

PARASITOLOGIE ANIMALE. — *Sur le statut taxonomique et médical des souches isoenzymatiques de Trypanosoma cruzi. Considérations sur la valeur systématique et immunogénique des différentes isoenzymes.* Note (\*) de Michel Tibayrenc, Lourdes Échalar, Frédérique Brénière, Jean-Loup Lemesre, Christian Barnabé et Philippe Desjeux, présentée par Pierre-Paul Grassé.

Les calculs de distances génétiques pour 45 isolats boliviens de *Trypanosoma cruzi* montrent l'absence de continuum parmi eux et permettent de distinguer deux groupes principaux, dont l'origine est peut-être une spéciation ancienne. La présence d'une certaine hétérogénéité au sein de chaque groupe nous conduit à proposer une terminologie d'attente : chaque variant isoenzymatique reçoit le nom de « zymosouche » sans préjuger de son importance médicale ou taxonomique.

Les relations entre classification biochimique et données médicales sont discutées. La valeur taxonomique des différentes isoenzymes est passée en revue. La valeur immunologique éventuelle de certaines d'entre elles (en particulier la glutamate déshydrogénase) est discutée.

ANIMAL PARASITOLOGY. — *On the Taxonomic and Medical Status of the Isozymic Strains of Trypanosoma cruzi. Reflexions on the Systematic and Immunological Value of Their Isoenzymes.*

*The genetic distance calculations for 45 Bolivian stocks of Trypanosoma cruzi show the lack of continuum among them and allow to distinguish two main groups, which origin is perhaps a passed speciation. The presence of some heterogeneity within each group leads us to propose a temporary terminology: each isozymic variant is called "zymostrain" without prejudging its medical or taxonomic importance.*

*The relationships between biochemical Taxonomy and medical data are discussed. The taxonomic value of the different isoenzymes is examined. The possible immunogenic properties of some of them (particularly Glutamate deshydrogenase) is discussed.*

Le statut taxonomique des souches isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi* [1] est actuellement imprécis. Un essai de taxonomie numérique basée sur une interprétation intuitive des zymogrammes a montré la présence au Brésil de trois variants principaux, et de quelques variants mineurs [2].

Nous avons reconsidéré récemment le problème avec l'interprétation génétique des zymogrammes : l'absence apparente de sexualité classique chez *T. cruzi* ([3], [4]) interdit d'appliquer à ce taxon la définition biologique de l'espèce. Cependant, l'utilisation des distances génétiques [5] proposée pour la Systématique des Flagellés [6] permet d'établir de réelles relations phylogéniques entre les souches. L'hypothèse d'une diploïdie chez *T. cruzi* ([7], [8]) semble pouvoir être étendue à toutes les souches isoenzymatiques du parasite [9]. Ceci confirme la possibilité des calculs de distances génétiques. Une première étude concernant un nombre restreint d'isolats avait permis d'éclaircir certains rapports entre souches brésiliennes et boliviennes sans rendre compte de la variabilité réelle de ces souches [10]. Le présent travail, portant sur un échantillonnage plus vaste, apporte de nouveaux éléments au problème de la variabilité génétique de *T. cruzi*.

Les 45 isolats étudiés proviennent de localités aux conditions écologiques variées (tableau I). Les méthodes d'isolement, de culture et d'électrophorèse sur acétate de cellulose sont décrites par ailleurs ([11], [12]). On a utilisé 10 systèmes enzymatique, soit 12 loci (tableau II).

Les calculs de distances génétiques ont fait appel à l'indice standard de Nei [5] avec les adaptations que nous avons proposées pour les Flagellés asexués ([6], [7]).

L'interprétation génétique des zymogrammes est donnée par le tableau II. Les distances génétiques sont montrées par le tableau III et la figure. On peut faire les observations suivantes :

— La variabilité est un phénomène assez discret : sur 45 isolats, on n'observe que 9 variants. De plus, 88 % des isolats appartiennent soit à la souche isoenzymatique 1, soit

à la souche 2, soit à des variants très proches de ces deux souches (n'en différant que par un allèle).

— Le dendrogramme montre la présence de deux groupes principaux. Or, pour un parasite asexué, on attendrait un *continuum* de souches [13]. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : (a) l'évolution de *T. cruzi* s'est faite uniquement par reproduction asexuée. Dans ce cas, il faut invoquer un effet fondateur drastique pour expliquer la présence de deux lignées séparées. Dans ce cas également, le résultat d'une reproduction asexuée chez un organisme diploïde devrait être une forte hétérozygotie [14]. Or, ce n'est pas le cas ici. Dans ce cas enfin, on s'explique mal la présence d'une diploïdie et le passage dans plusieurs cas d'un état homozygote à un autre [7] chez un organisme primitivement asexué. (b) L'absence de sexualité est un phénomène secondaire d'adaptation parasitaire.

TABLEAU I

Provenance des zymosouches, avec effectifs respectifs des isolats.  
Origin of the zymostrains, with respective numbers of stocks.

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

Tous isolats obtenus de *Triatoma infestans*, sauf : zymosouche 1c de Santa Cruz (*Triatoma sordida*); zymosouche 1b de Sucre (Homme); zymosouche 1a de l'Alto Beni (*Rhodnius pictipes*).

Chiwisivi : altitude 2 600 m; 60 km SE de La Paz; climat tempéré sec.

Sucre : altitude 2 600 m; 250 km SE de La Paz; climat tempéré sec.

Santa Cruz : altitude 400 m; 400 km E de La Paz; climat subtropical.

Yungas : altitude 1 600 m; 100 km E de La Paz; climat subtropical.

Alto Beni : altitude 1 000 m; 200 km NE de La Paz; climat subtropical.

Tupiza : altitude 2 600 m; 1 000 km S de La Paz; climat tempéré sec.

Tarija : altitude 1 600 m; 900 km S de La Paz; climat subtropical sec.

Ceci pourrait être dû à l'extension de la niche écologique du parasite qu'a occasionnée l'inféodation des triatomés vecteurs à l'Homme et leur pullulation. L'existence de deux groupes principaux pourrait alors avoir pour origine une spéciation classique antérieure à la perte de sexualité. Quelle qu'en soit l'origine demeure le fait de l'existence en Bolivie de deux subdivisions principales du taxon *T. cruzi*.

— Les distances génétiques observées entre les deux groupes sont très fortes. Bien qu'il soit hasardeux d'établir des relations entre valeurs de distances génétiques et niveau taxonomique, ces comparaisons sont légitimes pour des organismes apparentés. Ainsi, les valeurs observées ici sont très supérieures à celles qu'on relève entre *Trypanosoma brucei brucei* et *T. brucei gambiense* (Tait et Le Ray, communication personnelle) et similaires à celles qu'on observe entre « espèces » différentes de *Leishmania* [15]. Ceci suggère que les variants principaux que nous observons en Bolivie sont des entités taxonomiques réelles, des « agamospécies », un argument important étant fourni par la constance des souches

TABLEAU II

Interprétation génétique des zymogrammes; fréquences alléliques.  
*Genetic interpretation of the zymograms; allelic frequencies.*

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

PGM, phosphoglucumutase; PGI, phosphoglucose isomérase; 6PGD, 6 phosphogluconate déshydrogénase; PEP, peptidase; G6PD, glucose 6 phosphate déshydrogénase; ICD, isocitrate déshydrogénase; ME, malate déshydrogénase Nadp<sup>+</sup>; MDH, malate déshydrogénase Nad<sup>+</sup>; LAP, leucine aminopeptidase; GD, glutamate déshydrogénase Nadp<sup>+</sup>.

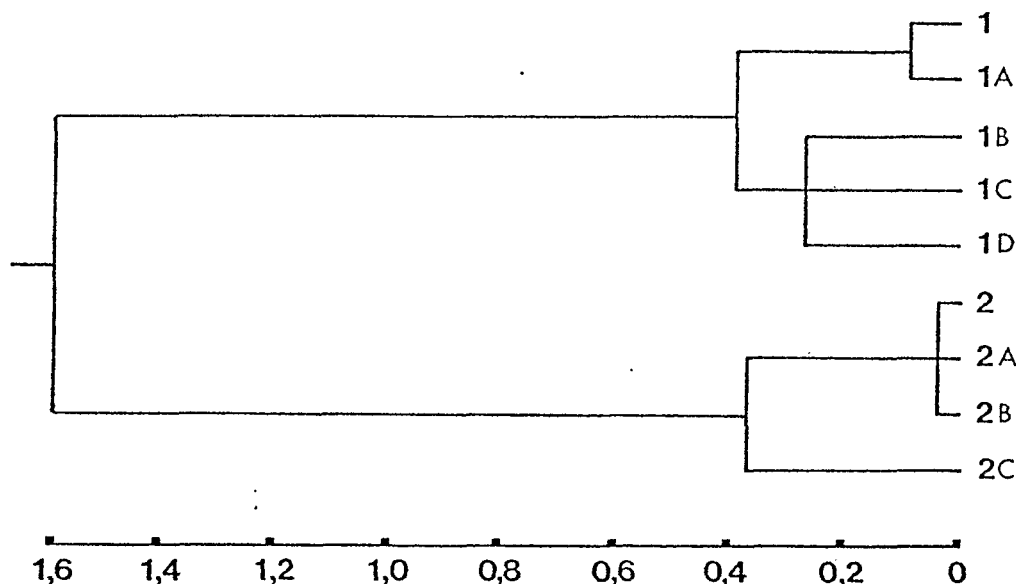
TABLEAU III

Matrice des distances génétiques entre les zymosouches.  
*Matrix of genetic distances among the zymostrains.*

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

isoenzymatiques 1 et 2 (ou 2a) sur des aires géographiques très vastes [10] (Tibayrenc et Dedet, en préparation; Tibayrenc et Le Ray, en préparation).

L'adoption d'une terminologie définitive est cependant interdite par l'existence d'une certaine hétérogénéité au sein de chaque groupe principal. Jusqu'à présent, le terme de « zymodème » en ce qui concerne *T. cruzi* désignait les souches enzymatiques « majeures » [16]. Il est difficile d'établir dès à présent cette distinction entre souches « majeures » et « mineures » tant que la variabilité réelle du taxon *T. cruzi* n'aura pas été appréciée par une étude extensive portant sur toute l'aire de répartition du parasite. D'autre part, le terme de zymodème prête à confusion, un dème désignant en Génétique des Populations une communauté panmictique, ce qui implique une sexualité. Nous proposons une terminologie d'attente aussi pragmatique que possible : chaque variant isoenzymatique reçoit le nom de « zymosouche » (abréviation : ZS) sans préjuger de son importance médicale ou taxonomique.



Dendrogramme des distances génétiques; seuls les premiers branchements donnent des valeurs exactes. Les branchements de rang supérieur donnent des distances génétiques moyennes.

Dendrogram of the genetic distances: only the first branchings give exact values. The following branchings give average genetic distances.

— La valeur taxonomique des différents loci n'est pas univoque : seuls MDH 2 et GD sont apparus constamment monomorphes pour tous les isolats étudiés. Ils semblent constituer de bons « loci-diagnostic » du taxon *T. cruzi* par rapport à d'autres parasites apparentés : *Trypanosoma cruzi marenkellei* et *T. rangeli* (Tibayrenc et Le Ray, en préparation). L'enzyme GD est monomorphe et très active chez *T. cruzi*. Son fort poids moléculaire et son taux élevé de synthèse pourraient logiquement lui conférer des propriétés immunogéniques. Si cette hypothèse se vérifie, le fait de connaître la nature biochimique d'un antigène devrait grandement faciliter sa purification. A part ces deux loci communs, les différentes zymosouches, et les deux groupes principaux peuvent être caractérisés aisément par plusieurs loci (tableau II). On relève le cas spécial de la ZS 1 b (un seul isolat) du groupe 1, qui présente l'aspect ME du groupe 2. Ce fait insolite ne suffit

pas à faire suspecter l'existence d'une sexualité classique (recombinaison de tout le génome) chez *T. cruzi*. Il est par contre compatible avec l'hypothèse d'une parasexualité (échange d'une petite fraction du génome).

Enfin, il faut souligner que la classification biochimique ne permet pas de prévoir *a priori* la distribution parmi les zymosouches de caractères médicaux importants tels que résistance aux drogues, pathogénie ou particularités épidémiologiques. Ces caractères sans doute adaptatifs peuvent relever de mécanismes génétiques différents de ceux qui sont impliqués dans l'évolution protéique. Les propriétés immunologiques des zymosouches, reflétant dans une certaine mesure l'évolution protéique, pourraient par contre recouper la classification enzymatique. Cela semble être le cas pour les *Leishmania* ([15], [17]).

La présente étude montre que la variabilité enzymatique de *T. cruzi* en Bolivie ne constitue pas un continuum, mais permet de définir deux groupes principaux. L'hétérogénéité de ces groupes nous dissuade d'adopter dès à présent une terminologie définitive. Seule une étude extensive de la variabilité enzymatique de *T. cruzi* sur toute son aire de répartition permettra de dégager des lois générales.

La classification par distances génétiques du taxon *T. cruzi* demeure la plus rigoureuse du point de vue phylogénique. Elle devrait servir de référence à toutes études appliquées concernant ce parasite. Il en va de même pour des parasites proches posant des problèmes taxonomiques comparables : Trypanosomes africains, Leishmanies. Cependant, les résultats de cette classification biochimique doivent être confrontés de façon rigoureuse aux faits médicaux, le parallélisme n'étant pas *a priori* obligatoire entre les deux types de données.

Le Docteur Carlos La Fuente du Cenotrop de Santa Cruz nous a aimablement fourni la souche I b.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide de la Coopération Technique française (Ministère des Affaires étrangères) et l'aide de la Direction générale à la Recherche scientifique et technique, n° d'aide : PVD/81/L-1423.

(\*) Remise le 10 janvier 1983, acceptée le 31 janvier 1983.

[1] M. A. MILES et coll., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 1977, p. 217.

[2] P. D. READY et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 1980, p. 238.

[3] M. TIBAYRENC et coll., *Comptes rendus*, 293, série III, 1981, p. 207.

[4] M. TIBAYRENC et coll., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (soumis pour publication).

[5] M. NEI, *Amer. Nat.*, 106, 1972, p. 283.

[6] M. TIBAYRENC, *Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Ent. méd. Parasitol.*, 3, 1981, p. 207.

[7] M. TIBAYRENC et coll., *Comptes rendus*, 292, série III, 1981, p. 623.

[8] D. E. LANAR et coll., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 1981, p. 327.

[9] J. L. LEMESRE et M. TIBAYRENC, *Exp. Parasitol.* (soumis pour publication).

[10] M. TIBAYRENC et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1982 (sous presse).

[11] M. TIBAYRENC et coll., *Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Ent. méd. Parasitol.*, 1982 (sous presse).

[12] M. TIBAYRENC et coll., *Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Ent. méd. Parasitol.*, 1982 (sous presse).

[13] J. GÉNÉRMONT, *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 38, 1976, p. 375.

[14] J. GÉNÉRMONT, *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 40, 1980, p. 287.

[15] G. LANOTTE et coll., *Ann. Parasitol.*, 56, 1981, p. 575.

[16] M. A. MILES et coll., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75, 1981, p. 667.

[17] D. AFCHAIN, *Thèse Sc.*, Lille, 1976.

I.B.B.A.-O.R.S.T.O.M., Embajada de Francia, Casilla 824, La Paz, Bolivia.