

PARASITOLOGIE ANIMALE. — Forte corrélation entre classification isoenzymatique et variabilité de l'ADN kinétoplastique chez *Trypanosoma cruzi*. Note de Michel Tibayrenc et Francisco José Ayala, présentée par François Jacob.

Nous avons étudié avec 14 enzymes de restriction le polymorphisme de l'ADN kinétoplastique chez 21 isolats de *Trypanosoma cruzi* préalablement classés en 19 génotypes différents par l'analyse de 15 loci isoenzymatiques. Nous avons trouvé une corrélation élevée ($p < 0,001$) entre la proportion de bandes (fragments) de restriction communes à deux isolats donnés, et les identités génétiques correspondantes, calculées à partir de données isoenzymatiques. Ainsi, les deux classifications se confirment-elles mutuellement, et ceci suggère fortement que les deux types de variabilité (ADNk et isoenzymes) ont des taux d'évolution proportionnels au temps (horloges moléculaires). Les classifications phylogéniques ainsi obtenues peuvent servir de base rationnelle aux études médicales et épidémiologiques. Quoique corrélés, les deux types d'analyse ne fournissent pas des résultats identiques, et sont donc complémentaires. Les valeurs obtenues pour les proportions de bandes (fragments) de restriction communes se répartissent, comme les distances génétiques, selon un continuum. Ceci semble confirmer que les populations naturelles de *T. cruzi* montrent un large éventail de génotypes plutôt qu'un nombre restreint de souches principales différant fortement les unes des autres.

ANIMAL PARASITOLOGY. — High correlation between isozyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*.

By means of 14 restriction enzymes, we have studied the kinetoplast DNA polymorphism in 21 *Trypanosoma cruzi* isolates previously classified into 19 different genotypes based on the analysis of 15 isozyme loci. We have found a high correlation ($p < 0,001$) between the proportion of restriction bands (fragments) common to any two given isolates and the corresponding genetic identities calculated from the isozyme data. This shows that the two classifications (kDNA and isozymes) corroborate one another and strongly suggests that the two types of variability are correlated with time (molecular clocks). The phylogenetic classifications so obtained can be used as rational bases for medical and epidemiological studies. Although they are correlated, the two types of analysis are complementary as they do not yield identical results. Like the isozyme genetic distances and genetic identities, the values obtained for the proportion of common restriction bands (fragments) exhibit a continuum. This seems to confirm that natural *T. cruzi* populations exhibit a wide range of genotypes rather than a few well-differentiated clusters of strains.

Morel et coll. ont introduit une méthode de classification des variants de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, méthode basée sur l'analyse de la variabilité de l'ADN kinétoplastique par endonucléases de restriction (analyse schizodémique) [1].

Nous avons par ailleurs proposé une interprétation génétique des zymogrammes de ce même parasite [2] ayant montré que ses populations naturelles étaient composées de clones diploïdes très diversifiés d'un point de vue génétique, la recombinaison génétique étant rare ou absente parmi eux ([3], [4]). Nous avons utilisé la distance génétique de Nei (D = nombre moyen de codons différents par gène entre deux populations) [5] pour quantifier les relations phylogéniques existant entre ces clones naturels ([4], [6]). Nous présentons ici les premiers résultats d'une comparaison entre cette classification isoenzymatique et une quantification de l'analyse schizodémique.

21 stocks de *Trypanosoma cruzi*, représentant 19 génotypes différents préalablement établis par l'analyse de 15 loci isoenzymatiques [4], ont été étudiés. La figure 1 montre un réseau de Wagner ([7], [8]) visualisant les relations phylogéniques entre les différents génotypes. Dans ce réseau, les numéros désignant les génotypes correspondent à ceux d'un travail antérieur [4]. Dans le présent échantillon, les génotypes 32 et 39 sont chacun représentés par deux isolats différents, les autres génotypes, par un seul isolat. Les méthodes utilisées pour la culture, la récolte et le stockage des parasites ont été décrites antérieurement [9]. L'isolement de l'ADN kinétoplastique du parasite a été conduit selon la méthode de Morel et coll. [1] avec quelques modifications. La richesse des échantillons en ADN a été estimée par visualisation directe de la fluorescence au bromure d'éthidium [10]. Une quantité d'ADN d'environ 2 à 5 μg a été utilisée pour chaque digestion. Les

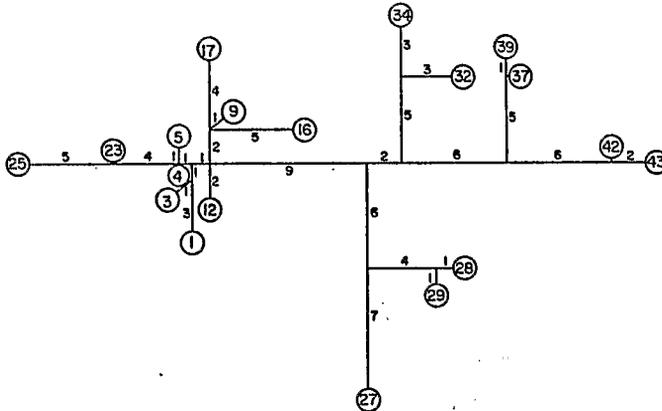


Fig. 1. — Réseau de Wagner ou « arbre sans racines » visualisant les relations phylogéniques entre 19 génotypes isoenzymatiques de *T. cruzi*. Les numéros entourés d'un cercle représentent ces génotypes. Ce numérotage suit celui d'un travail antérieur [4]. Les numéros placés le long des branches sont les distances « patristiques » ou évolutives qui séparent ces génotypes. La distance entre deux génotypes donnés s'obtient par la somme des distances patristiques qui les séparent.

Fig. 1. — An unrooted Wagner Network depicting the phylogenetic relationships among 19 *T. cruzi* isozyme genotypes. These genotypes are represented by the numbers inside a circle. This numbering is the same than the one of a previous work [4]. The numbers along the branches are the "patristic" or evolutionary distances among the genotypes. The distance between any two given genotypes is calculated by summing the patristic distances which separate them.

14 enzymes suivantes ont été utilisées pour la digestion de cet ADN : *AluI*, *AvaII*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HincII*, *HindIII*, *HinfI*, *HpaII*, *RsaI*, *Sau3A*, *TaqI*, *ThaI* et *XbaI*. Les électrophorèses ont été faites sur gel d'agarose à 1,2% (100 v, 2 h). Les gels ont été teints au bromure d'éthidium et photographiés. Le degré d'apparement entre deux isolats donnés a été estimé par la proportion de bandes communes à ces deux isolats, selon la formule : $F = 2N_{XY}/N_X + N_Y$, dans laquelle N_X et N_Y représentent respectivement le nombre de bandes dénombrées pour les isolats X et Y, et N_{XY} est le nombre de bandes communes à ces isolats [11]. Ce coefficient a été estimé en utilisant (i) trois enzymes : *EcoRI*, *HinfI* et *HpaII*; (ii) six enzymes : les mêmes, plus *AvaII*, *HaeIII*, et *HindIII*; (iii) 12 enzymes : la série complète sauf *RsaI* et *TaqI*, ces deux dernières enzymes donnant un nombre de bandes élevé dont le dénombrement est difficile. Le nombre de bandes observables étant de toutes façons assez élevé (voir fig. 2), nous n'avons pris en compte que les résultats obtenus pour des échantillons placés côte à côte sur le même gel. Ceci a limité notre analyse à 26 comparaisons par paires. Nous avons recensé toute bande visible, quelle que soit l'intensité de sa coloration.

La simple analyse visuelle des gels montre clairement que les isolats ayant entre eux une distance génétique isoenzymatique faible ou nulle^o présentent constamment des « patterns » de restriction très similaires (voir fig. 2), alors que le résultat contraire s'observe pour des isolats séparés par des distances génétiques fortes. Cette impression est amplement confirmée par le dénombrement des bandes. Nous avons mesuré la corrélation entre l'identité génétique I (qui est liée à la distance génétique D par la formule : $D = -\ln I$) et le coefficient F (proportion de bandes de restriction communes) pour nos 26 comparaisons par paires. Le résultat ($r=0,86$ avec 24 degrés de liberté, en utilisant les valeurs de F obtenues avec six enzymes de restriction) montre une corrélation

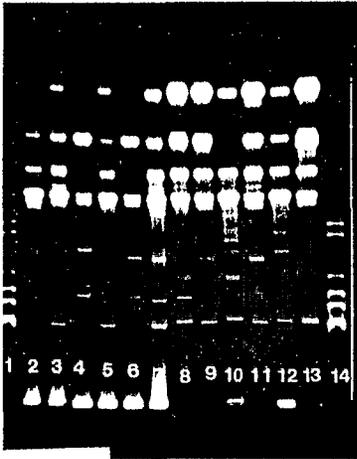


Fig. 2

Fig. 2. — Photographie d'un gel d'argose montrant la variabilité de l'ADN kinétoplastique (analyse schizodémique) chez différents génotypes isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*. Les échantillons 1 et 14 sont des marqueurs (phage λ digéré par l'enzyme de restriction *Hind*III). Les échantillons n° 2 à 7 ont été digérés par l'enzyme de restriction *Eco*RI. Les échantillons n° 8 à 13 ont été digérés par l'enzyme *Hae*III. Échantillons 2 et 8 = génotype isoenzymatique 29; échantillons 3 et 9 = génotype 9; échantillons 4 et 10 = génotype 39; échantillons 5 et 11 = génotype 17; échantillons 6 et 12 = génotype 37; échantillons 7 et 13 = génotype 12 (voir fig. 1). On peut voir que les génotypes 37 et 39, très apparentés par leurs isoenzymes, partagent un grand nombre de bandes de restriction communes, et que ces bandes montrent en général une intensité de révélation similaire.

Fig. 2. — Photograph of an agarose gel showing the kinetoplast DNA variability (schizodeme analysis) in a set of *T. cruzi* isozyme genotypes. Samples 1 and 14 are markers (phage λ digested with the restriction enzyme *Hind*III). Samples 2 to 7 were digested with the restriction enzyme *Eco*RI, samples 8 to 13 were digested with the enzyme *Hae*III. Samples 2 and 8 = isozyme genotype 29; samples 3 and 9 = genotype 9; samples 4 and 10 = genotype 39; samples 5 and 11 = genotype 17; samples 6 and 12 = genotype 37; samples 7 and 13 = genotype 12 (see Fig. 1). One can see that the closely related isozyme genotypes 37 and 39 share a high number of common restriction bands, and that these bands have generally the same staining intensity.

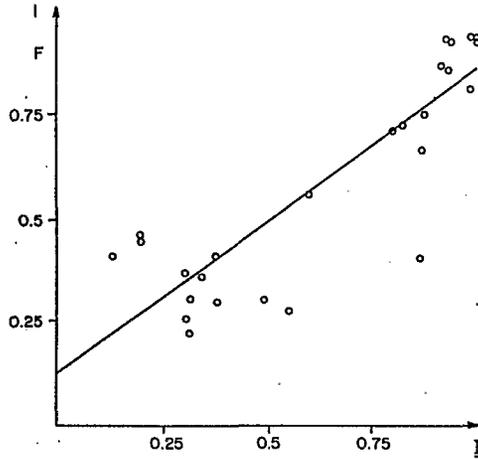


Fig. 3

Fig. 3. — Corrélation entre l'identité génétique *I* mesurée pour 15 loci isoenzymatiques et le coefficient *F* (proportion de bandes d'ADNk communes, obtenues par l'emploi de six enzymes de restriction). La corrélation porte sur 26 comparaisons par paires d'isolats de *T. cruzi*. L'équation de la droite est $F = 0,124 + 0,718 I$.

Fig. 3. — Correlation between genetic identity *I* calculated from 15 isozyme loci and coefficient *F* (proportion of common kDNA bands based on six restriction enzymes). The correlation involves 26 pairwise comparisons between *T. cruzi* isolates. The equation for the regression line is $F = 0,124 + 0,718 I$.

hautement significative entre *I* et *F* ($p < 0,001$). L'information fournie par les différentes enzymes de restriction semble assez redondante, puisque nous avons obtenu des coefficients *F* similaires, que l'analyse ait été conduite avec 3, 6 ou 12 enzymes. Dans les trois cas, la corrélation avec *I* donne un niveau de signification comparable. La figure 3 montre la droite de corrélation entre *I* et *F* obtenue avec six enzymes de restriction. Le nombre de comparaisons par paire étant inférieur à 30, nous avons complété cette analyse par un test non paramétrique de Spearman. Le résultat obtenu (*F* étant fondé sur l'emploi de six enzymes) confirme la forte corrélation entre *I* et *F* ($r' = 0,76$, $p < 0,001$).

L'analyse visuelle révèle également un autre élément de similitude de l'ADNk entre isolats similaires ou semblables quant à leurs isoenzymes : non seulement de tels isolats ont une forte proportion de bandes de restriction communes, mais encore ces bandes montrent-elles une intensité de coloration en général similaire (fig. 2). De tels résultats se prêtent bien sûr mal à une quantification.

A notre connaissance, ce travail représente le premier essai de quantification de l'analyse schizodémique chez *T. cruzi*. Les résultats sont d'autant plus significatifs que l'échantillonnage porte sur des situations épidémiologiques variées (cycles sylvestres et domestiques, isolats pratiqués chez des patients humains, chez des mammifères sauvages, chez des triatomes) et sur de grandes étendues géographiques (par exemple, les isolats représentant les génotypes 42 et 43 ont été pratiqués respectivement en Bolivie et au Chili). Nos données indiquent que les classifications basées sur la variabilité des isoenzymes et sur celle de l'ADNk se confirment l'une l'autre. Ceci suggère fortement que les deux types de variabilités considérés ici sont une fonction du temps (horloge moléculaire) et que les classifications ainsi obtenues sont « naturelles », phylogéniques, fournissant une base rationnelle pour les études médicales et épidémiologiques.

D'un autre côté, les deux méthodes donnent des résultats corrélés mais pas identiques, certaines comparaisons *I-F* étant même assez discordantes (fig. 3). Ceci peut s'expliquer par l'imperfection des méthodes ou par l'hypothèse que les ADN nucléaire (commandant la synthèse des isoenzymes) et kinétoplastique peuvent subir des pressions sélectives différentes. Les deux classifications apparaissent donc complémentaires, comme l'avaient déjà suggéré Morel et coll. [1].

Enfin, les valeurs obtenues pour le coefficient *F*, comme celles de *I* et *D*, se répartissent selon un continuum, tous les intermédiaires existant entre les résultats extrêmes. Ceci est en faveur de notre hypothèse [4] selon laquelle les variants naturels de *T. cruzi* ne se limitent pas à un nombre restreint de souches principales (principal zymodemes) très différentes les unes des autres ([12], [13]) : il semble au contraire qu'un large éventail de génotypes différents soient représentés parmi les clones naturels de *T. cruzi*, et qu'une approche typologiste de cette variabilité soit spécialement erronée.

Nous remercions B. Kahane (Institut Pasteur de Paris) de nous avoir conseillé utilement pour l'isolement de l'ADNk, et Clara Camacho (IBBA de La Paz en Bolivie) pour son aide technique efficace dans la récolte des isolats de *T. cruzi*. Nous remercions les scientifiques suivants pour certains des isolats de *T. cruzi* : J.-P. Dedet (Institut Pasteur de Cayenne), C. La fuente (CENETROP de Santa Cruz, Bolivie), F. Le Pont (IBBA de La Paz, Bolivie), D. Le Ray (IMT « Prince Leopold » d'Anvers, Belgique) et M. A. Miles (École de médecine tropicale de Londres, Angleterre). Nous remercions enfin H. Bellen et S. Shattuk (université de Davis, Californie) pour leur aide dans l'analyse informatique des données.

Reçue le 8 septembre 1986, acceptée le 15 décembre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. MOREL et coll., *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 77, 1980, p. 6810.
- [2] M. TIBAYRENC, M. L. CARIUO et M. SOLIGNAC, *Comptes rendus*, 292, série III, 1981, p. 623-625.
- [3] M. TIBAYRENC et coll., *Comptes rendus*, 293, série III, 1981, p. 207-209.
- [4] M. TIBAYRENC et coll., *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.*, 83, 1986, p. 115.
- [5] M. NEI, *Amer. Nat.*, 106, 1972, p. 283.
- [6] M. TIBAYRENC et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 1983, p. 76.
- [7] J. S. FARRIS, *Syst. Zool.*, 19, 1970, p. 83.
- [8] J. FELSENSTEIN, *Syst. Zool.*, 27, 1978, p. 401.
- [9] M. TIBAYRENC et D. LE RAY, *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 64, 1984, p. 239.
- [10] T. MANIATIS, E. F. FRITSCH et J. SAMBROCK, *Molecular cloning, a laboratory manual*, C.S.H. Laboratory, 1982, p. 468.
- [11] P. BOURSOT et F. BONHOMME, *Genet. Sél. Evol.*, 18, 1986, p. 73.
- [12] P. P. READY et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 1979, p. 238.
- [13] W. C. GIBSON et M. A. MILES, *Brit. Med. Bull.*, 41, 1985, p. 115.

M. T. et F. J. A. : Department of Genetics,
University of California, Davis, CA95616, U.S.A.:

M. T. : Adresse permanente : Entomologie médicale,
O.R.S.T.O.M., Miniparc, rue des Apothicaires, 34100 Montpellier.