify variable regions of kDNA minicircles. These primers generate polymorphic multi-banding patterns for all *Leishmania* sp. and other Kinetoplastidae, *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *T. brucei* sp. Three probes were generated from major polymerase chain reaction (PCR) bands derived from strains of *L. mexicana* (MNYC/BZ/62/M379), *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) and *L. braziliensis* (MHOM/BO/90/CG) species (SF Brenière et al. 1996 International Workshop on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Pathogenic Microorganisms, CDC, Atlanta, SF Brenière et al. 1997 *Medicina* 55 Suppl. III: 81). The heterogeneity of the *Leishmania* sp. was investigated by hybridization of these probes to membrane-bound PCR products obtained from a large set of *Leishmania* strains previously characterized by isoenzyme typing (F Guerrini 1993 *Genétique des Populations et Phylogénie des Leishmania du Nouveau Monde*, PhD Thesis, University of Montpellier II, France, 111 pp.). These probes were specific of their respective *Leishmania* complex.

During September 1996, 42 mammals were captured near dwellings and in citrus plantations: 12 *Didelphis marsupialis* (MSP), 2 *Micoureus cinerea* (MSP), 14 *Akodon* spp. (ROD), 8 *Oligoryzomys* spp. (ROD), 1 *Oryzomys* spp. (ROD), 2 *Rhipidomys leucodactylus* (ROD), 2 *Conepatus chinga rex* (CAR) and 1 *Histiotus velatus* (CHT). For each mammal, a piece of skin, liver and spleen were ground together with sterile PBS in a tissue grinder and the extracts inoculated in the hind feet of hamsters. Only one stock was isolated from a *C. chinga rex* and was characterized by isoenzyme analysis (8 loci) and kDNA-PCR as belonging to the *L. braziliensis* complex (Fig. A, B, lanes 25 and 26). A blood sample of each mammal was tested by kDNA-PCR. Thirty-five percent of the samples gave highly polymorphic multi-banding patterns. After Southern blot and hybridization with the three different probes, four samples from 1 *Akodon* spp., 2 *Oligoryzomys* spp., and 1 *C. chinga rex* (mentioned above) were only recognized by the *L. mexicana* complex probe (Fig. A, B, lanes 5, 7, 8 and 15). The profiles of kDNA-PCR from the three rodents were very similar and were also recognized by kDNA-PCR products of a patient strain isolated from this focus and previously characterized as belonging to *L. amazonensis*. The kDNA-PCR profile of *C. chinga rex* was different from the three others, presenting weaker hybridization with the *L. mexicana* complex probe and did not hybridize with the kDNA-PCR products from the patient strain. As the stock isolated from this mammal belongs to the *L. braziliensis* complex, this animal appears to be in-

This investigation received financial support from the French Ministry of Foreign Affairs and UNDP/World Bank/WHO, Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, grant no. 940902.

+Corresponding author. Present address: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, Ciudad Universitaria, AP 70228, CP 04510, México DF. E-mail: breniere@servidor.unam.mx  
Received 15 December 1997

Accepted 20 October 1998

ected by two *Leishmania* belonging to different complexes. All the other PCR samples were not recognized by any of the *Leishmania* complex probes and similarly did not hybridize with PCR products from *T. cruzi*.

These results showed that some mammals are putative reservoirs of *Leishmania*. As the primers used are ubiquitous and amplify a large range of Kinetoplastidae, the majority of the studied mammals could have been infected by parasites other than *T. cruzi* and *Leishmania* of the three complexes tested. The strong hybridization of the PCR products of the three rodents with the *L. mexicana* probe and PCR products from a patient strain support the hypothesis that *Akodon* spp. and *Oligoryzomys* spp. are reservoirs of *L. amazonensis* at this focus. *Akodon* spp. and *Oligoryzomys* spp. represented 56% and 32% respectively of captured rodents and their infection rates reached 7% and 25%. Moreover at this focus, the sandfly, *Lutzomyia nuñeztovari anglesi* is an abundant species and three strains were isolated and typed by isoenzyme. All three were genetically closely related to *L. amazonensis* and one presented the same genotype as the strain isolated from a patient. An infected sandfly gut from another *L. nuñeztovari anglesi*

specimen was kDNA-PCR tested and the amplification products were recognized only by the *L. braziliensis* complex probe. Although no human strain of *L. braziliensis* complex was isolated, parasites belonging to the *L. braziliensis* and *L. mexicana* complexes co-exist in this area. Very few data are available on reservoirs of the *L. mexicana* complex. Leishmaniasis due to these parasites occurs more commonly as outbreaks, and human lesions mostly cure spontaneously (A Barral 1991 *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546, BL Herwaldt et al. 1992 *J Inf Dis* 165: 518-527). Nevertheless, in different New World foci, species belonging to various orders of mammals including dogs, rodents and carnivores have been infected by parasites of the *L. mexicana* complex (FJ Andrade-Narvaez et al. 1990 *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 219-220, RD Kreutzer 1990 *Am J Trop Med Hyg* 43: 90-136, RN Johnson et al. 1992 *Am J Trop Med Hyg* 46: 282-287). In Ecuador, T Mimori et al. (1989 *Am J Trop Med Hyg* 40: 154-158) reported that single isolates from *Sciurus vulgaris* (ROD), *Potos flavus* (CAR) and *Tamandua tetradactyla* (EDE) were identified as *L. amazonensis*. In the Cajuata focus, the putative reservoirs corresponded to the most frequently captured mammals.

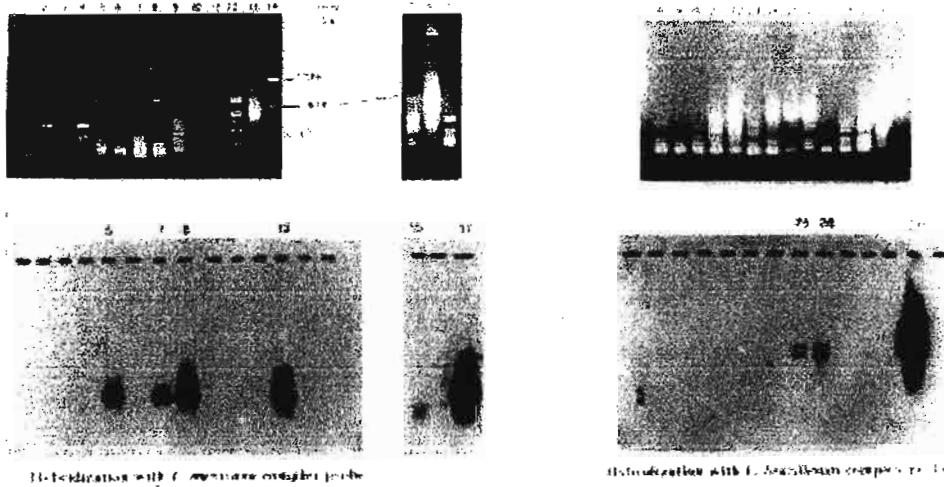


Fig.- A: ethidium bromide stained 1.5% agarose gel comparing kDNA-PCR products examined in this study. Products from reference strains of *Leishmania donovani* complex, strain MHOM/BR/79/L101 are shown in lanes 11 and 28; products from *L. mexicana* complex, MNYC/BZ/62/M379 are in lanes 12, 17, and 29; and *L. braziliensis* complex, MHOM/BO/90/CG in lanes 13, 16 and 30. Products from mammal blood samples were as follows: rodents (lanes 1-5, 7, 8, 19-24), *Conepatus chinga rex* lanes 6 and 15, marsupial (lane 18). Products from isolated strain of *C. chinga rex* (lanes 25 and 26) and Paraguayan *Leishmania* sp. (lane 9). Water template (lanes 10, 27); molecular weights Puc 19/Ras I (lanes 14, 31). B: hybridization patterns of these products with the three *Leishmania* complex specific probes; only positive hybridizations are presented; hybridization with M379 probe, corresponding to *L. mexicana* (lanes 1-17); hybridization with CG probe corresponding to *L. braziliensis* complex (lanes 18 to 31). These products were negative with other probes except when corresponding to strain control.

Reprinted from

# ACTA TROPICA

---

Acta Tropica 73 (1999) 283–293

## Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes

S.F. Brenière <sup>a,\*</sup>, J. Telleria <sup>b</sup>, M.F. Bosseno <sup>a</sup>, R. Buitrago <sup>b</sup>, B. Bastrenta <sup>a</sup>,  
G. Cuny <sup>c</sup>, A.L. Banuls <sup>a</sup>, S. Brewster <sup>d</sup>, D.C. Barker <sup>d</sup>

<sup>a</sup> UMR CNRS/ORSTOM no. 9926: 'Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs', ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

<sup>b</sup> Universidad Mayor de San Andres, IBBA, Instituto Boliviano de Biología de Altura, CP 641 La Paz, Bolivia

<sup>c</sup> Laboratoire Rétrovirus-parasites, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

<sup>d</sup> MRC Outstation of NIMR, Department of Pathology, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QP, UK



ELSEVIER

# ACTA TROPICA

**Aims and Scope:** *Acta Tropica* is an international journal that covers biomedical and health sciences with particular emphasis on topics relevant to human and animal health in the tropics and the subtropics. Its scope includes the biology of parasites and vectors, welcoming contributions concerning either basic or applied research in disciplines such as taxonomy, morphology, biochemistry, physiology and immunology; the development of tools for diagnosis and disease control; clinical and community medicine; and the epidemiology of communicable disease and health systems. Contributions may be in the form of original papers, review articles or short communications.

## Editors:

A. Björkman.

Department of Infectious Diseases, Karolinska Hospital, S-171 76 Stockholm, Sweden (Fax: +46-8-517 718 06; E-mail: anders.bjorkman@inf.ds.sll.se).

G.V. Brown

The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Post Office, The Royal Melbourne Hospital, Melbourne, Victoria 3050, Australia (Fax: +61-3-93470852; E-mail: brown\_g@wehi.edu.au).

## Editorial Board

J. R. Baker (Cambridge, UK)  
B. Betschart (Neuchâtel, Switzerland)  
K. Bienz (Basel, Switzerland)  
P. Billingsley (Aberdeen, UK)  
Z. Brener (Belo Horizonte, Brazil)  
H. Briegel (Zürich, Switzerland)  
R. Brun (Basel, Switzerland)  
N.O. Christensen (Charlottenlund, Denmark)  
C.F. Curtis (London, UK)  
J.J. Doyle (Nairobi, Kenya)  
H. Feldmeier (Bucholz, Germany)  
L.C. Gasbarre (Beltsville, MD, USA)  
N. Gyr (Basel, Switzerland)  
C. Hatz (Basel, Switzerland)  
P. Köhler (Zürich, Switzerland)  
S.M. Krassner (Irvine, CA, USA)

S.B. Lucas (London, UK)  
M.-S. Lye (Kuala Lumpur, Malaysia)  
J. Manuël (Épalinges, Switzerland)  
D.P. McManus (Brisbane, Australia)  
D.H. Molyneux (Liverpool, UK)  
M. Murray (Glasgow, UK)  
Z.S. Pawlowski (Poznań, Poland)  
C.T.D. Ribeiro (Rio de Janeiro, Brazil)  
D.M. Sala-Diakanda (Yaoundé, Cameroon)  
G. Schaub (Bochum, Germany)  
P. Schubarth (Delémont, Switzerland)  
T. Seebeck (Bern, Switzerland)  
M. Tanner (Basel, Switzerland)  
A. Tomkins (London, UK)  
S.G. Wright (London, UK)

**Publication information:** *Acta Tropica* (ISSN 0001-706X). For 1999, volumes 71-73 are scheduled for publication. Subscription prices are available upon request from the Publisher or from the Regional Sales Office nearest you or from this journal's website (<http://www.elsevier.nl/locate/actatropica>). Further information is available on this journal and other Elsevier Science products through Elsevier's website: (<http://www.elsevier.nl>). Subscriptions are accepted on a prepaid basis only and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by standard mail (surface within Europe, air delivery outside Europe). Priority rates are available upon request. Claims for missing issues should be made within six months of the date of dispatch.

**Orders, claims, and product enquiries:** please contact the Customer Support Department at the Regional Sales Office nearest you: New York: Elsevier Science, P.O. Box 945, New York, NY 10159-0945, USA, Tel. (+1)212-633-3730. [Toll free number for North American customers: 1-888-4ES-INFO (437-4636)]. Fax (+1)212-633-3680, e-mail [usinfo-f@elsevier.com](mailto:usinfo-f@elsevier.com). Amsterdam: Elsevier Science, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands, Tel. (+31)20-4853757, Fax (+31)20-4853432, e-mail [nlinfo-f@elsevier.nl](mailto:nlinfo-f@elsevier.nl). Tokyo: Elsevier Science K.K., 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan, Tel. (+81)3-5561-5033, Fax (+81)3-5561-5047, e-mail [info@elsevier.co.jp](mailto:info@elsevier.co.jp). Singapore: Elsevier Science, No. 1 Temasek Avenue, #17-01 Millenia Tower, Singapore 039192, Tel. (+65)434-3727, Fax (+65)337-2230, e-mail [asiainfo@elsevier.com.sg](mailto:asiainfo@elsevier.com.sg).

© The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).

© 1999, Elsevier Science B.V. All rights reserved

Printed in The United Kingdom.



## Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes

S.F. Brenière<sup>a,\*</sup>, J. Telleria<sup>b</sup>, M.F. Bosseno<sup>a</sup>, R. Buitrago<sup>b</sup>, B. Bastrenta<sup>a</sup>,  
G. Cuny<sup>c</sup>, A.L. Banuls<sup>a</sup>, S. Brewster<sup>d</sup>, D.C. Barker<sup>d</sup>

<sup>a</sup> UMR CNRS/ORSTOM no. 9926: 'Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs', ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

<sup>b</sup> Universidad Mayor de San Andres, IBBA, Instituto Boliviano de Biología de Altura, CP 641 La Paz, Bolivia

<sup>c</sup> Laboratoire Rétrovirus-parasites, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

<sup>d</sup> MRC Outstation of NIMR, Department of Pathology, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QP, UK

Received 16 January 1998; received in revised form 28 March 1999; accepted 2 April 1999

### Abstract

Here we define a new approach for the detection and characterisation of *Leishmania* complexes by polymerase chain reaction (PCR) and specific hybridisation. The first step consists of PCR amplification of kDNA minicircles using general kinetoplastid primers, which generate a polymorphic multi-banding pattern for all *Leishmania* species and other Kinetoplastidae. The second step is the identification of the *Leishmania* species complexes by hybridisation of the PCR products with specific kDNA probes. Polymorphic PCR-products from a genetically diverse set of *Leishmania* species were analysed by electrophoresis and the banding patterns compared with multi-locus enzyme electrophoresis (MLEE) data. The banding patterns produced by *Leishmania* species were very heterogeneous, making kDNA-PCR useful for determining closely related strains and for fingerprinting individual strains. The degree of kDNA-PCR and MLEE polymorphism was compared using UPGMA dendrograms. Three complex-specific probes were generated from major PCR bands of reference stocks belonging to the *Leishmania mexicana*, *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* complexes, and hybridisation of these probes to membrane-bound PCR products could reliably identify the strain to a complex level. A combination of kDNA-PCR fingerprinting and hybridisation with kDNA probes was found to be useful for both sensitive detection and direct identification of *Leishmania* species complexes. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Leishmania* genera; Kinetoplast; Polymerase chain reaction; DNA hybridisation; Phylogeny

### 1. Introduction

Leishmaniasis affects more than 12 million people in 88 countries of the world with 350 million

\* Corresponding author. Present address: ORSTOM, Mission Bolivia, Casilla 9214, La Paz, Bolivia. Fax: +591-2-391854.

people at risk; every year there are 1–1.5 million cases of cutaneous leishmaniasis and 500 000 cases of visceral leishmaniasis (WHO, 1997). In the New World two taxonomic groups of *Leishmania* exist, the sub-genera *Leishmania* *Leishmania* and *Leishmania* *Viannia*; the subgenus *Viannia*, which is also known as the *braziliensis* complex, includes the species *Leishmania braziliensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania panamensis*, and *Leishmania guyanensis*, while the subgenus *Leishmania* may be further divided into species complexes: the *mexicana* complex (*Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania aristidesi*, and *Leishmania pifanoi*), and the *donovani* complex (*Leishmania chagasi*) (Lainson and Shaw, 1987). These agents are responsible for a whole spectrum of clinical symptoms: cutaneous leishmaniasis, diffuse cutaneous leishmaniasis, muco-cutaneous leishmaniasis, and visceral leishmaniasis.

The present classification is mostly based on the geographical distribution and biological behaviour of the parasite in vectors and mammalian hosts or in culture. Genetic population studies of parasites are becoming increasingly important in the identification of *Leishmania* species (Lainson and Shaw, 1987). Construction of dendrograms from genetic marker data has shown that each complex can be considered as a separate lineage (Rioux et al., 1986; Guerrini, 1993; Soccol, 1993). Within each lineage, classification into genetic sub-groups is more difficult and commonly recognised species are not always concordant with genetic markers; for example, the *L. garnhami* species is genetically so closely related to *L. amazonensis* that they cannot be distinguished by genetic markers (Guerrini, 1993). A large survey of data in the literature reveals evidence of clonality in natural populations of many species of *Leishmania* (Tibayrenc et al., 1990; Tibayrenc, 1993; Jiménez et al., 1997). These natural clones appear to be evolving over time and dispersing over geographic locations without genetic exchange between organisms, maintaining genetically similar populations.

Several groups have proposed using the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* species, due to the low sensitivity of

the current detection methods (most commonly direct detection of parasites in tissue from the lesions by microscopic observation) and the difficulty in isolating parasites from reservoirs and cases of *Leishmania braziliensis* infection. Kinetoplastid species (including *Leishmania* and *Trypanosoma* species) contain an ideal target for PCR in the form of the minicircle DNA of the kinetoplast, an unusual type of mitochondrion. Minicircles are small molecules of around 750 bp in *Leishmania* species, and are present at a copy number of 10 000 molecules per cell (Barker, 1980), providing a plentiful target for PCR.

Each minicircle contains a region of conserved sequence around the origin of replication flanked on either side by a variable sequence (Fig. 1). Sets of primers designed for the detection of species complexes, generating kDNA amplification products, have been described (de Bruijn and Barker, 1992; Lopez et al., 1993; Eresh et al., 1994; Ravel et al. 1995). In this study we developed a set of primers generating a distinct and complex banding pattern for each isolate within the Kinetoplastida (*Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*). *Leishmania* complexes can subsequently be identified by hybridisation with kDNA probes specific for the three complexes. This work was based on a large set of reference strains previously characterised by MLEE for 17 loci (Guerrini, 1993).

## 2. Material and methods

### 2.1. *Leishmania* isolates and DNA preparation

The *Leishmania* stocks used are listed in Table 1 with geographic and host origins, and the date of isolation indicated according to WHO nomenclature. Cultures were maintained in Schneider's media at 26°C. DNA was purified by phenol-chloroform extraction, as described by Veas et al. (1991).

### 2.2. Polymerase chain reaction

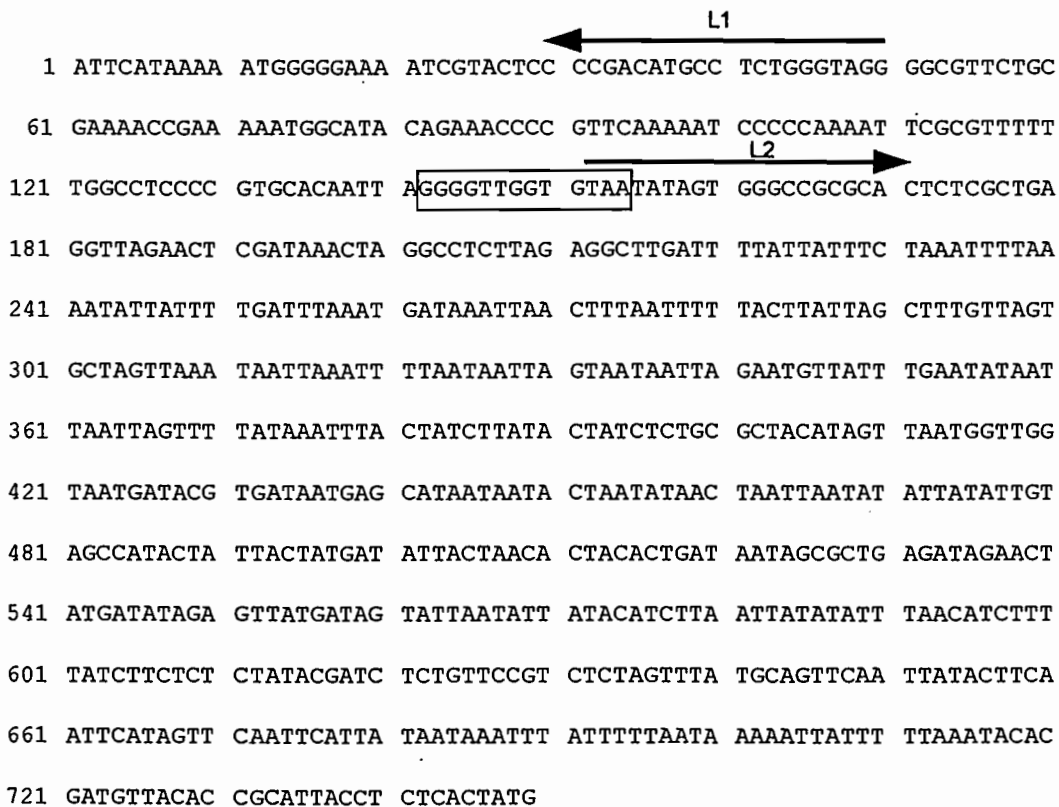
PCR reactions for amplification of variable regions of kDNA minicircles were performed using the following primers:

L1: 5'-CCT ACC CAG AGG CCT GTC  
GGG-3'

L2: 5'-TAA TAT AGT GGG CCG CGC AC-  
3',

purchased from Genset Laboratory (Paris, France). These primers were designed from the minicircle sequence of the *L. braziliensis* reference strain MHOM/BR/75/M2904 (de Bruijn and Barker, 1992) (Fig. 1). A restriction site (*Stu*I) was artificially introduced into the L1 oligonucleotide, and the L2 primer contains a natural *Sau*96I site. These restriction sites were used to separate the amplified variable region of the minicircle away from the oligonucleotide primers which contain part of the conserved region. The

samples were amplified in 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X100, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, and 1 μM of each oligonucleotide primer in a total reaction volume of 100 μl. Each reaction tube was covered with 50 μl paraffin to prevent evaporation. *Taq* DNA polymerase (2.5 U) (Promega, USA) were used for amplification, performed on a Biometra Trio thermoblock (Göttingen, Germany). Amplification took place under the following conditions: 96°C for 6 min, followed by 40 cycles of 93°C for 5 s; 58°C for 1 min; and 72°C for 1 min. Reactions were cooled at 4°C for variable times. Each run included one positive control of total DNA template and one negative



L1: 3' GGGCTGTCCGGAGACCCATCC 5'

L2: 3' CACGCGCCGGTGATATAAT 5'

Fig. 1. Whole minicircle sequence from *L. braziliensis* M2904 (de Bruijn and Barker, 1992) showing the position of primers L1 and L2. The universal minicircle sequence (UMS) is boxed. A 145 bp conserved region runs from nt 25–170, with the variable region comprising the remainder of the minicircle. The *Sau*96I site is underlined in L2, and the artificial *Stu*I site in L1. This minicircle would give a 610 bp product when amplified using L1 and L2.

Table 1  
Details of *Leishmania* species isolates and identification of complex based on kDNA probes

WHO species code	Species	Code	Z <sup>a</sup>	Identification by kDNA probes			
				PP75	M379	CG	B18
MHOM/IN(--)/61/L13	<i>L. donovani</i>	1	Z 01	+	–	–	–
MHOM/BR/79/L101	<i>L. chagasi</i>	2	Z 04	+	–	–	–
MHOM/BR/74/PP 75	<i>L. chagasi</i>	3	Z 07	+	–	–	–
MHOM/VE/76/JAP 78	<i>L. garnhami</i>	4	Z 11	–	+	–	–
IFLA/BR/67/PH8	<i>L. amazonensis</i>	5	Z 12	–	+	–	–
MHOM/BR/76/LTB 012	<i>L. amazonensis</i>	6	Z 15	–	+	–	–
MINYC/ BZ/62/ M379	<i>L. mexicana</i>	7	Z 20	–	+	–	–
MHOM/ VE/57/ LV135	<i>L. pifanoi</i>	8	Z 21	–	+	–	–
MORY/PA/68/GML3	<i>L. aristidesi</i>	9	Z 23	–	+	–	–
RTAR/SN/67/G10	<i>L. tarentolae</i>	10	Z 27	–	–	–	–
MHOM/SU/73/5 Askh	<i>L. major</i>	11	Z 29	–	–	–	–
MHOM/CO 83/REST 417	<i>L. panamensis</i>	12	Z 43	–	–	+	+
MHOM/GF/85/Lem 669	<i>L. guyanensis</i>	13	Z 50	–	–	+	+
MHOM/BR 78/M5378	<i>L. guyanensis</i>	14	Z 51	–	–	+	+
MHOM/BR/84/LTB 300	<i>L. braziliensis</i>	15	Z56	–	–	+	+
MHOM/CO/83/Lem 469	<i>L. braziliensis</i>	16	Z 58	–	–	+	+
MHOM/BO/90/CG	<i>L. braziliensis</i>	22	Z 60	–	–	+	+
MHOM/BO/90/JP	<i>L. braziliensis</i>	23	Z 60	–	–	+	+
MHOM/BO/90/JM	<i>L. braziliensis</i>	24	Z 60	–	–	+	+
MHOM/BO/90/AM	<i>L. braziliensis</i>	25	Z 60	–	–	+	+
MHOM/BO/90/EL	<i>L. braziliensis</i>	26	Z 60	–	–	+	+
MHOM/BO/90/CS	<i>L. braziliensis</i>	27	Z 60	–	–	+	+
MHOM/Br/75/M2904	<i>L. braziliensis</i>	17	Z 62	–	–	+	+
MHOM/PE/90/LH 1016	<i>L. braziliensis</i>	18	Z 64	–	–	+	+
MHOM/BO/84/LPZ 595	<i>L. braziliensis</i>	19	Z 66	–	–	+	+
MHOM/PE/90/HB44	<i>L. peruviana</i>	20	Z 78	–	–	+	+
MHOM/BR/81/M6426	<i>L. lainsoni</i>	21	Z 81	–	–	–	+
MHOM/SU/74/k-27	<i>L. tropica</i>	28	n/d	–	–	–	–

<sup>a</sup> Z, zymodeme numbers referred to in Guerrini (1993) (17 loci).

control where the DNA template was replaced by water. The sensitivity was evaluated using from 10 fg to 10 ng of *Leishmania* reference strain total DNA.

### 2.3. Gel electrophoresis and Southern blotting

PCR products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels in 1 × TAE buffer (40 mM Tris acetate; 1 mM EDTA pH 8.0) and stained with 200 µg/l ethidium bromide. DNA was transferred from agarose gels after alkali denaturing (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, twice for 15 min) on to charged nylon membranes, Hybond N+ (Amersham, UK) by vacuum blotting.

Polyacrylamide gel electrophoresis was done on 7.5% gels (10 × 7 cm) at 100 V for 90 min in a mini gel system (Bioblock Scientific, France), and stained with ethidium bromide or silver nitrate.

### 2.4. Probes

Five different probes were used in total: CG, M379, PP75, B18 and LTc. CG, M379 and PP75 were purified major bands of PCR products from reference isolates CG (*L. braziliensis*, 564 bp band), M379 (*L. mexicana*, 350 bp band) and PP75 (*L. chagasi*, 564 bp band), respectively. The fragments were recovered by electroelution using a 422 electroeluter device (Bio-Rad, France) according to the manufacturer's instructions, and

then digested with *Sau96I* and *StuI* (Promega, USA). After digestion, the DNA was ethanol precipitated and resuspended in 100 µl sterilized, distilled water. The amount of DNA present was quantified by electrophoresis of sequential dilutions.

B18 is a 525 bp partial minicircle from M2904 (*L. braziliensis*) cloned into a PUC8 vector: it contains the conserved region of the minicircle and is specific for the subgenus *Viannia* (Barker et al., 1986; Barker, 1989).

LTc is a mixture of PCR products from SO34 cl4 and MN *T. cruzi* reference stocks, amplified with L1 and L2. These stocks are from two different lineages of the *T. cruzi* taxon. The PCR products were digested with *Sau96I* and *StuI* as above, and used directly for labelling.

### 2.5. Labelling and hybridisation conditions

Probes CG, M379 and PP75 were labelled using the enhanced chemiluminescence gene detection system (ECL), according to the manufacturer's instructions (Amersham, UK). Hybridisation was performed at 42°C overnight in a rotating oven (Appligen, France.). The membranes were washed twice to a stringency of  $0.1 \times \text{SSC}$ . Two exposures were performed (1 and 30 min) on autoradiography film (Hyperfilm<sup>TM</sup>-MP, Amersham, UK).

The B18 probe was labelled with  $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dATP}$  using the Prime-It II random priming kit (Stratagene, USA). Hybridisation took place at 65°C overnight, and the filters were washed to a stringency of  $0.1 \times \text{SSC}$  for 15 min at 65°C. Autoradiographic film was exposed overnight at  $-70^\circ\text{C}$ .

### 2.6. Phylogenetics

Each reproducible kDNA-PCR gel band was coded, starting with 1 for the largest DNA fragment, so that each stock was represented by a set of numbers. Similarly, for each enzyme system each band is coded. For estimation of divergence and clustering, Jaccard's distance (Jaccard, 1908) was used. It is estimated as follows:  $D_j = 1 - (C/2N - C)$  where  $C$  is the number of bands common to both genotypes to be compared, and  $N$  is the total number of observed bands in the two com-

pared genotypes. The UPGMA method (unweighted pair-group method with arithmetic averages; Sokal and Sneath (1963)) was used to cluster the zymodemes or the kDNA-PCR profiles together according to their Jaccard's distances. Dendrograms were computed using Mac Dendro software (Thioulouse, 1989).

## 3. Results

### 3.1. Sensitivity and specificity of kDNA-PCR

For all of the 28 *Leishmania* isolates studied, the primers L1 and L2 generated multi-sized products ranging from 100–1300 bp, amplified from the variable regions of kDNA minicircles (Fig. 2a). The banding patterns were reproducible when the annealing temperature of the PCR was raised from 58 to 61 and 64°C. The PCR was sensitive enough to detect 1–100 parasites depending on the *Leishmania* complex: the minimal amount of total DNA used as template was 0.1, 10 and 100 pg from stocks CG, PH8 and PP75, respectively. Hybridisation was found to increase the sensitivity 10-fold. Primers L1 and L2 were not specific to *Leishmania* species, amplifying all other Kinetoplastidae tested: 12 stocks of *T. cruzi*, four stocks of *T. rangeli* and two stocks of *T. brucei* (Fig. 3).

To ensure that L1 and L2 did not amplify human DNA, DNA was extracted from non-infected patients using the method of Wincker et al. (1994). The quality of the DNA was confirmed by amplification using  $\beta$ -globin primers. No product was observed when this DNA was used as template in a L1L2 PCR reaction. Similarly, hamster DNA was extracted from non-infected and infected animals; an amplification product with L1 and L2 was observed only from the infected animals. FASTA searches (Pearson and Lipman, 1988) of EMBL and Genbank using the primer sequences showed significant homology only to *Leishmania* species from the subgenus *Viannia*, with only very weak homology to some human unique sequences. The kDNA nature of the amplified products was confirmed both from strains of the subgenus *Viannia* by hybridisation with

B18, which is a cloned minicircle fragment, and from *T. cruzi* strains: the L1L2 PCR product from *T. cruzi* recognised the same bands of *Hinf*I- and *Eco*R1-digested total *T. cruzi* DNA as variable region kDNA probes previously used (Veas et al., 1991).

3.2. PCR-polymorphism of *Leishmania* isolates

Agarose electrophoresis of PCR products revealed polymorphism among *Leishmania* species. All isolates from the subgenus *Viannia* and the *L. lainsoni* species presented a similar profile characterised by a pack of bands of around 610 bp (Fig.

2a). The other *Leishmania* species fail to show specific patterns. Acrylamide electrophoresis gave a clearer separation of PCR products (Fig. 4) and was used to assess the relationship between the 28 *Leishmania* strains by constructing a UPGMA dendrogram (Fig. 5b), and comparing it with a similar dendrogram constructed from MLEE data (Fig. 5a). The topologies of the two dendrograms are similar.

The MLEE dendrogram clusters the isolates in principal lineages as previously reported (Guerini, 1993). The three stocks from the *donovani* complex are clustered together, as are those from the *mexicana* complex (*L. amazonensis*, *L. mexi-*

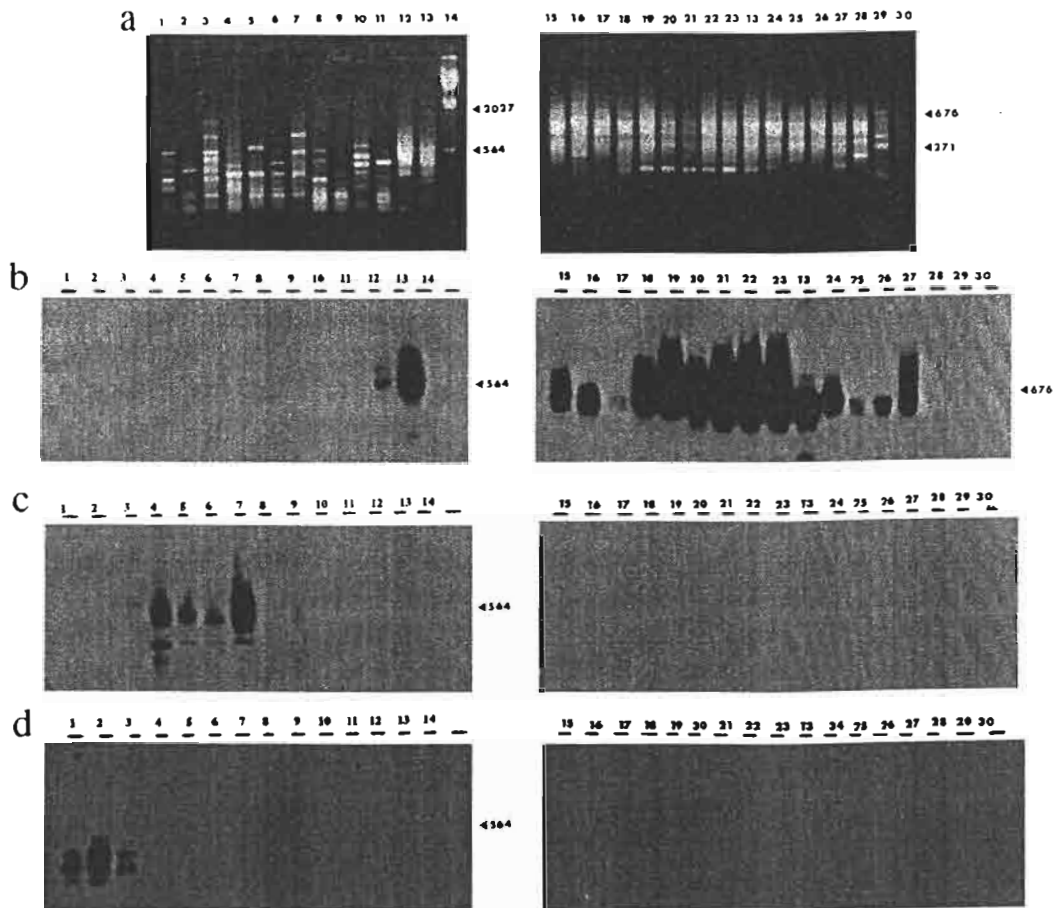


Fig. 2. (a) Ethidium bromide stained 1.5% agarose gel containing kDNA PCR products from *Leishmania* strains. (b, c, d) Hybridisation with *Leishmania* complex specific probes (CG, M379, and PP75, respectively). Lanes 1–3: *L. donovani* complex (L13, L101 and PP75); lanes 4–7 and 9: *L. mexicana* complex (JAP 78, PH8, LTB 012, M379 and GML3); lane 8: *Leishmania* sp.; lane 10: *L. tarentolae* (G10); lane 11: *L. major* (5 Askh); lanes 12–13, 15–27: *braziliensis* complex (subgenus *Viannia*) (REST 417, CG, Lem 669, M5378, LTB 300, Lem 469, JP, AM, EL, JM, CS, GC, M2904, LH 1016, LPZ 595 and HB44); lane 28: *L. lainsoni* (M6426); lane 29: *L. tropica* (k27); lanes 14 and 30: molecular weight markers  $\lambda$  *Hind*III and Puc Ras I. NB: Amplification of GML3 (lane 9) was subsequently repeated, giving a much stronger product, which gave a strong signal when hybridised with probe M379.

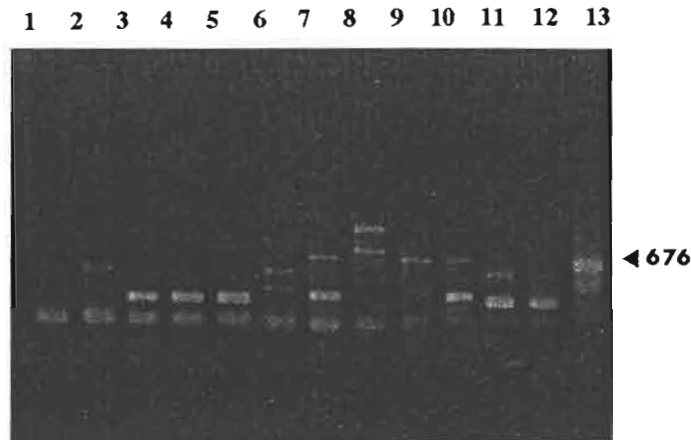


Fig. 3. Ethidium bromide stained 1.5% agarose gel containing kDNA PCR products from Kinetoplastidae strains. Lanes 1–6: *T. cruzi* strains (OPS21, Cuica, CBB, MN, Tpk1 and Tehuentepec); lanes 7–10: *T. rangeli* strains (Basel, Riera, 2008 and ITMAP 1140); lanes 11 and 12: *T. brucei* strains (Biyamina and Eatro 1125); and lane 13: *L. peruviana* (HB44).

*cana*, *L. pifanoi*, and *L. garnhami* species). The stocks from the subgenus *Viannia* (the *braziliensis* complex) are separated into two groups corresponding to *L. panamensis* and *L. guyanensis* species on the one hand (Fig. 5a, isolates numbered 12–14) and *L. braziliensis* and *L. peruviana* on the other (Fig. 5a, isolates numbered 15–20 and 22–27). These two groups are more closely related to each other than to isolates from the other complexes. *L. lainsoni* is most closely related to species of the subgenus *Viannia*.

The kDNA-PCR dendrogram shows large genetic distances between the different isolates. Isolates belonging to the subgenus *Viannia* (*braziliensis* complex) or *mexicana* complex are closely related to other isolates in their complex, but within the complexes the topology is different to that observed from MLEE data. It is worth noting that the isolates belonging to zymodeme 60 (Table 1) are distinguished by kDNA-PCR.

### 3.3. Complex specificity of the three *Leishmania* kDNA probes

High stringency hybridisation results using the CG probe (from *L. braziliensis*) to Southern blots of PCR products is presented in Fig. 2b. The probe hybridised only to bands of around 600 bp in size from the isolates belonging to the subgenus *Viannia* (Table 1).

The B18 probe hybridised the to same set of isolates as CG but also to the *L. lainsoni* isolate (Table 1), again recognising only bands of around 600 bp in size (data not shown).

Hybridisation of probe M379 (*L. mexicana*) was limited to *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. mexicana*, *L. garnhami* and *L. aristidesi* (Fig. 2c, Table 1). This probe recognised two bands: one of around 600 bp, and another of around 200–300

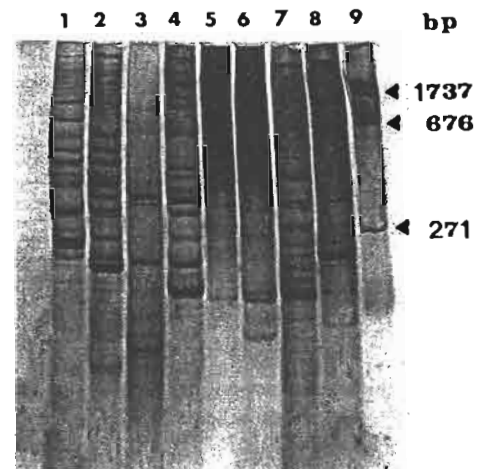


Fig. 4. Ethidium bromide stained 7.5% acrylamide gel showing kDNA PCR products from *Leishmania* strains. Lane 1: PP75 *L. chagasi*; lane 2: L13 *L. donovani*; lane 3: M379 *L. mexicana*; lane 4: M6426 *L. lainsoni*; lane 5: GML3 *L. aristedes*; lane 6: M2904 *L. braziliensis*; lane 7: M5378 *L. guyanensis*; lane 8: G10 *L. tarentolae*; and lane 9: molecular weight markers Puc 19/Ras I.

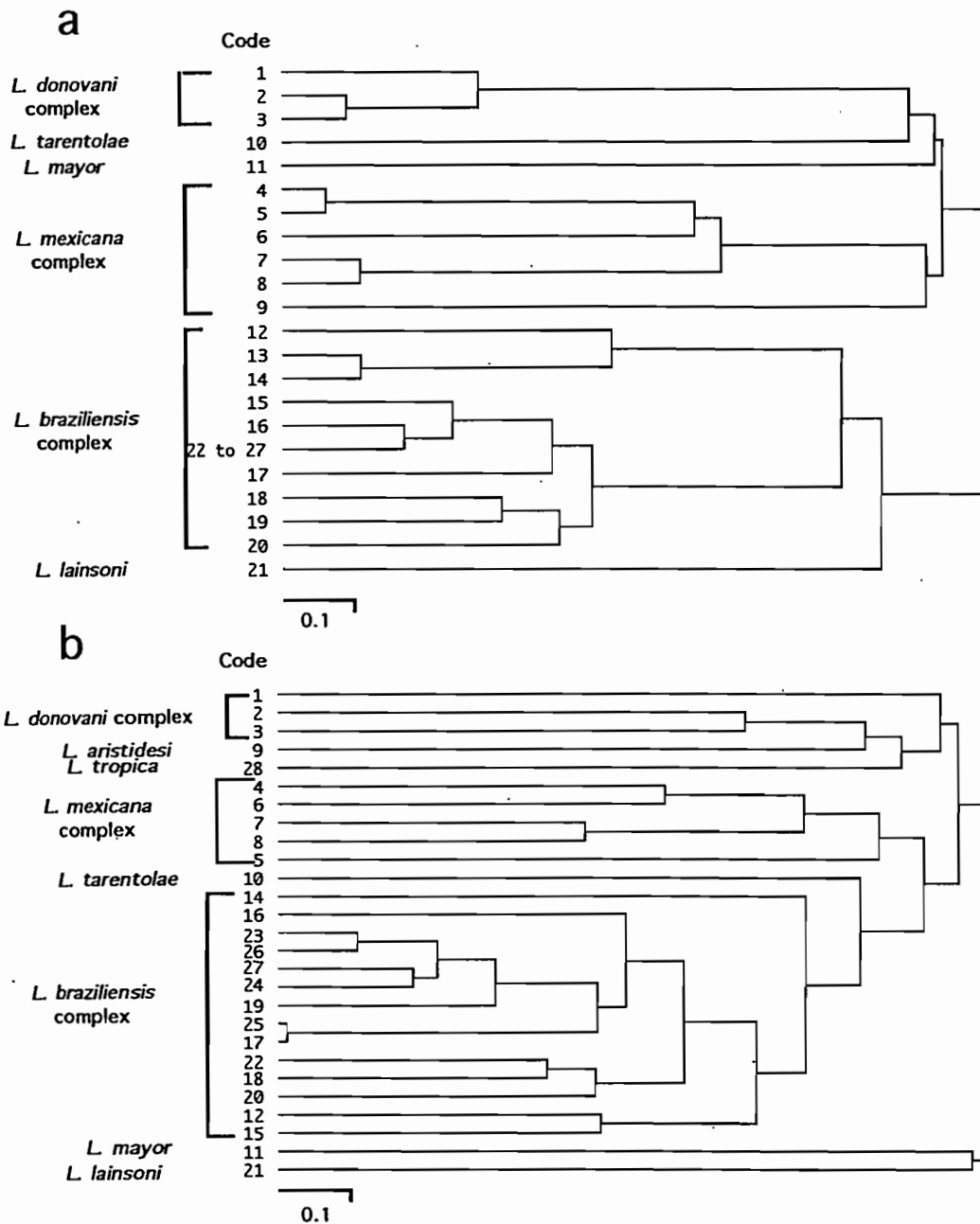


Fig. 5. Dendrograms constructed using the unweighted pair group method with arithmetic mean from a Jaccard distance matrix, based on (a) a multilocus enzyme electrophoresis study, and (b) kDNA-PCR patterns. The numbers at the extremities of the branches refer to strain codes indicated in Table 1.

bp. High stringency hybridisation of probe PP75 (*L. chagasi*) to Southern blots of PCR products was limited to small bands from the three isolates belonging to the *donovani* complex (Fig. 2d). Probes CG, B18, M379 and PP75 do not hybridise to PCR products from *T. cruzi*, *T. rangeli* and *T. brucei* sp. isolates.

Interestingly, one sample (*Leishmania* sp., Fig. 2a, lane 8) gave a small PCR product which was not hybridised by any of the probes. This sample, from Paraguay, was subsequently found not to be related to *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* or *L. donovani* by isoenzyme analysis at eight loci, although it was most similar to mem-

bers of the *Leishmania* subgenus. It remains as yet unidentified.

#### 4. Discussion

The prognosis of human leishmaniasis depends in part on the species of the infecting parasite. In field situations the isolation of *Leishmania* cultures for their species characterisation is not always possible, especially since often very few parasites are present in lesions, blood, skin, organs and sandflies. Moreover, isolation and culture protocols can select for particular clones from a heterogeneous population. It is highly desirable to develop sensitive molecular tools that are able to identify and type *Leishmania* directly.

Several studies have used PCR to amplify parasite DNA in biological samples using species- or complex-specific primers (de Bruijn and Barker, 1992; Arevalo et al., 1993; Guevara et al., 1992; Eresh et al., 1994). In some geographical areas more than one *Leishmania* species may be present, and to screen a single sample with multiple PCRs is expensive and introduces a major risk of contamination (false positives). Thus a general PCR avoiding population selection followed by secondary typing with probes is useful to discriminate *Leishmania* in the field (Rodgers et al., 1990; Degraeve et al., 1994). Here, we use a general Kinetoplastida PCR to generate polymorphism among Kinetoplastida followed by *Leishmania* species-complex discrimination using kDNA probes, an approach involving only one PCR reaction which can be used to identify a wide range of species.

Primers L1 and L2 were designed from the minicircle sequence of M2904 *L. braziliensis* (Fig. 1). Bearing in mind that minicircles from the *braziliensis* complex are approximately 750 bp in size, the product of L1L2 amplification should be around 610 bp in size; matching the set of bands shown in Fig. 2a. The kDNA nature of amplified products was confirmed by hybridisation to a cloned minicircle fragment, probe B18 (Table 1).

A search of GenBank revealed that the primers share sequence homology only with minicircle sequences from the subgenus *Viannia*. This corre-

lates well with the higher sensitivity of L1 and L2 for species of this subgenus. The highly polymorphic nature of the PCR products is rationalised by hybridisation: only some of the amplified bands are detected by kDNA probes. This does not mean to say that the remaining bands are not of *Leishmania* kinetoplast or nuclear DNA origin; when primers L1 and L2 were tested on human and hamster DNA, no product was observed, implying that all products are amplified from parasite DNA. In this way, L1 and L2 act almost as RAPD primers, producing a fingerprint of the DNA of each parasite strain, the complex of which can then be identified by hybridisation.

This fingerprint may be due to annealing of the primers at multiple sites around minicircles; indeed we know that minicircles from *T. cruzi* have four conserved regions equally spaced around the minicircle (Degraeve et al., 1988). In addition, the minicircle network of kinetoplastid organisms is often comprised of a number of different sequence classes, ranging from one in *T. evansi* (Borst et al., 1987) to an estimated 300 in *T. brucei* (Steinert and Van Assel, 1980). Thus, a multiple-sized PCR product may be the result of the primers annealing to different positions on each minicircle sequence class. The less polymorphic PCR product generated from species of the *braziliensis* complex reflects the remarkable homogeneity of the minicircle sequence over the primer annealing sites in these species (Brewster and Barker; unpublished observations).

The degree of polymorphism of the PCR product was used to relate species: species from the same complex showed similar, but not identical banding patterns. When the products were analysed in greater detail using polyacrylamide gel electrophoresis, extensive intra-specific and intra-zymodeme polymorphism was observed, and this was confirmed by phylogenetic analysis. The identification of individual strains is frequently required to infer the presence of the same pathogenic agent in different hosts; the technique is useful for vector and reservoir studies, and for the analysis of relapsed leishmaniasis in patients.

Several authors class *L. lainsoni* as belonging to the subgenus *Viannia* (Eresh et al., 1995):

Whether or not this is justified remains debatable: the CG probe hybridised to all strains of the *braziliensis* complex except *L. lainsoni* species, but B18 hybridised to all strains of the *braziliensis* complex including *L. lainsoni*. Isoenzyme analysis shows that *L. lainsoni* is genetically distant to other members of the *Viannia* subgenus (Guerrini, 1993; Soccol, 1993) and the kDNA-PCR pattern is also different to all other strains tested (Fig. 4b), results which favour the theory that this species is substantially different to other species of the subgenus *Viannia* (Eresh et al., 1995).

The M379 probe hybridised to strains from the *mexicana* complex including *L. aristidesi*, which is genetically distant to other members of the complex. This parasite is not a human pathogen and its taxonomic position is not well established. Similarly, the PP75 probe hybridised only to strains of the *donovani* complex, although more extensive testing is necessary to confirm the specificity of this probe. It is worth noting that numerous kDNA minicircle probes have been developed to type complexes and species of *Leishmania* (Barker and Butcher, 1983; Barker, 1990; Degraeve et al., 1994; Ravel et al., 1995; Fernandes et al., 1996). These probes should be tested on our kDNA-PCR products and may be able to discriminate the species within each complex.

Kinetoplast DNA is a useful target for PCR due to minicircle abundance. The high degree of sequence heterogeneity makes minicircle sequence data useful for taxonomic purposes. PCR and subsequent typing with kDNA probes have been applied to identify vectors and reservoirs and to type parasites in biopsy tissue and the blood of patients (Perez et al., 1994; Vasconcelos et al., 1994; Ravel et al., 1995; Passos et al., 1996). Primers L1 and L2 are being tested on blood samples from a preliminary set of patients with active cutaneous lesions from a focus of *mexicana* complex *Leishmania* infection in Bolivia. Five out of six blood samples gave products with similar multi-banding patterns, which did not resemble the characteristic pattern of the subgenus *Viannia*. Similarly, multi-banding patterns were obtained from blood samples of mammals captured in the *mexicana* focus (15/39) and from tissues (liver, spleen and skin) of a *Dasyurus novemcinctus* from

the Alto Beni region. Hybridisation is in progress, and the study of reservoirs has been extended to another Bolivian focus.

The use of the L1 and L2 primers in the search for reservoirs offers an important auxiliary tool that allows the identification of both *T. cruzi* and *Leishmania* species. In most Bolivian foci of *Leishmania*, *T. cruzi* is also present. This tool allows rapid screening of multiple samples and facilitates large scale epidemiological studies.

### Acknowledgements

This investigation received financial supports from the French Ministry of Foreign Affairs, the World Health Organisation, the Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (ID 94 0902) and the Medical Research Council (UK). S. Brewster holds a Wellcome Trust Prize Studentship.

### References

- Arevalo, J., Inga, R., Lopez, M., 1993. Polymerase chain reaction. Detection of *Leishmania braziliensis*. In: Persing, D.H., Tenover, F.C., Smith, T.F., White, T.J. (Eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 456–461.
- Barker, D.C., 1980. The ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of dark field electronmicroscopy images of isolated, purified networks. *Micron* 11, 21–62.
- Barker, D.C., 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99, 125–146.
- Barker, D.C., Butcher, J., 1983. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 285–297.
- Barker, D.C., Gibson, L.J., Kennedy, W.P.K., Nasser, A.A.A., Williams, R.H., 1986. The potential use of recombinant DNA species-specific probes for the identification of tropical *Leishmania*. *Parasitol.* 91, 139–174.
- Barker, R.H. Jr., 1990. DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Exp. Parasitol.* 70, 494–499.
- Borst, P., Fase-Fowler, F., Gibson, W.C., 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23, 31–38.
- De Bruijn, M.H.L., Barker, D.C., 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the

- Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Trop. 52, 45–58.
- Degrave, W.M., Fragoso, S., Britto, C., et al., 1988. Peculiar sequence organisation of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 27, 63–70.
- Degrave, W. M., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopez, U.G., 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*. A mini review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 89, 463–469.
- Eresh, S., McCallum, S.M., Barker, D.C., 1994. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitol. 109, 423–433.
- Eresh, S., de Bruijn, M.H.L., Mendoza-Leon, J.A., Barker, D.C., 1995. *Leishmania (Viannia) lainsoni* occupies a unique niche within the subgenus *Viannia*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89, 231–236.
- Fernandes, O., Bozza, M., Pascal, J.M., de Miranda, A.B., Lopes, U.G., Degrave, W.M., 1996. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 91, 279–284.
- Guerrini, F., 1993. Genetique des populations et phylogenie des *Leishmania* du Nouveau Monde. These de Doctorat, Universite de Montpellier II.
- Guevara, P., Alonso, J., Franco Da Silveira, J., et al., 1992. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. Mol. Biochem. Parasitol. 56, 15–26.
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44, 223–270.
- Jiménez, M., Alvar, J., Tibayrenc, M., 1997. *Leishmania infantum* is clonal in AIDS patients too: epidemiological implications. AIDS 11, 569–573.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Academic Press, New York, pp. 1–120.
- Lopez, M., Inga, R., Cangalaya, M., et al., 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49 (3), 348–356.
- Passos, V.M.A., Lasmar, E.B., Gontijo, C.M.F., Fernandes, O., Degrave, W., 1996. Natural infection of domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the Metropolitan region of Belo Horizonte state of Minas Gerais Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 91, 19–20.
- Pearson, W. R., Lipman, D. J., 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444–2448.
- Perez, J. E., Ogusku, E., Inga, R., et al., 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 161–164.
- Ravel, S., Cuny, G., Reyes, J., Veas, F., 1995. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. Acta Trop. 59, 187–196.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Pratlong, F., 1986. *Leishmania killicki* n. sp. (Kinetoplastida Trypanosomatidae) *Leishmania*. In: Rioux, J.A. (Ed.), *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. IMEEE, Montpellier, pp. 247–255.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection of diagnosis of *Leishmania*. Exp. Parasitol. 71, 267–275.
- Soccol, V.T., 1993. Les leishmanies du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Demarche progressive phenetique-cladistique. Relations phylogéniques avec les *Leishmania* de l'ancien monde. These de Doctorat, Universite de Montpellier I.
- Sokal, R.R., Sneath, P.H.A., 1963. In: Kennedy, D., Park, R.B. (Eds.), Principles of Numerical Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco, CA, p. 359.
- Steinert, M., Van Assel, S., 1980. The sequences of two kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma brucei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2445–2449.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J., 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma*, and its medical and taxonomical consequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2414–2418.
- Tibayrenc, M., 1993. Clonality in *Leishmania*. Parasitol. Today 9, 58.
- Thioulouse, J., 1989. Statistical analysis and geographical display of multivariate data on the Macintosh computer. Appl. Biosci. 5, 287–292.
- Vasconcelos, I.A.B., Vasconcelos, A.W., Fe Filho, N.M., et al., 1994. The identity of *Leishmania* isolated from sandflies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeastern Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50, 158–164.
- Veas, F., Brenière, S.F., Cuny, G., Brengues, C., Solari, A., Tibayrenc, M., 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. Cell. Mol. Biol. 37, 73–84.
- WHO, 1997. Website: <http://www.who.ch/programmes/ctd/act/leisact.htm>
- Wincker, P., Britto, C., Borges Pereira, J., Cardoso, M.A., Oelemann, W., Morel, C.M., 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51, 171–177.

**Information:** Instructions to authors are to be found at the beginning of each issue. The instructions can also be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.nl> or <http://www.elsevier.com>.

**Advertising information:** Advertising orders and enquiries may be sent to: **International:** Elsevier Science, Advertising Department, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK, Tel. (+44)(0)1865 843565, Fax (+44)(0)1865 843976. **USA and Canada:** Elsevier Science Inc., Mr. Tino DeCarlo, Advertising Sales Director, Elsevier Science Inc., 655 Avenue of the Americas, New York, NY 10010-5107, USA; Tel. (+1)(212) 633 3815; Fax (+1)(212) 633 3820; e-mail: [t.decarlo@elsevier.com](mailto:t.decarlo@elsevier.com). **Japan:** Elsevier Science K.K., Marketing Services, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan. Tel.: (+81)-3-5561-5033; Fax: (+81)-3-5561-5047.

**Submission:** Manuscripts (original and two copies) should be submitted to: *Dr. A. Björkman*, Department of Infectious Diseases, Karolinska Hospital, S-171 76 Stockholm, Sweden (Fax: +46-8-6225833; E-mail: [anders.bjorkman@inf.ds.sll.se](mailto:anders.bjorkman@inf.ds.sll.se)); or *Dr. G.V. Brown*, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Post Office, The Royal Melbourne Hospital, Melbourne, Victoria 3050, Australia (Fax: +61-3-93470852; E-mail: [brown\\_g@wehi.edu.au](mailto:brown_g@wehi.edu.au)).

**Publication:** Information concerning articles accepted for publication may be obtained from: *Acta Tropica*, Elsevier Science Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland (Tel.: +353 61 709600; Fax: +353 61 709100/709101; E-mail: [m.pearl@elsevier.ie](mailto:m.pearl@elsevier.ie)).

**USA mailing notice:** *Acta Tropica* (ISSN 0001-706X) is published monthly except in June, August and November by Elsevier Science B.V. (P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands). Annual subscription price in the USA US\$ 981 (valid in North, Central and South America), including air speed delivery. Application to mail at periodical postage rate is pending at Jamaica, NY 11431.

**USA POSTMASTER:** Send address changes to *Acta Tropica*, Publications Expediting Inc., 200 Meacham Ave. Elmont, NY 11003.

**AIRFREIGHT AND MAILING** in the USA by Publications Expediting Inc., 200 Meacham Avenue, Elmont, NY 11003.

**Electronic manuscripts:** Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs.

For the initial submission of manuscripts for consideration, hardcopies are sufficient. For the processing of *accepted papers*, electronic versions are preferred. After *final acceptance*, your disk plus two, final and exactly matching printed versions should be submitted together. Double density (DD) or high density (HD) diskettes (3½ or 5¼ inch) are acceptable. It is important that the file saved is in the native format of the wordprocessor program used. Label the disk with the name of the computer and wordprocessing package used, your name, and the name of the file on the disk. Further information may be obtained from the Publisher.

**Authors in Japan please note:** Upon request, Elsevier Science K.K. will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo office: Elsevier Science K.K. 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044; Tel. (03)-5561-5032; Fax (03)-5561-5045.

Article en preparation :

**Predominant clonal evolution leads to a close parity between gene expression profiles  
and subpecific phylogeny in *Trypanosoma cruzi***

**Telleria, J., Barnabé, C., Hide, M., Bañuls, A. L., and Tibayrenc, M\***

*Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche Centre  
National de la Recherche Scientifique (CNRS)/Institut de Recherche pour le Développement  
(IRD) BP64501 , 34394 Montpellier Cedex 05, France.*

**Analyse phylogénique intraspécifique de *Trypanosoma cruzi* par étude des séquences codantes exprimées et des séquences hypervariables des minicercles de l'ADN kinétoplastique. Implications sur le taux d'évolution clonale et de recombinaison génétique du parasite.**

Les populations naturelles de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, présentent un déséquilibre de liaison considérable, vérifié pour de nombreux marqueurs génétiques (isoenzymes, RAPD, RFLP, microsatellites). Ceci a permis de postuler que ce parasite subit une évolution clonale prépondérante, avec recombinaison génétique rare. Cependant, ce modèle a été remis en question par la découverte d'hybrides naturels et par l'obtention d'hybrides expérimentaux.

Dans le cadre de ce débat, nous avons mené deux analyses complémentaires de la diversité génétique de *T. cruzi*, sur un échantillonnage de souches représentatives de cette diversité.

Nous avons d'abord étudié le polymorphisme des séquences codantes exprimées, par purification des ARN messagers et amplification aléatoire des ADN-copie correspondants (RADES). Nous avons trouvé une corrélation statistique très forte entre les distances génétiques RADES et celles basées sur les isoenzymes ou les RAPD. Cette corrélation a été vérifiée visuellement par le fait que les arbres phylogénétiques RADES étaient très similaires aux arbres basés sur les autres techniques. Ceci montre que l'évolution clonale est suffisamment prépondérante pour imprimer sa marque sur la grande majorité des séquences du génome du parasite, y compris les séquences codantes exprimées, qui sont cependant soumises à sélection naturelle. Nous avons mis en évidence plusieurs séquences codantes exprimées spécifiques de l'espèce, de ses subdivisions génétiques et de ses stades (épimastigotes, trypomastigotes, amastigotes). Ces séquences seront analysées en détail.

Nous avons ensuite séquencé les parties variables des minicercles de l'ADN kinétoplastique. Les phylogénies obtenues étaient hautement incohérentes. Ceci peut s'expliquer: soit parce que notre sondage était insuffisant pour mettre en exergue les séquences majoritaires, soit du fait de la recombinaison génétique, soit pour les deux raisons combinées. Cette analyse sera poursuivie avec des échantillons plus forts.

Mots clés : Evolution clonale, recombinaison, séquence codante exprimée, sélection naturelle, génome mitochondrial

---

**Subspecific phylogenetic analysis of *Trypanosoma cruzi* by studying coding expressed sequences and hypervariable sequences of kinetoplast DNA minicircles. Implications on this parasite's rate of clonal evolution and genetic recombination.**

Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, exhibit a considerable linkage disequilibrium, verified with many genetic markers (isoenzymes, RAPD, RFLP, microsatellites). This led to postulate that this parasites undergoes predominant clonal evolution with rare recombination events. However, this model has been challenged by the discovery of natural hybrids and the obtention of experimental hybrids.

In the framework of this debate, we have performed two complementary analyses of *T. cruzi* genetic diversity on a sample of strains representative of this diversity.

We have first studied the polymorphism of coding expressed sequences by purifying messenger RNAs and random aplification of the corresponding copy dans.

We have found a very strong statistical correlation between RADES genetic distances and those based on isoenzymes and RAPD. This correlation has been visually verified by the fact taht the RADES phylogenetic trees were very similar to those based on the other techniques. This shows that clonal evolution is preponderant enough to carve its print on the vast majority of the sequences of this parasite's genome., including expressed coding sequences, although they undergo natural selection. We have evidenced several coding expressed sequences specific of the species, of its genetic subdivisions and of its stages (epimastigotes, trypomastigotes, amastigotes). These sequences will be analyzed in details.

We have then sequenced the variable parts of kinetopast DNA minicircle. The obtained phylogenies were highly incoherent. This can be explained either because our sample was not sufficient enough to reval the dominant sequences or because of genetic recombination or both reasons. This analysis will be continued with broader samples.

Key word : Clonal evolution, recombination coding expresed sequence, natural selection, mitochondrial genome.

---